: 30 2 2003
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 30, No. 2, 2003, 6

동결보존된 생쥐 고환조직 세포의 광학 및 전자현미경적 관찰

삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실[1], 산부인과[2], 순천향대학교 생명과학과[3]

한상철[1] · 송상진[1] · 이선희[1] · 오승한[3] · 궁미경[2] · 박용석[1]

Light and Electron Microscopic Observation in the Frozen-thawed Mouse Testicular Tissues

Sang Chul Han[1], Sang Jin Song[1], Sun-Hee Lee[1], Seung Han Oh[3], Mi-Kyung Koong[2], Yong-Seog Park[1]

[1]Laboratory of Reproductive Biology and Infertility, [2]Department of Obstetrics & Gynecology, Samsung Cheil Hospital & Women's Healthcare Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, [3]Department of Life Science, College of Natural Science Soonchunhyang University, Asan, Choongnam, Korea

Objective: The aim of this study was to investigate the morphological aspects of testicular tissue before and after freezing-thawing by light and transmission electron microscopy.

Methods: Tissue biopsies were carried out on mouse testis for freezing. Samples in medium containing 20% glycerol were frozen by computer-controlled freezing program. The effect of freezing-thawing on the structural change of testicular tissues were examined by light and electron microscopy.

Results: The freezing-thawing procedure had no significant effect on tubular diameter. However, it caused folding of the lamina propria, and notable damage to Sertoli cells, spermatogonia and spermatocytes. The cells were detached, desquamated from the basal lamina and had increased vacuolization. Round spermatids, elongated spermatids and spermatozoa were less affected, and most of them maintained their normal structure.

Conclusions: The structure of spermatogonia, spermatocyte and basal compartments in seminiferous epithelium was significantly altered by freezing-thawing procedure of mouse testicular tissues. Thus, we need to develop a more reliable method for the cryopreservation of testicular tissues.

Key Words: Freezing-thawing, Ultrastructure, Testicular tissues, Seminiferous tubule

고환조직 정자채취술과 세포질내 정자주입술은 정자를 채취할 수 없거나 정자를 채취하였으나 활동성이 없어 수정에 부적합한 정자를 지닌 폐쇄성 무정자증 환자와 정자성숙부전으로 인한 비폐쇄성 무정자증 환자에게 수정률 및 임신율을 높일 수 있는 매우 유용한 방법이다.[1-5] 그러나 임신에 도달하지 못했을 경우 차기 IVF-ET 시술에 다시 고환조직을 절개해야 하는 문제가 발생한다. 반복적인 고환

연락저자: 한상철, 우) 100-380 서울특별시 중구 묵정동 1-19, 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실
Tel: (02) 2000-7641, Fax: (02) 2265-5621, e-mail: sch-han@hanmail.net
주관책임자: 박용석, 우) 100-380 서울특별시 중구 묵정동 1-19, 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실
Tel: (02) 2000-7592, Fax: (02) 2265-5621, e-mail: arkangel@daum.net
본 연구는 2003년도 제일의료장학재단 연구비 지원으로 이루어진 것임.

조직의 절개는 고환조직의 손상에 따른 정자세포의 회수 및 이용가능성을 낮춘다. 따라서 고환조직의 동결보존은 임신에 실패하였을 경우 반복적, 다중적 고환조직 정자채취술 없이 고환 정자를 이용할 수 있으므로 고환조직의 손상 및 경제적 부담을 줄일 수 있다.[6~10]

동결보존 시 빙점온도에 도달하면 세포막 밖에서 먼저 빙결정이 형성되고 이로 인한 삼투압 차에 의해 세포내 탈수현상이 일어나게 되며 세포는 수분이 방출된 상태로 동결되어 세포내에 형성되는 빙결정으로 인한 냉해를 막을 수 있다. 그러나, 빙점온도에서 빙결정이 형성될 때 수분과 전해질이 분리되어 장해가 유발되며 탈수현상으로 인한 세포막 손상이 야기되는데 이러한 냉해를 최소화하기 위하여 동결보호제 첨가는 필수적이다.

동결보호제는 친수성과 유해성이 적어야 한다는 두 가지 기본 조건을 만족하는 glycerol, DMSO (dimethyl sulfoxide) 등이 사용되고 있다. Glycerol은 동결보존액의 빙점온도를 낮추고 전해질의 농도를 줄이며 온도의 변화나 pH를 유지시킴으로써 냉해를 방지하며 정자 동결에 가장 효율적인 것으로 알려져 있고, DMSO는 glycerol 보다 세포막에 대한 투과성이 높아 쥐나 인간의 수정란을 동결하는데 효과적이며 줄기세포 등의 동결에 널리 사용되고 있다.[11,12]

IVF-ET 시술에 사용하기 위한 고환조직의 동결 시, 주요 대상세포는 융해 후 사용할 정자세포이므로 정자 동결에 효과적이라고 알려져 있는 glycerol을 주로 사용하고 있다. 본 연구에서도 동결보호제로 glycerol을 사용하여 고환조직을 동결-융해 후, 광학 및 전자현미경을 이용하여 조직상태 및 세포 미세구조의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 생쥐 고환조직 준비

10주령 된 생쥐를 경추이탈로 희생시킨 후, 고환을 적출하여 0.4% HSA가 첨가된 Ham's F-10/HEPES 배양액에서 세정관을 분리하였다. 분리된 세정관은 DMEM/F-12에 20% glycerol을 첨가한 동결보존액에 넣어 동결하였다.

2. 동결 및 융해 방법

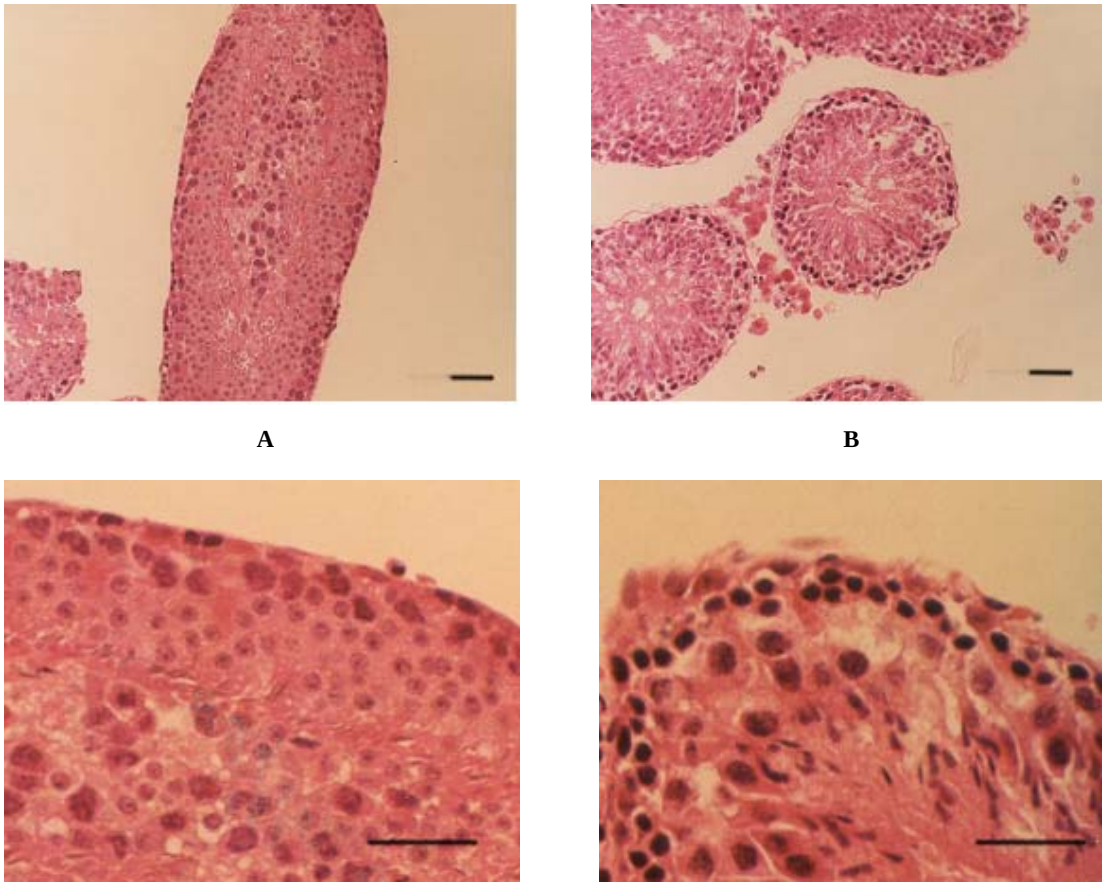
대조군은 동결-융해하지 않은 생검조직을 사용하였으며 실험군은 동결보존한 조직을 사용하기 위하여 computer-controlled freezing program을 이용하여 동결하였다. 준비된 세정관을 cryovial에 넣고 20℃에서 4℃까지 -0.5℃/min의 속도로 냉각 후, -10℃/min의 속도로 -90℃까지 냉각하여 LN_2에 보관하였다. 융해는 vial을 LN_2에서 꺼낸 후, 흐르는 물에 1분간 정치 후 37℃ 항온수조에 10분간 정치하였다. 동결보호제 제거는 동결-융해한 세정관이 들어있는 동결보존액에 0.4% HSA가 들어있는 Ham's F-10을 2배 이상의 양으로 천천히 희석하고 상층액을 제거하여 실시하였다.

3. 광학현미경 표본 제작

동결-융해 후 생쥐 정소조직의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 광학현미경 표본을 제작하였다. 생검 및 동결-융해를 실시한 세정관을 phosphate buffer로 수세하여 조직내에 남아있는 고정액을 제거하였다. 이후 50% 알코올에서부터 무수 알코올까지 농도 상승순으로 탈수하고 xylene으로 치환하였다. 파라핀 침투 및 포매과정을 거쳐 제작된 시료를 회전형 박절기를 사용하여 7~8 μm 두께로 박절하고 hematoxylin과 eosin으로 이중염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

4. 전자현미경 표본 제작

동결-융해 후 생쥐 정소의 미세구조적 특징을 관찰하기 위하여 전자현미경 표본을 제작하였다. 생검 혹은 동결-융해를 실시한 세정관을 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)로 보정된 4% glutaraldehyde 용액 1 ml에 10분간 고정하고 1 mm^3의 크기로 세절한 후 동일 고정액에 전고정하였으며 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)로 조정된 1% OsO_4에서 90분간 후고정하였다. 탈수과정은 50% 알코올에서 무수 알코올 농도 순으로 실시하였으며 치환 및 포매는 propylene을 두번 처리 후 propylene : epon (1 : 1)에 12시간 치환하고 Epon 812에 포매하였다.



A **B**

C **D**

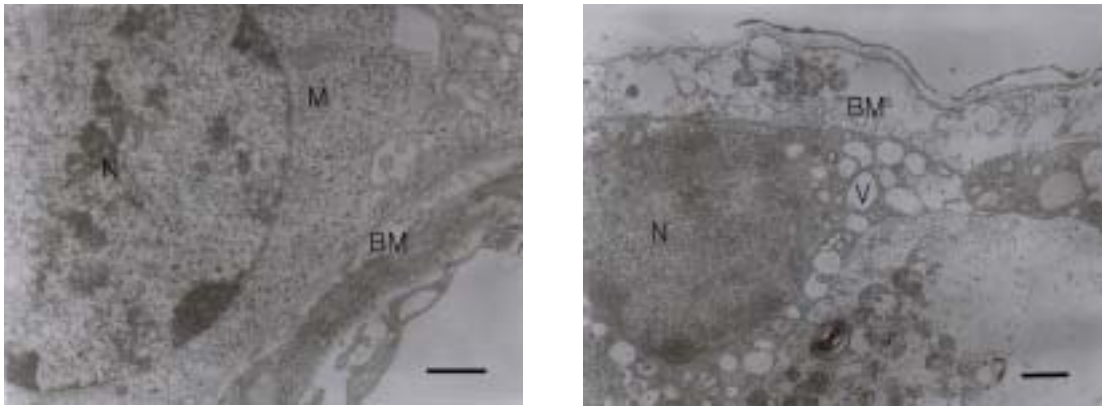
Figure 1. Light micrographs of seminiferous tubules. (**A**, and **C**) Seminiferous tubule before the freezing-thawing procedure. The tubule is surrounded by the gentle lamina propria within the basal tubular compartment, spermatogonia and the major part of Sertoli cells. In the apical tubular compartment spermatocytes and round and elongated spermatids are visible. (**B**, and **D**) Seminiferous tubule after the freezing-thawing procedure. Within the seminiferous epithelium, the 'gap' is extended from the basal to the apical compartment. Some spermatogonia and Sertoli cells are detached from the basement membrane. Sertoli cell cytoplasm is displayed many vacuoles of different size. Most of the cells in basal compartment are shrunken and divided from the apical part of the seminiferous epithelium by gaps. Round and elongated spermatids seem to be mostly preserved (Bar = 50 μm).

5. 광학현미경적 관찰

동결-융해 후 정소조직의 형태적 특징은 lamina propria의 두께, 세정관의 직경, Sertoli cell의 형태를 중심으로 관찰하였다. 각 spermatogonia의 세포질과 핵의 형태 그리고 막의 손상 여부를 동결-융해 전후 각각의 조직들에서 실시하였다.

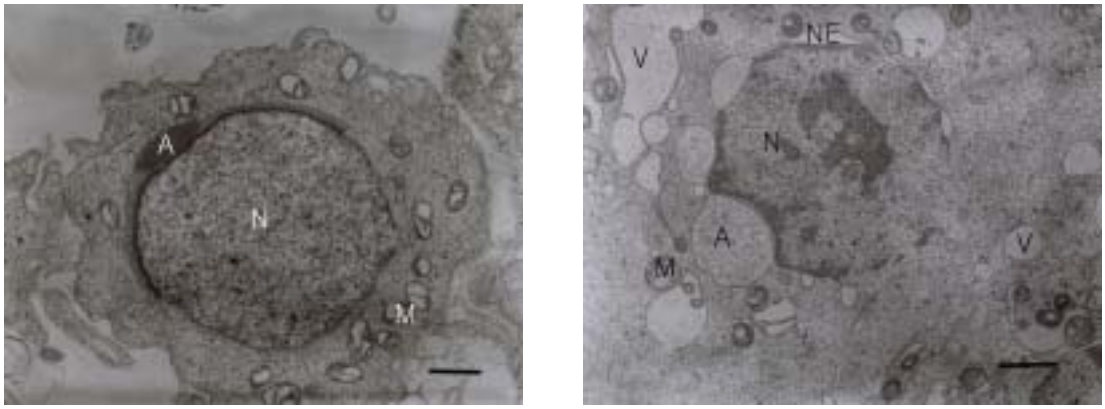
6. 전자현미경적 관찰

Diamond knife를 사용하여 생검 및 동결-융해를 실시한 세정관을 75 nm로 초박절편하였고 생성된 절편은 copper grids 위에 얹어 uranyle acetate와 lead citrate로 이중염색을 실시하였다. 세정관내의 lamina propria, spermatogonia, spermatocyte, spermatid, spermatozoa를 관찰하였으며, 각각의 세포들의 핵막의 손상 여부, 핵막의 확장 여부 뿐만 아니라 첨체막과 첨체 물질의 존재 여부를 기록하였다. Equatorial segments와 postacrosomal region의 정상 혹은 확장 여부는 elongated spermatids와 spermatozoa에서 관찰하였다.



A **B**

Figure 2. Electron micrographs of spermatogonia and basement membrane. **(A)** Spermatogonia and basement membrane before the freezing-thawing procedure. The tubular lamina propria is consisted of one layer of gentle peritubular (myoid) cells facing the basement membrane of the seminiferous epithelium. Spermatogonia are located on the basal lamina of the tubule. **(B)** Spermatogonia and basement membrane after the freezing-thawing procedure. Spermatogonia shows detachment, desquamation from the basement membrane, and increased vacuolization. N = nucleus; M = mitochondria; V = vacuole; BM = basement membrane; Bar = 1 μm



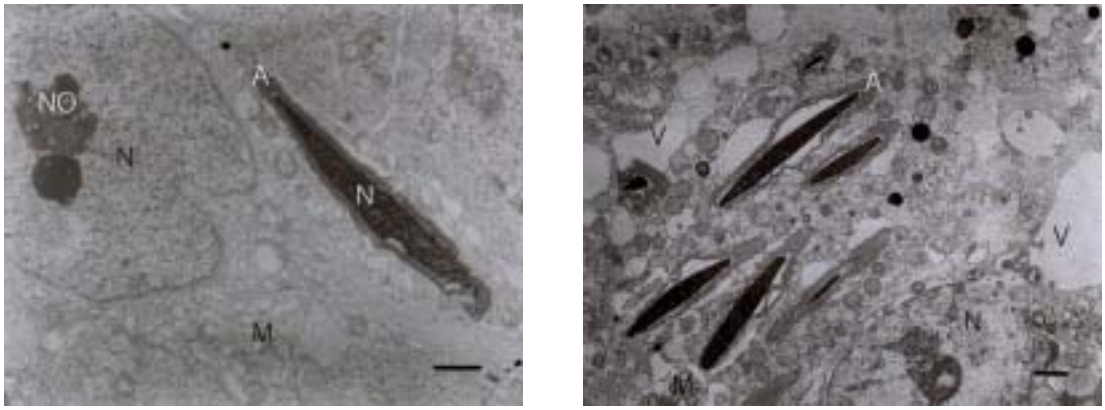
A **B**

Figure 3. Electron micrographs of early-stage spermatids. **(A)** Early-stage spermatid before the freezing-thawing procedure. The nuclear envelope is thickened over the whole area of the contact with the acrosomal vesicle by a thin electron-dense layer of perinuclear theca. The acrosomal granule is present as a small electron-dense mass. Mitochondria are found at the cell periphery. Endoplasmic reticulum are visible in the cytoplasm, close to electron-dense granules. **(B)** Early-stage spermatid after the freezing-thawing procedure. The nucleus clumping of chromatin is observed which suggests a degenerative process. Nuclear membrane is disrupted and swollen. The acrosomal granule is not visualized in this cell. A = acrosome; N = nucleus; NE = nuclear envelope; M = mitochondria; V = vacuole; Bar = 1 μm

결 과

1. 광학현미경적 관찰

융해 후 세정관의 직경은 동결-융해에 따른 차이는 발견되지 않았다. Lamina propria는 융해 후, 생검조직에 비해 현저하게 비대해져 있었다. 세정관에서 lamina propria의 inner layer와 germinal epithelium의 basal layer 사이의 경계면이 비규칙적이고 파괴된 것을 관찰할 수 있었다. Sertoli cell 세포질



A **B**

Figure 4. Electron micrographs of spermatozoa. **(A)** Spermatozoa before the freezing-thawing procedure. The chromatin is fully condensed. The acrosomal matrix is clearly present covering most of the sperm head. **(B)** Spermatozoa after freezing-thawing procedure. The inner acrosomal membrane, outer acrosomal membrane and plasma membrane are swollen. A = acrosome; N = nucleus; NO = nucleolus; M = mitochondria; V = vacuole; Bar = 1 μm

에서는 투명한 공포들이 증가된 것이 관찰되었으며 spermatogonia, spermatocytes, early spermatids의 핵은 확장 또는 위축되어 있었다. 모든 세포의 세포질에서 공포가 관찰되었지만 대조군에서는 관찰되지 않았다. Late spermatids와 spermatozoa 일부는 seminiferous epithlium의 박리된 세포 사이에서 발견되기도 하는 반면 다른 세포들은 세정관의 정상적인 위치에 존재하고 있었다 (Figure 1).

2. 전자현미경적 관찰

1) Lamina propria

대조군은 seminiferous epithelium의 basement membrane에 peritubular cells (myoid)가 한층 존재한 반면 동결-융해한 조직에서는 lamina propria가 folding 되고 파괴된 현상을 관찰하였다 (Figure 2).

2) Sertoli cells

대조군에서는 Sertoli cell이 seminiferous epithelium의 basement membrane에 부착되어 있었으며, 난형의 핵과 뚜렷한 인이 관찰되었고 세포질은 적은 수의 공포와 지방적이 존재하였다. 실험군에서는 Sertoli cell이 basement membrane으로부터 떨어져 있었으며 핵막은 확장되고 일부 파괴된 것을 관찰할 수 있었고, 세포질은 공포가 증가하는 것으로 관찰되었다.

3) Spermatogenic cells

대조군에서 spermatogenic cell들은 규칙적인 형태를 보여주었다. Spermatogonia는 basement membrane의 윗층인 basal tubular compartment에서 관찰되었다. Spermatocytes와 round, elongated spermatids는 차례로 lumen 쪽을 향하여 존재하고 있었다. 상위의 모든 세포들은 Sertoli cell의 세포질에 의하여 둘러싸여 있으며 적당한 수의 지방적 공포와 잔사체를 포함하고 있었다.

동결-융해과정에서 발생된 손상은 basal compartment 즉, spermatogonia와 Sertoli cell에서 보다 현저히 나타났다. Spermatogonia는 basement membrane으로부터 떨어져 있으며 공포의 증가와 핵 손상을 관찰할 수 있었고 세포질의 확장 또는 위축도 나타났다. Sertoli cell과 spermatogonia는 basement membrane과 lamina proporia로부터 넓은 간격으로 떨어져 있었다 (Figure 2). Spermatocyte는 basal tubular compartment에 근접해 존재하고 박리, 공포, 확장, 위축 등의 형태적 변화 양상은 spermatogonia와 유사하나 변화 정도는 적은 것으로 관찰되었다. Round spermatids와 elongated spermatids는 동결-융해에 의한 손상은 적은 편이었으나 round spermatids의 박리와 핵 손상이 일부 관찰되었고 확장 또는 위축은 산발적으로 관찰되었다 (Figure 3). Elongated spermatids/spermatozoa는 형태가 매우 잘 보존되어 있었다. 박리 및 핵 손상은 관찰되지 않았으며, 가장 많이 관찰된 형태적 변화는 세포질 공포의 증가였다. Elon-

gated spermatids/spermatozoa는 spermatogonia와 spermatocyte에 비해 확장 또는 위축의 정도가 심하지 않았다. Spermatozoa의 두부에서 많이 관찰된 미세구조 변화는 첨체의 확장현상으로 일부 첨체와 세포막이 파괴되기도 하였다. Spermatozoa의 꼬리에서 세포질/세포소기관의 확장과 공포가 관찰되기도 하였으나 미세소관과 미세섬유의 배열상의 특성들은 영향을 받지 않았다 (Figure 4).

고 찰

IVF-ET 시술 주기에 무정자증으로 인한 testicular biopsy를 실시한 후, 다음 주기의 TESE/ICSI 시술에 대비하여 여분의 testicular biopsy를 동결보존하는 경우가 점차 늘어나고 있으나 동결보존 과정과 다양한 동결보존액이 고환조직에 미치는 효과에 대한 보고는 적은 편이다.

Nogueira 등 (1999)은 Test-yolk buffer에 동결보호제로 12% glycerol을 첨가하여 인간의 세정관을 동결-융해한 후 그 영향을 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 관찰하였다.[13] 이 연구에서 round (early) spermatids를 포함하여 spermatogenic cell과 Sertoli cell의 핵 확장 또는 위축, 세포질의 공포 증가, 세포막 파괴 등을 보고하였다. 본 연구의 결과는 위 보고의 결과와 일치하며 동결-융해 시 가장 손상을 받는 부분은 spermatogonia, spermatocytes, Sertoli cells, basal tubular compartment이었으며, spermatids와 spermatozoa는 동결-융해에 비교적 손상을 적게 받았다. 위의 결과는 spermatogonia, spermatocytes, Sertoli cells, basal tubular compartment는 많은 세포질을 지니고 있으며 spermatids와 spermatozoa는 비교적 적은 세포질을 지님에 의한 것으로, 동결-융해 시 빙결정의 형성, 염분의 농도 증가, 온도와 삼투압의 변화에 의해 세포질은 쉽게 손상을 받을 수 있기 때문에 각각의 세포마다 지니고 있는 세포질의 양에 의하여 상대적인 손상이 나타나는 것으로 사료된다. 즉, Spermatogonia, spermatocytes, Sertoli cells, basal tubular compartment는 세포질이 풍부한 세포들이므로 동결-융해 시 손상을 쉽게 받을 수 있는 것이며 spermatids와 spermatozoa는 비교적 세포질이 적으나 spermatids의 첨체와 세포질 그리고 spermatozoa의 mid-piece의 세포질과 mitochondria에서 손상을 받을 수 있다. 이는 Ben-Yosef 등 (1999)의 연구와도 일치한다.[14]

결론적으로 동결-융해의 손상을 관찰하기 위해 동결보호액에 저장한 생쥐의 세정관을 형태학적으로 분석한 결과, 동결-융해가 세정관의 직경에 큰 영향을 미치지는 않았으나 lamina propria의 folding, Sertoli cell, spermatogonia, spermatocytes에는 큰 손상을 주었다. 반면에 round spermatids, elongated spermatids, spermatozoa는 비교적 손상이 적었다. 즉, 동결-융해과정은 세정관내의 세포들에 손상을 주었으며, 특히 basal compartment 부분에 많은 손상을 주었다. 따라서 인간 고환조직의 동결-융해 후 보다 향상된 수정률과 임신율을 얻기 위해서 동결-융해 후 basal compartment 부분의 손상을 최소화하기 위한 동결보호제 및 동결-융해 방법의 개선이 요구된다.

참 고 문 헌

1. Bourne H, Watkins W, Speirs A, Baker H. Pregnancies after intracytoplasmic injection of sperm collected by fine needle biopsy of the testis. Fertil Steril 1995; 64: 433-6.
2. Crister JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa III. The effect of cryoprotectants on motility. Fertil Steril 1998; 50: 314-20.
3. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, et al. Pregnancy after fretilization with human testicular spermatozoa. Lancet 1993; 342: 1237.
4. 박용석, 전진현, 변혜경, 김종현, 서주태, 이유식 등. 고환조직 정자채취술과 세포질내 정자주입술을 이용한 고환조직 정자의 수정률과 임신율. 대한불임학회지 1997; 24: 101-9.
5. Borini A, Sereni E, Bonu MA, Flamigni C. Freezing a few testicular spermatozoa retrieved by TESA. Mol Cell Endo 2000; 169: 27-32.
6. Oates RD, Mulhall J, Burgess C, Cummingham D, Carson R. Fertilization and pregnancy using inten-

tionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1997; 12: 734-9.
7. Liu J, Nagi Z, Goossens A, Touraye H, Camus M, Van Steirteghem A, et al. Pregnancy after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1995; 10: 1457-60.
8. Craft I, Sirigotis MT. Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa. Hum Reprod 1995; 10: 1623-7.
9. 박용석, 전진현, 이호준, 강인수, 김종현, 이유식 등. 동결-융해 후 회수된 고환 정자와 세정관내 정자의 수정능력과 효율성에 관한 연구. 대한불임학회지 1998; 25: 171-7.
10. 박용석, 이형송, 변혜경, 염혜원, 송상진, 임천규 등. 폐쇄성 무정자증 환자의 신선고환조직 정자와 동결고환조직 정자의 운동성이 임신율에 미치는 영향. 대한불임학회지 2001; 28: 155-60.
11. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after verification and dehydration at low temperature. Nature 1949; 164: 666-76.
12. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. Wiley-Liss, New York. 1994: 253-65.
13. Nogueira D, Bourgain G, Van VG, Steirteghem AC. Light and electron microscopic analhysis of human testicular spermatozoa and spermatids from frozen and thawed testicular biopsies. Hum Reprod 1999; 14: 2041-9.
14. Ben-Yosef D, Yogev L, Hauser R, Yavetz H, Azem F, Yovel I, et al. Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1999; 14: 1794-801.