

흰쥐 정소의 방사선 조사에 따른 정자변화의 영상처리에 의한 정량분석

나수경*, 김성인**, 이언석*

김천대학교 간호보건대학 방사선학과*, 김천대학교 간호보건대학 임상병리학과**

The quantitative analysis by the image processing of sperm changes according to the radiation irradiation of white rat testicle

Soo-Kyung Na*, Sung-In Kim**, On-Seok Lee*

Dept. of Radiological Science, Gimcheon University*

Dept. of Biomedical Laboratory Science, Gimcheon University**

요 약 본 연구는 흰쥐의 정소에 방사선을 조사하였을 때 시간이 경과함에 따라 나타나는 정소세포 및 정자의 변화를 현미경학적으로 얻은 영상을 기초로 영상처리에 의한 정량분석을 통하여 정자의 변화에 대한 결과를 정량화함으로써 더 정확하고 객관적인 결과를 얻고자 하는데 그 목적을 두고 있다. 연구에는 8주 수령의 흰쥐를 대상으로 하였으며, 6 MV의 X선을 1회 2 Gy를 전신 조사하였다. 총 30 마리의 흰쥐를 대상으로 방사선을 조사하지 않은 정상대조군과 실험군을 조사 즉시, 조사 2시간, 4시간, 8시간, 24시간 후에 각 실험군 마다 5마리의 정소를 각각 적출하였다. 적출 후 Periodic acid Schiff 염색을 시행하여 정상대조군과 실험군에서의 정소세포와 정자의 상태를 관찰하였다. 방사선조사 후 24시간까지, 정소세포 수와 정자수가 점차 감소하는 것을 정성적 및 정량적으로 유의함을 확인하였다.

주제어 : 방사선 조사, 정자, 조직화학적영상, 영상처리, 정량분석, 흰쥐

Abstract This study aims to get more accurate and objective result by quantifying the result for the sperm changes through the quantitative analysis by the image processing based on the image obtained microscopically for the testicle cell and sperm change appeared with the passage of time when the radiation is irradiated to the white rat testicle. This study has targeted the white rat of 8 weeks lifespan, the X-ray of 6 MV with 1 time of 2 Gy has been irradiated to the whole body. The testicles of 5 rats at each test group immediately after irradiation, after 2 hours of irradiation, 4 hours, 8 hours and 24 hours has been respectively extracted targeting all 30 white rats of normal control group not irradiated by the radiation and the test group. The state of testicle cell and sperm has been observed in the normal control group and the test group by implementing Periodic acid Schiff dyeing after extraction. 24 hours after irradiation, a gradual decrease in sperm count and testicular cells qualitatively and quantitatively that were identified as significant.

Key Words : Radiation Irradiation, Sperm, Histochemical Image, Image Processing, Quantitative Analysis, White Rat

Received 20 March 2014, Revised 15 May 2014

Accepted 20 June 2014

Corresponding Author: On-Seok Lee(Dept. of Radiological Science, Gimcheon University)

Email: on-seok@hanmail.net

ISSN: 1738-1916

© The Society of Digital Policy & Management. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

방사선이 생체에 조사되면 물리적인 과정과 화학적인 과정, 그리고 생물학적인 과정을 거치면서 세포에 변화가 일어나게 된다. 특히 인간 및 쥐의 정소는 방사선에 가장 민감한 장기에 속하며 방사선 조사 시 그의 형태 및 기능변화에 영향을 주게 되어 정소세포에 이상을 초래하게 된다[1,2]. 또한 방사선 조사에 의해 방사선선량 및 일정 시간이 경과함에 따라 정자 수의 감소 및 무정자증을 유발할 수 있게 된다[3].

기존의 선행연구에서는 방사선 조사 후 나타나는 생물학적인 변화를 평가하는 방법으로 조직화학적 염색에 의한 현미경으로 관찰하는 것이 일반적인 방법이다. 최근에는 생물학적인 변화를 영상처리에 의해 정량적 분석을 하므로 보다 구체적이고 객관적인 평가를 요구하고 있다.

본 연구는 방사선 조사 후 즉시, 2, 4, 8, 24시간 까지 시간이 경과하는데 따른 현미경학적으로 얻어진 영상자료를 토대로 영상처리에 의해 정량분석을 함으로서 보다 객관적인 평가결과를 얻었으며 이를 통계적으로 분석하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 실험동물 및 실험설계

Rat(male, 250 ± 20 g, Sprague-Dawley)은 한국 썬타코로부터 구입하였으며, 구입 후 1일간 계류시켜 적응시킨 다음 실험에 사용하였다.

실험동물의 사육은 온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 40~60%, 명암 주기는 12시간 조건에서 실시하였다. 사료는 퓨리나사로 충분히 공급하였으며, 식수는 제한 없이 공급하였다.

정상대조군과 실험군은 총 30 마리의 동물을 각 군 5마리씩, 6군으로 구성하였다.

즉, G1(정상대조군), G2(조사 즉시), G3(조사 2시간 후) G4(조사 4시간 후), G5(조사 8시간 후), G6(조사 24시간 후)로 구성하여 실험하였다[4].

2.2 방사선 조사

실험 방법으로 흰쥐는 케이지에 5마리씩 나누어서 총

25마리를 5그룹으로 나누어 조사하였다. 정소에 선량을 2 Gy를 조사하기 위해 선형가속기 ONCOR Expression(Siemens, Germany)를 이용하여 에너지 6 MV X선을 선량률 300 R/min, 조사면 40×40 cm, D_{\max} 1.2 cm, output factor 1.12를 설정하여 모니터선량 183 MU를 조사하였다.

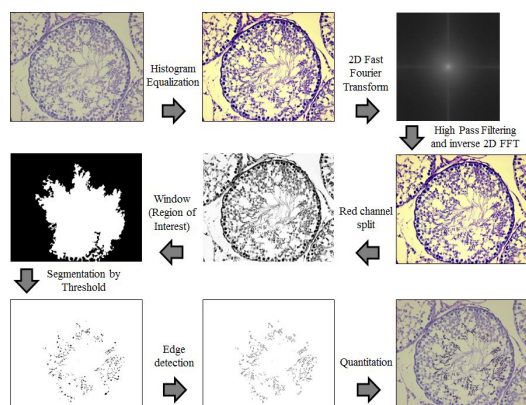
이때 흰쥐위에 스티로폼을 올려놓고 케이지의 윗 커버를 닫아 흰쥐를 엎드린 자세로 하고 압박하여 흰쥐가 움직이지 못하게 하면서 조사하였다. Gantry는 180° 방향에서 D_{\max} 를 맞추기 위해 정소가 있는 깊이를 고려하여 1 cm Solid Water Phantom (Gammex, USA)위에 케이지를 올려놓고 조사하였다.

2.3 조직화학적 염색

조직학적 변화를 관찰하기 위하여 조직을 채취하여 10% Neutral buffer formalin (Medilab, Korea) 용액으로 고정한 후, Tissue-Tek TEC5 자동조직처리기 (Sakura co, Japan)를 사용하여 탈수, 투명, 파라핀 침투과정을 실시하였다. 포매 과정을 통해 파라핀 블록을 만들고, 회전형 박절기(Reichert Jung, Germany)를 사용하여 $4 \mu\text{m}$ 두께로 박절하여 조직절편 슬라이드를 제작하였다. 제작된 슬라이드는 VENTANA NEXES special stain(USA)를 이용하여 Periodic acid Schiff 염색을 시행하였으며, 염색과정은 탈 파라핀과 함수과정을 마친 후 0.5% periodic acid(JUNSEI, Japan) 수용액에 10분간 산화, 흐르는 물에 5분 동안 수세 한 후 Schiff 시약(pararosaniline hydrochloride, sigma)으로 10분 동안 염색한 후 흐르는 물에 10분간 수세하였다. 핵을 관찰하기 위하여 harris hematoxylin(영동제약) 용액에 3분간 염색 후 1% HCl-70% ethanol 에 분별한 후, ammonia water 수용액으로 30초간 중화과정을 거쳐 흐르는 물에 10분간 방치 청색화 시킨 후 탈수, 투명과정을 거쳐 DAKO Mounting Medium (DAKO, USA)을 사용하여 봉입하고 현미경 (Digital Image System, SEDAS MEDIA Co. Korea)을 통해 400배로 관찰하여 촬영하였다.

2.4 영상처리에 의한 정량화

각 그룹별 정소 내 정자를 분석하기 위하여 다음과 같은 영상처리를 수행하였다. 먼저, 영상의 히스토그램 분



[Fig. 1] Image processing for quantification

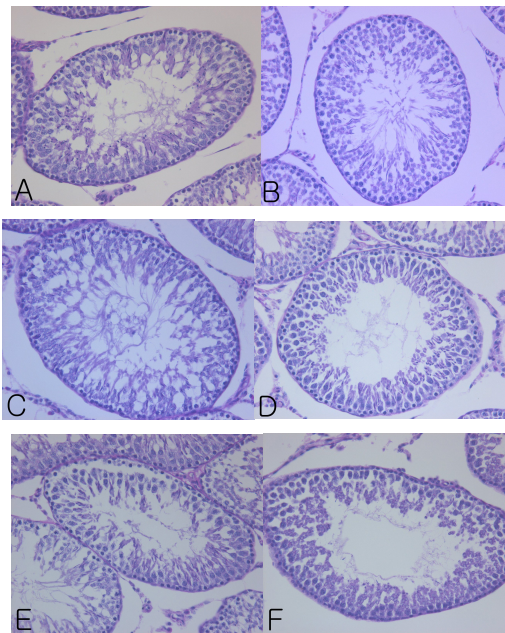
포를 평활하게 하여 대조도를 향상시키기 위하여 히스토그램 평활화(histogram equalization)를 수행하였다. 그리고 정자의 윤곽을 선명하게 유도하기 위하여 2D FFT(Fast Fourier Transform)를 수행 후, 고주파필터(High Pass Filter) 처리를 하였다. 정확한 정자의 영상분할을 위해 염색된 영상 중 Red 채널의 영상을 분리하였고, Magic Wand 처리기법을 사용하여 관심영역(Region of Interest)을 설정하여 윈도우(Window)를 생성하였다. 원래 영상과 윈도우 영상을 사용하여 역치 값을 사용하여 관심 영역 내 정자를 영상분할을 하였다. 그 다음, 에지 획득(Edge Detection) 하여 정자의 외곽을 결정하였다. 이를 통해 획득된 정자는 정량화를 위해, 윤곽의 수(Count), 윤곽의 전체 영역(Total Area), 전체영상대비 정자의 비중(% Area), 정자의 평균 화소값(Mean), 누적 화소값(IntDen)를 계산하였다. 정량화 분석을 위해 매트랩 소프트웨어 프로그램(Matlab 2013a; MathWorks, Natick, MA, USA)을 이용하여 코딩 후 분석하였으며, 정량화된 값은 SPSS 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하여 Student's paired t-test에 대한 유의성 검정을 수행하였다.

3. 결과

흰쥐의 정소에 방사선을 2 Gy를 조사 후 대조군과 각각의 실험군의 정소에 방사선 조사 후 대해 조직표본 완성 후 현미경을 이용하여 400배로 관찰하여 촬영하였다.

그리고 현미경 영상을 토대로 영상처리에 의한 정량분석을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

3.1 조직화학적 염색 결과

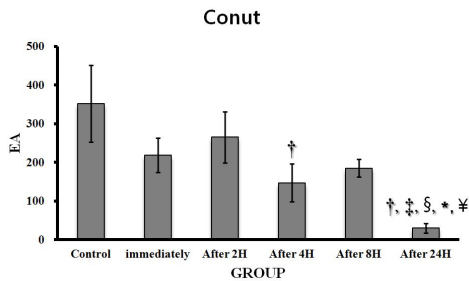


[Fig. 2] Periodic acid Schiff(PAS) stain images (x400)

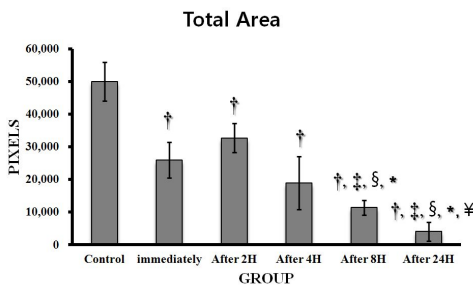
A. control group, B. immediately radiation irradiation, C. after 2 hours, D. after 4 hours, E. after 8 hours, F. after 24 hours.

방사선을 조사하지 않은 대조군에서는 흰쥐 정소의 단면에서 정상적인 곱슬정세관과 세포간질 및 완전히 성숙 분화된 정자를 포함하는 다양한 성숙단계의 정자발생 세포를 관찰 수 있었고 [Fig. 2, (a).] 방사선을 조사한 후 즉시 적출한 실험군의 정소에서는 뚜렷한 변화가 나타나지 않았으며 [Fig. 2, (b).] 방사선 조사 2시간 후부터 정자발생이 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다 [Fig. 2, (c).] 조사 4시간 이후부터 많은 수의 정자발생이 줄어들고 관내강이 확장되는 것을 관찰 할 수 있었으며 [Fig. 2, (d), (e), (f).] 방사선 조사한 후 24시간의 경우 정모세포와 정자세포가 손상을 받고, 정모세포가 농축 변화하며 정자수가 현저히 줄어들고 정세관 내강이 확장되는 것을 확인할 수 있었다 [Fig. 2, (f).]

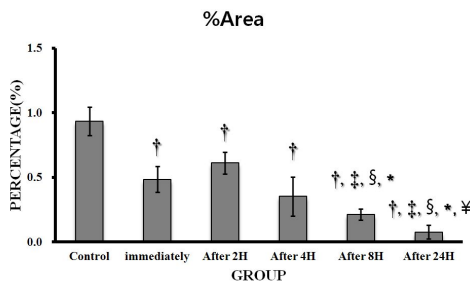
3.2 정량적 분석 결과



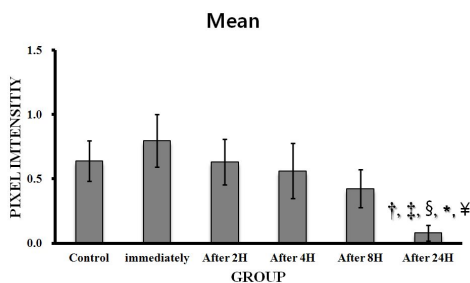
(a) The count of sperm



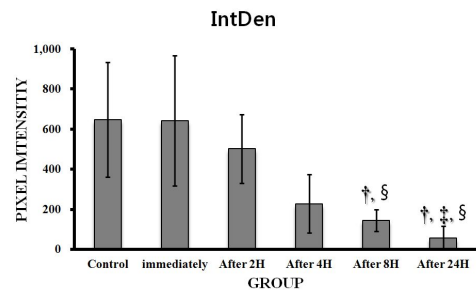
(b) The total area of sperm



(c) The area ratio of sperm



(d) The average pixel value of sperm



(e) The Accumulated pixel value of sperm

[Fig. 3] The quantification results for each group.

† : vs. control group, ‡ : vs. immediately radiation irradiation, § : vs. after 2 hours, * : vs. after 4 hours, ¥ : vs. after 8 hours.

방사선 조사 시간대별 정자 형태의 수는 모든 그룹이 조사 후 24시간 경과 후와 비교하였을 때, 통계적으로 유의한 수준에서 감소하였다. 조사 4시간 후에도 정상대조군과 비교하였을 때 유의하게 감소하였으나, 조사 8시간 후에는 오히려 조사 4시간 후 보다 증가하였다 [Fig. 3, (a).]

정자 형태 영상의 영역은 조사전과 비교하였을 때, 조사 후 즉시, 2시간 후, 4시간 후, 8시간 후, 24시간 후 모든 그룹에서 통계적으로 유의한 수준에서 감소하였다 [Fig. 3, (b).] 이와 같은 결과는 % Area에서도 동일하게 나타났다 [Fig. 3, (c).]

평균 값은 염색의 정도에 따른 영상 내 화소값의 평균 값으로서, 모든 그룹과 조사 24시간 후의 그룹만이 유의 수준에서 차이가 있는 것으로 나타났다 [Fig. 3, (d).]

누적 화소 값은 조사전과 조사 8시간 후, 조사 24시간 후에 유의성을 보이며 감소하여, 앞의 분석결과와는 달리 8시간 후부터 유의한 차이를 가짐을 알 수 있다 [Fig. 3, (e).]

4. 고찰

방사선 조사에 의한 정소세포 및 정자수는 세포주기 및 정자의 성숙도에 따라 차이가 있지만 본 실험에서는 그러한 요소는 고려하지 않았다. Jang JS와 Liu G[4,5] 등은 방사선 조사는 선량이나 시간에 따라 고환세포의 염색체 이상이나 정소세포수의 감소 등의 손상을 유발한

다고 하였듯이 조직화학적 실험군에서 대조군에 비하여 방사선 조사 후 시간대별 정자발생이 일반적으로 감소되는 것을 보여주고 있으며, 특별히 방사선 조사 24시간 후에는 정자세포가 손상을 받고, 정자수가 줄어드는 등 현저한 조직학적 변화가 나타나는 것을 알 수 있다.

이러한 조직화학적 결과를 토대로 정량적 분석의 실험군 고찰에서는 조사 4시간 후에도 조사전과 비교하였을 때 정자로 판단되는 형태의 수는 유의하게 감소하였으나, 조사 8시간 후에는 오히려 조사 4시간 후 보다 증가하는 것을 보여 통계적으로 의미 있는 값을 도출하기 위해서 추가적 검증 실험이 필요할 것으로 사료된다.

정자로 판단되는 형태의 숫자의 경우 24시간 후에 통계적으로 유의수준에서 감소한 것에 비해, 조사 후 즉시에서부터 통계적으로 유의한 수준에서 감소한 것은 조사로 인해 정자가 완전체로 성장하는데 영향을 미친 것으로 사료 된다.

5. 결론

방사선조사 후 시간이 지날수록 24시간 까지는 일반적으로 시간적 변화에 따른 정소세포수와 정자수가 감소하는 것을 정성적으로 확인할 수 있었으며, 영상처리에 의한 다양한 분석결과에서도 방사선조사 후 24시간 후에 정자수가 유의 수준에서 감소함을 정성적 평가와 동일하게 확인할 수 있었다.

또한 정량적 분석법에서는 정성적으로는 분석하기 어려웠던 구체적 변화를 알 수 있었으며, 향후 추가적인 연구를 통해 분석방법, 영상처리법 등 조직화학적 염색의 정량적 연구가능성을 확인하는데 의미를 둘 수 있다.

본 연구에서는 방사선 조사에 의한 흰쥐 정소의 세포 및 정자의 변화를 기존의 정성적 방법과 함께 영상처리에 의한 정량적 방법을 수행하여 접근 가능성을 제시하였다. 다양한 방법으로 염색된 세포 영상을 정량화 하여 분석하는 시도가 많이 되고 있지만 [6,7], 조직 및 세포 영상마다의 특성에 맞는 방법은 각각의 조건에 맞게 변화되어야 하는 난제가 있다. 따라서 많은 조직영상에 대한 최적화 연구가 향후 진행되어야 할 것으로 사료된다.

이 연구에서는 방사선 조사에 의한 정소의 변화를 정자에 중점을 두어 정량화 하여 보다 객관적인 결과를 얻

을 수 있었다. 그러나 방사선조사에 의해서 Type A dark spermatogonia, Type A pale spermatogonia, Type B spermatogonia 과 같은 정소세포뿐만 아니라 1차정모세포 및 2차정모세포의 정량적 분석에는 접근하지 못한 한계를 가지고 있다. 따라서 추가적으로 세포의 변화의 특성을 반영할 수 있는 연구가 후행되어야 할 것이다.

REFERENCES

- [1] Hasegawa, M. G. Wilson, L. D. Russell, and M. L. Meistrich, Radiation-induced cell death in the mouse testes: relationship to apoptosis. *Radiat, Res*, 147, 457-467, 1997.
- [2] Y. Kamiguchi, H. Tateno, Radiation-and chemical-induced structural chromosome aberrations in human spermatozoa. *Mutat, Res*, 504, 183-191. 2002.
- [3] M. L. Meistrich, Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Spermatogenesis, *Eur Urol*, 23(1), 136-141, 1993.
- [4] J. S. Jang, J. S. Kim, S. H. Kim, Evaluation of Radiation-induced Apoptosis in Seminiferous Tubule of ICR Mouse after Gamma Irradiation, *Journal of Life Science*, 19(6), 799-803, 2009.
- [5] G. Liu, P. Gong, H. Zhao, Z. Wang, S. Gong, L. Cai. Effect of low-level radiation on the death of male germ cells. *Toksikol*, 165(4), 379-389. 2006.
- [6] O. Lee, S. H. Jeong, W. U. Shin, G. Lee, C. Oh, & S. W. Son, Influence of surface charge of gold nanorods on skin penetration. *Skin Research and Technology*, 19(1), e390-e396. 2013.
- [7] T. S. Oh, O. Lee, J. E. Kim, S. W. Son, & C. H. Oh, Quantitative method for measuring therapeutic efficacy of the 308 nm excimer laser for vitiligo. *Skin Research and Technology*, 18(3), 347-355. 2012.

나 수 경(Na, Soo kyung)



- 1985년 2월 : 방송대학교 행정학과 (행정학사)
- 1988년 2월 : 중앙대학교 사회개발 대학원 보건행정학과(행정학석사)
- 2001년 2월 : 경기대학교 물리학과 (이학박사)
- 1992년 9월 ~ 현재 : 김천대학교 방사선학과 교수

· 관심분야 : 방사선종양학, 핵의학
· E-Mail : skna@gimcheon.ac.kr

김 성 인(Kim, Sung In)



- 1987년 2월 : 방송대학교 농축학과 (농학사)
- 1990년 2월 : 한양대학교 교육대학원 생물교육학과(교육학석사)
- 2002년 2월 : 충남대학교 대학원 생물학과(이학박사)
- 1996년 3월 ~ 현재 : 김천대학교 임상병리학과 교수

· 관심분야 : 조직병리학, 진단세포학
· E-Mail : adultgim@hanmail.net

이 언 석(Lee, On Seok)



- 2005년 2월 : 고려대학교 전자공학 (공학사)
- 2007년 2월 : 고려대학교 의용생체 공학(공학석사)
- 2011년 2월 : 고려대학교 의용생체 공학(공학박사)
- 2012년 3월 ~ 현재 : 김천대학교 방사선학과 조교수

· 관심분야 : 영상처리, 분자영상
· E-Mail : on-seok@hanmail.net