한국가축위생학회지 제39권 제3호 (2016)
Korean J Vet Serv, 2016, 39(3), 141-149
ISSN 1225-6552, eISSN 2287-7630
http://dx.doi.org/10.7853/kjvs.2016.39.3.141

Korean Journal of
Veterinary Service
Available online at http://kjves.org

< Original Article >

한우 고환 간질세포의 형태계측학적 연구

태현진 · 안동춘 · 이영덕 · 나성진 · 박병용 · 김인식*
전북대학교 수의과대학 생체안전성 연구소

Morphometric study of the Leydig cell in Korean native cattle (*Bos taurus coreae*)

Hyun-Jin Tae, Dong-Choon Ahn, Young-Deok Lee, Sung-Jin Na, Byung-Yong Park, In-Shik Kim*
College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea

(Received 30 June 2016; revised 8 August 2016; accepted 11 August 2016)

Abstract

Changes in the Leydig cell from pre-puberty to adulthood were studied in Korean native cattle. Eight groups of male cattle aged 14, 17, 20, 25, 30, 35, 40 and 104 weeks (n=7 cattle per group) after birth were used. The purpose of this study was to obtain quantitative information on the Leydig cell of the Korean native cattle during postnatal development. Testes of cattle were fixed by perfusion using a fixative containing 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer, processed and embedded in Epon-araldite. Using 1 μm section stained with methylene blue-azure II, qualitative and quantitative (stereological) morphological studies were performed. The average diameter of seminiferous tubules gradually increased with age from 14 (75.56 μm) to 104 weeks (298.9 μm). The volume density of the seminiferous tubules increased with age from 54.2% at week 14 to 76.9% at week 104. The volume density of the interstitium represents 45.52% at week 14. This proportion progressively diminishes during development to reach a value of 23.14% at week 104. The volume density of Leydig cells decreased almost linearly from 14 (20.71%) to 104 weeks (5.28%). The absolute volume of Leydig cells per testis increased significantly from 14 to 104 weeks. The number of Leydig per testis have almost linearly increased from 14 to 104 weeks. The average volume of a Leydig cell reached maximum size by 104 weeks (2553 μm^3). These data suggested development of Leydig cell can be classified as the fetal and immature adult Leydig cells (14～35 weeks), and the adult Leydig cells (40～104 weeks).

Key words : Korean native cattle, Leydig cell, Morphometry

서 론

고환(testis)은 크게 2부분으로 나누어져 있는데, 정자(spermatozoa)를 생산하는 곱슬정세관(seminiferous tubule)과 정세관 사이의 간질조직(interstitium)이다. 간질조직은 성긴결합조직, 간질세포(Leydig cell), 중간엽세포, 근모양세포, 혈관, 혈관주위세포, 혈관내피세포 및 림프공간으로 이루어져 있다(Ariyaratne와 Mendis-Handagame, 2000; Ewing과 Zirkin, 1983; Mendis-Handagame 등, 1987; Kim과 Yang, 1999; Kim 등, 2002).

고환 내 내분비기능을 담당하는 간질세포는 체내 대부분의 수컷호르몬을 분비하는 대표적인 세포이다. 간질세포는 일반적으로 미분화된 중간엽세포에서 발생하는 것으로 알려져 있으며(Kerr, 1988; Mendis-Handagama와 Ariyaratne, 2001), 간질세포 자극호르몬(interstitial cell stimulating hormone)은 간질세포막에 있는 특수한 막수용체에 작용하여 간질세포를 성장, 분화시키고, 간질세포의 세포질 내 미세구조에 존재하는 몇 가지 효소를 이용하여 웅성호르몬을 합성하여 분

*Corresponding author: In-Shik Kim, Tel. +82-63-850-0941, Fax. +82-63-850-0910, E-mail. iskim@jbnu.ac.kr

Copyright © 2016, The Korean Society of Veterinary Service. All Rights Reserved.

비 하는 작용이 있으며(Saez, 1994), 이 수컷호르몬은 정자발생의 조절, 부속생식기관의 유지 및 발기기능을 포함한 수컷생식계통에서 중요한 작용을 나타낸다(Robert와 Delost, 1978; Saez, 1994).

고환의 형태계측학적 기법을 적용한 연구를 살펴보면, 간질조직을 이루고 있는 각기 다른 유형의 세포들의 형태와 기능의 상호연관성에 관한 연구가 사람(Nistal 등, 1986), 개(Zirkin 등, 1980), 흰쥐(Kim과 Yang, 1999), 생쥐(Blackburn 등, 1973), 원숭이(Rey 등, 1993; Russel 등, 1995) 햄스터(Sinha-Hikim 등, 1989) 그리고 돼지(Allrich 등, 1983)에서 수행 되었고, Fawcett 등 (1973)은 14종의 포유동물류에서 간질조직 구성에 대한 형태적인 차이를 보고 하였으며, 이 밖에도 동물에 따른 간질세포의 형태 및 기능의 차이에 관한 비교 연구가 보고되어 있다(Ewing 등, 1979; Kim 등, 2000; Mendis-Handagama 등, 1998; Zirkin 등, 1980). 출생 후 성장 단계별 고환 발달에 관한 많은 연구는 주로 흰쥐(Ewing과 Zirkin, 1983; Mendis-Handagama와 Ewing, 1990; Mendis-Handagama 등, 1998)와 토끼(Castro 등, 2002; Gondos 등, 1977; Gondos와 Renston, 1976)에서 보고되었다.

소 고환에서의 연구는 곱슬정세관과 정자생성(Moura와 Erickson, 2001; Rana와 Bilaspuri, 2004; Wrobel, 2000), 고환 간질세포의 변화(Rana와 Bilaspuri, 2000; Wrobel, 1990) 및 부고환 구조(Scala 등, 2002)로 대부분 곱슬정세관에 관한 연구가 간질세포에 관한 연구보다 많이 수행되었고, 특히 한국산 한우 고환에 대한 연구 보고는 없는 실정이다.

출생 후부터 성 성숙까지 성장 단계별로 고환간질조직을 구성하고 있는 간질세포의 용적치밀도(volume density), 절대용적(absolute volume), 평균세포 용적(average volume) 및 고환 내 총 숫자(total number of per testis) 변화는 간질세포 분화의 역학, 고환의 발달 정도, 정자발생과 간질조직의 상호관계 및 간질조직의 구조와 기능의 유연관계를 이해하는데 매우 중요하지만, 가축에서의 이러한 연구는 극히 적으며 특히 대한민국 쇠고기 시장의 중요한 부분을 차지하고 있는 한우에서 정자를 생산하는데 중요한 역할을 하는 고환 간질세포에 관한 형태계측학적인 연구는 접할 수 없다.

따라서 고환 간질세포의 구조와 기능에 관하여 명확하게 밝혀지지 않은 한우를 대상으로 출생 후 14주령부터 104 주령까지 일반조직학적인 방법 및 형태계측학적 방법으로 간질세포의 용적치밀도, 절대용적, 평균세포 용적 및 고환 내 총 숫자의 변화를 구명하기 위하여 이 연구를 수행 하였다.

재료 및 방법

실험동물

농촌진흥청 국립축산과학원에서 한우 고급육 생산기술을 목적으로 진행된 연구에 공여된 한우를 14, 17, 20, 25, 30, 35, 40, 104주령으로 군을 나누어, 전북대학교 실험동물센터 윤리규정위원회 관리 규정에 따라서 각 군당 7마리씩 거세 후 고환을 수집하여 실험에 이용하였다.

조직표본제작

고환의 용적을 측정하기 위하여 chemical balance로 무게를 측정하고 sucrose를 사용하여 부양법(float method)으로 비중(specific gravity)을 측정한 후 고환의 용적을 산출하였다(고환용적=고환무게/고환비중) (Christensen, 1980; Kim 등, 2002; Mendis-Handagma 등, 1987; Mendis-Handagma와 Ewing, 1990). 0.9% 생리식염수를 고환내 혈관에 직접 주입하여 세척 한 후 2.5% glutaraldehyde로 대체하여 고환이 단단해 질 때까지 관류고정 하였다. 고환을 1~2 mm로 세절하여 2.5% glutaraldehyde로 2시간 동안 고정 한 후 phosphate buffer (pH 7.3)로 세척 하고 1% osmium tetroxide로 후 고정 하였다. 알코올로 탈수하고 Epon-812에 포매하여 각 개체 당 10개씩 블록을 제작하였다.

광학현미경관찰

초박절편기(Ultramicrotome, Leica ultracuts, Austria)를 사용하여 1 μm 두께의 후박절편(seminthin section)을 제작한 후 1% methylene blue-azure II로 염색하여, 광학현미경(Leica, DMRBE. Germany)을 사용하여 관찰하였고, 곱슬정세관의 직경 및 각 세포핵의 크기는 영상분석기(image analyzer system, Leica Q500MC, Germany)를 사용하여 측정하였다.

형태계측(Morphometry)

고환 간질조직 구성물의 용적 치밀도: Point counting

methods (Kim 등, 2002; Mendis-Handagma와 Ewing, 1990)법을 적용, 121 point ocular grid를 장착한 광학현미경 하에서 point와 만나는 각 구조물(간질세포, 혈관, 중간엽세포, 근모양세포, 혈관내피세포, 및 림프주위공간)의 네 모서리와 가운데 즉 5군데 부위를 측정 하였으며, 각 개체 당 최소 50부위에서 최대 100부위를 중복되지 않게 측정 하였다. 이것을 전체 point (121×5)로 나누어 고환 간질세포의 용적 치밀도(v:v %)는 아래와 같은 공식을 이용하여 구하였다.

$$V: v\ \%\ of\ a\ component = \frac{number\ of\ points\ on\ the\ component}{total\ number\ of\ points\ on\ the\ testis\ tissue} \times 100$$

고환 간질세포의 절대용적: 이미 구해진 용적치밀도(volume density, v;v%)와 고환용적(fresh testis volume, g)을 이용하여 절대용적(absolute volume, mm^3)을 다음과 같은 공식에 의하여 구하였다(Kim 등, 2002; Mendis-Handagma 등, 1987; Mendis-Handagma와 Ewing, 1990).

Absolute volume of testicular component (mm^3)= volume density of the component (v;v %)×fresh testis volume (g)

여기서 고환의 용적은 고환의 무게와 비중으로부터 구하였다.

고환 단위 용적 당 세포 수: Floderus (1944) 방정식 $Nv=Na/(T+D-2h)\times(1-S_T)$를 적용하여 단위용적 당 세포수(numerical density)를 계산 하였다. 이 공식에서 Na는 단위면적당 각 세포핵의 숫자(단위 면적 40006.28 μm^2), D는 평균 핵의 직경, T는 평균절편 두께, S_T (total shrinkage=histologic correction factor)는 총 고환조직의 고정 전, 고정 후, 표본제작 후의 총 수축량, h는 가장 작다고 생각되는 핵의 높이이며 이는 보통 평균 핵 직경의 10% 정도이다(Wing과 Christensen, 1982). 단위면적당 각 세포의 총 숫자와 핵의 크기는 조직 표본에서 5부위를 중복되지 않도록 선택하여 영상분석기(image analyzer system, Leica Q500MC, Germany)를 이용하여 측정하였다. 고환 당 간질세포의 총 숫자는 다음과 같은 공식에 의하여 구하였다(Kim 등, 2000; Mendis-Handagama 등, 1987; Mendis-Handagma와 Ewing, 1990).

Total number (cells/testis)=numerical density×fresh testis volume

간질세포의 평균 용적: 간질세포의 평균 용적은 용적치밀도를 단위용적 당 세포 수로 나누어 구하였다(Kim 등, 2001; Mendis-Handagama 등, 1998; Mendis-Handagma와 Ewing, 1990).

Average cell volume=volume density/numerical density of Leydig cells

곱슬정세관의 직경 측정: 곱슬정세관의 직경은 군에 따라 20～30개의 원형의 정세관을 택하여 image analyzer (Leica Q500MC, Germany)를 이용하여 측정하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 자료는 SAS package의 General Linear Model (GLM) Procedure (SAS Ver. 6.12, SAS Institute, 1998)를 ANOVA로 통계처리 후 Duncan's multiple range test에 의하여 검정하였으며 $P<0.05$ 이하의 유의성을 통계학적 차이로 인정하였다.

결 과

한우 고환조직의 광학 현미경적 관찰

생후 14주령의 한우에서 채취한 고환에서 곱슬정세관은 고환의 약 54.2%를 차지하였고, 직경이 약 75.56 μm이었고, 기저막 부위에는 원형의 큰 핵을 가진 정조세포(spermatogonia)들이 위치하고 그 사이에서는 부정형의 핵을 가진 소수의 지지세포(Sertoli cell)들이 관찰되었다. 반면 45.8%를 차지하고 있는 간질조직 부위에서는 치밀하게 배열된 성숙간질세포(adult Lydig cell, 큰 화살표), 태자간질세포(fetal Leydig cell, 작은화살표), 중간엽세포, 근모양세포 그리고 혈관내피세포를 관찰 할 수 있었다(Fig. 1A).

생후 17주령 간질조직 내에는 세포질 내에 지방방울이 많이 늘어나고 핵의 직경이 커지고(6.71±5.6 μm) 핵소체가 뚜렷한 원형의 핵을 가진 성숙간질세포(큰화살표)는 크게 증가하였고 반면에, 핵이 진하게 염색되고 부정형의 외형을 가진 태자간질세포(작은화살표)는 숫자가 현저히 감소되었다. 핵의 크기가

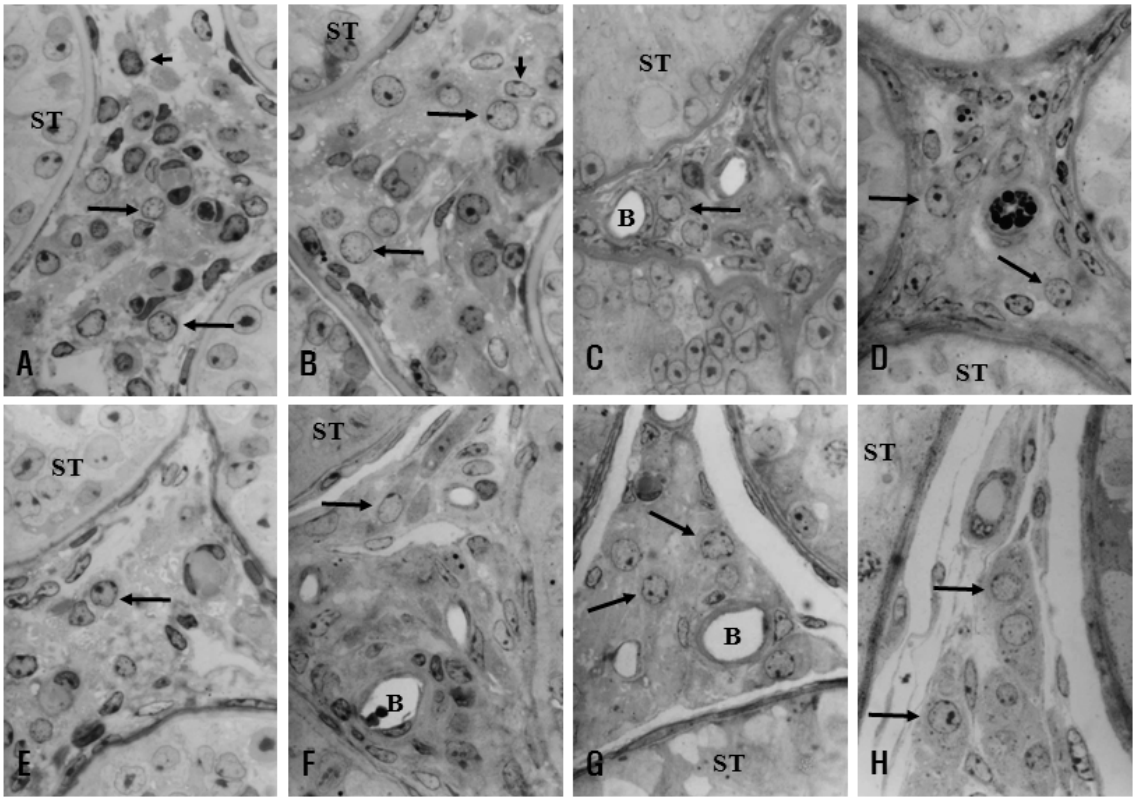

Fig. 1. Representative light micrographs showing testis of Korean native cattle at postnatal ages 14 (A), 17 (B), 20 (C), 25 (D), 30 (E), 35 (F), 40 (G), and 104 (H) weeks. All figures were of the same magnification (×1,000, methylene blue-azure II stain). ST, Seminiferous tubules; B, blood vessel; Large arrows, adult Leydig cell; Short arrows, fetal Leydig cells).

증가되어 있고 세포질이 적고 기다란 타원형의 핵을 가진 중간엽세포, 근모양세포 그리고 혈관 주위에서 볼 수 있는 혈관내피세포와 혈관주위세포를 관찰 할 수 있었다(Fig. 1B).

생후 20주령과 25주령에서 채취한 고환 간질조직에서는 핵의 직경은 오히려 줄어들고(60.1±0.37 μm), 핵소체가 뚜렷한 원형모양의 핵과 세포질 내 지방방울을 함유한 성숙간질세포(큰화살표)는 많이 관찰되었으나, 25 주령 이후에는 태자간질세포는 거의 찾아볼 수가 없고 중간엽세포는 17주령과 비교하여 숫자는 증가하는 경향을 보였다(Figs. 1C, 1D).

생후 30주령과 35주령에서 채취한 고환에서 곱슬정세관의 비율이 64%, 직경 또한 153 μm으로 크게 증가 하였고, 간질조직에서 태자간질세포는 관찰 할 수 없었고, 성숙간질세포(큰화살표), 중간엽세포와 근모양세포가 관찰 되었다(Figs. 1E, 1F).

생후 40주령에서 채취한 고환에서 곱슬정세관의 비율이 69.1%까지 증가하였고, 직경 또한 181.7 μm으로 증가하였다. 간질조직은 전 군에 비해 비교적 덜 치밀해 졌고, 성숙간질세포(큰화살표)의 크기가 큰 폭으로 커져 있었으며, 중간엽세포와 근모양세포가 관찰 되었다(Fig. 1G).

104 주령에서 채취한 고환에서는 곱슬정세관의 비율이 76.9%, 직경이 298.9 μm까지 증가하였다. 간질조직에서는 성숙간질세포(큰화살표), 중간엽세포와 근모양세포가 관찰 되었으며, 40 주령과는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 1H).

고환조직 구성물의 형태계측학적 관찰

고환조직 구성물의 용적치밀도: 고환조직을 이루고 있는 각종 구성물에 대한 용적치밀도는 Table 1에 나타나 있다. 곱슬정세관의 용적치밀도는 생후 14주령에 54.4±4.8%로 관찰되었으며, 30 주령부터 유의성 있게 증가하였고($P<0.05$), 40주령에서는 65.85±54.24%, 104주령에서는 76.9±7.62%로 관찰이 되었다. 고환 간질조직의 용적치밀도는 생후 14 주령(45.5±3.73%)부터 25 주령(47.2±4.39%)까지 감소와 증가를 반복하다가, 30 주령 이후부터 유의성 있게 감소하기 시작하여($P<0.05$), 104 주령에서는 23.1±5.78%로 관찰되

Table 1. Volume density (%) of seminiferous tubules (ST), interstitium (IT) and Leydig cells in postnatal cattle form 14 to 104 weeks of age (mean±SEM)

Parameter	Age in weeks							
	14	17	20	25	30	35	40	104
ST	54.48 (4.8)^{a}	49.58 (6.2)^{a}	53.31 (2.28)^{a}	52.78 (4.09)^{a}	63.19 (4.23)^{b}	63.76 (3.78)^{b}	65.85 (4.24)^{b}	76.86 (7.62)^{b}
IT	45.52 (3.73)^{a}	50.42 (5.21)^{a}	46.69 (3.88)^{a}	47.22 (4.39)^{a}	36.81 (5.26)^{b,c}	36.24 (4.81)^{b,c}	34.15 (4.31)^{b,c}	23.14 (2.8)^{c}
Leydig cells	20.71 (2.49)^{a}	15.9 (2.89)^{a}	18.92 (2.57)^{a}	16.19 (2.79)^{a}	12.17 (1.71)^{b}	9.13 (2.23)^{b,c}	8.42 (1.46)^{b,c}	5.28 (1.21)^{c}

Numbers in parentheses are SEM. In each row, values with different superscripts are significantly different ($P<0.05$) among the age groups.

Table 2. Absolute volume (cm^3) of seminiferous tubules (ST), interstitium (IT) and Leydig cells in postnatal cattle form 14 to 104 weeks of age (mean±SEM)

Parameter	Age in weeks							
	14	17	20	25	30	35	40	104
ST	10.51 (1.28)^{a}	13.28 (2.91)^{a,b}	19.88 (4.29)^{b}	38.63 (2.99)^{c}	59.90 (4.01)^{d}	80.60 (7.78)^{e}	115.61 (7.46)^{e}	225.17 (39.62)^{f}
IT	8.78 (2.72)^{a}	13.51 (3.21)^{b}	17.41 (5.38)^{b,c}	34.56 (4.41)^{d}	34.89 (5.47)^{d}	45.79 (4.92)^{e}	59.98 (3.38)^{f}	67.79 (7.19)^{g}
Leydig cells	3.97 (0.48)^{a}	4.26 (0.77)^{a}	7.05 (0.95)^{b}	11.85 (2.04)^{c}	11.54 (1.62)^{c}	11.58 (2.81)^{c}	14.81 (2.56)^{c}	15.49 (6.18)^{c}

Numbers in parentheses are SEM. In each row, values with different superscripts are significantly different ($P<0.05$) among the age groups.

Table 3. Total number (10^8 cells/testis) and average volume (μm^3) of Leydig cells in postnatal cattle form 14 to 104 weeks of age (mean±SEM)

Parameter	Age in weeks							
	14	17	20	25	30	35	40	104
Total number	36.64 (4.93)^{a}	28.6 (3.51)^{a}	67.74 (5.52)^{b}	85.37 (3.93)^{c}	82.92 (5.52)^{c}	92.53 (6.12)^{d}	100.42 (5.37)^{d,e}	115.08 (8.13)^{e}
Average volume	1120 (113)^{a}	1561 (159)^{b}	1034 (107)^{a}	1395 (72)^{a}	1501 (139)^{b}	1231 (158)^{a}	1533 (184)^{b}	2553 (193)^{c}

Numbers in parentheses are SEM. In each row, values with different superscripts are significantly different ($P<0.05$) among the age groups.

Table 4. Diameter of seminiferous tubules (μm) in postnatal cattle form 14 to 104 weeks of age (mean±SEM)

Parameter	Age in weeks							
	14	17	20	25	30	35	40	104
Diameter	73.56 (3.29)^{a}	107.43 (6.74)^{b}	99.53 (5.82)^{b}	112.54 (8.52)^{b}	128.51 (7.52)^{b}	158.21 (9.14)^{c}	181.7 (6.71)^{c}	298.9 (12.76)^{d}

Numbers in parentheses are SEM. In each row, values with different superscripts are significantly different ($P<0.05$) among the age groups.

었다. 간질세포의 용적 치밀도는 생후 14 주령에서 20.7±2.49%로 계측되었는데 30주령부터 유의성 있게 감소하기 시작하여($P<0.05$), 생후 104주령에서는 5.3±0.99%까지 감소하였다.

고환조직 구성물의 절대용적: 고환조직을 이루고 있는 각종 구성물에 대한 절대용적은 Table 2에 나타나 있다. 곱슬정세관과 간질조직의 절대용적은 각각 10.51±1.28 cm^3과 8.78±2.72 cm^3이었고, 주령이 증가함에 따라서 이 수치가 유의성 있게 증가하기 시작하였다($P<0.05$). 특히 25 주령부터 급격히 증가하기 시작하여($P<0.05$), 104 주령에는 곱슬정세관은 225.17±39.62 cm^3, 간질조직은 67.79±7.19 cm^3이었다. 간질세포의 절대용적은 14 주령에 3.97±0.48 cm^3이었고, 이후 점차 증가하는 추세인데, 특히 25 주령부터 급격하게 증가하였고, 104 주령에는 15.49±6.18 cm^3로 측정되었다.

고환내 간질세포 총 숫자와 평균용적: 고환 단위용적 당 세포 수에 고환용적을 곱하여 얻어진 고환조직 당 각 세포 총 숫자와 간질세포 평균 용적에 관한 결과는 Table 3과 같다. 14주령 고한 간질세포의 총 숫자는 $36.64±4.93×10^8$로 계측되었고, 20주령부터 유의성 있게 ($P<0.05$) 증가하기 시작하여, 40주령까지 증가하는 경향을 보이다가 104주령에서는 최고치로 $115.08±8.13×10^8$

이었다. 간질세포의 평균용적은 14주령에 1120±113 μm^3로 관찰 되었고 40주령(1533±184 μm^3)까지 유지 되다가 104 주령(2087±193 μm^3)에 크게 증가하였다.

곱슬정세관의 직경: 곱습정세관의 직경은 14 주령에서 75.56±6.15 μm으로 측정 되었고, 점진적으로 증가하는 경향을 보였으며 40주령과 104주령에 각각 181.7 μm, 298.9 μm이었다(Table 4).

고 찰

고환을 이루고 있는 곱슬정세관과 간질조직에 관한 형태계측학적인 연구는 흰쥐(Ariyaratne와 Mendis-Handagma, 2000; Kim 등, 2001), 햄스터(Sinha-Hikim, 1989), 기니픽(Mendis-Handagma 등, 1998), 말(Johnson과 Neaves, 1981), 돼지(Allrich와 Christensen, 1983), 토끼(Castro 등, 2002), 낙타(Zayed 등, 1995), 당나귀(Neves 등, 2002) 등 각종 동물에서 폭 넓게 연구 되었으나 중요한 산업동물인 소에 대한 연구는 주로 곱슬정세관내 정자 발생에 대해 이루어져 왔고(Goyal과 Dhingra, 1973; Moura와 Erickson, 2001; Pant 등, 2003; Rana와 Bilaspuri, 2004; Wrobel, 2000), 소 고환 간질조직에 대한 형태계측학적 연구는 Murrah Buffalo에서만 보고 되어(Rana와 Bilaspuri, 2004), 소 고환 간질조직을 이루고 있는 각종 세포의 형태 및 기능에 관하여 명확하게 밝혀져 있지 않았으며, 특히 수컷 번식계통에서 중요한 역할을 담당하고 있는 간질세포가 매우 중요함에도 불구하고 간질세포에 관한 형태계측학적인 연구결과는 찾아볼 수 없다. 본 연구에서 얻어진 한우 고환간질세포의 용적치밀도, 절대용적, 평균용적 및 총 숫자에 관한 결과는 처음 보고 이며, 이러한 결과는 출생 후 빠른 시기에 정자발생이 이루어지는 흰쥐, 생쥐와는 여러 가지 차이를 나타내었으며, 특히 간질세포의 형태계측학적 결과는 다른 동물과 많은 차이가 있음을 알 수 있었고 이러한 결과는 비교해부학적인 측면에서 매우 가치 있는 결과로 생각된다.

고환 내에서 정자 생성을 담당하는 부분인 곱슬정세관과 간질조직의 용적치밀도를 비교해 보면 한우 14 주령에서 곱슬정세관 용적치밀도는 점진적으로 증가하는 양상을 보이는데 14 주령에 54.48%를 보이다가 30 주령부터 급격히 증가하기 시작하여, 정자가 보이는 40주령에 65.85%, 104 주령에는 76.86% 까지 증가 하였고, 곱슬정세관과는 반대로 간질조직 용적치밀도는 45.52%의 비율이 25 주령 까지 유지 되다가 생후 30주령 이후부터 감소하여 40 주령에는 36.81%, 104 주령에는 23.14%로 나타났다. 독일 재래 소 고환에서 간질조직의 용적치밀도는 4 주령에서 51.2%로 시작하여 이후부터는 지속적으로 감소하여 40 주령과 52 주령에 이르러 20～21%를 유지하다가 75～102 주령에서는 16.2% 까지 감소하였다(Wrobel, 2000). 이러한 결과를 비교해 보면, 독일 재래 소는 한우에 비하여 고환에서 간질조직이 차지하고 있는 비율이 훨씬 낮으며, 나이가 들어감에 따라서 간질조직이 차지하고 있는 비율이 한우보다 8～15% 정도 낮은 수치였고 감소율이 훨씬 높다는 것을 알 수 있었다. 그러나 한우와 독일 재래소를 비교하여 볼 때 이 연구에서는 40주령부터 104주령까지의 중간에 실험군이 없어 정확한 비교를 할 수 없기 때문에 상세한 변화를 비교하기 위해서는 성숙한 실험군을 대상으로 한우 실험군을 좀 더 세분하여 연구를 진행할 필요가 있을 것으로 생각한다.

고환의 용적 치밀도에 고환의 부피를 곱해서 얻어진 절대용적에서 곱슬정세관은 14 주령의 10.51 cm^3로부터 지속적으로 증가하여, 특히 35 주령과 정자가 보이기 시작하는 40 주령에서 크게 증가하고 104 주령에는 225,17 cm^3에 이른다. 이는 첫 번째로 측정하였던 14 주령에 비해 약 22배 증가하였다. 간질조직의 증가율은 14 주령에 8.78 cm^3에서 104 주령에서는 67.79 cm^3로 약 8배 증가하였다. 이러한 결과에 의하면 고환 절대용적에서 곱슬정세관의 증가율이 간질조직의 증가율보다 높다는 Rey 등(1993) 결과에 의해 설명 될 수가 있으며, 출생 후 주령에 따른 고환의 용적의 증가는 성 성숙 시기가 가까워지면서 곱슬정세관의 정모세포와 정자세포 분화가 활발히 이루어지고 관강의 부피가 크게 증가하여 곱슬정세관이 차지하고 있는 용적이 증가하기 때문인 것으로 생각된다.

여러 동물의 간질세포에 관한 연구를 살펴보면, 일반적으로 닭, 오리, 메추라기 같은 조류는 간질세포의 수가 적다고 보고되어 있다(Aire, 1997). 흰쥐(Ariyaratne와 Mendis-Handagma, 2000), 햄스터(Sinha-Hikim 등, 1989), 말(Johnson과 Neaves, 1981; Johnson과 Thomson, 1986)에서 고환 1 g당 간질세포의 숫자는 각각 12.1×10^6, 15.32×10^6, 18.7×10^6개이었으나, 한우의 경우 성 성숙이 완전히 이루어진 104 주령의 경우 24.03×10^6개로 조류는 물론 다른 포유동물보다 현저히 높은 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 수컷 생식계통에서 기초자료를 제공 할 수 있는 결과로 생각된다.

출생 후부터 성 성숙 시기까지 사람(Nistal 등, 1986)과 원숭이(Rey 등, 1996)에서 관찰되는 간질세포의 유형은 태자간질세포(fetal-type Leydig cells), 미숙한 간질세포(infantile-type Leydig cells), 부분적으로 분화된 간질세포(partially differentiated Leydig cells) 및 완전히 발달한 성숙간질세포(mature adult Leydig cells)의 4가지 유형이 있다. 그러나 흰쥐(Ariyaratne와 Mendis-Handagama, 2000; Mendis-Handagama 등, 1987), 고양이(Sanchez 등, 1993), 그리고 소(Rana와 Bilaspuri 2000; Wrobel, 2000)에서는 태자간질세포, 미성숙 간질세포 그리고 성숙간질세포로 3 종류의 간질세포만이 관찰되었는데 한우에서도 출생 후 14주령부터 104주령까지 에서는 동일한 결과를 나타내어 영장류와 차이가 있음을 알 수 있었고, 이러한 차이의 원인은 영장류에서는 출생 후부터 성 성숙이 이루어지기까지 오랜 시간이 소요되기 때문에 간질세포의 분화과정 중에 또 다른 유형의 세포가 하나 더 존재하는 것으로 생각되며, 한우 태자 간질세포의 변화를 명확하게 구명하기 위해서는 출생 후 초기 실험군을 좀 더 세분하여 연구를 진행할 필요가 있을 것으로 생각된다.

한우 생후 14 주령에서 채취한 고환 간질조직에서 태자간질세포, 미분화된 성숙간질세포와 성숙간질세포를 관찰 할 수 있었다. 태자간질세포와 미분화 간질세포는 적게 관찰되었고, 성숙간질세포가 대부분을 차지하였다. 이후 성숙 간질세포의 비율은 계속 증가하고 태자간질세포는 감소하는 추세를 보이다가 20 주령부터 관찰되지 않았다. 20 주령부터 성숙 간질세포가 거의 대부분을 차지하고, 미분화된 성숙간질세포는 조금씩 관찰되었다. 성 성숙이 48 개월령에 이루어지는 Murrah buffalo에서 태자간질세포는 생후 1～3개월령에 최고를 이루고 15개월령 이후에 없어진다고 보고한 내용과 일치한다(Rana와 Bilaspuri, 2004). 또한 본 실험에서 태자 간질세포가 전혀 관찰되지 못한 주령에서도 성숙 간질세포의 수는 계속 증가하였다. 이는 태자간질세포는 생후부터 계속 감소하여 세포죽음(cell death)이르게 되거나(Gondos 등, 1977), 생후 초기부터 분해(disintegration)된다고 하는 보고에서와(Kuopio 등, 1989) 같이 태자 간질세포가 성숙간질세포로는 분화가 이루어지지 않는 것으로 생각된다.

출생 후 태자간질세포와 성숙간질세포 사이의 역학에 관한 상호연관성은 동물의 종에 따라 많은 차이를 보이고 있다. 흰쥐에서는 출생 후 초기 단계에서부터 태자간질세포가 성숙간질세포로 전환하는 특징을 나타낸다(Ariyaratne와Mendis-Handagama, 2000; Kim 등, 1999). 한우에서 태자 간질세포는 출생 후부터 존재하다가 생 후 20 주령에서 변성되거나 사멸한다. 이는 혈청이나 조직의 웅성호르몬을 측정해보면 더욱 명확하겠지만, 형태계측학적 관찰 결과를 놓고 볼 때 한우의 성숙간질세포의 분화는 다른 종의 동물보다 늦고, 태자 간질세포는 중간엽세포로부터 성숙간질세포로 분화하는데 특별한 기능이나 작용이 없는 것으로 생각되고, 본 실험에서 성숙간질세포의 수적 증가는 간질세포 자체의 세포분열과 중간엽세포의 분화에 기인한 것으로 생각되며, 이는 간질세포 자체의 세포분열 빈도는 희박한 것으로 밝혀져 최근에는 일반적으로 간질세포는 중간엽세포로부터 분화한다는 주장과 부합한다(Kerr, 1988; Mendis-Handagama와 Ariyaratne, 2001).

본 실험에서 간질세포의 용적치밀도는 14 주령(20.7%)부터 104 주령(5.3%)까지 유의성 있게 감소하는데, Wrobel (2000)의 연구결과에서는 4 주령의 3.9%에서 점점 증가하기 시작하여 16 주령(17.1%)에서 최고치를 나타내고 20 주령(10.4%)부터 감소하기 시작하여 52 주령부터 75～100주령까지는 3.7～3.9% 대를 이룬다. 이는 전체적으로 한우보다 낮은 비율을 차지하고 있는데 한우에서 고환용적이 독일재래소보다 크기 때문인 것으로 생각된다.

간질세포 절대용적의 변화의 원인은 말(Johnson과 Neaves, 1981)과 토끼(Gondos 등, 1976)에서는 간질세포의 크기보다는 숫자에 관련이 있고, 반면에 전형적인 계절번식동물인 노루와 바위너구리에서는 숫자보다는 크기와 연관성이 있다(Neaves, 1973). 한우의 경우에는 고환내 간질세포 총 숫자의 증가폭이 평균용적 증가율 보다 훨씬 높은 것으로 보아 말에서와 같이 간질세포의 절대용적이 연령이 증가함에 따라서 변화하는 원인은 주로 간질세포 숫자의 변화와 밀접한 연관성을 가지고 있는 것을 알 수 있었고, 계절번식 동물과 연중번식동물에서 간질세포 크기와 숫자의 변화 양상이 차이가 있음을 확인 할 수 있었다.

간질세포에서 관찰되는 큰 지방방울(lipid droplets)은 생쥐에서 뇌하수체 절개 후 비활성기(inactive state) 고환의 특징이며(Aoki, 1970), 흰쥐에서도 성숙간질세포와 미성숙간질세포에 크고 많은 지방방울이 관찰되었다(Ariyarntne와 Menids-Handagama, 2000) 또한 꿩(Kim과 Yang, 2001)에서는 비번식기에는 번식기에 비하여 숫자는 감소하였으나 크기가 명확히 증가한 지방방울이 다수 관찰되어 포유동물의 미성숙 간질세포와 유사한 특징을 갖고 있다. 본 실험에서는

17 주령 이후에 지방방울이 크게 줄어 30 주령 이후에는 관찰을 할 수가 없었다. 지방방울은 웅성호르몬 분비와 매우 깊은 관계가 있으며 이에 의하여 웅성호르몬 분비가 저해됨을 의미하며 이는 성 성숙 전에는 웅성호르몬의 분비가 적다는 것을 유추 해낼 수가 있었다.

고환 간질조직의 단위부피당 세포의 총 숫자는 감소한다고(Kerr와 Knell, 1988; Mendis-Handagana 등, 1987) 보고되어 있는데 이는 본 실험의 결과와도 일치하고, 본 실험에서 14 주령 이전의 한우 고환을 채취 할 수 없었지만, 완전히 성숙한 간질세포의 출현을 알 수 있다면, 이 간질세포 출현 전에 곱슬정세관 내에서 정조세포의 첫 번째 체세포분열(mitosis) 전구세포가 만들어 졌음을 알 수 있고, 새로 분화된 간질세포에서 웅성호르몬을 생산해 내어 정자발생이 이루어지고 있음을 확인 할 수가 있었으며(Gondos와 Renston, 1976; Rana와 Bilaspuri, 2000), 간질조직을 구성하는 대식세포는 Kim과 Yang (1999)이 흰쥐의 고환에서 나타났다고 보고 하였지만, 본 실험에는 간질조직내에서 대식세포를 관찰할 수가 없었는데, 이에 관한 내용은 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

한우에서 출생 후 성장단계별 고환간질 세포의 형태학적인 변화를 알아보기 위하여 출생 후 14, 17, 20, 25, 30, 35, 40, 104 주령(n=7 마리/주령)의 수컷 한우 56두에서 고환을 채취하여 실험에 이용하였다. 소 고환은 2.5% glutaraldehyde를 이용하여 관류고정하고 조직처리 과정을 거쳐서 Epon-araldite에 포매하고 초박절편기를 사용하여 1 μm로 절편한 다음 methylene blue-azure II로 염색하여 일반적인 조직의 변화상과 형태계측을 하였다. 곱슬정세관의 평균직경은 14주령에 75.56 μm이었고 점차적으로 증가하여 104주령에 298.9 μm이었다. 곱슬정세관의 용적 치밀도는 생후 14주령에서 54.48%이었으나 점진적으로 증가하여 정자가 보이는 40 주령에서 65.85% 그리고 104 주령에서는 76.86%이었다. 간질조직의 용적치밀도는 14주령에 45.8%이었고 점진적으로 감소하여 104주령에는 23.1%이었다. 간질세포의 용적치밀도는 14 주령에서 20.71%였고 점진적으로 감소하여 정자가 보이는 40 주령에서 7.6%, 그리고 104 주령에서는 5.28%로 나타났다. 고환 조직당 간질세포 절대용적은 14 주령의 3.97 cm^3으로부터 점진적으로 증가를 보이다가, 25 주령(11.85 cm^3)에서 급격히 증가한 104 주령에서는 15.49 cm^3으로 나타났다. 고환 조직당 간질세포의 총 숫자는 연령이 증가함에 따라서 거의 연속적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 간질세포 평균용적은 14 주령에 1120 μm^3이었고, 17 주령에서 1561 cm^3으로 크게 증가하였다가 20 주령에 감소하고, 이후 40 주령부터 점진적으로 증가하여 104 주령에는 2553 cm^3로 나타났다. 이상의 결과는 한우에서 간질세포의 형태는 태자 및 미성숙 간질세포(14～35주령) 시기와 성숙간질세포(40～104주령) 시기로 나눌 수 있다.

REFERENCES

Aire TA. 1997. The structure of the interstitial tissue of the active and resting avian testis. J Vet Res 64: 291-299.

Allrich RD, Christensen RK, Rord JJ, Zimmerman DR. 1983. Pubertal development of the boar: age-related change testicular morphology and in vitro production of testosterone and estradiol-17 beta. Biol Reprod 28: 902-909.

Aoki A. 1970. Hormonal control of Leydig cell differentiation. Proplasma 71: 209-225.

Ariyaratne HBS, Chamindrani Mendis-Handagama SML. 2000. Change in the testis interstitium of sprague dawly rats from birth to sexual maturity. Biol Reprod 62: 680-690.

Castro AC, Berntson WE, Cardoso FM. 2002. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbit. Biol Res 35: 493-498.

Ewing LL, Zirkin BR. 1983. Leydig cell structure and steroidogenic function. Recent Prog Horm Res 39: 599-632.

Ewing LL, Zirkin BC, Cochran RC, Kromann N, Peters C, Ruiz-Bravo N. 1979. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro : correlation with Leydig cell mass. Endocrinology 105: 1136-1142.

Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. Biol Reprod 9: 500-532.

Floderus S. 1944. Untersuchunger uber den bau der menschlichen hypophysemit bseonder berucksichtigung der quantitativen mikromorphologischen verhaltnisse. Acta Pathol Microbiol Scand 5: 1-276.

Gondos B, Morrison KP, Renston RH. 1977. Leydig cell differentiation in the prepubertal rabbit testis. Biol Reprod 17: 745-748.

Gondos B, Reston RH, Goldsten DA. 1976. Postnatal differentiation of Leydig cells in the rabbit testis. Am J Anat

145: 167-182.
Goyal HO, Dhingra LD. 1973. A study on the postnatal histology of the testis in buffalo (bubalus bubalis). From birth to one year. Acta Anat 84: 237-250.
Johnson L, Neaves WB. 1981. Age-related change in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. Biol Reprod 24: 703-712
Johnson L, Thomson DL. 1986. Seasonal variation in the total volume of Leydig cells in stallions is explained by variation in cell number rather than size. Biol Reprod 35: 971-979.
Kerr JB, Knell CM. 1988. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and fatal and postnatal rat testis. Development 103: 535-544.
Kim IS, Ariyaratne HBS, Mendis-Handagama SMLC. 2001. Effects of continuous and intermittent exposure of lactating mother to Aroclor 1242 on testicular steroidogenic function in the adult male offspring. Tissue Cell 33: 169-177.
Kim IS, Ariyaratne HBS, Mendis-Handagama SMLC. 2002. Change in the testis interstitium of Brown Norway rats with aging and effects of luteinizing and thyroid hormones on the aged testis in enhancing the steroidogenic potential. Biol Reprod 66: 1359-1366.
Kim IS, Kim HY, Lee YH, Yang HH. 2000. Comparison of components of the testis interstitium with testosterone secretion in pigeon, Pheasant, and chicken testis incubated in vitro. Koera J Lab Anim Sci 16: 257-268.
Kim IS, Yang HH. 1999. Morphometric study of the testicular interstitium of the rat during postnatal development. Korea J Anat 32: 849-858.
Kim IS, Yang HH. 2001. Seasonal change of testicular weight, sperm production, serum testosterone, and in vitro testosterone release in Korean ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus Karpowi*). J Vet Med Sci 63: 151-516.
Mendis-Handagama SMLC, Ariyaratne HBS. 2001. Change in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. Biol Reprod 65: 660-671.
Mendis-Handagama SMLC, Ewing LL. 1990. Sources of error in the estimation of Leydig cell number in control and atrophied mammalian testes. J Microsc 59: 73-82.
Mendis-Handagama SMLC, Risbridger GP, de Krester DM. 1987. Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. Int J Androl 10: 525-534.
Mendis-Handagama SMLC, Zirkin BR, Ewing LL. 1998. Comparison of components of the testis interstitium with testosterone secretion hamster, rat, and guinea pig testis perfused in vitro. Am J Anat 188: 12-22.
Moura AA, Erickson BH. 2001. Testicular development, histology, and Hormone profiles in three yearling angus bulls with spermatogenic arrest. Theriogenology 55: 1469-1488.
Neaves ES, Chiarini-Garcia H, Franca LR. 2002. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycles length in donkeys and mule. Biol Reprod 67: 274-255.
Neaves WB. 1973. Change in testicular Leydig cells and in plasma testosterone levels among seasonally breeding rock hyrax. Biol Reprod 8: 451-466.
Nistal M, Paniagua R, Regadera J, Santamaria L, Amat P. 1986. A quantitative morphometry of human Leydig cells from birth to adulthood. Cell Tissue Res 246: 229-236.
Pant HC, Sharma RK, Patel Shukla HR, Mittal AK, Kasiraj R, Misra AK, Prabhakar JH. 2003. Testicular development and its relationship to semen production in Murrah buffalo bulls. Theriogenology 60: 27-34.
Rana BK, Bilaspuri GS. 2000. Change in interstitial cells during development of Buffalo testis. Vet J 159: 179-185.
Rana BK, Bilaspuri GS. 2004. A quantitative study of seminiferous tubular cells in the developing Murrah buffalo testis. Vet J 167: 95-103.
Robert A, Delost P. 1978. Peripheral metabolism of testosterone during puberty in the male guinea-pig. Reprod Fert 53: 227-276.
Saez JM. 1994. Leydig cell: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. Endrocrine Rev 15: 576-626.
Sanchez B, Pizarro M, Garcia P, Flores JM. 1993. Histological study of Leydig cells in the cat from birth to sexual maturity. J Reprod Fert 47: 349-353.
Scala G, De Girolamo P, Corona M, Pelagalli GV. 2002. Microvasculature of the Buffalo Epididymis. Anat Rec 266: 58-68.
Sinha-Hikim AP, Amador AG, Russell LD. 1989. Structure/function relationship in active and inactive hamster Leydig cells : A correlative morphometric and endocrine study. Endocrinology 125: 1844-1856.
Wrobel KH. 1990. The postnatal development of the bovine Leydig cell population. Reprod Dom Anim 25: 51-60.
Wrobel KH. 2000. Prespermatogenesis and supermatogoniogenesis in the bovine testis. Anat Embryol 202: 209-222.
Zayed AE, Hifny A, Abou-Elmagd A, Wrobel KH. 1995. Seasonal changes in the intertubular tissue of the camel testis (*Camelus dromedarius*). Ann Anat 177: 199-212.
Zirkin BR, Ewing LL, Kromann N, Cochran RC. 1980. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. Endocrinology 107: 1868-1874.