大韓獸醫學會誌(1991) 第31卷 第1號
Korean J Vet Sci (1991) 31(1):1~10

닭의 精子腺 機能 向上을 위한 硏究
1. 組織化學的 및 電子顯微鏡的 觀察

郭守東・禹浩春・崔尙龍
경상대학교 수의과대학
(1990. 11. 3 접수)

Study on functional elevations of sperm-host glands in domestic hens
1. Histochemical and electron microscopical observations

Soo-dong Kwak, Ho-choon Woo, Sang-yong Choe
College of Veterinary Medicine Gyeongsang National University
(Received Nov. 3, 1990)

Abstract: The present investigation was focussed on histochemical and electron microscopical observations of utero-vaginal(U-V) glands in U-V junctions of domestic hens.

In histochemical observations, fine granules by PAS technique for mucopolysaccharides and nile blue stain for acidic lipids were slightly stained on the cytoplasm of U-V glandular epithelium.

Larger granules by Sudan black B stain for neutral fat and phospholipids and Sudan III stain for neutral fat were heavily stained on the perinuclear region of the U-V gland epithelial cells. These positive materials were heavily stained on the U-V glandular epithelium of low-fecundity hens and non-laying hens.

In scanning electron microscopic findings of the U-V junction surface, the orifices of U-V glands are seen as the crater-like invagination. The neck of the U-V gland and the epithelium of U-V junction were covered by ciliated epithelial cells. Aggregates of spermatozoa are observed often to be on the necks of the U-V gland. These spermatozoa heads are embedded in the glandular tubules and many spermatozoa tails are free on the epithelium of uterine surface.

In transmission electron microscopic findings, the epithelial cells of the U-V glandular orifices were ciliated, columnar cells. The apical regions of these cells contained numerous electron-dense, round secretory granules of uniformly size. The epithelial cells of the U-V glandular tubule were columnar or pyramid shape with round or oval nuclei. These epithelial cells have numerous microvilli and also contained electron-dense, round secretary granules of uniformly size and electron-lucent vesicles of various size. Spermatozoa are seen as the cross-sections of various regions of heads and tails in glandular tubules. Also spermatozoa arranged longitudinally parallel within the glandular tubules.

Key words: U-V glands, histochemistry, EM, hen.

이 논문은 1989년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음
("Ⅱ 精子貯藏 상태에 대하여"와 동일건임).

緒　論

닭의 암컷의 生殖器 중에 子宮과 膣 接合部의 隆起部는 외래 이물과 운동성이 없는 精子는 통과하지 못하게 하고 활력이 있는 精子만 통과하게 하는 精子이동의 선택적 장벽역할을 한다.[1~3] 精子가 隆起部를 통과할때 隆起部의 2~5mm 정도의 너비인 원형의 대에 있는 精子腺에 精子의 일부가 유입되어 장기간 보존하면서 일부분씩 배출하기 때문에 교미후 장기간 수정란을 産卵할 수 있으며 최장 32일간 수정란을 産卵하였다는 보고도 있다.[3~9]

精子腺내에 장기간 精子가 저장되는 동안 精子腺內는 저장한 精子를 위한 영양공급 등 적절한 환경이 형성되어 있다.[3,10~14]

精子腺을 組織化學的으로 觀察한 바, 닭 칠면조 메추리에서는 脂質 특히 燐脂質, 糖原 등이 함유되었다고 한바 있고[10,12,14~16], 電子顯微鏡的으로는 腺의 開口部는 纖毛細胞로 되고[10~12] 腺管의 上皮는 미섬모 세포로서 미세융모가 있고[10,11,13] 높은 대사와 분비작용의 소견이 있었다고 하였고[14], 또 産卵率이 높은 닭일 수록 수정율도 높고 또 精子腺內 精子保有率도 높다고 하였다.[7] 이로 보아 産卵率이 높은 닭의 精子腺은 기능도 더 왕성한 것으로 보고된 바 있다.[17]

精子腺의 정확한 기능을 硏究하기 위하여 精子腺세포의 組織學的 및 組織化學的 硏究는 장기간 精子를 저장시켜 人工受精率 향상을 위한 중요한 資料가 된다.

이 硏究의 목적은 닭의 精子腺의 組織化學的 및 電子顯微鏡的으로 精子腺의 기능 硏究의 資料를 조사함으로서 닭에 人工受精率 향상을 기하는 基礎資料를 제공코자 한다.

材料 및 方法

組織化學的 過程：15~18개월령 백색 産卵鷄(이사바브록)와 유색 産卵鷄(와렌)종 20수를 단독 cage에서 사육하면서 産卵率을 예비조사한 후, 부검하여 子宮膣 接合部를 절취하여 10% 中性 formalin액, formol-calcium액, Bouin액, 중크롬가리액 등에 固定하였다. 固定된 조직에서 수당 2~3개의 組織片을 채취하여 5 μm로 凍結切片 또는 paraffin 또는 paraplast 切片을 만들어 Sudan black B(Chiffele and Putt法), nile blue(Cain法), Sudan Ⅲ(Whitehead法), PAS法(De Tomasi-Coleman法), 渡銀染色法(Gomor法) 등의 染色을 실시하여 광학현미경으로 觀察하였다.[18]

走査電子顯微鏡的 過程：6개월령 백색 多産鷄(이사바브록) 2수를 剖檢하고, 子宮膣 接合部를 가로 세로 각 2cm 정도의 3~5개 조직편을 채취하여 생리적 식염수에 3회 세척한 후, 2.5% glutaraldehyde(sodium phosphate buffer, pH 7.2)에 固定하였다. 다시 0.1M sodium phosphate buffer에 3회 수세하여 alcohol에 단계적 脫水를 한 다음 凍結 건조기에서 냉동건조하고 gold coating한 후, DS-130C 주사 전자현미경으로 觀察하였다.

透過電子顯微鏡的 過程：6개월령 백색 多産鷄(이사바브록) 2수의 子宮과 膣接合部 조직을 1cm 정도의 나비로 절취하고 4°C 생리적 식염수에 5~10분 동안 洗滌한 후, 3% glutaraldehyde(0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.4)에 4°C에서 2시간 동안 前固定하고 그 후 다시 0.1M sodium phosphate buffer로 수세하였다. 이후 다시 추벽이 가능한 많이 부착된 부위를 1mm³ 정도의 크기로 절제하고 1% osmium tetroxide (0.1M sodium phosphate)에 30분간 後固定 하였다. 그후 위의 buffer액에 다시 세척하고 alcohol의 단계적 탈수와 propylene oxide의 치환을 거쳐 Epon media로 포매하였다. 다음 ultra microtome으로 만든 초박절편을 lead citrate와 uranyl acetate로 2重 染色한 후 전자현미경(히다치)으로 觀察하였다.

結　果

組織化學的 觀察(Plate Ⅰ)：精子腺을 組織化學的으로 觀察하기 위하여 각종 방법으로 染色을 하였던 바, PAS染色(Fig. 1)에서는 점액다당류 物質로 인정되는 赤色의 陽性物質이 腺壁에서 미세한 과립으로 觀察되었고 이러한 物質들은 精子가 저장되지 않는 신박에서 더 진하게 染色되는 경향이었다.

Sudan black B染色(Fig. 2,3)에서는 中性脂肪과 燐脂質로 인정되는 흑색의 비교적 큰 顆粒들이 腺上皮細胞의 核의 주변부에 주로 밀집하여 觀察되었다.

Sudan Ⅲ染色(Fig. 4,5)에서는 脂肪顆粒으로 인정되는 등적색의 微細顆粒들이 産卵率이 다른 닭이나 精子保有 여부에 관계없이 모든 腺上皮에서 광범하게 밀집하여 觀察되었고 非産卵鷄의 腺上皮에서는 더 현저하게 觀察되는 경향이었다.

한편 nile blue染色(Fig. 6)에서는 그 染色性이 아주 약하고 작은 顆粒들이 觀察되었다.

이들의 각종 染色性의 物質들은 非産卵鷄의 腺이나 産卵率이 낮은 닭의 腺의 上皮에서 더 많은 경향이었다.

渡銀染色(Fig. 7)에서 정상적인 형태를 한 精子腺의 주위에는 세망섬유망이 미세한 반면, 腺腔이 확장되고 신박이 위축된 腺의 주위에는 세망섬유망이 굵고 치밀

한 경향이었다.

走査電子 顯微鏡的 觀察(Plate Ⅱ) : 子宮과 膣 接合部의 上皮와 精子腺의 開口部는 纖毛上皮로 되었고 精子腺의 開口部는 표면에서 분화구 처럼 함몰되었다(Fig. 1). 精子들은 子宮上皮의 표면에는 하나씩 고립성으로 산재하였으나, 精子腺의 開口部에서는 경자가 밀집하여 精子塊를 형성하였으며 腺管의 입구를 막고 있었고(Fig. 2,3), 일부 精子의 頭部는 腺腔內로 진입시키고 尾部는 표면에 노출시키고 있었다(Fig. 3).

透過電子 顯微鏡的 觀察(Plate Ⅲ) : 子宮上皮와 腺管 입구의 上皮 표면은 긴 纖毛가 밀생하고 있었고 核은 부정형이고 세포질내는 전자밀도가 치밀하고 균등한 크기의 원형 분비과립이 밀집하고 있었고 전자 밀도가 낮고 투명한 대소 부동 원형의 공포가 산재하고 있었다(Fig. 1).

腺管의 腺上皮細胞는 작은 핵소체를 가진 核이 원형 또는 타원형으로 기저부에 위치한 원주형 또는 긴 pyramid형 細胞이었고 선세포의 遊離面에는 미세한 융모가 밀생하였다(Fig. 2,3). 또 세포질내는 전자밀도가 치밀하고 균등한 크기인 원형의 분비顆粒이 세포의 상부에 밀집하고 있었고 전자밀도가 희박한 대소부동의 空胞도 산재하고 있었다. 또 腺腔內 저장된 精子(Fig. 2,3)는 腺腔內 遊離하고 있거나 미세융모에 접하고 있었고 精子의 頭部 中片部 終部 등의 斷面이 보였고 腺腔의 장축에 평행하여 있는 경향이었다.

考 察

박쥐(bat)의 子宮上皮는 精子를 보유하고 있는 동안은 組織化學的 觀察에서, Krutzsch et al[19]은 PAS 陽性物質을, Racey[20]와 Burke et al[21]은 glycogen을 觀察한 바 있고, Hoffman과 Wimsatt[22]는 뱀(snake)의 卵管의 蓄臟器(receptacle)에서 이와 같은 보고를 한바 있다.

닭과 메추리의 子宮 膣 接合部에 있는 精子腺 上皮에는 精子를 보유하고 있는 동안 PAS 陽性物質과 脂質顆粒을 觀察한 바가 많다.[10~12,14~16,20,21] 본 觀察에서도 위의 보고와 같이 中性脂肪 燐脂質 등 脂肪物質과 唾液처리로서 소멸되는 PAS 染色 陽性物質 등이 觀察되었고 이러한 物質은 產卵鷄뿐 아니라 위에서 조사한 바 없는 휴지기에 있는 非產卵鷄의 精子腺의 上皮에서 더 많이 출현하는 경향이었다. 非產卵鷄의 이러한 소견은 이들 物質들의 분비가 감소 또는 정지되고 停滯되어 있는 상태로 사료되었다.

精子腺은 기능이 감소되면 점차 구조가 퇴축하거나 변성 괴사되어 結合組織으로 대치될 것이다. 본 觀察에서는 渡銀 染色에서 精子腺은 정상상태[11]거나 腺腔의 확장 신박이 위축된 상태에서도 結合組織이 精子腺壁과 腺腔內에 증식 침입하지 않았고 미세한 疎性結合組織으로 되어 있었으나 선주위에 세망섬유가 더 굵고 치밀한 경향만이 인정되었다.

精子腺內 저장된 精子에 대하여는 透過電子 顯微鏡的으로 腺上皮細胞와 精子腺腔內 精子에 대하여 觀察한 바[10,13~15,19,23]가 있으나, 走査 電子顯微鏡的으로는 rat 子宮上皮에 관하여서만 觀察한 바[1] 있는데 精子신의 입구는 자궁점막 표면에 乳頭 모양으로 돌출되었다고 하였다.

닭은 精子腺의 分布帶가 너무 좁고[24] 육안적으로 부위를 명확히 확인 하는데 어려움이 많아 주사전자 현미경적으로는 觀察 보고한 바를 확인할 수 없고 다만 Burke et al[21]은 투과 전자현미경적으로 관찰하고 精子는 腺管내서 頭部를 腺管의 주변에, 尾部는 腺管의 중심부에 두는 경향이 있다고 하였다.

본 走査電子 顯微鏡的 觀察에서 精子腺의 입구가 분화구 처럼 함몰한 것은 rat의 자궁관의 接合部에 精子 유입부위가 유두처럼 돌출하고 개구부가 닫혀 있는 것보다는 개구부가 열려서 있고 크며 형태의 차이가 많았다. 또 精子가 선강내에 완전히 합입되지 못하고 尾部가 자궁 표면에 노출된 것은 중요한 의미로 사료 된다. 精子腺을 함유한 추벽들은 腺管을 수축하여 저장된 精子를 배출할 수 있는 근육층이 없고 單層의 腺上皮로만 되고 그 주변부는 渡銀染色에서도 본 바와 같이 소화관의 고유판 처럼 疎性結合組織으로 되어 있어 저장된 精子가 어떻게 다시 유출되는지에 대하여는 보고된 바가 없고 다만 미지의 어떤 작용이나 요인이 있을 것으로 추정하고 있을 뿐이다.[7,21]

본 走査電子 顯微鏡的 觀察에서 精子腺에 저장된 精子의 일부는 頭部 또는 주부까지만을 腺腔內에 함입하고 그 하부는 子宮내면에 노출하고 있어 난관내 형성된 계란이 이 부위를 통과할 때 卵殼의 마찰압력으로 인하여 精子腺內 精子가 腺腔 밖으로 유출될 것으로 생각된다.

透過電子 顯微鏡的 觀察에서 精子腺腔內 精子는 腺上皮에 밀착되지 않고 遊離되거나 腺上皮의 미세융모에 집축되어 있고, 腺管의 한 斷面에서 精子가 頭部 上片部 終部 등 여러 부위의 斷面이 나타 났다고 하였다.[3,21] 본 觀察에서도 精子腺 上皮는 lipid 顆粒의 제거부위로 생각되는 공포와 電子密度가 높은 glycogen 顆粒이 많이 觀察되어 분비기능이 왕성하였고 精子는 腺腔內 遊離되어 있었고 또 精子의 斷面을 Bernstein

과 Techman[25]의 觀察한 바와 같이 精子의 여러 부위의 斷面이 觀察되었다. 이러한 소견은 貯藏精子의 일부는 깊숙히 함입되어 尾部가 子宮上皮 표면에 노출되지 않는 것도 많을 것으로 사료되었다.

結　論

産卵鷄의 子宮과 膣 接合部의 精子腺을 組織化學的 및 電子顯微鏡的으로 觀察하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

組織化學的 觀察에서 精子腺管의 壁은 粘液多糖類와 酸性脂肪은 낮은 陽性反應을 나타내는 미세한 顆粒들로 출현하였고, 中性脂肪과 燐脂質은 높은 陽性反應을 나타내는 大顆粒들로 출현하였다. 이러한 反應은 産卵率이 낮거나 非産卵鷄의 精子腺管의 벽에서 더 높은 反應을 보였다.

走査電子 顯微鏡的 觀察에서 精子腺의 開口部는 분화구처럼 함몰되었고 자궁과 질의 接合部의 상피와 精子腺의 開口部는 纖毛上皮로 되고 精子腺의 開口部에는 精子가 밀집하였고 이들 精子들의 일부는 頭部를 腺腔內 진입시키고 尾部는 점막 遊離面에 노출하고 있는 것이 많았다.

透過電子 顯微鏡的 觀察에서 腺管의 개구부의 上皮細胞는 纖毛 圓柱細胞였고 전자밀도가 치밀하고 균등한 크기의 분비과립을 많이 함유하였고 腺管의 壁上皮細胞는 核이 원형 또는 타원형인 원주 또는 pyramid 형세포로 遊離面에 융모가 밀생하고 있었고 이 세포상부는 전자밀도가 치밀하고 균등한 크기의 분비과립과 대소부동의 공포가 산재하였고 腺腔內 유입된 精子들의 斷面은 頭部와 尾部의 여러 부위가 觀察되어 精子의 腺腔內 진입정도가 다양하였고 腺腔의 장축에는 평행하게 배치되어 있었다.

Legends for figures

Plate I

Light micrographys of histochemical findings of the U-V gland in laying hens.

Fig 1. Note lighter positive reaction in the epithelium of sperm-containing utero-vaginal(U-V) glands (arrow and arrow head) and uterine fold epithelium by PAS technique for mucopolysccharide. ×50.

Fig 2. Note large positive granules in the epithelium of the completely spermatozoa-filled U-V glands (arrow) and uterine fold epithelium by Sudan black B stain for neutral fat and phospholipids. ×50.

Fig 3. Higher magnification of the completly spermatozoa-filled U-V gland (arrow) in Fig 2 is seen. ×125.

Fig 4 and 5. Note large positive granules in the epithelium of non-spermatozoa containing U-V glands in Fig 4 and in the epithelium of the completely spermatozoa-filled U-V glands(arrow) in Fig 5 by Sudan III stain for neutral fat. ×125.

Fig 6. Lighter reacton of acid lipid is seen in the epithelium of U-V glands by nile blue stain. ×125.

Fig 7. The U-V glands in uterine folds of high fecundity hen are seen in fine reticular fiber meshwork by silver impregnation stain. ×50.

Plate II

Scanning electron micrograph of the orifice of the U-V gland and the free suface of the U-V junction in laying hens.

Fig 1. Three orifices (arrows) of the U-V gland are seen in the free surface of the U-V junction. Bar= 9.01μm. ×1,110.

Fig 2. Sperm-aggregate (arrows) in the orifices of the U-V gland and numerous long ciliated cells of the free surface of the U-V junction are seen. Bar=6.25μm. ×1,600.

Fig 3. Heads (arrows) of some spermatozoa pointed towards an orifice of the U-V gland. Bar=6.17μm. ×1,620.

Plate III

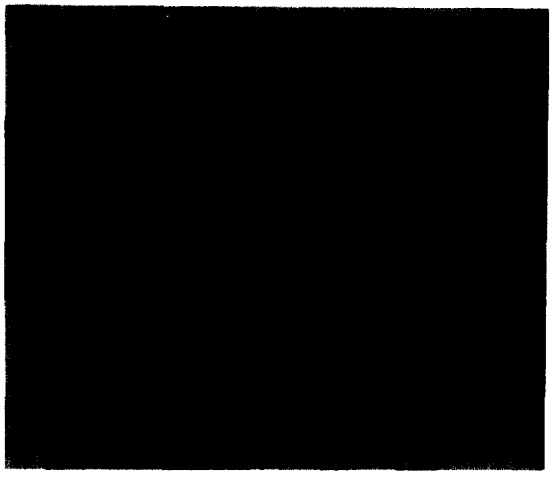
Transmission electron microscophs of the U-V glands in laying hens.

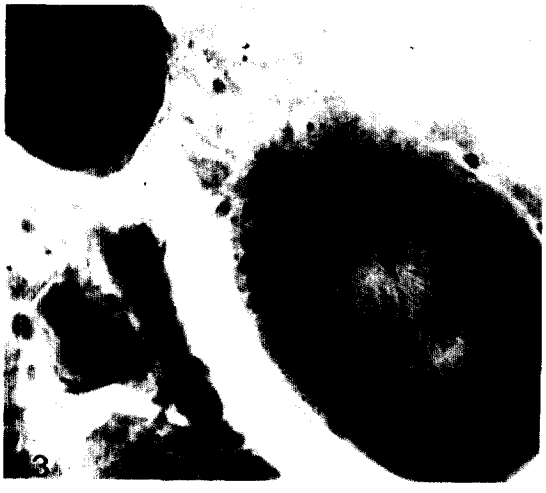
Fig 1. Long ciliated cells of the orifice have numerous electron-dense secretory granules (arrow) and round or oval nuclei. ×3,800.

Fig 2. Several cross or oblique-sections through various spermatozoa regions (arrows) are present in the glandular lumen. The epithelial cells of this gland were columnar or pyramidal shapes with round or oval nuclei. ×3,800.

Fig 3. Higher manification of Fig 2. Many electron-dense secretory granules (arrows) of uniformly size and electron lucent vesicles (arrow heads) of various size are in the apical regions of glandular cells. Also abundant microvilli (broad arrows) on the free surface of epithelium are seen. ×9,500.

Plate I





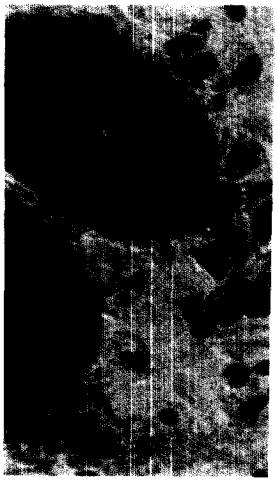


Plate II

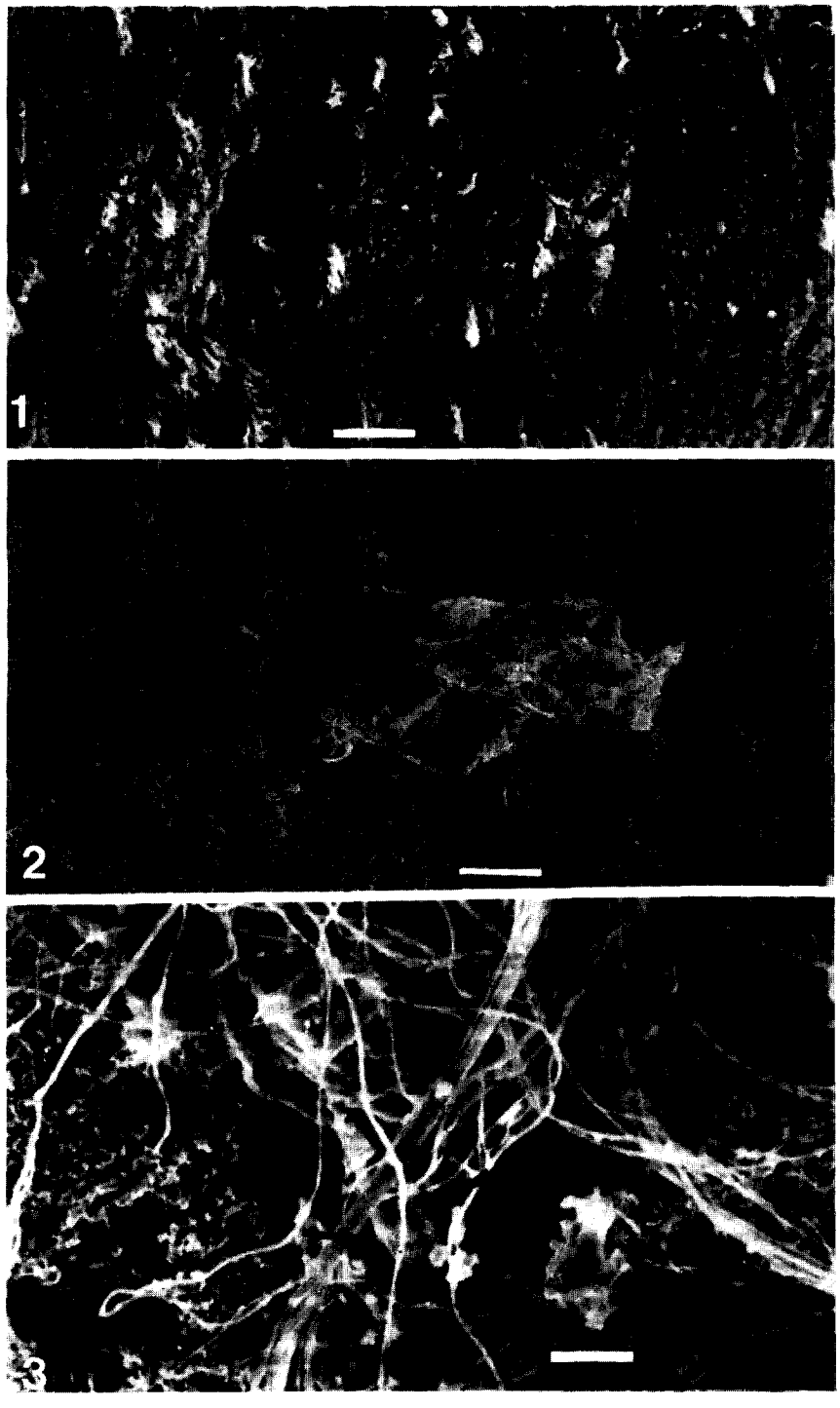
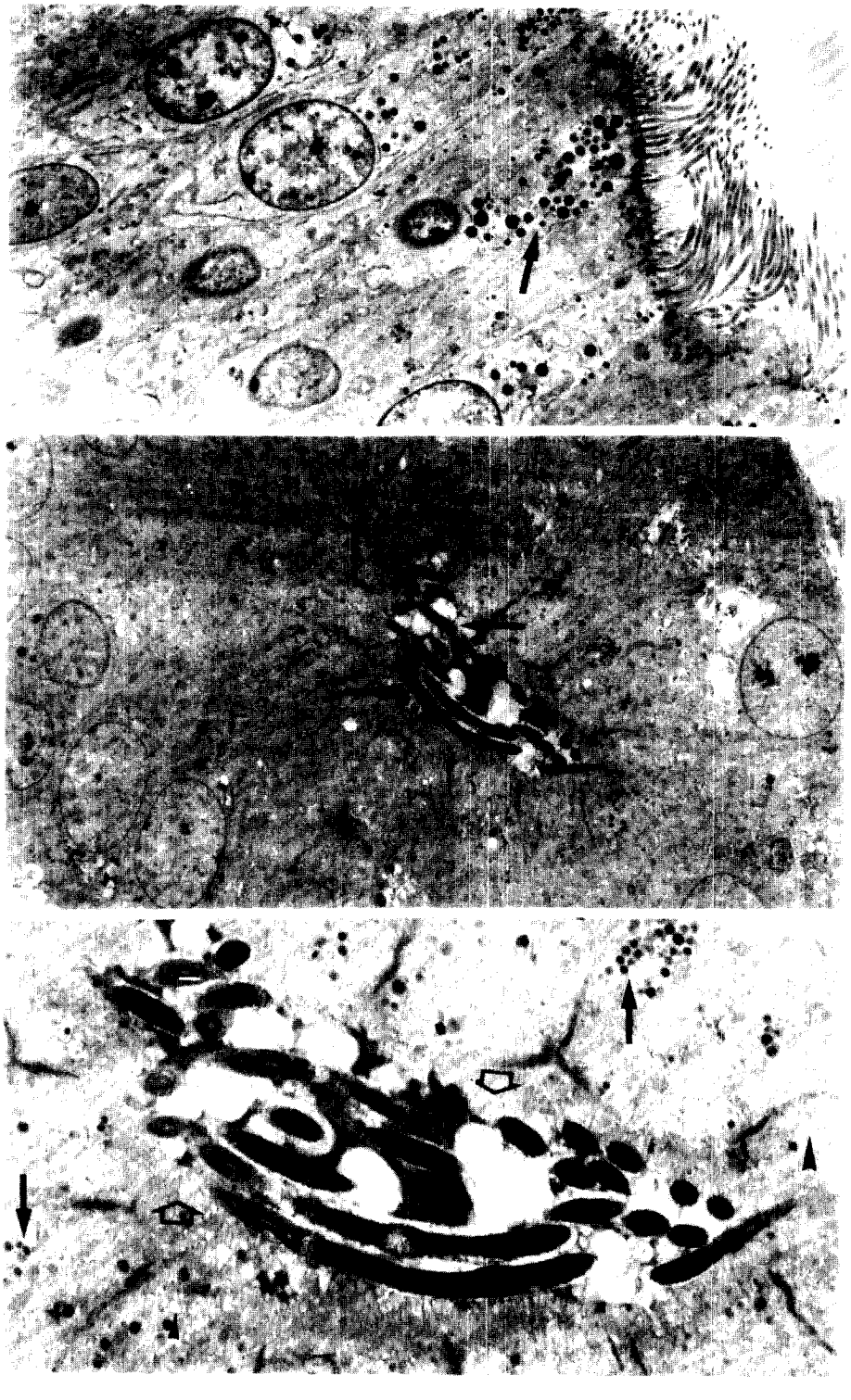


Plate III



參 考 文 獻

1. Gaddum-Rosse P. Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat. *Am J Anat* 1981;160:333~341.
2. Krzanowska H. The passage of abnormal spermatozoa through the uterotubal junction of the mouse. *J Reprod Fert* 1974;38:81~90.
3. Schindler H, Ben-David E, et al. The relation of spematozoa to the glandular tissue in the storage sites of the hen oviduct. *Poultry Sci* 1967;46:1462~1471.
4. Bilgili SF, Renden JA, Krista LM. Relationships among fertility, sperm storage, and shell quality. *Pouttry Sci* 1984;63:2292~2295.
5. Van Krey HP, Balander RJ, Compton MM. Storage and evacuation of spermatozoa from the uterovaginal sperm-host glands in domestic fowl. *Poultry Sci* 1981;660:871~877.
6. Van Krey HP, Leighton AT. Sperm gland population, oviduct homogenates and late season declines in fertility. *Poultry Sci* 1970;49:1447 (Abstr.).
7. 이재근. 닭의 인공주정시각이 수정에 미치는 영향. Ⅱ. 체질 주정에 관한 연구(제 2 보). 한국축산학회지 1970;12(1):1~10.
8. Bobr LW, Lorenz FW, Ogasawara FX. Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds. I. Residence sites of spermatozoa in fowl oviducts. *J Reprod Fertil* 1964;8:39~47.
9. Bobr LW, Ogasawara FX, Lorenz FW. Distribtion of spermatozoa in domestic birds. II. Transport of spermatozoa in the fowl oviducts. *J Reprod Fertil* 1964;8:49~58.
10. Friess AE, Sinowatz F, Wrobel KH. The uterovaginal sperm host glands of the quail (Coturnix japonica). *Cell Tiss Res* 1978;191:101~114.
11. Gilbert AE, Reynolds ME, Lorenz FW. Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds. V. Histochemistry of the uterovaginal sperm-host glands of the domenstic en. *J Reprod Fert* 1968;16:433~444.
12. Renden JA, May EB, Benoff FH. Histochemistry of uterovaginal sperm-host gland in japanese Quail (Coturnix japonica) with reference the period of oviposition. *Poultry Sci* 1981;60:2529~2531.
13. Schuppin GT, Van Krey HP, Denbow DW. Ultrastructural analysis of uterovaginal sperm storage glands infertile and infertile breeder hens. *Poultry Sci* 1984;63:1872~1882.
14. Tingari MD, Larke PE. Ultrastructural studies on the uterovaginal sperm-host glands of the domestic hen, Gallus domestics. *J Reprod Fert* 1973;34:423~431.
15. Johnston HS, Altken RNC, Wyburn GM. The fine structrue of the uterus of the domestic fowl. *J Anat Lond* 1963;97(3):333~344.
16. Baker M, Brake J, Krista LM, Histological study of uterine lipid distributon in the laying hen. *Poultry Sci* 1980;59:1557~1558.
17. Given RL, Enders AC. Mouse uterine glands during the peri-implantation period; Fine structure. *Am J Anat* 1980;157:169~179.
18. Raphael SS, Lynch's medical laboratory technology. 3th ed. Philadelphia: WB Sauders Co. 1979:876~1063.
19. Krutzsch PH, Crichton EG, Nagle RB. Studies on prolonged spermatozoa survival in Chiroptera: A morphological examination of storage and clearance of intra-uterine and cauda epididymal spermatozoa in the bats Myotis lucifugus and M. velifer. *Am J Anat* 1982;165:421~434.
20. Racey PA. The prolonged storage and survival of spermatozoa in chiroptera. *J Reprod Fert* 1975;56:391~402.
21. Burke WH, Ogasawara FX, Euqua CL. A study of the ultrastructure of the uterovaginal sperm-storage glands of the hen, gallus domesticus, in relation to a mechanism for the release of spermatozoa. *J Reprod Fert* 1972;29:29~36.
22. Hoffman LH, Wimsatt WA. Histochemical and elctron microscopic observations on the sperm receptacles in the gaeter snake oviduct. *Am J Anat* 1972;134:71-96.
23. Racey PA, Uchida TA, et al. Sperm-epithelium relationships in relation to the time of insemination in little brown bats (Myotis lucifugus). *J*

Reprod Fert 1987;80:445~454.
24. Ogasawara FX, Lorenz FW, Bobr LW. Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds. *J Reprod Fert* 1966; 11:33~41.
25. Bernsten MH, Teichman RJ. Regional differentiation in the heads of spermatozoa of rabbit, man bull. *Am J Anat* 1972;133:165~178.