

한우 정액에 B-body 보유 정자와 마우스 조직에 F-body 부유 세포의 출현율

곽수동 · 강원화 · 박성식
경상대학교 수의과대학
(1993년 8월 14일 접수)

Appearance frequency of spermatozoa bearing B-body in semen of Korean native bull and cells bearing F-body in mouse tissues

Soo-dong Kwak, Won-hwa Kang, Sung-shik Park
College of Veterinary Medicine Gyeongsang National University
(Received August 14, 1993)

Abstract : The smear preparations of the semen from Korean native bull and the tissue preparations of the organs from male and female mice were performed by fluorescent staining method.

More than 600 spermatozoa per straw from two semen straw groups and more than 300 cells per mouse organ from two mice per sex were observed and then the ratio of spermatozoa bearing B-body and the cells bearing F-body were assessed, respectively.

1. The ratios of spermatozoa bearing B-body in semen of Korean native bull were $37.3 \pm 3.1\%$.
2. The ratios of cells bearing F-body in the organs of mice were $63.5 \pm 4.5\%$ in male tissues and $7.5 \pm 3.2\%$ in female tissues.
3. The organs with higher appearance frequency of F-body were ordered as brain, kidney, stomach, lung, testis, liver, small intestine, spleen and pancreas in male mice and pancreas, small intestine, liver, brain, kidney, lung, spleen and stomach in female mice.

Key words : F-body, mouse tissues, B-body, spermatozoa, Korean native bull.

서 론

인간은 후대의 성을 인위적으로 지배하려고 오랜 세대를 통하여 연구를 계속하여 왔다. 현대는 인공수정의 발달과 형광염색법으로 X Y 염색체를 가진 정자를 구별할 수 있음에 따라 정액을 전기영동법, 침전분리법 등 여러가지 방법을 실시하여 X Y 정자를 분리한 실험 결과를 확인할 수 있어 후대의 성지배에 많은 발전이 이루어져 왔다.¹⁻² 그러나 윤리적 도덕적인 면과 결부되어 연구에 많은 제약이 되고 있다.

동물에서는 암·수의 성조절이 가능하다면 생산성 향상에 많은 도움이 되므로 성지배를 위한 연구가 계속되어 왔다.^{1,8,21~23}

태아의 성감별은 임신한 부인의 태막의 융모막 상피 또는 양수에서 분리·배양한 임파구나 섬유모세포로써 성감별을 하고 있다.^{3,5,9,12,14,24~28}

X Y 정자의 구별은 앞으로 출산될 후대의 암·수 성을 조절할 수 있는 기초가 되며 개체 조직세포에 대한 성의 구별은 운동선수의 성감별이나 법의학적인 등에서 필요한데 구강상피세포, 말초혈액의 백혈구 등이 이용

되고 있다. ^{2, 4-6, 9, 12, 25, 29, 30} 이와같은 성감별은 휴지기 세포의 Y 염색체 위위 말단부에 있는 adenine과 thymine이 형광물질과 친화성이 강하여 fluorescent body(F-body)로 출현하기 때문이라 하며 이 F-body는 휴지기 세포의 Y 염색체의 존재 빈도와 일치한다고 한다. ^{2, 6, 10}

본 연구는 사람 정자의 F-body와 같은 의미인 소 정액의 B-body^{1, 18, 20}를 보유한 정자의 비율을 조사하고 mouse의 각 장기를 동결절편하여 사람에서의 F-body와 같은 형광소소의 출현양상을 조사함으로써 암·수성의 인위적 조절실험을 위한 동물의 태아 성감별이나 법의학적면에서 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

한우의 정액 : 축산업협동조합으로부터 가축병원 또는 인공수정소에 공급되고 있는 인공수정용 한우 정액을 일주일 간격으로 2개씩 ice box로 straw를 실험실에 운반한 직후 율해하여 한 straw당 5ml의 생리적식염수를 가하여 2,500rpm으로 20분동안 원심분리한 후에 상층액을 제거하고 침전물을 다시 1ml의 생리적식염수와 10mg의 protease(Sigma)를 가하여 38°C에서 20분간 소화한 후에 slide glass에 이 정액과 0.4% quinacrine dihydrochloride(pH 5.5, Sigma)를 각각 1적을 혼합하여 3~5분간 염색하고 cover glass로 덮어 형광현미경(Nikon)으로 B V filter하에서 두개의 straw로된 군단 600개 이상의 정자중에서 B-body가 출현하는 정자의 비율을 조사하였다.

Mouse 조직 : Mouse(ICR, 5주령) 암·수 각 2수를 ether로 마취하여 10% 중성 formalin으로 관류고정한 후에 개체별로 위, 회장, 간, 비장, 췌장, 폐, 고환, 뇌 등 각 실질장기를 채취하여 동결 medium(Polyscience Co)에 포매한 후 5~7 μ m 정도의 두께로 동결절편을 만들고 Vectabond reagent(Vector Lab)로서 coating 처리한 slide glass에 부착시켜 다시 100% methyl alcohol에 5분동안 재공정하고 건조하였다. 다음 0.05% protease(Sigma)로 37°C에서 30분간 처리한 후에 5N HCl 용액으로 30분동안 산성화하여 PBS로 5분동안 수세하였다. 이후 다시 0.4% quinacrine dihydrochloride(pH 5.5)에 5분동안 염색하고 PBS(pH 5.5)로 수세하여 glycerine으로 mounting하고 형광현미경으로 BV filter 하에서 각 장기의 300개 이상의 세포중에서 F-body가 출현하는 세포의 비율을 조사하였다.

결 과

인공수정용 한우 정액과 mouse 각 장기의 조직 절편을 quinacrine dihydrochloride로 형광염색하여 형광현미경

으로써 한우 정액은 첫째와 둘째 각회의 두 straw군에서 군단 600개 이상의 정자를 관찰하여 그 중에 B-body를 보유한 정자의 비율을 조사하고, mouse는 각 장기당 300개 이상의 세포를 관찰하여 그 중에서 F-body를 보유한 세포의 비율을 조사한 바 한우 정액에서는 Table 1과 같이 B-body를 보유한 정자(Fig 1)의 비율이 첫째 straw군에서는 36.0 \pm 2.8%, 둘째 straw군에서는 38.5 \pm 3.5%로 두 straw군의 평균은 37.3 \pm 3.1%였다.

Table 1. Incidences of spermatozoa(%) bearing B-body in semen of Korean native bull

| 1st STRaws | 2nd Straws | Means |
|----------------|----------------|----------------|
| 36.0 \pm 2.8 | 38.5 \pm 3.5 | 37.3 \pm 3.1 |

Mouse 수컷 9개 기관과 암컷 8개 기관에서 F-body를 보유한 세포(Fig 2)의 출현율을 조사한 바 Table 2, 3과 같이 수컷 2수 중에 mouse A는 61.7 \pm 4.0%, B는 65.3 \pm 7.5%로서 수컷의 평균은 63.5 \pm 4.5%였고, 암컷 2수 중에 mouse A는 9.0 \pm 4.0%, B는 6.0 \pm 2.9%로서 암컷의 평균은 7.5 \pm 3.2%였으며 같은 성의 개체별로는 약간의 차이가 있었으나 성별로는 암컷에서 보다 수컷에서 월등히 높았다.

장기별로는 수컷은 뇌, 신장, 위, 폐장, 고환, 간장, 소장, 비장, 췌장 등의 순으로 출현율이 높았고, 암컷은 췌장, 소장, 간장, 뇌, 신장, 폐장, 비장, 위 등의 순으로 출현율이 높았다.

고 찰

사람에서 Y 염색체인 F-body는 동물의 정자에서는 B-body와 같은 결과로 규정하였는데^{1, 18, 20} 이들 소체들은 암컷의 X 염색체인 Barr body처럼 다같이 핵내 형광빛을 나타내는 성염색체이다. 이 두 소체는 서로 형태의 혼동이 있었으나 1981년 Davis와 Penny⁴는 수컷의 F-body는 암컷의 세포핵막에 밀착해 있는 Barr body보다 1/3정도로 작고 위치가 불일정하고 더 강한 형광빛을 발생하는 것으로 규정하여 양자 구별을 명확히 한 바 있다. 그러나 F-body나 Barr body와 같은 형태의 형광빛을 나타내는 소체가 반대성 쪽의 세포에서도 비정상적으로 소수 나타난다. 이러한 현상은 상대성에서 형광을 발하는 어떤 다른 비특이 물질⁵이거나 다른 핵염색질 고정과정에서 너무 치밀하게 되어 나타나는 현상으로써⁹ 태아의 용모막에서도 5%이하의 비특이적인 소체가 발견된다고 하였다.⁵ 그러므로 형광항체법에서 이들 소체의 유무로는 성감별이 불가능하고 출현율의 높고 낮음의 차이로써 성감별에 이용하고 있다. 그러나 F-body의 체세포내 출현빈도는 휴지기 세포의 Y 염색

Table 2. Incidences of nuclei(%) with fouorescent bodies in frozen sections from the organs of two male mice stained with quinacrene dihydrochloride

| Organs | Mouse A | Mouse B | Means |
|-----------------|-------------|------------|-------------|
| Testis | 63.7 ± 7.5 | 64.0 ± 6.2 | 63.8 ± 6.2 |
| Spleen | 64.3 ± 10.3 | 57.0 ± 4.0 | 60.7 ± 8.0 |
| Small Intestine | 65.3 ± 12.6 | 57.0 ± 4.0 | 61.2 ± 9.5 |
| Liver | 61.0 ± 10.1 | 63.3 ± 6.4 | 62.2 ± 7.7 |
| Kidney | 57.3 ± 4.0 | 75.0 ± 3.5 | 66.2 ± 10.2 |
| Brain | 60.0 ± 2.7 | 82.3 ± 3.1 | 71.2 ± 12.5 |
| Lung | 63.7 ± 7.0 | 67.3 ± 9.0 | 65.5 ± 7.5 |
| Stomach | 69.7 ± 2.9 | 61.7 ± 7.2 | 65.7 ± 6.6 |
| pancreas | 50.3 ± 2.5 | 59.7 ± 2.1 | 55.0 ± 5.5 |
| Means | 61.7 ± 4.0 | 65.3 ± 7.5 | 63.5 ± 4.5 |

Table 3. Incidences of nuclei(%) with fouorescent bodies in frozen sections from the organs of two female mice stained with quinacrene dihydrochloride

| Organs | Mouse A | Mouse B | means |
|-----------------|------------|------------|------------|
| Spleen | 5.3 ± 2.9 | 5.3 ± 5.1 | 5.3 ± 3.7 |
| Small Intestine | 14.0 ± 2.6 | 10.0 ± 2.0 | 12.0 ± 3.0 |
| Liver | 11.7 ± 3.2 | 6.3 ± 0.6 | 9.0 ± 3.6 |
| Kidney | 5.3 ± 2.1 | 5.7 ± 2.3 | 5.5 ± 2.3 |
| Brain | 5.3 ± 2.1 | 5.7 ± 1.5 | 5.5 ± 1.5 |
| Lung | 8.0 ± 1.7 | 2.7 ± 0.6 | 5.3 ± 3.1 |
| Stomach | 7.7 ± 2.6 | 2.3 ± 0.6 | 5.0 ± 3.5 |
| pancrease | 15.0 ± 2.0 | 10.0 ± 2.6 | 12.5 ± 3.5 |
| Means | 9.0 ± 4.0 | 6.0 ± 2.9 | 7.5 ± 3.2 |

체의 출현빈도와 일치하며 사람에서 한세포에 두 F-body가 출현하는 세포는 염색체가 47 X Y Y 인 세포로 추정하였다.^{2,9,10}

사람의 정액에서 F-body 또는 동물의 정액에서 B-body를 보유한 Y 정자의 비율을 조사한 바 고양이의 두예에서 Oikawa³¹는 40.91 ± 3.13%, 고 등¹⁸은 소에서 43.3 ± 1.3%, 돼지에서 45.5 ± 0.7%, 사람에서 Kelberman과 Barlow¹⁰은 38.5 ~ 46.5%, Klasen과 Schmid²⁴은 47%, 고 등¹⁸은 41.8 ± 0.5%, Quinlivan과 Sullivan³²는 31 ~ 37%에서 관찰되었다고 하였다. 본 조사는 한우에서 37.3 ± 3.1%로 Quinlivan과 Sullivan의 사람에서의 보고와 거의 일치하였고 그의 다른 동물이나 사람에서의 보고에 보다는 약간 낮은 편이다.

Dotters et al⁵는 사람 태아의 80예를 융모막과 양막 등의 태반조직절편을 이용하여 감별한 바 있고, 출생후 성감별은 1972년 Kegel과 Conen⁹가 paraffin 조직을 이용하여 F-body의 분포비율을 사람에서 남녀 구분하여 조사한 바 조직세포에서 남자는 71%, 여자는 9%의 세포에서 관찰되어 남자가 월등히 많이 출현하였기에 성감별의 기초방법이 됨을 보고한 바 있다.

혈액을 이용하여 F-body를 보유한 세포의 출현율에 의한 성별 차이를 조사한 바를 보면 Thomsen과 Niebular³⁰은 사람의 혈액도말에서 남자 혈구의 56%와 58%에서, 여자 혈구의 10%에서 F-body가 관찰되었다고 하였고, F-body를 가진 세포율이 10% 이상일 때는 남자, 10% 이하 일때는 여자로 규정한 바 있고, 연령이 증가할 수록 그 율이 낮아진다고 하였다. West et al²⁸는 성인의 혈구에서 Y 염색체를 가진 세포가 많은 경우 60 ~ 66%, 적은 경우 51 ~ 61%였고 최하의 경우도 40% 이상 이었고, 여자는 최고의 경우도 10%이하라고 하여 보고자에 따라 차이가 많다.

본 조사에서 mouse 각 장기 체세포의 평균에서 수컷은 63.5 ± 4.5%, 암컷은 7.5 ± 3.2%로써 사람의 혈구와는 F-body 출현율이 약간의 차이는 있었으나 암·수 성별의 현격한 차이는 사람에서 처럼 많음을 알 수 있었다.

Kegel과 Conen⁹은 사람의 남자와 여자의 신장, 간, 췌장, 근육, 위, 소장, 폐 등 각 장기 별로 조사한 바 있는데 세포의 50% ~ 80%의 핵내에서 관찰되었다고 하였다.

본 조사에서 mouse 암·수 각 8개와 9개의 장기는 Table 2, 3과 같이 암·수의 모든 장기에서 사람의 조사에 보다 현저히 낮았다.

Kegel과 Conen⁹은 사람의 고환조직에서 4단계의 성세포를 조사한 바 정조세포는 $80 \pm 7.9\%$, 정모세포는 $39 \pm 15.7\%$, 정자세포는 $53 \pm 5.7\%$, 정자는 $45 \pm 4.0\%$ 의 세포에서 F-body가 출현하였다고 하였다.

본 조사에서 mouse 고환의 전체 단계의 세포중에서 F-body의 출현율 $63.8 \pm 6.2\%$ 는 위전체 평균치와 같은 의미를 나타내는데 X Y 염색체를 모두 가지는 배수체를 가진 정조세포의 수치 보다는 낮았고 그 이하의 분열된 전세포 보다는 높았다.

결 론

인공수정용 한우정액을 이용한 도말표본에서 전체 정

자중에 B-body를 보유한 정자의 비율을 조사하고, mouse 암·수 각 장기의 동결절편의 조직표본에서 전체 세포중에 F-body를 보유한 세포의 비율을 조사하기 위하여 각 표본을 quinacrine dihydrochloride로 형광염색하여 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 인공수정용 한우 정액에서 B-body를 보유한 정자의 비율은 $37.3 \pm 3.1\%$ 였다.

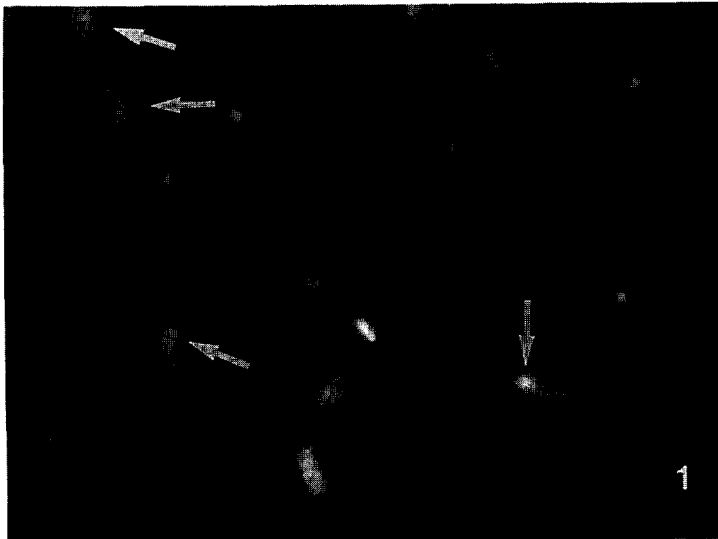
2. Mouse의 각 장기의 조직에서 F-body를 보유한 세포의 평균비율은 수컷은 $63.5 \pm 4.5\%$, 암컷 $7.5 \pm 3.2\%$ 였다.

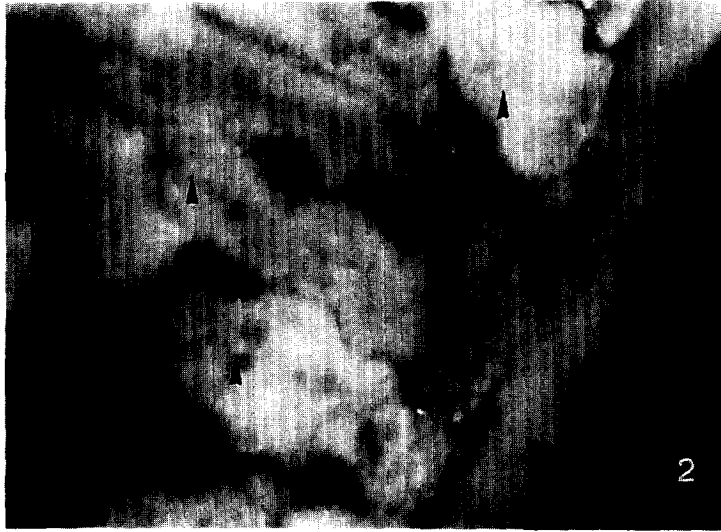
3. Mouse의 각 장기별 F-body를 보유한 세포의 비율은 수컷은 뇌, 신장, 위, 폐장, 고환, 간장, 소장, 비장, 췌장 순으로 출현율이 높았고, 암컷은 췌장, 소장, 간장, 뇌, 신장, 폐장, 비장, 위 순으로 출현율이 높았다.

Legends for figures

Fig 1. B-bodies(arrowheads) in spermatozoa of semen from Korean native bull were seen by fluorescence antibody microscope. Quinacrine dihydrochloride stain. $\times 400$.

Fig 2. F-bodies(arrowheads) in the cells of small intestine preparation from male mouse were seen by fluorescence antibody microscope. Quinacrine dihydrochloride stain. $\times 400$.





참 고 문 헌

1. Bhattacharya BC, Gunther AH. Phenotype of mammalian spermatozoa in relation to genetic content. *Animal Breeding Abstr* 1978 ; 46(2) : 82.
2. Bibbins Jr PE, Lipshultz LI, Ward JB, et al. Fluorescent body distribution in spermatozoa in the male with exclusively female offspring. *Fertil Steril* 1988 ; 49(4) : 670~675.
3. Daniel, Hughes HC, et al. Antenatal sex determination in macaca arctoides. *Fertil Steril* 1976 ; 27(9) : 1095~1100.
4. Davis JR, Penny RJ. Improved fluorescence method for identifying sex chromatin in formalin-fixed tissue. *Am J Clin Pathol* 1981 ; 75 : 731~733.
5. Dotters D, Davis JR, Christian CD. Sex ratio in ectopic gestations. *Fertil Steril* 1984 ; 41 : 778~780.
6. Ericsson RJ, Langevin CN, Nishino M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature* 1973 ; 246 : 421~424.
7. Glass RH. Sex preselection, *Obstetrics and Gynecology* 1977 ; 49(1) : 122~126.
8. Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. Sex preselection in rabbits : Live births from X and Y separated by DNA and cell sorting. *Biology of Reproduction* 1989 ; 41 : 199~203.
9. Kegel J, Conen PE. Nuclear sex identification in human tissue ; a histologic study using quinacrine fluorescense. *Am J Clin Pathol* 1972 ; 57 : 425 ~ 430.
10. Kelberman L, Barkow P, Vosa CG. The Y chromosome in human spermatozoa. *Nature* 1970 ; 226(6) : 961~962.
11. Martin RH, Lin CC, et al. Direct chromosomal analysis of human spermatozoa : Preliminary results from 18 normal men. *Am J Hum Genet* 1982 ; 34 : 459~468.
12. Pearson PL, Bobrow M, Vosa CG. Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei. *Nature* 1970 ; 226 : 78~80.
13. Pearson PL. The use of new staining technique for human chromosome identification. *J Med Genetics* 1972 ; 9 : 264~275.
14. Rook A, Hsu LY, Gertner M. Identification of Y and X chromosomes in amniotic fluid cells. *Nature* 1971 ; 230 : 53.
15. Ross A, Robinsen JA, Evans HJ. Failure to confirm separation of X-and Y-bearing human sperm using BSA gradients. *Nature* 1975 ; 253 : 354~355.
16. Shettles LB. Use of the Y chromosome in prenatal sex determination. *Nature* 1971 ; 230 : 52.
17. Tsukahara M, Matsuura S, et al. Isolation of a Y chromosomal DNA sequence and its clinical application. *Jpn J Human Genet* 1990 ; 35 : 331~339.

18. 고대환, 박흥대, 정길생. 가축에 있어서 X-정자와 Y-정자의 분리에 관한 연구. 한국가축번식학연구회보 1979 ; 3(1) : 41~47.
19. 엄기영, 정길생, 정병현. X-정자와 Y-정자의 분리에 관한 연구. 한축지 1986 ; 28(12) : 765~770.
20. 이용빈, 오봉국, 권종국 외. 돼지의 자연성비와 정자의 전기분리에 의한 수태성적에 관한 연구. 한국가축번식학연구회보 1979 ; 3(1) : 56~60.
21. Oikawa H. Fluorescence-positive body in the spermatozoa of domestic cat(feliscatus). *Jpn J Vet Sci* 1987 ; 49(5) : 942~944.
22. 심호섭, 고정재 외. 생쥐 수정란에 대한 H-Y 항체 처리가 산자의 성비에 미치는 영향. 한축지 1986 ; 28(12) : 759~764.
23. 이용빈, 임경순, 서국성 외. 정자에 대한 물리적 처리에 의한 돼지의 성비조절에 관한 연구. 한국가축번식학연구회보 1979 ; 3(1) : 36~40.
24. Klasen M, Schmid M. An improved method for Y-body identification and confirmation of a high incidence of Y Y sperm nuclei. *Hum Genet* 1981 ; 58 : 156~151.
25. Trigomi V, Serr D, Solish G. The ratio of male to female embryos as determined by the sex chromatin. *Am J Obstet Gynecol* 1960 ; 79 : 504~505.
26. Vickers. AD. Amniotic sex chromatin and fetal sexing in the mouse. *J Reprod Fert* 1967 ; 14 : 503~505.
27. Vickers, AD. A direct measurement of the sex-ratio in mouse blastocysts. *J Reprod Fert* 1967 ; 13 : 375~376.
28. West JD, Gosden CM, et al. Sexing the human fetus and identification of polyploid nuclei by DNA-DNA in situ hybridisation in interphase nuclei. *Molecular Reproduction and Reproduction* 1989 ; 1 : 129~137.
29. Caspersson T, Zech L, Modest E. Fluorescent labeling of chromosomal DNA : Superiority of quinacrine mustard to quinacrine. *Science* 1970 ; 170 : 762.
30. Thomsen JL, Niebuhr E. The frequency of false-positive and false-negative results in the detection of y-chromosomes in interphase nuclei. *Human Genet* 1986 ; 73 : 27~30.
31. Oikawa H. Fluorescence-positive body in the spermatozoa of domestic cat(feliscatus). *Jpn J Vet* 1987 ; 49(5) : 942~944.
32. Quinlivan WLG, Sullivan H. The ratios and separation of X and Y spermatozoa in human semen. *Fertil Steril* 1974 ; 25(4) : 315~318.