

흰쥐 부정소 상피세포, 내강액 및 성숙 전후 정자에서의 생리화학적 변화

정경순 · 박용빈 · 최임순

연세대학교 이과대학 생물학과

흰쥐 부정소 정자의 성숙 전후에 일어나는 변화를 몇가지 효소를 중심으로 관찰하였고 그 성숙과정중에 일어나는 상피세포, 내강 및 정자 사이의 상호관계를 알아보기 위하여 실험군 별로 몇가지 효소의 활성도와 탄수화물 진기의 함량을 측정하였으며, 전기영동을 이용하여 각 군의 차이를 관찰하고 이에 대한 웅성호르몬의 관련성을 알아보았다.

1. 부정소두 정자와 부정소미 정자에서 활성도 측정시 lactate dehydrogenase, glucose-6-phosphatase 및 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 의 경우는 유의한 차이가 없었으며, $\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 의 경우만이 부정소미 정자가 부정소두 정자보다 유의성 있게 높은 활성도를 가지는 것으로 나타났다. 또한 부정소두와 부정소미를 상피세포, 내강 및 정자의 세 군으로 나누어 각각 탄수화물 진기를 정량하였을 때 hexose는 내강액에서, hexosamine은 상피세포에서, sialic acid는 상피세포와 내강액에서 부정소미의 경우가 더 높은 함량이 존재하였으며, 내강액과 정자의 crude membrane fraction을 SDS-PAGE 했을 때 분자량이 33-37 KD 사이에 존재하던 band가 부정소미 내강액과 부정소미 정자의 crude membrane fraction에서 관찰되었으므로 흰쥐에서 정자의 성숙과정과 관련된 부정소내의 여러 변화를 비교하는 자료가 될 수 있다.

2. 부정소 내강액에서 β -glucuronidase와 β -glucosidase의 활성도 및 웅성호르몬에 대한 의존성을 측정하였을 때 거세 후 5일째부터 이 두 효소의 활성도가 모두 유의하게 감소하기 시작하였고, testosterone을 투여하였을 때는 β -glucuronidase는 투여 5일, β -glucosidase는 투여 10일 후부터 유의하게 증가하였으며 웅성호르몬에 대한 내강액의 의존성을 알아보기 위하여 SDS-PAGE하였을 때 testosterone투여군의 부정소두에서 분자량이 약 21 KD에 해당하는 band를 새로이 관찰하였다.

KEY WORDS: Epididymis, Sperm maturation, Physiochemical changes

포유류의 정자는 성소에서 일어나는 정자원성 과정 후에 형태적으로 고도로 분화되어 있으나 기능적으로는 미성숙한 상태이며 웅성부속기관의 수출관계를 거치는 동안 대사, 구조 및 구성성분 등에서의 변화가 일어나는 정소후 변화단계(post-testicular step)를 거치게 되는데 이러한 과정을 성숙이라 하며 주로 부정소에서 일어난다(Olson and Orgebin-Crist, 1982; Young *et al.*, 1985). 수형 능력을 가진 성숙한 정자와 미성숙한 정자를 구분하는 기준에 대해서는 보고가 미흡하며 성숙과정중 일어나는 몇가지 변화들만 알려져 있는데 이러한 변화들도 종에 따라 매우 다양하

다. 정자성숙과정중에 일어나는 일반적인 변화로는 세포질잔유(cytoplasmic droplet)의 이동(migration)과 접체의 형태 변화 등의 구조적 변화(Bedford, 1979; Hoffer *et al.*, 1981)와 정자 원형질막의 성질, 구성성분의 변화(Bedford, 1979; Hamilton, 1977) 및 운동성의 획득(Hamilton, 1977; Hoskins *et al.*, 1978) 등을 들 수 있다. 이 과정은 웅성호르몬에 의존적인 과정으로 웅성호르몬은 정자의 생존력 및 부정소의 정상적인 기능을 유지하게 하며(Hamilton, 1977; Orgebin-Crist *et al.*, 1975) 그 외 웅성부속기관의 조직학적 구조(Brandes, 1974; Dahl *et al.*, 1973)와 대사과정

(Brandes, 1966)에도 영향을 미치는 것으로 보고되었다.

부정소는 두부, 체부, 미부의 세 부위로 나뉘는데 정자성숙이 완료되는 부위는 종에 따라 다르나 대부분의 종에서는 성자가 부정소미로 들어갈 때 수정능력을 가지게 된다고 보고된 바 있다 (Waites, 1980). 부정소가 정자성숙과정에 영향을 미칠 수 있는 것은 부정소 내강액에 의하여 중개되는 것으로 알려져 있으며 (Jones and Glover, 1975), 내강액의 성분은 부정소 부위에 따라 각기 다양한데 이것은 정소의 분비물(testicular secretion)이 흘러 나가면서 변형되거나 부정소 상피세포의 분비와 재흡수 과정에 의하여 성숙되는 것으로 생각되고 있다 (Jones and Glover, 1975; Jones, 1978).

또한 부정소의 구조가 음성호르몬에 의존적이라는 것이 오랫동안 알려져 왔는데 (Orgebin-Crist, *et al.*, 1975) 이것은 정자성숙과정에 음성호르몬이 필수적이라는 것을 시사해주며 수정에 영향을 주는 것으로 알려진 특이한 부정소 분비물들, 예를들면 acidic epididymal glycoprotein(AEG), 여러 sperm coating antigen들 및 carnitine 등이 음성호르몬에 의존적인 것으로 알려져 있다 (Lea and French, 1981; Lea *et al.*, 1978). 이와같이 성자가 부정소를 통과하면서 수정능력을 갖는 것은 부정소 상피세포에서 합성된 여러 단백질 및 당단백질들이 부정소 내강으로 분비되어 (Hamilton, 1977) 내강에서 정자와 직접 상호작용하는 것으로 생각되고 있다 (Lea *et al.*, 1978; Moore, 1980; Voglmayer *et al.*, 1980).

본 연구에 있어서는 부정소를 부정소두와 부정소미의 두 부분으로 나누고 이것들을 각각 상피세포, 내강 및 정자의 세 군으로 나누어, 정자성숙과성숙 부정소내에서 일어나는 일련의 변화를 관찰하고자 하였다. 첫째, 정자의 운동에 필요한 에너지를 공급하는 ATPase의 활성도와 해당과정 및 그 역과정에 관여하는 효소의 활성도를 측정하여 정자성숙 전후의 변화를 살펴보고 상피세포, 내강액 및 정자의 crude membrane fraction에 존재하는 hexose, hexosamine, sialic acid 등 각각

의 함량을 측정하고 전기영동을 함으로써 정자성숙 전후의 변화를 살펴보았다. 둘째, 특히 탄수화물 잔기의 분해에 관여하는 몇가지 효소들의 음성호르몬에 대한 의존성을 활성도 변화를 통하여 내강액에서 확인하고 이때에 내강액내 단백질 또는 당단백질이 어떻게 변화하는가를 전기영동을 통하여 관찰함으로써 상피세포, 내강 및 정자와의 관련성을 고찰하여 보았다. 이와 같은 실험들을 통하여 흰쥐에서 정자성숙과정중에 일어나는 변화와 그 기작을 밝히는데 도움이 되고자 한다.

재료 및 방법

실험동물의 처리

실험동물로는 표준사료와 물을 자유롭게 먹게 하여 (*ad libitum*) 1주일 이상 기초사육한 230-250g의 Sprague-Dawley계 음성 흰쥐를 사용하였다.

시제 실험군의 경우는 실험동물을 ethyl ether로 마취하여 음낭을 절개한 후 정소만을 제거하고 의로용 봉합사로 봉합하여 계속 사육한 다음 정소 제거 후 일정 기간별로 경추 파피로 도살하여 적출한 부정소를 실험재료로 사용하였다. 음성호르몬을 투여한 실험군에 대해서는 거세와 동시에 일정 기간별로 매일 testosterone propionate (Sigma, USA)를 투여하고 마지막 투여한지 24시간 후에 경추 파피로 도살하여 적출한 부정소를 사용하였으며 이때 testosterone propionate는 10 mg/ml의 농도로 olive oil에 용해시킨 후 매일 0.2 ml씩 복강주사 하였다.

부정소두와 부정소미의 분리

적출된 부정소에서 지방조직을 떼어내고, 두부, 체부 및 미부의 세 부분으로 나눈 뒤 (Fig. 1), 부정소를 싸고 있는 피막(capsule)을 완전히 벗기고 고유한 부정소관만을 남긴 후 부게를 측정하였으며 실험재료로는 부정소두와 부정소미만을 사용하였다.

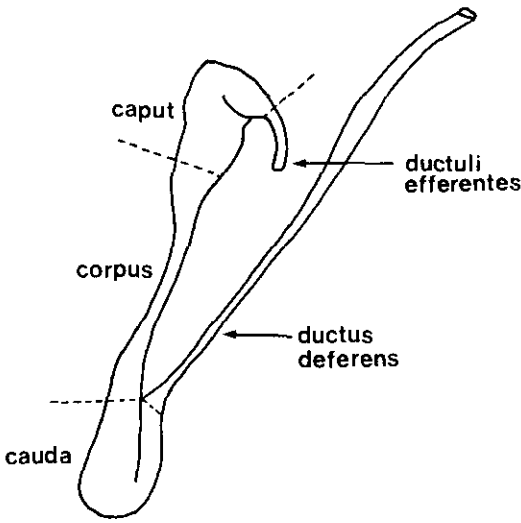


Fig. 1. Schematic representation of the epididymal regions in which all experiments were done.

상피세포 분획 및 정자와 내강액의 분리

적출된 부정소 상피세포의 분획은 정과 최 (1988)의 방법을 이용하여 microsomal supernatant를 얻었으며 정자와 내강액을 분리하는 과정은 Brooks와 Higgins(1980)의 방법을 변형하여 사용하였다. 적출해낸 부정소를 세절한 후 2 ml의 0.9% 생리식염수를 넣고 약 2시간 동안 37°C를 유지하며 shaking한 뒤 1,500 rpm에서 수 초 동안 원심분리하였고, 상등액을 2,000 rpm에서 10분간 재원심분리한 후 그 상등액은 Whatman No. 1 여과지로 여과하여 내강액으로 사용하였다. 침전물은 생리식염수로 현탁시킨 후 2,500 rpm에서 10분간 재원심분리하여 수세과정을 수행하였고, 이때의 침전물은 재현탁하여 hemocytometer로 정자의 수를 계산하였으며 동일재료를 1 ml당 10초씩 2회 초음파분쇄기(Lab Line Instrument Inc. USA)로 분쇄하여 lactate dehydrogenase, glucose-6-phosphatase 및 ATPase 측정시 효소원으로 사용하였고, 이것을 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 그 상등액을 sperm crude membrane fraction으로 사용하였다(Fig. 2).

Lactate dehydrogenase의 활성도 측정

부정소 부위별로 모은 정자를 초음파로 분쇄하여 사용하였다. 반응액으로는 0.1 M glycine-NaOH 완충액(pH 10.0), 0.5 M sodium lactate, 0.02 M β-NAD와 효소원을 포함하는 용액을 Hitachi Model U-2000 Spectrophotometer를 사용하여 340 nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정함으로써 효소 활성도를 결성하였다(Neilands, 1955).

Glucose-6-phosphatase의 활성도 측정

0.03 M cacodylate 완충액(pH 6.5)과 3 mM glucose-6-phosphate(dipotassium salt)가 포함된 반응기질 1.0 ml에 효소원을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 20% trichloroacetic acid 1.0 ml을 가하여 반응을 정지시켰다. 이때의 반응액을 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액 1.0 ml을 얻어 방출된 유리 인(inorganic phosphate)의 양을 측정하여 효소 활성도를 산출하였으며 효소원은 위와 동일한 것을 사용하였다(Leskes *et al.*, 1971; Swanson, 1955).

Na⁺-K⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase의 활성도 측정

동일 효소원을 사용하였으며 Mayanil 등(1982)의 방법을 이용하여 측정하였다. 전체 ATPase 활성은 6 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 40 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4)을 포함한 반응액 3 ml에 효소원을 첨가한 후 30°C에서 10분간 방치하였다. 그 후 0.1 M ATP용액(pH 7.4)을 첨가하여 30°C에서 4분간 반응시킨 후 냉각된 50% trichloroacetic acid 0.1 ml을 첨가하여 반응을 정지시켰으며 반응후 형성된 유리 인의 양을 측정하여 효소 활성도를 산출하였다(Chen *et al.*, 1956).

Mg²⁺-ATPase는 1 mM ouabain이 첨가된 반응액에서 나타난 활성이며 Na⁺-K⁺-ATPase는 전체 ATPase 활성에서 Mg²⁺-ATPase 활성값을 뺀 것으로 산출하였다.

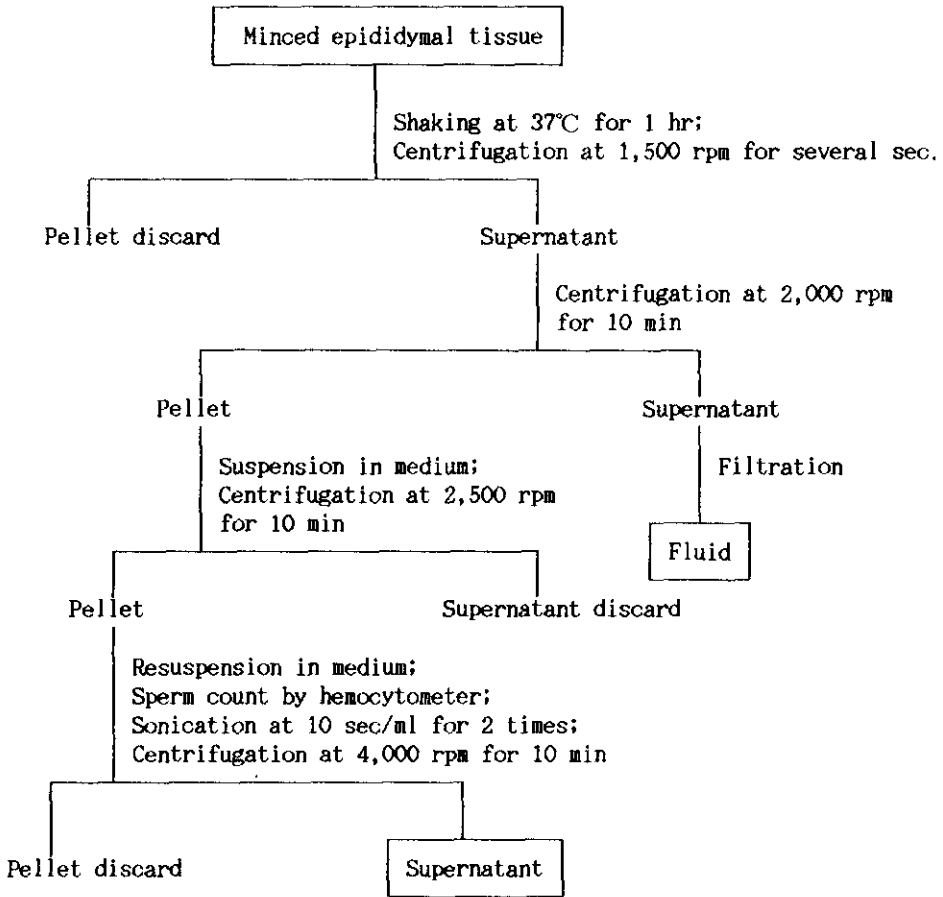


Fig. 2. Procedure for the preparation of the fluid and sperm crude membrane fraction of rat epididymis.

Glycosidic bond의 분해와 hexose, hexosamine 및 sialic acid의 정량

Hexose, hexosamine 및 sialic acid를 정량하기 위하여 glycosidic bond를 분해하는 과정을 수행하였다(Montreuil *et al.*, 1986).

Hexose의 정량은 황산 원액 100 ml에 0.2 g의 anthrone을 용해시킨 것을 reagent로 사용하여 염산으로 가수분해한 시료와 반응시킨 후 625 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다(Hodge and Hofreiter, 1962).

Hexosamine의 경우는 염산으로 가수분해한 시료에 0.1 ml의 0.8 M sodium tetraborate를 넣고 끓는 수조에서 3분간 가열시키고 냉각시킨 다음 3

ml의 reagent를 첨가하여 36-38°C에서 20분간 반응시킨 후 다시 냉각하여 반응이 완료된 즉시 585 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(Dische, 1962). Reagent는 2.5% (v/v)의 10 N HCl을 포함하는 빙초산에 N,N-dimethyl-*p*-aminobenzaldehyde의 2% (w/v) 용액을 만들어 사용하였다.

Sialic acid의 경우는 황산으로 가수분해한 시료 3 ml에서 40 μ l의 periodate 용액을 넣어 잘 혼합시키고 상온에서 20분간 방치시킨 후 여기에 400 μ l의 arsenite 용액을 넣고 잘 혼합시켜 상온에서 5분간 더 방치시켰다. 여기에 다시 1.2 ml의 thiobarbituric acid 용액을 넣고 잘 혼합한 후 100°C에서 15분간 열처리하고나서 상온에서 냉각

사킨 뒤 1.0 ml의 cyclohexane을 넣고 교반기로 혼합시켰다. 이것을 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 붉은 색이 추출되어 나온 상층을 549 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(Chaplin, 1986).

전기영동

Laemmli(1970)의 방법에 따라 vertical slab gel kit(Korea Manhattan Co.)에서 실시하였다. denaturing 전기영동은 12.5% acrylamide에 sodium dodecyl sulfate(SDS, Sigma, USA)가 0.4%(w/v) 포함된 running gel을 사용하였고, running은 stacking gel의 경우는 100 V, running gel은 150 V로 전압을 일정하게 유지시키면서 수행하였고, 전기영동이 끝난 gel은 0.25% Comassie Brilliant Blue R-250(CBB, Sigma, USA) 용액으로 2시간 동안 염색한 다음 7.5% 빙초산과 5% ethanol로 탈색하였으며 7.5% 빙초산 용액에서 보관하였다.

각 실험군별로 준비한 내강액과 정자의 crude membrane fraction을 loading에 사용하였으며, 표준나뉘막 질모는 low molecular weight calibration kit(Pharmacia, Sweden)를 사용하였다.

β-Glucuronidase와 β-glucosidase의 활성도 측정

이 두 효소의 활성도는 Fishman(1974) 및

Daniels와 Glew(1984)의 방법에 근거하여 최와성(1989)이 사용했던 방법을 이용하여 측정하였다.

통계적 분석

실험결과에의 통계적 분석은 상용의 통계 program(Abstat Statistics Package)을 이용한 Student's t-test로 검정하여 p 값이 0.05 이하인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정되었다.

결 과

부정소 상피세포, 내강액 및 성숙 전후의 정자에서의 생리화학적 변화

1) 해당과정 관련효소 및 ATPase의 활성도 변화

여러 대사 관련효소들의 활성도 비교가 성숙 전후의 정자를 구분하는 기준이 되는지 알기 위하여 부정소두 정자와 부정소미 정자를 각각 수집하여 lactate dehydrogenase, glucose-6-phosphatase 및 ATPase의 활성도를 측정하였다(Table 1).

Lactate dehydrogenase의 경우, 부정소두 정자는 $0.08 \pm 0.04 \mu\text{mole/mg protein/min}$ 의 활성도를 나타내었으며, 부정소미 정자의 활성도는 이에 비하여 약 1.6배 증가하였으나 이 증가는 유의성이 없는 것으로 나타났고 glucose-6-phosphatase의 활성도도 부정소미 정자가 부정소두 정

Table 1. Comparison of several enzyme activities in the rat caput and cauda epididymal spermatozoa.

Enzyme	Region		p-value
	Cp	Cd	
Lactate dehydrogenase	0.08±0.04	0.13±0.09	N.S.
Glucose-6-phosphatase	0.12±0.10	0.33±0.27	N.S.
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	0.14±0.12	0.23±0.13	N.S.
Mg ²⁺ -ATPase	0.60±0.54	1.82±0.84	p < 0.05

Cp, caput; Cd, cauda. The results are expressed as the mean ± SD ($\mu\text{mole/mg protein/min}$ in lactate dehydrogenase and $\mu\text{gPi/mg protein/min}$ in glucose-6-phosphatase, Na⁺-K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase). N.S., Non-significant.

Table 2. Comparison of hexose contents in the rat caput and cauda epididymis.

Fraction	Region		p-value
	Cp	Cd	
Microsomal supernatant	19.68±3.42	18.30±3.55	N.S.
Fluid	21.10±1.00	27.04±0.75	p < 0.05
Sperm crude membrane fraction	18.43±4.04	14.74±3.52	N.S.

Cp, caput; Cd: cauda. The results are expressed as the mean ± SD (mg/ml). N.S., non-significant.

Table 3. Comparison of hexosamine contents in the rat caput and cauda epididymis.

Fraction	Region		p-value
	Cp	Cd	
Microsomal supernatant	214.62±15.14	419.32± 7.84	p < 0.05
Fluid	485.21± 9.83	518.59±38.97	N.S.
Sperm crude membrane fraction	90.50±11.55	92.42±14.06	N.S.

Cp, caput; Cd, cauda. The results are expressed at the mean ± SD (μg/ml). N.S., non-significant.

자의 활성화도(0.12 ± 0.10 μgPi/mg protein/min)보다 높은 것으로 나타났으나 이 증가에는 유의성이 없었다. 정자의 운동에 필요한 에너지를 공급하는 ATPase의 활성화도 변화를 알아보기 위하여 Na⁺-K⁺-ATPase와 Mg²⁺-ATPase의 활성화도를 측정하였는데 Na⁺-K⁺-ATPase의 경우는 부정소미 정자가 부정소두 정자에 비하여 유의성있게 증가하지 않았으며, Mg²⁺-ATPase의 경우는 부정소미 정자가 1.82 ± 0.84 μgPi/mg protein/min의 활성화도를 나타내어 부정소두 정자보다 유의성있게 증가하였다.

2) 상피세포, 내강액 및 정자에서 여러 탄수화물 잔기의 함량변화

부정소를 상피세포, 내강 및 정자의 세 군으로 나누어, 상피세포의 분획으로는 microsomal supernatant, 내강액 및 정자의 crude membrane fraction에서 각각 hexose, hexosamine 및 sialic acid를 정량하여 부정소두와 부정소미에서의 차이를 비교하였다.

Hexose의 함량 측정 결과, 상피세포의 microsomal supernatant에서는 부정소두와 부정소미의

경우 각각 19.68 ± 3.42 mg/ml과 18.30 ± 3.55 mg/ml로 거의 비슷한 양으로 나타났으며, 정자의 crude membrane fraction의 경우도 부정소미 정자에 존재하는 hexose양이 더 적었으나 유의성은 없었다. 내강액의 경우는 오히려 부정소미에서 유의성있게 더 높은 함량을 가지는 것으로 나타났다(Table 2).

내강액과 정자의 crude membrane fraction의 경우 hexosamine의 함량 비교는 유의성이 없었으나, 상피세포의 microsomal supernatant의 경우는 부정소미에서 419.32 ± 7.84 μg/ml로 부정소두에 존재하는 양보다 유의성있게 높은 것으로 나타났다(Table 3).

상피세포의 microsomal supernatant와 정자의 경우는 부정소미에 더 많은 양의 sialic acid가 존재하는 것으로 나타났으며, 내강액에서는 부정소두(270.12 ± 10.41 μg/ml)가 부정소미보다 유의성있게 더 많은 양이 존재하였다(Table 4).

3) 내강액과 정자에서의 전기영동 관찰 결과

부정소두와 부정소미에서 내강액과 정자를 분리하고 정자를 초음파로 분쇄한 후 microcentri-

Table 4. Comparison of sialic acid contents in the rat caput and cauda epididymis.

Fraction	Region		p-value
	Cp	Cd	
Microsomal supernatant	318.50 ± 23.38	451.54 ± 35.70	p < 0.05
Fluid	270.12 ± 10.41	245.48 ± 18.08	p < 0.05
Sperm crude membrane fraction	281.20 ± 33.31	314.47 ± 49.38	N.S.

Cp, caput; Cd, cauda. The results are expressed as the mean ± SD ($\mu\text{g/ml}$). N.S., non-significant.

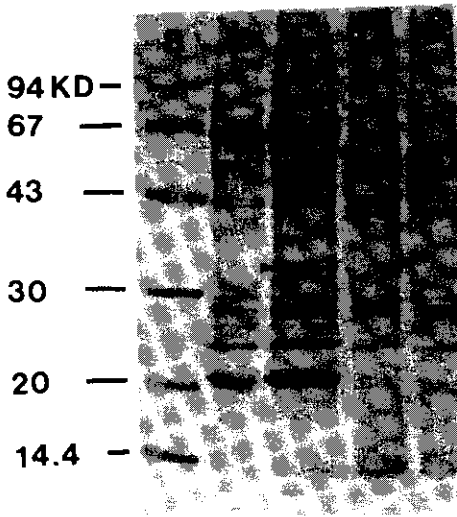


Fig. 3. Electrophoretic comparison of the epididymal fluid and spermatozoal fractions. Gels containing 12.5% acrylamide were running according to Laemmli (1970) in the presence of 0.1% (w/v) SDS and stained with CBB. Standard marker proteins used were phosphorylase b (94 KD), albumin (67 KD), ovalbumin (43 KD), carbonic anhydrase (30 KD), trypsin inhibitor (20 KD) and α -lactalbumin (14.4 KD). Lane: (a) mixture of standard marker proteins (b) caput epididymal fluid of control (c) cauda epididymal fluid of control (d) sperm crude membrane fraction of caput epididymis (e) sperm crude membrane fraction of cauda epididymis.

fugation하여 두부(head)가 포함된 침전물과 crude membrane fraction이 포함된 상층액으로 나누어 전기영동하였다. 그 결과 각 군에서 10-100 KD까지 다양한 분자량을 갖는 band가 존재하는 것이 관찰되었고, 부정소미의 내강액과

정소의 crude membrane fraction에서는 부정소수에 존재하지 않던 분자량이 33-37 KD 정도의 band(arrowhead)가 발견되었다(Fig. 3).

부정소 내강액내 여러 효소의 활성도 및 단백질의 androgen 의존성

1) β -Glucuronidase와 β -glucosidase

정소를 제거한 실험군과 정소를 제거한 직후부터 testosterone propionate를 복강투여한 실험군으로 나누어, 거세 후 각각 5일, 10일, 15일 후의 활성도 변화를 관찰하였을 때 β -glucuronidase의 활성도는 거세 후 5일째부터 유의성있게 감소하였고($0.257 \pm 0.008 \mu\text{mole/mg protein/min}$), testosterone을 투여한지 5일째부터는 대조군의 109.9%로 유의하게 증가하였다(Table 5). β -Glucosidase의 경우에는 거세 후 5일째부터 대조군의 47.9%인 $0.057 \pm 0.003 \text{ nmole/mg protein/min}$ 의 활성도를 나타내어 유의성있게 감소하였고, testosterone을 투여한 실험군에서는 투여 후 10일째부터 유의하게 증가하였다(Table 6). 또한 정상 음성 흰쥐의 부정소두와 부정소미에서는 β -glucuronidase의 경우는 부정소두가 부정소미에 비하여 높은 활성도를 가지는 것으로 나타났으며 β -glucosidase는 두 부위에서 거의 비슷한 활성도를 나타내었다(Table 7).

2) 전기영동 관찰 결과

웅성호르몬에 의존적으로 합성되어 부정소 내강에 존재하는 단백질을 알아보기 위하여 거세 후 14일된 부정소의 내강액과 거세 후 7일 및 14일간 계속해서 testosterone을 투여한 후의 내강액에서

Table 5. Effects of castration and testosterone propionate on β -glucuronidase activity in the rat epididymal fluid.

Treatment	Control	5 days	10 days	15 days
Castration	0.273 \pm 0.017 (100.0)	0.257 \pm 0.008* (94.1)	0.206 \pm 0.007* (75.5)	0.101 \pm 0.056* (37.0)
Castration + Testosterone propionate	0.273 \pm 0.017 (100.0)	0.300 \pm 0.021* (109.9)	0.554 \pm 0.029* (202.9)	0.593 \pm 0.015* (217.2)

The results are expressed as the mean \pm SD (μ mole/mg protein/min). The numbers in parentheses are expressed assuming the activity of the control being 100. *p < 0.05.

Table 6. Effects of castration and testosterone propionate on β -glucosidase activity in the rat epididymal fluid.

Treatment	Control	5 days	10 days	15 days
Castration	0.119 \pm 0.024 (100.0)	0.057 \pm 0.003* (47.9)	0.048 \pm 0.002* (40.3)	0.042 \pm 0.003* (35.3)
Castration + Testosterone propionate	0.119 \pm 0.024 (100.0)	0.111 \pm 0.005 (93.3)	0.144 \pm 0.011* (121.0)	0.158 \pm 0.001* (132.8)

The results are expressed as the mean \pm SD (nmole/mg protein/min). The numbers in parentheses are expressed assuming the activity of the control being 100. *p < 0.05.

Table 7. Comparison of β -glucuronidase and β -glucosidase activities in the rat caput and cauda epididymal fluid.

Enzyme	Region		p-value
	Cp	Cd	
β -Glucuronidase	0.226 \pm 0.012	0.271 \pm 0.057	p < 0.05
β -Glucosidase	0.116 \pm 0.024	0.121 \pm 0.015	N.S.

Cp, caput; Cd, cauda. The results are expressed as the mean \pm SD (μ mole/mg protein/min in β -glucuronidase and nmole/mg protein/min in β -glucosidase). N.S., Non-significant.

그 변화를 관찰하였을 때 거세 후 14일 된 부정소 내강액에서는 분자량이 30 KD 이하의 단백질이 거의가 소실되는 것으로 나타났으며, 다시 testosterone을 부여했을 때 회복되었고, 7일간 투여했을 때보다 14일간 투여했을 때 회복되는 band를 더 분명히 관찰할 수 있었는데 부정소두의 내강액에서 분자량이 약 21 KD 정도, 부정소두와 부정소미의 내강액에서는 약 26-27 KD에 해당하는

band (arrowhead)가 새로이 발견되었다(Fig. 4).

고 찰

포유류의 정사는 부정소에서 성숙과정을 거치는 동안 구조적, 생리적 변화가 일어남으로써 수정능력을 갖게 되는 것으로 알려졌는데 이러한 변

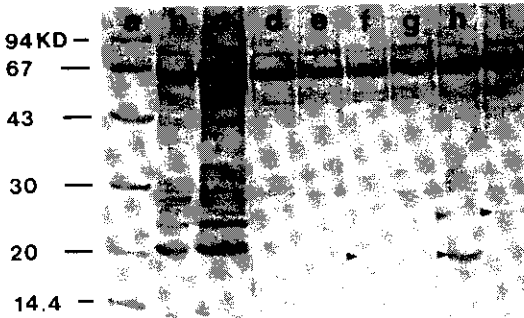


Fig. 4. Electrophoretic comparison of the caput and cauda epididymal fluid in the castrated and testosterone-administered rat.

Lane: (a) mixture of standard market proteins (b) caput epididymal fluid of control (c) cauda epididymal fluid of control (d) castrated caput epididymal fluid for 14 days (e) castrated cauda epididymal fluid for 14 days (f) testosterone-administered caput epididymal fluid for 7 days (g) testosterone-administered cauda epididymal fluid for 7 days (h) testosterone-administered caput epididymal fluid for 14 days (i) testosterone-administered cauda epididymal fluid for 14 days.

화는 핵, 첨체 및 원형질막 등에서 일어나며, 주로 원형질막에서 일어나는 구성, 성질, 분자적 구조 등에서의 변화가 연구되었다(Olson and Danzo, 1981; Olson and Hamilton, 1978). 정자가 수정능력을 갖는 부정소내의 부위는 종마다 다양하여 토끼, 양 및 돼지의 경우는 부정소체 단부(distal corpus)에서, 흰쥐, hamster 및 guinea pig는 부정소미 기부(proximal cauda)에서 발견되는 정자의 50% 정도만이 난자와 수정할 수 있다고 보고되었으므로 대부분의 종에서 부정소미 예시는 정자성숙이 완료되는 것을 알 수 있다(Cooper, 1986). 또한 정소에서 나온 미성숙한 정자가 성숙이 완료되기까지 걸리는 시간도 종마다 다양하나 약 2.5-5일 정도로 보고되었고(Amann, *et al.*, 1976; Courot, 1981; Orgebin-Crist and Olson, 1984), 토끼의 경우는 24시간 이내에 부정소체를 통과해서 대부분의 정자가 수정능력을 갖게 된다는 보고가 있다(Orgebin-Crist, 1965).

정자성숙과정에는 응성호르몬이 필수적이라는

것이 오래동안 알려져 왔다. 거세하여 생체내의 응성호르몬을 없애거나, hypophysectomy하였을 때 또는 antiandrogen을 처리하였을 때 정자성숙이 일어나지 않았으며(Orgebin-Crist, 1973; Orgebin-Crist and Davies, 1974; Dyson and Orgebin-Crist, 1973), 이러한 과정은 *in vitro*에서도 입증되었다(Dyson and Orgebin-Crist, 1973). 이와같이 응성호르몬이 정자성숙에 영향을 미칠 수 있는 것은 부정소에 작용함으로써 가능한 것으로 알려졌는데(Orgebin-Crist *et al.*, 1975), 부정소 전체에 걸쳐서 응성호르몬 수용체가 존재하여 정자 성숙에 관여하게 되며 이것은 부정소 상피에 의하여 매개된다고 제시되어왔다.

이와 같은 연구를 토대로 하여 성숙 전후의 정자에서 여러 대사 관련효소들의 활성도를 측정하여 그 변화를 알아보고 그러한 효소들의 활성도가 정자성숙의 기준이 될 수 있는지 알아보려 하였다. 그 결과 lactate dehydrogenase와 glucose-6-phosphatase의 활성도는 부정소미가 부정소두보다 높은 것으로 나타났으나 이와 같은 차이는 유의성이 없는 것으로 나타났기 때문에 성숙한 정자와 미성숙한 정자를 구분해내는 기준으로는 삼을 수 없는 것으로 생각된다. 생쥐와 원숭이에서 glucose-6-phosphatase의 경우는 이와 일치하는 결과가 나타났는데(Panse and Sheth, 1981; Panse *et al.*, 1983), phosphorylase a의 활성도가 감소하는 것으로 보아 해당과정은 점차 감소하며 그 역과정이 서서히 증가하는 것을 암시해 준다. 정자의 기능적 성숙과 해당과정의 변화와는 밀접한 관계가 있다는 것을 알 수 있으나 lactate dehydrogenase와 glucose-6-phosphatase는 유의성 있게 변화하지 않았으므로 성숙한 정자와 미성숙한 정자를 구분하는 기준으로는 사용될 수 없으리라 생각된다. 또한 운동성을 나타내는데는 에너지 공급이 필요하며 반응액에 ATP를 넣어 주었을 때 운동성과 filament의 sliding이 유도되었다는 보고와 dynein이 Mg^{2+} -ATPase라는 사실에 근거해서(Lindemann and Gibbons, 1975; Alberts *et al.*, 1983) 에너지 형성에 관여하는 효소인 ATPase의 활성도를 측정하였는데, Mg^{2+}

-ATPase와 ATPase 가운데서 가장 많은 양을 차지하고 잘알려져 있는 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 의 활성도를 측정하였다. 그 결과 $\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 의 경우만이 유의성있게 높은 것으로 나타났으므로 정자 성숙 전후를 구분하는 기준이 될 수 있는 것은 $\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 의 활성도라 생각된다. $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 는 정자에 있어서 원형질막의 전위 (potential)와 편모운동을 유지하는데 필요한 것으로 알려져 있는데 (McGrady, 1979), $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 가 부정소미 정자에서도 유의성있게 높은 활성도가 나타나지 않은 것은 정자의 수정능 획득 (capacitation)이나 침체반응에 더욱 필수적인 것으로 알려져 있고 (Mrsny and Meizel, 1983), 이와같은 과정은 주로 정자두부에서 일어나는 변화이므로 정자중에서 두부부회만을 따로 분리하여 자성생식관내에서나, 수정능획득이 일어나고 침체반응이 일어나기 전에 활성도를 측정할 경우 더 높은 활성도를 나타낼 것으로 기대된다. 또한 $\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 활성도를 정자성숙이 되기 전후로 살펴본 예는 별로 없으며 정자를 두부와 미부의 각 분획으로 나누어 그 활성도의 차이를 관찰하거나 (Ashraf *et al.*, 1982) 두부에서의 특성을 관찰하였는데 (Working and Meizel, 1982) $\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 의 경우는 실제로 운동성을 나타내는 것과 밀접한 관련이 있으므로 두부보다는 오히려 미부와 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되며, 본 실험의 결과에서처럼 부정소미에서 유의성있게 활성도가 증가하는 것은 부정소미에서 정자가 성숙하여 운동성을 획득한다는 사실을 암시해 준다.

정자성숙과정은 상피세포, 내강액 및 정자의 상호작용에 의하여 이루어지며 여기에서 당단백질이 중요한 역할을 한다고 알려져 있으므로 상피세포와 내강, 정자의 세 군으로 나누어 실험하였다. 상피세포에서는 당단백질의 분비소포인 골지소포 (Golgi vesicle)를 얻기 위하여 microsomal supernatant를 사용하였고, 정자에서는 핵만을 제외한 crude membrane fraction을 사용하여 hexose, hexosamine 및 sialic acid를 정량하였다. 그 결과 hexose는 내강액에서, hexosamine은 상피세포에서, sialic acid는 상피세포와 내강액에서

부정소두와 부정소미가 유의성있는 차이를 나타내었으며, 내강액에 존재하는 sialic acid의 함량 외에는 세 경우 모두에서 부정소미의 경우가 더 많은 양의 탄수화물 잔기를 가지는 것으로 나타났다. 그러나 이 실험만으로는 상피세포에서 분비된 당단백질이 내강으로 분비되어 정자에 부착된 후 정자의 탄수화물 잔기에 변화를 일으킨다고 판단할 수는 없으며, 분비과정을 알아보기 위해서는 다른 종류의 실험이 더 수행되어야 하리라 생각되나 이 실험 결과에서 나타난 여러 변화 양상을 정자성숙과정 전후의 비교에 대한 하나의 자료로 사용할 수 있으리라 생각된다. 또한 내강액에 존재하는 단백질 또는 당단백질이 정자의 crude membrane fraction에도 존재하는지 이들 상호간의 부착에 대한 가능성을 확인하기 위하여 SDS-PAGE하여 겔과를 살펴보았을 때 부정소두에 존재하지 않던 분자량이 33-37 KD 사이에 존재하던 band가 부정소미 내강액에서는 뚜렷이 관찰되었고, 부정소미 정자의 crude membrane fraction에도 나타나는 것을 볼 수 있었다. 따라서 부정소미에서 새로이 합성되어 내강액으로 분비된 것이 정자와 상호작용함으로써 정자의 crude membrane fraction에 존재하게 되는 것으로 사료된다.

또한 부정소 상피세포내에 존재한다는 것이 이미 보고된 (Conchie *et al.*, 1959) β -glucuronidase와 β -glucosidase의 응성호르몬에 대한 의존성을 내강액에서 관찰하며 이때 내강액에서 단백질 또는 당단백질의 변화를 전기영동을 통하여 관찰하였다. 그 결과 기세균에서 내강액내의 β -glucuronidase의 활성도는 기세 후 5일째부터 유의하게 감소하기 시작하였고, testosterone을 투여했을 때에도 5일 후부터 유의하게 증가하기 시작하여 응성호르몬에 대하여 높은 의존성을 가지는 것으로 나타났다. 부정소두 내강액과 부정소미 내강액에서 이 효소들의 활성도 차이를 비교하였을 때는 부정소미 내강액에서 유의하게 큰 것으로 나타났다. β -glucosidase의 활성도를 측정했을 때에도 기세 5일째부터 유의하게 감소하였으며, 또한 testosterone을 투여했을 때는 투여 10일

후부터 유의하게 증가함으로써 β -glucosidase도 응성호르몬에 대하여 의존적인 것으로 나타났으며 두 부위에서 이 효소의 활성도 차이는 없는 것으로 나타났다. 이 두 효소의 활성도가 응성호르몬에 의존적으로 나타난 결과는 상피세포에서 측정했던 것(최와 정, 1989)과 일치하는 결과를 얻었는데, 이 효소들은 일부가 분비형태로 나타나며 다른 일부는 비분비형태 또는 조직에 결합된 형태로 나타난다는 보고로 미루어 보아 부정소 상피세포에서 합성되어 내강으로 분비된 것으로 알려져 있으며(Jauhianen and Vanha-Perttula, 1986), 부정소는 응성호르몬에 의존적인 기관이므로 이와 같은 합성, 분비 즉 이 효소들의 활성도도 응성호르몬에 의존적으로 나타나는 것으로 생각된다. 내강액의 성분은 부정소관의 위치에 따라 다양한데 이것은 정소의 분비물들이 흘러 나가면서 변형되거나 상피세포의 분비와 새롭수 과정에 의한 것으로 사료되며, 특히 부정소내 내강액이 정자의 수정능력을 유지하는데 더 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Jones and Glover, 1975; Jones, 1978). 부정소에서 분비되어 내강액 내에 존재하면서 정자성숙 및 수정에 영향을 주는 것으로 알려진 부정소의 여러 분비물들, 예들 들어 AEG, 다른 sperm coating antigen들과 carnitine도 androgen에 의존적인 것으로 알려져 있는데, Jauhianen과 Vanha-Perttula(1986)의 보고와 본 실험 결과에 따라 위의 효소들도 응성호르몬에 의존적으로 부정소에서 합성되어 내강내로 분비되는 것으로 생각된다. 즉 응성호르몬에 의존적으로 부정소 상피에서 합성되어 내강으로 분비된 후 하나하나의 특수한 탄수화물 잔기들을 분해함으로써 정자 표면의 성분을 변화시키는 것으로 사료된다. 같은 변화를 관찰하기 위하여 전기영동하였을 때 거세한지 14일 후에는 분자량이 작은 단백질은 거의가 소실되었다가 다시 testosterone을 투여해준 후 여러 단백질들의 회복을 관찰할 수 있었는데, 이러한 사실은 부정소 내강액에 있는 여러 성분들이 응성호르몬에 대하여 의존성을 가진다는 사실을 직접 나타내준다. 그 가운데서도 부정소두에서는 분자량이 약 21 KD에 해당하

는 band가 새로이 관찰되었는데, 이와 같은 것들은 응성호르몬에 의존적으로 합성 분비되어 정자에 작용함으로써 성숙에 관여하리라 생각되는 band들이다.

따라서 성숙후에 정자에서 나타나는 변화들을 종합해 보면, Mg^{+} -ATPase의 경우는 성숙의 기준으로 삼을 수 있고, hexose, hexosamine 및 sialic acid의 함량은 부정소두와 부정소미에서 유의한 차이를 나타내지 못했으며, 분자량 33-37 KD에 해당하는 단백질 또는 당단백질이 부정소미에서 새로이 나타남을 알 수 있고 이러한 것들을 성숙 후 정자에서 나타나는 변화로 생각할 수 있다. 또한 β -glucuronidase와 β -glucosidase는 응성호르몬에 의존적으로 부정소 내강액에서 활성도를 나타내며 그 외에도 부정소 내강액에는 이 호르몬에 의존적으로 존재하는 몇가지 단백질 또는 당단백질들을 발견할 수 있었는데 이러한 구조적 또는 기능적 단백질들은 정자성숙에 관여하리라 사료되는 것들이다.

인용문헌

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson, 1983. Ciliary movement. In: *Molecular biology of the cell* (1st ed.), Garland Publishing, Inc., New York & London, pp. 561-569.
- Amann, R. P., L. Johnson, D. L. Thompson, and B. W. Pickett, 1976. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit times of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. *Biol. Reprod.* **15**: 586-592.
- Ashraf, M., R. N. Peterson, and L. D. Russell, 1982. Activity and location of cation-dependent ATPase on the plasma membrane of boar spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **107**: 1273-1278.
- Bedford, J. M., 1979. Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis. In: *The spermatozoon* (Fawcett, D. W. and J. M. Bedford, eds), Urban & Schwarzenberg, Baltimore, Maryland, pp. 7-21.
- Brandes, D., 1966. The fine structure and histochemistry of prostatic glands in relation to sex hormones. *Int. Rev. Cytol.* **20**: 207-220.

- Brandes, D., 1974. Hormones regulation of fine structure. In: Male accessory sex organ structure and function in mammals (Brandes, D. eds), New York, pp. 184-192.
- Brooks, D. E. and S. J. Higgins, 1980. Characterization and androgen-dependence of proteins associated with luminal fluid and spermatozoa in rat epididymis. *J. Reprod. Fert.* **59**: 363-375.
- Chaplin, M. F., 1986. Monosaccharides. In: Carbohydrate analysis: a practical approach (Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy, eds), IRL Press, OXFORD, pp. 1-8.
- Chen, P. S., T. Y. Toribara, and H. Warner, 1956. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* **28**: 1756-1758.
- 성경순, 최임순, 1988. Testosterone과 cyclic AMP-theophylline이 흰쥐 부정소의 미세구조 및 몇 가지 효소활성에 미치는 영향. *동물학회지* **31**: 35-48.
- 최임순, 성경순, 1989. Testosterone과 dibutyl cyclic AMP가 거세한 흰쥐 부정소의 β -glucuronidase와 몇 가지 glycosidase 활성에 미치는 영향 및 부정소 상피세포의 여러 유형에 관한 연구. *동물학회지* **32**: 290-303.
- Conchie, J., J. Findlay, and G. A. Levvy, 1959. Mammalian glycosidases. *Biochem. J.* **71**: 318-325.
- Cooper, T. G., 1986. Maturation of spermatozoa in epididymis. In: The epididymis, sperm maturation and fertilization, Springer-Verlag, pp. 1-5.
- Courot, M., 1981. Transport and maturation of spermatozoa in the epididymis of mammals. In: Epididymis and fertility: Biology and pathology (Bollack, C. and A. Clavert, eds) Karger, Munich, pp. 67-79.
- Dahl, E., A. Kjaerheim, and K. J. Trester, 1973. The ultrastructure of the accessory sex organs of the male rat. I. Normal structure. *Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **137**: 345-354.
- Daniels, L. B. and R. H. Glew, 1984. β -D-Glucosidases in tissue. In: Methods of enzymatic analysis (3rd ed.) Academic Press, Inc. New York and London. Vol. IV, pp. 217-226.
- Dische, Z., 1962. Color reactions of hexosamines. *Methods in carbohydrate chemistry* **1**: 507-512.
- Dyson, A. L. M. B. and M. C. Orgebin-Crist, 1973. Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology* **93**: 391-402.
- Fishman, W. H., 1974. β -Glucuronidase In: Methods of enzymatic analysis (2nd ed.) Vol. II., pp. 929-943.
- Hamilton, D. W., 1977. The epididymis In: Frontiers in reproduction and fertility control (Greep, R. D. and M. A. Koblinsky, eds), MIT Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 411-426.
- Hodge, J. E. and B. T. Horeiter, 1962. Determination of reducing sugars and carbohydrates. *Methods in carbohydrate chemistry* **1**: 380-390.
- Hoffer, A. P., M. Shalev, and D. H. Frish, 1981. Ultrastructure and maturational changes in spermatozoa in the epididymis of the pigtailed monkey *Macaca nemestrina*. *J. Androl.* **3**: 140-146.
- Hoskins, D. D., H. Brandt and T. S. Acott, 1978. Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis. *Feb. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **37**: 2534-2542.
- Jauhianen, A. and T. Vanha-Perttula, 1986. β -N-acetylglucosaminidase in the reproductive organs and seminal plasma of the bull. *J. Reprod. Fert.* **76**: 239-250.
- Jones, R., 1978. Comparative biochemistry of mammalian epididymal plasma. *Comp. Biochem. Biophys.* **61B**: 365-370.
- Jones, R. and T. D. Glover, 1975. Interrelationships between spermatozoa, epididymis and epididymal plasma. In: The biology of the male gamete. (Duckett, J. G. and P. M. Racey, eds) Suppl. No. 1. *J. Linnaea Soc.* **7**: 367-384.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.
- Lea, O. A. and F. S. French, 1981. Characterization of an acidic glycoprotein secreted by principal cells of the rat epididymis. *Biochim. Biophys. Acta* **668**: 370-376.
- Lea, O. A., P. Petrusz, and F. S. French, 1978. Purification and localization of acidic epididymal glycoprotein (AEG): A sperm coating protein secreted by the rat epididymis. *Int. J. Androl. Suppl.* **2**: 592-607.
- Leskes, A. P., P. Siekevitz, and G. E. Palade, 1971. Differentiation of endoplasmic reticulum in hepatocytes. I. Glucose-6-phosphatase distribution *in situ*. *J. Cell Biol.* **49**: 264-287.
- Lindemann, C. B. and I. R. Gibbons, 1975. Adenosine triphosphate-induced motility and sliding of filaments in mammalian sperm extracted with triton X-100. *J. Cell Biol.* **65**: 147-162.
- Mayanil, C. S. K., S. M. I. Kazmi, and N. Z. Baguer, 1982. Na⁺-K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities in different regions of rat brain during alloxan diabetes. *J. Neurochem.* **39**: 903-908.
- McGrady, A., 1979. The effect of ouabain on membrane potential and flagellar wave in ejaculated bull spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* **56**: 549-553.
- Montreuil, J., S. Bouquelet, H. Debray, B. Fournet, G. Spik, and G. Strecker, 1986. Colorimetric assays of

- carbohydrates in glycoproteins and glycopeptides. *In*: Carbohydrate analysis: a practical approach (Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy, eds), D. C. Washington, pp. 174-178.
- Moore, H. D. M., 1980. Localization of specific glycoproteins secreted by the rabbit and hamster epididymis. *Biol. Reprod.* **22**: 705-718.
- Mrsny, R. J. and S. Meizel, 1983. Initial evidence for the modification of hamster sperm Na⁺-K⁺-ATPase activity by cyclic nucleotide-mediated processes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **112**: 132-138.
- Neilands, J. B., 1955. Lactic dehydrogenase of heart muscle. *Methods in enzymology* **1**: 449-454.
- Olson, G. E. and B. J. Danzo, 1981. Surface changes in rat spermatozoa during epididymal transit. *Biol. Reprod.* **24**: 431-443.
- Olson, G. E. and D. W. Hamilton, 1978. Characterization of the surface glycoproteins of rat spermatozoa. *Biol. Reprod.* **19**: 26-35.
- Olson, G. E. and M. C. Orgebin-Crist, 1982. Sperm surface changes during epididymal maturation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **383**: 372-390.
- Orgebin-Crist, M. C., 1965. The passage of spermatozoa labelled with thymidine-³H through the ductus epididymidis of the rabbit. *J. Reprod. Fert.* **10**: 241-251.
- Orgebin-Crist, M. C., 1973. Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis: effect of castration and testosterone replacement. *J. Exp. Zool.* **185**: 301-310.
- Orgebin-Crist, M. C., B. J. Danzo, and J. Davies, 1975. Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. *In*: Handbook of physiology (Hamilton, D. W. and R. O. Greep, eds), *Am. Physiol. Soc.*, Washington, D.C. Sec. 7., Vol. V, pp. 319-388.
- Orgebin-Crist, M. C. and J. Davies, 1974. Functional and morphological effects of hypophysectomy and androgen replacement in the rabbit epididymis. *Cell Tissue Res.* **148**: 188-201.
- Orgebin-Crist, M. C. and G. E. Olson, 1984. Epididymal sperm maturation. *In*: the male in farm animal reproduction. (Courot, M. eds), Martinus-Nihoff, Boston, US. pp. 80-102.
- Panse, G. T. and A. R. Sheth, 1981. Glycogen metabolism in epididymal spermatozoa of developing mice. *Ind. J. Exp. Biol.* **19**: 183-185.
- Panse, G. T., S. Jayaraman, and A. R. Sheth, 1983. Shift of glycolysis as a marker of sperm maturation. *Arch. Androl.* **11**: 137-140.
- Swanson, M. A., 1955. Glucose-6-phosphatase in liver. *In*: Methods in enzymology, (Colowick, S. P. and N. O. Kaplan, eds) New York, Academy Vol. 2, pp. 541-542.
- Voglmayr, J. K., G. Fairbanks, M. A. Jackowitz, and J. R. Coliela, 1980. Post-testicular developmental changes in the ram sperm cell surface and their relationship to luminal fluid proteins of the reproductive tract. *Biol. Reprod.* **22**: 655-667.
- Waites, G. M. H., 1980. Functional relationships of the mammalian testes and epididymis. *Aust. J. Biol. Sci.* **33**: 355.
- Working, P. K. and S. Meizel, 1982. Preliminary characterization of a Mg²⁺-ATPase in hamster sperm head membranes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **104**: 1060-1065.
- Young, L. G., B. T. Hinton, and K. G. Gould, 1985. Surface changes in chimpanzee sperm during epididymal transit. *Biol. Reprod.* **32**: 399-412.

(Accepted December 3, 1990)

**The Physicochemical Changes of the Epithelial Cells, Luminal Fluid and Spermatozoa
in Rat Epididymis**

Kyung Soon Cheong, Yong Bin Park and, Rim Soon Choe (Department of Biology, College of
Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea)

It has been investigated what could be the selective marker distinguishing the immature from mature spermatozoa and whether β -glucuronidase and β -glucosidase are dependent on androgen in the luminal fluid of the epididymis or not. The contents of hexose, hexosamine and sialic acid in the epithelial cells, luminal fluid and spermatozoa of the epididymis were examined and the patterns of protein bands were compared in each group of the luminal fluid by SDS-PAGE.

Lactate dehydrogenase, glucose-6-phosphatase, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase showed higher activities in the cauda than the caput epididymal spermatozoa but only Mg^{2+} -ATPase activity appeared to be changed significantly. When the contents of hexose, hexosamine and sialic acid were analyzed and compared quantitatively, those of hexose were significantly different in the luminal fluid of caput and cauda epididymis, those of hexosamine in the epithelial cells and those of sialic acid in the epithelial cells and luminal fluid. When SDS-PAGE has been performed in each group, the band of MW 33-37 KD which was absent in the luminal fluid of caput epididymis appeared obviously in the luminal fluid of cauda epididymis and also appeared in the cauda sperm crude membrane fraction.

In addition, β -glucuronidase and β -glucosidase activities and their dependence on androgen were measured and the SDS-PAGE patterns of proteins and/or glycoproteins in the luminal fluid were examined. The activities of these two enzymes in the luminal fluid of the epididymis decreased significantly from the 5th day after castration. When testosterone was injected, the activity of β -glucuronidase began to increase significantly from the 5th day following injection and that of β -glucosidase from the 10th day. On the other hand, the band of about MW 21 KD was newly observed in the lumen of caput epididymis when testosterone was administered.