

Testosterone과 Tunicamycin 투여에 따른 흰쥐 부정소내 여러 탄수화물 잔기의 정량분석

정경순 · 김옥용 · 최임순

연세대학교 이과대학 생물학과

흰쥐 정자의 성숙과정중에 일어나는 부정소 상피세포, 내강 및 정자 사이의 상호관계를 알아보기 위하여 각 실험군 별로 웅성호르몬 투여에 따른 탄수화물 잔기의 함량 변화를 측정하였고, tunicamycin 투여 후 hexosamine의 함량 변화를 살펴봄으로써 glycosylation되는 장소를 확인하였다.

부정소두와 부정소미 상피세포내의 hexose 함량은 거세 후 5일군부터 유의성있게 감소하였고, testosterone 투여시는 각각 5일, 10일군부터 유의하게 증가하였으며, hexosamine과 sialic acid의 경우도 통계적으로 유의하게 변화하는 시기는 달랐으나 hexose와 유사하게 증가와 감소하는 경향이 나타났으므로 이러한 하나하나의 탄수화물 잔기의 함량 변화는 웅성호르몬에 의존적임을 알 수 있었다. Tunicamycin을 투여하여 hexosamine의 함량 변화를 측정하였을 때 투여 기간에 따라 상피세포와 내강액에서 유의하게 감소하였으나, 정자에서는 일관성있게 감소되지 않았으므로 정자가 직접 hexosamine 또는 여러 당단백질 합성에 관여하는 것은 아니며 부정소 상피세포나 내강에 의하여 영향받을 수 있다는 가능성을 확인하였다.

KEY WORDS: Rat epididymis, Hexose, Hexosamine, Sialic acid, Tunicamycin

포유류의 정자는 정소에서 정자완성과정 후에 형태적으로 고도로 분화되나 기능적으로는 미성숙한 상태이며 웅성부속기관의 수출관계를 거치는 동안 대사, 구조 및 구성성분 등의 변화가 일어난다(Olson and Orgebin-Crist, 1982; Young *et al.*, 1985). 부정소는 두부 체부, 미부의 세 부위로 나뉘는데 정자성숙이 완료되는 부위는 종에 따라 다르나 대부분의 종에서는 정자가 부정소미로 들어갈 때 수정능력을 가지게 된다고 보고된 바 있다(Waites, 1980). 정자성숙과정 중에 일어나는 일반적인 변화로는 세포질 잔유(cytoplasmic droplet)의 이동(migration)과 첨체의 형태 변화 등의 구조적 변화(Bedford, 1979; Hoffer *et al.*, 1981)와 정자 원형질막의 특성, 구성성분의 변화(Bedford, 1979; Hamilton, 1977) 및 운동성의 획득(Hamilton, 1977; Hoskins *et al.*, 1978) 등을 들 수 있다. 이 과정 중에 웅성호르몬은 정자의 생존

력 및 부정소의 구조와 기능(Hamilton, 1977; Orgebin-Crist *et al.*, 1975)을 정상적으로 유지하게 하는데 이것은 정자성숙과정에 웅성호르몬이 필수적이라는 것을 시사해 준다. 정자가 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; Voglmayr *et al.*, 1980). 정자성숙에 관여하는 물질에 대하여는 잘 알려져 있지 않으나 방사성 동위원소로 표지된 [³H]-leucine이나 [³H]-fucose를 사용하여 단백질 및 당단백질임이 확인되었는데(Flickinger *et al.*, 1984; Flickinger, 1985) 이와 같은 당단백질은 부정소 내강으로 분비되어 정자의 표면에 부착함으로써 정자 표면의 구성성분의 변화를 일으키는 원인이 되고 있음이 추적되었으며(Kopecny *et al.*, 1984), 부정소 내강액에 특수한 glycosyl-

transferase가 존재하며 내강에서 glycosylation된 물질에 의해 정자성숙이 일어난다는 보고도 있었고(Yanagimachi *et al.*, 1985), 정자 자체에 의한 것이라는 가능성도 제시되었으므로(Voglmayr, 1975) 이와 같은 이견에 대하여 일관성있는 결과를 얻어야 하리라 생각된다.

따라서 본 연구에 있어서는 부정소를 부정소두와 부정소미의 두 부분으로 나누고 이것들을 각각 상피세포, 내강 및 정자의 세 군으로 나누어, 생체내의 옹성호르몬 source를 제거 혹은 재투여시, 그리고 glycosylation 억제제인 tunicamycin을 투여했을 때 상피세포, 내강액 및 정자에 존재하는 여러 탄수화물 잔기의 함량이 어떻게 변하는지 살펴봄으로써 glycosylation에 관여하는 효소들의 옹성호르몬에 대한 의존성을 알아보고, glycosylation되는 부위를 간접적으로 확인하여 정자성숙이 일어나는 각 구획간의 상호관계를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물의 처리와 실험군 설정

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

기세실험군의 경우는 실험동물을 기세와 동시에 일정 기간별로 매일 testosterone propionate (Sigma, USA)를 투여하고 마지막 투여한지 24시간 후에 경추 파괴로 도살하여 적출한 부정소를 사용하였으며 이때 testosterone propionate는 10 mg/ml의 농도로 olive oil에 용해시킨 후 매일 0.2 ml씩 복강주사하였다.

Tunicamycin투여군의 경우는 각각 20, 40, 60, 80, 100 μ g/kg의 량으로 3일간 복강주사한 후 마지막 투여한지 24시간 후에 경추 파괴로 도살하였으며 50 μ g/kg의 량으로 투여하였을 때는 각각 1일, 2일, 3일간으로 나누어 투여하고 마지막 투여한지 24시간 후에 경추 파괴로 도살하여 적출한 부정소를 사용하였다. Tunicamycin(Sigma, USA)은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 1 mg/ml의 농도로 용해하여 보관하였으며 투여하기 전에 각

농도별로 증류수로 희석한 후 주사하였다.

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 무게를 측정하였으며 실험재료로는 부정소두와 부정소미만을 사용하였다.

상피세포 분획의 분리 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.

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 산으로 가수분해한 시료 1 ml과 반응시킨 후 625

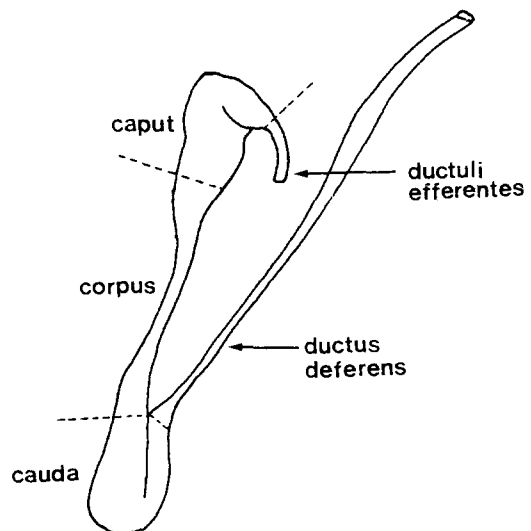


Fig. 1. Schematic representation of the epididymal regions in which all experiments were done.

nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(Hodge and Horeiter, 1962). Blank로는 동량의 증류수를 넣고 반응시킨 것을 사용하였으며, 표준시약으로는 glucose(Sigma, USA)를 사용하였다.

Hexosamine의 경우는 산으로 가수분해한 시료 3 ml에 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 병초산에 N, N-dimethyl- ρ -aminobenzaldehyde의 2%(w/v) 용액을 만들어 사용하였고, blank로는 동량의 증류수를 넣어 사용하였으며 표준시약으로는 N-acetyl-D-glucosamine(Sigma, USA)을 사용하였다.

Sialic acid의 경우는 산으로 가수분해한 시료 3 ml에 40 μ l의 periodate용액에 넣어 잘 혼합시키고 상온에서 20분간 방치시킨 후 여기에 400 μ l의 arsenite용액을 넣고 잘 혼합시켜 상온에서 5분간 더 방치시켰다. 여기에 다시 1.2 ml의 thiobarbituric acid 용액을 넣고 잘 혼합한 후 100°C에서 15분간 열처리하고 나서 상온에서 냉각시킨 뒤 1.0 ml의 cyclohexane을 넣고 vortex-mixer에서 혼합시켰다. 이것은 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 붉은 색이 추출되어 나온 상층을 549 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(Chaplin,

1986). 표준시약으로는 N-acetylneuraminic acid(Sigma, USA)를 사용하였다.

통계적 분석

실험결과와 통계적 분석은 상용의 통계 program(Abstat Statistics Package)을 이용한 Student's t-test로 검정하여 p값이 0.05 이하인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

Androgen 투여에 의한 탄수화물 잔기의 함량변화

정소를 제거한 실험군과 정소를 제거한 직후부터 testosterone propionate를 복강투여한 실험군으로 나누어 거세 후 5일, 10일, 15일 후에 여러 탄수화물 잔기의 함량을 부정소두와 부정소미의 두 부분에서 각각 측정하였다.

Hexose의 함량

부정소 상피세포내의 hexose 함량은 부정소두와 부정소미에서 모두 거세 후 5일군에서 대조군 함량의 70% 정도로 유의성 있게 감소하여 거세 후 15일군에는 7.25 \pm 1.84 mg/ml과 5.88 \pm 1.00 mg/ml로 각각 대조군의 36.9%와 32.1%까지 감소하였으며, 거세 후부터 testosterone을 동시

Table 1. Effects of castration and testosterone propionate on hexose contents in the epithelial cells of rat epididymis.

Treatment	Region	Control	5 days	10 days	15 days
Castration	Cp	19.68 \pm 3.42 (100)	13.89 \pm 2.45* (70.6)	9.51 \pm 2.08* (48.3)	7.26 \pm 1.84* (36.9)
	Cd	18.30 \pm 3.55 (100)	13.35 \pm 1.57* (73.0)	8.19 \pm 2.69* (44.8)	5.88 \pm 1.00* (32.1)
Castration + Testosterone propionate	Cp	19.68 \pm 3.42 (100)	23.68 \pm 2.00* (120.4)	34.66 \pm 1.88* (176.1)	43.67 \pm 2.95* (221.9)
	Cd	18.30 \pm 3.55 (100)	19.77 \pm 0.84 (107.9)	36.46 \pm 2.02* (199.3)	56.76 \pm 2.74* (310.2)

Unit: mg/ml; Cp: caput, Cd: cauda

The results are expressed as the mean \pm S.D. of more than four times determination. The numbers in parentheses indicate the relative percentage of control. Student's t-test was used for statistical analysis of the data. *p < 0.05.

에 투여한 실험군에서는 부정소두에서 투여 5일
군부터, 부정소미에서는 투여 10일군부터 증가하
기 시작하였다(Table 1).

내강액의 경우도 상피세포와 유사하게 거세 후
5일군부터 유의하게 감소하였으며, 거세 15일군
의 부정소두에서는 대조군 함량(21.10 ± 1.00
mg/ml)의 11.4%인 2.40 ± 0.93 mg/ml까지 감
소하였다. Testosterone 투여군의 경우 부정소두
는 투여 10일군부터, 부정소미는 투여 5일군부터
유의하게 증가하였다(Table 2).

Hexosamine의 함량

상피세포내의 hexosamine 함량은 두 부위에서
모두 거세 후 5일군부터 유의성있게 감소하여 거
세 후 15일군 부정소미 상피세포의 경우는 대조군
의 21.6%인 90.50 ± 24.69 μ g/ml까지 감소하였
고, testosterone을 투여하였을 때는 두 부위에서
모두 투여 10일군부터 유의하게 증가하였다
(Table 3).

내강액의 경우는 두 부위에서 모두 거세 5일군
부터 유의성있게 감소하였고, testosterone 투여

Table 2. Effects of castration and testosterone propionate on hexose contents in the rat epididymal fluid

Treatment	Region	Control	5 days	10 days	15 days
Castration	Cp	21.10 ± 1.00 (100)	$6.94 \pm 0.53^*$ (32.9)	$5.74 \pm 1.18^*$ (27.2)	$2.40 \pm 0.93^*$ (11.4)
	Cd	27.04 ± 0.75 (100)	$19.63 \pm 3.61^*$ (72.6)	$11.57 \pm 0.31^*$ (42.8)	$9.62 \pm 0.44^*$ (35.6)
Castration + Testosterone propionate	Cp	21.10 ± 1.00 (100)	22.17 ± 3.81 (105.1)	$38.33 \pm 0.51^*$ (181.6)	$41.04 \pm 1.56^*$ (194.5)
	Cd	27.04 ± 0.75 (100)	$34.45 \pm 1.66^*$ (127.4)	$40.81 \pm 2.29^*$ (150.9)	$46.32 \pm 2.36^*$ (171.3)

Unit: mg/ml; Cp: caput, Cd: cauda

The results are expressed as the mean \pm S.D. of more than four times determination. The numbers in parentheses indicate the relative percentage of control. Student's t-test was used for statistical analysis of the data. * $p < 0.05$.

Table 3. Effects of castration and testosterone propionate on hexosamine contents in the epithelial cells of rat epididymis.

Treatment	Region	Control	5 days	10 days	15 days
Castration	Cp	214.62 ± 15.14 (100)	$156.60 \pm 35.94^*$ (73.0)	$87.29 \pm 8.89^*$ (40.7)	$54.28 \pm 11.04^*$ (25.3)
	Cd	419.32 ± 7.84 (100)	$367.97 \pm 18.03^*$ (87.8)	$257.58 \pm 20.13^*$ (61.4)	$90.50 \pm 24.69^*$ (21.6)
Castration + Testosterone propionate	Cp	214.62 ± 15.14 (100)	226.77 ± 17.61 (105.7)	$333.74 \pm 15.57^*$ (155.5)	$395.36 \pm 35.20^*$ (184.2)
	Cd	419.32 ± 7.84 (100)	431.30 ± 16.24 (102.9)	$458.68 \pm 7.84^*$ (109.4)	$740.65 \pm 93.21^*$ (176.6)

Unit: μ g/ml; Cp: caput, Cd: cauda

The results are expressed as the mean \pm S.D. of more than four times determination. The numbers in parentheses indicate the relative percentage of control. Student's t-test was used for statistical analysis of the data. * $p < 0.05$.

후 5일군부터 유의성있게 증가하였다(Table 4).

Sialic acid의 함량

상피 세포내의 sialic acid 함량은 부정소두의 경우 거세 10일군부터 대조군 함량($318.50 \pm 23.28 \mu\text{g/ml}$)의 80.2%인 $255.34 \pm 45.85 \text{ mg/ml}$ 로 유의성있게 감소하기 시작하였고, 부정소미의 경우는 5일군부터 대조군 함량($451.42 \pm 35.70 \mu\text{g/ml}$)의 56.3%인 $253.99 \pm 34.11 \mu\text{g/ml}$ 까지 감소하기 시작하여 15일군에의 대조군의 19.2%까지 감소하였다. Testosterone을 부여하였을 때

는 두 부위에서 모두 투여 10일째부터 유의성있게 증가하였으며, 투여 15일군의 부정소두에서는 대조군의 223.2%인 $710.86 \pm 50.93 \mu\text{g/ml}$ 까지, 부정소미에서는 197.5%인 $891.79 \pm 85.45 \mu\text{g/ml}$ 까지 증가하였다(Table 5).

내강액의 경우도 이와 비슷한 결과를 나타내었는데 거세군의 경우 부정소두는 5일군, 부정소미는 10일군부터 유의성있게 감소하였고, testosterone을 부여하였을 때 두 부위에서 모두 투여 5일군부터 유의성있게 증가하였다(Table 6).

Table 4. Effects of castration and testosterone propionate on hexosamine contents in the rat epididymal fluid.

Treatment	Region	Control	5 days	10 days	15 days
Castration	Cp	485.21 ± 9.83 (100)	439.86 ± 15.46* (90.7)	337.17 ± 2.96* (69.5)	157.70 ± 25.10* (32.5)
	Cd	518.59 ± 38.97 (100)	425.31 ± 12.75* (82.0)	320.05 ± 7.84* (61.7)	87.29 ± 11.64* (16.8)
Castration + Testosterone propionate	Cp	485.21 ± 9.83 (100)	516.53 ± 17.64* (106.5)	650.37 ± 2.96* (134.0)	679.47 ± 26.35* (140.0)
	Cd	518.59 ± 38.97 (100)	567.93 ± 8.89* (109.9)	621.28 ± 25.50* (119.8)	748.61 ± 5.62* (144.4)

Unit: $\mu\text{g/ml}$; Cp: caput, Cd: cauda

The results are expressed as the mean ± S.D. of more than four times determination. The numbers in parentheses indicate the relative percentage of control. Student's t-test was used for statistical analysis of the data. *p < 0.05.

Table 5. Effects of castration and testosterone propionate on sialic acid contents in the epithelial cells of rat epididymis.

Treatment	Region	Control	5 days	10 days	15 days
Castration	Cp	318.50 ± 23.28 (100)	260.72 ± 54.91 (81.9)	255.34 ± 45.85* (80.2)	116.92 ± 23.28* (36.7)
	Cd	451.42 ± 35.70 (100)	253.99 ± 34.11* (56.3)	216.56 ± 8.62* (48.0)	86.68 ± 28.98* (19.2)
Castration + Testosterone propionate	Cp	318.50 ± 23.28 (100)	357.47 ± 64.67 (112.2)	557.09 ± 45.39* (174.9)	710.86 ± 50.93* (223.2)
	Cd	451.54 ± 35.70 (100)	481.49 ± 52.20 (106.6)	604.91 ± 40.44* (134.0)	891.79 ± 85.45* (197.5)

Unit: $\mu\text{g/ml}$; Cp: caput, Cd: cauda

The results are expressed as the mean ± S.D. of more than four times determination. The numbers in parentheses indicate the relative percentage of control. Student's t-test was used for statistical analysis of the data. *p < 0.05.

Table 6. Effects of castration and testosterone propionate on sialic acid contents in the rat epididymal fluid.

Treatment	Region	Control	5 days	10 days	15 days
Castration	Cp	270.12 ± 10.41 (100)	239.21 ± 25.92* (88.6)	190.83 ± 16.78* (70.6)	153.20 ± 17.42* (56.7)
	Cd	248.35 ± 19.31 (100)	251.30 ± 37.27 (101.2)	205.61 ± 10.41* (82.8)	74.60 ± 12.10* (30.0)
Castration + Testosterone propionate	Cp	270.12 ± 10.41 (100)	465.65 ± 16.62* (172.4)	514.23 ± 29.70* (190.4)	619.86 ± 49.03* (229.5)
	Cd	248.35 ± 19.31 (100)	387.03 ± 13.97* (155.8)	458.45 ± 44.02* (184.6)	685.37 ± 45.97* (276.0)

Unit: $\mu\text{g/ml}$; Cp: caput, Cd: cauda

The results are expressed as the mean \pm S.D. of more than four times determination. The numbers in parentheses indicate the relative percentage of control. Student's t-test was used for statistical analysis of the data. * $p < 0.05$.

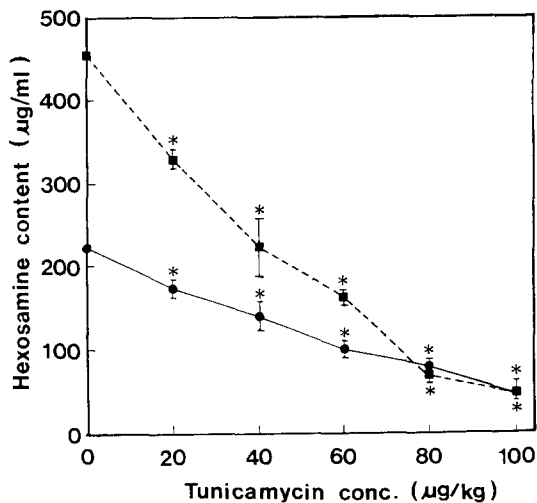


Fig. 2. Effects of the various concentrations of tunicamycin on hexosamine contents in the epithelial cells of rat epididymis. Bars indicate S.D. of the mean. Caput (●—●); Cauda (■—■), * $p < 0.05$.

농도별 tunicamycin 투여에 의한 hexosamine의 함량변화

Tunicamycin을 체중 kg당 20, 40, 60, 80, 100 μg 의 농도별로 3일간 투여하여 이때의 hexosamine 함량의 변화 양상을 관찰하였다.

상피세포와 내강액에서 나타나는 함량의 변화는 20 $\mu\text{g/kg}$ 을 투여하였을 때부터 유의성있게 감소하여 투여농도가 증가함에 따라 감소 효과도 크게 나타났다(Figs. 2, 3). 정자에서는 부정소

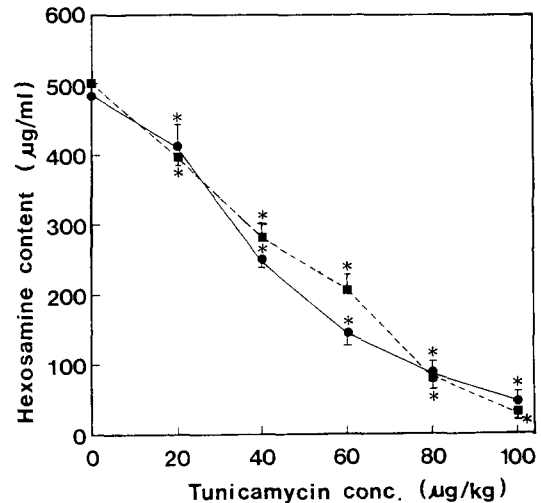


Fig. 3. Effects of the various concentrations of tunicamycin on hexosamine contents in the rat epididymal fluid. Bars indicate S.D. of the mean. Caput (●—●); Cauda (■—■), * $p < 0.05$.

두의 경우에 오히려 증가하다가 100 $\mu\text{g/kg}$ 의 농도에서만 유의성있게 감소하였고 부정소미의 경우에는 대조군과 비슷한 수준을 나타내다가 80 $\mu\text{g/kg}$ 의 농도부터 유의성있게 감소하였다(Fig. 4).

Tunicamycin 투여기간에 따른 hexosamine의 함량변화

부정소미 상피세포의 경우는 투여 2일째부터 유의성있게 감소하였으나 부정소두의 상피세포와

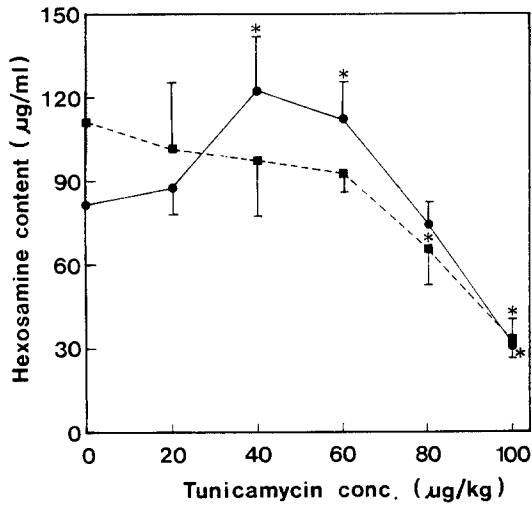


Fig. 4. Effects of the various concentrations of tunicamycin on hexosamine contents in the sperm crude membrane fractions of rat epididymis. Bars indicate S.D. of the mean. Caput (●—●); Cauda (■—■), *p < 0.05.

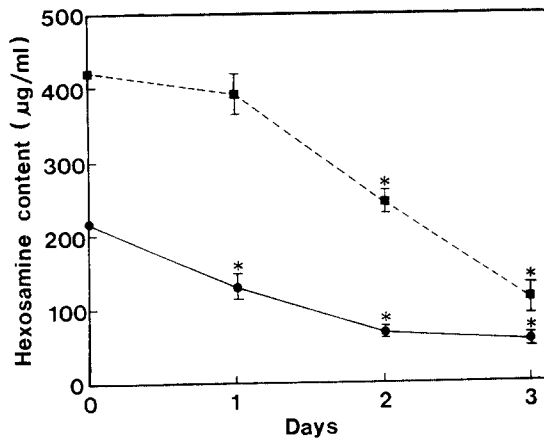


Fig. 5. Effects of tunicamycin (50 µg/kg) on hexosamine contents in the epithelial cells of rat epididymis for the lapse of days. Bars indicate S.D. of the mean. Caput (●—●); Cauda (■—■), *p < 0.05.

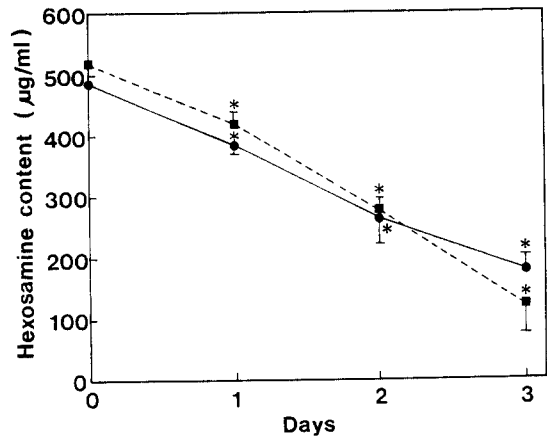


Fig. 6. Effects of tunicamycin (50 µg/kg) on hexosamine contents in the rat epididymal fluid for the lapse of days. Bars indicate S.D. of the mean. Caput (●—●); Cauda (■—■), *p < 0.05.

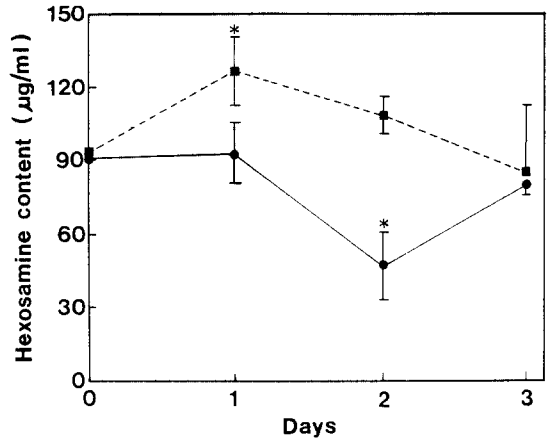


Fig. 7. Effects of tunicamycin (50 µg/kg) on hexosamine contents in the sperm crude membrane fractions of rat epididymis for the lapse of days. Bars indicate S.D. of the mean. Caput (●—●); Cauda (■—■), *p < 0.05.

내강액에서는 투여 1일째부터 유의하게 감소하였다(Figs. 5, 6). 정자의 경우는 일관성있게 변화하지 않았으며, 부정소두 정자의 경우 투여 2일째 유의성있게 감소하였고 부정소미 정자는 투여 2일째부터 점차 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 7).

고 찰

포유류의 정자는 부정소에서 성숙과정을 거치는 동안 구조적, 생리적 변화가 일어남으로써 수정능력을 갖게 되는 것으로 알려졌는데 이러한 변화는 핵, 첨체 및 원형질막 등에서 일어나며, 주로 원형질막에서 일어나는 구성, 성질, 분자적 구

조 등에서의 변화가 연구되었다(Olson and Danzo, 1981; Olson and Hamilton, 1978). 정자성숙 과정에는 응성호르몬이 필수적이라는 것이 오래 동안 알려져 왔는데 거세하여 생체내의 응성호르몬을 없애거나, hypophysectomy했을 때 또는 antiandrogen을 처리했을 때 정자성숙이 일어나지 않았으며(Orgebin-Crist, 1973; Orgebin-Crist and Davies, 1974), 이러한 과정은 *in vitro*에서도 입증되었다(Dyson and Orgebin-Crist, 1973). 이와 같이 응성호르몬이 정자성숙에 영향을 미칠 수 있는 것은 부정소에 작용함으로써 가능한 것으로 알려졌는데(Orgebin-Crist *et al.*, 1975), 부정소 전체에 걸쳐서 응성호르몬 수용체가 존재하여 정자성숙에 관여하게 되며 이것은 부정소 상피에 의하여 매개된다고 제시되어왔다.

이와 같은 보고를 토대로 하여 본 연구에 있어서는 각 실험군에 대하여 생체내의 응성호르몬의 source를 제거 혹은 재투여시, 그리고 glycosylation 억제제인 tunicamycin을 투여했을 때 상피세포, 내강액 및 정자에 존재하는 여러 탄수화물 잔기의 함량 변화를 측정함으로써 탄수화물 잔기 함량의 응성호르몬에 대한 의존성과 각 구획, 즉 상피세포, 내강액, 정자 사이의 관계를 알아보고자 하였으며 tunicamycin 투여 후 위의 각 구획별 함량 변화를 살펴봄으로써 glycosylation 장소를 확인해 보고자 하였다.

그 결과 거세군의 경우는 거세 후 5일군부터 부정소두와 부정소미의 상피세포에서 hexose의 함량이 유의성있게 감소하였고, testosterone을 다시 투여했을 때 부정소두에서는 투여 5일, 부정소미에서는 투여 10일군부터 유의하게 증가하는 것으로 보아 부정소 상피세포 내에서의 hexose 함량 변화는 응성호르몬에 의존적임을 알 수 있었다. 내강액내의 함량변화도 이와 유사한 결과를 나타냄으로써 부정소 상피세포와 내강액 사이의 합성과 분비의 관계를 간접적으로 알 수 있으며 이러한 함량 변화는 응성호르몬에 의존적으로 나타났으므로 정자성숙과도 밀접한 관계가 있다는 것을 제시해 준다. 거세군과 testosterone 투여군에서 hexosamine과 sialic acid의 경우도 통계적으로 유의하게 변화를 나타내는 시기는 달랐으나 증가와 감소하는 경향은 이와 같은 결과를 나타내었다

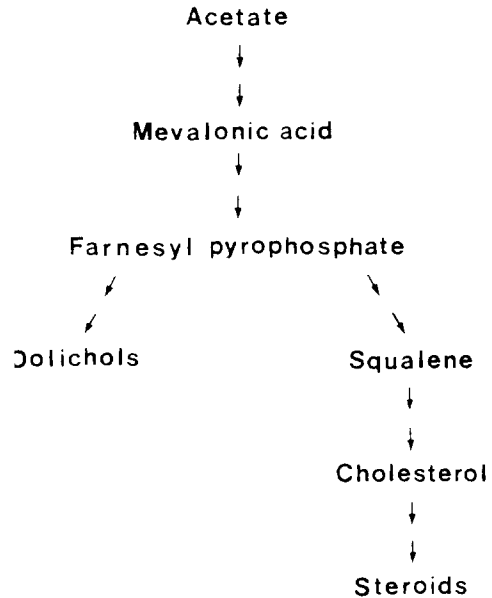


Fig. 8. Biosynthesis pathway from acetate to both dolichols and steroids (Wenstrom and Hamilton, 1980).

데, 따라서 이러한 하나하나의 탄수화물 잔기는 응성호르몬에 의존적으로 부정소 상피세포에서 합성되어 내강으로 분비되는 것으로 생각할 수 있으며, 이와 같이 분비된 것들이 부정소 정자와 상호작용함으로써 정자성숙과정에 관련되어 있다는 것을 나타내준다.

Dolichol은 steroid와 동일한 전구체로부터 유래하는 긴 사슬(C_{80} - C_{100})의 polyisoprenoid alcohol군으로 이루어져 있는데(Pennock *et al.*, 1960), dolichol의 phosphate ester는 소당류의 곁사슬(side chain)을 집합(assembly)시킬 때와 원형질막을 가로질러 당을 수송시킬 때 운반자(carrier)로서 작용한다고 알려져 있다(Waechter and Lennarz, 1976; Hemming, 1977). 따라서 dolichol의 분포량과 당단백질의 전구체의 생성과는 일치하므로 dolichol의 분포는 정자성숙과 밀접한 관련이 있다고 보고되어 있다(Dyson and Orgebin-Crist, 1973). 또한 tunicamycin은 당단백질 형성과정 중 소당류의 곁사슬 집합의 첫 단계인 N-acetylglucosamine이 dolichol phosphate에 첨가되어 dolichyl-pyrophosphoryl-N-acetylglucosamine의 형성을 억제하는 항생물질로 알려져 있다(Tkacz and Lampen, 1975). 따라서

tunicamycin을 처리했을 때 hexosamine 함량의 감소 양상을 통하여 hexosamine이 결합하여 형성될 당단백질의 합성장소를 알아보고, 그 농도별 변화 양상과 투여 날짜에 따른 변화를 관찰해 보고자 하였다.

Tunicamycin의 투여량은 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 3일간 투여하여 cytochrome p-450의 함량을 측정한 Singh 등(1985)의 방법을 참고로 하여 결정하였다. Tunicamycin을 체중 kg 당 20 μg 씩 3일간 투여하였을 때부터 상피세포와 내강액에서는 hexosamine 함량이 유의성있게 감소하기 시작하였으며, 정자에서의 양상은 이와는 좀 달리 부정소수 정자의 경우는 오히려 약간 증가하다가 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 투여하였을 때 유의성있게 감소하였고 부정소미 정자에서는 80, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 투여하였을 때 유의성있게 감소하였다. 따라서 tunicamycin을 투여한 후 상피세포는 유의성있는 감소를 나타내며 내강액에서의 변화도 이와 동시에 일어났으므로 hexosamine 잔기를 갖는 여러 당단백질은 상피세포에서 합성되어 내강으로 분비되나 미량의 분비에 의해서도 정자에 변화를 미칠 수 있는 것으로 생각된다. 또한 이와 같은 tunicamycin 농도 가운데 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이상에서 50% 이상의 감소를 나타냈으므로 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 농도로 1일, 2일 및 3일간으로 나누어 투여했을 때에도 상피세포와 내강액에서 투여기간이 길어짐에 따라 유의하게 감소하였으나 정자의 경우에는 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 3일간 투여해도 농도별 투여 결과와 유사한 감소양상을 나타내지 못했고 1일과 2일의 투여에도 일관성 있게 감소하지 않았다. 이것은 정자가 직접 hexosamine 또는 여러 당단백질 합성에 관여하는 것은 아니며 부정소 상피세포나 내강 뿐만 아니라 그 외의 다른 여러 생식기관에 의해서도 영향받을 수 있다는 가능성을 나타내주는 것이다.

인용문헌

- 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.
- 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.). pp. 18.
- 정경순, 최임순, 1988. Testosterone과 cyclic AMP-theophylline이 흰쥐 부정소의 미세구조 및 몇 가지 효소활성에 미치는 영향. *동물학회지* **31**: 35-48.
- Dische, Z., 1962. Color reactions of hexosamines. *In*: Methods in carbohydrate chemistry, Vol. 1, pp. 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.
- Flickinger, C. J., K. M. Wilson and H. D. Gray, 1984. The secretory pathway in the mouse epididymis as shown by electron microscope radioautography of principal cells exposed to Monensin. *Anat. Rec.* **210**: 435-448.
- Flickinger, C. J., 1985. Radioautographic analysis of secretory pathway for glycoproteins in principal cells of the mouse epididymis exposed to [^3H]-fucose. *Biol. Reprod.* **32**: 377-389.
- 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.
- Hemming, F. W., 1977. Dolichol phosphate, a coenzyme in the glycosylation of animal membrane bound glycoproteins. *Biochem. Soc. Trans.* **5**: 1223-1231.
- Hodge, J. E. and B. T. Horeiter, 1962. Determination of reducing sugars and carbohydrates, *In*: Methods in carbohydrate chemistry Vol. 1, pp. 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.
- Kopecny, V., J-E. Flechon and J. Pivko, 1984. Binding of secreted glycoproteins to spermatozoa in the mammalian epididymis: A fine structure autoradiographic study. *Anat. Rec.* **280**: 197-206.
- Lea, O. A., P. Petrusz and F. S. French, 1978. Purification and localization of acidic epididymal glycoprotein (AGE): A sperm coating protein secreted by the rat epididymis. *Int. J. Androl. Suppl.* **2**: 592-607.
- 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.). pp. 174-178.
- Moore, H. D. M., 1980. Localization of specific glycoproteins secreted by the rabbit and hamster epididymis. *Biol. Reprod.* **33**: 705-718.
- 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., 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.
- Pennock, J. F., F. W. Hemming and R. A. Morton, 1960. Dolichol: A naturally occurring polyisoprenoid alcohol. *Nature* **186**: 470-472.
- Singh, Y., V. Shirhatti, C. T. Liu, D. R. Feller and G. Krishna, 1985. Inhibition of protein synthesis: A basis for tunicamycin-induced decrease in rat liver cytochrome p-450. *Life Sciences* **37**: 1411-1417.
- Tkacz, J. S. and J. O. Lampen, 1975. Tunicamycin inhibition of polyisoprenyl-N-acetylglucosaminyl pyrophosphate formation in calf liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **65**: 248-257.
- Voglmayr, J. K., 1975. Metabolic changes in spermatozoa during epididymal transit, *In*: Handbook of physiology (Hamilton, D. W. and R. O. Greep, eds.). Am. Physiol. Soc., Washington, D.C., Sec. 7, Vol. V, pp. 437-451.
- Voglmayr, J. K., G. Fairbanks, M. A. Jackowitz and J. R. Collela, 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.
- Waechter, C. J. and W. F. Lennarz, 1976. The role of polyprenol-linked sugars in glycoprotein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* **45**: 95-113.
- Waites, G. M. H., 1980. Functional relationships of the mammalian testes and epididymis. *Aust. J. Biol. Sci.* **33**: 355.
- Wenstrom, J. C. and D. W. Hamilton, 1980. Dolichol concentration and biosynthesis in rat testis and epididymis. *Biol. Reprod.* **23**: 1054-1059.
- Yanagimachi, R., Y. Kamiguchi, K. Mikamo, F. Suzuki and H. Yanagimachi, 1985. Maturation of spermatozoa in the epididymis of the chinese hamster. *Am. J. Anat.* **172**: 317-330.
- 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 January 31, 1992)

Analysis on the Contents of Several Carbohydrate Residues after Administration of Testosterone and Tunicamycin in Rat Epididymis

Kyung Soon Cheong, Ok Yong Kim, and Rim Soon Choe (Department of Biology, Yonsei University, Seoul, 120-749, Korea)

It has been known that mammalian spermatozoa functionally immature become fertile as their maturation process proceeds in the epididymis and some kinds of the changes during sperm maturation are concerned with the loss or modification of several carbohydrate residues. However, the dependence on androgen of their contents and the interactions in the epididymis have not been examined.

It has been, therefore, investigated that the androgen dependence of the contents of hexose, hexosamine and sialic acid in the epithelial cells, lumen of the epididymis was examined. In order to certify the place of synthesis, the changes of hexosamine contents were examined in the

tunicamycin-administered rats.

As the results, the contents of hexose significantly decreased from the 5th day after castration and showed significantly increase from both the 5th and 10th day in the caput and cauda epididymis when testosterone was administered. The contents of hexosamine and sialic acid showed similar tendencies and dependence on androgen. The similar results in the luminal fluid suggest indirectly that the epithelial cells are closely related to the luminal fluid in the epididymis, as far as the synthesis and secretion are concerned. While confirming the secretory pathway of the carbohydrate residues and/or glycoproteins, we discovered significant decreases of the hexosamine contents in the epithelial cells and lumen by tunicamycin administration. In the spermatozoa, however, the experimental results were not coincided with the above ones. It is suggested, therefore, that spermatozoa themselves do not participate directly in the synthesis of hexosamine or several glycoproteins but they are subjected to be affected by the epididymal epithelial cells or lumen.