

## 북방산개구리의 정자형성주기에 관한 연구

고선근 · \*김정우 · \*권혁방

호남대학교 생물학과, \*전남대학교 생물학과

북방산개구리의 성체 수컷을 년중 채집하여 gonadosomatic index(GSI)와 정자형성과정 및 정소내 testosterone양의 변화를 조사하였다. 정자형성은 8월에 시작되어 9월에 가장 활발하게 진행되었으며 이때 GSI도 가장 높았고 세정관의 단면적도 가장 넓었다. 번식기(2월) 이후 일정기간 동안에는(3월-7월) 정자형성이 정지되었으며, GSI나 세정관의 단면적도 최저치를 나타내었다. 정소내 testosterone양은 11월부터 급격히 증가하여 2월에 가장 높았으며 3월부터 급격히 감소되어 10월 까지 매우 낮은 농도를 유지하였다. Interstitial cell의 수도 동면기간이 활동기 보다 훨씬 많았으며 핵의 크기도 동면기간이 훨씬 컸다. 따라서 testosterone의 생성 증가와 interstitial cell의 활성화가 일치함을 알 수 있었다. 본 결과들은 북방산개구리의 정소에서는 정자형성과정이 불연속적으로 일어난다는 것과 2월 이후에는 testosterone의 양이 급격히 줄어드는 것으로 보아 이 개구리의 번식기가 2월임을 확인해 주고 있다.

**KEY WORDS: Spermatogenic cycle, Amphibia, *Rana dybowskii***

척추동물에서 계절적 번식을 하는 동물들에 대해 많은 연구가 있어왔다. 특히 생식주기에 관련된 내분비적 조절기능에 대해 상어(Parson and Grier, 1992), 도롱뇽(Iwasawa *et al.*, 1992), 독사(Naulleau *et al.*, 1987), 새(Wingfield *et al.*, 1992)등에서 많이 알려져 있다. 그러나 양서류인 개구리에 대해서는 연구가 많지 않았다. 양서류에서도 정소내의 구조변화를 관찰함으로써 정자형성과정을 분석하게 되는데, 정자형성은 서식지의 기후조건과 종(species)에 따라 커다란 차이를 나타내는 것으로 나타났다(Kera and Iwasawa, 1981; Yoneyama and Iwasawa, 1985). 양서류의 정자형성도 다른 척추동물에서 처럼 정소내 스테로이드 호르몬의 영향을 받는 것으로 알려져 있는데 특히 testosterone이 이들의 번식기 근처(봄)에서 가장 많이 존재하는 것으로 알려져 있다

(Pierantoni *et al.*, 1984; Licht *et al.*, 1983; Delgado *et al.*, 1989). 그러나 대부분의 개구리에서 정자형성과정은 여름에서 가을사이 에 일어남으로 상기한 testosterone과는 거의 무관한 것으로 보인다(Iwasawa *et al.*, 1977; Kobayashi and Iwasawa, 1986; Delgado *et al.*, 1989). 따라서 아직도 정소내 스테로이드 호르몬과 정자형성과정과의 관계가 분명치 않다. 우리나라 같이 온대지방에 서식하는 몇몇 개구리들의 생식주기에 대한 연구가 일부 있었지만 한국산 개구리 정소의 생식주기에 관한 연구는 거의 없었다. 특히 북방산개구리는 야외관찰에서 매우 추운 2월중순에 산란을 하는 것으로 나타났으나 구체적으로 번식기를 알아내려는 연구가 없었다. 이처럼 겨울에 산란하는 개구리는 이제까지 보고된 바가 거의 없으므로 그 내분비적 조절기능이 매우 흥미롭다(Kwon *et al.*, 1989).

본 연구는 수컷 개구리를 대상으로 북방산개구리의 정자형성과정을 분석하고 이들의 testosterone 생성양상을 조사함으로써 이러한 호르몬 및 정소의 구조변화가 이 개구리의 번식

이 연구는 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-'92-412)와 과학재단 세포분화연구센터 연구비(92-2-3)의 지원에 의한 것이다.

기와 일치하는지를 조사하고자 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

본 실험에 사용한 북방산개구리(*Rana dybowskii*)는 광주근교에서 매월 일정한 시기에 채집하였으며 채집후 2일 이내에 실험에 사용하였다. 개구리의 gonado-somatic index (GSI)는 정소의 무게를 체중으로 나눈 다음 100을 곱하여 구하였다.

### 정소의 구조

개구리 정소를 취하여 Bouin's 용액에 고정한 후 paraplast에 포매하여 5-6  $\mu\text{m}$ 의 두께로 절단하였다. 이 절편을 Harris hematoxylin과 eosin으로 염색한 후 관찰하였다. 일부의 정소들을 1mm<sup>3</sup> 이하의 작은 조각으로 잘라 2% glutaraldehyde에 2시간 고정시킨 후 Epon 812에 포매하여 0.5~0.6  $\mu\text{m}$ 로 절단한 후 toluidine blue로 염색하여 관찰하였다. 정자형성과정을 분석하기 위하여 세정관내에 존재하는 생식세포군들을 제1정원세포(primary spermatogonia: PSG), 제2정원세포(secondary spermatogonia: SSG), 제1정모세포(primary spermatocyte: PSC), 제2정모세포(secondary spermatocyte: SSC), 정세포(spermatid: ST)등 5단계로 나누었다(Rastogi, 1976; Mathews, 1986). 각 단계의 생식세포들은 각각의 cyst를 형성하고 있으며 이 cyst의 숫자를 셈으로써 정자형성 진행을 판정하였다. 3개체의 정소에서 각각 5개의 세정관을 무작위로 선택하여 횡축을 중심으로 정원세포 혹은 각 단계의 정자형성과정에 있는 세포들을 포함한 cyst들을 세었다. 정소내 세정관 횡단면의 크기는 Yoneyama(1985)의 방법에 따라 세정관의 장축과 단축을 측정하여 구하였다. Interstitial cell핵의 크기도 같은 방법으로 구하였으며 이들 세포의 숫자는 세 개체의 정소 횡

단면에 존재하는 숫자를 세어 각 개체의 정소 횡단면에 존재하는 평균을 구하였다.

### 정소내 스테로이드 추출

정소내의 스테로이드는 Pierantoni등(1984)의 방법에 따라 추출하였다. 즉 정소절편을 시험관에 넣은 후 500  $\mu\text{l}$ 의 methanol(Merck)를 첨가한 후 초음파분쇄기(Ultrasonic homogenizer)로 부순 다음 이 tube를 원심분리하여 (10,000 $\times$ g, 20 min, 4°C) 상층액을 취하였다. 이 시료들은 -40°C에서 보관하였으며 스테로이드 분석직전 1ml의 assay buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 3.15 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 14.54 g/L, NaCl: 8.8 g/L, Gelatin: 1.0 g/L, Thiomersal: 0.1 g/L)로 재구성하여 스테로이드 분석에 사용하였다.

### Steroid radioimmunoassay (RIA)

정소내에 존재하는 testosterone(T)양을 RIA 방법으로 측정하였다. T의 RIA에 관한 구체적인 방법과 추적자, 항혈청교차반응도등은 전보에 자세히 기술하였다(Kwon et al., 1991). 실험간(interassay), 실험내(intraassay)의 변이계수는 각각 10.0%와 9.2%이었다.

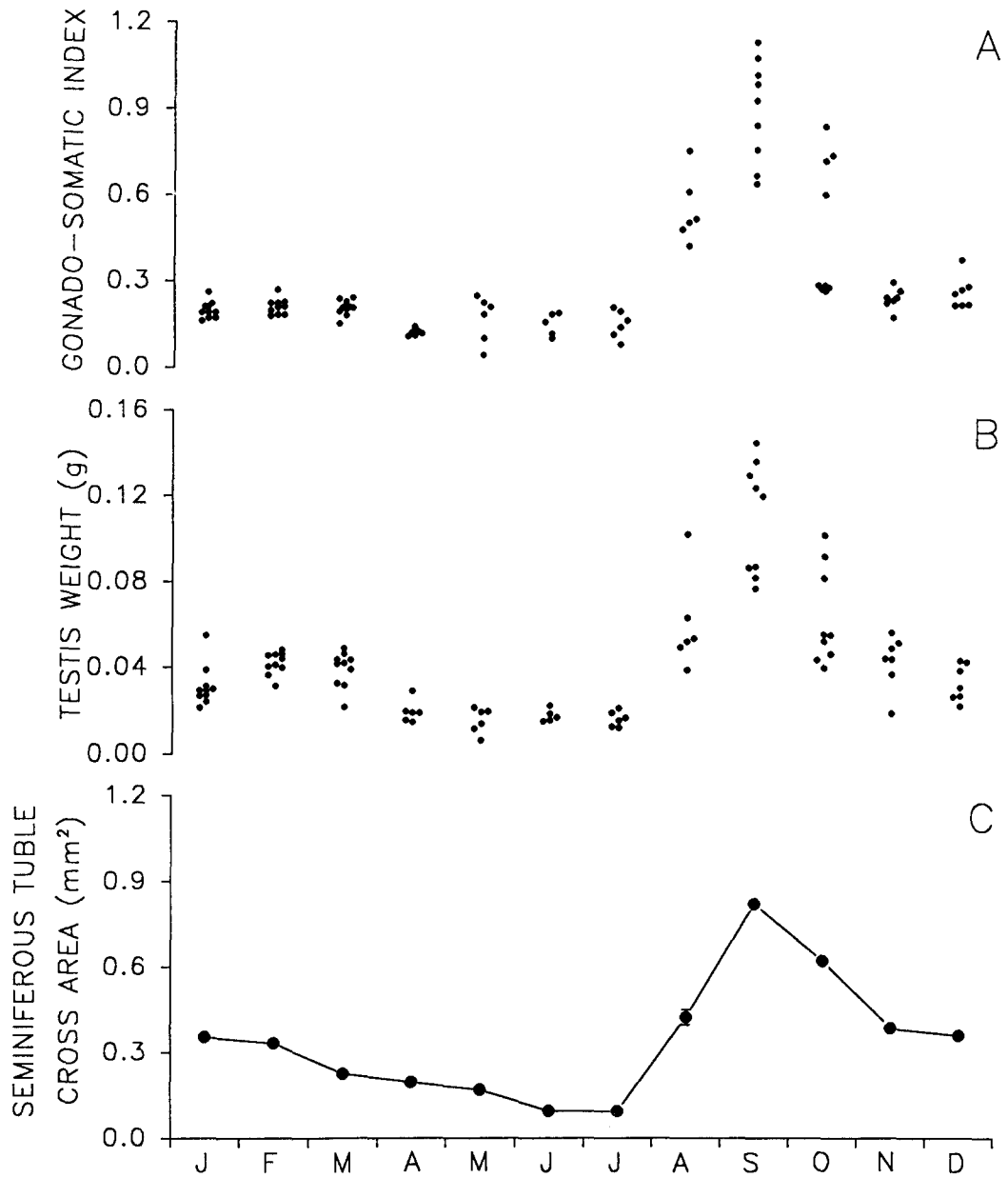
### 통계처리

호르몬 측정치 및 정소내 생식세포수와 핵의 크기의 년중 변화의 검정은 one way analysis of variance(ANOVA)에 이은 Duncun's multiple range test로 수행하였다.

## 결과

### GSI, 정소무게 및 세정관 단면적의 변화

계절에 따른 GSI의 변화를 알아보기 위해 매월 5-10마리의 개구리를 취하여 GSI를 조사하였다. GSI는 번식기와 관계없이 1월에서 7월까지 매우 낮은 수준을 유지하였다(Fig. 1A). 그러나 8월부터 급격히 증가하기 시작하여 9월에 최대치에 이르다가 점차 낮아져서 11월에는 다



**Fig. 1.** Annual changes in gonadosomatic index (A), testicular weight (B), and cross area of seminiferous tubules (C) in *R. dybowskii*. Each point in the figure A and B represents testicular weight and GSI of individual animals respectively. Point in figure C represents average cross area of seminiferous tubules of 3 animals.

시 본래의 수준으로 돌아왔다( $P < 0.01$ , 8, 9, 10월을 다른 달과 비교하였을 때). 정소의 절대적인 크기도 유사한 결과를 나타내어 8월에서 10월 사이가 다른 기간보다 거의 4배정도로 크

기가 증가하였다(Fig. 1B)( $P < 0.01$ ). 세정관의 단면적도 GSI의 크기와 비례하여 증감하는 것을 알 수 있었다(Fig. 1C).

정자형성 과정의 분석

정소의 세정관에 존재하는 생식세포들이 언제 어떻게 정자형성과정(spermatogenesis)을 진행하는지를 조사하였다. Fig. 2에서 보여주는 바와 같이 1월과 2월에 취한 정소에서는 제1정원세포(primary spermatogonia: PSG)가 거의 관찰되지 않았다. 그러나 3월부터 제1정원세포가 나타나기 시작하여 점차 그 숫자가 증가하기 시작하였다. 이 세포들의 증가는 8월에 최대값을 보여 주었다(Fig. 2, 5A)( $P < 0.01$ ). 그러나 이 이후에는 유의하게 감소하기 시작하여 11월에

는 거의 사라졌다. 이에 대해 제2정원세포(secondary spermatogonia: SSG)는 1월에서 7월에 이르기까지 전혀 나타나지 않다가 8월에 급격히 다수가 출현하였다(Fig. 2, 5A)( $P < 0.01$ ). 그 이후에는 이 생식세포들이 점차 줄어들어 12월에 가서는 거의 사라졌다. 제1정모세포들(primary spermatocyte: PSC)을 간직한 cyst(낭)들도 8월에 극히 일부가 나타나기 시작하여 9월에 급격히 증가하고 최대치를 이루다가( $P < 0.01$ ) 10월부터 다시 감소하기 시작하였다(Fig. 2, 5B). 이들 세포들도 1월에서 7월까지 는 전혀 관찰되지 않았다. 제2정모세포(secondary spermatocyte: SSC)는 1월에서 8월까지 거의 나타나지 않다가 9월에 급격히 증가한 후( $P < 0.01$ ) 계속 12월까지 증가하였다(Fig. 2, 5B). 그러나 1월에는 급격히 감소하였다. 정세포(spermatid: ST)는 9월에 일부 나타나기 시작하여 11월에 최대치를 이루다가( $P < 0.01$ ) 이듬해 2월까지 서서히 감소하였다(Fig. 2, 5B). 번식기가 지난 3월에는 정세포들이 아주 소수만이 관찰되었다. 정자(spermatozoa: SZ)는 9월에 출현하기 시작하여 2월까지 다수 출현하다가 그 이후에는 급격히 그 숫자가 줄어들었다(Fig. 2, 5B, 5C). 3-4월에 미미한 숫자로 남아 있다가 5월에서 8월까지 는 거의 관찰되지 않았다(결과 표시하지 않음).

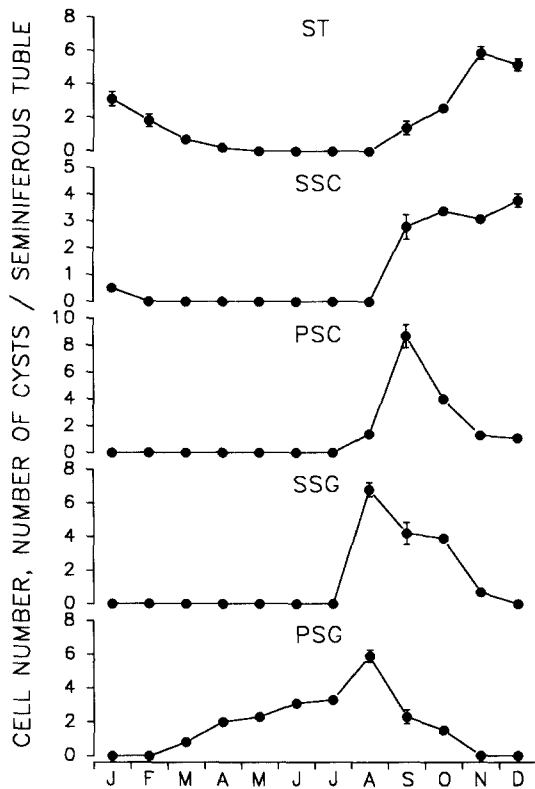


Fig. 2. Annual changes in cell number or number of germinal cysts of different spermatogenic stages per cross section of seminiferous tubules. Each point in the figure represents average (mean  $\pm$  SEM) number of cells or cysts per seminiferous tubule ( $n = 15$ , 5 cross sections, 3 animals). PSG; primary spermatogonia, SSG; secondary spermatogonia, PSC; primary spermatocyte, SSC; secondary spermatocyte, ST; spermatid.

Interstitial cell의 핵 크기와 세포수의 변화

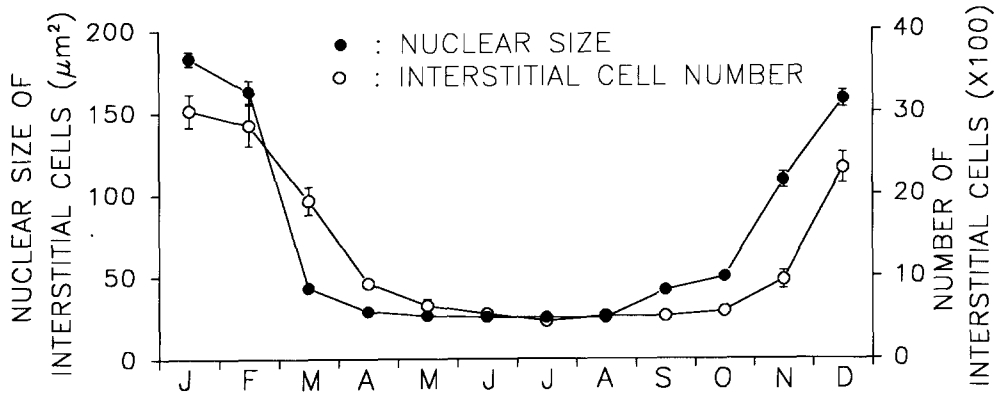
계절에 따른 interstitial cell의 핵 크기와 세포수의 변화를 조사한 결과 세포핵의 크기는 2월 이후부터 감소하기 시작하여 3월에는 유의하게 감소하였으며( $P < 0.01$ ) 정자형성이 활발히 이루어지고 정자들이 출현하기 시작한 9월부터 다시 증가하였으며 1월에 최고의 크기를 나타내었다. 또한 이들 세포들의 수는 2월부터 감소하기 시작하여 3월에 유의하게 감소하여 계속 낮은 수준을 유지하다가 11월부터 다소 증가하여 12월에 유의하게 증가하였으며 1월에 가장 많은 수를 나타내었다(Fig. 3, 5C, 5D).

### 정소내 testosterone양의 변화

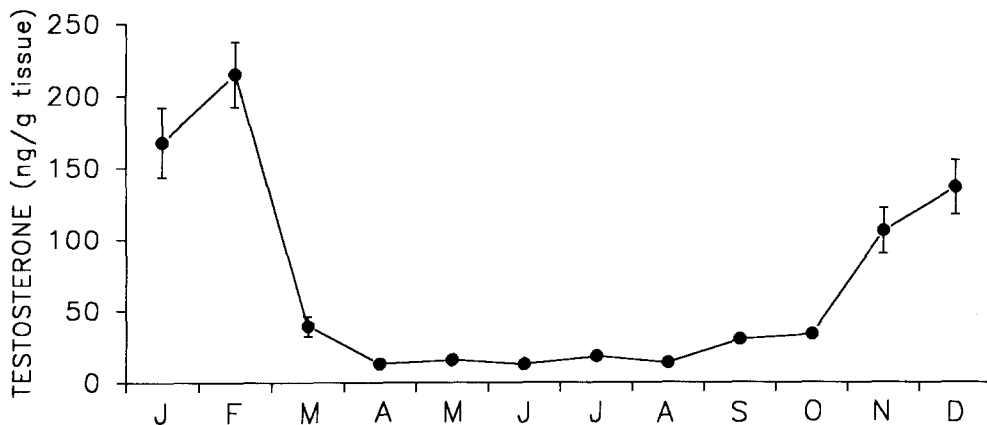
정소내의 testosterone양은 11월에서 이듬해 2월에 이르는 동안 매우 높은 농도를 유지하였으며( $P < 0.01$ , 다른달과 비교하였을 때) 3월에 급격히 감소하였다. 4월에서 8월까지 이 호르몬양이 거의 바닥수준에 계속 머물렀다. 이 결과들은 testosterone의 농도변화는 interstitial cell 수와 핵의 크기의 변화가 계절적으로 일치하여 변한다는 것을 보여주고 있다(Fig. 4).

### 고찰

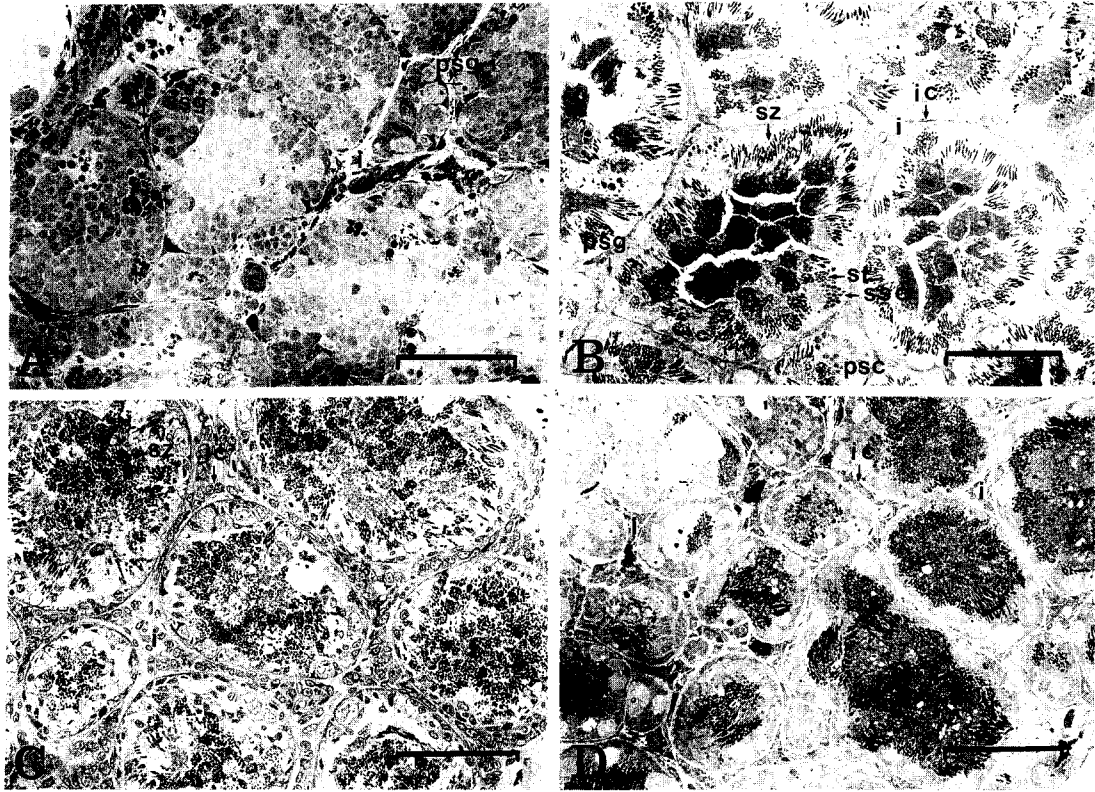
본 연구의 결과로부터 북방산개구리의 정자형성과정은 늦여름(8월)에서 시작되어 가을(9월-11월)에 활발하게 일어나고 3월에서 7월 사이에는 거의 일어나지 않는다는 것을 알았다. 또한 정소내 testosterone의 농도는 11월에서 이듬해 2월까지의 동면기간에 매우 높고 그 이후에는 10월까지 매우 낮다는 것을 알았다. 정자형성과정의 진행 결과로 1-2월에는 정세포와 정자들이 거



**Fig. 3.** Annual changes in nuclear size and number of interstitial cells in cross section. Each point in the figure represents average (mean  $\pm$  SEM) nuclear size ( $\bullet$ - $\bullet$ ) and number of cells ( $\circ$ - $\circ$ ) per seminiferous tubule ( $n = 15$ , 5 cross sections, 3 animals).



**Fig. 4.** Annual changes in the testicular testosterone levels in *R. dybowskii*. Each bar in the figure represents average (mean  $\pm$  SEM) ng testosterone per gram of testis (4-5 animals per month).



**Fig. 5.** Micrographs of testis of *Rana dybowskii* illustrating the main characteristics of the seminiferous tubules during different seasons. (A; August, B; October, C; February, D; April, psg; primary spermatogonia, ssg; secondary spermatogonia, psc; primary spermatocyte, ssc; secondary spermatocyte, st; spermatid, sz; spermatozoa, i; interstitium, ic; interstitial cell). Scale; 100  $\mu$ m.

의 세정관을 채우고 있었으며 3월 부터는 급격히 이들 세포들이 줄어들고 잔류 정자들만 관찰되었다(Fig. 2, 5D). 이 사실은 야외 관찰에서 암컷 북방산개구리가 추운 2월에 산란을 한다는 것과 잘 일치하는 것으로써 이 개구리의 번식기가 2월 이라는 것을 입증해 주고있다. 이 개구리의 정소에서 3월 부터 7월 까지는 제1 정원세포의 증식 만이 일부 진행될 뿐 더 이상의 정자형성과정이 진행되지 않았다(Fig. 2). 즉 이 기간에는 정자형성과정이 거의 정지상태에 머물러 있다고 보겠다. 이렇게 정자형성과정이 년중 계속되지 않고 일정한 시기에만 일어나는 현상은 온대지방에서 서식하는 일부의 양서류에서 발견되어 “불연속형(discontinuous type)”으로 불리기도 한다(Delgado *et al.*, 1989). 이러한 불연속형

은 생식주기중 제한된 기간에만 정소내에 정자가 존재하며 정자형성의 정지기(quiescent period)를 거쳐 개시기에 이르면 정소의 무게가 급격히 증가하는 특징을 가지고 있는데(Delgado *et al.*, 1989). 본 실험에 사용했던 북방산개구리도 정자형성 개시기인 9월에 정지기인 7월에 비해 8배 정도의 급격한 증가를 이룬 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

이러한 생식주기를 갖는 정소의 또 하나의 특징은 정자형성이 활성화 됨과 동시에 GSI도 역시 크게 증가한다는 것이다. 본 실험의 결과 북방산개구리에서도 정자형성이 가장 활발한 9월에 세정관의 단면적도 가장 넓게 나타났으며, 정소의 무게도 년중 최고치로 나타났다. 반면 정자형성의 정지기(3월-7월)에는 GSI, 정소의 무게 및

세정관의 단면적 등이 모두 매우 낮게 나타났다 (Fig. 1).

개구리의 정소에서 만들어지는 스테로이드 중 에서 testosterone이 번식기를 조절하는 호르몬 으로 알려져있으며 정소내에 존재하는 testosterone의 양과 혈장에 존재하는 양이 년중 거의 유사한 것으로 알려져 있다(Pirantoni *et al.*, 1984). Testosterone을 비롯한 스테로이드 호르몬들은 일반적으로 척추동물에서 정소의 interstitial cell에서 만들어 지는 것으로 알려져 있다(Hardy *et al.*, 1992). 개구리에서도 정소내의 스테로이드 호르몬의 변화는 세정관 사이에 존재하는 interstitial cell의 핵 크기 변화와, interstitial cell수의 변화가 밀접한 관계가 있음이 이미 보고 된 바 있다(Yoneyama and Iwasawa, 1985). 본 실험의 결과도 interstitial cell의 숫자가 늘어나는 것과 핵이 커지는 시기가 testosterone 농도의 증가와 일치하여 일어난다는 것을 보여주고 있다(Fig. 4). 따라서 본 실험의 결과로 interstitial cell들이 testosterone의 생성 장소라는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다. 그러나 testosterone의 증가와 정자형성과는 거의 관계가 없는 것으로 나타났다. 왜냐하면 testosterone은 동면기, 즉 정자형성과정의 후반부에 높게 나타나고 정작 정자형성이 왕성하게 일어나는 활동기의 일부인 초가을에는 아직 매우 낮기 때문이다. 따라서 증가된 testosterone은 정자변태과정이나 spermiation 과정에 영향을 미칠것으로 추정될 따름이다. 또 하나의 가능성은 testosterone이 reproductive behavior의 유도요인으로 작용할 가능성이 있다. 그러나 이들을 입증할만한 증거는 아직 없다.

본 결과들을 종합해 보면 첫째, 북방산개구리의 GSI는 년중 크게 변한다는것, 둘째, 이 개구리의 정자형성과정은 8월-10월에 가장 왕성하게 일어나고 3월-7월 사이에는 거의 정지되는 "불연속형" 이라는 것, 셋째, 정소내 testosterone은 11월에서 2월에 이르는 동면기에 매우 높고 그 이외의 활동기에는 매우 낮다는것, 넷째, 이러한 사실들은 북방산개구리의 번식기가 2월 이라는

것을 간접적으로 입증하고 있다는 것 등이다.

## 인용문헌

- Delgado, M.J., P.P. Gutierrez, and M. Alonso-Bedate, 1989. Seasonal cycle in testicular activity in the frog, *Rana perezi*. *Gen.Comp. Endocrinol.* **73**: 1-11.
- Hardy, M.P., R.L. Sprando, and L.L. Ewing, 1992. Leydig cell renewal in testis of seasonally breeding animals. *J. Exp.Zool.* **261**: 161-172.
- Iwasawa, H., M. Yamada, and M. Kobayashi, 1977. Response of immature testis to exogenous gonadotropins in young *Rana nigromaculata*. *Sci. Rep. Niigata univ.*, Ser. D (Biology) **14**: 15-20.
- Iwasawa, H., K. Kashiwakura, and T. Sato, 1992. Seasonal changes in the testis and wolffian ducts in the salamander *Hynobius retardatus*. *Jap. J. Herpetol.* **14**: 116-123.
- Kera, Y. and H. Iwasawa, 1981. Functional histology of the testis in the process of sexual maturation in the frog, *Rana nigromaculata*. *Zool. Magazine* **90**: 6-14.
- Kobayashi, T., and H. Iwasawa, 1986. Effects of testosterone on spermatogenic process and sperm preservation in late autumn young *Rana nigromaculata*. *Zool. Sci.* **3**: 387-390.
- Kwon, H.B., Y.K. Lim, M.J. Choi, and R.S. Ahn, 1989. Spontaneous maturation of follicular oocytes in *Rana dybowskii* in vitro: Seasonal influences, progesterone production, and involvement of cAMP. *J. Exp. Zool.* **252**: 190-199.
- Kwon, H.B., H.H. Choi., R.S. Ahn., and Y.D.Yoon, 1991. Steroid production by amphibian (*Rana nigromaculata*) ovarian follicles at different developmental stages. *J. Exp. Zool.* **260**: 66-73.
- Licht, P., B.R. McCreery, R. Barnes, and R. Pang, 1983. Seasonal and stress related changes in plasma gonadotropins, sex steroids, and corticosterone in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **50**: 124-145.
- Mathews, W.W., 1986. "Atlas of Descriptive Embryology" Forth Edition. pp. 50-52. Macmillan Publishing Company. New York.
- Naulleau, G., F. Fleury, and J. Boissin, 1987. Annual cycles in plasma testosterone and thyroxine in the male asp viper *Vipera aspis* L., (Reptilia, viperidae), in relation to the sexual cycle and hibernation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **65**: 254-263.
- Parsons, G.R., and H.J. Grier, 1992. Seasonal changes in shark testicular structure and spermatogenesis. *J. Exp. Zool.* **261**: 173-184.

- Pierantoni, R.L., Iela, M., D'Istra, S. Fasano, R.K. Rastogi, and G. Delrio, 1984. Seasonal testosterone profile and testicular responsiveness to pituitary factors and gonadotrophin releasing hormone during two different phase of the sexual cycle of the frog (*Rana esculenta*). *J. Endocrinol.* **102**: 387-392.
- Rastogi, R.K., 1976. Seasonal cycle in anuran (amphibia) testis: The endocrine and environmental controls. *Bull. Zool.* **43**: 151-172.
- Wingfield, J.C., T.P. Hahn, R. Levin, and P. Honey, 1992. Environmental predictability and control of gonadal cycle in birds. *J. Exp. Zool.* **261**: 214-231.
- Yoneyama, H. and H. Iwasawa, 1985. Annual changes in the testis and accessory sex organs of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Zool. Sci.* **2**: 229-237.

(Accepted September, 29)

---

### Seasonal cycles in testicular activity in the Frog, *Rana dybowskii*

Sun Kun Ko, \*Jeong Woo Kim, and \*Hyuk Bang Kwon (Dept. of Biology, Honam University, Kwangju 506-090 \*Dept. of Biology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea)

Annual changes in spermatogenic activity in testis and intra-testis testosterone levels were examined in the frog, *Rana dybowskii*. Testis weight, GSI, and cross-area of seminiferous tubules varied among different seasons in a similiar manner. They were higher in autumn (September) than any other seasons. In accord with this, spermatogenesis occurred most actively during August-September. Seminiferous tubules were filled with all stages of the germinal cyst at this month. In contrast, spermatogenesis was almost stopped during March and July. The nuclear size was bigger and the number of interstitial cells was higher in testis obtained in hibernation period than those in active period. Similarly, intra-testis testosterone levels were higher in hibernation period than observed in active period. Particularly, testosterone levels decreased rapidly in March.

Taken together, the data indicate that spermatogenesis occurred discontinuously in this frog, and the decrease in testosterone level in March support the fact that the breeding season of this frog is February.