

## 성장 중인 수토끼에서 혈청 IGF-I 수준과 Flow Cytometry 측정에 의한 정자 형성의 변화

이주형<sup>1</sup> · 김창근<sup>1,2\*</sup> · 장유민<sup>1,2</sup> · 류재원<sup>1</sup> · 박민영<sup>1</sup> · 정영채<sup>1</sup> · 방명걸<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>중앙대학교 산업과학대학 동물자원학과

### 초 록

본 연구는 New Zealand White 수토끼에서 춘기발동 기간 동안에 혈청내 IGF-I(insulin-like growth factor-I)과 GH (growth hormone) 수준의 변화, 정자 형성에 따른 정소내 세포 구성 변화 및 이들 측정치들 간에 관계를 조사하기 위하여 실시되었다. 주령과 관련된 정소내 세포의 DNA 함량 변화 조사를 위하여 10~28주령 수토끼 정소 조직의 fine-needle biopsy를 flow cytometry(FCM)로 분석하였다. 생체중은 12~20주령 때 크게 증가되었고( $P<0.05$ ), 28주령 체중은 3.4kg이었다. 혈청 IGF-I 수준(451.3ng/mL)은 20주령에서 가장 높았으며( $P<0.05$ ), 그 후 낮은 수준으로 유지되었다. 혈청 GH 수준은 183.3pg/mL으로 다른 주령 때보다 현저히 높았으며( $P<0.05$ ), 상승시기가 IGF-I보다는 다소 빨랐다. 정소 조직세포 중 1C-세포의 상대적 비율은 18주령 때 48.2%로 16주령보다 크게 상승되었고( $P<0.05$ ), 주령 증가와 더불어 68%로 증가되었다. 2C-세포 비율은 18주령 때 26.8%로 16주령의 54.3%보다 현저히 낮았다( $P<0.05$ ). 4C-세포 비율은 18주령 때 9.9%를 제외하고 2~6%를 유지하였다. 이상 결과에서 토끼는 춘기 발동 개시가 약 18주령에 일어나고 이 기간 중 IGF-I과 GH 수준의 변화가 나이 또는 체성장과 관계가 있었으며 그 영향이 정자 형성과 관련이 있음을 알 수 있었다. Fine-needle biopsy와 연계된 FCM은 춘기 발동 개시와 관련된 정자의 형성 과정을 평가하는데 매우 정확한 방법임을 확인할 수 있었다.

(주제어 : Flow cytometry, IGF-I, 토끼, 춘기 발동, 정자 형성)

### 서 론

포유동물 수컷에서 춘기발동(puberty)의 개시는 체중 (Skinner와 Rowson, 1968) 또는 성장률(Glass 등, 1979)과 관계가 있는 것으로 보고되어 있다. 성성숙과 번식기능이 시상하부-뇌하수체-정소 축에 의한 내분비 조절 하에 있음을 잘 알려진 사실이다. 최근에 somatotrophic axis를 이루는 growth hormone(GH)과 insulin-like growth factor-I (IGF-I)의 관여도 매우 중요한 조절기구로 연구되고 있다(Chandrashekar 등, 2004). 이들 호르몬의 체내 생산이 나이보다는 체성장과 더 관련이 있는 것으로 제시되었다(Laron, 2002). IGF-I은 GH 작용의 주 매개체이며(Chandrashekar 등, 2004) 혈청과 조직내 IGF-I 수준은 내분비적으로 GH의 영향을 받는다(Daughaday와 Rotwein, 1989; Jones와 Clemmons, 1995), 또한 GH와는 독립적으로 정소내 Leydig 및 Sertoli 세포에서 생산되며(Cailleau 등, 1990) 자가분비 또는 인접분비 작용을 통해서 정소 기능에 관여함이 보고되었다(Lin 등, 1990; Codner와 Cassorla, 2002).

혈액내 IGF-I 수준은 GH 수준과 상관이 있으며(Lee와 Rosenfeld, 1987; Davis 등, 1992; Jones와 Clemmons,

1995), 설치류와 영장류에서 혈액 IGF-I 수준은 puberty 도래시기에 크게 증가한다는 보고들이 있으며(Copeland 등, 1982; Handelsman 등, 1987; Daughaday와 Rotwein, 1989), 그 수준은 정소의 급속한 발달 개시와 상관이 있다고 보고되었다(Ojeda와 Urbanski, 1988). 성성숙과 정상 번식 기능의 유지를 위해서는 적정 수준의 IGF-I이 요구되며 성성숙 개시에 IGF-I의 시그널이 절대 필요한 것으로 보고되었다(Nakae 등, 2001). IGF-I의 결핍 또는 결여시 성성숙이 지연되며(Keene 등, 2002; Chandrashekar 등, 2004), GH의 결핍 또는 결여에서도 성성숙이 지연되었다(Laron, 2002; Keene 등, 2002). 이 경우 GH 또는 IGF-I의 처리로 성장촉진도 보고되었다(Pell과 Bates, 1992; Clark와 Rogol, 1996). 그러나 puberty 개시와 관련된 여러 요인들은 물론이고 특히 IGF-I과 GH의 puberty 조절 기전에 대해서 더욱 규명되어야 할 부분이 많이 남아 있다.

IGF-I 또는 GH는 정소의 정자 형성과 Leydig 세포 기능에 중요한 역할을 갖는 것으로 되어 있다(Gnessi 등, 1997; Chandrashekar 등, 2004). IGF-I이 정자 형성 개시와 관계가 있으며(Cailleau 등, 1990), IGF-I 결여시 Leydig 세포의 성숙이 불가능하고 스테로이드 호르몬 생산도 감소되었다(Wang 등, 2003). GH도 정소 발달에 크게 영향을 미치며(Ohyama 등, 1995), GH 결여시 정소 크기의

\* 이 논문은 2003학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

<sup>2</sup> 중앙대학교 생명환경연구원(BET Research Institute, CAU, Ansung, Korea).

† Corresponding author : Dr. C. K. Kim, Dept. of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Ansung, 456-756, Korea.

TEL: +82-31-670-3026, FAX: +82-31-676-0062, E-mail: cckim@post.cau.ac.kr

감소 및 정자 형성의 장애가 보고되었다(Keene 등, 2002). Growth factors의 정소내 작용 기전에 대해서는 앞으로 많은 연구가 요구되고 있으며 특히 이들 요인과 puberty와의 관계 규명도 동물 번식 기능의 조절을 위해 매우 필요한 연구 과제이다.

정소내 정자 형성 과정의 분석 및 정소 기능 검사의 방법으로 flow cytometry(FCM)가 많이 이용되고 있다(Clausen 등, 1977; Hacker 등, 1981; Janca 등, 1986; Yoon 등, 2001). 특히 Dey 등(2000)은 정소의 fine-needle biopsy를 FCM과 연계시킨 매우 유용한 방법을 제시한 바 있다.

본 연구는 성장중인 수토끼에서 춘기 발동 개시와 관련된 된 혈액내 IGF-I과 GH의 수준 변화를 조사함과 동시에 정소 조직내 세포 구성 비율의 변화를 FCM으로 조사하여 체성장과 혈액내 IGF-I 및 GH의 수준과 춘기 발동 개시시간의 관계를 알기 위하여 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 공시 동물

본 실험은 성장 중인 8~28주령의 New Zealand White 종 수토끼 35두를 공시하였다. 실험기간 중 사육용 케이지에 1두씩 분리 사육하였고 사육실내 온도는 15~20°C, 습도는 50~60%를 유지하였다. 급여사료는 조단백질 16.0% 이상, 조지방 2.0% 이상을 함유한 시중 판매 육성 토끼용 펠릿사료였으며 하루 200~250g을 2회로 나누어 급여하였고, 물은 자유 급수시켰으며 실험기간 중 1일 일조시간은 12시간으로 유지하였다.

### 체중측정 및 시료 채취

8~28주령 동안에 2주 간격으로 체중 변화를 측정하였다. 혈청 내 IGF-I과 GH의 수준 측정을 위하여 해당 주령에 이정맥에서 채혈하였고 정소조직의 flow cytometry (FCM) DNA 함량 분석을 위해서는 해당 주령 때 fine-needle biopsy를 실시하였다. 흡입조직은 분석 시까지 -20°C에 보관하였다.

### 혈청 IGF-I 수준의 측정

IGF-I 수준 측정은 Active non-extraction IGF-I ELISA kit(Diagnostic System Lab. Inc., USA)를 이용하였다. 시료 혈청(-20°C)를 용해하여 polypropylene culture tube (12×75mm)에 20μL를 넣고 990μL의 sample buffer I을 넣은 후 25°C에서 30분간 교반하였고 990μL의 sample buffer II를 다시 넣고 천천히 혼합하여 시료를 전처리 하였다. 실험 전 washing solution의 농축액을 1,500mL 증류수로 희석하였으며, 모든 시약은 사용 직전에 25°C로 유지하였다. Antibody-enzyme conjugate solution은 assay buffer I에 1:50으로 희석하여 준비하였다. IGF-I standards(A와 B-F)와 IGF-I control (level I과 II)을 1차 항 IGF-I 항체가 피복된 microtitration well에 전처리 혈청 20μL를 넣고 각 well에 assay buffer B 100μL를 첨가하고 실온에서 2시간 동안 500~600×g으로 교반하고 aspiration한 후 0.35mL washing solution으로 각 well을 5회

세척하고 well plate를 건조하였다. IGF-I antibody-enzyme conjugate solution을 각 well에 100μL를 첨가하고 500~600×g으로 교반한 후 30분간 25°C에서 배양하고 aspiration 하였다. 각 well에 TMB chromogen solution 100μL를 첨가하고 500~600×g으로 교반한 다음 10분간 25°C에서 배양하고 aspiration 후, stopping solution 100μL를 각 well에 첨가하였다. ELISA reader(SIRIO, Italy)로 450nm에서 30분 이내에 absorbance를 측정하여 정량하였다.

### Growth Hormone 수준의 측정

혈청 내 GH 수준 측정은 Immuno-enzymometric assay (IEMA)에 기초한 IEMA Well hGH kit(RADIM, Italia)를 사용하였다. Mouse monoclonal anti-hGH antibody로 coating된 microplate well에 blank, standard control (hGH 0, 0.5, 1.5, 5, 15, 50 ng/mL), enzyme tracer(mouse monoclonal anti-hGH antibody) 200μL를 blank를 제외한 모든 well에 넣은 다음 sealer로 직사광선을 차단한 상태에서 37±2°C에서 60분간 배양하고 aspiration 하였으며, 농축 희석된 washing solution으로 4회 세척하고 aspiration한 다음, 미리 준비된 substrate solution(TMB chromogen solution + substrate buffer) 200μL를 첨가하고 37°C에서 15분간 배양하였다. 그 후 blocking solution (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 첨가하였다. 450nm와 405nm에서 ELISA reader(SIRIO, Italy)를 이용해 20분 이내에 absorbance를 측정하여 정량하였다.

### 정소 세정관내 정자 형성 측정

#### 정소조직 Biopsy

정소를 돌출시킨 후 음낭 피부를 70% 에탄올로 소독하고 정소 실질 부위에 fine biopsy needle(22G×3<sup>1</sup>/<sub>2</sub>, 72 mm× 8.89cm, Becton Dickinson, USA)을 삽입한 다음, 삽입된 needle의 안쪽 심침을 제거하고 10mL 주사기를 장착하고 주사기에 음압을 걸어 Dey 등(2000)의 방법으로 정소내의 4~5부위로부터 정소 실질조직을 채취하였다. 채취한 조직을 D-PBS(Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco, USA)로 처리하였다. 정소 조직 내의 세포분리를 위하여 collagenase 용액에 담가 34°C에서 약 15분간 배양하였고 disposable filter 20μm (Partec, Germany)로 여과하였다. 실온에서 600×g에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 실험전 보존을 위하여 70% ethanol로 고정하였다.

#### 세포의 DAPI 염색

Stock solution 제조는 DAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole)lactate, Sigma, USA)를 D-PBS에 1mg/mL로 희석한 다음 stock solution 100mL에 Triton X-100 (Sigma, USA) 0.1%를 첨가하였고, working solution은 stock solution을 D-PBS에 1,000배로 희석한 후 최종농도를 0.001mg/mL로 조절하였다. 조직 sample의 전처리는 600×g에서 5분간 원심 분리시킨 후 70% ethanol을 제거하고 PBS로 부유시킨 다음 sample의 최종 세포농도를 4~5×10<sup>4</sup> 세포/mL로 조정하였다. 세포의 형광염색은 flow

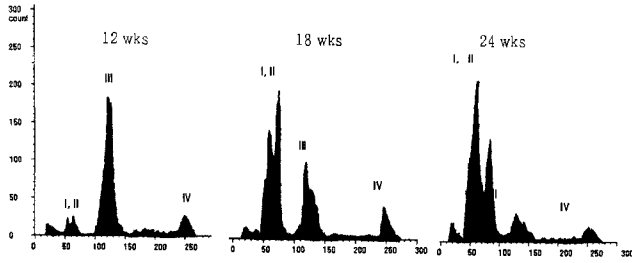


Fig. 1. DNA flow cytometric patterns at different ages (wks). Peaks I, II, III and IV correspond to elongated spermatid(1C-cells), round spermatid(1C-cells), 2C-cells and 4C-cells, respectively.

cytometry용 tube(Rohren, 3mL, 55×12mm, SARSTEDT, Germany)에 전처리된 sample을 1mL당 stock solution 10 μL를 넣고 36°C, 암실에서 12분간 배양하였다.

**Flow Cytometry DNA 함량 분석**

DAPI로 염색된 정소 조직 세포를 Cell counter analyser CCA(Partec, Germany)로 DNA 함량을 분석하였다. 정소조직 세포의 DNA 함량 형태, 즉 DNA ploidy 분석은 Hacker 등(1981)과 Dey 등(2000)의 방법에 준하였다. 성숙토끼 정소조직으로 만든 histogram을 4개 peaks (peak I 과 II: 1C; peak III: 2C; peak IV: 4C)로 구분하였으며 DNA histogram의 예는 Fig. 1과 같다.

**통계처리**

본 실험의 결과에 대한 통계분석은 SAS (strategy application system) 프로그램 GLM(general linear model)으로 분석하였고, 유의성 검정은 Duncan's multiple range

test로 실시하였다.

**결 과**

**생체중 변화**

8~28주령에서의 체중 변화는 Table 1과 같다. 12주령, 20주령 및 24주령 이후의 체중은 각각 2.1kg, 2.9kg 및 3.2~3.4kg이었으며 12~20주령 사이에서 2주 간격의 체중 간에는 모두 유의적 증가를 보였다 ( $P<0.05$ ).

**혈청 IGF-I과 GH 수준 변화**

IGF-I과 GH의 주령별 수준 변화는 Table 2와 같다. IGF-I 수준은 14주령에 381.3ng/mL로 12주령보다 유의적으로 높았으며 20주령의 수준은 451.3ng/mL로 16~18주령 때보다 현저히 높았다( $P<0.05$ ). 22주령 이후는 14~16 주령 수준으로 유지되었다. GH 수준은 16주령까지는 125~133 pg/mL이었으나 18주령 때 183.3pg/mL로 유의적으로 상승되었고( $P<0.05$ ), 20주령 이후는 감소되었다. GH 수준의 상승 시기는 IGF-I 보다 다소 빨랐다.

**정소 세정관내 세포구성 변화**

주령과 정자 형성에 따른 세정관내 세포 구성 비율의 변화는 Fig. 2와 같다. 정소 조직내 DNA 함량이 1C-세포 비율은 16주령에서 9.2%였으나 18주령에서 48.2%로 크게 증가되었으며( $P<0.05$ ) 그 후 점증하여 26~28주령에서는 68%이었다. 한편 2C-세포 비율은 12주령 이하의 54.3%가 18주령에서 유의적으로( $P<0.05$ ) 26.8%로 크게 감소되었으며, 그 후 28주령까지 13~20% 수준으로 유지되었다. 4C-세포의 비율은 18주령에서 9.9%로 다소 상승이 있었으나

Table 1. Changes in body weight measured at 2-week intervals

BW (kg)	Age(wks)										
	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
Mean	1.27 <sup>a</sup>	1.68 <sup>b</sup>	2.08 <sup>c</sup>	2.29 <sup>d</sup>	2.52 <sup>e</sup>	2.71 <sup>f</sup>	2.88 <sup>g</sup>	3.03 <sup>h</sup>	3.21 <sup>i</sup>	3.33 <sup>ij</sup>	3.39 <sup>j</sup>
± SD	0.17	0.21	0.19	0.20	0.20	0.25	0.27	0.25	0.21	0.21	0.32

Different letters represent significant differences at  $P<0.05$ .

Table 2. Changes in IGF-I and GH levels in serum measured at 2-week intervals

	Age(wks)									
	≤ 12	14	16	18	20	22	24	26	28	
IGF-I (ng/mL)	287.8 <sup>a</sup>	381.3 <sup>b</sup>	347.3 <sup>bc</sup>	367.8 <sup>bc</sup>	451.3 <sup>d</sup>	373.6 <sup>bc</sup>	315.0 <sup>ab</sup>	336.3 <sup>ab</sup>	325.5 <sup>ab</sup>	
	33.2	10.9	10.1	55.5	32.6	46.1	3.5	27.3	43.4	
GH (pg/mL)	125.0 <sup>a</sup>	133.3 <sup>a</sup>	125.0 <sup>a</sup>	183.3 <sup>c</sup>	162.5 <sup>ab</sup>	137.5 <sup>a</sup>	175.0 <sup>bc</sup>	137.5 <sup>a</sup>	100.0 <sup>a</sup>	
	106.1	57.7	80.0	125.8	110.9	110.9	136.8	110.9	70.7	

Mean±SD.

Different letters represent significant differences at  $P<0.05$ .

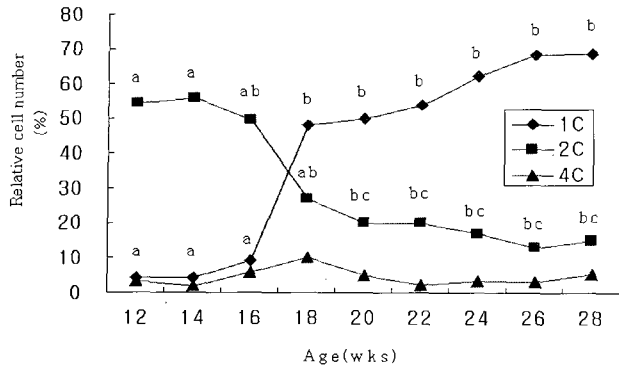


Fig. 2. Relative cell numbers(%) in DNA flow cytometry at different ages. <sup>a,b,c</sup> different letters on the same line represent significant differences at  $P < 0.05$ .

그 외의 주령에서는 2-6%로 유지되었다. 1C, 2C 및 4C 세포 비율이 성숙 개체와 같은 비율로 개시된 시기는 18 주령이었고 그 후 28주령에서 1C-세포 비율이 다소 증가되었다.

### 고찰

#### 체중변화

본 결과에서 12-20주령 사이에서 2주 간격으로 매 체중 간에 유의적 차이를 보이며 성장률이 높았다. 이러한 성장률은 Foote 등(2000)이 New Zealand White종에서 28 주령 때 성숙 체중의 90%에 도달됨을 보고한 것과 같았다. 춘기 발동 개시의 시기가 체중(Skinner와 Rowson, 1968) 및 성장률(Glass 등, 1979)과 관계가 있다는 보고로 보아 16-18주령의 2.5-2.7kg 때가 춘기발동기가 됨을 예측할 수 있었다. 또한 일반적으로 춘기 발동 개시에는 정소 크기가 급증되는 시기인데 McCarthy 등(1979)은 수소에서 정소 크기 증가와 월령 간에 직선적 관계가 있음을 보고하였다.

#### 혈청 IGF-I과 GH 수준 변화

혈청 IGF-I은 14-18 주령에서 높아져 20주령에 최고 수준으로 주령에 따른 특이적 상승 변화를 나타내었다. 다른 여러 보고에서도 성숙 개시에 유의적 상승이 설치류와 영장류(Copeland 등, 1982; Handelsman 등, 1987) 및 사람(Daughaday와 Rotwein, 1989)에서 보고되었다. 특히 puberty 시기에 높은 IGF-I 수준에 대해서 Handelsman 등(1987)은 IGF-I의 상승이 puberty 도달에 필요한 LHRH 방출빈도 증가와 관련이 있음을 보고하였고, Nakae 등(2001)은 춘기 발동 개시의 시그널이 IGF-I의 상승이라고 하였다. 본 결과에서 GH의 수준도 IGF-I의 최고 수준 시기와 동일하지는 않았으나 18-20 주령에서 더욱 높았다. 변양(Davis 등, 1992)과 사람(Lee와 Rosenfeld, 1987)에서도 IGF-I과 GH 수준 간에 상관성이 있는 것으로 보고되었으며, Jones와 Clemmons(1995)에서도 두 호르몬 수준 간에 상관성이 보고되었다. 또한 IGF-I이 GH 작용의 주 매개체로서(Chandrashekar 등, 2004) GH의 영향 하에 조절된

다는 보고(Daughaday와 Rotwein, 1989; Jones와 Clemmons, 1995)는 본 연구에서 두 호르몬이 춘기 발동 개시기간에 같이 상승된 결과를 설명해 주는 것으로 볼 수 있다. 또한 IGF-I 결핍 생쥐에 GH 처리시 혈청내 IGF-I 수준이 상승하였으며(Chandrashekar와 Bartke, 1993), Santos 등(1999)은 정상 수소에 GH 처리시 혈청 IGF-I 수준이 상승됨을 보고하였다. Lee와 Rosenfeld(1987)은 사람에서 GH 처리 효과의 지표로서 IGF-I 수준의 상승 정도를 제시한 바 있다.

이들 호르몬의 수준 변화와 체중 변화를 비교해 볼 때 성장률이 빠른 시기에 IGH-I과 GH가 높았던 결과를 다른 보고와 비교해 볼 때 Handelsman 등(1987)과 Laron(2002)은 두 호르몬의 체내 생산이 체성장과 관련이 있으며 IGF-I의 결핍시 체성장이 지연됨을 보고하였다. 또한 Clark와 Rogol(1996)도 puberty 동안에 GH가 체성장을 촉진시킨다고 하였다. 실험동물에서도 IGF-I의 결핍 또는 결여시 IGF-I의 처리로 체중의 증가가 보고되었다(Pell과 Bates, 1992). 한편 IGF-I 또는 GH 결핍시 성숙속이 지연된 보고들도 있다(Keene 등, 2002; Laron, 2002; Chandrashekar 등, 2004).

Puberty 개시와 정소의 급성장 시기에 관하여 Ojeda와 Urbanski(1988)는 IGF-I 수준이 그리고 Ohyama 등(1995)은 GH의 수준이 정소의 빠른 발달과 상관성이 있음을 보고하였다. 또한 Keene 등(2002)과 Chandrashekar 등(2001)은 GH 결핍시 정소 크기가 감소됨을 보고하였다. IGF-I과 GH가 정소 형성과의 관계에 대한 연구 결과를 보면 Cailleau 등(1990)은 정자 형성 개시와 IGF-I 간에 관계가 있음을 보고되었다. 또한 IGF-I 또는 GH가 정자 형성과 Leydig 세포에 주요 역할을 갖는 것으로 보고되었다(Gnessi 등, 1997; Chandrashekar 등, 2004). Wang 등(2003)은 이들 호르몬이 Leydig과 Sertoli 세포의 성숙과 분화에 크게 영향을 준다고 보고하였다. Lin 등(1990)은 미성숙 개체로부터 취한 Leydig 세포의 체외 배양시 IGF-I의 처리로 testosterone 합성이 성숙 개체 유래의 세포보다 더 높음을 보고하였다. 또한 Katongole 등(1971)은 puberty 개시전 일정 수준 이상의 testosterone이 유지되어야 함을 보고하였다. Rawilings 등(1972)은 puberty 기간중 정소내 정자 형성 정도가 testosterone 수준과 상관성이 있으며 호르몬 수준이 정자 형성의 유지보다는 개시와 더욱 관계가 있음을 보고하였다. 한편 Santos 등(1999)은 성숙 수소의 GH 처리에서 IGF-I은 상승되었으나 정소내 세정관 구조와 정자 형성에는 변화가 없었다. 이러한 결과들은 puberty 과정에서 IGF-I 또는 GH가 정소내 세정관 구성세포들의 성숙과 분화뿐만 아니라 정자 형성의 개시와 유지에 필요한 testosterone 합성에 매우 중요한 역할이 있음을 보여주고 있다.

본 결과에서 puberty 과정이 체중의 급속한 증가와 더불어 정자 형성 과정의 개시가 IGF-I과 GH 수준의 상승과 연관이 있는 것으로 사료되었다.

#### 정소 세정관내 세포 구성 변화

본 결과에서 FCM의 1C-세포(정자세포) 비율이 특히 16-18주령 사이에 크게 상승되고 28주령까지 계속 점증된 반면에 2C-세포 비율은 16-20 주령 사이에 크게 감소되었다. 또한 1C, 2C 및 4C 세포 비율이 성숙된 개체 수준과

같은 정도로 시작한 때가 18-20주령이었다. 이러한 결과로 보아 puberty의 개시가 약 18주령에 이뤄짐을 알 수 있었다. 이 결과는 Dutch종에서 14주령과 16주령에서 각각 정자세포의 첫 출현 및 성숙정자가 존재한다는 McFee(1963)의 결과보다는 그 개시시기가 다소 늦었으나 Frame 등(1994)이 18-20 주령에 정자 첫 출현을 보고한 것과는 일치된 결과였다. Amann과 Lambriase(1967)도 New Zealand White종에서 puberty가 Dutch종보다 늦다고 하였다. 춘기 발동 개시시기에 1C 세포 비율이 급증된 결과는 생쥐(Janca 등, 1986), 흰쥐(Clausen 등, 1977; Yoon 등, 2001)에서도 보고되었다. 또한 24-28주령 때 나타난 각 세포의 구성비율은 성숙된 생쥐(Janca 등, 1986), 흰쥐(Yoon 등, 2001) 및 사람(Dey 등, 2000)에서 보고된 경향과도 같았다.

본 결과에서 18주령을 전후하여 IGF-I과 GH 수준이 특히 상승되었던 시기와 정소 내 세포 구성 비율의 변화 시기에 유사성을 알 수 있었다. 그러나 이러한 관계를 더 명확히 규명하기 위해서는 puberty의 개시시기를 전후하여 호르몬 측정 간격을 더욱 좁히고 정소의 스테로이드 합성과 분비의 조사도 병행되어야 하며 IGF-I과 GH의 국소적 작용에 대하여 더욱 세밀한 연구가 요구되었다.

#### Changes in Serum IGF-I and Spermatogenesis Analysed by Flow Cytometry in Growing Male Rabbit

J. H. Lee, C. K. Kim, Y. M. Chang, J. W. Ryu, M. Y. Park,  
Y. C. Chung and M. G. Pang

Department of Animal Science & Technology, Chung-Ang University,  
BET Research Institute, Chung-Ang University

#### ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I) and growth hormone (GH) in serum, the quantitation of spermatogenesis and the comparable relationships among these measurements during pubertal period in New Zealand White male rabbits. To investigate the age-related testicular changes in DNA contents of spermatogenic cells, the fine-needle testicular biopsies from males aged 10 to 28 wks were evaluated by flow cytometry (FCM). Body weight increased significantly between the ages of 12 and 20 wks ( $P<0.05$ ) and reached 3.4 kg at 28 wks of age. The highest serum IGF-I level (451.3 ng/mL) was observed at 20wks of age ( $P<0.05$ ) and thereafter remained stable at low levels. Serum GH level at 18 wks of age was 183.3 pg/mL which was significantly higher compared to the other ages ( $P<0.05$ ), and the rising time in serum GH tend to be somewhat earlier than that of IGF-I. The relative percentage of 1C-cells in testicular cell compartments was 48.2% at the age of 18 wks which significantly increased than those of 16-wk-old ( $P<0.05$ ) and thereafter increased with the advance of age to 68%. The percentage of 2C-cells in testis was 26.8% at 18 wks of age

which was significantly lower than 54.3% at 16 wks old ( $P<0.05$ ). The percentage of 4C-cells was constantly maintained 2~6% except the 9.9% at 18 wks of age. In conclusion, the results suggest that the puberty onset occurred at about the 18 wks of age and that the IGF-I and GH in serum during the pubertal period showed the age/growth-specific changes and these changes might be related to the spermatogenesis. The DNA FCM combined with fine-needle testicular biopsy could offer a very sensitive method to monitor the quantitative spermatogenic events related to the puberty onset.

(Key words: Flow cytometry, IGF-I, Puberty, Rabbit, Spermatogenesis)

#### 인용문헌

1. Amann RP, Lambiase, JTJr (1967): The male rabbit. I. change in semen characteristics and sperm output between puberty and one year of age. *J Reprod Fert* 14:329-332.
2. Cailleau J, Vermeire S, Verhoeven G (1990): Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Mol Cell Endocrinol* 69:79-89.
3. Chandrashekar V, Bartke A (1993): Induction of exogenous insulin-like growth factor-I secretion alters the hypothalamic-pituitary-testicular function in growth hormone-deficient adult dwarf mice. *Biol Reprod* 47:544-551.
4. Chandrashekar V, Bartke A, Awoniyi CA, Tsai-Morris CH, Dafau ML, Russell LD, Kopchick JJ (2001): Testicular endocrine function in GH receptor gene disrupted mice. *Endocrinology* 142(8):3443-3450.
5. Chandrashekar V, Zaczek D, Bartke A (2004): The consequences of altered somatotrophic system on reproduction. *Biol Reprod* 71:17-27.
6. Clark PA, Rogol AD (1996): Growth hormones and sex steroid interactions at puberty. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25:665-681.
7. Clausen OPF, Purvis K, Hansson V (1977): Application of microflow fluorometry to studies of meiosis in the male rat. *Biol Reprod* 17:555-560.
8. Codner E, Cassorla E (2002): Growth hormone and reproductive function. *Mol Cell Endocrinol* 186:133-136.
9. Copeland KC, Kuehl TJ, Castracane VD (1982): Pubertal endocrinology of the baboon : elevated somatomedin-c/insulin-like growth factor I at puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 55:1198-1201.
10. Daughaday W, Rotwein, P (1989): Insulin-like growth factors I and II : peptide, messenger ribonucleic

- acid and gene structure, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10:68-91.
11. Davis SR, Hodgkinson SC, Prosser CG, Gluckman PD, Bconomio FC, Collier RJ (1992): Effect of growth hormone treatment on the distribution of insulin-like growth factor-I between plasma and lymph of lactating sheep. *J Endocrinol* 132:339-344.
  12. Dey P, Mondal A, Singh SK, Vohra H (2000): Quantitation of spermatogenesis by DNA flow cytometry from fine-needle aspiration cytology material. *Diagn Cytopathol* 6:386-387.
  13. Foote RH, Carney EW (2000): The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. *Reprod Toxicol* 14:477-493.
  14. Frame SR, Hurtt ME, Green JW (1994): Testicular maturation in prepubertal New Zealand rabbits. *Vet Pathol* 31:341-345.
  15. Glass AR, Dahms WT, Swerdloff RS (1979): Body fat at puberty in rats: alteration by changes in diet. *Pediatr Res* 12:263-267.
  16. Gnassi L, Fabbri A, Spera G (1997): Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis : an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* 18: 541-608.
  17. Hacker U, Schumann J, Göhde W, Müller K (1981): Mammalian spermatogenesis as a biologic dosimeter for radiation. *Acta Radiol Oncol Radiat Phys Biol* 20:279-282.
  18. Handelsman DJ, Spaliviero JA, Scott CD, Baxter RC (1987): Normal regulation of the peripubertal surge of insulin-like growth factor-I in the rat. *Endocrinology* 120:491-496.
  19. Janca FC, Jost LK, Evenson DP (1986): Mouse testicular and sperm cell development characterized from birth to adulthood by dual parameter flow cytometry. *Biol Reprod* 34:613-623.
  20. Jones JL, Clemmons DR (1995): Insulin-like growth factor and their binding proteins : biological actions. *Endocr Rev* 16:3-34.
  21. Katongole CB, Naftolin F, Short RV (1971): Relationship between blood levels of luteinizing hormone and testosterone in bulls and the effect of sexual stimulation. *J Endocrinol* 50:457-466.
  22. Keene DE, Suescun MO, Bostwick MG, Chandrashekar V, Bartke A, Kopchick, JJ (2002): Puberty is delayed in male growth hormone receptor gene-disrupted mice. *J Androl* 23:661-668.
  23. Laron Z (2002): Growth hormone insensitivity (Laron syndrome). *Rev Endocr Metab Disord* 3:347-355.
  24. Lee PDK, Rosenfeld RG (1987): Clinical utility of insulin-like growth factor assays. *Pediatrician* 14: 154-161.
  25. Lin T, Wang D, Calkins JH, Guo H, Chi R, Housley PR (1990): Regulation of insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid expression in Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 73:147-152.
  26. McCarthy MS, Hafs HD, Convey EM (1979): Serum hormone patterns associated with growth and sexual developments in bulls. *J Anim Sci* 49:1012-1020.
  27. McFee AF (1963): Changes in testicular morphology and reproductive capacity of male rabbits following pre-pubertal exposures to gamma radiation. PhD thesis Cornell Univ.
  28. Nakae J, Kido Y, Acelili D (2001): Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev* 22:818-835.
  29. Ohyama K, Ohta M, Nakagomi Y, Yamori T, Sano T, Shimura Y, Sato K, Nakazawa S (1995): Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on testosterone secretion in premature male rats. *Endocr J* 42:817-820.
  30. Ojeda SR, Urbanski HF (1988): Puberty in the rat. In: Knobil, E. Neill, J. *The physiology of reproduction*. Raven press. New York, USA, pp 1699.
  31. Pell JM, Bates PC (1992): Differential actions of growth hormone and insulin-like growth factor-I on tissue protein metabolism in dwarf mice. *Endocrinology* 130:1942-1950.
  32. Rawlings NC, Hafs HD, Swanson LV (1972): Testicular and blood serum androgens in Holstein bulls from birth through puberty. *J Anim Sci* 34: 435-440.
  33. Santos RL, Silva, CM, Ribeiro AFC, Vasconcelos AC, Pesquero JL, Coelho SG, Serakides R, Reis SR (1999): Effects of growth hormone and induced IGF-I release on germ cell population and apoptosis in the bovine testis. *Theriogenology* 51:975-984.
  34. Skinner JD, Rowson A (1968): Puberty in suffolk and creoss-bred rams. *J Reprod Fert* 16:479~488.
  35. Wang GM, O'Shaughnessy PJ, Chubb C, Robaire B, Hardy MP (2003): Effects of insulin-like growth factor I on steroidogenic enzyme expression levels in mouse Leydig cells. *Endocrinology* 144:5058-5064.
  36. Yoon CY, Hong CM, Cho YY, Song JY, Hong IJ, Cho DH, Lee BJ, Song HJ, Kim CK (2001): Flow cytometric evaluation on the age-dependent change of testicular DNA contents in rats. *J Vet Sci* 2:43-46. (접수일자: 2005. 4. 6. / 채택일자: 2005. 8. 1.)