

Chlorambucil 이 수컷 생쥐의 생식세포에 미치는 영향*

계명대학교 의과대학 해부학교실

김덕훈 · 김곤섭 · 최인장 · 이인환 · 장성익

= Abstract =

Effect of Chlorambucil on the Reproductive Cells of Male Mice

Douk Hoon Kim; Gon Seop Kim; In Jang Choi; Ihn Hwan Lee, MD; Sung Ik Chang, MD

Department of Anatomy, Keimyung University

School of Medicine, Taegu, Korea

The present study was performed to investigate the effects of chlorambucil on the reproductive cells of male mice.

The animal was treated with daily injection of chlorambucil(16mg/kg) for periods up to 35 days.

The morphological changes in reproductive cells of male mice were observed with light microscope after routine preparation.

The results are summarized as follows:

1. Testis, epididymis, prostate, and body weight were increased in control groups, however, in the experimental groups, these were severely decreased.
2. The diameter of seminiferous tubule and the height of germinal epithelium cell were decreased, and more numbers of spermatogonia A, spermatogonia B, spermatocyte, spermatid, and spermatozoa were severely decreased. After 35 days treated with chlorambucil, almost all spermatozoa were lost in seminiferous tubules.
3. During the process of treatment, the frequency of cell debris, vacuolations, piknotic nuclei, and multinucleated giant cells were markedly appeared in the germinal epithelial cells.
4. The severe hyperplasia of Leydig cell was revealed, however, the Sertoli cell was not affected with treatment.

These results indicate that the chlorambucil causes ultimate lesions for the production of reproductive cell in all stages of the spermatogenesis.

서 론

chlorambucil(Leukeran)은 alkylating agents 의 일종인 nitrogen mustard 류로써 대체로 작용이 느리고 부작용이 적은 종양치료제이다.

이 약물은 1952년 Haddow 등이 최초로 합성하여 실험동물에서 항암효과를 증명한 이후, 만성림파성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia), Hodgkin 씨병, 다발성골수종(multiple myeloma), 본태성 고분자 글로부린혈증(primary macroglobulinemia), 전립선암, 유방암 및 고환암 등의 치료제로 사용되

* 이 논문은 1987년도 계명대학교 울종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

어 왔다(Calabresi, 1967 ; Lerner, 1978).

chlorambucil은 DNA의 기본적 구성물질인 guanine의 7번 질소원자를 alkyl화 시켜 DNA 합성을 억제한다(Brooks와 Lawley, 1960). 따라서 이 약물은 강력한 항암효과 외에도 정상조직에 영향을 주어 성장억제, 임신태아의 기형유발 등에 심한 부작용을 나타내고 있다(Connor, 1972).

chlorambucil 투여로 인한 세포독성은 김등(1986)이 20mg 씩 2주간 누적투여후 생쥐의 심근미세구조변성에 관하여, Monie(1961)는 웅성생쥐에서 심장혈관 이상에 대하여, Connors(1972)는 간, 신장의 조직에 연구를 하였다.

한편 chlorambucil 투여로 인한 생식세포에 대한 연구는 Jackson 등(1959, 1966)이 수컷 흰쥐에서 약물투여군의 수정에 대한 영향, Freund(1968)의 guinea-pig에서 5mg을 1회 투여군에서 사정에서 정자수의 현저한 감소, 김등(1986)의 2주간 20mg 씩 누적투여후 세정관의 직경감소, 세정관 모양의 변화, 정원세포의 수적감소 등을 보고하였다.

본 실험은 chlorambucil을 5주간 경시적 누적투여한 치리군에서 세정관의 직경, 생식상피세포층의 두께, A정원세포, B정원세포, 정모세포, 정세포, 정충, Sertoli 세포 및 Leydig 세포 등에 미치는 변화과정을 관찰하기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

계명대학교 의과대학 의용동물 사육실에서 일정

조건(실내온도 20°C±1°C, 습도 60±10%)으로 몸무게 27g인 생후 20주된 A/S Swiss Albino(Mus Muscus)계의 male mouse로서 대조군 15마리, 처리군 1, 3, 5주에 각 15, 12, 9마리를 사용하였다.

2) 약 품

영국의 Burroughs wellcome사 제품인 chlorambucil(Leukeran)을 사용하였다.

2. 실험방법

chlorambucil을 Elanie와 Johnson(1979)의 방법에 따라 처리군은 0.5N NaHCO₃(pH8.0)에 부유시켜 kg당 16mg을 복강에 주입하고 대조군은 동량의 0.5N NaHCO₃만 주입하였다.

조직관찰은 일반적인 방법으로 매주 15마리씩 경추탈구법으로 하여 개복 즉시, 정소, 부고환, 전립선을 적출하여 E. T. N. balance에서 무게를 단 후 정소는 0.25% glutaraldehyde와 Helley 고정액에 넣은 뒤 Epon과 Paraffin으로 포매하였다.

조직은 0.5μ와 4μ으로 cross-section하여 toluidine blue와 hematoxylin eosine으로 염색한 뒤 olympus 광학 현미경으로 검경하고 촬영하였다.

실험성적

1. 대조군

사육기간이 길수록 체중과 각 기관의 무게 즉 정소, 부고환, 전립선은 늘어났다(Table 1).

세정관은 거의 원형이며(Fig. 1), 세정관의 직경, 생식상피세포층의 높이는 정상군과 동일한 양상을 보였으며, 정원세포, 정모세포, 정세포 등의 생식세포, 정충, Sertoli 세포는 잘 발달되어 있었다(Fig. 1).

Table 1. Organ weights in male mouse treated with chlorambucil

(16μg/kg body weights)

Group	Duration (week)	B. W. (g)	T. W. (g)	E. W. (g)	P. W. (g)
Control	0	27.113±0.322	0.227±0.018	0.148±0.006	0.161±0.003
	1	28.380±0.472	0.251±0.009	0.158±0.001	0.167±0.001
	3	30.533±0.539*	0.282±0.001*	0.162±0.002	0.171±0.002
	5	34.300±1.257**	0.302±0.003**	0.172±0.006*	0.210±0.010*
Treatment	1	24.387±0.430	0.209±0.007*	0.136±0.004	0.139±0.002
	3	21.200±0.539*	0.099±0.005*	0.086±0.006*	0.102±0.005
	5	17.793±0.766†	0.075±0.010**	0.081±0.008*	0.079±0.006*

B. W. ; Body Weight, T. W. ; Testes Weight, E. W. ; Epididymis Weight, P. W. ; Prostate Weight. Data are expressed as mean ± S. E. M.

*p>0.025, **p>0.001

Table 2. The effect of chlorambucil on quantitative distribution of mouse germ cells

	Control	Treatment		
		1W	3W	5W
Number of males studied	10	10	9	7
Mean tubular diameter(um)	176.17±20.95	120.88±8.39**	95.96±12.29**	78.25±11.75**
Mean height of germ cells(um)	48.25±7.84	34.66±6.03**	19.54±7.49	11.17±4.54**
Type A spermatogonium number per 60 tubular cross	15±2	12±2*	3±1**	—
Type B spermatogonium number per 60 tubular cross	26±4	23±2	9±2**	—
Sertoli cells number per 60 tubular cross	18±2	18±2	18±2	17±2
Multinucleated giant cells number 60 tubular cross	—	—	0.6±0.5	1.2±0.9

Data are express as mean±S. D.

*p>0.025, **p>0.005

Table 3. The severity of different effects seem after cumulating administration of chlorambucil on the seminiferous tubules of mouse

Lesion	Control	Treatment		
		1W	3W	5W
Vacuoles	—	—	++	+++
Germ cell disruption	—	+	++	+++
Intratubular cellular debris	—	—	++	++
Frequency of seminiferous tubules atrophy	—	+	++	++
Intensity of Leydig cell hyperplasia	—	+	+++	++

Effect were graded as follows; —none, +minimal, ++moderate, +++severe.



Fig. 1. Seminiferous tubules of control mouse. H-E stain. X400.

간질세포는 정상적으로 분포되어 있어 조직의 손상은 거의 볼 수 없었다(Table 2, 3).

2. 약물투여 1주군

대조군에 비하여 체중, 정소, 부고환, 전립선의 무게는 조금 감소하였으며(Table 1), 세정관의 직경,

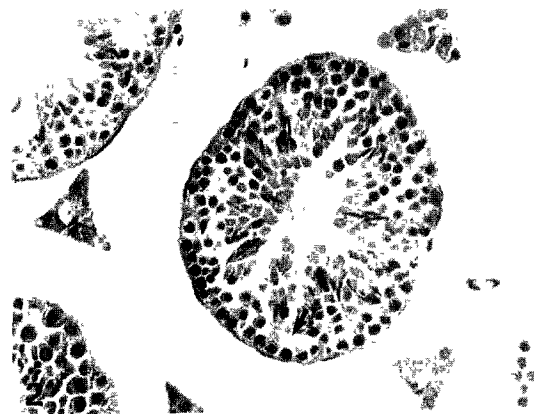


Fig. 2. Seminiferous tubule from a mouse receiving chlorambucil for 7 days. Note characteristic vacuolation(arrow). H-E stain. X400.

생식상피 세포층의 높이도 줄어들었다(Table 2).

생식세포의 손상은 기저막 가까이에 위치한 정원세포가 심하며, 다른 생식세포들은 약간의 감소가

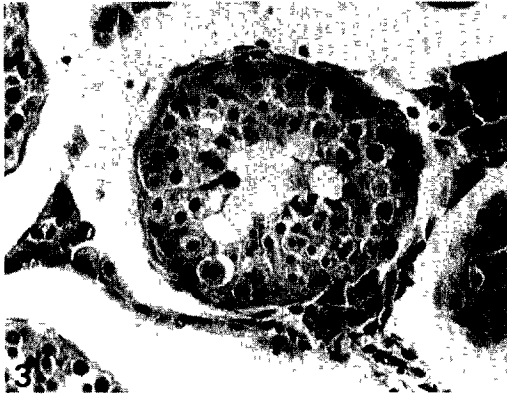


Fig. 3. Seminiferous tubule from a mouse receiving chlorambucil for 21 days. Note characteristic vacuolation(arrow), piknotic nuclei(arrow head), and Leydig cell hyperplasia(star). H-E stain. X400.



Fig. 5. Seminiferous tubule from a mouse receiving chlorambucil for 35 days. Note numerous vacuolation(arrow) in degenerating germinal epithelium cell and the cell debris(double arrow head) in lumen. Toluidine blue stain. X400.

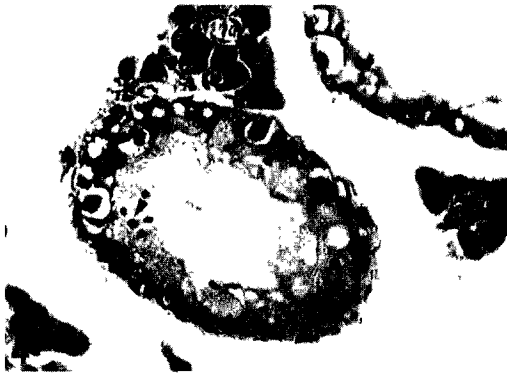


Fig. 4. Seminiferous tubules from a mouse receiving chlorambucil for 35 days. Note characteristic piknotic nuclei (arrow head) and multinucleated giant cell(double arrow). H-E stain. X400.

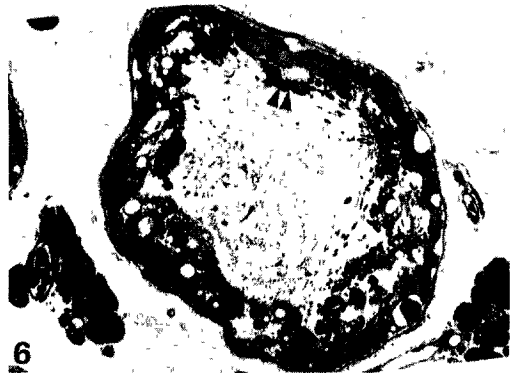


Fig. 6. Seminiferous tubule from a mouse receiving chlorambucil for 35 days. Note numerous multinucleated giant cell(double arrow) and the cell debris (double arrow head) in lumen. Toluidine blue stain. X400.

있었다(Fig. 3).

또한 변성된 생식세포 주위에 공포현상이 조금 나타났(Fig. 2). 한편 Sertoli 세포의 수적 변이는 거의 없었으나(Table 2), Leydig 세포는 대조군에 비하여 약간의 증식을 나타내었다(Table 3).

3. 약물투여 3주간

체중과 각 기관의 무게 즉 정소, 부고환, 전립선은 대조군에 비해 현저히 감소하였으며(Table 1), 세정관의 직경, 생식세포 층의 높이도 많이 줄어들었다(Table 2, Fig. 3). 생식세포의 손상은 거저막에 가까운 A, B 정원세포의 손실이 크며 정모세

포, 경세포 등의 수도 크게 감소하였다. 또한 정총도 내강(lumen)에서 거의 볼 수 없었다(Fig. 3).

손상된 생식세포의 위치에는 변성된 cell debris, 공포현상, piknotic 세포 등이 나타났으며 일부 세정관에는 multinucleated giant 세포가 나타났다.

Leydig 세포는 대조군에 비하여 많은 증식을 보였으며 Sertoli 세포의 수적 변이는 거의 볼 수 없었다(Table 2, Fig. 3).

4. 약물투여 5주간

대조군에 비하여 체중, 정소, 부고환, 전립선의 무게는 크게 감소하였으며 사망률도 늘어났다

(Table 1).

개복시 정소는 매우 작고 심하게 위축되어 있었으며 표면이 부드럽고 창백하게 되어있었다.

세정관의 직경과 생식상피세포층의 높이는 크게 줄어들었으나 내강은 상대적으로 넓게 나타났(Fig. 4, 6).

생식세포의 심한 손상은 기저막 부근에 위치한 A, B 정원세포로서 이들은 모두 소실되었으며, 정모세포, 정세포도 수가 크게 감소하였고, 정충은 거의 없었다(Fig. 4, 5, 6).

변성된 생식세포 주위에는 공포현상, piknotic nuclei, multinucleated giant 세포 등이 나타났(Fig. 4, 5, 6).

Sertoli 세포의 수적변이는 없었으나(Table 2), Leydig 세포는 많은 증식을 나타내었다(Table 3, Fig. 4).

고 찰

chlorambucil은 DNA의 구성물질인 guanine의 7번 질소 원자를 alkyl화 시켜 DNA 합성을 억제시키는 것으로 알려져 왔다(Brookes와 Lawley, 1960). 따라서 강력한 항암효과 외에 분열이 왕성한 조직에 특히 부작용이 큰 것으로 보고 되어 왔다(Lerner, 1978).

본 연구에서 약물의 투여 기간이 길수록 체중, 정소, 부정소, 전립선의 무게가 감소하고 사망률이 높은 것은 정확한 기전은 알려지지 않았으나, 약물에 의한 DNA 합성 억제에 의한 부작용이 심하기 때문에 일어난 결과라고 사료된다.

약물에 의한 세정관 모양에 대해 kaufman 등(1955)은 rat에서 ethionine 투여와 김등(1986)이 chlorambucil을 mouse에 누적투여한 후 처리군의 초기에 세정관의 표면이 불규칙하며, 후에 다각형으로 변한다고 보고하였으나, 본 연구에서는 약물의 누적투여 기간이 길수록 세정관의 모양은 크게 변화하지는 않았으나, 직경과 생식상피세포층은 많이 줄어들었다.

Kaufman 등(1955)은 세정관의 줄어들음은 고유층의 줄어들음에 의하여 일어난다고 하였으며, 김등(1986)은 약물이 세정관에 부분적 영향을 주어서 일어난다고 하였다. 그러나 본 결과에서는 약물이 세정관의 전체에 고르게 영향을 주어 상피세포의 감소로 인하여 세정관이 줄어들은 것으로 여겨진다.

chlorambucil의 누적투여 기간이 길수록 세정

관의 내강은 크게 비어 있는 반면 생식세포는 많은 감소와 변성이 일어났다.

Prior와 Ferguson(1950), 김등(1986)은 약물에 의한 세정관 내의 생식세포의 변성 정도는 세정관마다 손상의 정도가 조금씩 다르게 나타나는데, 이 같은 결과는 간질세포 사이에 분포하는 혈관의 크기와 혈류량의 정도 차이라고 보고 하였다. 그러나 본 연구에서는 약물에 의한 각 세정관의 손상이 거의 동시에 일어났는데 이 같은 현상은 약물에 의한 생식세포의 손상이 거의 같은 시기에 받은 것으로 추측된다.

약물에 의한 손상이 가장 크고 먼저 영향을 받은 세포는 기저막 부근의 A 정원세포, B 정원세포이며, 다음으로 정모세포, 정세포, 정충이다. 이 같은 손상을 Waites와 Setchell(1966)는 혈류량의 감소가 정자형성에 영향을 주기 때문이라 여겼으며, Bocchilla 등(1962)과 김등(1986)은 간질세포 지역에 분포하는 혈관의 혈류량에 약물이 섞여 기저막을 통해 이들 지역에 먼저 들어가 영향을 주기 때문이라 보고하였는데, 본 결과도 이와 비슷하게 일어난 것으로 유추된다.

약물투여 3,5주에서 내강내에 정충이 없는 것으로 약물투여 전에 이미 존재한 것이 판강에서 부정소쪽으로 방출되었으며 그 후에 새로운 정충의 생성이 중단되었기 때문이라 사료된다.

chlorambucil 영향에 의한 생식세포의 변성은 cell debris, piknotic nuclei, multinucleated giant 세포, 공포현상이 나타났.

김등(1986)은 cell debris는 Sertoli 세포의 기능 이상으로 식작용의 불능 때문에 일어난 현상으로 여겼는데, 본 연구도 비슷한 결과라고 생각된다. 그러나 본 실험에서 Sertoli 세포의 수적 이상은 거의 볼 수 없었는데, 이것은 Banhawy 등(1977)과 Bowler(1972)가 mepivacaine과 열을 rat에 처리했을 때 심하게 손상받은 세정관에서 Sertoli 세포의 수적 이상이 없었던 결과와 일치한다.

그러나 이 세포의 미세구조와 기능 이상은 있을 것으로 사료된다.

변성된 생식세포에서 piknotic nuclei의 나타남을 Hans 등(1962)은 일부의 정세포가 변하여 일어나며, 이 때의 세포질은 팽대하고 약물의 영향이 심하면 나타나지 않는다고 하였다. 한편 김등(1986)은 정원세포, 정모세포 등의 염색체 손상에 의해 핵의 비정상에서 나타난다고 하였는데, 본 연구의 변성된 핵인 piknotic nuclei의 위치로 볼 때 김등

(1986)의 연구 결과와 유사하다.

본 연구의 약물에 의한 공포화 현상은 Bamhawy 등(1977)은 mepivacine phdrochloride 을 rat 에 투여했을 때 약물의 영향에 의해 이같은 현상이 일어난다고 보고한 것과 비슷하다.

본 실험의 약물투여 3, 5주군에서 multinucleated giant 세포가 나타났다. Hans 등(1962)은 rat 에 bisdichloroacetyl diamies 의 투여시 내강에서 이들의 짧은 출현을 보고하였는데, 이것은 생식세포의 억제 과정에서 공통적으로 나타난다고 하였으며, Brown 등(1960)은 비정상 유사분열에서 온 결과라고 주장했으며 Siperstein(1920)는 rats 에서 약물에 의한 제1정모세포의 용해에 의해 형성된다고 하였다. 또한 Alvizouri 와 Warren(1954)는 변성된 정세포의 응집에 의해서 이루어졌으며, Goldberg 등(1959)은 cap-phase 정세포의 이상에서 만들어 진다고 보고하였다. 그러나 본 결과는 Kaufman 등(1956)이 세포질분리의 실패로 인한 핵분리의 계속 진행에 의하여 형성된다는 보고와 유사하다고 여겨진다.

이 같은 이유는 이들 세포의 출현이 생식상피세포의 여러 곳에서 발견이 되기 때문이다.

Grass 와 Silver(1962)는 mepivacine 의 처리군에서 정자형성의 증지는 약물의 혈관수축에 영향을 주어 혈류량의 감소에 의해 일어난다고 하였으며, Etribi 등(1976)은 guinea-pig 에 ambihher 가 glyco-gen 변성에 영향을 주기 때문에 정자형성의 억제를 가져온다고 하였다.

본 연구의 결과는 chlorambucil 이 DNA 의 합성에 영향을 주어 염색체 손상에 의해 일어난다고 하는 김등(1986)의 연구결과와 유사하다고 사료된다. 그러나 약물에 의해서는 정자형성의 세포주기가 어느 단계에서 어느 정도 영향을 받았는가를 결정하기란 Leblond 와 Clermont(1952)가 보고한 것처럼 결정하기가 어렵다.

약물에 의한 정소의 위축은 Kaufman 등 (1956)은 ethione 이 rat 의 정소에서 고유층에 영향을 주어 세정관이 줄어들기 때문에 일어난다고 하였다. 본 결과는 혈류량의 감소에 의해 정소의 위축과 부정소, 전립선, 체중의 감소가 일어난다고 사료된다. 그러나 이 같은 정소의 위축에도 간질세포에서 Leydig 세포는 누적투여 기간이 길수록 과증식 현상이 일어났는데 Hans 등(1962)은 항생식세포의 영향이 클수록 이런 결과가 나타난다고 하였으며, 이때 Leydig 세포는 조밀군(dense group)을 이룬다고

하였다. 한편 Mc-cullagh(1932)는 뇌하수체의 억제 영향이 간질세포에 자극을 주어 과증식이 일어난다고 보고하였는데, 본 실험 결과도 이와 유사하다고 생각된다.

요 약

Nitrogen mustard 계통의 일종인 chlorambucil 을 mouse 의 복강에 kg 당 16mg 씩 1, 3, 5주간 누적투여하여 약물에 의한 정소내의 생식세포에 미치는 결과는 다음과 같다.

1. 체중, 정소, 부정소, 전립선의 무게는 대조군에서는 사육기간이 길수록 증가하였으나 처리군에서는 현저히 감소하였다.
2. 세정관의 직경, 생식상피 세포층은 줄어들었으며 A 정원세포, B 정원세포, 정모세포, 정세포, 정종의 수는 크게 감소하였으며, 5주에서는 정원세포가 모두 소실되었다.
3. 누적투여기간이 길수록 생식상피 세포층내에 cell debris, 공포현상, piknotic-nuclei, multinucleated giant 세포의 출현이 늘었다.
4. Leydig 세포는 과증식 현상을 나타내고 있었으나, Sertoli 세포의 수적 변화는 거의 없었다.

참 고 문 헌

1. Alvizourt M, Warren S: Effects of Di-ethionine on the pancreas and other organs. *AMA Arch Pathol* 1954; 57: 130-137.
2. Bamhawy MA, Rached RMA, Bowler K, Stacey MJ: The effect of a single injection of mepivacine hydrochloride on spermatogenesis in rat. *J Reprod Fertil* 1977; 51: 477-479.
3. Boccabella AV, Salgado ED, Alger EA: Testicular function and histology following serotonin administration. *Endocrinology* 1962; 71: 827-837.
4. Bowler K: The effect of repeated applications of heat on spermatogenesis in the rat: a histological study. *J Reprod Fertil* 1972; 28: 325-333.
5. Brooks M, Lawley S: The reaction of mono and di function alkylating agent with nucleic acid. *Biochem J* 1961; 80: 496.

6. Browning HC, Larke G: Response of male mice to norethynodrelmestranol. *Anat Rec* 1960 ; 136 : 322.
7. Calabresi P: New techniques for measure the effect of chemotherapeutic agent upon mice plastic and mice host cells. *Verlag Wien Med Akad* 1967 ; 7 : 99—111.
8. Connors TA: New platinum complex with antitumor patient. *Biochem Int* 1972 ; 5 : 415—424.
9. Elanie A, Johnson D: Morphological alteration in the developing rat due to maternal index of chlorambucil. *Teratology* 1979 ; 20 : 279—288.
10. Etribi A, Ibrahim A, El-Hagger S, Awad H, Metaw B: Effect of ambilhar(niridazole) on spermatogenesis in guinea pig. *J Reprod Fertil* 1976 ; 48 : 439—440.
11. Freund M: Comparison of the effects of the radiomimetics, busulfan and chlorambucil, on sperm production in the guinea pig. *Proc 6th Intern conger Animal Reprod Artif Insem Paris* 1968 ; 1 : 113.
12. Goldberg GM, Pfuu A, Ungar H: Testicular lesions following ingestion of D1-ethionine studied by a quantitative cytologic method. *Am J Pathol* 1959 ; 35(2) : 383—397.
13. Haddow A: New cytotoxic and radiomimetic agents. *Ann Report Brit Emp Cancer Campaign* 1952 ; 30 : 25.
14. Hans P, Drobeck, Frederisk C: Inhibition and recovery of spermatogenesis in rats, monkeys, and dogs medicated with Bis (dichloroacetyl) diamines. *Exp Mol Pathol* 1962 ; 1 : 251—274.
15. Jackson H, Craig AW: Antifertility action and metabolism of hexame-thylphosphoramide. *Nature* 1966 ; 212 : 86.
16. Jackson H, Fox BW, Craig AW: The effect of alkylating agents on male rat fertility. *Br J Pharmacol* 1959 ; 14 ; 149.
17. Kaufman N, Klavins JV, Kinney ID: Testicular damage following Ethionine administration. *Am J Pathol* 1956 ; 32(1) : 105—115.
18. 김덕훈, 박원학 : Chlorambucil의 mouse에 testis 미치는 영향. 영남대학교기초과학연구 1986 ; 6 : 173—181.
19. 김덕훈, 박원학, 정형제 : Chlorambucil이 mouse 심근미세구조에 미치는 영향. 한국전자현미경학회 1986 ; 16(1) : 47—62.
20. Leblond CP, Dlermont Y: Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 1952 ; 55 : 548—573.
21. Lerner H: Acute mioglggenous leukemia in patients receiving chlorambucil a long term theory for stage two breast cancer. *Cancer-Treat Rep* 1978 ; 62 : 113—115.
22. McClullagh R: Dual endocrine activity of the testis. *Science* 1932 ; 76 : 19.
23. Monie IW: Chlorambucil induced abnormalities of urogenital system of rat fetuses. *Anat Rec* 1961 ; 139 : 145.
24. Prior JP, Ferguson JH: Cytotoxic effects of a nitrofurans on the rat testis. *Cancer* 1950 ; 3 : 1062.
25. Siperstein DM: The effects of acute and chronic inianition upon the development and structure of the testis of the albino rat. *Anat Rec* 1920 ; 20 : 355—391.
26. Waites GMH, Setchell BP: Changes in blood flow and vascular permeability of the testis, epididymis and accessory reproductive organs of the rat administration of Cadmium chloride. *J Endocrinol* 1966 ; 34 : 329—342.