

## Chlorambucil 이 수컷 생쥐의 Sertoli 세포의 미세구조에 미치는 영향\*

체명대학교 의과대학 해부학교실

김덕훈 · 최인장 · 이인환 · 장성익

### =Abstract=

### Effect of Chlorambucil on the Ultrastructure of Sertoli Cell in Male Mouse

Douk Hoon Kim Ph D, In Jang Choi; Ihn Hwan Lee, MD; Sung Ik Chang, MD

Department of Anatomy, Keimyung University

School of Medicine, Taegu, Korea

This study was investigated the effect of chlorambucil (Leukeran) on the Sertoli cell of male mouse by electron microscope.

Chlorambucil suspended in the 0.5N sodium bicarbonate (pH 8.0) was injected into the male mouse by intraperitoneal at doses level (16mg/kg) for one week, 3 weeks, and 5 weeks, respectively.

The results were as follows;

1. One week after administration of chlorambucil, swelling and their inner cristae disruption of some mitochondria, mild vacuolation of cytoplasm, moderate dilation of smooth endoplasmic reticulum (SER) were presented. But, lipid droplet and secondary lysosome were severely increased.

2. After 3 weeks, the dilation of SER and vacuolation of some cytoplasm, the swelling and inner cristae destruction of most mitochondria were appeared. The lipid droplet and lysosome were mildly increased.

3. After 5 weeks, most mitochondria were swelling and their membrane were almost disrupted. The dilation of SER and vacuolation of most cytoplasm were almost severely increased. But lipid droplet and lysosome were not observed.

As a results, the duration of the chlorambucil administration is longer, the degeneration of the cytoplasm organelles is increased in comparison with control group. On the other hand, nucleus is not degenerated.

1984 ; Buch 등, 1988).

### 서 론

Sertoli 세포는 웅성동물 정소내의 세정관 기저막 주위에 위치하여, 분열을 하지 않고 비교적 일정한 수의 세포를 유지하는 지지세포(supporting cell)이다(Rowley 와 Heller, 1971). 또한 정자형성 과정에 있는 생식세포에 중요한 영향을 미친다(Lee,

이 같은 세포의 형태는 원주형으로 기부는 기저막 주위에서 정원세포들 사이에 있으며, 판강(lumen) 쪽으로 잘수록 원추상으로 되어 있고, 생식세포의 분열 시기 때에는 기저막에서 판강쪽으로 세포질이 크게 신장되어 있다(Elftman, 1963).

전자현미경상에서 해은 세정관 기저막에서 판강쪽으로 수직의 타원형 또는 원추형으로 해막 주위가

\*이 논문은 1988년도 체명대학교 윤종 연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌다.

매우 불규칙하게 합입되어 있고, 핵질은 동질상이며, 인에는 소포가 존재하는 것이다. 또한 mitochondria는 tubular cristae 상태로 가늘고 선장되어 있으며, Golgi 기판은 매우 짧고, lysosome, lipid 및 dense body 등은 세포질 전체에 고르게 존재하며, SER(smooth endoplasmic reticulum)은 잘 발달되어 있다(Faucett, 1975).

이 세포의 기능은 성선자극호르몬(gonadotrophic hormone)의 영향을 받아 정자형성 과정에서 정충의 완성에 영향을 주고, 정충이 관강내로 방출하는데 관여한다(Means 와 Vaitukaitis, 1972; Dym 와 Raj, 1977; Lee, 1984). 또한 정충이 방출한 후 남은 잔여체(residual body)와 여러 변성된 세포소 기관을 삭작용 한다(Lacy, 1967).

한편 이 세포는 steroid를 생산 분비하며(Lacy, 1962), 많은 lipid를 소유한다(Keer 등, 1979). 특히 SER은 androgen binding protein을 생산하여 생식세포의 분화에 관여하며(Elftman, 1963), gap junction은 blood testis barrier로서 물질의 출입을 통제한다(Setchell 와 Waites, 1970).

이와같이 Sertoli 세포는 성숙된 웅성동물의 정상적인 세정관에서 정자형성 과정에 미세환경을 제공해 주고 있다(Lee, 1984).

Sertoli 세포의 특이한 상태에 관하여 Kreger 등(1974)과 Sobhon 등(1979)은 vitamin A의 결핍된 흰쥐 정소의 세포질에 공포의 출현을, Chapin 등(1983)은 정상적인 조건에서도 생리상 세포질에 공포가 형성됨을, Hugon 와 Borgers(1966)은 X-ray를 투과한 후 생쥐의 Sertoli 세포와 정원세포 사이의 원형질막의 용해를, Kaya(1986)는 흰쥐 정소혈관의 일시적 결찰(ligation)에서 세포의 심한 괴사를 보고하였다.

chemical agent에 의한 Sertoli 세포의 변성에 관해 Uematsu(1966)는 nitrofurazone 사용에서 SER의 공포현상을, Krueger 등(1974)은 bis(dichloroacetyl) diamine의 투여군에서 세포질에 공포 출현에 관해, Steinberger(1982)는 triethylene melanin의 사용에서 생식세포와 Sertoli 세포 사이에 비정상 정충의 출현에 대하여 보고하였다. 그러나 Lee(1984)는 hexatluoroacetane 투여군에서 Sertoli 세포는 크게 손상을 받지 않음을 발표하였다.

본 연구는 chemical agent 중에서 alkylating agent의 일종인 chlorambucil(Leukeran) 즉 국내에서 종양치료제로 사용되고 있는 항암제를 생쥐의 복강에 경시적으로 누적투여하여 약물의 영향에 따

른 Sertoli 세포의 미세구조에 대하여 일련의 형태적 변화를 대조군과 비교하여 유의한 성적을 얻었기에 그 결과를 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 실험동물

제명대학교 의과대학 의용동물사육실에서 일정조건(실내온도:  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 습도:  $60 \pm 10\%$ )으로 몸무게 27g인 생후 20주 된 A/J Swiss Albino(Mus Musculus) 계통의 수컷 생쥐를 대조군 및 처리군의 1, 3, 5주 군에 각 20마리를 사용하였다.

#### 2) 약 품

영국의 Burroughs Wellcome사 제품인 chlorambucil(Leukeran)을 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 약물주입

Elanie 와 Johnson(1979)의 방법에 따라 처리군은 Chlorambucil을 0.5N NaHCO<sub>3</sub>(pH 7.4)에 부유시켜 몸무게(kg)당 16mg 씩 복강에 매일 일정 시간 주입하였으며, 대조군은 동량의 0.5N NaHCO<sub>3</sub>만 주입하였다.

#### 2) 투과전자현미경 관찰

해부현미경 하에서 적출한 정소는 즉시 0.25% glutaraldehyde 용액에 전고정 한 후 cacodylate buffer(pH 7.2)로 조성된 OsO<sub>4</sub>에 2시간 후 고정하였다. 고정된 시료는 ethanol로 탈수하고 propylene oxide를 사용하여 최종적으로 치환한 다음 Epon(Luft, 1961)으로 포대하였다.

조직절편은 LKB ultramicrotome으로 semi-thin section 하여 1% toluidine blue로 염색한 후 관찰부위를 확인한 다음, ultra-thin section 하여, uranyl acetate(Hayat, 1969)와 lead citrate(Reynold's, 1963)로 이중염색하였다. 관찰 및 촬영은 Hitach(H-600) 투과전자현미경(transmission electron microscope)으로 하였다.

## 결 과

대조군과 약물누적 투여에 따른 기간별 처리군의 성적은 다음과 같다.

전자현미경 하에서 대조군의 Sertoli 세포는 기저막을 중심으로 관강쪽으로 원추상태로 되어 있고, 세

Table 1. Electron microscopic observation of the effect of chlorambucil on the Sertoli cells in Male Mouse.

Control	Treatment			
	1W	3W	5W	
Cytoplasm Vacuolation	-	+	++	+++
Mitochondrial destruction	-	+	+++	+++
Smooth endoplasmic reticulum dilation	-	+	++	+++
Lipid droplets	+	+++	+	-
Lysosome	++	+++	+	-

Effect were graded as follow; -none, +minimal, ++moderate, +++severe.

포질은 생식세포들 사이에 분지상으로 분포하고 있어 확인이 용이하였다. 이 세포의 핵은 불규칙한 타원형으로 핵막 주위가 심하게 함입되어 있으며, 일부 세포의 인에는 소포가 형성되어 있었다. 또한 세포질에는 lamella 상태의 발달된 SER과 여러 가지 형태의 tubular cristae 모양의 mitochondria 가 가늘고 길게되어 있으며, Golgi 기관은 짧고 굽게되어 있고, lysosome, lipid droplet, residual body 가 세포질 전체에 고르게 산재해 있었다(Fig 1). 세포소기관의 손상은 거의 관찰되지 않았다(Table 1).

1주군에서 핵은 원형 또는 타원형으로 되어 있고, 핵질은 균일하며, 일부 핵막의 함입이 있는 것도 관찰되었다(Fig 2).

한편 Sertoli 세포질과 생식세포 사이에 gap junction 이 발달되어 있으며, 2차 lysosome residual body 는 다양한 크기로 세포질 전체에 고르게 분포하였고, lipid droplet 는 크고 핵에서 떨어진 부위에 많이 출현하였다. 또한 SER은 약간의 확장이 있으며, 일부 mitochondria 는 변성되어 cristae 및 membrane 이 소실된 것이 관찰되었다(Fig 2, Table 1).

3주군의 핵은 핵막이 불규칙한 타원형으로 핵질의 일부는 이형 염색질이 형성되어 있었다(Fig 3). 세포질에서는 SER이 크게 팽대되어 있고, 일부는 공포화되었으며, mitochondria 는 변성되어 크게 팽대되어 있으나, lysosome 및 lipid droplet 는 거의 관찰되지 않았다(Fig 3, Table). 한편 변성된 정종의 꼬리가 세포질에 있고, 기저막과 세포질 사이에는 collagen fiber 가 많이 형성되었다(Fig 3).

5주군에서 핵은 타원형이며, 핵질은 동질한 상태이며, 세포질에는 큰 공포가 핵에서 멀티 떨어질수록 많이 출현되었다(Fig 4). 또한 대개의 mitochondria 는 변성되었고, SER은 크게 확장되었고, 다른 세포소기관은 거의 관찰되지 않았다(Fig 4, Table

1). 한편 기저막과 세포질 사이에는 collagen fiber 가 많이 출현하였으며, 일부 기저막은 파열된 것이 관찰되었다(Fig 4).

## 고 칠

Chemical agent 의 일종인 alkylating 약물은 실험 동물에 주입하였을 때 정상적인 생식기관에도 영향을 주어 정자세포의 염색체 손상(Bateman, 1960), 정소 조직의 파괴(Jackson, 1969; 김등, 1987), 불임유발(Jackson과 Craig, 1966) 등을 나타내는 antispermatic agent로서 보고되어 왔다(Reddy와 Svoboda, 1967; Martino 등, 1987).

본 연구는 수컷 생쥐에 chlorambucil 을 경시적 누적투여하여 Sertoli 세포의 미세구조의 형태적 변화를 관찰한 것이다.

약물의 누적투여에 따른 미세구조의 변화로서 SER 이 있다(Table 1). 본 연구의 대조군에서 lamella 상태로 발달된 SER은 Lacy(1962)가 보고한 것과 같이 정상적인 정소에서 steroid 의 생산과 분비를 한 것으로 여겨진다. 그러나 누적투여의 기간이 길수록 초기의 평たい에서 5주에서 큰 확장으로 관찰되었다(Fig 4, Table). 이 같은 변성에 대하여 Sobhon 등(1979)은 vitamin A 의 결핍된 흰쥐에서, Kaya (1986)은 정소혈관의 결찰로 인한 흰쥐 실험군에서 초기의 SER 팽대와 후에 SER 확장이 커져 세포세포 괴사를 유발시키며, 이것의 영향으로 핵은 piknotic 상태로 되고 최종적 으로 foamy 형태로 되어 세포수는 줄고 반면에 lipid droplet 및 dense body 는 증가함을 보고하였다. 이 같은 원인을 저산소증과 대사의 차단 때문으로 추측하였다. 한편 Anton(1979)은 SER 의 확장을 초기 변성으로 여겼으며, 이것이 세포 전체에 영향을 줄 수 있다고 하였다.

본 연구에서 약물의 누적투여기간이 길수록 SER

의 확장이 큰 것은 약물에 의한 SER의 변성으로 여겼으며, 이는 Anton(1970)이 보고한 것과 같이 다른 세포소기간에 비해 가장 먼저 영향을 받았다고 사료된다. 이 같은 변성에서는 steroid의 생산 및 분비가 끝지 않을 것으로 유추된다.

Sertoli 세포질의 공포현상에 관하여 Uematsu(1966)는 nitrofurazone을 사용해서, Kierszenbaum(1970)은 trenimon의 투여로서, Hausler와 Hodel(1979)은 piperazine methylhydroxyindone을 실험동물에 주입하여 약물의 영향으로 SER의 확장에 따른 세포질에 공포가 형성됨을 보고하였다. Krueger 등(1974)은 bis (dichloroacetyl) diamine의 사용에서 약물이 직접 손상을 주어 일어난 결과로 주장하였다. 또한 Mason 등(1964)은 cadmium 투여에서 이 같은 공포화가 세포 괴사를 유발함을 발표하였다. 한편 Chapin(1983)은 Sertoli 세포는 정상 상태일 때에도 세포주기에 따라 공포화가 형성된다고 하였으며, Russel과 Clermont(1977)은 정상 정소에도 변성되는 생식세포가 있으면 이 같은 현상이 출현된다고 하였다. 본 연구에서 약물누적에 의한 공포화의 현상은 Uematsu(1966)와 Krueger 등(1974)이 주장한 것과 같이 약물이 직접 손상을 주어 SER의 확장에 의해 형성된 것으로 추측된다. 그러나 Mason 등(1964)이 보고한 것과 같이 공포가 세포괴사를 유발한다는 보고와는 본 연구의 해의 변성이 없는 것으로 보아 일치되지 않는다.

대조군에서 발달된 tubular cristae 형태의 mitochondria는 Toren 등(1964)이 보고한 steroid 생산에 필요한 cholesterol이 전환의 첫 단계인 side chain의 분열을 위한 것으로 여겨진다. 그러나 3,5주에서 mitochondria의 cristae와 막의 파괴, 내용물의 소실이 있었다(Fig 3, 4). 이 같은 형태적 변성은 약물에 의한 세포질내에 물질 통제가 되지 않고 또한 mitochondria DNA의 손상에 의한 것으로 보고한 김 등(1988)의 견해와 유사하다. 또한 Voglmayr(1971)은 mitochondria 막의 구조적 변성은 O<sub>2</sub> 대사에 영향을 미쳐 막과 기질 및 다른 세포소기관의 변성을 유발한다고 보고하였다.

본 연구에서 변성된 mitochondria는 비록 SER에서 생산된 cholesterol이 있을지라도 이들이 progesterone으로 전환하는데 mitochondria의 기능이 불활성되기 때문에 steroid 생산은 되지 않는다고 추측된다.

Lacy(1960, 1962)는 방사선 치료 후 lipid droplet, dense body의 증가는 정세포의 손상에 의한 Sertoli

세포의 쇠작용 결과로 여겼으며, Gillies와 Lee(1983)는 lipid의 줄어듬은 정자형성이 억제된다고 하였으나, Sertoli 세포가 변성 정세포의 쇠작용을 증가하면 lipid는 다시 축적된다고 발표하였다. 또한 Keer 등(1980)은 흰쥐에서, Mortiner와 Lincoln(1982)는 수양에서 정자형성의 퇴행시기에 lipid droplet가 많이 침착됨을 보고하였다. 본 연구에서 대조군의 lipid droplet의 침착은 steroid 생산된 결과로 여겨지나, 1주에서의 증가는 Keer 등(1980)이 보고한 것과 같이 변성된 정자형성세포로 인한 lipid의 침착 결과로 여겨진다. 그러나 3,5주에서 lipid droplet의 소실은 세포변성과정에서 일어난 현상으로 그 기능이 억제되어 형성이 중지된 것으로 여겨진다. Mortiner와 Lincoln(1982)는 퇴행시는 정자형성세포에서 lysosome의 증가와 necrotic body의 침착을 보고하였다. 본 결과의 1주군에서 출현된 lysosome의 증가는 Hugon과 Borger(1966) 및 Lacy(1962) 등이 X-ray에 의한 위축정소에서 Sertoli 세포의 쇠작용이 증가한다는 연구와 비슷한 것으로 이 것은 약물에 의한 변성된 생식세포의 쇠작용 기능을 하기 위한 것으로 유추되나, 3,5주에서 lysosome의 소실은 약물에 의한 기능중지 및 형성억제에 의한 세포괴사로 여겨진다. 대조군과 1주군에서 residual body의 증가는 정상적인 정자형성과정에서 이루어져 정자의 방출후 남은 것으로 추측되나, 3,5주에서 이들의 없음은 정자형성이 중지된 것으로 사료된다.

본 연구의 대조군에서 출현된 gap junction은 Setchell(1970)이 보고한 것과 같이 물질 출입에 관여하는 것으로 여겨진다. 약물투여 3,5주군에서 크게 발달한 것은 주위 생식세포의 소실과 Sertoli 세포의 소기판 변성으로 볼 때 물질출입의 통제하기 보다는 없어진 세포지역에 공간을 매워주는 지지작용으로 생각된다.

해온 쳐리군에서 대조군에 비해 큰 형태적 차이가 없는 것은 비록 chlorambucil이 DNA 복제를 억제시키는 것이나, 세포분열을 하지 않는 지지세포이기 때문에 약물의 영향을 적게 받은 것으로 추측되나 DNA의 구조적 손상은 있을 것으로 생각된다.

이상과 같이 외부 요인에 의한 Sertoli 세포의 영향에 관해 Kaya(1986)은 정소동맥의 결찰에서 Sertoli 세포가 가장 먼저 영향을 받아 이것이 세정관의 다른 생식세포에 변성을 유발한다고 하였다. 그러나 Oettle와 Harrison(1952) 및 Steinberger와 Tjioe(1969)는 Sertoli 세포는 약물이나 다른 억제영향에 가장 오래 견디며, 다른 생식세포가 거의 변성된 뒤

에도 그냥 남은 것으로 보고 하였고, Lee(1984)는 hexafluoroacetane 투여군에서 Sertoli 세포는 크게 손상을 받지 않고 남은 것은 성선자극호르몬의 작용이 아직 남아있기 때문이라 발표하였다. 본 연구에서는 chlorambucil 의 영향으로 Sertoli 세포는 다른 생식세포보다 영향은 적게 받으나 약물누적투여 기간이 길수록 세포질에는 많은 영향을 받으나 핵에는 큰 영향을 받지 않은 것으로 나타났다.

## 요 약

Chlorambucil 을 수컷 생쥐의 Sertoli 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 몸무게(kg)당 16mg 씩 1, 3, 5주간 복강에 주입한 후 미세구조를 관찰한 결과 다음과 같은 성과를 얻었다.

1. 약물투여 1주에서는 일부 mitochondria 의 팽대와 SER 의 확장, gap junction 의 발달, 2차 lysosome 및 lipid droplet 의 증가가 있었다.

2. 3주에서 대개의 mitochondria 는 cristae 와 막의 파괴, SER 의 심한 확장, 세포질내의 공포형성이 있으나, lysosome, lipid droplet 및 residual body 는 감소되었다.

3. 5주에서 거의 모든 mitochondria 는 변성되었으며, SER 은 크게 확장되어 세포질에 큰 공포를 형성하였고, 다른 세포소기관은 거의 관찰되지 않았다.

이상과 같이 chlorambucil 의 누적투여 기간이 길수록 세포질내의 소기관은 변성이 크고 공포의 출현이 증가하나 핵의 변성은 거의 볼 수 없었다.

## References

1. Anton E: Early ultrastructural changes in the rat testis after efferentes ligation. *Fertil steril* 1979; 31: 187-194.
2. Bateman AJ: The induction of dominant lethal of mutations in rat with triethylene melamine (TEM) *Genet Res* 1960; 1: 381.
3. Buch JP, Lamb DJ, Lipshultz LI, Smith RG: Practical characterization of a unique growth factor secreted by human Sertoli cells. *Fertil steril* 1988; 49: 658-665.
4. Chapin RE, Morgan KT, Bus JS: The morphogenesis of testicular degeneration induced rats by orally administration 2,5-hexanedione. *Exp Mol Pathol.* 1983; 38: 149-169.
5. Dym M, Raj HGM: Response of adult rat Sertoli cells and Leydig cells to depletion of Lutenizing hormone and Testosterone. *Biol Reprod* 1977; 17: 676-696.
6. Elanis A, Johnson D: Morphological alternation in the developing rat due to maternal index of chlorambucil. *Tertiology* 1979; 20: 279-288.
7. Elftman H: Sertoli cells and testis structure. *Am J Anat* 1963; 113: 25-32.
8. Fawcett DW: Ultrastructure and function of the Sertoli cell. *Endocrinology* 1975; 7: 21-25.
9. Gillies PJ, Lee KP: Effects of hexafluoroacetate on testicular morphology and lipid metabolism in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983; 68: 188-197.
10. Hausler PM, Holdel C: Ultrastructural alternations induced by two different antispermatozoic agents in the seminiferous epithelium of rat testes. *Arch Toxicol* 1979; 2: 387-392.
11. Hayat MA: Uranyl acetate as a stain and a fixative for heart tissue. Proc. 27th Ann Meet. *Electron Microsc Soc Am* p 413.
12. Hugon J, Borgers M: Ultrastructural and cytochemical changes in spermatogonia and Sertoli cells of whole body irradiated mice. *Anat Rec* 1966; 155: 15-32.
13. Jackson H: Chemical interference with spermatogenesis and fertility, in *Advances in Reproductive Physiology*, Academic Press, New York, 1969; 4: 65.
14. Jackson H, Craig AW: Antifertility action and metabolism of hexame-thylphosphoramide. *Nature* 1966; 212: 86.
15. Kaya M: Sertoli cells and various types of multinucleated in the rat seminiferous tubules following temporary ligation of the testicular artery. *J Anat* 1986; 144: 15-29.
16. Keer JB, Rich KS, Dekretser DM: Effects of experimental cryptorchidism on the ultrastructure and function of the Sertoli cell and peritubular tissue of the rat testis, *Biology of Reproductive* 1979; 21: 823-838.

17. Kierszenbaum AL: Effect of trenimon on the ultrastructure of Sertoli cells in the mouse. *Virchows Arch* 1970; 5: 1-12.
18. Kim DH, Kim GS, Choi IJ, Lee IH, Chang SI: Effect of chlorambucil on the reproductive cells of male mouse. *The Keimyung Univ Med J* 1987; 6: 379-385.
19. Kim DH, Park WH: Effect of chlorambucil on the ultrastructure of Leydig cell in male mouse. *KJ of Electron Microscopy* 1988: in Press.
20. Krueger PM, Hodgen GD, Sherins R: New evidence for the role of the Sertoli cell and spermatogonia in feedback control of FSH secretion in male rats. *Endocrinology*. 1974; 95: 955-962.
21. Lacy D: Light and its use in the study of factors influencing spermatogenesis in the rat. *J Roy Microscop Soc* 1960; 79: 209-225.
22. Lacy D: Certain aspects structure and function. *Brit Med Bull* 1962; 18: 202-208.
23. Lacy D: The seminiferous tubule in mammals. *Endeavour* 1967; 26: 101-109.
24. Lee, KP, Gillies PJ. Ultrastructural alterations in hexafluoroacetone induced testicular atrophy in the rat. *Exp Molecular Path* 1984; 40: 29-37.
25. Luft JH: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys* 1961; 9: 409-414.
26. Martino CD, Malorni W, Amantini MC, Barcellona PS, Frontail N: Effects of respiratory treatment n-hexane on rat testis morphology. *Exp mol Pathol* 1987; 46: 199-216.
27. Mason KE, Brown JA, Young JO, Nesbit RR: Cadmium induced injury of the rat testis. *Anat Rec* 1964; 149: 135-148.
28. Means AR, Vaitukaitis J: Peptide hormone receptor specific binding of  $^3\text{H}$  FSH to testis. *Endocrinology* 1972; 90: 39-46.
29. Mortimer D, Lincoln GA: Ultrastructural study of regressed and reactivated testis from rams. *J Report Fertil* 1982; 64: 437-442.
30. Oettle AG, Harrison RG: The histological changes produced in the rat testis by temporary and permanent occlusion of the testicular artery. *J Pathol Bacter* 1952; 64: 273-297.
31. Reddy KJ, Svoboda DJ: Alterations in rat testis due to an antispermatic agent. *Arch Pathol* 1967; 84: 376-392.
32. Reynolds ES: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; 17: 208-213.
33. Rowley MJ, Haller CG: Quantitation of the cells of the seminiferous epithelium of the human testis employing the Sertoli cell as a constant. *Z Zellforsch* 1971; 115: 461-472.
34. Russell LD, Clermont Y: Degeneration of germ cells in normal hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat Rec* 1977; 187: 347-366.
35. Setchell BP, Waites GMH: Changes in the blood testis barriers after injection of cadmium chloride in the rat. *J Endocrinol* 1970; 47: 81.
36. Sobhon P, Mitrandon V, Toskhawong P, Chindadungrat M: Cytological changes in the testis of vitamin A deficient rats. Ultrastructural study of the seminiferous tubules. *Acta Anatomica* 1979; 103: 169-183.
37. Steinberger E: A Quantitative study of the effect of an alkylating agent(triethylenemelamine) on the seminiferous epithelium of rats. *J Reprod Fertil* 1982; 3: 250-259.
38. Steinberger E, Tjioe DY: Spermatogenesis in rat testes after experimental ischaemia. *Fertil and steril* 1969; 20: 839-649.
39. Toren, D, Menon KMJ, Forchielli E, Dorfman RI: In vitro enzymatic cleavage of the cholesterol side chain in rat testis preparations. *Steroids* 1964; 3: 381-390.
40. Uematsu K: Testicular changes of rats induced by nitrofurazone. A light and electron microscopic study. *Med J Osaka Univ* 1966; 16: 287-320.
41. Voglmayr JK, Setchell BP, White IG: The effects of heat on the metabolism and ultrastructure of ram testicular spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1971; 24: 71-80.

### Legends for figures

- Fig 1. The Sertoli cell from control male mouse. The nucleus(N) is infolding in the surface. The endoplasmic reticulum(ER), lysosome(L), lipid droplet(LD) and mitochondria(M) are well developed.  $\times 8,000$ .
- Fig 2. The Sertoli cell on the one week of chlorambucil administration. Note a striking increase in the moderate dilation of endoplasmic reticulum(ER), lysosome(L), degenerating mitochondria (DM) and lipid droplet(LD). The nucleus(N) is normal shape. The gap junction(double arrow), collagen fiber(CF) and residual body (RB) are well developed.  $\times 10,000$ .
- Fig 3. The Sertoli cell on the 3 weeks of chlorambucil administration. Note a striking increase in cytoplasmic vaculation(CV), smooth endoplasmic reticulum dilation(arrow), collagen fiber (CF), heterochromatin(HE) and degenerating mitochondria(DM). The nucleus(N) is normal, but the lysosome is not observed.  $\times 12,000$ .
- Fig 4. The Sertoli cell on the 5 weeks of chlorambucil administration. Note marked cytoplasmic vacoulation(aster), SER dilation(arrow), degenerating mitochondria(DM) and collagen fiber (CF) of the Sertoli cell cytoplasm. The nucleus(N) is normal. Some basement membrane (arrow head) are broken.  $\times 6,000$ .



