

Cyclophosphamide가 생쥐 정소의 Leydig Cell에 미치는 영향

정 해 만·김 정 상*·조 광 필**

Effects of Cyclophosphamide on the Leydig Cells of the Mouse Testis

Jung, Hae Man, Jeong Sang Kim* and Kwang Phil Cho**

(Received April 21, 1995)

ABSTRACT

This research was undertaken to determine the effect of cyclophosphamide(CP) on the Leydig cells and macrophages in the interstitial tissue of the mice(ICR strain). To evaluate how this drug could affect the these cells, during administration(200mg/kg) 1 time to 3 times at intervals of 48hrs.

In the Leydig cells of the control and 1 time treated group, a number of microperoxisomes were observed interspersed among the network of smooth endoplasmic reticulum(SER) in cellular regions where the SER predominates. Microperoxisomes were also founded in close proximity to the cell membrane. The interstitial tissue were exhibited degenerating Leydig cells but macrophages were contained greatly increased numbers of cytoplasmic inclusion body and secondary lysosomes. In the 1 time treated group. A very small number of Leydig cells were observed, from 2 to 3 time group, but macrophages were more increased than 1 time group in number. CP thus offers a valuable opportunity to study further the interaction between Leydig cells and macrophages in the interstitial tissue. These alteration could be direct mediated by toxic effect of the drug on the interstitial tissue.

서 론

Cyclophosphamide는 항암제와 면역억제제로서 널리 사용되지만 암치료를 위하여 1회 고용량 투여하거나 면역억제제로 장기 저용량을 투여하였을 경우 수정능력에 영향을 미치며(Fukutani *et al.*, 1981; Watson *et al.*, 1985), 골수, 피부, 위장관과 같이 세포분열이 활

발하거나 재생세포 집단을 갖는 기관과 전 생식선에 걸쳐 독성을 야기하므로 종양이나 신장질환의 젊은 환자에게 투여하였을 경우 생식과정에 문제가 유발된다(Thachil *et al.*, 1981). Cyclophosphamide는 동물의 정소조직과 세균의 돌연변이 유발원이 되며(Hales, 1982), 임신가능성이 있는 남·녀에 투여하면 기형발생의 원인이 되는데(Hales, 1981) 이는 DNA에 손상을 주기 때문이다(Trasler *et al.*, 1986).

조선대학교 치과대학 동물학교실, *동신대학교 한의학과, **목포전문대학 물리치료과

Dept. of Zoology, College of Dentistry, Chosun University

*Dept. of Oriental Medicine, Dongshin University **Dept. of Physical Therapy, Mokpo Junior College

※ 이 논문은 1993년도 조선대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

생쥐에 cyclophosphamide를 고용량(50~100mg/kg)투여하였을 때 정소의 무게가 감소하며(Pacchieroti *et al.*, 1983), 일시적인 정자 결핍(Lu and Meistrich, 1979)과 정소에서 DNA 및 RNA 합성의 저해와 단백질 합성이 감소된다(Lee and Dixon, 1972). Kerr와 Sharpe(1985)에 의하면 수정억제제인 EDS(Ethylene Dimethane Sulfonate)는 고환의 간질조직에 존재하면서 음성호르몬인 testosterone을 주로 생성하는 Leydig 세포와 정세관에 존재하는 Sertoli 세포의 기능에 영향을 미친다고 하였다. 한편, 고환의 간질조직에 존재하는 대식세포는 Leydig 세포집단 가까이나 세포집단 사이에서 관찰되는데, 흰쥐에 EDS를 고용량 투여하였을 때 Leydig 세포와 대식세포의 미세구조에 영향을 주고 투여량이 증가함에 따라 대체로 대식세포수가 증가하였다(Kerr *et al.*, 1985). 반면 DES의 투여량이 증가할 수록 Leydig 세포의 퇴화현상이 뚜렷하였으며, 간질조직내에서 대식세포의 식세포 작용은 증가하고 Leydig 세포의 집단은 점차 감소함(Kesrr *et al.*, 1985; Molenaar *et al.*, 1985)에 따라 testosterone의 생산도 점차 감소하였다(Molenaar *et al.*, 1985). 그러나 cyclophosphamide의 투여에 따른 정소 간질조직의 미세구조 변화에 대한 연구가 미비하여 본 연구에서는 이들의 반복 투여가 Leydig 세포와 대식세포의 미세구조에 미치는 영향과 이들 세포의 상호관계를 비교 관찰하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

체중이 약 30g 정도인 생쥐(ICR strain)의 건강한 수컷을 사용하였다. 실험동물은 대조군과 cyclophosphamide를 투여한 투여군으로 나누었으며, 각 실험군 마다 10마리씩 사용하였다. 투여 약품은 cyclophosphamide(상품명: cyclophosphamide monohydrate, 和光純藥 Co., 日製)를 사용하여 실험기간 중 사료(제일사료)와 식수를 충분히 공급하였다.

2. 실험방법

1) Cyclophosphamide 투여

Cyclophosphamide를 주사용 증류수(200mg/ml)에 희석한 후 체중 1kg당 200mg을 복강내 투여(1회 투여

군)한 후 48시간 간격으로 2회 투여(2회 투여군)와 3회 투여(3회 투여군)하여 7일째에 모두 도살하였다.

2) 전자현미경 관찰

대조군과 실험군은 ethyl ether로 마취하여 흉곽을 열어 심장을 노출시키고 14gauge 주사바늘로 좌심실을 통하여 먼저 Heparin(2 I.U./ml)를 첨가한 생리식염수로 혈관을 세정한 후 우심방을 절개하여 유출케하고 2.5% glutaraldehyde를 관류시켜 관류고정하여, 음낭을 절개한 후 정소를 적출하였다. 정소를 1mm³로 세절한 후 0.1M cacodylate 완충액(pH 7.4)으로 만든 2.5% glutaraldehyde 고정액에서 5시간 전고정하고, 동일한 완충액으로 15분씩 3회 세척한 다음, 동일한 완충액으로 만든 1% osmium tetroxide(O₃O₄) 용액으로 2시간 동안 후고정하였다. 고정된 조직은 동일한 완충액으로 15분씩 3회 세척한 다음 알콜 상승 농도 순으로 무수 알콜까지 탈수하여 propylene oxide로 치환한 후, Epon포매제로 포매하였다. 포매된 조직을 35°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 24시간 동안 중합시킨 다음 초박절편기(ultramicrotome LKB-V형)를 사용하여 1 μ m두께로 절편제작 후 1% toluidineblue로 염색하여 광학현미경으로 관찰 대상부위를 확인하였다. 확인한 부위를 60nm의 초박절편으로 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEM 100CX-II 투과형 전자현미경(80KV)으로 관찰하였다.

결 과

정상군 정소의 간질조직은 Leydig 세포, 대식세포, 림프구, 모세혈관의 평활근과 내피세포 등 다양한 세포로 구성되어 있다. Leydig 세포는 정세관 간질조직의 대부분을 차지하는 세포로 음성호르몬인 testosterone을 분비한다. 세포소기관은 Golgi 복합체, 조면소포체, 활면소포체, 전자밀도가 높은 소포, 그리고 활면소포체에 둘러싸여있는 mitochondria와 microperoxisomes이 존재한다(Fig. 1).

Cyclophosphamide를 1회 투여한 Leydig 세포는 정상군에 비하여 핵의 핵막이 불규칙할 뿐만 아니라 이질 염색질이 증가하였다. 세포질에는 lysosomes과 전자밀도가 높은 소포들이 다수 존재하였다. 미토콘드리아는 정상군과 같이 다수 존재하지만 cristae가 뚜렷하지 않으며 내강이 팽대되었다(Fig. 2). 2회 투여군의 Leydig

세포는 핵의 핵막이 1회 투여군보다 불규칙하게 관찰되었으며, 미토콘드리아가 다수 존재하지만 일부는 cristae가 파괴되거나 내강이 팽대되어 나타났다. 세포질에 다수 존재하는 전자 밀도가 높은 소포들은 1회 투여군에 비하여 전자밀도가 낮게 나타났으며, 활면소포체의 내강은 대체로 팽창되었다(Figs. 3, 4). 3회 투여군에서는 핵은 등골게 관찰 되었으나 핵질의 전자밀도가 다소 낮게 나타나며 세포막 주변부에서 크고 작은 소포들이 다수 관찰되었으며, 다수의 미토콘드리아는 cristae가 파괴되거나 내강이 팽창된 모양을 보여주었다. 활면소포체는 또한 내강이 다소 팽창되었으며 그 이외의 세포소기관은 거의 관찰되지 않아 전반적으로 Leydig 세포가 퇴화되어 갔다(Fig. 5).

대식세포는 간질세포의 20%까지 차지한다(Miller, 1982). 이들 세포의 특징은 막으로 둘러싸인 과립을 다수 포함하고 있으며, 이들 과립은 전자밀도가 낮은 것과 높은 것이 나타났다(Fig. 6). 1회 투여군에서는 미토콘드리아와 1차 lysosomes이 다수 존재하였으며, 조면소포체와 활면소포체가 대조군에 비하여 현저하게 발달하였다(Fig. 6). 2회 투여군에서는 macrophage의 수가 정상군과 1회 투여군에 비하여 대체로 증가하였으며, 세포질에서는 커다란 2차 lysosomes이 다수 관찰되기 시작하였다. 미토콘드리아의 수는 다소 증가하였으며 조면소포체 또한 대체로 발달되어 나타났다(Fig. 7). 3회 투여군에서는 2차 lysosomes의 수가 2회 투여군 보다 증가하였으며, 조면소포체나 미토콘드리아는 2회 투여군과 유사한 소견을 보여 주었다(Fig. 8).

고 찰

Alkylating agent인 cyclophosphamide는 DNA 염기의 guanine 7 nitrogen원자에 결합하여 alkyl화 반응을 일으킴으로써 세포의 분열과 성장 및 대사기능을 억제하기 때문에 종양세포의 치료제로 사용되지만(Velez *et al.*, 1989; Genka *et al.*, 1990), 정상세포에서도 독성을 일으킨다(Ylöstalo *et al.*, 1973).

Leydig 세포는 정소의 간질조직을 구성하는 여러 세포 중에서 가장 많이 존재하는 세포이며 Leydig 세포의 세포소기관 중 활면소포체는 steroid 호르몬의 생산에 관여한다(Murota *et al.*, 1965)는 것은 이미 생화학적으로 잘 알려져 있는 사실이다. Nussdorfer 들(1980)

과 Fouquet 들(1984)은 활면소포체의 형태제측과 testosterone생산과의 유연관계에 대하여 보고하였다. 그 밖에도 Leydig 세포는 androgen의 생산과 분비의 중요한 역할 때문에 가장 널리 연구되어왔다. Leydig 세포에서는 합성된 cholesterol의 각 분자들이 testosterone으로 전환되고 약간의 cholesterol만 저장하므로 극소수 세포의 미세구조상 lipid droplet를 가지고 있다고 하였다. 본 연구의 정상군에서도 지방적은 거의 관찰되지 않았다. Cholesterol은 결사슬을 절단하므로써 testosterone으로의 전환이 시작되며 pregnenolone을 생산한다. 또한 30종류 이상의 지질성 효소가 Leydig 세포의 활면소포체에서 합성된다(Mori and Christensen, 1980). 흰쥐 정소 간질조직의 Leydig 세포가 생후 분화하는 동안 미세구조의 변화에 대한 연구에서 Russo 들(1970)은 초기에는 빈약한 활면소포체가 발달하나 후에는 glycogen입자, lipid droplet의 수적 증가 및 활면소포체와 일부 세초질에 membrane whorl이 나타난다고 보고하였다. 본 연구에서도 Russo의 소견과 대체로 일치하였으나 glycogen입자는 관찰되지 않았다. Microperoxisomes은 신생 Leydig 세포의 세포질에서 특징적으로 관찰되는 세포소기관중의 하나이다. 이들은 활면소포체의 망과 혼합하여 나타나는데 steroid호르몬의 생사에 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 조면소포체는 세포질의 한쪽 부위에서 한정되어 나타나는 경향이 있다(Prince, 1990). 본 연구에서도 정상군과 1회투여군에서는 다수의 microperoxisome들이 관찰되었지만 2회와 3회 투여군에서는 거의 관찰되지 않았다.

흰쥐에서 대식세포는 Leydig 세포 집락에 인접하여 흔히 관찰된다. Miller 들(1983)에 의하면 대식세포는 간질세포의 20%에 이르며, 이들 세포의 가장 뚜렷한 특징으로 과립을 함유하고 있는 소포들이 다수 존재한다. 이들 과립중 일부는 전자밀도가 낮으면서 균일한 밀도를 가지고 있고, 다른 일부는 대체로 전자밀도가 높은 과립을 함유하고 있었다. 또한 대식세포의 세포질에서는 잘 발달된 조면소포체와 다수의 소포들이 나타난다고 하였는데 본 연구의 1회투여군에서도 비슷한 결과를 보여 주었다(Fig. 6).

Cho 들(1992)에 의하면 cyclophosphamide의 누적 투여 횟수가 증가할 수록 흰쥐의 부정소 상피세포에서는 핵의 핵막이 불규칙하고 핵질에서는 이질염색질이 점차 증가하여 핵의 기능에 이상을 초래한다고 하였는데 본 연

구에서도 투여 회수가 증가함에 따라 핵의 핵막은 보다 불규칙하고 이질염색질 또한 증가하였다. Cyclophosphamide의 투여는 정소상피세포의 투과성의 변화에 의한 삼투압의 변화에 따라 미토콘드리아의 내강으로 물이 유입되므로써 내막과 외막이 분리되어 호흡능력이 정상세포보다 떨어지게 되는데(Pedersen *et al.*, 1970), 본 연구에서도 1회 투여군에서부터 3회 투여군까지 미토콘드리아의 cristae 파괴와 내강의 팽대가 점차 뚜렷하게 나타났다.

또한 cyclophosphamide의 누적투여 결과 흰쥐 부정소의 상피세포에서 lysosome의 크기와 수가 증가(Trasler *et al.*, 1988; Cho *et al.*, 1992)하였는데, 본 연구에서는 1회 투여군의 macrophage에서는 1차 lysosomes이 다수 나타나지만 투여 회수가 증가함에 딸 2차 lysosome의 수가 크기가 점차 증가하여 나타났다.

EDS 처리후 Leydig 세포의 파괴는 새로운 Leydig 세포의 증식과 분화를 유도한다. 간질조직내에 성숙한 Leydig 세포의 존재는 negative feedback mechanism에 의하여 Leydig 세포 전구체의 증가 속도를 조절하는데, 세포의 증식과 분화는 황체형성 호르몬에 의존한다(Molenaar *et al.*, 1986; Edwards *et al.*, 1988, Keeney *et al.*, 1988). 혈청 androgen은 처리 1주 후에 급격히 감소하다가 점차 증가하여 7주후에 정상적인 농도로 증가하였으며, 임성은 2주후부터 복원되었다. 그러나 세포의 수를 조절하는 인자는 알려지지 않다.

본 연구에서 사용한 항암제인 cyclophosphamide도 간질조직에 존재하는 Leydig 세포의 파괴를 가져오며 1회와 2회 투여군에서는 대식세포의 수적 증가현상이 나타났으며 3회 투여군에서 대식세포의 수적증가와 Leydig 세포의 감소현상이 현저하였다. 따라서 Leydig 세포와 대식세포의 변화 양상을 세포내 독성에 대한 기전으로 보이며, 결과적으로 cyclophosphamide는 정소 간질조직 기능의 변화는 물론 DNA 손상에 영향을 미쳤을 것으로 사료되어 이에 대한 기작은 더욱 더 연구되어야 한다고 본다.

결 론

Cyclophosphamide(CP) 투여(200mg/kg)가 생쥐 정소의 간질조직 속에 존재하는 Leydig 세포와 대식세

포에 미치는 영향을 밝히기 위하여 48시간 간격으로 1회에서 3회까지 누적 투여하였다.

정상군과 1회 투여군에서는 많은 microperoxisome들이 활면소포체가 발달되어 있는 세포질 부분의 활면소포체망 사이와 세포막 근처에서 관찰되었다. 1회 투여군의 간질조직에서 Leydig 세포는 대체로 퇴화되어 갔으나 대식세포에서는 세포내 함유물과 2차 lysosome의 수가 증가하였다. 2회와 3회 투여군에서는 소수의 Leydig 세포와 1회 투여군 보다 그 수가 증가된 대식세포가 관찰되었다.

이러한 변화는 Leydig 세포와 대식세포에 대한 cyclophosphamide의 직접적인 세포 독성에 의한 것으로 보인다. 앞으로 이들 세포사이의 상호작용에 대해서는 더 연구할 필요가 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

- Cho, K.P., J.S. Kim and H.M. Jung, 1992. Effects of Cyclophosphamide in the epididymis of the rat. II. corpus. Korean J. Electron Microscopy 22(2):127-140.
- Edwards, G., W.R. Robertson and I.D. Morris, 1988. Characterization of the regenerated Leydig cell population of the rat after destruction by ethylene-1, 2-dimethane sulphonate. J. Endocrinol. 117:11-18.
- Fouquet, J.P., N. Meusy-Dessolle, and D.C. Dang, 1984. Relationships between Leydig cell morphometry and plasma testosterone during postnatal development of the monkey, *Macaca fascicularis*. Reprod. Nutr. Develop. 24:281-296.
- Fukutani, K., H. Ishida, M. Shinohara, S. Minowada, T. Nijima, K. Hijikata and Y. Izawa, 1981. Suppression of spermatogenesis in patients with Behcet's Disease treated with cyclophosphamide and clochicine. Fertil. Steril. 36:76-80.
- Genka, S., J. Deutsch, P.L. Stahle, U.H. Shetty, V. John, C. Robinson, S.I. Rapoport and N.H. Greig, 1990. Brain and plasma pharmacokinetics and anticancer activities of cyclophosphamide and phosphoramidate mustard in the rat. Cancer, Chemother. Pharmacol. 27(1):1-7.

- Hales, B.F., 1981. Modification of the teratogenicity and mutagenicity of cyclophosphamide with thiol compounds. *Teratology* 23:373-381.
- Hales, B.F., 1982. Comparison of the mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphamide and its active metabolites, 4-hydroxycyclophosphamide, phosphoramidate mustard, and acrolein. *Cancer Res.* 42:3016-3021.
- Hiroshi Mori and A.K. Christensen, 1980. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J. Cell Biology.* 84:340-354.
- Keeney, D.S., Mendis-handagama SMLC, B.R. Zirkin and L.L. Ewing, 1988. Effect of long term deprivation of luteinizing hormone on Leydig cell volume, Leydig cell number, and steroidogenic capacity of the rat testis. *Endocrinology* 123:2906-2915.
- Kerr, J.B., K. Donachie and F.F.G. Rommerts, 1995. Selective destruction and regeneration of rat Leydig cells in vivo. A new method for the study of seminiferous tubular-interstitial tissue interaction. *Cell Tissue Res.* 242:145-156.
- Kerr, J.B. and R.M. Sharpe, 1985. Stimulatory effect of follicle-stimulating hormone on rat Leydig cells. A morphometric and ultrastructural study. *Cell Tissue Res.* 239:405-415.
- Lee, I.P. and R.L. Dixon, 1972. Antineoplastic drug effects on spermatogenesis studied by velocity sedimentation cell separation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 23:20-41.
- Lu, C.C. and M.L. Meistrich, 1979. Cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. *Cancer Res.* 39:3575-3582.
- Miller, S.C., 1982. Localization of plutonium-241 in the testis. An interspecies comparison using light and electron microscope autoradiography. *Int. J. Radiat. Biol.* 41:633-643.
- Miller, S.C., B.M. Bowman and H.G. Rowland, 1983. Structure, cytochemistry, endocytic activity, and immunoglobulin(Fe) receptors of rat testicular interstitial tissue macrophages. *Am. J. Anat.* 168:1-13.
- Molenaar, R., D.G. de Rooij, F.F.G. Rommerts, and H.J. van der Molen, 1986. Repopulation of Leydig cells in mature rats after selective destruction of the existent Leydig cells in mature rats after selective destruction of the existent Leydig cells with ethylene dimethane sulphonate is dependent on luteinizing hormone. *Endocrinology* 118:2546-2554.
- Molenaar, R., D.G. de Rooij, F.F.G. Rommerts, P.J. Reuvers and H.J. van der Molen, 1985. Specific destruction of Leydig cells in mature rats after in vivo administration of ethane dimethyl sulfonate. *Biol. Reprod.* 33:1213-1222.
- Murota, S., M. Shikita and B. Tamaoki, 1965. Intracellular distribution of the enzymes related to androgen formation in mouse testes. *Steroids*, 5:409-413.
- Nussdorfer, G.G., C. Robba, G. Mazzocchi and P. Rebuffat, 1980. Effects of human chorionic gonadotropins on the interstitial cells of the rat testis: A morphometric and radioimmunological study. *Int. J. Androl.* 3:319-332.
- Pacchieroti, F., D. Bellicampi and D. Civitareale, 1983. Cytogenetic observations in mouse secondary spermatocytes on numerical and structural aberrations induced by cyclophosphamide in various stages of spermatogenesis. *Mutat. Res.* 119:177-183.
- Pedersen, P.L., J.W. Greenawalt, T.L. Chan and H. Morris, P., 1970. A comparison of some ultrastructural and biochemical properties of mitochondria from Morris hepatomas 9618A, 7800 and 3924A. *Cancer Res.* 30:2620.
- Prince, F.P., 1990. Ultrastructural evidence of mature Leydig cells and Leydig cell regression in the neonatal human testis. *Anat. record.* 228:405-417.
- Russo, J., C. Juan and D.C. Rosas. 1970. Differentiation of the Leydig cell of the mouse testis during the fetal period: An ultrastructural study. *Am. J. Anat.* 130:461-480.
- Thachil, J.V., M.A.S. Jewett and W.D., Rider, 1981. The effects of cancer and cancer therapy on male fertility. *J. Urol.* 126:141-145.
- Trasler, J.M., B.F. Hales and B. Robaire, 1986. Chronic low dose cyclophosphamide treatments

- of adult male rats: Effect on fertility, pregnancy outcome and progeny. *Biol. Reprod.* 34: 275-283.
- Trasler, J.M., L. Hermo and B. Robaire. 1988. Morphological changes in the testis and epididymis of rats treated with cyclophosphamide: A quantitative approach. *Biol. Reprod.* 38:123-141.
- Velez de la Calle J.F., F. de Queiroz, D.H. Garnier, H. Kercret, R. Folliot and B. Jegou, 1989. Reproductive Effects of the anticancer drug cyclophosphamide in male rats at different ages. *Arch. Androl.* 22(3):251-263.
- Watson, A.R., C.P. Rance, and J. Bain, 1985. Long term effects of cyclophosphamide on testicular function. *Br. Med. J.* 291:1457-1460.
- Ylöstalo, P., A. Kauppila, P. Jouppila, K. Kivinty and A. Vehashari. 1973. Hepatic and adrenocortical function during cyclophosphamide therapy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 52:299-302.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Leydig cell in the interstitium of a control rat. The Leydig cell of control rat showing typical mitochondria(M) with tubular cristae, and rough and abundant smooth endoplasmic reticulum. The whirl-like endoplasmic reticulum(wER), microperoxisomes(arrow) and a number of electron dense vesicles(DV) are observed. N, nucleus. Bar indicate 2 μ m.
- Fig. 2.** Electron micrograph of Leydig cell 1 time treated with cyclophosphamide. A number of electron dense vesicles(DV) and mitochondria(M) are observed. The cristae of mitochondria are scarcely observed. The nuclioplasm is abnormal. N, nucleus. Bar indicate 2 μ m.
- Figs. 3-4.** Electron micrographs of Leydig cell 2 times treated with cyclophosphamide. Electron micrographs are showing electron lucent vesicles(LV) and prominent smooth endoplasmic reticulum(sER) in the peripheral cytoplasm of the nucleus(N) (Fig. 3). The magnified smooth endoplasmic reticulum(sER) and electron lucent vesicles(LV) (Fig. 4). Bar indicate 1 μ m.
- Fig. 5.** Electron micrograph of Leydig cell 3 times treated with cyclophosphamide. Degenerating Leydig cell showing a number of electron lucent vesicles(LV) and dilated mitochondria(M). Bar indicate 2 μ m.
- Fig. 6.** Macrophages of the interstitium 1 time treated with cyclophosphamide. The macrophage showing a number of mitochondria(M) with tubular cristae and smooth endoplasmic reticulum(sER). N, nucleus. LY, lysosome. Bar indicate 2 μ m.
- Fig. 7.** Electron micrograph of macrophage 2 times treated with cyclophosphamide. Secondary lysosomes(Ly) are observed. N, nucleus. Bar indicate 2 μ m.
- Fig. 8.** Electron micrographs of macrophage 3 times treated with cyclophosphamide. A number of secondary lysosomes are observed. N, nucleus. Bar indicate 2 μ m.





