

고장성 식염수 주사에 의한 흰쥐 정소의 해부학적 변화

곽병국¹ · 이철상² · 이성호^{1,†}

¹상명대학교 그린생명과학과, ²군산대학교 생물학과

Histological Changes in Rat Testis by Injection of Hypertonic Saline

Byung Kuk Kwak¹, Chul-Sang Lee² and Sung-Ho Lee^{1,†}

¹Dept. of Green Life Science, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

²Dept. of Biology, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Korea

ABSTRACT : Recent evidence has revealed that the intratesticular injection of hypertonic saline(20%) resulted in a chemically castrated state such as nadir testosterone levels in rats. To confirm the efficacy of this simple saline-injection method further, we investigated the changes in the gross and microscopic anatomy of testis. Our study comprised three groups; intact(control) group, orchidectomy group and saline-injection (experimental) group. Single dose of hypertonic saline (sterilized, 750 μ l/testis) were directly administered into both testis of adult rats (about 300 g BW). Bilateral orchidectomy was performed at the same day of saline injection. Following 30 days post-injection, reproductive tissues were surgically removed, weighed and fixed for histological examination. The body weights were not changed in both orchidectomy group and saline-injection group when compared to those in intact group. The wet weights of testis were significantly decreased in saline-injection group when compared to those in intact group. The wet weights of epididymis and seminal vesicle and prostate were significantly decreased in orchidectomy group and saline-injection group when compared to those in intact group. Macroscopically, the testes exerted slight atrophy and the tunica albuginea seemed to be intact in saline injection group. Histologically, however, larger parts of testicular tissue underwent necrosis and were barely recognizable after hematoxylin-eosin staining. In the same section, only the opposite part of the injection site was stained showing abnormal state of cell layers mostly fibrosis and infiltrated leukocytes. Sloughing of immature germ cells from the basement membrane along with shedding cells in the intraluminal space was notable in most seminiferous tubules from the saline injected testis. The present study confirmed that the direct injection of hypertonic saline into testis can induce a castration-like, testosterone-depriving effects on accessory sex organs. Our findings suggest that the efficacy of this less expensive and minimally invasive method seems to be almost even with that of conventional orchidectomy and chemical castration, though more in-depth evaluation should be supported.

Key words : Hypertonic saline injection, Intratesticular, Testicular atrophy, Necrosis, Orchidectomy, Chemical castration.

요 약 : 최근 고장성(20%) 생리식염수를 흰쥐 정소에 직접 주사할 경우, 혈중 테스토스테론 수준이 최저 수준에 도달하는 화학적 거세 상태에 들어감이 보고되었다. 본 연구는 이러한 간단한 생리 식염수 주사 모델의 효용성을 더 검증하기 위해 정소의 미세 해부 구조상의 변화를 조사하였다. 실험군으로는 무처리군(intact, control), 정소제거군(orchidectomy), 그리고 식염수 주사군(saline-injection)으로 하였으며, 식염수 주사군에는 정소당 750 μ l의 멸균한 20% 식염수를 직접 주사하였다. 정소 제거 수술은 식염수 주사가 행해진 날에 시행하였다. 주사후 30일 경과 후에 동물을 희생하여 생식조직들을 채취하고 무게를 측정 후 조직학적 조사를 위해 고정시켰다. 체중의 경우 무처리 대조군과 비교하여 정소절제군과 식염수 주사군 모두에서 유의한 변화는 없었다. 식염수 주사군의 정소 무게는 무처리 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 부정소와 저정낭의 무게의 경우 무처리 대조군에 비해 정소절제군과 식염수 주사군 모두에서 유의하게 감소하였으며, 전립선의 경우 무처리 대조군에 비해 정소절제군에서는 유의하게 감소하였으며, 식염수 주사군에서는 감소하는 경향은 있었지만 유의성은 없었다. 외양상으로 식염수 주사군의 정소에는 약간의 위축이 나타났으며, 백막이 정상적으로 보였

[†] 교신저자: 서울특별시 종로구 홍지동 7, 상명대학교 그린생명과학과.
(우) 110-743, (전) 02-2287-5139, (팩) 02-2287-0070, E-mail: shlee@smu.ac.kr

무처리 대조군에 비해 정소절제군에서는 유의하게 감소하였으며, 식염수 주사군에서는 감소하는 경향은 있었지만 유의성은 없었다. 외양상으로 식염수 주사군의 정소에는 약간의 위축이 나타났으며, 백막이 정상적으로 보였

다. 그러나 조직학적으로 정소 대부분에서 괴사가 발견되었으며, 헤마톡실린-에오신으로 거의 염색되지 않았다. 동일한 절편에서, 주사 부위의 정반대 부분은 비정상적인 세포층들이 염색되었다. 대부분의 세정관에서 미성숙한 생식세포들이 기질 막에서 분리되고, 내강 쪽으로 세포들이 떨어져 나간 것이 확인되었다. 본 연구는 정소내 고장성 식염수 직접 주사가 부속 생식기관에 정소절제와 유사한 테스토스테론 제거 효과를 유발할 수 있음을 확인하였다. 비록 심층적인 연구들이 더 요구되지만, 본 연구는 정소 내 고장성 식염수 직접 주사법이 비용이 덜 들고 덜 침습적이면서 정소절제술이나 화학적 거세와 거의 동일한 효용성을 가졌음을 시사한다.

서 론

정소를 외과적으로 적출하여 수컷 혹은 남성으로서의 성적 기능과 발현을 제거하는 거세는 가축은 물론 인간을 대상으로 오랜 세월 동안 사용되어왔다. 과학적인 측면에서 최초의 내분비학 실험은 A. A. Berthold가 1849년에 수행한 수탉의 거세 효과 및 정소 이식을 통한 거세 이전 상태로의 기능 회복에 대한 것이었다(Hadley & Levine, 2006). 이후 현재까지 거세는 남성호르몬 관련 연구에 있어서 매우 중요한 실험 방법론 가운데 하나였으며, 지난 세기 후반부터는 GnRH 유사체를 사용한 화학적 거세법도 개발되어 의학적으로 적용중이다(Labrie et al., 1986).

최근 고장성(20%) 생리식염수를 흰쥐의 정소에 직접 주사할 경우 혈중 테스토스테론 수준이 최저 수준에 도달하고 정소 조직이 완전히 파괴되는 화학적 거세 상태에 들어감에 보고되었다(Emir et al., 2008). 만약 이 방법이 유의한 부작용 없이 외과적 거세 또는 호르몬 제재를 사용한 화학적 거세와 총체적으로 동일하거나 유사한 효과를 나타낸다면, 이는 수술의 번거로움과 고가의 약물 구입을 피할 수 있는 매우 유용한 대체 수단이 될 것이다. 본 연구는 이러한 간단한 생리 식염수 주사 모델의 효용성을 보다 심층적으로 검증하기 위해 정소의 미세 해부 구조상의 변화를 조사하였다. 실험군으로는 정상적인 식염수(0.9%)를 주사하는 무처리군(intact, control), 외과적으로 정소를 제거하는 정소제거군(orchidectomy), 그리고 정소당 750 μ l의 멸균한 20% 식염수를 직접 주사하는 식염수 주사군(saline-injection)으로 설정하였다. 주사 후 30일 경과된 뒤에 동물을 희생하여 생식 조직들을 채취하여 무게를 측정하고 후 조직학적 조사를 위해 고정시켰다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

본 연구에서 사용된 실험 동물의 사육과 전체 실험 과정은 식품의약품안전청(KFDA)의 가이드라인에 부합하도록 상명대학교 실험 동물윤리위원회(IACUC)의 승인 하에 수행되었다(R-10-03). 상명대학교 실험 동물 사육장에서 18~22°C로 일정하게 유지되는 온도와 일정한 광주기(12시간 조명, 12시간 소등), 그리고 먹이와 물의 접근을 자유롭게 사육한(ad libitum) Sprague-Dawley(SD) strain의 성숙한 수컷 흰쥐(350~400 g, 생후 150일 전후; 대한마이오링크 공급)를 사용하였다. 멸균 처리한 정상 및 고장성 식염수의 주사는 이전의 보고를 따라 정소에 750 μ l씩 서서히 주사하였고, 주사 후에 유출 여부를 확인하였다(Emir et al., 2008). 정소절제는 식염수를 주사한 날과 동일한 날에 시행하였는데, zoletil로 마취한 상태에서 음낭 피부를 10 mm 정도 절제하고 정소를 적출하였고, 부정소 등은 다시 음낭 안으로 집어넣은 후 봉합하였다.

2. 조직 절편 제작과 조직학적 조사

희생 직후 적출한 정소, 부정소, 저정낭(정액 포함), 전립선을 유지 위에 놓고 'wet weight'를 측정하였다. Hematoxylin & Eosin 염색을 위해 조직 무게의 10배 volume에 해당하는 4% paraformaldehyde(Merck, Germany; pH 7.4)를 넣고 4°C에서 96시간 동안 고정하였고, 고정 후 ethanol(70%, 80%, 90%, 95%, 100%)로 순차적으로 탈수하였다. 탈수가 끝난 조직은 파라핀으로 포매하여 블록을 만들었고, 조직 절편기(Microm, Germany)로 4.5 μ m 두께로 절편을 얻은 후 gelatin(Sigma, USA)으로 코팅된 슬라이드에 부착시켰다. 이후 Hematoxylin & Eosin 염색을 시행하고 봉입한 뒤 현미경(Olympus BX51, Japan)으로 관찰하였다(Heo et al., 2008).

3. Statistical Analysis

실험 결과의 통계적 처리는 Student's *t*-test를 사용하여 이루어졌으며, *p*-value 0.05 미만을 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

체중의 경우, 무처리 대조군과 비교하여 정소절제군과 식염수 주사군 모두에서 유의한 변화는 없었다(intact : orchidectomy : saline-injection=499.91±16.92 : 458.83±19.10 : 510.50±25.90, Fig. 1A). 식염수 주사군의 정소 무게는 무처리 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(intact : saline-injection=1.449±0.022 : 1.177±0.043, $p<0.001$, Fig. 1B). 부정소 무게의 경우, 무처리 대조군에 비해 정소절제군과 식염수 주사군 모두에서 유의하게 감소하였으며(intact : orchidectomy : saline-injection=0.561±0.028 : 0.247±0.055 : 0.151±0.017, Fig. 1C, $p<0.001$), 저정낭의 경우도 동일한 양상을 보였다(intact : orchidectomy : saline-injection=0.380±0.034 : 0.087±0.023 : 0.070±0.005, Fig. 1D, $p<0.001$). 한편, 전립선의 경

우 무처리 대조군에 비해 정소절제군에서는 유의하게 감소하였으며, 식염수 주사군에서는 감소하는 경향은 있었지만 유의성은 없었다(intact : orchidectomy : saline-injection= 0.506±0.053 : 0.316±0.144 : 0.096±0.021, Fig. 1E).

외양상으로 식염수 주사군의 정소는 무처리군 정소와 비교하여 약간의 위축이 나타났으며, 백막이 정상적인 것으로 보였다(data not shown). 그러나 조직학적으로 고장성 식염수를 주사한 부위의 정반대 부분에서만 비정상적인 세포층들이 hematoxylin-eosin으로 염색되었는데, 섬유질성 구조와 다수의 백혈구들이 침투한 것이 확인되었다(Fig. 2, upper right panel). 그 외 정소 대부분에서 괴사가 발견되었으며, hematoxylin-eosin으로 거의 염색되지 않았다(Fig. 2, middle right panel). 내부의 세포들이 완전히 사멸된 일부 세정관은 침투한 백혈구들에 완전히 둘러싸인 것이 관찰되었다(Fig. 2, lower right panel). 식염수 주사군의 정소에서 염색된 부위의 백막의 경우도 무처리군과 달리 세포들이 백막 내부 방향으로 분리된 상태였으며(Fig. 3, upper right panel), 세정관 외부의 Leydig 세포와 간질세포들이 완전히 사멸한 상태였다(Fig. 3, middle right panel). 세정관 내강 방향의 정세

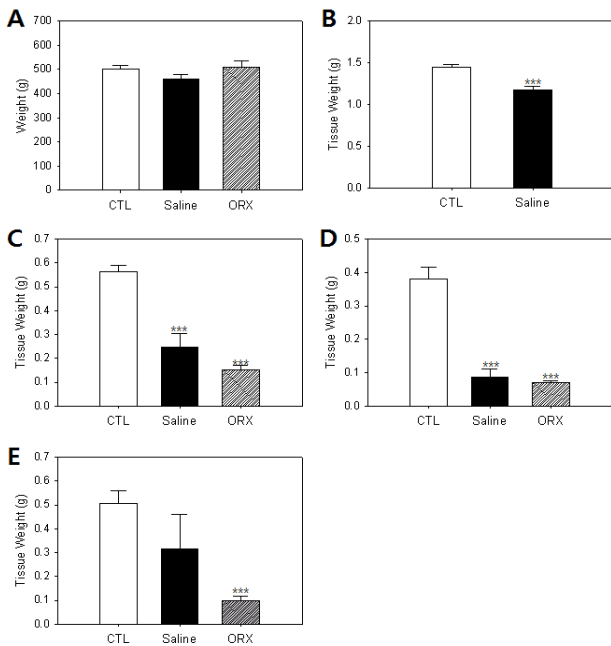


Fig. 1. Changes in body and tissue weights of the rats treated with hypertonic saline solution intratesticularly. Adult rats were given a single dose of normal saline (0.9%, CTL) or hypertonic saline (20%, saline) through bilateral intratesticular administration. Bilateral orchidectomy was performed at the same day in the third group. All rats were sacrificed 30 days after the injection. A, body weight. B, testis. C, epididymis. D, seminal vesicle. E, prostate. Values are expressed as mean±S.E. *** Significantly different from control group, $p<0.001$.

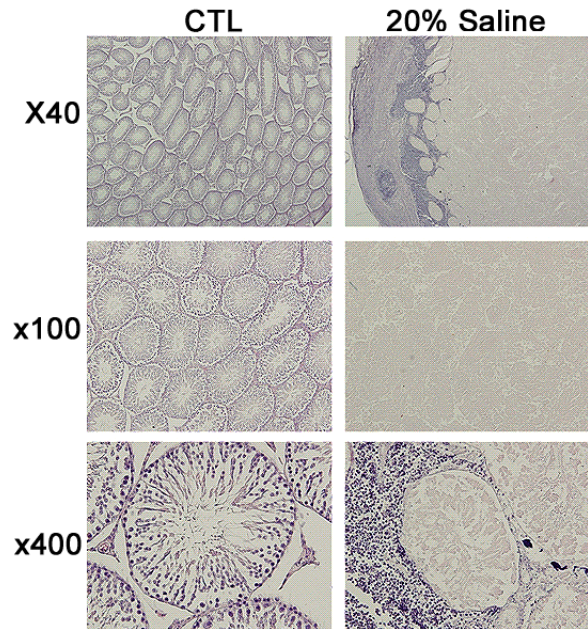


Fig. 2. Light microphotographs of the testes from the control (left column) and hypertonic saline (right column) treated adult rats. The cross sections were stained with hematoxylin and eosin (magnification, ×40, ×100 and ×400).

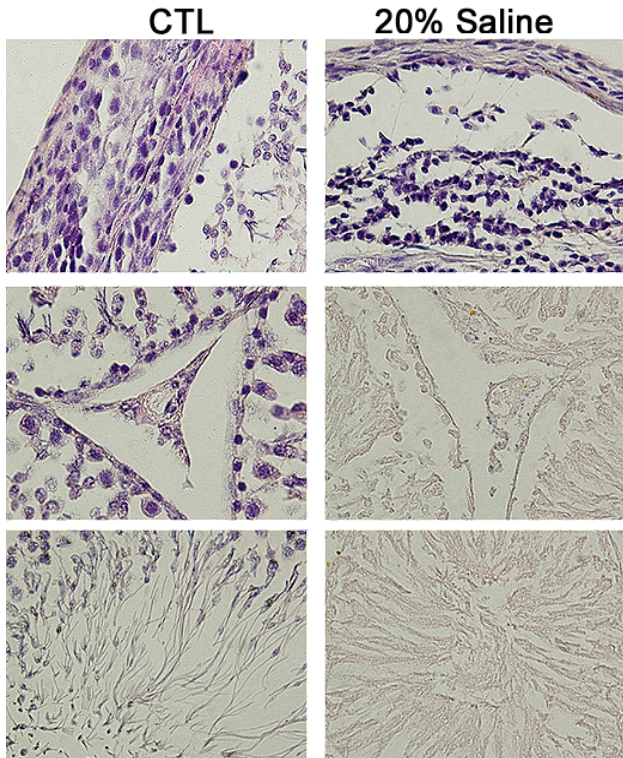


Fig. 3. High power light microphotographs of the testes from the control (left column) and hypertonic saline (right column) treated adult rats. The cross sections were stained with hematoxylin and eosin (magnification, $\times 1000$).

포들도 역시 완전히 사멸하였다(Fig. 3, lower right panel).

고 찰

본 연구는 흰쥐 정소 내에 고장성 식염수를 직접 주사할 경우 외과적인 정소절제를 했을 때와 유사하게 호르몬 제거 효과를 유발하여 안드로겐 의존성 부속 생식기관들의 크기를 감소시킴을 확인하였으며, 이때 정소 내의 미세 구조들의 변형과 세포 사멸이 나타나고, 백혈구의 대량 침입이 야기됨을 조직학적으로 확인하였다. 비록 심층적인 연구들이 더 요구되지만, 본 연구 결과는 정소내 고장성 식염수 직접 주사법이 비용이 덜 들고 덜 침습적이면서 정소절제술이나 화학적 거세와 거의 동일한 효용성을 가졌다는 이전의 보고를 지지하며(Emir et al., 2008, 2009), 부속 생식기관들과 여타 안드로겐의 영향을 받는 조직들에 대한 연구에 있어서 정소절제 모델을 편리하게 대체할 가능성을 확인하였다. 고장성 식염

수 주사 실험법 고안자들과는 달리 본 연구자들은 화학적 거세 효과와 외과적 정소제거를 직접 비교하여 그 효용성을 증명하였는데, 두 방법은 부정소와 저정낭에서는 유사한 안드로겐 결핍 상태를 초래하였다. 전립선의 경우 고장성 식염수 주사에 의해 대조군에 비해 무게가 감소하는 경향은 있었으나, 유의한 차이가 나타나지 않았다. 현미경적인 조사에서 정소 대부분에서 세포 사멸이 일어났고, 일부나마 염색이 되는 부위에서도 정상적인 세정관 구조들이 남아 있지 않았지만 정소내 안드로겐 생성이 완전히 차단되지 않았을 가능성을 배제할 수 없으며, 부신이나 지방조직과 같은 여타 안드로겐 생성 부위의 활성 변화가 나타날 가능성 역시 배제할 수 없으므로 현재 이들에 대한 조사를 진행하고 있다. 한편, 부속생식기관들의 조직학적 변화는 대조군과 대비하여 고장성 식염수 주사 동물과 정소절제 동물에서 모두 유사한 변화를 가져왔다(data not shown).

거세는 현재 축산 분야 대동물들의 육질 향상이나 애완동물의 관리 목적으로 널리 사용되는 수술법으로, 인간의 경우에는 과거 형벌이나 특별한 역할(예, 환관) 부여를 위한 목적으로 사용되었다. 저개발국에서는 현재도 전립선암 치료에 거세가 사용되며, 일부 선진국에서는 우생학적 필요성(예, 강제 불임시술) 혹은 도착성 성범죄자들에 대한 재범 방지를 목적으로 제한적으로 외과적 거세를 시행하고 있다(Huggins et al., 1941; Reilly, 1983; Schmucker & Lösel, 2008). 전립선암 치료에 사용되던 외과적인 거세는 화학적인 거세(chemical castration) 또는 의학적인 거세(medical castration)로 대체되었는데, 현재 안드로겐 결핍을 유도하는 GnRH analog 또는 GnRH 수용체 차단제(예, degarelix)들이 주로 사용되고 있다(Labrie et al., 1986). 그런데, 암 치료 목적의 의학적 거세나 도착성 성범죄자에게 적용하는 화학적 거세의 경우 투여 초기 2~3주간 오히려 혈중 테스토스테론이 상승하여 암을 악화시키거나 행동 조절이 어려운 부작용이 있을 수 있으며(Van Poppel, 2010), 기타 신체적 이상 외에도 장기적으로 투약해야 하므로 대단히 많은 비용이 든다는 문제가 있다. 이러한 측면에서, 고장성 식염수 직접 주사법을 인간에게 직접 적용시키는 것은 현재로는 불가능하겠지만, 만약 안전성이 확보된다면 매우 유용할 것이다. 즉, 무엇보다도 비용이 저렴하며, 복잡한 수술이 필요없고, 의학적 거세시 사용되는 약물들의 여러 신체적 부작용들을 회피할 수 있으면서도 외과적 정소절제술과 거의 동등하게

즉시 안드로겐 결핍 효과가 나타난다는 점이다. 또한 실험 동물을 사용한 연구에서도 외과적 정소절제시 흔히 경험하는 부속 생식조직들의 유착 가능성을 줄일 수 있어서 부정소 등에 미치는 안드로겐 연구에 큰 도움이 될 수 있다. 마지막으로, 마취와 수술을 줄일 수 있어서 실험 동물의 복지를 증진시키므로 현재 시행 중인 실험 동물 관련 연구윤리에도 잘 부합할 수 있다. 고장성 식염수 주사 이전에도 비호르몬성 물질을 사용한 화학적 거세에 대한 시도는 이전에도 있었는데, 알킬화제인 ethane 1,2-dimethane sulfonate(EDS)는 흰쥐에서 선택적인 Leydig cell(LC) 독성과 정소 기능 장애를 일으켜서 안드로겐 결핍 실험 동물 모델을 제작하는데 널리 사용되어왔다(Morris et al., 1986; Rommerts et al., 2004). 정소에 직접 주사하는 고장성 식염수와는 달리 EDS는 복강에 1회 주사하며, 3일 이내로 선택적으로 LC의 완전한 사멸을 유도하여 혈중 테스토스테론 수준을 감소시키며, 뇌하수체로부터의 LH와 FSH 분비를 증가시키고, 정자 형성 장애, 정소 내 생식세포와 간질세포의 구조적 변화를 야기한다(Ariyaratne et al., 2003; Bakalska et al., 2004). 그러나 이후 정소 내의 중간엽 Leydig 전구세포의 분화와 증식이 유도되어 사멸한 세포들에 대한 보충이 일어나며, 그 결과 정소를 비롯한 부속생식기관들의 무게 감소와 회복, 생식호르몬 분비 패턴의 회복이 일어난다(Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001). 따라서 EDS는 영구적인 불임 상태를 유도할 수는 없고, 일시적인 거세 상태에서 정상 상태로 회복되는 가역적인 화학적 거세를 일으킨다. EDS 주사 약물의 경우, 생식계의 변화 외에 뚜렷한 다른 부작용은 보고되지 않았는데, 다른 종들에는 효과가 없거나 미약하다는 단점이 있다.

한편, 고장성 식염수 투여는 국부적으로 삼투압 조절의 붕괴를 야기하여 탈수와 세포사를 유도하는 것으로 추정된다. 과거에도 요도 경유 고장성 식염수 주사(3 ml, 23.4%)로 전립선의 괴사가 유도 되고(Rehman et al., 2003), 같은 농도의 고장성 식염수를 신장암에 투여한 보고가 있으므로(McCoy et al., 1999), 고장성 식염수 용액을 비전신적인 국부 투여로만 엄격히 제한할 경우 일정 부분 의학적 안정성이 확보될 가능성이 높다. 결론적으로 고장성 식염수를 정소내로 직접 주사하는 흰쥐 모델은 외과적 거세를 대체할 수 있는 유용한 실험법이 될 가능성이 높으며, 안전성과 효용성에 대한 더 많은 연구가 향후 필요하다.

인용문헌

- Emir L, Dadali M, Sunay M, Erol D, Caydere M, Ustün H (2008) Chemical castration with intratesticular injection of 20% hypertonic saline: A minimally invasive method. *Urol Oncol* 26:392-396.
- Emir L, Sunay M, Yalbuздаğ O, Karakaya Y, Erol D (2009) Hormonal and pathologic changes after chemoablation of testes with hypertonic saline solution as a treatment method alternative to orchietomy in patients with hormone sensitive metastatic prostatic cancer. *Urol Oncol* [Epub ahead of print]
- Hadley M, Levine JE (2006) *Endocrinology*. 6th ed. Benjamin Cummings, New York, pp 1-608.
- Heo HJ, Lee WY, Yoon YD, Choi D, Lee SH (2008) Effect of prepubertal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate on the maturation of rat seminal vesicles and prostate glands. *Dev Reprod* 13:215-259.
- Huggins C, Stevens RE, Hodges W (1941) Studies on prostate cancer II. The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *Arch Surg* 43:209-213.
- Labrie F, Dupont A, Bélanger A, St-Arnaud R, Giguère M, Lacourcière Y, Emond J, Monfette G (1986) Treatment of prostate cancer with gonadotropin-releasing hormone agonists. *Endocr Rev* 7:67-74.
- Lee WY, Lee SH (2009) Effect of ethane 1,2-dimethane sulfonate(EDS) on the accessory sex organs in adult rats : A histological study. *Dev Reprod* 13:105-114.
- McCoy S, Evans A, Spurrier N (1999) Sclerotherapy for leg telangiectasia: A blinded comparative trial of polidocanol and hypertonic saline. *Dermatol Surg* 25:381-385.
- Morris ID, Phillips DM, Bardin CW (1986) Ethylene dimethanesulfonate destroys Leydig cells in the rat testis. *Endocrinology* 118:709-719.
- Rehman J, Landman J, Sundaram C, Clayman RV (2003) Tissue chemoablation. *J Endourol* 17:647-657.
- Reilly P (1983) The surgical solution: The writings of ac-

tivist physicians in the early days of eugenical sterilization. *Perspect Biol Med* 26:637-656.

Schmucker M, Lösel F (2008) Does sexual offender treatment work? A systematic review of outcome evaluations. *Psicothema* 20:10-19.

Van Poppel H (2010) Evaluation of degarelix in the management of prostate cancer. *Cancer Manag Res* 2:39-52.

(received 25 November 2010, received in revised form 16 December 2010, accepted 17 December 2010)