

Study on Changes of Sperm Count and Testis Tissue in Black Mouse after Neutron Irradiation

Ki-Jung Chun · Won Sook Seo · Hwa-Young Son*
Korea Atomic Energy Research Institute, *Chungnam National University

중성자 조사후 Black mouse의 고환 조직 및 정자수 변화에 관한 연구

천기정 · 서원숙 · 손화영*

한국원자력연구소, *충남대학교

(2005년 9월 9일 접수, 2006년 3월 6일 채택)

Abstract - For the purpose of the biological effect in black mouse by neutron irradiation, mice were irradiated with 16 or 32 Gy neutron (flux: 1.036739E+09) by lying flat pose at BNCT facility on HANARO Reactor. And 90 days later of irradiation, physical changes of testis and testis tissue were examined. There were no weight changes but a little bit volume changes and sperm counts in the testes. Atrophy of seminiferous tubules irradiated with 32 Gy neutron is increased in number and severity and those in stage VI showed depletion of spermatogonia and pachytene spermatocytes compared to the non-irradiated control group. Testis damage of black mouse was not recovered after long time by 32 Gy neutron irradiation.

Key words : black mouse, testis, neutron irradiation, sperm count.

요약 - Black mouse에 하나로 원자로의 BNCT시설을 이용하여 중성자(flux:1.036739E+09)를 머리를 정면으로 16 및 32 Gy 조사한 후 생물학적 효과를 관찰하는 일환으로 고환에 대한 물리학적 변화 및 조직 변화를 관찰하였다. 조사 후 90일이 경과한 후에 고환의 무게는 변화가 없었으나 고환의 부피는 약간 감소하였으며, 정자수도 감소하였다. 고환의 조직검사에서는 32 Gy 중성자 조사군에서 위축된 정세관의 수가 증가되었으며 stage VI에서의 정세관에서는 정모세포 및 비사기 정모세포가 고갈되어 있음을 알 수 있었다. 중성자 조사(32 Gy)후 고환의 손상이 장기간 경과 후에도 회복되지 않음을 알 수 있었다.

중심어 : 생쥐, 고환, 중성자 조사, 정자수

서 론

오늘날 사람의 사망원인 중 암이 차지하는 비율은 매우 높다. 암치료에는 외과수술, 항암제 투여 및 방사선 치료법 등이 널리 이용된다. 이 중 방사선을 이용한 암 치료법은 암세포가 있는 곳에 집중적으로 방사선을 조사하여 암세포를 죽이는 것인데 암세포 주변의 정상세포까지 방사선의 손상을 초래할 수 있는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 선진외국에서는 많은

연구가 수행되어 지고 있다. 이 방법중의 하나가 주로 뇌종양 및 피부암에 적용되는 붕소 중성자 포획법(BNCT, Boron Neutron Capture Therapy)이라는 신기술이다. 우리나라에서도 2002년 말 하나로 원자로내에 이 시설이 완공되어 임상적용에 앞서 실험동물을 이용한 연구가 시작되었다. 이와 같이 원자로에서 인출한 중성자를 이용하여 실행하는 종양 치료법을 중성자 치료(Neutron therapy) 또는 원자로 요법이라고 한다. 원자로에서 인출한 '슬로 뉴트론'을 리튬이나 붕소의 원

자핵에 대면 이른바 포획 반응이 일어나서 방사성 리튬 또는 붕소가 생기고 알파선을 방사하므로 이것을 이용하여 뇌종양 세포를 파괴할 수 있다. 혈중에 붕소화합물을 넣으면 건강한 뇌조직에는 거의 들어가지 않으나 뇌종양속에는 비교적 높은 농도가 모이므로 중성자로 조사하면 뇌종양속에서 방사성 붕소가 생겨서 알파선을 방사하게 된다[1,2]. 본 연구는 BNCT를 위한 첫 단계의 연구로서 black mouse에 보론화합물을 투여하지 않고 중성자만을 조사하여 생물학적 효과를 관찰하는 일환으로 고환에 대한 연구를 하였고 변화여부를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 중성자 조사

실험동물은 생후 6주 된 C57/BL 수컷 생쥐(체중: 약 22 g)를 바이오링크사로부터 제공받아 사용하였다. 중성자 조사는 하나로 연구용 원자로의 BNCT 시설을 이용하여 중성자 (flux 1.036739E+09)에서 16 및 32 Gy로 조사하였다. 동물 조사 시 조사상태는 엎드린 자세로 머리를 정면으로 하였으며, 조사하기 직전에 1% chloral hydrate (Fluka)용액을 0.2 ml 복강 주사하여 마취시켜 마취상태를 유지하면서 조사하였다.

2. 시료 채취 및 측정

중성자 조사 후 90일이 경과한 다음 좌,우 고환 및 부고환을 적출하였다.

3. 고환 무게, 부피 및 정자수 측정

고환무게는 balance(OHAUS Corp. U.S.A)로 측정하였으며, 고환 부피는 ruler(Vernier Caliper, Mitutoyo Corp.)로 가로, 세로를 재어 부피를 측정하여 생쥐의 몸무게로 나누어 절대무게로 삼았다. 정자수를 측정하기 위하여 부고환을 1%의 Sodium citrate 용액 1 ml에 넣고 homogenizer로 약하게 분쇄하고 vortex로 부유시켜 hemocytometer 상에서 광학현미경(Canon, Japan)으로 400 배에서 측정하였다.

4. 고환 조직 관찰

적출한 고환은 고정액 (picric acid, saturated aqueous, 75 ml, formalin 25 ml, acetic acid, glacial 5 ml)에 담그고 24시간 후에 70 % 알콜 용액으로 교체 보관한 후 시료로 사용하였다. 조

직 section은 10 % 중성 완충 포르말린 용액에서 24시간 고정하고 12시간 동안 물로 씻은 후 50에서 100 %까지 여러 농도의 알콜 용액을 사용하여 탈수 과정을 거친 후 xylene 용액으로 탈알콜 시키고 파라핀에 포매 하였다. 조직 절편기 (Reichert Jung)를 이용하여 포매된 조직을 5 μ m 두께로 자르고 젤라틴이 입혀진 슬라이드에 부착시켰다. 조직 염색 및 관찰은 35°C 슬라이드 건조기에서 12시간 건조 시킨 후 일반적인 염색방법인 Hematoxylin & Eosin staining으로 염색하였다. 즉 xylene을 이용하여 파라핀을 제거하고 100 %에서 50 %까지 여러 농도의 알콜 용액으로 함수 과정을 거친 후 hematoxylin으로 6분간 염색하고 탈색 시킨 후 eosin으로 6-8분간 다시 염색하고 50에서 100 %까지 여러 농도의 알콜 용액으로 다시 탈수 과정을 거치고 xylene을 이용하여 탈알콜 시키고 Canada balsam으로 마운팅한 후에 광학현미경으로 조직을 관찰하였다.

결과 및 고찰

중성자 조사 후 90일이 경과한 다음 고환을 적출하여 무게를 측정된 결과 Fig. 1에서와 같이 조사치 않은 정상 대조군과 무게의 차이를 보이지 않았다. 그러나 고환의 부피는 Fig. 2에서와 같이 중성자 조사군에서 모두 감소하는 경향이 있었다. 또한 정자수를 측정된 결과, Fig. 3에서와 같이 정상군보다 감소하고 있는 것을 알 수 있다.

본 결과로 볼 때 엎드린 자세로 중성자를 조사 받은 black mouse의 고환이 직접적으로 중성자를 받지 않았지만 신체에 노출되어 있는 기관으로 고환에 약간의 손상을 초래함을 알 수 있었고 조

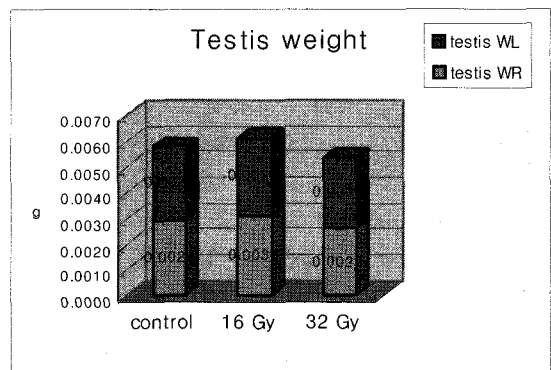


Fig. 1. Testis weight in black mice after 90 days by neutron irradiation.

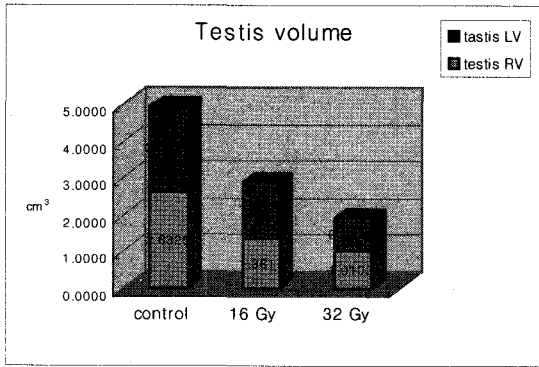


Fig. 2. Testis volume in black mice after 90 days by neutron irradiation.

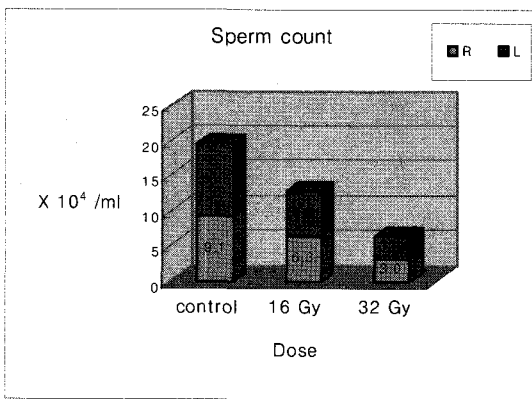


Fig. 3. Sperm count in black mice after 90 days by neutron irradiation.

사 후 장기간 경과 후에도 정상적으로 회복되지 않고 있음을 알 수 있었다. 중성자를 비롯한 감마선 등 방사선에 피폭되면 신체의 여러 장기에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있으나 조사상태에 따라 소화기관, 순환기관 및 생식기관 등에 조직 손상 등을 야기할 수 있다. 특히 수컷의 생식기관은 밖으로 노출되어 있어 다른 기관보다 상당한 손상을 초래할 가능성이 높다. 설치류 고환에 대한 방사선의 손상 효과는 많이 알려져 있다 [3-7]. G. A. Haines (2002) 등의 연구에 따르면 X-ray 조사한 후 45일 경과된 생쥐의 몸무게는 큰 변화가 없었으나 선량에 따라 고환의 무게와 정관의 정자수가 감소되었다고 하였다. 고환 무게의 감소는 1 Gy 조사시 관찰되었으며 또한 정관 (vas deferen)의 정자(sperm) 수는 매우 낮은 선량인 0.25 Gy를 조사하였을 때 감소하였다고 하였다. 4 Gy의 x-ray를 조사한 생쥐의 각 고환의 무게는 현저하게 감소되었는데 16일 경과한 고환

의 무게는 정상에 비해 55% 감소하였고 31일이 경과될 때까지 감소가 계속되었다고 하였다. 그러나 45일 경과된 고환은 정상에는 미치지 못하나 회복의 조짐을 보였고 120일 경과된 고환은 정상과 비슷한 무게로 회복되었다고 하였다. 4 Gy의 X-ray를 고환에 조사한 후 정관의 정자수를 관찰한 결과, 31일이 경과한 생쥐의 정자는 조사에 의해 사멸됨에 따라 정상에 비해 약 33%가 감소되었다고 하였다. 조사한 후 45일이 경과된 생쥐의 정자수는 미분화된 정조세포에서 조사에 의한 세포독성으로 정상에 비해 25%의 감소를 관찰하였다고 하였다[8]. 고환에서 가장 방사선에 예민한 세포는 연속 분화하는 정조세포(spermatogonia)이다. 1.5 Gy 이상의 방사선 선량을 조사받으면 생쥐에서 이 정조세포가 파괴되며 이는 최종적으로 정자(spermatozoa)의 수를 감소시키며 부수적으로 고환무게를 감소시키게 된다. 고환 조직의 정세관은 Fig. 4와 같이 정상에 있어서 약간 위축된 것이 보이나 Fig. 5에서와 같이 32 Gy 중성자 조사군에서는 위축된 정세관의 수가 증가됨을 보여주고 있다.

또한 Stage VI에서의 정세관을 보면 정상군에서는 Fig. 6과 같이 정조세포와 정자세포 및 비사기 정모세포등이 눈에 띄게 보이나 Fig. 7에서와 같이 32 Gy 중성자 조사군에서는 정조세포와 비사기 정모 세포 등이 고갈되어 있음을 보여주고 있다. M. R. Bansal(1990) 등은 2.5 및 10 Gy γ -ray를 조사한 albino rat 고환에서 전사사기 단계의 정자세포가 가장 많은 영향을 받았으며 이들 영향으로 나타나는 현상은 정자 생성의 정지, 사멸된 세포의 잔재, 종자세포의 공포화 그리고



Fig. 4. Some seminiferous tubules showing atrophy (*). $\times 100$.

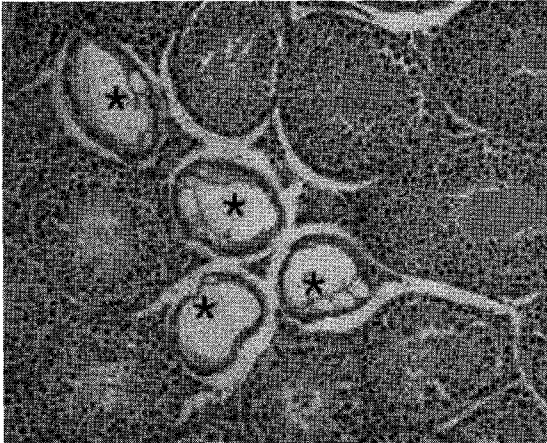


Fig. 5. Seminiferous tubule of 32 Gy neutron irradiated mouse. Atrophy of seminiferous tubules (*) is increased in number and severity. $\times 100$.

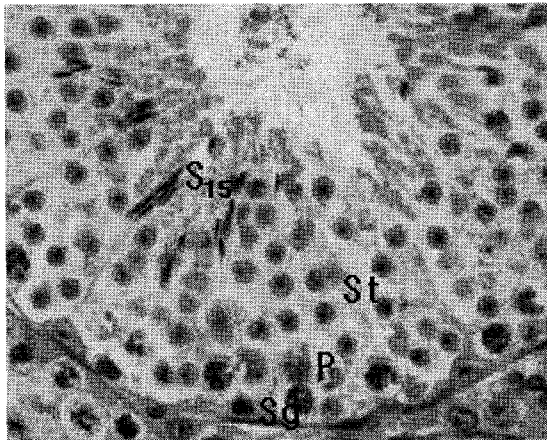


Fig. 6. Seminiferous tubule in stage VI of control mouse. Sg :spermatogonia, St: spermatid, P: pachytene spermatocyte, St: round spermatid, S15 : step 15 spermatid. $\times 400$.

다형핵 거대세포등의 출현이 조사선량에 비례하여 증가한다고 하였다[9]. 또한 Y. S. Lee(1998)등의 연구에서는 생쥐 정소에 1~15 Gy의 γ -ray를 조사한 후 35일이 경과할 때까지 정자형성 세포의 변화에 대해 관찰한 결과, 조사한지 4시간과 1일 된 조직에서는 세포들의 형태적인 변화가 뚜렷하게 관찰되지 않았으나 5일이 경과된 정소조직은 세정관의 형태가 고르지 못하고, 비정상적인 거대세포와 핵이 응축된 세포의 숫자가 세정관 내에서 많이 관찰되었다고 하였다. 10일이 경과한 정소에서는 정모세포의 감소로 인해 세정관의 크기가 현저하게 줄어든 것이 관찰되었으나 정세포 또는 정충을 포함하고 있는 세정관은 비교적 정

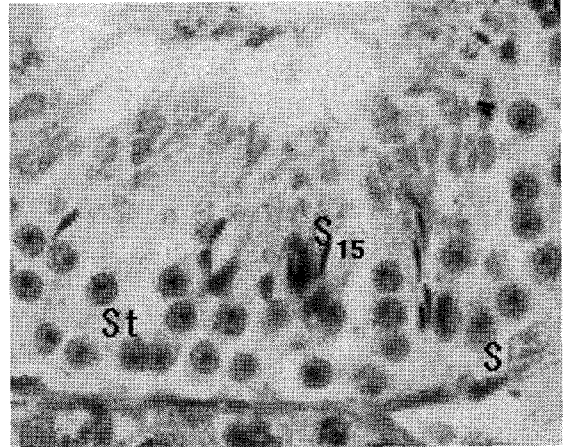


Fig. 7. Seminiferous tubule in stage VI of 32 Gy neutron irradiated mouse showing depletion of spermatogonia and pachytene spermatocytes. St: round spermatid, S15 : step 15 spermatid. S: Sertoli cell. $\times 400$.

상적으로 관찰되었다고 하였다. 20일째 된 정소는 소수의 정세포가 관찰되었고 세정관 막에는 새로 생성되는 정원세포들이 관찰되었으며, 35일된 정소에서는 새로운 정원세포와 정모세포들이 관찰되었다고 하였다[10].

본 실험결과, 머리를 정면으로 하여 중성자 조사를 받은 black mouse의 고환은 무게의 감소는 없었으나 부피의 감소와 정자 수 감소를 나타내는 손상을 입었으며, 32 Gy 중성자 조사에서 특히 3개월 가량의 장기간 후에도 조직의 손상이 정상으로 회복되지 않음을 알 수 있었다. 따라서 머리 정면을 조사한 중성자 조사시 감마선 조사와 유사한 고환 조직의 손상을 인지할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부에서 지원한 원자력 증강기 과제 연구사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. J. A. Coderre and G. M. Morris, " The radiation biology of boron neutron capture therapy", Radiat. Res., 151:1-18(1999).
2. R. F. Barth, W. Yang, J. H. Rotaru, M. L. Moeschberger, C. P. Boesel, A. H. Soloway, D. D. Joel, M. M. Nawrocky, K. Ono and J. H. Goodman," Boron neutron capture therapy

- of brain tumors: enhanced survival and cure following blood brain barrier disruption and intracarotid injection of sodium borocaptate and boronophenylalanine", *Int. J. of Radiat. oncol. biol. phys.*, 47:209-218(2000).
3. C. Jackson, H. Jackson, M. Bock, I. D. Morris and H. L. Sharma, "Metal radionuclides and the testis", *Int. J. Radiat. Biol.*, 60:851-858 (1991).
 4. K. P. Hoyes, H. L. Sharma, H. Hackson, J. H. Hendry and I. D. Morris, "Spermatogenic and mutagenic damage after paternal exposure to systemic indium-114m", *Radiat. Res.*, 139:185-193(1994).
 5. B.H. Erickson, "Effect of continuous gamma-radiation on the stem and differentiating spermatogonia of the adult rat", *Mutat. Res.*, 52:117-128(1978).
 6. A. G. Searle and C. V. Beechey, "Sperm count, egg fertilization and dominant lethality after x-irradiation of mice", *Mutat. Res.*, 22:63-72 (1974).
 7. K. P. Hoyes, I. D. Morris, H. L. Sharma and J. H. Hendry, "Effect of dietary vitamin C on radiation induced damage to the testis", *J. Radiol. Prot.*, 15:143-150(1995).
 8. G. A. Haines, J. H. Hendry, C. P Daniel and I. D. Morris, "Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation", *Biol. reprod.*, 67:854-861 (2002).
 9. M.R. Bansal, A. Kau, M. Tewari and B. Nehru, "Spermatogenesis and epididymal sperm after scrotal gamma irradiation in adult rats", *Reprod. Toxicol.* 4(4):321-324 (1990).
 10. Y. S Lee, T. J. Ji and H. S. Jung, "Apoptosis of spermatogenic cells by γ -irradiation", *Korean J. Genetics.*, 20(4):265-276(1998).