

Fig. 8. Karyopyknosis and karyorrhexis were seen in group III. Semithin section, toluidine blue, x 1,000.

Table 3. Effect of o,p'-DDD on the ACTH secretory activity and cell population of the pituitary gland (Immunohistochemical staining for Anti ACTH antibody)

Group	I Adenohypophysis (75mg/kg)	II (150mg/kg)	III (300mg/kg)
Cell population	+	++	+++
Secretory activity (staining activity)	+	++	+++

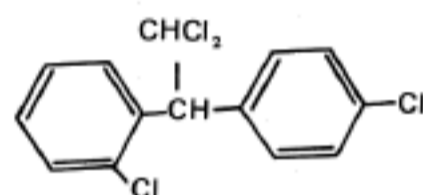
+:mildly increased    ++:moderately increased    +++:makedly increased

히 조면소포체가 증가되었으며, peroxisome이 증가된 부위와 사립체 기질내 이중막을 지닌 물질이 관찰되며 (Fig. 17), 사립체막의 파괴가 곳곳에서 관찰되었다 (Fig. 18). 한편 사립체의 파괴된 부위에서 지방변화가 초래된 곳이 관찰되었으며 보다 심한 병변부위에서는 사립체가 myelin 형태를 형성한 후 점차 지방변성화를 나타낸 부위가 관찰되었다 (Fig. 19).

### 고 찰

o, p'-DDD는 부신 피질에서 기원한 암종에 대하여 특이하게 작용하기 때문에 최근 수술이 불가능한 부신피질 암종에 대한 화학요법제로서 많이 이용되고<sup>15,24,25</sup>)있다. 항암제 Lysodren®은 일상적으로 o, p'-DDD로 잘 알

려져 있으며 화학적으로는 1,1-dichloro-3-(o-chlorophenyl)-2-(p-chlorophenyl) ethane이며 화학구조식은 다음과 같다.



Lysodren®은 무색 무미의 결정체이며 ethanol, isoctane과 carbon tetrachloride 등에 잘 녹는 분자량 320.05의 경구 투여용 항암제로 Lysodren® 정제에는 avicel, polyethylene Glycol 4,000, Silicon dioxide 그리고 전분 등이 함유되어 있다.

암세포에 작용하는 항암제의 기전은 대부분이 밝혀졌으나 o, p'-DDD가 특이하게 선택적으로 부신피질암종에 대하여 항암제로서 작용하는 명확한 기전은 밝혀져 있지 않았다. Hart<sup>16</sup>), Moore<sup>17</sup>), Kruger<sup>18</sup>) 등의 실험적 연구에 의하면 o, p'-DDD가 부신피질암세포의 사립체에 다양한 형태학적 변형을 초래하고 암세포 핵의 염색질에 변형을 야기시킴으로써 암세포를 괴사 시킨다는 보고가 있으나 명확한 형태학적 귀결 결과는 없다.

o, p'-DDD가 개의 부신의 구상대와 속상대에 대하여 위축을 초래한다는 보고가 Nelson과 Woodward에 의하여 처음으로 보고된 이래로 o, p'-DDD의 독성과 스테로이드 합성에 대한 장애기전 등의 기능적인 측면에서의

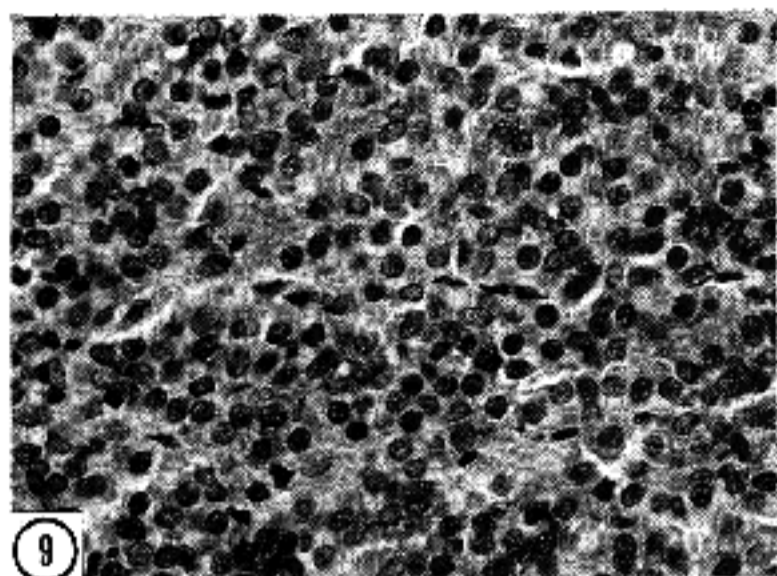


Fig. 9. Mildly increased the number of ACTH secreting cells and increased intensity of staining property in group II. ABC method, x200.

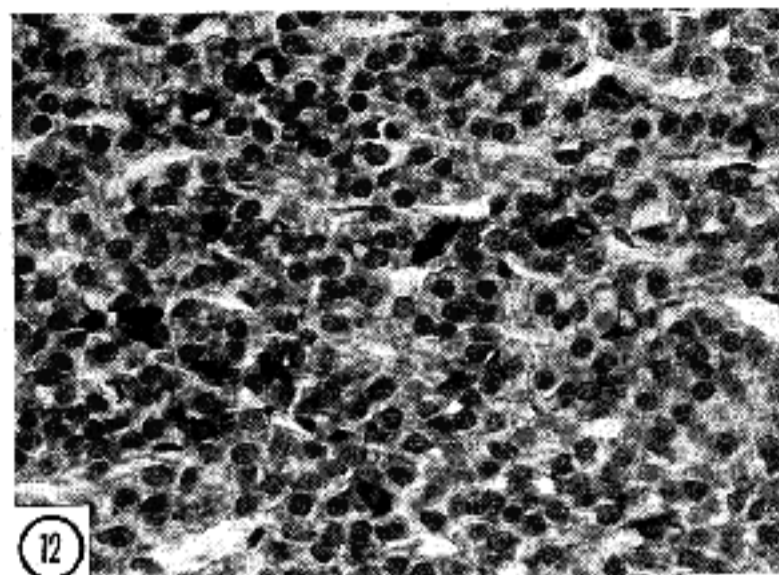


Fig. 12. Increased intensity of staining property in group III. ABC method, x 200.

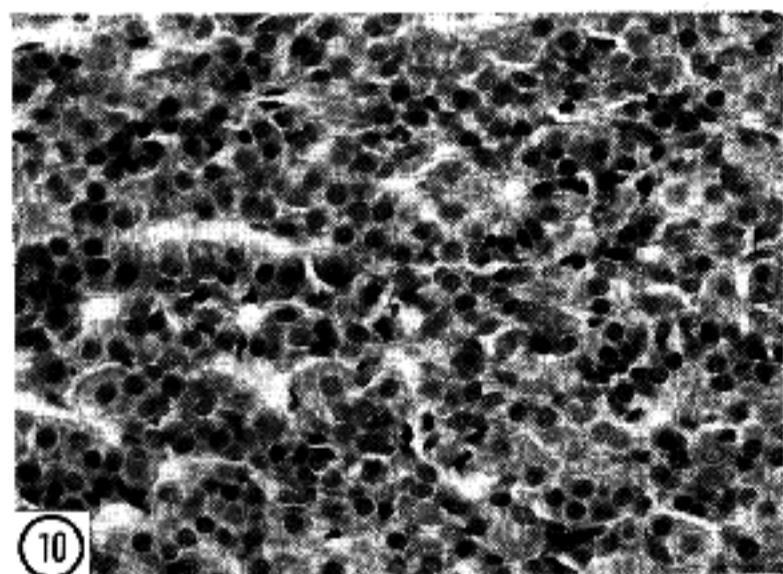


Fig. 10. Moderately increased the number of ACTH secreting cells and increased intensity of staining property in group II. ABC method, x 200.

Table 4. Effect of *o,p'*-DDD on the fine ultrastructural changes of zona fasciculata of rat adrenal gland cortex

Group	I (75mg/kg)	II (150mg/kg)	III (300mg/kg)
Cells of Zona fasciculata			
Cytoplasm			
lipid droplets	+	++	++
peroxisome	+	++	+
Mitochondria			
double ring form	-	±	++
disappearance of cristae	-	-	++
myelin figure form	-	±	++
membrane destruction	-	±	++
calification	-	±	+
Nucleus			
membrane wrinkling	±	+	++
pyknosis	-	±	+
karyorrhexis	-	±	+
karyolysis	-	-	+

-:absent ±:mild +:moderate ++:marked

많은 연구가 이루어 졌다<sup>2-7)</sup>. Vilare와 Tullner<sup>4)</sup>의 연구에 따르면 *o,p'*-DDD는 cholesterol이 pregnenolone으로 전환되는 것을 촉진시키는 ACTH의 기능을 억제시킴으로서 스테로이드 호르몬의 합성에 장애를 초래한다고 하였으며 Hart와 Straw<sup>5)</sup>는 사립체내에서 11-deoxycortisol이 cortisol로 전환되는 것을 부분적으로 억제시킴으로서, 그리고 Touitou등<sup>6)</sup>은 Cushing's

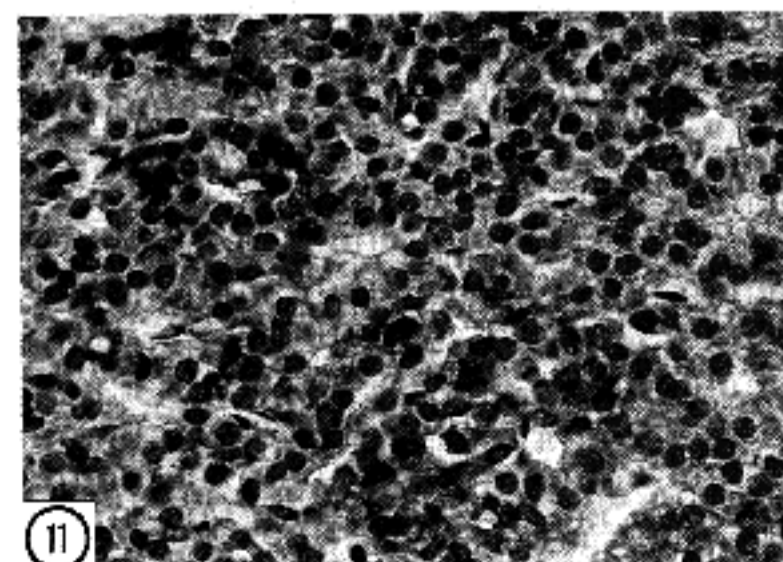


Fig. 11. Markedly increased the number of ACTH secreting cells in group III. ABC method, x 200.

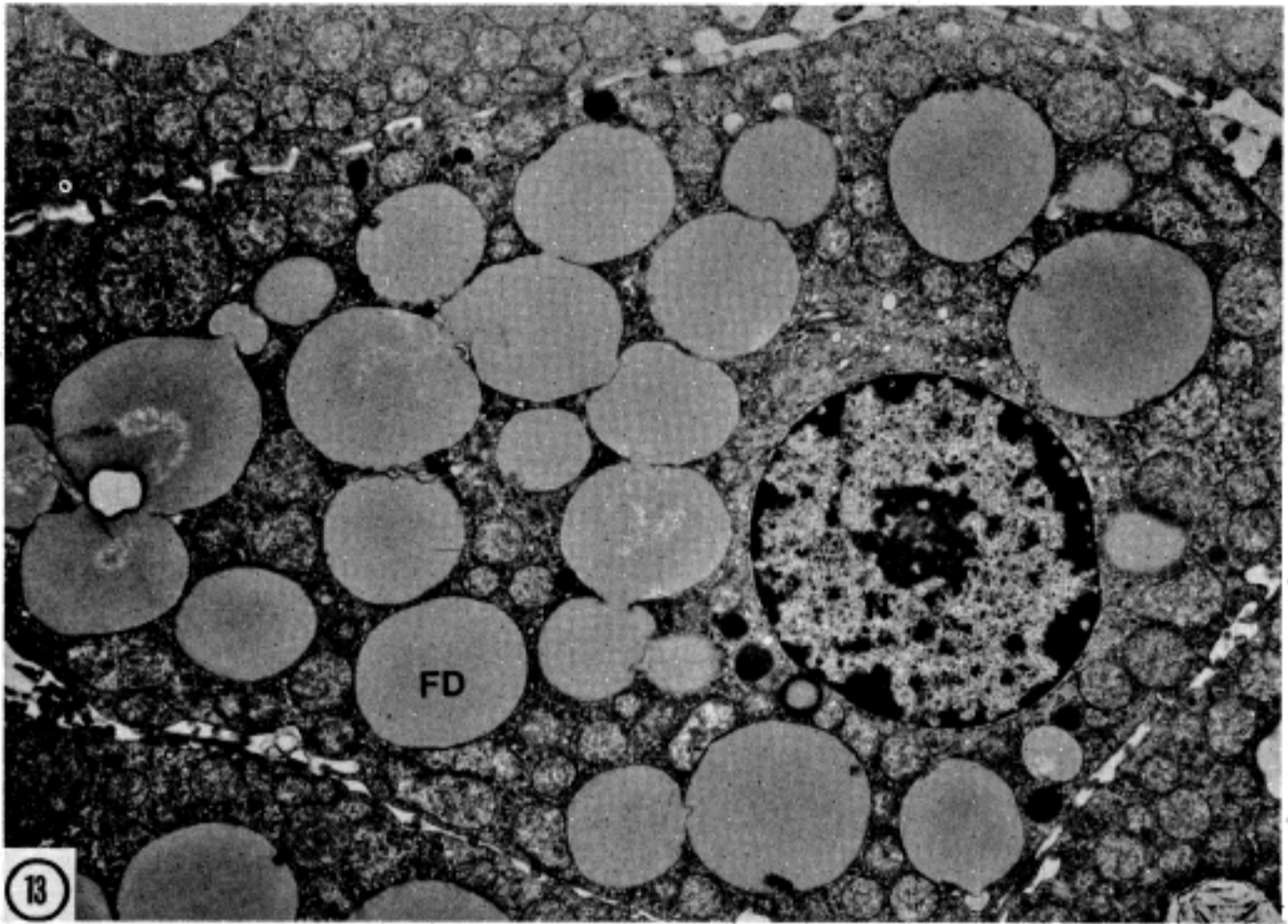


Fig. 13. Increased intracytoplasmic lipid droplets in the edematous cytoplasm in group I. Uranyl acetate and lead citrate, x 2,800.

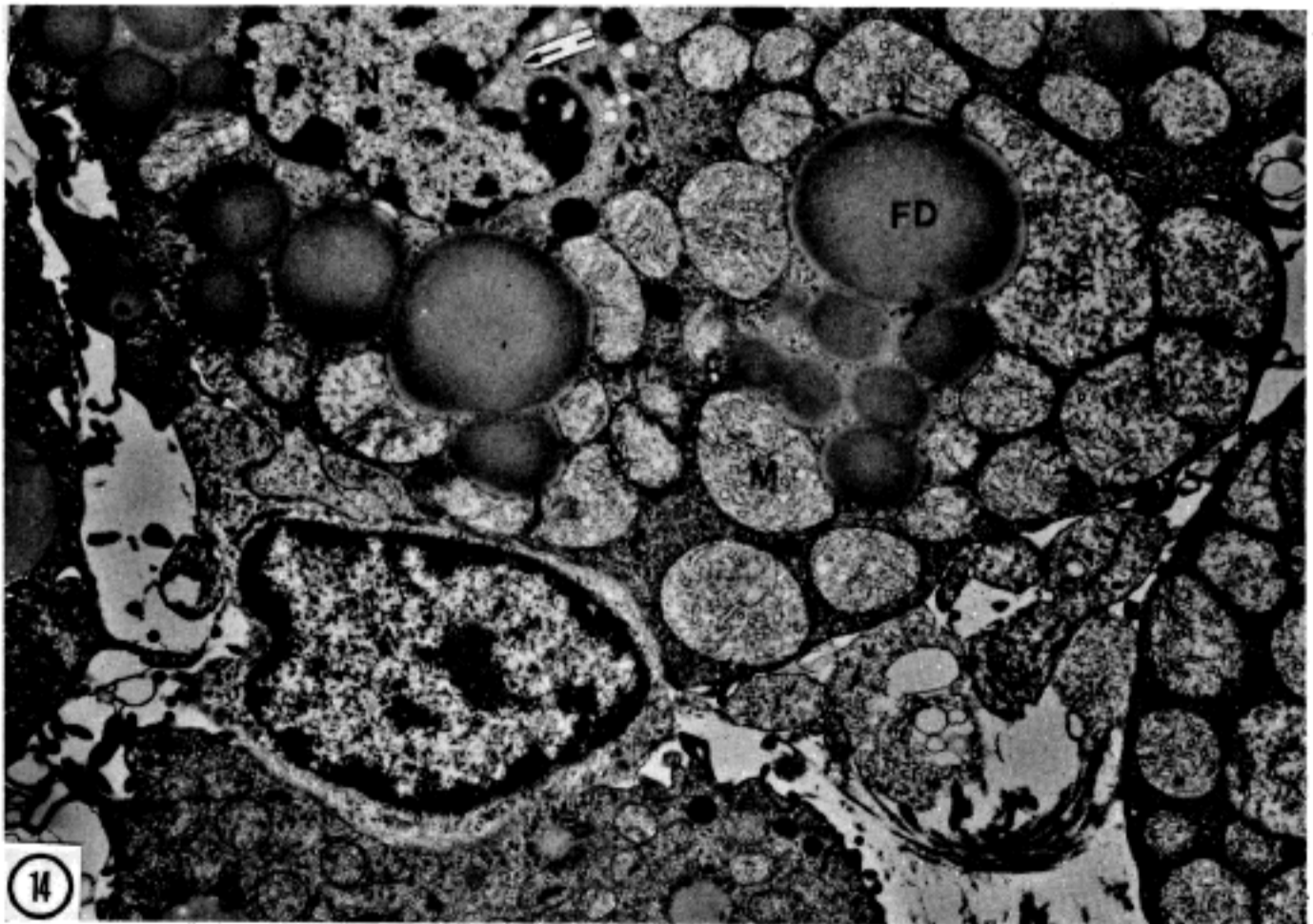


Fig. 14. Increased intracytoplasmic lipid droplets show formations of clusters bearing compressed the adjacent mitochondria (\*). Nuclear membrane indentation (arrow) are seen in group II. Uranyl acetate and lead citrate, x 2,800.

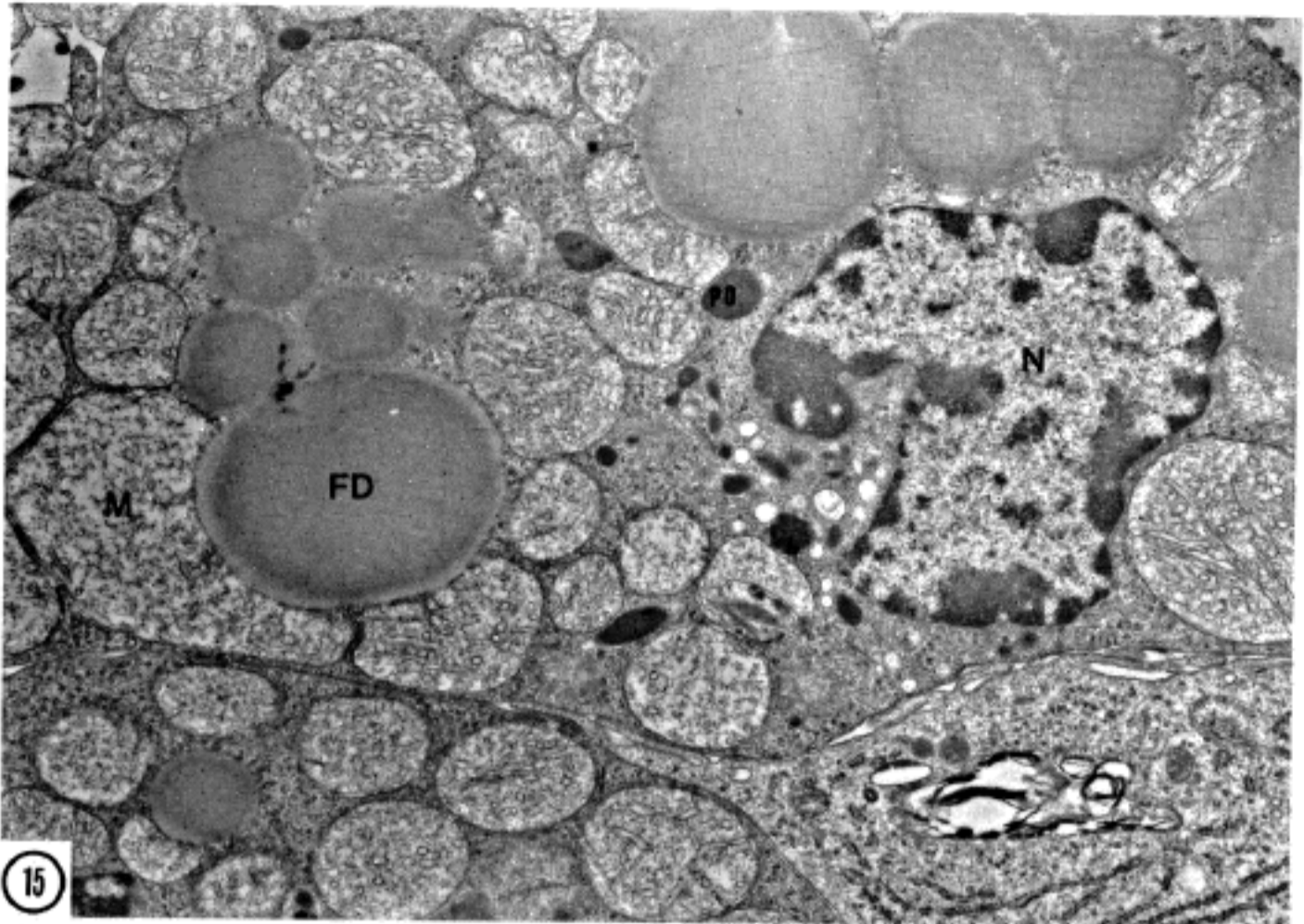


Fig. 15. Higher magnification. Nuclear membrane indentations were evident. Increased peroxisome and appearance of vacuoles in the adjacent nuclear membrane were seen in group II. Uranyl acetate and lead citrate, x 5,300.

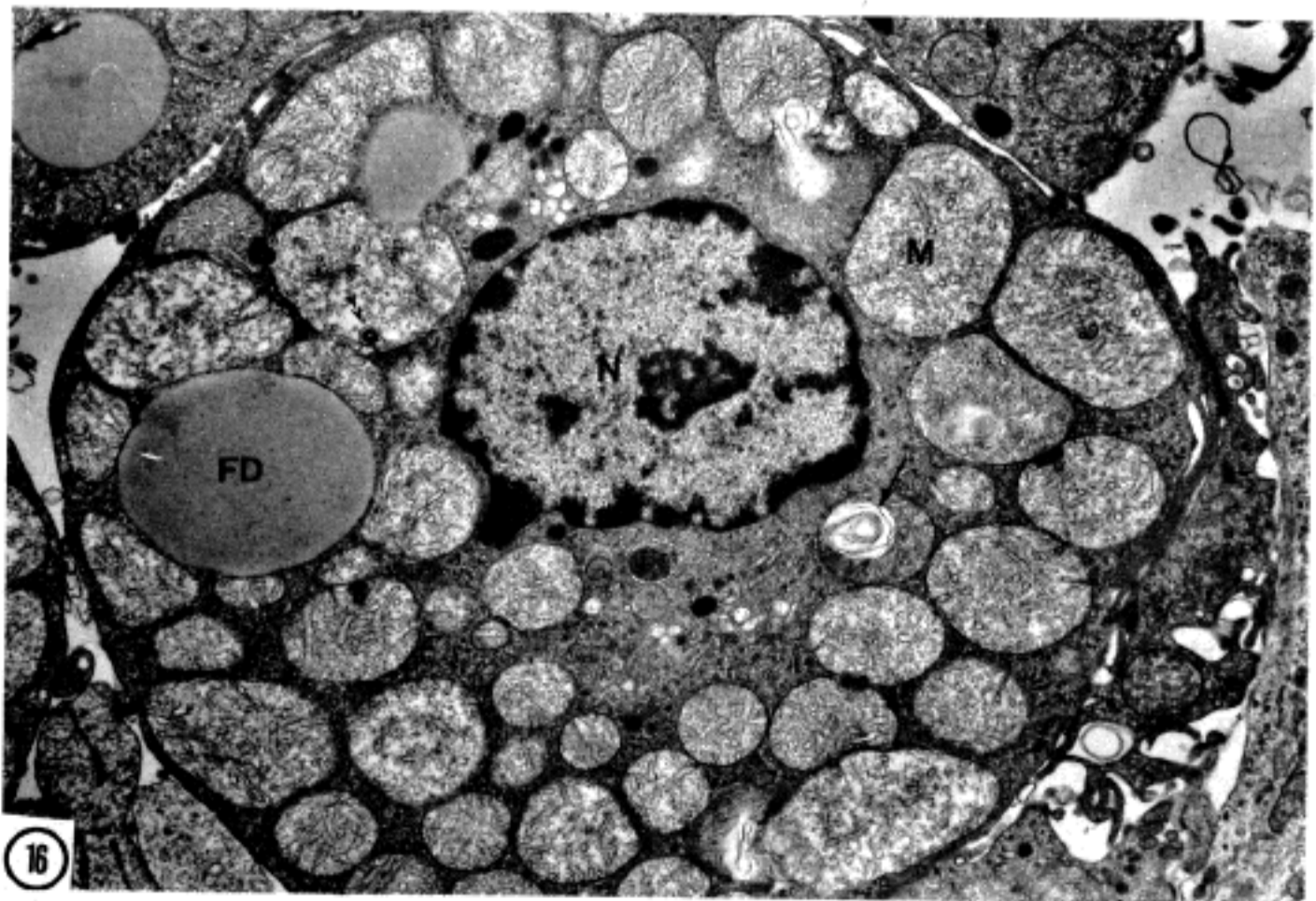


Fig. 16. Prominent nuclear membrane indentation and mitochondrial changes were evident. Intramitochondrial changes showed double membrane rings (arrow), myelin figure formations in the matrix and focal destruction of mitochondrial membrane in group III. Uranyl acetate and lead citrate, x 2,800.

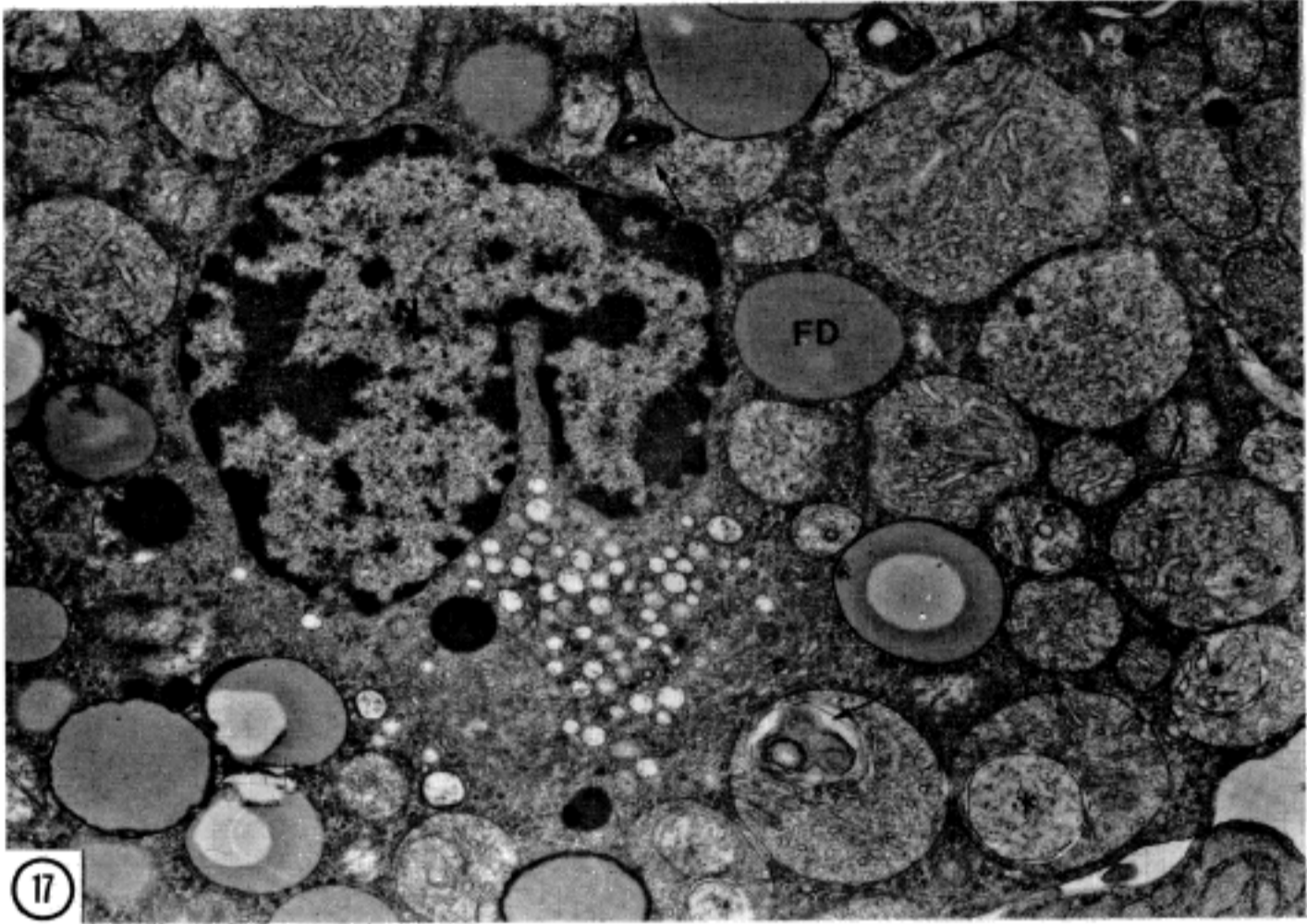


Fig. 17. Prominent double membrane ring formations (\*) and myelin configurations (arrow) were seen in group III. Uranyl acetate and lead citrate, x 5,300.

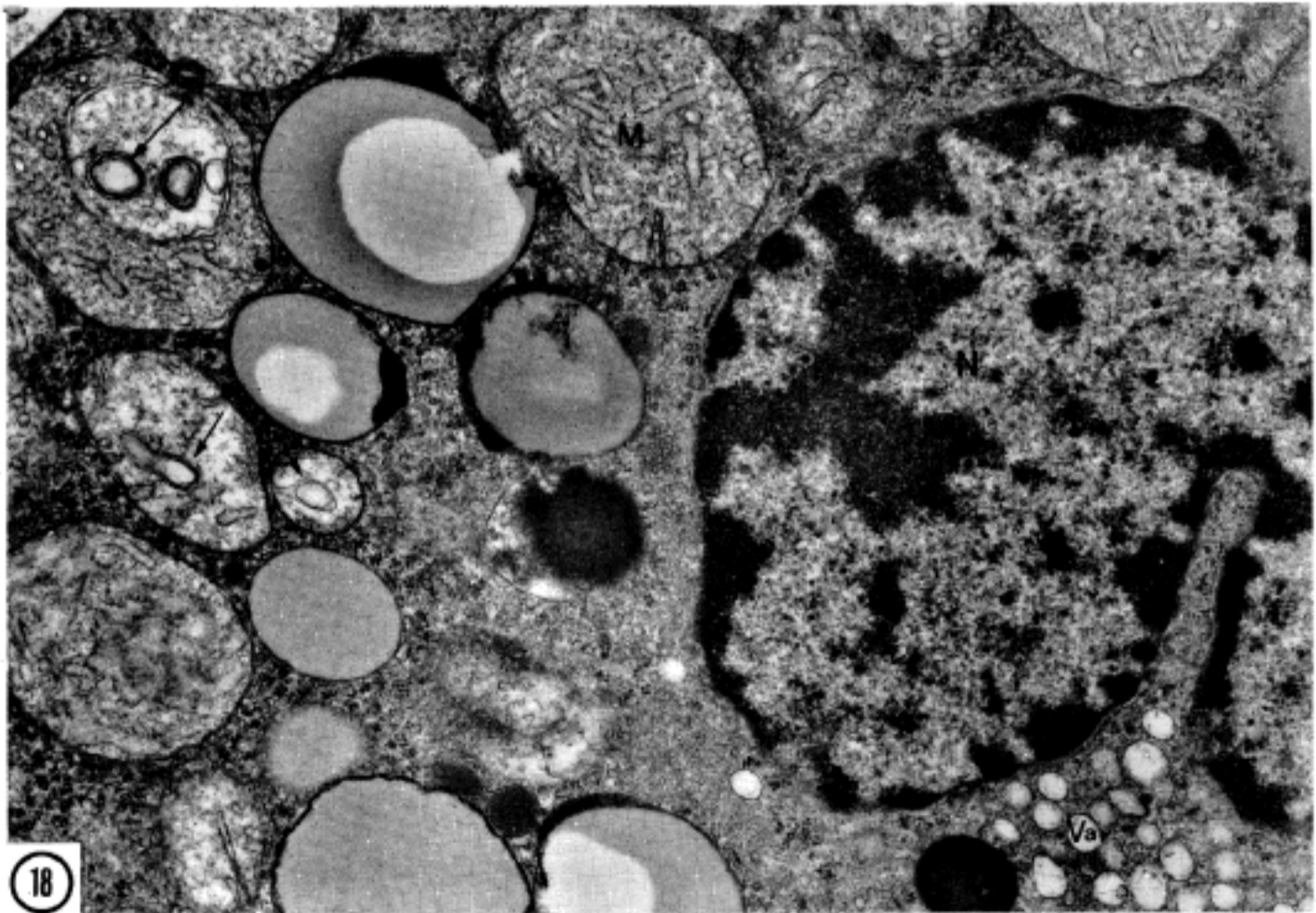


Fig. 18. Higher magnifications of double membrane ring formations (arrow) and fatty changes in the mitochondrial matrix (\*) in group III. Uranyl acetate and lead citrate, x 8,000.

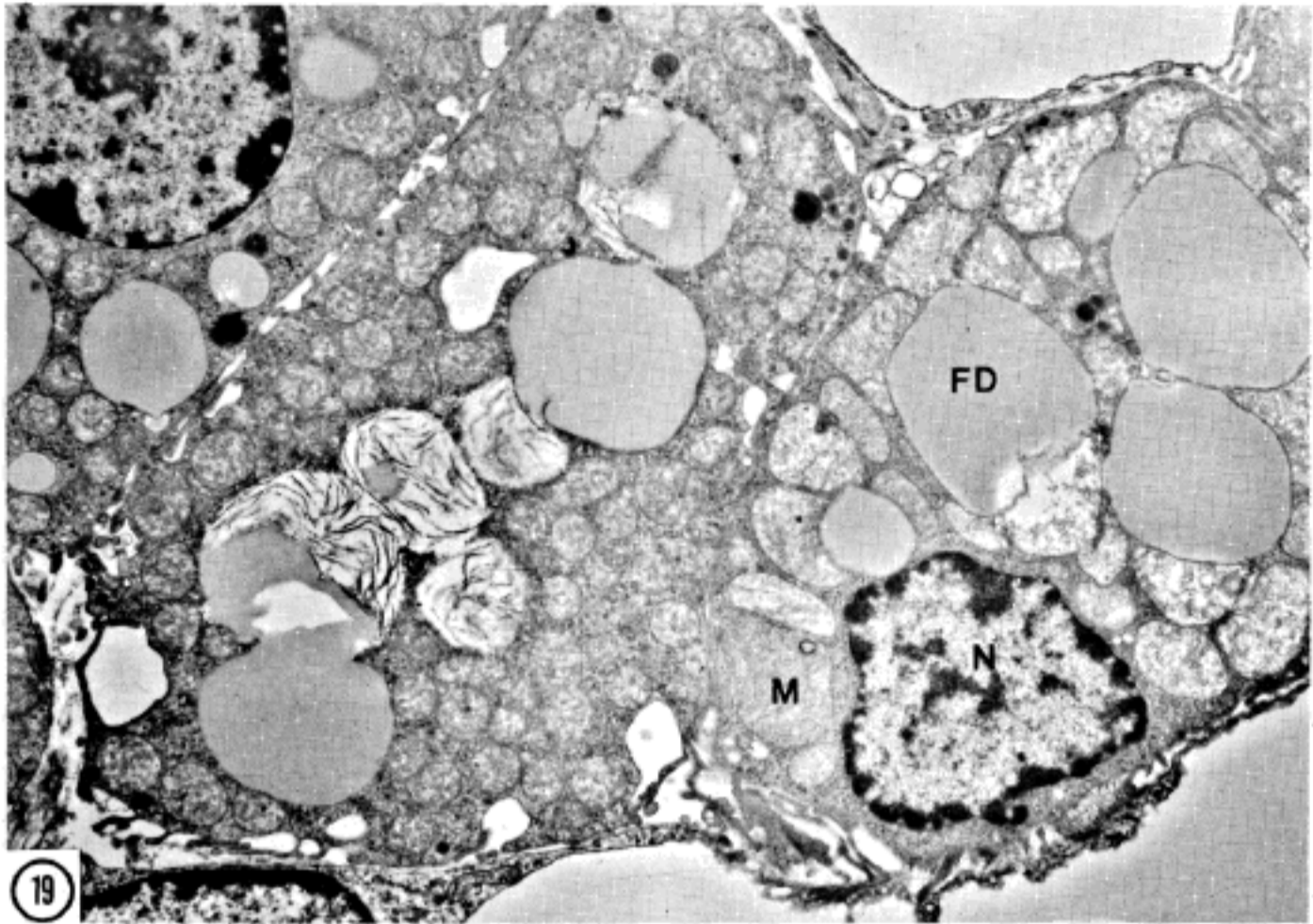


Fig. 19. Fatty changes of myelin figures in mitochondria in group III. uranyl acetate and lead citrate, x 2,800.

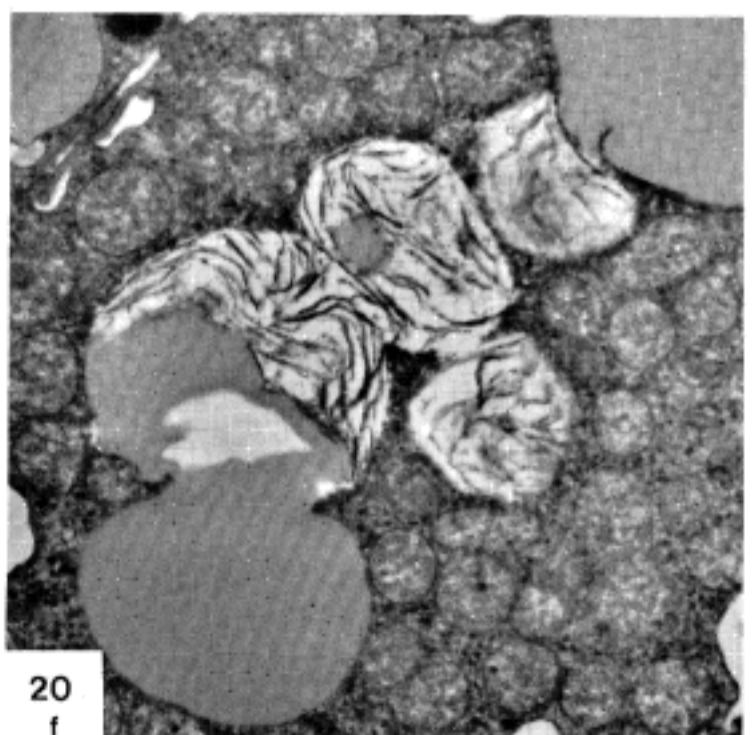
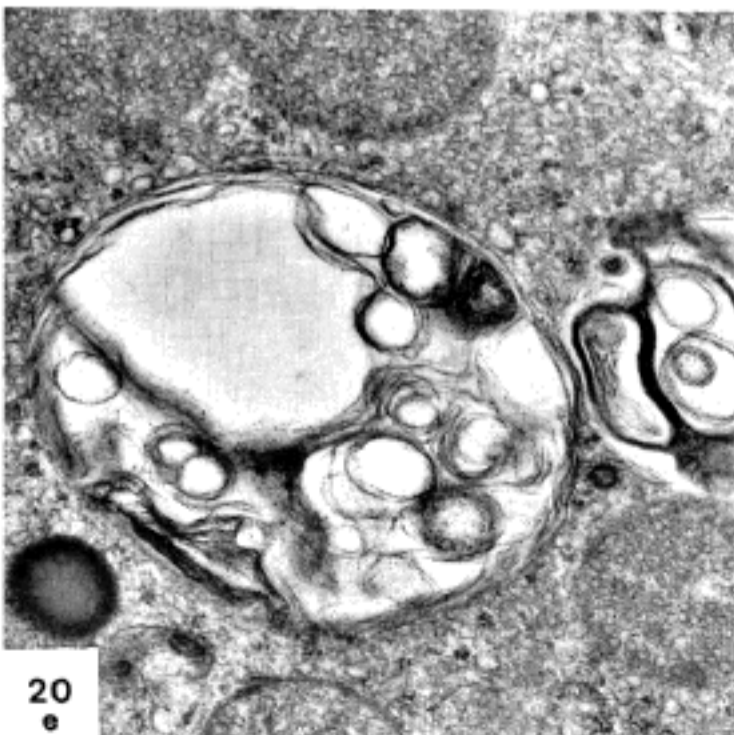
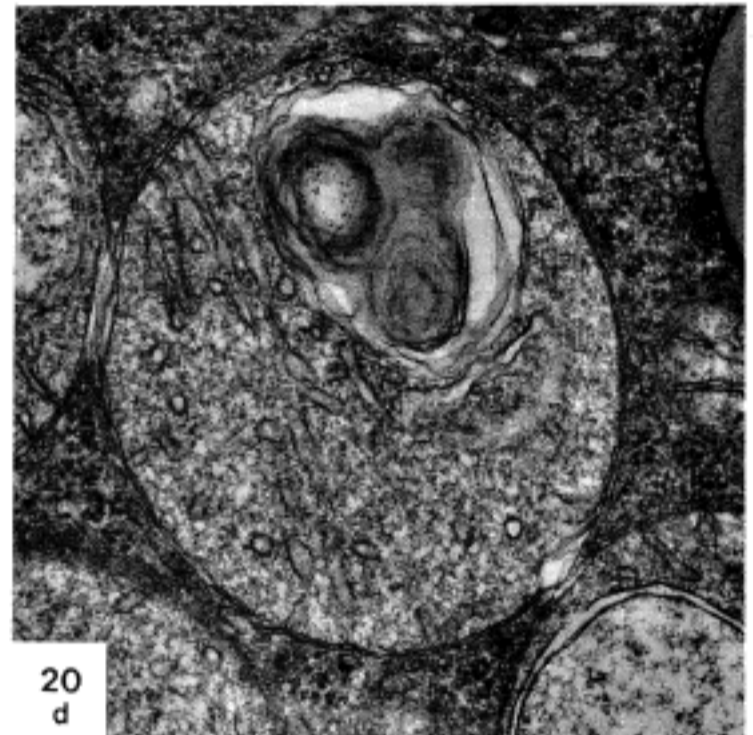
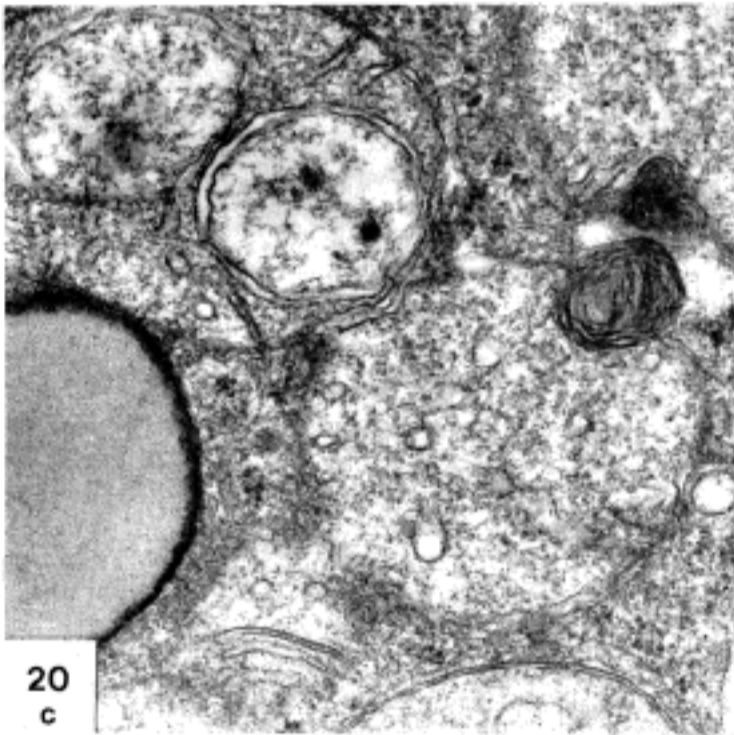
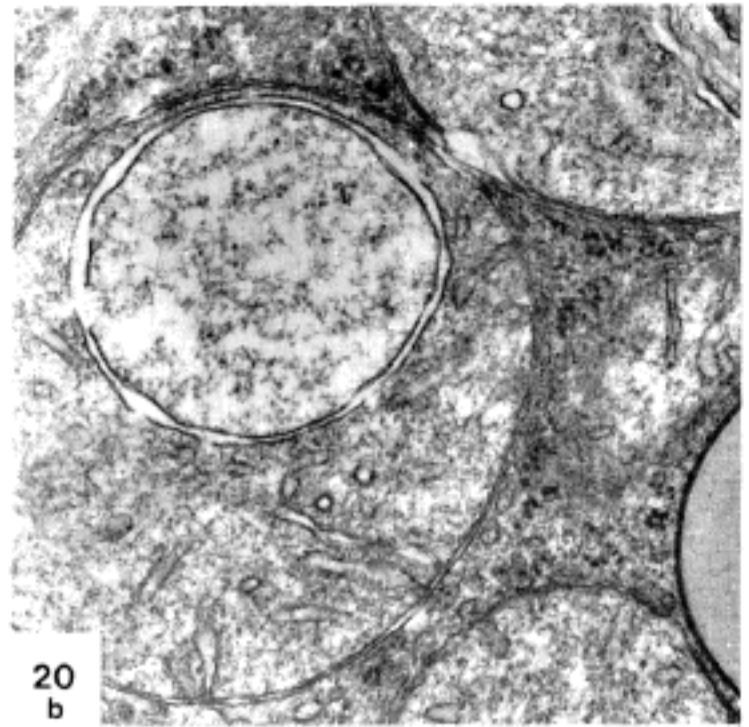
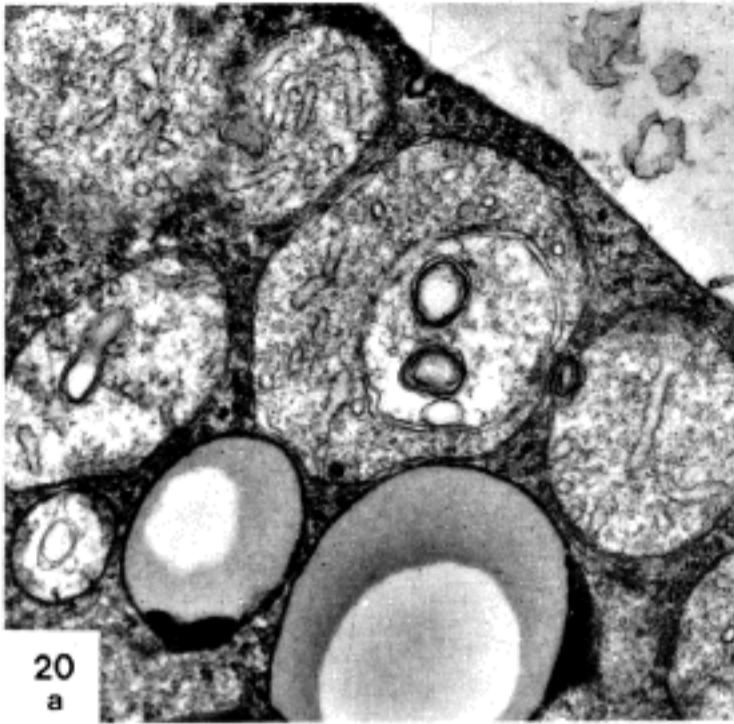
syndrome을 나타내는 환자에 o, p'-DDD를 투여하여 연구한 결과 사립체내 스테로이드 호르몬에 관여하는 11-hydroxylase와 18-hydroxylase의 활성도를 억제시킴으로서 cortisol의 분비를 저하시킨다고 보고하였다. 그러나 Cazorla등<sup>2)</sup>은 o, p'-DDD를 개에 투여하여 실험한 결과 o, p'-DDD는 G6PD (glucose-6-phosphate dehydrogenase)를 억제시킴으로서 NADPH의 생성이 안되어 결국 스테로이드 합성과정인 수산화(hydroxylation)가 장애를 받아서 스테로이드 합성에 장애를 초래한다고 보고하였다.

이와 같이 o, p'-DDD는 cortisol합성에 대하여 직접적인 영향을 미쳐 합성장애를 가져올 뿐 아니라 부신피 밖에서도 cortisol의 대사에 변형을 초래<sup>3)</sup>하여 17-hydroxycorticosteroid 축적을 무의미하게 하기도 한다고 알려져 있다. 많은 연구자들은 o, p'-DDD가 개의 부신피에는 독성을 현저하게 나타내지만 백서에서는 별다른 기능적변화나 형태학적 변형을 초래하지 않는다고<sup>2,4-6)</sup> 하였으나 Moore<sup>17)</sup>, Kruger<sup>15)</sup>는 o, p'-DDD가 백서의 부신피에서도 현저한 형태학적 변형을 초래하는 것을 관찰하였는데 o, p'-DDD가 주로 변형을 초래하는 세포내 소기관은 속상대의 사립체이었다. 즉 사립체의 부종과 사립체

막의 변성 및 과열 그리고 사립체능의 소실, 사립체 기질내 electron dense한 이중막을 지닌 구조물의 출현과 myelin 형태물질의 형성 그리고 사립체 기질내에 지질 소적 형성 등이 관찰되었다고 보고하였다.

본 실험에서도 현저한 형태학적 변형을 초래하는 세포내 소기관은 사립체로서 매우 다양한 형태학적 변형을 나타내었다. 즉 사립체내에 이중막으로 된 ring이 출현하고(Fig. 20a), 이들은 점차 커져서 나타나기도 하였으며(Fig. 20a) 사립체막에 myelin 형태의 물질이 형성되어 사립체 막에 myelin 형태의 물질이 형성되어 사립체 막이 파열되거나(Fig. 20c), myelin 형태의 물질의 사립체내에서 형성되어 다른 사립체에 연결되어 있는 형태가 관찰되며(Fig. 20d) 사립체능이 완전소실되어 결과적으로는 myelin 형태의 물질이 형성되고(Fig. 20e) myelin 형태의 사립체가 점차 지방성 물질로 변형해 가는 양상(Fig. 20f)이 관찰 되었으며 마지막으로 칼슘이라고 여겨지는 물질의 침착(Fig. 20g)으로 인하여 세포는 괴사에 이르렀는데 이러한 변형들은 특히 III군에서 현저하였다.

사립체는 전술한 바와 같이 세포대사에 필요한 에너지인 ATP를 생산하는 세포질내 소기관<sup>18)</sup>이며 특히 부신피



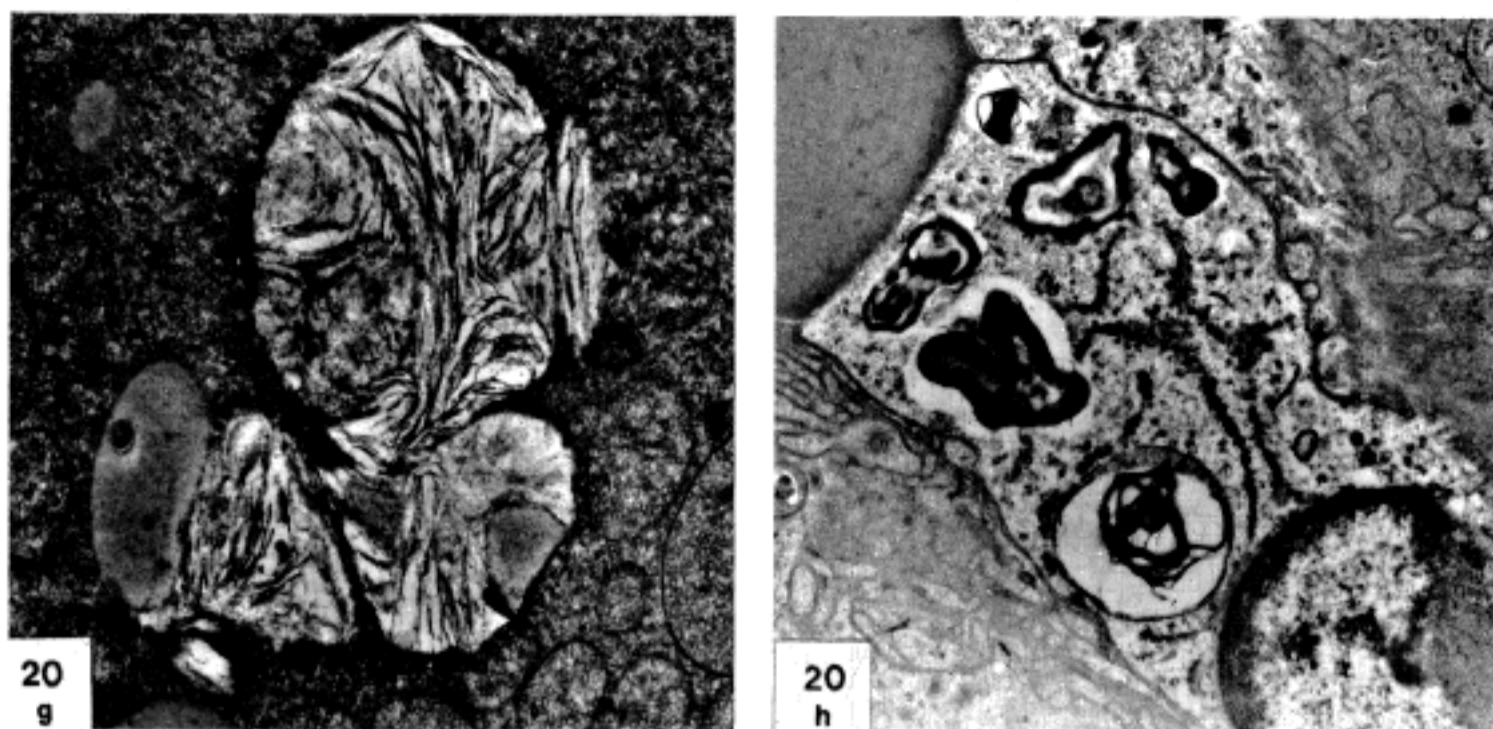


Fig. 20. Sequence of mitochondrial changes in group III.  
 a, b: Double membrane ring formations and disappearance of mitochondrial cristae.  
 c, d: Myelin figure formations in mitochondrial membranes and mitochondrial matrix.  
 e: Complete effacement of normal mitochondrial matrix and replaced by myelin figure.  
 f, g: Fatty changes of myelin figures in the mitochondrial matrix.

의 속상대에서의 사립체는 스테로이드 호르몬을 합성하는데 필요한 효소는 물론 수산화(hydroxylation)를 시키는데 필요한 NADPH의 형성도 이루어지며 형태학적으로는 특이하게 tubulovesicle한 구조를 띄고<sup>19,20)</sup> 있다. 따라서 전술한 사립체의 변성은 스테로이드 호르몬의 합성에 손상을 가져올 수 있다고 추측된다. 그러나 *o, p'*-DDD가 어떤 기전으로 부신피질 속상대의 사립체에 대하여 선택적으로 독성을 초래하는지는 여전히 알 수 없다고 생각된다. 그러나 *o, p'*-DDD를 각 용량별로 투여 하였을 때 300 mg/kg를 투여한 군에서는 사립체의 변성이 확실하게 관찰 되었으며 결국에는 사립체기질내 칼슘침착이 이루어져 세포가 괴사에 이르는 초미형태학적 소견이 관찰되는 것으로 보거나 또는 세포의 괴사 과정에서 나타나는 사립체막이 다른 사립체 막으로의 herniation이 관찰되는 점 그리고 사립체 기질내 기질 성분이 관찰되는 등으로 미루어 사립체내 병변은 결국 세포대사에 필요한 에너지 공급의 결손으로 말미암아 결국 세포괴사가 초래된다고 여겨진다.

사립체의 형태학적 변형이 초래되어 ATP의 형성이 떨어지거나 억압되면 세포내 대사에 기능 장애가 초래<sup>26)</sup> 되어 세포막의 유지가 어려워져 결국  $Ca^{++}$ ,  $Na^+$ , 물 등이 세포내로 유입되어 세포부종이 초래되고<sup>27)</sup> 즉시 원인 제거가 일어나지 않을 때 세포막의 손상이 초래되고<sup>28)</sup>

사립체내에  $Ca^{++}$  등의 침착이 이루어져<sup>29)</sup> 세포가 괴사에 빠지는 것은 잘 알려진 세포손상의 기전이다.

본 실험에서 관찰된 핵막의 변화역시 III군에서 심한 변화를 보였다. 즉 핵막의 심한 함몰과 함몰된 부위의 세포질내 공포형성과 염색질응집 등의 소견으로 이러한 소견 역시 세포질내 에너지 공급이 중단될 때 나타나는 변화중의 하나이다.

한편 사립체 손상에 따른 부신피질내에서의 스테로이드 호르몬의 합성장애에 대한 명확한 근거는 뇌하수체에 대한 항 ACTH 항체에 대한 면역조직화학적 검색으로 증명할 수 있었다. 즉 III군 (*o, p'*-DDD를 300 mg/kg 투여한 군)에서 부신피질 속상대의 세포가 확실한 괴사를 초래한 백서의 뇌하수체에서의 ACTH분비 세포는 그 숫자가 훨씬 증가되어 있었으며 세포의 염색도 훨씬 증가되어 나타났다. 또한 I군과 II군에서도 ACTH분비 세포는 대조군에 비하여 훨씬 증가된 양상을 보여 주었다. 따라서 이러한 면역조직화학적 관찰결과는 부신피질 속상대의 손상에 따르는 시상하부-뇌하수체-부신피질의 축에 의한 ACTH분비의 증가<sup>30)</sup> 결과라 생각되며 *o, p'*-DDD에 대한 부신피질 속상대세포의 파괴를 반영해주는 간접적인 증거라 여겨진다.

따라서 상기한 소견을 종합해 볼 때 *o, p'*-DDD가 부신피질 속상대의 사립체에 미치는 형태학적 소견을 종합하면 다



음과 같다. *o, p'*-DDD는 백서 부신 속상대의 사립체에 대하여 선택적으로 손상을 초래하였는데 어떠한 기전에 의해서 선택적으로 이 장기에 대하여 독성을 나타냈는지 그 명확한 기전은 알 수 없으나 사립체의 구조에 특이한 변형 즉 이중막의 구조를 지닌 물질의 침착, 사립체능의 소실, myelin 형태물질의 침착, 사립체막의 파열, 사립체 기질내 미세지방적 침착, 그리고 사립체기질내 칼슘의 침착 등의 소견 등이 사립체에 관찰되었다. 그러므로 *o, p'*-DDD는 부신피질 속상대의 사립체에 대한 특이한 독성이 있음이 확인되었으며 이로 인한 세포의 괴사는 최종적으로 사립체내에  $Ca^{++}$ 의 침착으로 이루어짐을 확인할 수 있었다.

그러나 본 실험적 연구에서는 *o, p'*-DDD가 부신 피질 속상대를 제외한 다른 장기에서의 독성에 대한 초미형태학적 변화는 연구하지 못하였으며 이에 대한 연구, 특히 간장, 신장, 위장관, 폐장 그리고 골수에 대해서도 병리조직학적 검색이 이루어져 *o, p'*-DDD에 대한 독성과 세포내 작용기전이 광범위하게 밝혀져야 할 것으로 생각된다.

### 결 론

*o, p'*-DDD가 백서부신피질 속상대의 세포손상을 초래하는 기전을 초미 형태학적인 측면에서 관찰하고자 *o, p'*-DDD를 유기용매제인 corn oil에 용해시킨 후 75 mg/kg, 150 mg/kg, 300 mg/kg을 백서에 경구투여한 후 28일 후에 도살하여 양측 부신피질에 대한 초미형태학적 변화와 이들 세포손상에 따른 뇌하수체의 ACTH 분비 세포의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 백서에 *o, p'*-DDD를 투여한 후 백서의 체중은 대조군에 비하여 통계적으로 유의있는 감소를 나타냈다.
- 2) 광학현미경적 소견상 75 mg/kg을 투여한 군에서의 구상대는 특이한 변화가 없었으며 속상대에서는 세포질내 지방소적이 증가하였다. 150 mg/kg을 투여한군에서는 다수의 미세한 지방소적이 증가되었으며 핵이 농염된 곳도 관찰되었으며 특히 핵막의 함요가 관찰되었다. 300 mg/kg을 투여한 군에서 지방적 침착이 증가하였고 세포의 핵은 심한 함요와 함께 농염된 핵이 관찰되었으며 핵붕괴가 관찰되었다.
- 3) 뇌하수체의 ACTH에 대한 면역화학적 검사상

ACTH를 분비하는 세포의 숫자 및 염색정도는 *o, p'*-DDD를 투여한 용량이 많을수록 증가하였다.

4) 전자현미경 소견상 *o, p'*-DDD를 75 mg/kg 투여군에서는 세포질내에 지방적과 peroxisome이 증가하였으나 사립체의 변형은 관찰되지 않았다. 150 mg/kg을 투여한 군에서는 지방적이 증가하였으며 이들 지방적은 서로 집락을 형성하면서 큰 지방적을 만들며 이들 지방적은 주위의 사립체를 압박하여 일부 함요가 관찰되었으며 세포질에는 미세한 공포가 관찰되었다. 300 mg/kg은 투여한 군에서는 핵막의 함요가 현저하였으며 사립체는 특징적으로 이중막을 지닌 윤상의 물질의 침착이 사립체 기질에 나타났으며, 사립체능은 소실되었고 myelin형태의 물질이 다수 관찰되었다. 사립체의 기질은 점차 지방적으로 채워졌으며 심한 병변부위에서는 사립체내에 칼슘이 침착되었고 국소적인 석회화 현상이 초래되었다.

### REFERENCES

- 1) Nelson AA, Woodward G: Severe adrenal cortical atrophy (cytotoxic and hepatic damage produced in dogs boy feeding 2, 2-is-(parachlorophenyl)-1, 1-dichloroethane (DDor TDE). *Arch Pathol* 48:387, 1949
- 2) Cazorla A, Moncloa F: Action of 1, 1-dichloro-2-*p*-chlorophenyl-1-2-0-chlorophenylethane on dog adrenal cortex. *Science* 136:47, 1962
- 3) Bledsoe T, Island DP, Ney RL: An effect of *o, p'*-DDD on the extraadrenal metabolism of cortisol in man. *J Clin Endocrinol Metab* 24:1301-1311, 1964
- 4) Vilar O, Tlilner WW: Effects of *o, p'*-DDD on histology and 17-hydroxycorticosteroid output of the dog adrenal cortex. *Endocrinology* 65:80-86, 1965
- 5) Hart MM, Straw JA: Effects of 1-(*o*-chlorophenyl)-1-(*p*-chlorophenyl)-2, 2-dichloroethane and puromycin on adrenocorticotrophic hormone induced steroidogenesis and on amino acid incorporation in slices of dog adrenal cortex. *Biochem Pharmacol* 20: 257-263, 1971
- 6) Hart MM, Straw JA: Studies on the site of action of *o, p'*-DDD in the dog adrenal cortex. 1. Inhibition of ACTH-mediated pregnenolone synthesis. *Stereoids* 17:1217-1224, 1978
- 7) Touitou YA, Bogdam A, Luton JP: Changes in

- corticosteroid synthesis of the human adrenal cortex in vitro, induced by treatment with o,p'-DDD for the human adrenal cortex in vitro, induced by treatment with o,p'-DDD for Cushing's syndrome; Evidence for the sites of action of the drug. *J Steroid Biochem* 9:1217-1224, 1978
- 8) **Schteingart DR, Cash R, Coon J:** Aminogluthimide and metastatic adrenal cancer. *JAMA* 198: 143-146, 1966
  - 9) **Bergental DM, Hertz R, Lipsett MB:** Chemotherapy of adrenocortical cancer with o,p'-DDD. *Ann Intern Med* 53:672-682, 1960
  - 10) **Hutter AM, Kayhoe DE:** Adrenal cortical carcinoma, results of treatment with o,p'-DDD in 138 patients. *Am J Med* 41:581-592, 1966
  - 11) **Hajjar RA, Hickey RC, Samaan NA:** Adrenal cortical carcinoma. A study of 32 patients. *Cancer* 5:544-559, 1975
  - 12) **Slooten HV, Moolenaar AJ, Seters APV, Smeenk D:** The treatment of adrenocortical carcinoma with o,p'-DDD: Prognostic simplification of serum level monitoring. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20:47-53, 1984
  - 13) **Lubitz JA, Freeman L, Okun R:** Mitotane use in inoperable adrenal cortical carcinoma. *J Am Med Ass* 223:1109-1112, 1973
  - 14) **Boven E, Vermorken JB, Slooten HV, Pinedo HM:** Complete response of metastasized adrenal cortical carcinoma with o,p'-DDD. *Cancer* 53:26-29, 1984
  - 15) **Kruger R, Uhl UJ, Voigt KH:** Fine structural effects of a DDT derivative on a rat adrenocortical carcinoma. *Histochemical Journal* 16:406-408, 1984
  - 16) **Hart MM, Reagan RL, Adamson RH:** The effect of isomers of DDD on the ACTH-induced steroid output, histology and ultrastructure of the dog adrenal cortex. *Toxicol Appl Pharmacol* 24:101-113, 1973
  - 17) **Moore RN, Penney DP, Averill KT:** Fine structural and biochemical effects of aminogluthimide and o,p'-DDD on rat adrenocortical carcinoma, adrenals and adrenals. *Anat Record* 198:11-124, 1980
  - 18) **Lehninger R:** The molecular organization of mitochondrial membranes. *Adv Cytopharmacol* 1:199, 1971
  - 19) **Long JA:** The adrenal gland, In: *Histology. Cell and tissue biology.* Weiss L ed. 5th edition. The MacMillan Press, New York, 1983, p 1124
  - 20) **Fawcett DW:** *Histology.* 11th edition WB Saunders, Philadelphia, 1986, p 518
  - 21) **Millonig GA:** Further observation on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation in electron microscopy proc. 5th Int. Congr. Electron Microscopy. Academic press, New York 2:8, 1962
  - 22) **Reynolds ES:** The use lead citrate at high pH an electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208-214, 1963
  - 23) **Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S:** The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 27:1131, 1979
  - 24) **Bergental DM, Lipsett MB, Moy RH, Hertz R:** Regression of adrenal cancer and suppression of adrenal function in man by o,p'-DDD. *Trans Ass Am Phycns* 72:341-350, 1959
  - 25) **Gallagher TG, Fukushima DK, Hellman L:** The effect of ortho, para DDD on steroid hormone metabolites in adrenocortical carcinoma. *Metabolism* 11:1155-1161, 1962
  - 26) **Jennings RB:** Relationship between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog. *Am J Pathol* 92:187, 1978
  - 27) **Jennings RB, Reimer KA:** Lethal myocardial ischemic injury. *Am J Pathol* 102:241, 241
  - 28) **Farber, JL:** The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol* 102:271, 1981
  - 29) **Farber JL:** Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulation necrosis. *Lab Invest* 47:114, 1982
  - 30) **Eipper BA, Mains RE:** Structure and biosynthesis of proadrenocorticotropin endorphin and related peptides. *Endocrine Rev* 1:1, 1980

— Abstract —

**Effect of Lysodren® on the Ultrastructural Changes in the Rat Adrenal Cortex**

-Immunohistochemical staining for anti-ACTH antibody on the adenohipophysis-

**Ho Jong Chun, M.D., Hae Chang Cho, M.D.  
Hae Sook Song, M.D. and Kyu Ho Park, M.D.**

Department of Pathology, Medical College,  
Chosun University

The toxicity and adrenergic effect of o,p'-DDD, a derivative of the insecticidal DDT, on the adrenal cor-

tex were well known. It was known that the toxicity was based on the blocking of steroid biosynthesis when cholesterol was converted to pregnenolone. Lysodren® was also known to be capable of producing a regression of adrenocortical carcinoma and its metastases, and this drug became one of useful choice for the treatment of unoperable adrenocortical carcinomas. Recently, fine structural effect of o,p'-DDD on the adrenocortical carcinoma show that the mitochondria is the primary target organelle. o, p'-DDD was dissolved in corn oil and it was orally administered for 28 days to investigate the ultrastructural effects of zona fasciculata of rat adrenal cortex.

The results obtained were as follow.

1) The body weight was decreased after feeding o, p'-DDD.

2) Light microscopic examination showed no remarkable change except increased fine lipid droplets of zona fasciculata in group I (o,p'-DDD 75 mg/kg feeding). Moderately increased intracytoplasmic lipid droplets and pyknotic nuclei bearing membrane indentations were seen in group II (o,p'-DDD 150 mg/kg feeding). Large sized lipid droplet aggregates, pyknotic nuclei with severe nuclear membrane indentations and karyorrhexis in focal area were evident in group III.

3) Immunohistochemical staining for ACTH in pitui-

tary gland showed increasing number of ACTH secretory cell and increasing intensity of staining property according to the dosage of o,p'-DDD.

4) Ultrastructural examination showed increased intracytoplasmic lipid droplets and mild increased peroxisome. There was no remarkable ultrastructural changes in mitochondria in group I. Moderately increased lipid droplets and clusters formation, compressed mitochondria, partial disappearance of mitochondrial cristae, increased peroxisome and nuclear membrane indentations were seen in group II. In group III, nuclear membrane showed prominent indentation. Numerous cytoplasmic vacuolation, double membrane ring in mitochondria, disappearance of mitochondrial cristae, myelin figure formation in mitochondrial matrix, and fatty changes in mitochondrial matrix were seen.

These findings showed that the primary target organelle of attack by o,p'-DDD on zona fasciculata of adrenal gland in rat is mitochondria and it was developed from double ring formation in mitochondrial matrix.

---

**Key Words:** Toxicity of o,p'-DDD, Zona fasciculata, Ultrastructural changes, Mitochondria, Immunohistochemical staining, ACTH adenohypophysis

# Lysodren®이 흰쥐 부신피질 초미세형태에 미치는 영향

— 뇌하수체 전엽의 ACTH 분비의 변화에 관한 면역조직화학 연구 —

조선대학교 의과대학 병리학교실

전호종 · 조해창 · 송혜숙 · 박규호

## 서 론

살충제 DDDT의 한 변형유도체인 Lysodren®, 즉 화학명으로 *o, p'*-DDD [1,1-dichloro-2-(*o*-chlorophenyl)-2-(*p*-chlorophenyl)-ethane]는 부신피질에 작용하여 스테로이드 호르몬의 합성에 장애를 초래한다는 보고가 Nelson 등<sup>1)</sup>에 의하여 소개된 이후 부신에 대한 *o, p'*-DDD는 부신 피질 암종을 치료하는 화학요법제로서 이용되기에 이르렀으며, 최근에는 수술적 방법으로 근치가 불가능한 부신피질암종에 대한 치료 방법의 하나로<sup>13,14)</sup> *o, p'*-DDD가 많이 사용되고 있다.

*o, p'*-DDD가 부신피질, 특히 속상대(*zona fasciculata*)에 대하여 선택적으로 독성을 나타내는 정확한 기전은 잘 알려져 있지 않으나, Touitou 등<sup>7)</sup>은 *o, p'*-DDD가 사립체내에 11 hydroxylase와 18 hydroxylase의 활성도를 억제시킴으로서 스테로이드 합성에 장애를 초래한다고 하였으며 Kruger<sup>15)</sup>, Hart<sup>16)</sup>, Moore 등<sup>17)</sup>은 *o, p'*-DDD가 선택적으로 부신 속상대의 사립체에 대하여 형태학적 변형을 초래함으로써 이들 세포가 갖는 고유기능이 상실케 되며 또한 암종을 일으킨 종양세포에 대하여 종양세포 파괴효과를 초래한다고 보고하였다.

사립체는 세포질의 소기관으로서 "oxidative phosphorylation" 과정을 통하여 ATP (Adenosine triphosphate)를 생산하는 energy-transducing system<sup>18)</sup>이다. 부신피질의 속상대의 세포질에서 관찰되는 사립체는 스테로이드 합성에 관여하는 pregnenolone synthetase, 11  $\beta$ -hydroxylase, 18 hydroxylase와 같은 효소를 지니고 있으며<sup>19)</sup> 사립체능은 형태학적으로 특이하게 관상(tubulovesicular)의 형태<sup>20)</sup>를 취하고 있다.

*o, p'*-DDD는 이러한 부신피질 속상대의 사립체내에 존재하는 효소에 대한 억압작용을 나타냄으로서 스테로이드 호르몬 합성에 장애를 초래한다고는 하지만<sup>7)</sup> *o, p'*-DDD가 사립체내의 초미형태학적 변형을 초래하는 기전<sup>17)</sup>에 대해서는 명확히 알려져 있지 않다.

따라서 저자는 상기한 지견을 기초로 *o, p'*-DDD가 백서 부신피질 속상대의 사립체에 형태학적 변화를 초래하는 과정과 기전을 관찰하고자 *o, p'*-DDD를 일정기간 백서에 투여 한 후 부신에 대한 광학 및 전자현미경적 관찰과, 그리고 부신 속상대의 세포손상에 따르는 뇌하수체내 ACTH분비 세포의 반응을 면역조직학적 염색을 시행, 관찰하여 다소의 지견을 얻었으므로 이에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험동물은 일정기간 동일조건에서 사육한 13~15주령, 평균 체중 200 gm 정도의 Sprague-Dawley종 백서 수컷으로서 건강이 비교적 양호하다고 인정되는 것을 골라 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 약품인 *o, p'*-DDD는 Bristol Laboratories 제품 Lysodren® (mitotane)을 사용하였으며, 유기 용매제는 시중에서 구입한 동방유량사제품 해표식용유를 사용하였다. 또한 면역조직화학적 염색에 사용된 일차항체인 ACTH항체 (Rabbit anti-human ACTH) 및 이차항체는 Bio-Genex사 제품을, 그리고 발색시약 DAB는 Sigma 제품을 사용하였다.

### 2. 실험 방법

*o, p'*-DDD가 백서의 부신피질에 미치는 초미형태학적

변화에 관하여 연구할 목적으로 o, p'-DDD를 유기 용매 제인 식용유에 용해시킨뒤 (20 µg/1ml) 3군으로 나누어 백서 kg당 각각 75 mg(이하 I군 이라 약기함), 150 mg(이하 II군이라 약기함), 300 mg(이하 III군이라 약기함)을 polyethylene관을 사용하여 28일간 위장관내에 투여하였다. 이에 대한 대조군으로는 식용유만을 그 체중에 맞게 투여한 군(이하 IVa군이라 약기함)과 생리적 식염수를 투여한 무처리 정상군(이하 IVb군이라 약기함)으로 구별하였다. 각 군의 실험동물은 7마리의 백서를 사용하였다.

### 3. 체중측정

모든 실험백서는 처치 전후에 체중을 측정하였고 5일, 10일, 15일, 20일, 28일 간격으로 증감된 체중의 평균치를 비교 검토하였다.

### 4. 형태적 관찰

1) 광학현미경적 관찰 : 모든 백서는 해당처치가 종료된 후 24시간뒤 즉시 도살하여 양측의 부신을 절취, 후에 언급하게 될 전자현미경적 검사를 하기 위한 조직을 제외한 전체조직을 10%중성 포르말린액에 고정한 후 탈수과정과 파라핀 포매과정을 거쳐 Hematoxylin-Eosin (H & E) 염색을 실시하였다.

2) 전자현미경적 관찰 : 절취된 백서의 부신조직을 신속히 1mm<sup>3</sup>의 크기로 잘라서 2% glutaraldehyde 용액 (pH 7.4, 0.1 M cacodylate buffer, 온도 4°C)에 24시간 동안 전 고정된 뒤 Millonig법<sup>21)</sup>에 따라 만든 2% OsO<sub>4</sub> 용액 (pH 7.4 0.1 M cacodylate buffer)에 2시간 동안 후 고정하고 다시 동일한 cacodylate buffer로 세척하여 계열 에칠알콜로 탈수시킨 후 propylene oxide에 의해 침투시킨 후 Luft 방법에 의한 epon mixture로 포매하여 60°C에서 72시간동안 열중합시켰다. 이 Epon block을 1µm로 박절하여 1% toluidine blue에 염색한 후 광학현미경으로 관찰하여 특징적인 부위를 Diatome를 부착시킨 LKB microtome으로 초박절편을 만들어 Reynolds법<sup>22)</sup>에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색을 하여 JEM 100 CXII형 전자현미경으로 가속전압 80 KV하에서 관찰하였다.

3) 면역조직화학적 검사 : 백서를 도살한 직후 신속히 두 개강을 개방하여 뇌하수체를 적출한 후 10%중성 포르말린액에 고정하여 탈수과정과 파라핀 포매과정을 거

Table 1. Changes of body weight before and after treatment of o,p'-DDD on rat

Group	Dosage	Initial (gm)	Body weight (gm) after treatment							Difference (gm)*							Percent (%)**							P
			#5	#10	#15	#20	#28	#5	#10	#15	#20	#28	#5	#10	#15	#20	#28	#5	#10	#15	#20	#28		
I	75mg/kg(7)	192.0 ±5.63	183.1 ±6.25	190.6 ±5.92	192.3 ±5.85	196.7 ±2.65	202.4 ±5.19	-8.8 ±0.834	7.43 ±0.573	1.710 ±0.573	4.43 ±1.024	6.25 ±1.67	-4.69 ±0.567	3.98 ±0.473	2.27 ±0.321	2.27 ±0.531	3.39 ±1.429	< 0.001						
II	150mg/kg(7)	207.4 ±9.31	201.8 ±3.086	212.0 ±9.51	215.1 ±9.92	222.0 ±9.57	228.7 ±10.5	-5.57 ±0.89	11.0 ±1.76	2.29 ±1.375	7.71 ±1.381	5.68 ±1.223	-2.74 ±0.45	5.54 ±1.76	1.00 ±0.604	3.72 ±0.745	2.53 ±0.532	< 0.001						
III	300mg/kg(7)	265.2 ±9.45	257.7 ±6.54	278.0 ±9.45	270.3 ±9.82	283.3 ±8.94	279.3 ±14.6	-10.1 ±1.54	20.3 ±5.17	-7.6 ±1.33	1.33 ±0.85	-4.0 ±1.53	-3.76 ±0.577	8.05 ±2.24	-2.77 ±0.51	0.78 ±0.231	-0.36 ±0.486	< 0.001						
IV a:	Corn oil	189.0 ±14.9	198.0 ±13.2	215.6 ±14.6	215.3 ±16.9	221.0 ±18.6	234.1 ±18.9	9 ±2.08	7.6 ±2.33	9.6 ±2.98	5.6 ±0.93	9.6 ±1.45	4.98 ±1.58	4.39 ±0.89	4.64 ±2.84	2.52 ±0.82	4.44 ±0.75							
b:	No treat.	254.0 ±5.49	266.8 ±5.94	284.3 ±6.32	304.8 ±0.40	312.85 ±6.21	319.3 ±7.21	11.6 ±2.34	10.9 ±2.35	24.3 ±4.09	9.45 ±5.21	6.51 ±5.31	4.72 ±1.18	7.92 ±2.45	7.4 ±2.35	2.9 ±2.35	2.4 ±1.47							

All data are expressed as Mean ± S.E. Number of experiments are given in Parentheses.  
 \*o, p'-DDD 투여후 일정기간이 경과한 후의 체중과 실험전 체중과의 차이로 통계 처리한 수치  
 \*\*o, p'-DDD 투여후 일정기간이 경과한 후의 체중변화를 실험전 체중에 비하여 백분율 표시한 수치

쳐 조직을 절편한 후 ABC기법<sup>23)</sup>에 의하여 ACTH에 대한 면역조직화학적 검사를 실시하였다.

## 실험 성적

### 1. 체중 변화

각 실험군은 대조군에 비해 현저한 체중감소가 관찰되었는데 o, p'-DDD투여 5일 후에 특히 현저하였다. o, p'-DDD 용량을 300 mg/kg 투여한 III군에서의 체중감소 현상이 I, II군 보다 더 현저하여 5일째에는 실험전 체중의 3.76%, 15일째에는 2.77%, 28일째에는 1.36%의 체중감소가 관찰되었다(Table 1).

### 2. 병리조직학적 관찰

1) 광학현미경적 소견(H& E, Epon-toluidine blue 염색, Table 2)

(1) I 군 (o, p'-DDD 75 mg/kg 투여군) : 구상대에는 특이한 변화가 없었으며(Fig. 1), 속상대에도 광학현미

**Table 2.** Effect of o,p' -DDD on the cells in zona fasciculata of rat adrenal gland cortex by light microscopic examination

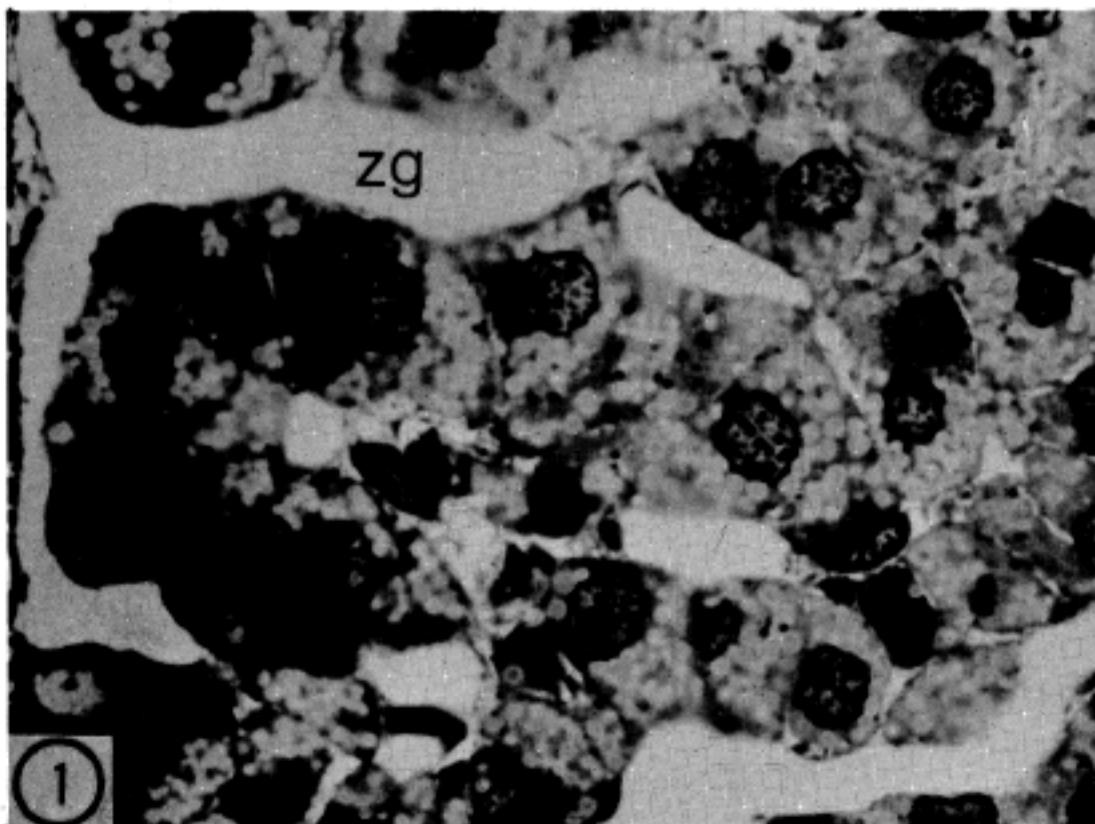
Group	I	II	III
Cell	(75mg/kg)	(150mg/kg)	(300mg/kg)
Cytoplasm	±	+	++
Lipid droplets			
Nucleus			
membrane	—	+	++
wrinkling			
pyknosis	—	+	++
Karyorrhexis	—	±	+
Karyolysis	—	—	+

—:absent    ±:mild    +:moderate    ++:severe

#### Key for abbreviation

FD : Fat droplet  
N : Nucleus  
Va : Vacuole  
ZG : Zona glomerulosa

M : Mitochondria  
PO: Peroxisome  
ZF: Zona fasciculata



**Fig. 1.** No remarkable changes in zona glomerula in group I (75 mg/kg feeding group). Semithin section, toluidine blue, x 1,000.

경적 소견이나 semithin 박절편에서도 특기할 만한 소견은 관찰되지 않으나(Fig. 2), 어느 부위에서는 대조군에 비하여 지질소적 등이 증가되었다(Fig. 3).

(2) II군 (o,p'-DDD 150 mg/kg 투여군) : 구상대세포의 세포질내에 다수의 미세한 지방소적등이 관찰되며 핵이 농염된 세포가 출현하였다(Fig. 4). 속상대 세포들은 매우 다양한 크기의 지방적으로 채워져 있고 핵막의 함요가 출현한 세포도 관찰되었다(Fig. 5).

(3) III군 (o, p'-DDD 300 mg/kg 투여군) : 속상대를 구성하고 있는 세포의 세포질에는 정상상태의 지방적과는 염색 성격이 다른 지방적들의 침착이 관찰되며, 이들 지방적들이 관찰되는 세포의 핵은 심한 함요와 함께 농염된 염색질이 관찰되었다(Fig. 6). 보다 현저한 변화가 관찰된 부위에서는 핵은 농염되어 세포질의 변연부위에 위치하여 있으며(Fig. 7), 핵붕괴가 관찰된 부위도 있었다(Fig. 8).

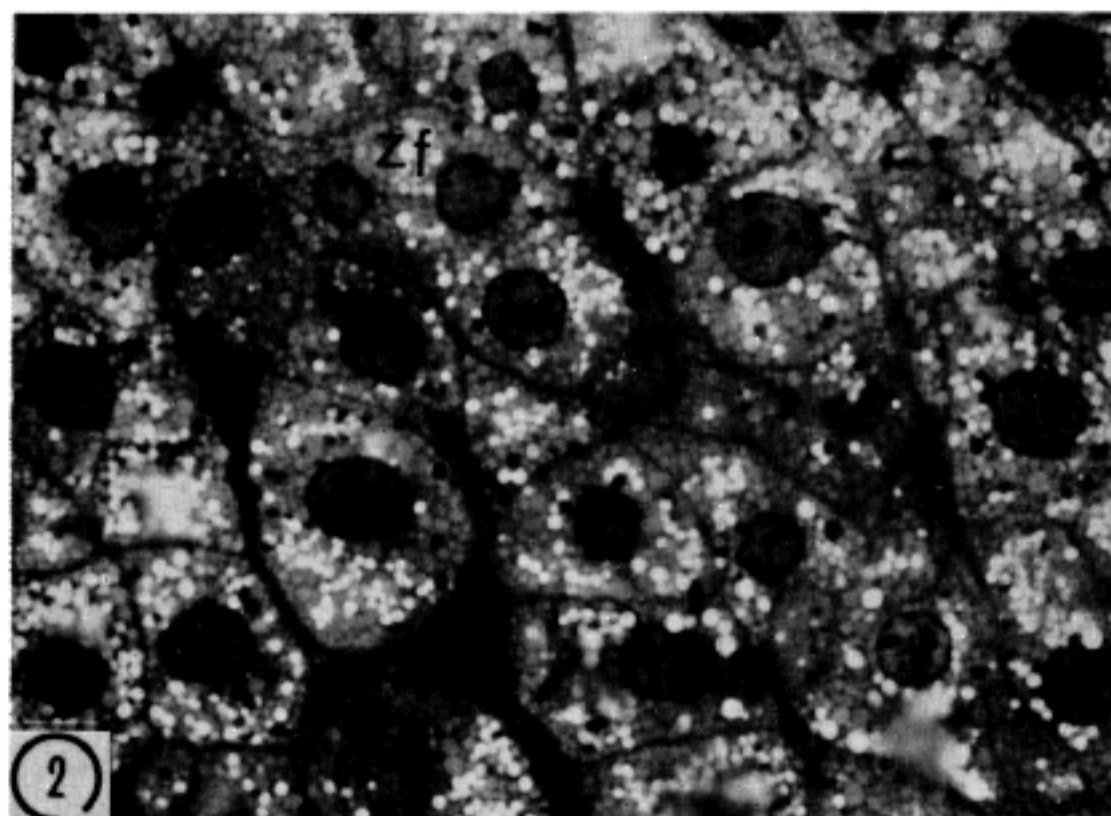


Fig. 2. Mildly increased lipid droplets in the cytoplasm of zona fasciculata in group I. Semithin section, toluidine blue, x 1,000.

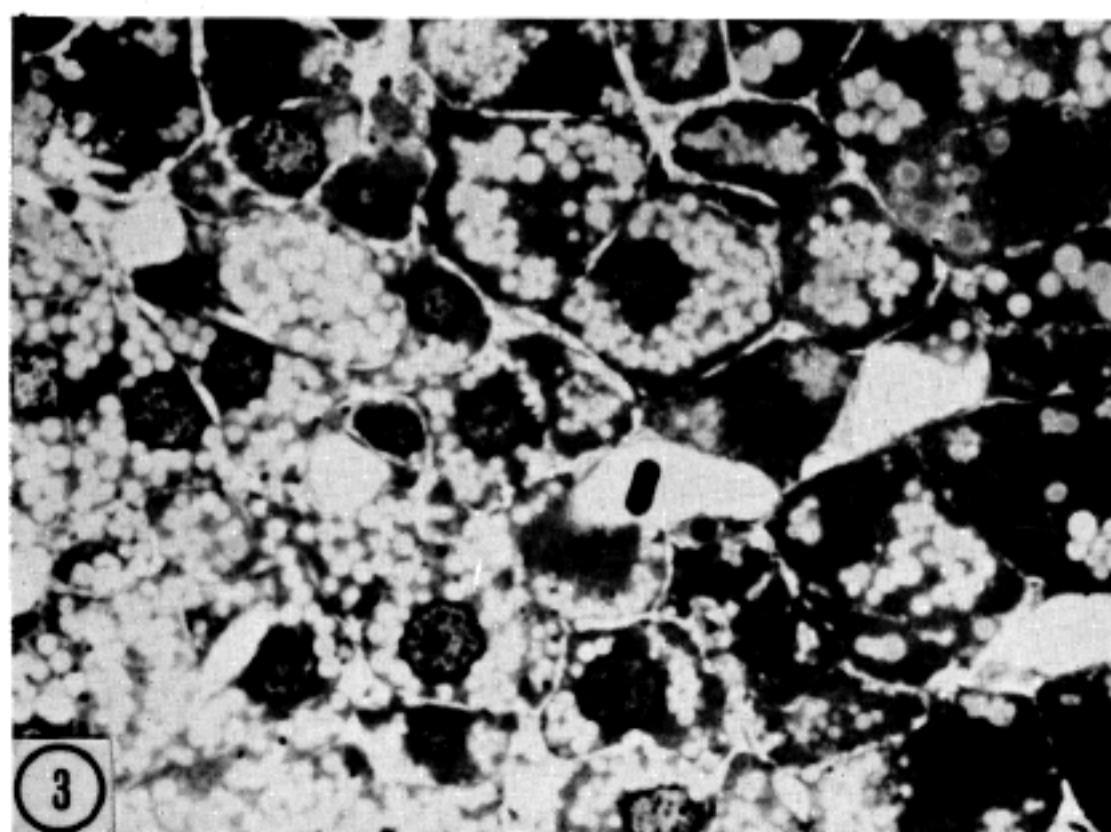


Fig. 3. Moderately increased lipid droplets in the cytoplasm of zona fasciculata in group I. Semithin section, toluidine blue, x 1,000.

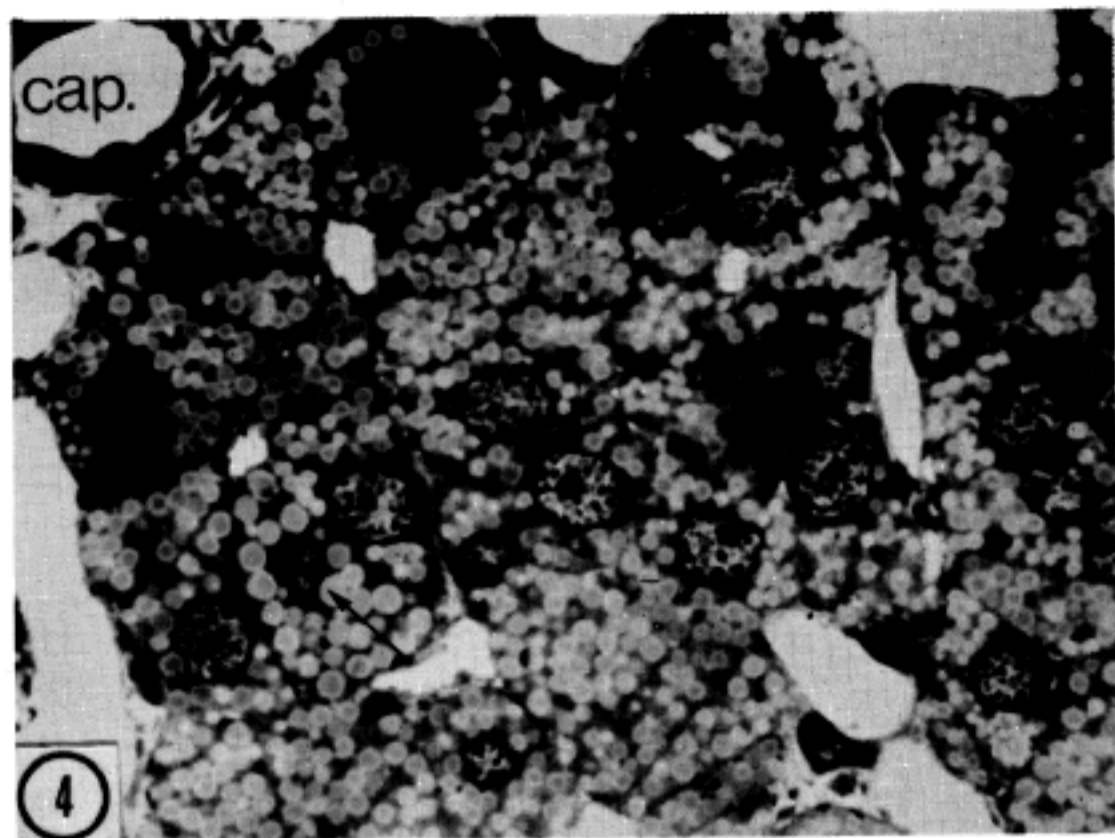


Fig. 4. Wrinkling of nuclear membrane and karyopyknotic changes were seen in group II (150 mg/kg feeding group). Semithin section, toluidine blue, x 1,000.

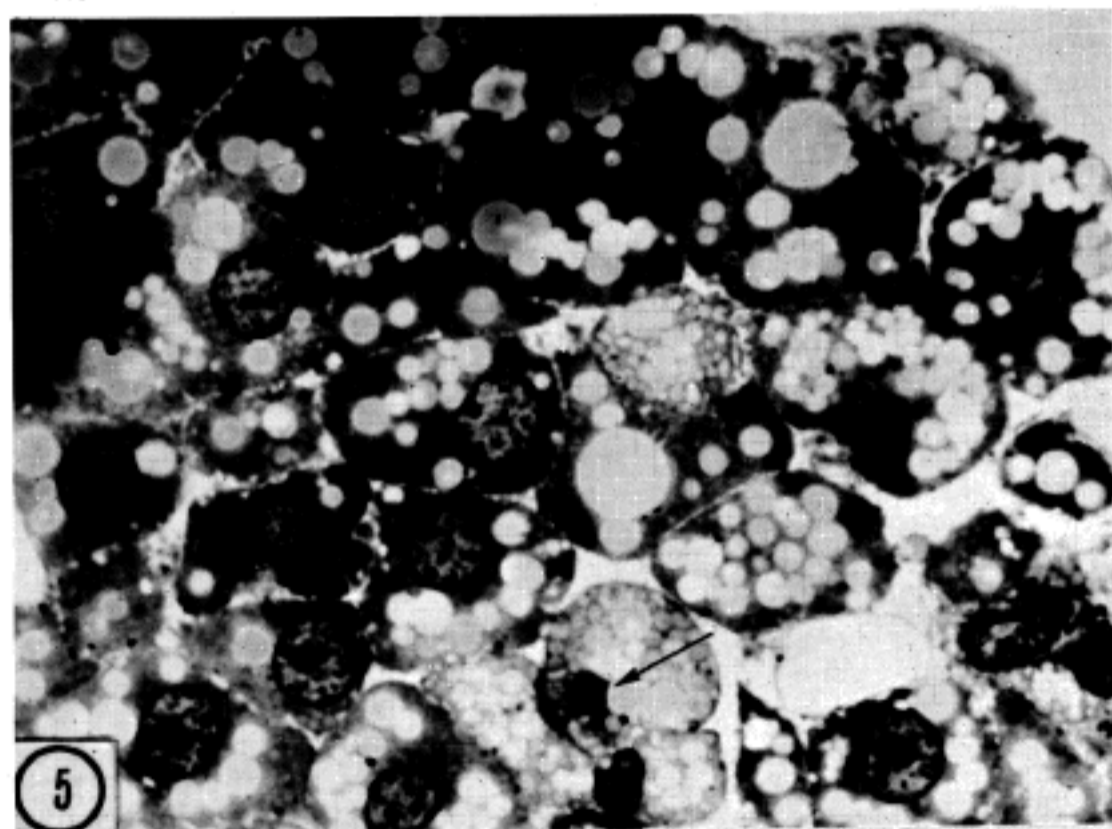


Fig. 5. Karyopyknotic changes were evident in group II. Semithin section, toluidine blue, x 1,000.

## 2) 면역조직화학적 검사소견 (Table 3)

(1) I군 (o, p'-DDD 75 mg/kg 투여군) ; 뇌하수체의 ACTH에 관한 면역조직 화학적 검사상 ACTH를 분비하는 세포는 대조군보다 약간 증가되어 나타났다(Fig. 9).

(2) II군 (o, p'-DDD 150 mg/kg 투여군) ; 뇌하수체의 면역조직화학적 검사상 ACTH 분비세포는 I군에 비하여 훨씬 증가되어 나타났다(Fig. 10).

(3) III군 (o, p'-DDD 300 mg/kg 투여군) ; 뇌하수체의 면역조직화학적 검사상 ACTH분비 세포는 II군에 비해 현저하게 증가되었으며(Fig. 11) 염색 정도도 훨씬 증가되어 나타났다(Fig. 12).

## 3) 전자현미경적 소견 (Table 4)

(1) I군 (o, p'-DDD 75 mg/kg 투여군) ; 속상대 세포의 세포질내에는 대조군에 비하여 미세 지방적이 증가되어 있으며 몇 개의 지방적들은 서로 집락되어 있었다.



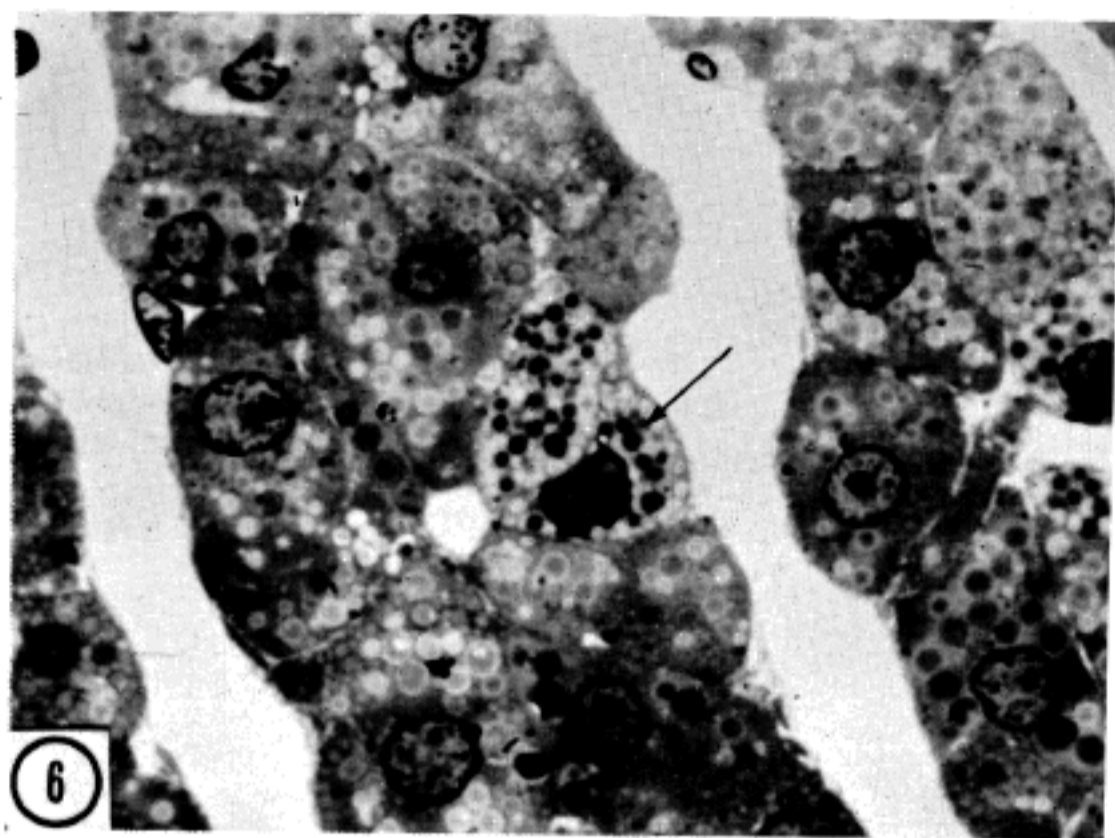


Fig. 6. Fatty changes and prominent nuclear condensations were evident in group III (300mg/kg feeding group). Semithin section, toluidine blue, x 1,000.

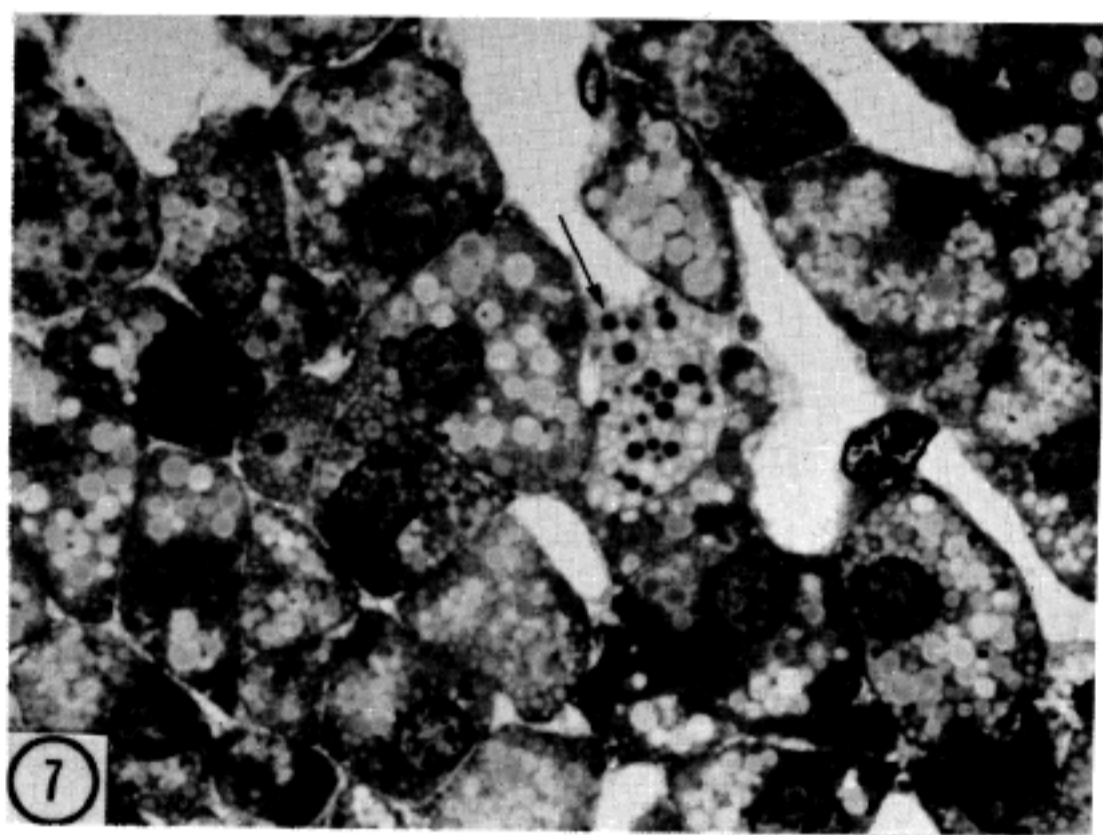


Fig. 7. Prominent cytoplasmic fatty changes were evident in group III. Semithin section, toluidine blue, x 1,000.

Peroxisome은 대조군에 비해 다소 증가하였으며, 조면 소포체 역시 증가되었다. 사립체에는 특이한 변화가 없었다(Fig. 13).

(2) II군 ( $\alpha, p'$ -DDD 150 mg/kg 투여군) : 속상대 세포의 세포질내에 역시 다수의 크기가 서로 다른 지방적이 증가되어 있으며 이들 지방적은 서로 커지면서 주위 사립체를 압박하여 사립체의 변형을 초래하였으며 이들 사립체 내부의 사립체능은 소실되었다(Fig. 14). Peroxisome은 현저히 증가되어 나타났으며 핵막은 뚜렷한

함요가 나타났고 핵막에 연한 세포질내에는 미세한 공포들이 관찰되었다(Fig. 15).

(3) III군 ( $\alpha, p'$ -DDD 300 mg/kg 투여군) : 속상대 세포의 핵에서는 현저한 함요가 관찰되었으며 이들 핵막에 연하여 다수의 공포들이 관찰되었다. 사립체내에는 다양한 크기의 이중막으로 된 소체들이 나타났으며 사립체능은 소실되고 myelin형태의 물질이 다수 관찰되었다.

특히 지방적들의 변연은 불규칙하였고 내부와 외부의 밀도가 서로 상이한 지방적이 관찰되었다(Fig. 16). 특