

Methotrexate (4-amino-N¹⁰-methyl pteroyl glutamic acid)

投與가 受胎白鼠 胎盤에 미치는 影響에 關한 病理組織學的 研究*

서울大學校 醫科大學 病理學教室

李仁哲·咸毅根·宋啓用*·張子俊**

서 론

Methotrexate (4-amino-N¹⁰-methyl pteroyl glutamic acid, 이하 MTX)는 1930년대 초 Willis (1931) 등에 의하여 활발히 개발되어 1945년 처음으로 합성되었고 1947년에 비로소 항암제로 이용되기 시작하였으며 특히 용모정결환에 탁월한 치료효과를 나타내고 있는 것은 널리 알려진 사실이다(Herz et al., 1958; Li et al., 1958; Brewer et al., 1964; Lewis et al., 1967).

MTX는 purine염기 또는 pyrimidine염기의 생합성을 저해함으로써 증식환(reproductive cycle)중 S-cycle시기의 세포를 공격하는 항대사성 제재로서 주요 작용기전은 엽산(folic acid)이 DNA를 합성하는 과정에서 엽산 환원효소(folic acid reductase)에 의하여 tetrahydrofolic acid로 환원되어야 하는데 MTX가 이 효소의 활성을 억제하므로써 세포의 재생산을 억제한다고 알려져 있으며 MTX는 골수세포, 태아조직세포, 피부상피, 장 및 방광 점막, 그리고 악성종양과 같은 증식성이 강한 조직에 특히 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다(Berlin, 1963).

Wilson 등(1979)은 MTX가 백서 태반을 신속히 통과하지 못하며 태아에서의 농도도 낮지만 소량으로도 태독성(embryotoxic)을 나타낸다고 했으며 더우기 Thiersch(1952)는 실제로 엽산길항제(folic acid antagonist)를 투여하여 치료적 유산을 시도하였고 신속히 성장하는 태아조직에서 엽산(folic acid)을 다량 필요로 하고 있다고 보고하였다.

Lauslahti 등(1971)은 태아사망에서 태반으로 인한 경우가 41.7%라고 보고하였고 Fujikura 등(1964)은 태아사망시 태반의 염증, 섬유소성 혈관폐쇄, 경색 및

혈전을 보고하였고 Ornoy 등(1976)은 풍진에 이환된 예에서 3월령의 태반손상이 약 57%, 5~6월령 태반손상이 약 55%이며 기형출현은 약 50%에서 관찰되어 태반은 태아의 발육과 성숙에 중요하며 사산이나 기형 등의 병리학적 연구와 임신손모울의 조사에서 태반의 병리조직학적 관찰은 중요하다고 하였다. 그러나 MTX 투여후에 정상태반의 용모상피에 미치는 연구는 찾아보기 어려운 실정이다.

그러므로 저자들은 MTX 투여후에 수태정상태반의 용모상피 및 간질에 어떠한 영향을 미치는가를 규명하기 위하여 태반의 병리조직학적 변화와 동시에 alkaline phosphatase (이하 alk. P.), acid phosphatase (이하 acid P.) NADH diaphorase 그리고 succinic dehydrogenase (이하 SDH) 등의 효소활성변동을 관찰하고 MTX 투여에 의한 태반손상과 아울러 이와 연관되는 임신손모울도 살펴보고자 본 실험을 시행하였다.

실험 방법

1. 실험동물

본실험에서는 체중이 230~250gm이 되는 Sprague-Dawley계 자백서 135마리를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 수태확인: 성숙한 자백서를 동일조건에서 사육하여 교미시킨 뒤 다음날 아침 질전이 생성됨을 확인하였고 이어 도말표본을 관찰하여 정자가 관찰되면 수태가 이루어진 것으로 간주하여 이날을 임신 제 1일로 계산하였다.

2) 실험군: 실험군은 크게 중도태반관찰군과 만삭태반관찰군으로 나누어 실험하였다. 중도태반관찰군은 5개의 소군, MTX투여량에 따라 대조군, 제 I 군(MTX 0.1mg), 제 II 군(MTX 0.2mg), 제 III 군(MTX 0.3mg), 제 IV 군(MTX 0.4mg)으로 나누고 각군을 다시 투여후 관찰시기에 따라 8일군, 11일군, 15일군으로 나누어 총 15군으로 나누었다. 각군에 3마리의 백서를 서시

* 본 연구는 1982년도 서울대학교 병원 특진연구비 보조(함의근)로 일부 충당되었음.

* 中央大學校 醫科大學 病理學教室

** 原子力 病院 病理科

총 45마리를 사용하였다. 반삭태반관찰군은 10개의 소군, 즉 MTX의 투여량에 따라 대조군 제 I 군(MTX 0.15mg), 제 II 군(MTX 0.3mg), 제 III 군(MTX 0.6mg), 제 IV 군(MTX 0.9mg), 제 V 군(MTX 1.2mg), 제 VI 군(MTX 1.5mg), 제 VII 군(MTX 1.8mg), 제 VIII 군(MTX 2.1mg), 제 IX 군(MTX 2.4mg)으로 나누고 각 군에 8~10마리의 백서를 써서 총 90마리를 사용하였다. MTX 투여량은 경구연속투여시 백서에서 LD₅₀가 5.6±1.7mg/kg로 보고되어 있고 또 태아는 성숙백서보다 10~20배 더 민감하다는 사실을 고려하여 각군의 투여량을 결정하였다(Ferguson, 1950).

3. 투여방법

Methotrexate(4-amino-N¹⁰-methyl pteroyl glutamic acid) (유한양행제) 2.5mg을 5% D.W. 50cc에 녹여 0.05mg/cc되게 한 후 경구로 투입하여 투여하였다. 중도태반관찰군은 임신제 7일, 10일, 14일에 투여한 후 제 8일, 11일, 15일에 각각 도살하였다. 반삭태반관찰군은 임신제 7일, 10일, 14일에 전 투여량의 1/3씩을 나누어 투여한후 반삭에 도살하였다.

4. 병리조직학적 및 조직화학적 방법

임신백서 1마리당 3대반은 조직화학적 검사에 나머지는 모두 병리조직학적 검사를 실시하였다. 병리조직적 검색용은 10%중성 포르말린용액에 고정하고 파라핀 포매하여 4~5 μ 으로 박절후 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 실시하여 광학현미경으로 검정하였다.

조직화학적 검색을 위하여는 태반의 중심부를 통과하는 조직절편을 만들어 -20°C에서 동결시킨 후 동결절편기를 써서 10 μ 두께로 박절한 후 alk. P., acid P., NADH diaphorase, SDH등의 효소염색을 다음과 같이 실시하였다.

1) **Alkaline phosphatase**염색 : Burstone의 방법을 따라 0.2M tris buffer (pH9.2) 25ml, naphthol AS biposphoric acid 5mg, dimethyl formamide 0.2ml, 증류수 25ml, red violet LB salt 30mg을 혼합하여 만든 기질용액을 Whatman No.2로 여과한 후 37°C항온기내에서 30분간 반응시켰다.

2) **Acid phosphatase**염색 : Burstone의 방법을 따라

0.2M tris buffer (pH 5.4) 25ml, naphthol AS biposphoric acid 5mg, dimethyl formamide 0.2ml, 증류수 25ml, red violet LB salt 30mg을 혼합한 기질용액을 Whatman No.2로 여과한 후 37°C 항온기에서 3시간 동안 반응시켰다.

이상의 2가지 방법은 red violet LB salt로 인하여 효소활성도는 적색의 강도에 비례한다.

3) **NADH diaphorase**염색 : Farber등의 방법을 사용했으며 0.2M phosphate buffer (pH 7.4) 4ml, nitro BT (1mg/ml) 4ml, 증류수 4ml와 NADH 10mg을 혼합하여 만든 기질용액을 사용하여 37°C 항온기에서 30분간 반응시켰다.

4) **Succinic dehydrogenase**염색 : Nachlas등의 방법을 따라 0.2M phosphate buffer (pH7.6) 5ml, nitro BT (1mg/ml) 10ml 및 0.2M sodium succinate 5ml를 혼합하여 만든 기질용액을 사용하여 37°C항온기에서 2시간 동안 반응시켰다.

이상의 두 방법은 모두 nitro BT를 사용함으로 효소활성도는 diformazan생성량에 따라 암청색으로 나타내게 되므로 조직내 효소의 활성은 암청색 또는 청자색의 강도에 비례하게 된다.

이상의 조직화학적 반응의 판정은 색변화의 정도에 따라 효소의 활성도를 - : 음성, ± : 미약, + : 정도, ++ : 중등도 ≡ : 고도 등으로 각각 표기하였다.

실험 성적

1. 임신손모율

MTX경구투여후 수태백서에서의 임신손모율은 태반을 기준으로 하여 계산해본 결과 반삭태반관찰군중 대조군에서는 임신손모가 관찰되지 않았으나 제 I 군에서는 7.8%, 제 II 군 33.8%, 제 III 군 62.2%, 제 IV 군 88.7%, 제 V 군 96.8%, 제 VI 군 94.4%, 제 VII 군 94.0%, 제 VIII 군 100%, 제 IX 군 100%로 MTX투여량의 증가에 따라 임신손모율도 증가하며 MTX투여량이 0.9mg 이상 증가시에는 88.7%~100%의 임신손모율을 나타내었다(Table 1).

Table 1. Wastage rate in pregnant rats following methotrexate administration

Experimental groups dose (mg)	C	I (0.15)	II (0.3)	III (0.6)	IV (0.9)	V (1.2)	VI (1.5)	VII (1.8)	VIII (2.1)	IX (2.4)
No. of rats	10	9	8	9	9	8	10	10	8	9
Wastage rate	0/100	7/90	27/80	51/82	63/71	61/63	85/90	79/84	81/81	92/92
Percentage(%)	0	7.8	33.8	62.2	88.7	96.8	94.4	94.0	100	100

Table 2. Histopathologic changes of the 8th, 11th, 15th days placentae in rats following methotrexate administration

Exp. groups(mg) Age of placenta(day)	Control			I (0.1)			II (0.2)			III (0.3)			IV (0.4)			
	8	11	15	8	11	15	8	11	15	8	11	15	8	11	15	
Labyrinth																
Congestion, maternal		±	±		±	±		±	±		±	±		±	±	
Fetal		+	±		+	±		+	±		+	+		+	±	
Deg. of trophoblast		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-	
Focal necrosis		-	-		-	-		-	±		-	±		-	+	
Basal zone																
Hemorrhage		-	-		-	-		-	±		+	-		-	-	
Cytolysis of glycogen cell			±			±			+			+			+	
Deg. of giant cell		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-	
Focal necrosis		-	-		-	-		-	+		-	-		-	-	
Decidua																
Fibrinoid necrosis		-	±		-	±		-	±		-	±		-	±	
Inflammation		-	-	±		-	-	±	-		-	-	+		-	+

Degree -: negative, ±: weak, +: mild, #: moderate, ##: marked. Exp. Experimental, Deg. Degeneration.

2. 병리조직학적 및 조직화학적 소견

수태기간중 MTX를 투여한 백서태반의 병리조직학적 소견을 검색함에 있어 미로부(labyrinth), 기저부(basal zone)과 탈락막(decidua)등 조직학적으로 구분하여 그 변화 소견을 각 실험군에서 관찰하였다.

1) 중도태반관찰군의 병리조직학적 소견: 8일령태반에서는 아직 태반이 형성되지 않아 특별한 소견을 관찰할 수 없었으며 11일령태반에서는 극소적인 피사 및 출혈이 미로부와 기저부에서 MTX 0.3mg을 투여한 1례에서 관찰되었으나 다른 소견은 대조군과 유사하였다(Table 2)

2) 중도태반관찰군의 조직화학적 소견

a) Alkaline phosphatase활성도는 대조군 15일령 태반에서 미로부의 영양세포, 기저부의 염기성세포와 거대세포에서 강한 활성을 나타냈으나(Fig. 9) 당원질세포에서는 거의 활성이 없었다. MTX 0.4mg 투여후 미로부의 영양세포에서 경도의 활성감소를 나타냈으나(Fig. 10) 그 외 조직에서는 큰 변동이 관찰되지 않았다(Table 3).

b) Acid phosphatase 활성도는 미로부의 영양세포, 기저부의 염기성 및 거대세포에서 경도내지 미약한 활성을 나타냈으나 MTX 0.4mg투여 후에도 큰 변동이

Table 3. Histochemical changes in the 15th day placentae of rats following methotrexate administration

Exp. groups dose(mg)	Alk.P.					Acid P.					NADH diaphorase					SDH					
	C	I	II	III	IV	C	I	II	III	IV	C	I	II	III	IV	C	I	II	III	IV	
	0.1	0.2	0.3	0.4		0.1	0.2	0.3	0.4		0.1	0.2	0.3	0.4		0.1	0.2	0.3	0.4		
Labyrinth																					
Trophoblast	##	##	##	##	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Basal zone																					
Glycogen cell	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-
Basophilic cell	##	##	##	##	##	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Giant cell	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Decidua	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	##	##	##	##	±	±	±	±	±	±	±

Degree -: negative, ±: weak, +: mild, #: moderate, ##: marked.

Table 4. Histopathological changes of the term placenta in rats following methotrexate administration

Exp. groups	*C	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII**	IX**
Histopath./No. of animals	10	9	8	9	9	8	10	10	8	9
Labyrinth										
Congestion	+	+	+	+	+	+	+	+		
Cystic dilatation	-	±	±	+	+	+	+	+		
Fibrinoid necrosis	-	±	±	+	+	±	+	+		
Inflammation	-	-	-	-	-	-	-	-		
Basal zone										
Cytolysis of glycogen cell	±	±	±	±	±	±	±	±		
Degeneration of giant cell	±	±	±	+	+	+	+	+		
Fibrin deposit	±	+	+	+	+	+	+	+		
Decidua										
Fibrinoid necrosis	±	±	±	+	+	+	+	+		
Placenta resorption	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Degree -: negative, ±: weak, +: mild, ++: moderate, #: marked.

* Doses(mg): I (0.15), II (0.3), III (0.6), IV (0.9), V (1.2), VI (1.5), VII (1.8), VIII (2.1), IX (2.4).

** Complete resorption of aborted placenta.

Table 5-1. Histochemical changes of alkaline phosphatase activity in term placenta in rats following methotrexate administration

Enzyme	Exp. groups	*C	Alkaline phosphatase								
			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII**	IX**
Labyrinth											
Trophoblasts		++	++	++	++	++	++	++	++		
Endodermal sinus		-	-	-	-	-	-	-	-		
Basal zone											
Glycogen cell		-	-	-	-	-	-	-	-		
Basophilic cell		++	++	++	++	++	++	++	++		
Giant cell		++	++	++	++	++	++	++	++		
Decidua		-	-	-	-	-	-	-	-		

Degree -: negative, ±: weak, +: mild, ++: moderate, #: marked.

* Doses (mg): I (0.15), II (0.3), III (0.6), IV (0.9), V (1.2), VI (1.5), VII (1.8), VIII (2.1), IX (2.4).

** Complete resorption of aborted placenta.

Table 5-2. Histochemical changes of acid phosphatase activity in term placenta in rats following methotrexate administration

Enzyme	Exp. groups	*C	Acid phosphatase								
			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII**	IX**
Labyrinth											
Trophoblasts		±	±	±	±	±	±	±	±		
Endodermal sinus		-	-	-	-	-	-	-	-		
Basal zone											
Glycogen cell		-	-	-	-	-	-	-	-		
Basophilic cell		+	+	+	+	+	+	+	+		
Giant cell		+	+	+	+	+	+	+	+		
Decidua		+	+	+	+	+	+	+	+		

Degree -: negative, ±: weak, +: mild, ++: moderate, #: marked.

* Doses(mg): I (0.15), II (0.3), III (0.6), IV (0.9), V (1.2), VI (1.5), VII (1.8), VIII (2.1), IX (2.4).

** Complete resorption of aborted placenta.

없었다.

c) NADH diaphorase 활성도는 대조군의 15일령 태반에서 미로부의 영양세포, 기저부의 거대세포에서 중등도의 양성 반응을 나타냈으며 탈락막에서 강한 활성이 관찰되었다(Fig. 11).

MTX를 0.4mg 투여 후에 미로부의 영양세포와 기저부의 거대세포에서 경도의 활성감소를 나타냈다(Fig. 12).

d) Succinic dehydrogenase 활성도는 대조군 15일령 태반에서 활성이 미약하였고 탈락막에서만 중등도의 활성을 나타냈으며 MTX 0.4mg 투여 후에도 큰 변동이 관찰되지 않았다.

3) 만삭태반관활군의 병리조직학적 소견 : 대조군의 만삭태반에서는 미로부에 경도의 울혈이 관찰되었고 기저부에서 경도의 섬유소성 물질의 침착과 거대세포의 퇴행성 변화 및 탈락막의 섬유소성 괴사가 경미하게 국소적으로 관찰되었다.

MTX를 수태 제7, 10, 14일에 3번으로 나누어 투여 후 단삭에 검출한 태반에서는 제 I ~ III군(MTX 0.15~0.6 mg)에서는 경도의 미로부 울혈과 국소적인 섬유소성 괴사와 기저부의 섬유소성 물질의 침착이 증가되었다. 제 V ~ VII군(MTX 0.9mg~1.8mg)에서는 유산성 태반에서 미로부의 울혈 및 미로동(sinus of labyrinth)의 확장과 낭포성 변화와 섬유소성 괴사가 관찰되었으며(Fig. 5, 6, 7) 기저부에서 섬유소성 물질의 침착과 탈락막의 섬유소성 괴사등이 경도로 증가됨을 관찰할 수 있었다.

또 미로부와 기저부에 광범위한 섬유소성 괴사를 나타내며 흡수되고 있는 태반도 관찰되었다(Fig. 8). 제 VIII ~ IX군(MTX 2.1mg~2.4mg)에서는 거의 모든 태반이 흡수되고 있어서 태반의 정상구조를 관찰할 수가 없었다(Table 4).

4) 만삭태반관활군의 조직화학적 소견 :

a) Alkaline phosphatase 활성도는 대조군의 만삭태반

Table 6-1. Histochemical changes of NADH diaphorase in term placenta in rats following methotrexate administration

Enzyme Exp. groups	NADH diaphorase									
	*C	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII**	IX**
Labyrinth										
Trophoblast	###	##	##	##	##	##	##	##	##	##
Endodermal sinus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Basal zone										
Glycogen cell	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Basophilic cell	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Giant cell	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Decidua	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Degree —: negative, ±: weak, +: mild, #: moderate, #: marked.

* Doses(mg): I (0.15), II (0.3), III (0.6), IV (0.9), V (1.2), VI (1.5), VII (1.8), VIII (2.1), IX (2.4).

** Complete resorption of aborted placentae.

Table 6-2. Histochemical changes of succinic dehydrogenase activity in term placenta in rats following methotrexate administration

Enzyme Exp. groups	Succinic dehydrogenase									
	*C	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII**	IX**
Labyrinth										
Trophoblast	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Endodermal sinus	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Basal zone										
Glycogen cell	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Basophilic cell	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Giant cell	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Decidua	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Degree —: negative, ±: weak, +: mild, #: moderate, #: marked.

* Doses(mg): I (0.15), II (0.3), III (0.6), IV (0.9), V (1.2), VI (1.5), VII (1.8), VIII (2.1), IX (2.4).

** Complete resorption of aborted placentae.

에서 미로부의 영양세포, 기저부의 염기성세포와 거대세포에서 중등도의 활성을 나타냈다(Fig. 15). MTX 투여 후 제 I ~ III군까지는 큰 변동을 관찰할 수 없었으나 제 IV ~ VII군에서는 미로부의 영양세포와 기저부의 염기성세포에서 alk.P.의 정도의 활성증가가 관찰되었다(Fig. 16, 17).

그리고 제 VIII ~ IX군에서는 태반이 거의 흡수되어 활성을 관찰할 수 없었다(Table 5-1).

b) Acid phosphatase활성도는 대조군의 반삭태반에서 미로부에 미약한 활성을, 기저부의 염기성 세포와 거대세포(Fig. 13) 그리고 탈락막에서 정도의 활성을 나타냈다. MTX투여 후 제 I ~ III군에서는 변동이 없었으나 제 IV ~ VII군에서는 기저부의 염기성 세포에서 정도의 활성증가를 관찰할 수 있었다(Fig. 14). 제 VIII ~ IX군에서는 태반이 거의 흡수되어 활성을 관찰할 수 없었다(Table 5-2).

c) NADH diaphorase활성도는 대조군의 반삭태반에서 미로부의 영양세포에서 강한 활성을, 기저부의 거대세포와 염기성 세포 그리고 탈락막에서 중등도의 활성을 나타내었다. MTX투여 후 제 I ~ III군에서는 큰 변동이 관찰되지 않았으나 제 IV ~ VII군에서는 미로부의 영양세포와 기저부의 염기성 세포에서 경미한 활성의 감소가 관찰되었다.

그러나 제 VIII ~ IX군에서는 태반이 거의 흡수되어 활성을 관찰할 수 없었다(Table 6-1).

d) Succinic dehydrogenase활성도는 대조군의 반삭태반에서 미로부의 영양세포와 기저부의 염기성 세포 및 거대세포에서 미약한 활성이 관찰되었고 탈락막에서는 중등도의 활성을 나타내었다. MTX투여 후 SDH의 태반내 활성이 전체적으로 높지 못하여 그 활성도 변화가 뚜렷하게 관찰되지 않았다(Table 6-2).

총괄 및 고안

용모성질환에 널리 쓰이고 특히 용모상피암종에 많이 사용되는 항암제인 methotrexate투여가 수태백서 태반의 정상적인 용모상피 및 간질에 어떠한 영향을 미치는가를 규명하고자 230~250gm의 Sprague-Dawley 계 백서 총 135마리를 사용하여 중도태반관찰군 45마리와 반삭태반관찰군 90마리를 사용하여 methotrexate를 투여한 후 태반을 적출하고 병리조직학적 및 alk, P., acid P. NADH diaphorase와 SDH등의 조직화학적 염색을 시행하여 얻은 결과를 총괄하면 다음과 같다.

methotrexate투여 후 임신손모율은 대조군에서는 임신손모가 관찰되지 않았으나 제 I 군에서는 7.8%, 제

II 군에서는 33.8%, 제 III군 62.2%, 제 IV군 88.7%이고 제 V군 ~ IX군에서 임신손모율이 94%~100%가 되었으므로 결과적으로 MTX투여량이 0.9mg이상 증가할 때 88.7%~100%의 임신손모율을 나타내었다. 이러한 2.1mg~2.4mg투여에서 100% 임신손모율의 결과는 Jordan(1977)등이 수태백서에서 태령 제4일부터 12일까지 2.5mg/kg를 복강내 주사하였을 때 관찰한 임신손모율과 유사하며 이때 Jordan은 제6일 내지 9일에서 100%의 손모율을 관찰할 수 있어서 초기 태아에서 현저하게 영향을 미친다고 주장하였다. 또 Thiersch (1952)는 인체에서 치료적유산에 4-aminopteroyl glutamic acid를 사용하여 임신초기에는 유산을 쉽게 일으킬 수 있었으나 임신 50일 이후에는 유산보다 기형을 동반하였다고 보고하였다. 이러한 사실은 본 실험에서 0.9mg이상 용량증가하여 투여했을 때는 거의 88.7%~100%의 임신손모를 관찰할 수 있었는데 이때 제7일 10일, 14일에 나누어 주었으므로 제7일에 준 MTX의 효과가 가장 현저하게 태아에 적용하여 임신손모를 나타낸 것이 아닌가 생각된다. Thiersch (1950)등은 MTX로 태아사망과 생쥐와 백서에서의 태아흡수를 세번의 적은량을 투여하여 수태백서에서 수태 첫 1주에 가장 민감하게 반응한다고 보고하였다.

또 인체에서도 초기임신 때의 태아는 성인에서 골수나 장·막상피보다도 더 민감하다고 주장하였다(Thiersch, 1952).

MTX의 LD₅₀가 백서에서는 경구투여로는 1회 180±45mg/kg정도를 사용하여야 하나 다섯번으로 나누어 연속 투여하면 5.6±1.7mg/kg로 현저히 LD₅₀가 감소된다고 하였다(Ferguson, 1950).

또 복강내로 주사할 경우에는 LD₅₀가 백서에서 1회 6~25mg/kg 정도를 사용하여야 하나 0.3mg/kg를 1회 복강내 주사하면 초기의 태아는 거의 모두에서 사망하며 기형도 발생된다고 보고되고 있다(Ferguson, 1950). 따라서 본 실험에서도 물론 MTX가 24시간내에 41%가 소변으로 배설되며 4시간내에 60%가 담관으로 배설되어 24시간내에 거의 모든 양이 배설되는 것으로 알려져 있으나 7일부터 시작했고 또 세번에 나누어 연속 투여함으로써 좀더 적은량으로 임신손모를 일으킨 것이 아닌가 생각되었다. 또 태아내의 MTX의 양은 모체의 배설과정 보다도 훨씬히 이루어지며 또 모체내에서 초기 혈중농도의 1/6~1/8정도로 감소되어 투여 2시간 후에 태아에서는 최고의 농도가 되어 모체내에서는 거의 다 배설되어도 태아내의 농도는 상대적으로 남아있어 본실험에서 3일 간격으로 소량씩 투여해도 효과가 있는 것이라고 사료되었다(Wilson, 1979).

본실험에서는 병리조직학적 및 조직화학적 변화는 중도태반관찰군에서 태령 제8일 태반에서는 태반이 형성되지 못한 상태이므로 비록 태령 제6일부터 9일까지 가장 많은 임신손모율이 보고되고 있으나 MTX의 태반에 미치는 영향은 관찰할 수 없었고 이 시기의 임신손모율은 MTX의 태아에 작용하여 일어난 것으로 사료되었다. 태령 제11일 태반에서는 초기 태반이 형성되기 시작한 시기이나 0.3mg의 MTX를 투여한 1례에서만 태반에 출혈이 관찰되었을 뿐 대조군과 현저한 차이를 관찰할 수 없었다. 태령 제15일 태반에서는 백서의 기본적인 구조가 가장 뚜렷하게 관찰되는 시기이며 MTX를 0.3~0.4mg투여 후에 울혈의 증가와 미로부의 극소성 괴사 및 기저부의 당원질세포의 붕괴와 극소적인 출혈성 괴사가 관찰되었으며 동시에 alk. P와 NADH diaphorase활성도도 미로부의 영양세포에서 그 활성이 감소되었다. 그러나 이러한 결과는 높은 임신손모율에 비하면 태반의 변화는 경한 손상을 준다고 사료되었고 MTX는 태반보다는 초기 태아에서 더욱 큰 손상을 주어 임신손모를 일으킨 것이라고 사료되었다.

만삭태반관찰군의 병리조직학적소견은 제Ⅳ~Ⅷ군(0.9mg~1.8mg)에서는 미로부의 조직손상이 심하여 출혈 또는 섬유소성 괴사가 증가되었고 흡수성태반도 관찰되었으며 이와같은 변화는 유산되는 태반에서 더욱 현저하였다. 조직화학적 변화는 태령 제15일 태반에서 관찰된 소견과는 달리 alk. P. 활성도는 미로부와 기저부의 염기성 세포에서, acid P.활성도는 기저부의 염기성 세포에서 경도의 활성증가가 관찰되었으나 NADH diaphorase활성도는 반대로 감소된 경향을 나타냈다.

Friedman (1979)은 인체 용모상피암세포인 BeWo세포배양에서 MTX투여 후 태반성 alk. P.와 human chorionic gonadotropin (HCG)가 현저히 증가되는 것을 관찰하였으며 이것은 세포성 영양세포가 합포성 영양세포와 유사한 거대세포로 변형이 되면서 태반성 alk. P. 활성도가 증가되는 것이라고 보고하고 있으며 MTX에 의한 DNA합성장애를 일으키는 기전과는 서로 기전이 다른 것이라고 주장하였다(Speeg et al, 1976). 그러나 본실험에서 alk. P.활성과 acid. P.의 활성은 증가되는 반면 NADH diaphorase의 활성은 감소되는 것을 볼 때 methotrexate에 의한 증가라기보다는 태아초기에 MTX에 의한 배아 내지 태아의 손상으로 인하여 태반이 흡수되는 과정에서 관찰된 것이 아닌가 사료되었다. Davies (1968) 등은 인공적으로 태아를 적출 후 태반의 변화를 관찰한 결과 초기에는 기저부의 염기성 세포의 증식이 일어나고 미로부는 위축된다고 관찰하였고 점차 시간이 경과되면서 기저부도 위축됨을 관찰하였는

데 본 실험에서도 MTX로 인한 태반손상후 비교적 초기에는 기저부의 염기성 세포의 증식과 또 퇴행성 변화가 일어나며 흡수되는 과정에서 alk. P.와 acid P.의 활성이 증가되나 NADH diaphorase의 활성도는 감소되는 것이라고 사료되었다. 또 완전히 섬유소성 괴사가 일어난 곳과 흡수된 태반에서는 효소의 활성은 소실되므로 MTX투여후 수태백서 태반의 변화는 초기에 효소의 활성감소와 함께 극소적인 섬유소성 괴사 및 출혈이 일어나고 시간이 경과되면서 태반괴사를 일으키며 흡수되는 것이라고 사료되었다.

결 론

용모성 질환 특히 용모상피암종에 많이 사용되고 있는 항암제인 methotrexate투여가 수태백서 태반의 정상적인 용모상피 및 간질에 어떠한 영향을 미치는가를 규명하고자 230~250gm의 Sprague-Dawley계 자백서 총 135마리를 중도태반관찰군(MTX 0.1~0.4mg) 45마리와 만삭태반관찰군(MTX 0.15~2.4mg) 90마리로나누었으며 작군별로 MTX를 경구투여하였고 태반을 병리조직학적 및 조직화학적 염색을 시행하고 검식하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 임신손모율은 제Ⅰ군에서 7.8%, 제Ⅱ군 33.8%, 제Ⅲ군 62.2%, 제Ⅳ군 88.7%, 제Ⅴ~Ⅶ군 94.0~96.8%, 제Ⅷ~Ⅸ군 100%로 투여량의 증가에 따라 증가되었다.

2. 중도태반관찰군의 11일령 태반에서는 병리조직학적으로 미로부 및 기저부에서 극소적인 출혈이 관찰되었고 15일령 태반에서는 울혈과 극소적인 괴사가 관찰되었다. 조직화학적으로 alk. P.와 NADH diaphorase 활성도가 미로부 영양세포에서 감소됨을 보았고 acid P.와 SDH활성도는 미약하여 그 변화가 뚜렷하지 않았다.

3. 만삭태반관찰군의 제Ⅰ~Ⅲ군 (0.15~0.6mg)에서는 병리조직학적으로 경도의 괴사 및 섬유소성 물질의 침착이 관찰되었으며 제Ⅳ~Ⅷ군(0.9mg~1.8mg)에서는 조직손상이 좀 더 심하여 출혈 또는 섬유소성 괴사가 증가되었고 흡수성 태반도 있었다.

제Ⅷ~Ⅸ군(2.1mg~2.4mg)에서는 거의 모든 태반이 흡수되고 있었다. 조직화학적으로 alk. P.와 acid P.의 활성도는 증가되는 경향을 보았고 NADH diaphorase활성도는 감소됨을 보았다. SDH활성도는 미약하여 그 변화가 뚜렷하지 않았다.

4. 그러므로 이상의 소견을 종합하여 볼 때 methotrexate투여는 수태백서의 임신손모와 유관하며 정상태

반에 미치는 병리조직학적 및 조직화학적 변화는 태반의 미로부 및 기저부에서 국소적인 괴사 및 출혈과 함께 alk. P. 및 NADH diaphorase 효소의 활성이 감소되는 초기변화를 보이며 시간의 경과에 따라 태반괴사를 일으켜 흡수되는 것이라고 추정되었다.

—ABSTRACT—

Histopathological Study on Effects of Methotrexate (4-amino-N¹⁰-methyl pteroyl glutamic Acid) Administration in Rat Placentae

In Chul Lee, Eui Keun Ham, Kye Yong Song and Ja Joon Jang

Department of Pathology, College of Medicine, Seoul National University

Methotrexate is an anticancerous drug used most commonly in trophoblastic disease especially in choriocarcinoma by its antifolic acid effects. But its effects on the normal placenta was not well known. To see the effects of methotrexate on the normal trophoblasts and its stroma following experiment was carried out with 135 Sprague-Dawley rats. Experimental group were divided by 45 rats of preterm placenta group and 90 rats of term placenta groups. Preterm placenta group was subdivided into fifteen small groups by its dosage (0.1 to 0.4mg MTX) and date of administration of methotrexate. Preterm placenta group was sacrificed at 8th, 11th, and 15th day those were one day after methotrexate administration. Term placenta group was sacrificed at term (20th day) after methotrexate administration at 7th, 10th and 14th day with one third dosage of total amount in each day by oral intubation. Placentae were examined histopathologically and histochemically with alkaline phosphatase, acid phosphatase, NADH diaphorase and succinic dehydrogenase stainings.

Results obtained were as follows:

1. Wastage rates after methotrexate administration revealed that no wastage was seen in control rats but experimental groups showed 7.8% (group I, 0.15mg MTX), 33.8% (II, 0.3mg MTX), 62.2%

(III, 0.6mg MTX), 88.7%(IV, 0.9mg MTX), 96.8% (V, 1.2mg MTX), 94.4% (VI, 1.5mg MTX), 94.0% (VII, 1.8mg MTX), 100% (VIII, 2.1mg MTX) and 100% (IX, 2.4mg MTX). The wastage rates were increased as dosage of methotrexate was increased.

2. Histopathological study of preterm placenta group revealed that no specific changes in 8th day of gestation, mild and focal hemorrhage in 11th day placenta and focal fibrinoid necrosis in labyrinth and base were seen in the group IV (0.4mg MTX) accompanying mild cytolysis of glycogen cells. Alkaline phosphatase and NADH diaphorase activities were slightly decreased but activities of acid phosphatase and succinic dehydrogenase were not decreased.

3. Histopathological study of term placenta groups revealed mild congestion and fibrinoid necrosis and increased desposits of fibrinous materials in the basal zone in group I ~ III (0.15~0.6mg MTX), increased hemorrhage and fibrinoid necrosis as well as resorbed placentae in groups IV ~ VI (0.9mg~1.8mg MTX) and all resorbed placentae were in group VII ~ IX (2.1mg~2.4mg MTX). Histochemically alkaline phosphatase activity was slightly increased in the labyrinth and basophilic cells of base. Acid phosphatase activity was increased in the basophilic cells of base. NADH diaphorase activity was slightly decreased in the labyrinth but succinic dehydrogenase activity was not decreased.

4. Therefore, with above features administration of methotrexate was related to the abortion and wastage rate of pregnancy and the first histological findings were seen in the labyrinth and basal zone showing decreased activities of alkaline phosphatase and NADH diaphorase with focal necrosis and hemorrhage followed by complete fibrinoid necrosis and absorption of placenta.

REFERENCES

- Berkowitz, R.S. and Goldstein, D.P.: *Methotrexate with citrovorum factor rescue for nonmetastatic gestational trophoblastic neoplasms. Obst. Gynec.*, 54: 725-728, 1979.
- Berlin, N.J. et al.: *Folic acid antagonists. Ann. Int. Med.*, 59:931-957, 1963.

- Brewer, J.I., Gerbie, A.B., Dolkart, R.E., Skom, J.H., Nagle, R.G. and Torok, E.E.: *Chemotherapy in trophoblastic disease. Am. J. Obst. Gynec.*, 90: 566-578, 1964.
- Bur, G.E., Hertig, A.T., McKay, D.G. and Adams, E.C.: *Histochemical aspects of hydatidiform mole and choriocarcinoma. Obst. Gynec.*, 19:156-182, 1962.
- Burstone, M.S.: *Histochemical demonstration of phosphatase in frozen sections with naphthol-AS-phosphates. J. Histol. Cytol.*, 8:146-156, 1960.
- Chungi, V.S., Bourne, D.W.A. and Dittert, L.W.: *Competitive inhibition between folic acid and methotrexate for transport carrier in the rat small intestine. J. Pharmaceutical Science*, 68:1552-1553, 1979.
- Davies, J. and Glasser, S.R.: *Histological and fine structural observations on the placenta of the rat. Acta Anat.*, 69:542-608, 1968.
- De Sesso, J.M.: *Comparative ultrastructural alternations in rabbit limb buds after teratogenic dose of either hydroxyurea or methotrexate. Teratology*, 23:179-215, 1981.
- ElDareer, S.M., Tillery, K.F. and Hill, D.L.: *Ditposition of 5-methyl tetrahydrohomofolate and methotrexate in rats. Cancer Treatment Reports*, 65:101-106, 1981.
- Farber, E., Sternberg, W.H. and Dunlop, C.E.: *Histochemical localization of specific oxidative enzymes: III. Evaluation studies of tetrazolium staining methods for diphosphopyridine nucleotide diaphorase, triphosphopyridine nucleotide diaphorase and the succinic dehydrogenase system. J. Histol. Cytol.*, 4:284-294, 1956.
- Ferguson, F.C. Jr., Thiersch, J.H. and Philips, F.S.: *The action of 4-amino-N¹⁰ methyl pteroyl glutamic acid in mice, rats and dogs. J. Pharm. Exp. Ther.*, 98:293-299, 1950.
- Freeman, N.M. and Narrod, S.A.: *Chronic toxicity of methotrexate in mice. J. Natl. Cancer Inst.*, 58:737-743, 1977.
- Friedman, S.J. and Skehan, P.: *Morphological differentiation of human choriocarcinoma cells induced by methotrexate. Cancer Res.*, 39:1960-1967, 1979.
- Fujikura, T. and Benson, R.C.: *Placentitis and fibrous occlusion of fetal vessels in the placentas of stillborn infants. Am. J. Obst. Gynec.*, 89:225-231, 1964.
- Garancis, J.C., Pattillo, R.A., Hussa, R.O. Schultz, J. and Mattingly, R.F.: *Electron microscopic and biochemical patterns of the normal and malignant trophoblast. Am. J. Obst. Gynec.*, 108:1257-1269, 1971.
- Gewirtz, D.A., White, J.C., Randolph, J.K. and Goldman, I.D.: *Transport, binding and polyglutamation of methotrexate in freshly isolated rat hepatocytes. Cancer Res.*, 40:573-578, 1980.
- Goldstein, D.P.: *Neutrophil alkaline phosphatase activity in patients with choriocarcinoma and related trophoblastic tumors, undelivered hydatidiform mole and in normal pregnancy. Am. J. Obst. Gynec.*, 92: 1014-1017, 1963.
- Herz, R., Bergenstal, D.M., Lipsett, M.B. and Price, E.B.: *Chemotherapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors in women. J.A.M.A.*, 186:845-854, 1958.
- Jordan, R.L., Wilson, J.G. and Schumacher, H.J.: *Embryotoxicity of the folate antagonist methotrexate in rats and rabbits. Teratology*, 15:73-80, 1977.
- Lauslahti, K. and Hulkko, S.: *On uterine death. Acta Obst. Gynec. Scand.*, 50:325-329, 1971.
- Lewis, J. Jr., Core, H., Hertig, A. and Goss, D.: *Treatment of trophoblastic disease. Am. J. Obst. Gynec.*, 96:710-722, 1967.
- Li, M.C., Herz, R. and Bergenstal, D.M.: *Therapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors with folic acid and purine antagonists. New. Eng. J. Med.*, 259:66-74, 1958.
- Mossman, H.W. and Weisfeldt, L.A.: *The fetal membranes of a primitive rodent, the thirteen striped group squirrel. Am. J. Anat.*, 64:59-109, 1939.
- Nachlas, M.M., Tsou, K.C., Souza, E.D., Cheng, C.S. and Seligman, A.M.: *Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted detetrazole. J. Histochem.*, 5:420-436, 1967.
- Ornoy, A., Crone, K. and Altshulcer, G.: *Pathological feature of the placenta in fetal death. Arch. Path.*, 100:367-371, 1976.
- Speeg, K.V., Azizkhan, J.C. and Stromberg, K.: *The stimulation by methotrexate of human chorionic gonadotropin and placental alkaline phosphatase in cultured choriocarcinoma cells. Cancer Res.*, 36:

- 4570-4576, 1976.
- Thiersch, J.B.: *Therapeutic abortions with a folic acid antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid administered by the oral route. Am. J. Obst. Gynec., 63:1298-1304, 1952.*
- Thiersch, J.B. and Philips, F.S.: *Effects of 4-aminopteroylglutamic acid on early pregnancy. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 74:204-208, 1950.*
- Wilson, J.G., Scott, W.J., Ritter, E.J. and Fradkin, R.: *Comparative distribution and embryotoxicity of methotrexate in pregnant rats and rhesus monkeys. Teratology, 19:71-80, 1979*

LEGENDS FOR FIGURES

- Fig. 1.** Abundant glycogen cells in the basal zone of the 15th day placenta of control rat with mild congestion in labyrinth, H&E $\times 80$.
- Fig. 2.** Moderate cytolysis of glycogen cells in the basal zone of 15th day placenta after 0.4mg methotrexate administration, H&E $\times 80$.
- Fig. 3.** Focal hemorrhagic necrosis in the basal zone of the placenta of 15th day placenta after 0.2mg methotrexate administration, H&E $\times 80$.
- Fig. 4.** Fibrinoid necrosis and fibrin desposits in the basal zone with cytolysis of glycogen cells of 15th day placenta after 0.4mg methrexate administration, H&E $\times 80$.
- Fig. 5.** Focal fibrinoid necrosis and dilatation of sinus in the labyrinth of 15th day placenta after 0.4mg methotrexate administration, H&E $\times 80$.
- Fig. 6.** Fibrinoid necrosis in the labyrinth and hemorrhage of term placenta after 1.8mg methotrexate administration, H&E $\times 80$.
- Fig. 8.** Marked fibrinoid necrosis in the labyrinth and basal zone of term placenta after 1.8mg methotrexate administration, H&E $\times 80$.
- Fig. 9.** Marked activity of alkaline phosphatase activity in the labyrinth of 15th day placenta in control, alk. P. $\times 80$.
- Fig. 10.** Mild decrease of alkaline phophatase activity in the labyrinth of 15th day pacenta after 0.4mg methotrexate administration, alk. P. $\times 80$.
- Fig. 11.** Moderate activity of NADH diaphorase in the labyrinth and decidua of 15th day placenta in control, NADH diaphorase $\times 80$.
- Fig. 12.** Mild decrease of NADH diaphorase activity in the labyrinth and basal zone of 15th day placenta after 0.4mg methotrexate administration, NADH diaphorase $\times 80$.
- Fig. 13.** Mild acid phosphatase activity in the basophilic cells and slight activity in labyrinth of term placenta in control, acid P. $\times 80$.
- Fig. 14.** Mild increase of acid phosphatase activity in term placenta after 1.5mg methotrexate administration, acid, P. $\times 80$.
- Fig. 15.** Moderate alkaline phoshatase activity in the labyrinth and basal zone in term placenta in control, alk. P. $\times 80$.
- Fig. 16.** Increased alkaline phosphatase activity in the labyrinth of term placenta after 1.2mg metho-rexat trexate administration, alk. P. $\times 80$.
- Fig. 17.** Increased alkaline phosphatase activity in the basal zone with early resortion in labyrinth of term placenta after 0.9mg methotrexate administration, alk. P. $\times 80$.





