

## Adriamycin과 CP-2가 Ehrlich 암세포를 이식한 지라조직에 미치는 영향: 자기방사법적 연구

고정식, 안의태, 박경호, 김진국  
순천향대학교 의과대학 해부학교실

**간추림** : 이 실험에서는 Ehrlich 암세포를 이식한 후 adriamycin과 CP-2를 투여하였을 때, 지라조직의 형태학적 변화를 연구하고자  $^3\text{H}$ -thymidine을 투여한 후 자기방사법적 연구를 시행하여 지라조직의 형태학적 변화 뿐만 아니라 DNA합성지수를 비교 연구하고자 하였다.

실험동물로는 체중 20 g 내외의 성숙한 생쥐(ICR계통)를 정상대조군, 암세포이식군(중양이식대조군), 암세포 이식후 adriamycin 투여군, 암세포 이식후 CP-2 투여군으로 구분하였다. 정상대조군 이외의 암세포이식군 동물 들은 살부위 피하에 각각  $1 \times 10^7$ 개의 Ehrlich암세포를 주사하여 이식한 후 다음날부터 실험군별로 adriamycin 2 mg/kg, CP-2는 30 mg/kg을 격일 간격으로 투여하였다. 중양이식대조군은 암세포이식 후에 약제 대신 0.2ml의 생리식염수를 피부밑에 주사하였고, 정상대조군은 암세포를 이식하지 않은 동물을 사용하였다. 자기방사법적 관찰을 위하여는 모든 실험동물을 마지막 주사 후, 일주기에 따른 변화를 최소화하기 위하여 다음날 오전 9시에 서 10시 사이에  $^3\text{H}$ -thymidine (methyl- $^3\text{H}$ -thymidine: specific activity 25 Ci/mmol, Amersham Lab., England) 0.7  $\mu$  Ci/gm를 꼬리에 한번 정맥주사하고, 70분 후 희생하여 지라조직을 떼어내어 10% formalin에 고정한 후 표본을 제작하여 관찰하였다.

일반조직관찰에서 adriamycin 투여군의 백색속질에서는 농축핵을 포함하고 있는 공포모양의 큰포식세포가 자주 관찰되었으나, CP-2 투여군에서는 정상군에 비하여 별다른 조직학적 변화를 관찰할 수 없었다. 자기방사법 적 관찰에서 단위면적당 (0.21 mm<sup>2</sup>)  $^3\text{H}$ -thymidine 표지세포의 수는 정상대조군은  $240.3 \pm 53.28$ , 중양이식대조군은  $252.3 \pm 58.23$ , CP-2 투여군은  $216.7 \pm 55.17$ , adriamycin 투여군은  $45.4 \pm 15.46$ 개였으며 대부분 지라의 가장자리 구역에 분포하고 있었다. 한편 adriamycin 투여군은 정상대조군에 비하여 방사성동위원소에 표지된 세포의 수가 현저히 적었을 뿐만 아니라 은입자의 수도 매우 적어서 표지과립이 겨우 구별될 정도로 적은 세포가 많았다.

이상의 결과를 종합하여 보면 생쥐 지라조직의 경우 CP-2 또는 adriamycin은 적색속질과 백색속질에 비하여 가장자리구역에 분포하는 세포의 DNA합성에 억제적으로 작용한다고 생각된다. 특히 CP-2는 adriamycin에 비하여 DNA합성을 억제하는 효과는 적으나 지라조직에 형태적인 손상을 거의 주지 않는 항암제라고 생각한다.

**찾아보기 낱말** : 지라, 자기방사법적 연구,  $^3\text{H}$ -thymidine, adriamycin, CP-2

### 서 론

각종 암의 발생빈도가 높아져 사회적 지출이 크게 늘고 있으며, 따라서 항암제의 개발과 작용기전

에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 대부분의 항암제가 기본적으로 세포분열 억제나 핵산합성과 단백질합성을 억제하는 성질을 갖고 있기 때문에 암세포에만 선택적으로 작용하지 않고 정상세포에도 분열과 대사과정을 억제하는 등 상당한 손상을 주고 있다 (Malpas 1991, King 1996). 대표적인 부작용으로는 골수기능에 장애를 주어 백혈구나 혈소

\*본 연구과제는 2001학년도 순천향대학교 학술연구조성비 일반연구과제로 지원받아 수행하였음.

correspondence to : 고정식 (순천향대학교 의과대학 해부학교실)

판이 감소되며, 소화계통, 호흡계통 및 생식계통에도 많은 손상을 준다(Gilman 등 1985). 가장 이상적인 치료방법은 암세포만을 찾아가는 항체에 세포독성물질을 부착하여 암세포를 선별적으로 살해하는 것이지만 아직은 실효를 거두지 못하고 있다. 따라서 현재 사용하는 약품들과 마찬가지로 DNA 또는 RNA에 작용하되 암세포를 제거하는 약효용량과 정상세포에 미치는 유해용량 사이의 격차가 큰 약품을 개발할 필요가 있다.

일반적으로 한방에서 황련(*Coptis chinensis*)으로 알려진 콕티스속 식물은 한국, 중국, 일본, 인도 및 네팔 등지에서 자생 또는 재배되는 다년생 초본으로서 이들 뿌리에는 알칼로이드인 Berberine, Coptisine, Jateorrhizine, Palmitine, Magnoflorine 등이 포함되어 있으며, 이들 성분은 혈압강하 및 항빈혈작용을 가지며, 낮은 농도에서도 강력한 항균작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(송주택 1991). 또한 한방에서 파두(*Croton tiglium*)로 알려져 있는 크로톤속의 식물은 말레이시아가 원산지이며, 동남아시아에 자생하는 다년생 관목으로서 이 식물의 종자에는 지방유 30~50%, 단백질 18%, 글로부린, 알부민이 함유되어 있고 중독과 혈관염을 일으킬 수도 있으나 항암성분이 있다는 보고도 있다(송주택 1991).

현재 사용되고 있는 항암제들은 작용기전에 따라 대사길항제(5-fluorouracil, methotrexate), 항암성 항생물질(adriamycin, mitomycin-C, bleomycin), 세포분열억제제(vinblastine, vincristine), 호르몬제(androgen, estrogen, adrenal steroid)로 구분한다(Gilman 등 1985, Clark 등 1992). 이 실험에서 사용하고자하는 adriamycin은 대표적인 항암성항생물질이고, CP-2는 황련과 파두에서 추출한 생약제제로서 위암, 림프종, 허파암, 간암에 대하여 강력한 항암효과가 있을 뿐만 아니라(김춘원 등 1993a, b, c), 항원성(antigenicity) 및 발암성(carcinogenicity) 평가시험에서 안전하다는 보고가 있다(Kang 등 1992a, b).

한편 면역계통에서 중요한 역할을 하는 지라는 연령 뿐만 아니라 영양, 면역독성, 스트레스, 감염 및 종양 등의 질병상태에 따라서도 형태적으로 민

감하게 반응하므로 암세포를 이식하거나 항암제를 투여하면 그 기능이나 형태에 변화가 있으리라고 예상된다. 이 실험에서는 항암성 항생물질인 adriamycin과 새로 개발된 항암성 생약제제인 CP-2를 이용하여 실험적 종양을 치료할 때 지라조직에 미치는 영향을 형태학적으로 연구하고자 하였다. 따라서 Ehrlich 암세포를 이식한 후 adriamycin과 CP-2를 투여하였을 때, 지라조직의 형태학적 변화를 연구하고자  $^3\text{H}$ -thymidine을 투여한 후 자기방사법적 연구를 시행하여 지라조직의 형태학적 변화 뿐만 아니라 DNA합성지수를 비교 관찰하여 종양치료과정에 따른 지라의 변화를 연구하는데 기본 정보를 제공하고자 이 실험을 시행하였다.

## 재료 및 방법

실험동물로는 체중 20g 내외의 성숙한 생쥐(ICR 계)를 정상대조군, 암세포이식군(종양이식대조군), 암세포 이식후 adriamycin 투여군, 암세포 이식후 CP-2 투여군으로 구분하였으며 각 실험군당 5마리의 동물을 사용하였다.

정상대조군 이외의 암세포 이식군 동물들은 살부위 피하에 각각  $1 \times 10^7$ 개의 Ehrlich암세포를 주사하여 이식한 후 다음날 부터 실험군별로 adriamycin 2 mg/kg, CP-2는 30 mg/kg을 격일 간격으로 투여하였다. 종양이식대조군은 암세포이식 후에 약제 대신 0.2ml의 생리식염수를 피부밑에 주사하였고, 정상대조군은 암세포를 이식하지 않은 동물을 사용하였다. 실험동물은 각각 7회씩 투여한 후 다음날 ether 마취하에 앞배벽을 열어 지라조직을 절취하였다.

일반조직관찰을 위하여는 10% 중성 formalin으로 고정한 후 hematoxylin-eosin(H-E)염색법을 시행하였다. 한편 자기방사법적 관찰을 위하여는 모든 실험동물을 마지막 주사 후, 일주기에 따른 변화를 최소화하기 위하여 다음날 오전 9시에서 10시 사이에  $^3\text{H}$ -thymidine(methyl- $^3\text{H}$ -thymidine: specific activity 25 Ci/mmol, Amersham Lab., England) 0.7  $\mu$  Ci/gm을 꼬리에 한번 정맥주사하고, 70분 후 희생

하여 지라조직을 떼어내어 10% formalin에 고정하였다. 광학현미경관찰을 위한 표본은 통상적인 방법에 따라 수세, 탈수, 파라핀 포매과정을 거쳤고, 절편을 만들어 젤라틴을 입힌 대물유리에 부착시킨 다음 파라핀을 제거하고 암실에서 감광유제 (autoradiographic emulsion EM-1, Amersham Lab., England)를 입혀 건조시켰다. 감광유제를 입힌 표본은 4°C 냉암소에서 5주일간 노출시켰고, D-19 (Kodak USA)로 현상한 다음 Meyer's hematoxylin으로 핵을 염색하여 영구표본을 만든 후 광학현미경으로 관찰하였다. 관찰방법으로는 지라의 백색속질, 가장자리구역, 적색속질을 택하여 400배율로 관찰하되 접안렌즈의 사진촬영용 직사각형 속의 면적을 한 시야로 하여 각각 10시야(0.21 mm<sup>2</sup>)씩 관찰하였다. 표지세포의 기준은 한 세포에 5개 이상의 은입자가 있는 세포로 하였으며, 실험군에 따른 표지세포수의 비교는 student-t test를 이용하여 통계처리 하였다.

## 결 과

### 1. 일반조직 관찰

정상대조군의 경우 백색속질에는 림프구가 밀집되어 있으며, 적색속질은 적혈구를 많이 포함하고 있어서 두 부분이 쉽게 구별되었다. 지라동굴 속에는 핵이 농축되고 eosin에 붉게 염색된 형성과정 중의 혈구세포(적혈구)들이 다수 관찰되었으며, 백색속질에 분포하는 림프구 가운데는 중심동맥주위에 분포하는 림프구들이 지라림프소절이나 가장자리구역에 분포하는 림프구에 비하여 어렵게 보였다. 또한 거대핵세포가 적색속질 전반에 걸쳐 고르게 관찰되었다(Fig. 1).

종양이식대조군의 경우 백색속질 속에 핵이 농축된 변성세포와 농축핵을 포함하고 있는 공포들이 소수 관찰되었으며, 적색속질 속에는 핵이 농축되고 eosin에 붉게 염색된 형성과정 중의 혈구세포가 다수 관찰되었다. 또한 거대핵세포도 적색속질 전반에 걸쳐 고르게 관찰되었다(Fig. 2).

CP-2 투여군의 경우에는 백색속질 속에 여러 형태의 농축핵을 포함하고 있는 공포들이 소수 관찰되었으나 적색속질을 비롯한 전체적인 모습이 종양이식대조군의 소견과 비슷하였다(Fig. 3).

Adriamycin 투여군의 경우에는 백색속질 속에 여러 형태의 농축핵들을 포함하고 있는 공포들이 많이 관찰되었으며 적색속질 속에 아교섬유로 보이는 구조들이 많이 관찰되었다(Fig. 4).

### 2. 자기방사표본의 관찰

정상대조군을 포함한 실험군의 지라조직에는 은입자들이 세포핵 위에 나타났는데 이들은 주로 가장자리구역근처에서 많이 관찰되었으며, 백색속질과 적색속질부분에서는 적게 관찰되었다. 정상대조군의 경우 가장자리구역에서는 단위면적당(0.21 mm<sup>2</sup>, 두께 6 μm) 143.7개가 관찰되었는데, 비하여 백색속질은 41.3개, 적색속질은 55.3개가 관찰되었다(Table 1). 특히 가장자리구역에서 관찰되는 표지세포들은 은입자의 수가 매우 많아서 그 수를 헤아리기가 힘들 정도였으나, 백색속질과 적색속질에서 관찰되는 세포들은 은입자의 수가 적어서 입자가 쉽게 구별될 정도였다(Figs. 5A, B).

종양이식대조군의 경우 표지세포의 분포양상은 정상대조군의 것과 유사하였으나 표지세포수는 가장자리구역은 147.7개이고 적색속질은 52.3개로서 정상대조군과 비슷하였으나 백색속질은 52.3개로서 정상대조군에 비하여 1.27배 더 많이 관찰되었다(Table 1, Figs. 6A, B). 그러나 표지된 은입자의 수는 정상대조군에 비하여 다소 적어 보였다.

CP-2 투여군의 경우에도 표지세포의 분포양상은 정상대조군의 것과 유사하였으나, 단위면적당 표지세포의 수는 216.7개로서 정상대조군에 비하여 10% 정도 감소하였다. 그러나 부위에 따라 그 경향이 다소 달라서 백색속질은 정상대조군에 비하여 4%만 감소하였는데 비하여 가장자리구역은 19%나 감소하였으며, 적색속질은 정상대조군에 비하여 9% 더 증가하였다(Table 1, Figs. 7A, B).

Adriamycin 투여군의 경우에는 표지세포의 분포양상이 정상대조군을 포함하여 다른 실험군들과는

**Table 1.** Relative number of labeled cells in the area of 0.21 mm<sup>2</sup> (6um thickness) of mouse spleen, after injection of <sup>3</sup>H-thymidine in different conditions

Group	Region	Number	Ratio (experimental/ normal)	Total number	Ratio (experimental/ normal)
Normal	White pulp	41.3 ± 10.25	1.00	240.3 ± 53.28	1.00
	Marginal zone	143.7 ± 25.58	1.00		
	Red pulp	55.3 ± 17.45	1.00		
Tumor control	White pulp	52.3 ± 18.45	1.27	252.3 ± 58.24	1.05
	Marginal zone	147.7 ± 22.33	1.03		
	Red pulp	52.3 ± 17.46	0.95		
CP-2	White pulp	39.8 ± 10.55	0.96	216.7 ± 55.17	0.90
	Marginal zone	116.3 ± 28.75	0.81		
	Red pulp	60.6 ± 15.87	1.09		
Adriamycin	White pulp	2.6 ± 1.25	0.06	45.4 ± 15.46	0.19
	Marginal zone	8.8 ± 3.96	0.06		
	Red pulp	34.0 ± 10.25	0.61		

\* Difference between normal and adriamycin is significant at p < 0.01 or better.

달리 가장자리구역에 비하여 적색속질에 많이 분포하였다 (Fig. 8A, B). 단위면적당 표지세포수는 가장자리구역, 백색속질, 적색속질에서 각각 2.6개, 8.8개, 34.0개가 관찰되어 전체적으로는 정상대조군에 비하여 81%나 감소하였는데, 조직내의 구역에 따른 감소비율이 달라서 백색속질과 가장자리구역은 각각 정상대조군의 0.06%로 현저히 감소하였는데 비하여 적색속질은 정상대조군의 61%로 감소하여 감소비율이 현저히 적었다 (Table 1). 뿐만 아니라 표지된 은입자의 수가 매우 적어서 표지세포가 겨우 구별될 정도였다.

## 고 찰

지라는 우리 몸에서 가장 큰 림프기관으로서 림프구의 생산, B림프구에서 분화된 형질세포에 의한 항체의 생산, 큰포식세포에 의한 항원의 제거, 항원제공세포에 의한 항원성분자의 처리 등 면역반응에 중요한 역할을 한다. 림프구가 많이 분포하고 있는 백색속질은 동맥주위림프구집 (periarterial lymphatic sheath, PALS)과 지라림프소절 (splenic nodule)로 구성되어 있으며, 림프조직의 크기는 여러 가지 자극에 따라 신축성 있게 변한다. 동맥주

위림프구집 (PALS)내에 분포하는 림프구는 대부분 T세포로 이루어졌는데, 도움세포가 억제세포보다 더 많으며, 지라림프소절에는 B세포가 주로 분포한다. 종자중심 (germinal center)부위에는 T 세포에서 기원한 도움T세포 (CD4+)들이 큰포식세포와 각지세포 (interdigitating cell)주위에 무리 지어 분포하고 있으며, 동맥주위림프구집내에는 도움T세포 (CD4+)와 억제T세포 (CD8+)가 2:1의 비율로 분포되어 있다 (Stein 등 1982, Buckley 1987). 한편 백색속질의 주변부위에 세망섬유망이 조밀하게 발달되어 있는 부분을 가장자리구역 (marginal zone)이라 하며, 이 부위에는 B세포가 주로 분포하며 형질세포, 큰포식세포 및 각지세포가 존재하는데 이 부분은 혈액에서 기원한 세포와 입자성 물질이 지라실질과 처음으로 접하는 부위이며 동시에 재순환하는 림프구가 지라동굴의 혈액을 떠나 백색속질의 동맥주위림프구집으로 들어가는 부위로서 면역반응이 가장 먼저 일어나는 부위이다 (정진웅 1998, Fawcett 1994).

적색속질은 지라끈 (splenic cord)과 지라동굴 (splenic sinus)로 구성되어 있는데, 지라끈은 세망세포와 세망섬유가 복잡하게 얽혀 이루어진 그물모양의 구조로서 그물사이에는 큰포식세포, 형질세포, 각종 백혈구, 적혈구 및 혈소판 등이 들어 있다. 지

라끈 속에 있는 적혈구는 모세혈관에서 나온 것인데 젊은 적혈구는 유연하여 지라동굴틈새를 통하여 다시 지라동굴 속으로 들어가지만 수명이 다한 적혈구는 유연하지 못하기 때문에 지라끈 속에 남아 있으므로 근처의 큰포식세포에 의해 포식된다. 그러나 생쥐를 비롯한 설치류와 고양이 같이 지라에 조혈기능이 있는 동물의 지라끈에는 거대핵세포가 종종 관찰된다(정진웅 1998, Fawcett 1994).

항암제 사용에서 가장 큰 문제점은 특이성의 결여이다. 즉 항암제는 분열이나 증식이 빠른 세포(골수세포, 위장관상피세포 및 털주머니세포)에 피해를 입히므로 정도의 차이는 있으나 골수기능장애, 위장장애 및 탈모증 등의 부작용이 생긴다(Gilman 등 1985, Clark 등 1992).

한편 항암제는 항암효과 이외에도 면역성을 억제하는 작용이 있어서 장기이식후 거부반응을 억제시킬 목적으로도 사용되나, 동시에 병균에 대한 개체면역성도 저하시키는 부작용이 있다.

Anthracycline 유도체들은 항암효과가 높아서 항암제로 널리 이용되고 있다. 특히 이들 유도체 중 doxorubicin은 가장 광범위하게 이용되는 항암제로서 일명 adriamycin이라고 한다.

이 약제는 DNA염기쌍 사이에 작용하여 DNA합성을 방해하며 중추신경계통을 제외한 온몸조직에 분포하는데 일차적으로 DNA와 결합하며 반감기가 30시간 내지 50시간으로 매우 천천히 체외로 배출된다. 그러므로 doxorubicin은 투여 후 수개월 후에도 조직에서 검출할 수 있다. 이들 물질은 간에서 대사되며 50%는 담즙을 통해 배출되고 10% 미만이 뇨를 통해 배출된다. Doxorubicin은 유방암에 효과가 매우 높으며, 육종(sarcoma), 위장관암, 방광암, 여성생식기계통의 종양, 다발성골수종, 폐암, 급성백혈병 등에도 효과가 있다. 그러나 효과가 높은 반면에 독성도 강하여 육지기, 구토, 원형탈모증, 점막염(mucositis), 심근장애 등을 일으킬 수 있다(DiPiro 등 1993, Craig and Stitzel 1994, Hardman 등 1996).

CP-2는 일반적으로 한방에서 황련으로 알려진 콧스속 식물뿌리와 파두라고 알려져 있는 크로톤속의 식물종자의 혼합추출물로서, 이들 물질은

한방에서 항암제 처방으로 널리 이용되어 왔다(Hong 등 1982). 황련은 한국, 중국 및 일본에 자생 또는 재배되는 다년생 초본으로서 이들 뿌리는 혈압강하 및 항빈혈효과가 있으며, 낮은 농도에서도 강력한 항균작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(송주택 1991). 또한 파두는 말레이시아가 원산지이며, 동남아시아에 자생하는 다년생 관목으로서 이 식물의 종자는 중독과 혈관염을 일으킬수도 있으나, 항암성분이 있다는 보고도 있다(송주택 1991). CP-2는 강력한 항암효과가 있을 뿐만 아니라(김춘원 등 1993a, b, c), 항원성(antigenicity) 및 발암성(carcinogenicity) 평가시험에서 안전하다는 보고도 있다(Kang 등 1992a, b).

한편 본 실험의 일반조직 관찰에서 정상대조군에 비하여 종양이식대조군, CP-2 투여군에서 농축된 핵을 포함하고 있는 공포가 자주 관찰되었으며 특히 adriamycin 투여군에서 많이 관찰되었는데, 이와 같은 공포는 생체가 외부물질의 유입, 즉 종양세포이식으로 자극을 받았거나 항암제 투여로 인해 손상을 입은 세포들을 처리하는 과정에 있는 큰포식세포들이 포식소체를 많이 포함하고 있는 모습이라고 생각된다. 특히 CP-2 투여군에 비하여 adriamycin 투여군이 더 많은 손상을 받은 것 같은 실험결과는 CP-2가 최소한 지라조직에서는 adriamycin에 비하여 손상을 덜 주었기 때문이라고 생각된다.

Thymidine은 DNA에만 함유되어 있는 물질로서 thymidine pool에 저장되어 있다가 세포분열시에 thymidic acid로서 DNA합성에만 이용되기 때문에 표지된 DNA의 전단계물질인  $^3\text{H}$ -thymidine을 자기방사법적 연구에 많이 사용한다.  $^3\text{H}$ 는 방사능에너지가 낮은  $\beta$ 선을 방출하므로 그 해상력이 매우 우수하며 실험동물에  $^3\text{H}$ -thymidine을 투여하면 증식기세포핵에 표지되어 나타난다(Helpap 등 1981, Tielemans 등 1989, Ryberg 등 1990, Karam과 Leblond 1993).

본 연구에서 단위면적당 관찰된 표지세포 수는 종양이식대조군은 정상대조군에 비하여 다소 증가(104.9%)하였으나 CP-2 투여군은 다소 감소(90.2%)하였으며, adriamycin 투여군은 현저히 감소(18.9

%)하였다. 특히 adriamycin 투여군의 경우 표지세포의 수 뿐만 아니라 표지된 은입자의 수도 정상대조군을 비롯한 다른 실험군에 비하여 현저히 적은 세포가 많았다. 이와 같은 실험결과는 CP-2는 지라조직을 구성하는 세포의 DNA합성을 크게 억제하지 않으나 adriamycin은 DNA합성을 현저히 억제하였기 때문이라고 생각된다. 지라조직의 경우 구역(백색속질, 가장자리구역, 적색속질)에 따라 표지세포의 출현수가 달랐다. 정상대조군의 경우 가장자리구역에서 관찰된 표지세포의 수가 현저히 많아서 백색속질과 적색속질에서 관찰된 표지세포 수를 합친 것의 1.5배(149%)가 되었으며, 종양이식대조군도 유사한 경향(141%)을 보였으나, CP-2 투여군은 다소 감소하였다(116%). 그러나 adriamycin 투여군은 적색속질에서 관찰된 표지세포 수가 백색속질과 가장자리구역에서 관찰된 표지세포 수를 합친 것보다 더 많이 관찰되었다. 이와 같은 실험결과는 adriamycin이 적색속질에 비하여 백색속질과 가장자리구역에 분포하는 세포에 더 억제적으로 작용하였기 때문이라고 생각되나 그 원인을 밝히기 위해서는 좀 더 자세한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다. 그러나 adriamycin 투여군을 제외한 다른 실험군은 가장자리구역의 경우 표지세포의 수 뿐만 아니라 은입자의 수도 다른 구역에서 관찰된 표지세포에 비하여 월등히 많았다. 정상대조군이나 실험대조군의 경우 가장자리구역에서는 방사성동위원소를 섭취한 세포는 표지된 은입자가 너무 많아서 은입자의 수를 헤아리기 어려운 세포들이 많았으며, 은입자를 계수 할 수 있을 정도로 적게 표지된 세포들은 적었다. 이와 같은 현상은 가장자리구역이 혈액에서 기원한 세포와 입자성 물질이 지라실질과 처음으로 접하는 부위이며 동시에 재순환하는 림프구가 지라동굴의 혈액을 떠나 백색속질의 동맥주위림프구집으로 들어가는 부위로서 면역반응이 가장 먼저 일어나는 부위(정진웅 1998, Fawcett 1994)라는 사실에 비추어 볼 때, 가장자리구역은 면역반응이 시작되는 장소이면서 동시에 지라조직내에서 세포분열(DNA합성)이 가장 활발하게 진행되는 부위라고 생각된다.

한편 CP-2 투여군의 경우 지라조직에 대한 손상

정도가 미약하였으며 지라조직 전체의 표지세포 수도 정상대조군에 비하여 다소 감소(90.2%)하였다. 그러나 부위에 따라 변화정도가 달라서 백색속질은 정상대조군에 비하여 다소 감소(96.4%)하였고, 적색속질은 다소 증가(109.6%)하였는데 비하여 가장자리구역에서는 정상대조군에 비하여 80.9%로 유의하게 감소하였다. 이와 같은 결과는 CP-2가 지라의 백색속질과 적색속질에 분포하는 세포에 비하여 가장자리구역에 분포하는 세포의 DNA합성을 더 억제한 결과라고 생각된다. 또한 CP-2는 지라조직에 대해서는 독성이 적으면서도 항암효과가 있는 약품이라고 생각된다.

한편 정상대조군과 종양이식대조군의 경우 표지세포수가 비슷하게 나타났으며 일반적인 조직관찰에서 지라조직에 큰 변화가 관찰되지 않은 점으로 보아 암세포를 이식하여도 2주일 정도의 짧은 기간에는 지라조직에 직접적인 영향을 미치지 않는 것 같다.

생쥐의 지라는 면역기관이면서 동시에 조혈기관이므로 본 연구의 결과가 면역계통세포들의 변화인지 조혈계통세포들의 변화인지를 광학현미경 수준에서 명확히 구분하기는 쉽지 않다. 그러나 Ehrlich 암세포를 이식한 동물 또는 정상동물에 5-FU 또는 mitomycin C를 투여했을 때 지라조직에서는 큰 포식세포가 많이 관찰되었고 림프구와 세망세포내에 수초구조가 많이 관찰되었으며(고정식 등 2000), 림프구가 급격히 감소하고 세망세포들의 변성이 심했다는 보고(고정식 등 1997, 안의태 등 1997)에 비추어 볼 때, 본 실험에서 사용한 항암제의 성분이 5-fluorouracil 또는 mitomycin C와 다르기는 하나, DNA합성을 방해하는 기능이 유사하므로 면역계통의 세포들에 변화를 주었다고 생각되거나 항암제의 특성상 조혈계통의 세포에도 영향을 미칠 수 있다고 생각된다. 한편 CP-2 투여군과 adriamycin 투여군의 경우 적색속질에 비하여 백색속질과 가장자리구역의 표지세포 수가 더 많이 감소한 실험 결과는 이들 항암제가 조혈계통의 세포보다는 면역계통의 세포에 더 심한 상해를 주었기 때문이라고 생각된다.

이상의 고찰을 종합하여 보면 생쥐 지라조직의

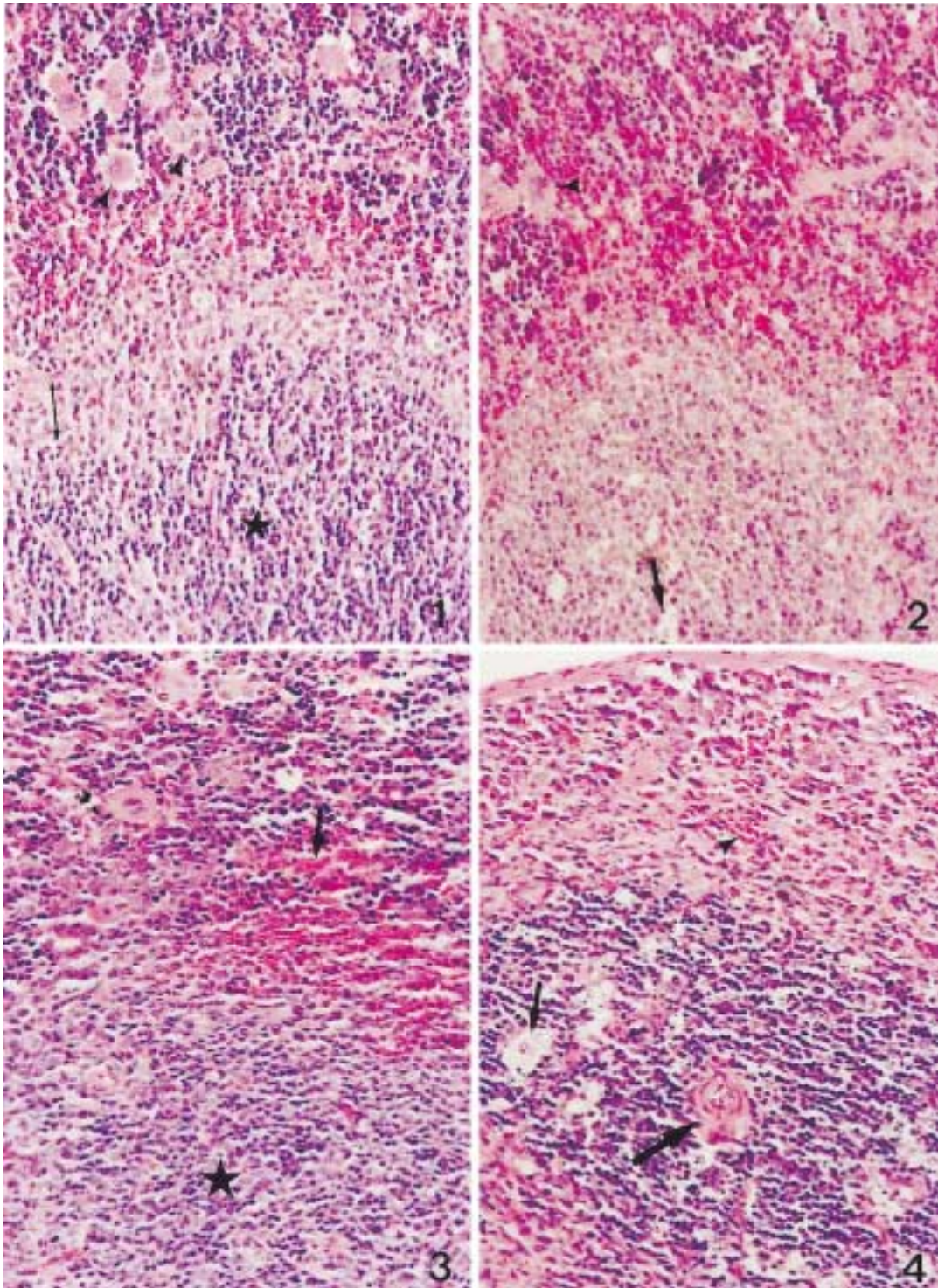
경우 CP-2 또는 adriamycin은 적색속질과 백색속질에 비하여 가장자리구역에 분포하는 세포의 DNA합성에 억제적으로 작용한다고 생각된다. 특히 CP-2는 adriamycin에 비하여 DNA합성을 억제하는 효과는 적으나 지라조직에 형태적인 손상을 거의 주지 않는 항암제라고 생각한다.

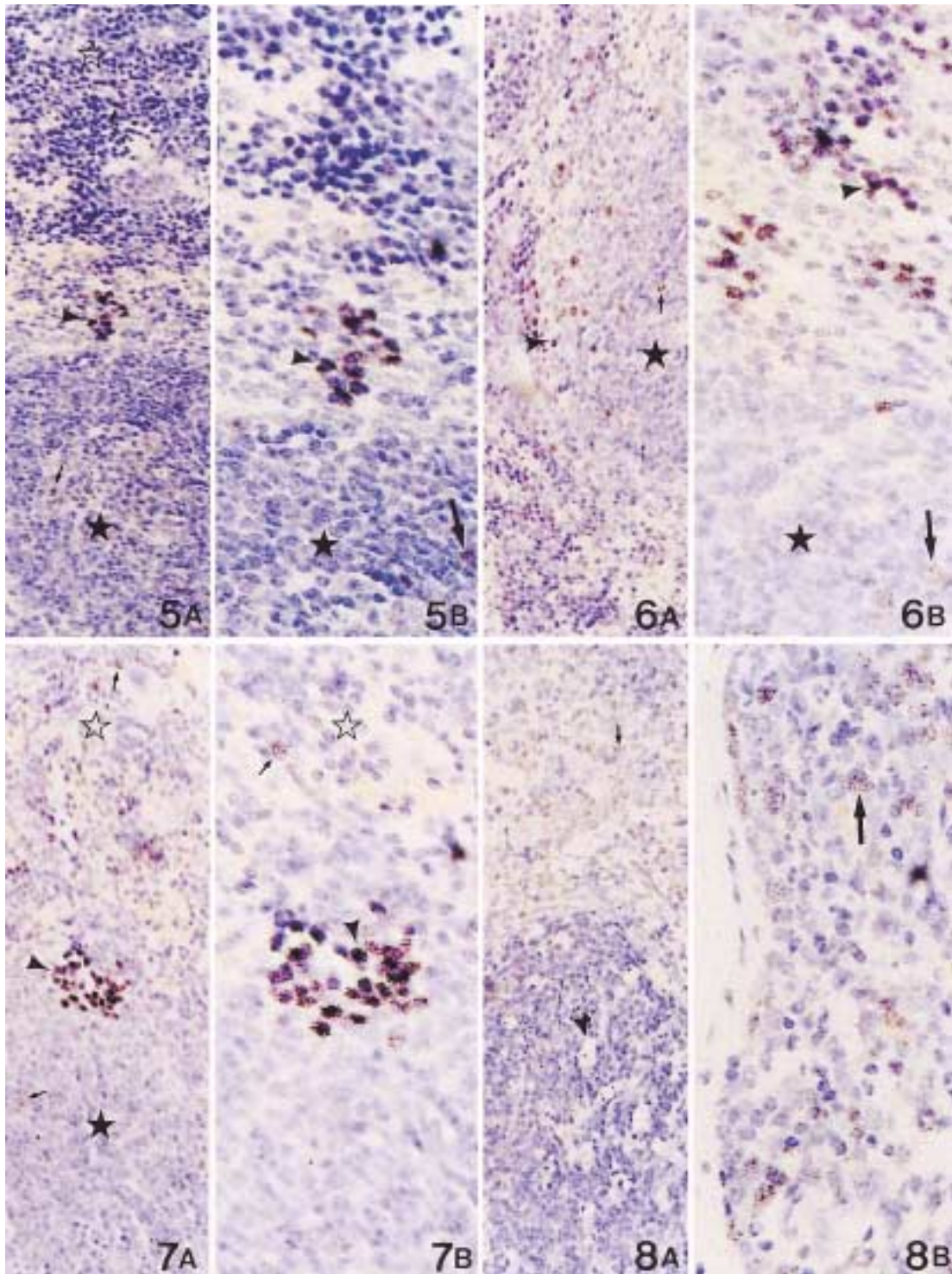
## 참 고 문 헌

- 고정식, 안의태, 박경호, 경홍기, 한영복 : 5-Fluorouracil 및 mitomycin이 가슴샘의 미세구조에 미치는 영향. 한국진자현미경학회지 27: 13-30, 1997.
- 고정식, 안의태, 박경호, 김진국, 김의환, 정영신 : 5-fluorouracil 및 mitomycin C가 지라조직에 미치는 영향. 대한체질인류학회지 13(2) : 221-238, 2000.
- 김춘원, 문정조, 한영복, 경홍기, 홍은경, 조영호, 김종배 : 파두와 황련의 혼합추출물(CP-2)이 동물 체내에서의 수종 암세포증식에 미치는 영향. 중앙의학 58(5) : 305-314, 1993a.
- 김춘원, 문정조, 한영복, 김윤규, 서경원, 김종배 : 종양을 유발시킨 마우스에서 콕티스속 근경과 탈지된 크로톤 종자의 혼합추출물(CP-2)이 면역계에 미치는 영향에 관한 연구. 중앙의학 58(3) : 177-184, 1993b.
- 김춘원, 서경원, 조영호, 홍은경, 한영복, 문정조, 경홍기, 김정환, 김종배 : 콕티스속 근경과 탈지된 크로톤 종자의 혼합추출물(CP-2)이 수종 암세포 대한 세포독성의 효과. 중앙의학 58(3) : 185-194, 1993c.
- 송주택 : 식물학 대사전, 서울, 한국도서출판 중앙회. p. 284, p. 572, 1991.
- 안의태, 박경호, 고정식, 정기수, 한영복, 홍은경, 정영신, 유보림, 김상건, 강종구, 이경영 : Acriflavine과 guanosine 복합투여가 생쥐가슴샘결질의 미세구조에 미치는 영향. 대한해부학회지 30 : 595-608, 1997.
- 정진용 : 조직생물학, 서울, 수문사, pp. 405-414, 1998.
- Buckley PJ, Smith MR, Braverman MF, Dickson SA : Human spleen contains phenotypic subsets of macrophages and dendritic cells that occupy discrete microanatomic locations. Am J Pathol 128 : 505-520, 1987.
- Clark WG, Brater CD, Johnson AR : Goth's Medical Pharmacology, 13th ed. St. Louis, Mosby Year Book, pp. 704-714, 1992.
- Craig CR, Stitzel RE : Modern Phamacology, 4th ed, Boston, Little Brown and Company, pp. 687-689, 1994.
- DiPiro JT, Talbert RL, Hayes PE, Yee GC, Matzke GR, Posey LM : Pharmacotherapy, A Pathophysiologic Approach, 2nd ed, Norwalk, Appleton and Lange, pp. 1906-1908, 1993.
- Fawcett DW : A textbook of histology, 12th ed, New York, Chapman and Hall, pp. 460-472, 1994.
- Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG : Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed, New York, McGraw-Hill, pp. 1225-1232, 1264-1265, 1996.
- Helpap B, Hattori T, Gedigk P : Repair of gastric ulcer. A cell kinetic study. Virchows Arch (Pathol Anat) 392 : 159-170, 1981.
- Hong ND, Kim JW, Doo HK, Kim NJ : Studies on the efficiency of combined perparation of crude drugs (v). Kor J Pharmacol 13(1) : 26-32, 1982.
- Kang KS, Cho JJ, Kim BW et al. : the study on carcinogenicity of coptis rhizome and croton tiglium L. Korean J Toxicol 8 : 131-137, 1992a.
- Kang KS, Cho JJ, Kim BW : Antigenicity test of coptis rhizome and tiglium L. extract (CP-2) in guinea pig and rabbits. Korean J Toxicol 8 : 139-143, 1992b.
- Karam SM, Leblond CP : Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. I. Identification of proliferative cell types and pinpointing of the stem cell. Anat Rec 236 : 259-279, 1993.
- King RJB : Principles of cancer treatment, In cancer biology, Essex, Longman, pp. 183-211, 1996.
- Malpas JS : Chemotherapy, In Introduction to the cellular and molecular biology of cancer, eds. Frank LM and Teich NM 2nd ed. Oxford, Oxford Univ Press, pp. 451-467, 1991.
- Ryberg B, Tielemans Y, Axelson J, Carlsson E, Hakanson R, Mattsson H, Sundler F, Willems G : Gastrin stimulates the self replication rate of the enterochromaffin-like cells in the rat stomach. Gastroenterology 99 : 935-942, 1990.
- Stein H, Gerdes J, Mason DY : The normal and malignant germinal center. Clin Haematol 11 : 531-559, 1982.
- Tielemans Y, Hakanson R, Sundler F, Willems G : Proliferation of enterochromaffin like cells in omeprazole-treated hypergastrinemic rats. Gastroenterology 96 : 723-729, 1989.

## Legends for Figures

- Fig. 1.** Photograph of hematoxylin–eosin stained spleen of a normal mouse. ( $\times 200$ ) A part of white pulp (asterisk) which contains many lymphocytes and some megakaryocytes (arrowheads) in the red pulp are seen. Dual headed arrow indicates marginal zone.
- Fig. 2.** Photograph of hematoxylin–eosin stained spleen of a tumor control mouse. ( $\times 200$ ) A few vacuoles (arrow) containing pyknotic nuclei in the white pulp, and megakaryocytes (arrowhead) in the red pulp are seen.
- Fig. 3.** Photograph of hematoxylin–eosin stained spleen of a mouse, treated with CP–2. ( $\times 200$ ) Morphological features are similar to normal ones. A part of white pulp (asterisk) which contains many lymphocytes, some megakaryocytes (arrowhead) and many erythrocytes (arrow) are seen in the splenic sinuses.
- Fig. 4.** Photograph of hematoxylin–eosin stained spleen of a mouse, treated with adriamycin. ( $\times 200$ ) Note that the vacuoles containing pyknotic nuclei (arrow) in the white pulp are increased as compared with those seen in the tumor control and CP–2 groups. Central artery (large arrow) in the white pulp, erythrocytes (arrowhead) in the splenic sinuses and splenic capsule are seen.
- Fig. 5A.** Photograph taken from an autoradiogram of the spleen of normal mouse. ( $\times 200$ ) Most of the labeled cells (arrowhead) are located in the marginal zone and some cells (small arrows) containing few silver grains are seen in the white pulp (asterisk) and red pulp (vacant asterisk).
- Fig. 5B.** Photograph taken from an autoradiogram of the spleen of normal mouse. ( $\times 400$ ) The labeled cells (arrowhead) containing massive silver grains are seen over the nuclei in the marginal zone. A labeled cell (arrow) containing a few silver grains is seen in the white pulp (asterisk).
- Fig. 6A.** Photograph taken from an autoradiogram of the spleen of a tumor control mouse. ( $\times 200$ ) Most of the labeled cells (arrowhead) are seen near the marginal zone, and some cells (arrow) containing a few silver grains are seen in the white pulp (asterisk).
- Fig. 6B.** Photograph taken from an autoradiogram of the spleen of a tumor control mouse. ( $\times 400$ ) The labeled cells (arrowhead) with silver grains are seen over the nuclei near the marginal zone, and some cells containing few silver grains (arrow) are seen in the white pulp (asterisk).
- Fig. 7A.** Photograph taken from an autoradiogram of the spleen of a mouse, treated with CP–2. ( $\times 200$ ) Morphological features are similar to tumor control ones. Most of the labeled cells (arrowhead) are located near the marginal zone and some cells (small arrows) containing few silver grains are seen in the white pulp (asterisk) and red pulp (vacant asterisk).
- Fig. 7B.** Photograph taken from an autoradiogram of the spleen of a mouse, treated with CP–2. ( $\times 400$ ) Most of the heavy labeled cells (arrowhead) are located near the marginal zone, and some cells containing few silver grains (small arrow) are seen in the red pulp (vacant asterisk).
- Fig. 8A.** Photograph taken from an autoradiogram of the spleen of a mouse, treated with adriamycin. ( $\times 200$ ) Many vacuoles (arrowhead) containing pyknotic nuclei are seen in the white pulp. Very weak labeled cells (small arrow) are seen in the marginal zone.
- Fig. 8B.** Photograph taken from an autoradiogram of the spleen of a mouse, treated with adriamycin. ( $\times 400$ ) Some moderately labeled cells (arrow) with silver grains are seen in the red pulp.





## Abstract

# Effects of Adriamycin or CP-2 on the Spleen of Mouse Implanted with Ehrlich Carcinoma Cells: An Autoradiographic Study

Jeong Sik Ko, E Tay Ahn, Kyung Ho Park, Jin Gook Kim

*Department of Anatomy, Soonchunhyang University Medical College*

In this experiment, side effects of two anticancer drugs (adriamycin and CP-2) on the structure of spleen were histologically studied.

Each of ICR mice was inoculated with  $1 \times 10^7$  Ehrlich carcinoma cells subcutaneously in the inguinal area. From next day, 0.2 ml of saline solution, adriamycin (2 mg/kg) or CP-2 (30 mg/kg) were injected subcutaneously every other day. The day following the 7th injection of adriamycin or CP-2, each mouse was injected with a single dose of  $0.7 \mu\text{Ci/gm}$  of methyl- $^3\text{H}$ -thymidine (25 Ci/mmol, Amersham Lab., England) through tail vein. Seventy minutes after the thymidine injection, animals were sacrificed, and splenic tissues were collected and fixed in 10% neutral formalin. Deparaffinized sections were coated with autoradiographic emulsion EM-1 (Amersham Lab., England) in the dark room and dried, and were kept in a light-tight box. The sections were exposed for 5 weeks in the dark room, and were developed in D-19 developer. The number of the labeled cells in the areas of the white pulp, the red pulp and the marginal zone (mean number of labeled cells per  $0.21 \text{ mm}^2$ ) were observed and calculated.

In the spleen of adriamycin treated group, vacuoles containing pyknotic nuclei were observed frequently. Whereas in the CP-2 treated group, morphological changes of the spleen were not observed. The number of the labeled cells of normal control, experimental control, CP-2 treated and adriamycin treated groups were  $240.3 \pm 53.28$ ,  $252.3 \pm 58.24$ ,  $216.7 \pm 55.17$  and  $45.4 \pm 15.46$ , respectively, and most of the labeled cells were located near the marginal zone of the spleen. In the adriamycin treated group, labeled cells containing a few silver grains of  $^3\text{H}$ -thymidine were observed more frequently than in those of the normal and experimental control groups.

From the above results, adriamycin and CP-2 may suppress the DNA synthesis of the splenic tissues. Especially, CP-2 does not results any histological defect on the splenic tissues. These result suggest that CP-2 is expected as one of effective anticancer drugs.

**Key words** : Spleen, Autoradiographic study,  $^3\text{H}$ -thymidine, Adriamycin, CP-2