

종양치료제가 생쥐 막창자점막의 DNA 합성에 미치는 영향

나지웅, 안의태, 박경호, 박대균, 고정식
순천향대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : 이 실험에서는 Ehrlich 암세포를 살부위에 이식한 후 5-fluorouracil, mitomycin C 및 adriamycin을 투여하였을 때, 막창자조직의 형태학적 변화와 DNA합성능을 비교 연구하였다.

실험동물로는 체중 25 gm 내외의 성숙한 생쥐(ICR계통)를 사용하였다. 정상대조군 이외의 암세포이식군 동물들은 살부위의 피부밑조직에 각각 1×10^7 의 Ehrlich암세포를 주사하여 이식한 후 다음날 부터 실험군별로 5-fluorouracil 30 mg/kg, mitomycin C 400 μ g/kg 및 adriamycin 2 mg/kg를 격일 간격으로 7회 투여하였다. 자기방사법적 관찰을 위해서는 모든 실험동물을 마지막 주사 후, ^3H -thymidine 0.7 μ Ci/gm을 꼬리에 한번 정맥주사하고, 70분 후 도살하여 막창자조직을 떼어내어 표본을 제작하였다. 관찰은 점막근육판을 따라 점막길이 3.5 mm의 창자생상피에 분포하는 ^3H -thymidine 표지세포수를 계수하였으며 일반조직 관찰을 위해서는 hematoxylin-eosin (H-E)염색을 시행하였다.

일반조직 관찰에서 암세포이식대조군과 mitomycin C 투여군의 경우 조직학적 구조는 정상대조군에 비하여 고유판에서 림프구와 호산성백혈구가 비교적 많이 관찰된 것 외에는 별다른 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 5-fluorouracil 투여군은 창자음의 샘상피세포들이 종창현상을 보여 정상대조군의 세포들 보다 약간 크게 보였다. Adriamycin 투여군의 경우에는 창자음의 모습이 불규칙하고 넓어졌으며, 호염기성 상피세포들이 많이 관찰되었다.

자기방사법적 연구에서 정상대조군, 암세포이식대조군, 5-fluorouracil 투여군, mitomycin C 투여군 및 adriamycin 투여군은 막창자 점막길이 3.5 mm 당 출현하는 은입자 표지세포수가 각각 362.2 ± 56.12 , 350.7 ± 42.65 , 215.7 ± 80.55 , 144.2 ± 34.60 및 125.0 ± 37.45 개 였다. 특히 mitomycin C 투여군과 adriamycin 투여군은 정상대조군과 암세포이식대조군에 비하여 은입자의 수가 적은 세포가 많았다.

이상의 결과를 종합하여 보면 adriamycin과 mitomycin C가 5-fluorouracil에 비해 생쥐 막창자점막상피의 DNA 합성에 더욱 억제적으로 작용하며, 특히 adriamycin은 mitomycin 5-fluorouracil에 비해 막창자점막조직에 손상을 많이 준다고 생각된다.

찾아보기 낱말 : Ehrlich 암세포, 항암제, DNA합성지수, 자기방사법적 연구

서론

대부분의 항암제는 기본적으로 세포분열을 억제하거나 핵산합성과 단백질합성을 억제하는 성질을 지니기 때문에, 암세포에만 선택적으로 작용하기 보다는 정상세포의 분열과 대사과정까지도 억제한다

(Malpas 1991, King 1996). 그러므로 세포에 상당히 큰 손상을 주고 있으며, 대표적인 부작용으로는 골수기능에 장애를 주어 백혈구나 혈소판이 감소되며, 소화계통, 호흡계통, 생식계통에도 많은 손상을 초래한다(Hardman 등 1996).

5-fluorouracil은 세포주기에서 특정과정의 진행을 막는 항대사성물질로서 pyrimidine nucleotide의 합성을 억제하고 더 나아가서 핵산의 합성을 방해하기 때문에 종양치료의 목적으로 사용되며(Hardman

교신저자 : 고정식(순천향대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편 : jeongsik@sch.ac.kr

등 1996), adriamycin은 anthracene 유도체 가운데 가장 광범위하게 이용되는 항암성항생물질로서 일명 doxorubicin이라고 하는데, 이 약제는 DNA 염기쌍 사이에 작용하여 DNA 합성을 방해하며 중추신경계를 제외한 온몸에 분포하고, 천천히 몸 밖으로 배출되므로 항암효과가 높은 반면에 독성도 강하다 (DiPiro 등 1993, Craig와 Stützel 1994, Hardman 등 1996). 한편 mitomycin C는 *streptomyces caepitosus*에서 추출한 항암성항생제로서 세포의 DNA 합성을 억제하며, 일부는 유리기 (free radical)를 만들어 DNA에 손상을 주기도 하는데, G1 후기와 S기 초기에 영향을 미친다 (Fisher와 Aristiff 1988, Hardman 등 1996).

소화기계통을 이루는 위와 창자는 상피의 세포생활주기가 짧기 (Cameron 1971) 때문에 항암치료과정에서 욕지기를 비롯한 소화장애 등 부작용이 심한 장기이다 (Clark 등 1992, Hardman 등 1996). 또한 창자는 위와 함께 스트레스, 감염 및 종양 등의 질병상태에 따라 민감하게 반응하는 장기 (Rubio 등 1988, Varedi 등 1999, Martins 등 2001)이므로 생체에 암세포를 이식하거나 항암제를 투여하면 그 기능이나 형태에 변화가 있으리라고 예상된다. 이 실험에서 관찰하고자 하는 생쥐의 막창자는 작은창자인 돌창자와 큰창자인 잘록창자의 이행부위에서 아래쪽으로 크게 돌출된 부위로서 작은창자에서 소화되지 않은 섬유질을 발효시켜 소화되도록 도와주는 기능이 있을 뿐만 아니라 점막상피에서 짧은사슬 지방산과 비타민 K 및 B도 생산하며 (Hedrich와 Bullock 2004), 끝부위에는 면역세포와 림프구가 많이 모여 있어 사람의 막창자꼬리와 그 구조가 유사하다 (Parkhomenko 등 1991). 그러나 사람의 막창자꼬리에서는 림프절이 여러 개 모여 집단 (cluster)을 형성하는 것과는 달리, 생쥐의 막창자는 속공간이 넓고 하나의 큰림프절이 존재한다 (Mizoguchi 등 1996). 막창자꼬리의 림프절은 소화관 점막 면역계통에 관여하는 부위로서 (Brandtzaeg 등 1989, Poussier와 Julius 1994), 림프절을 덮고 있는 상피세포에는 돌창자의 Peyer's patch를 덮고 있는 점막의 M 세포와 같이 창자 속공간의 항원을 점막 면역세포로 운반하는 세포도 존재한다 (Bockman와 Cooper

1973, Owen 1994). 한편 막창자꼬리의 림프조직은 대장염발생을 억제하는 기능도 있다 (Kriegelstein 등 2001, Farkas 등 2005).

이 실험에서는 Ehrlich 암세포를 살부위의 피부밑 조직에 이식한 후 5-fluorouracil, adriamycin 및 mitomycin C를 이용하여 실험적 종양을 치료할 때 소화기관과 면역기관의 특징을 함께 갖고 있는 막창자 조직에 미치는 영향을 형태학적으로 연구하고자 하였으며, ³H-thymidine을 투여한 후 자기방사법적 연구를 시행하여 막창자조직의 형태학적 변화뿐만 아니라 DNA합성능력을 비교 관찰하여 종양치료과정에 따른 막창자의 변화를 연구하는데 기본정보를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물로는 체중 25 gm 내외의 성숙한 생쥐 (ICR계통)를 정상대조군, 암세포이식대조군, 암세포 이식후 5-fluorouracil 투여군, 암세포이식후 adriamycin 투여군 및 암세포 이식후 mitomycin C 투여군으로 구분하였다. 각 약품의 주사량은 항암치료시에 사용되는 양과 LD₅₀를 참고하여 각 군별로 5-fluorouracil (30 mg/kg), adriamycin (2 mg/kg) 및 mitomycin C (400 µg/kg) 를 격일 간격으로 계속 투여하였으며, 각 실험군당 5마리씩의 동물을 사용하였다.

정상대조군 이외의 암세포 이식군 동물들은 살부위 피부밑조직에 각각 1×10^7 의 Ehrlich 암세포를 이식한 후 다음 날부터 실험군 별로 5-fluorouracil, adriamycin 또는 mitomycin C를 격일 간격으로 투여했으며, 종양이식대조군은 암세포이식 후에 약제 대신 0.2 mL의 생리식염수를 피부밑조직에 주사하였고, 정상대조군은 암세포를 이식하지 않은 동물을 사용하였다. 실험군 별로 약제 또는 생리식염수를 각각 7회씩 투여한 후 다음날 ether마취하에 앞배벽을 열어 막창자조직을 절취하였으며, 동물들은 희생시키기 전날 저녁부터 사료는 주지 않고 물만 공급하였다. 일반조직관찰을 위해서는 10% 중성 formalin으로 고정된 후 hematoxylin-eosin (H-E)염색법을 시행하였다. 한편 자기방사법적 관찰을 위해서는

모든 실험동물을 마지막 주사 후, 하루주기에 따른 변화를 최소화하기 위하여 다음 날 오전 9시부터 10시 사이에 ^3H -thymidine (methyl- ^3H -thymidine: specific activity 25Ci/mmol, Amersham Lab., England) 0.7 $\mu\text{Ci/gm}$ 를 꼬리에 한번 정맥주사하고, 70분 후 도살하여 막창자조직을 떼어내어 10% formalin에 고정하였다. 조직은 통상적인 방법에 따라 수세, 탈수, 파라핀 포매과정을 거쳤고, 절편을 만들어 젤라틴을 입힌 슬라이드에 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 막창자점막이 세로로 잘 절단된 부위를 택하여 점막근육관을 따라 250배율로 관찰하되, 접안렌즈의 사진촬영용 직사각형의 긴 쪽 길이 (0.35 mm)내에 보이는 막창자점막의 조직을 한 시야로 하여 각각 10시야씩 (점막길이 3.5 mm) 관찰하였다. 막창자점막을 이루는 세포 가운데 10개 이상의 은입자가 있는 세포를 표지세포로 간주하여 계수하였으며, 막창자꼬리점막을 이루는 세포 가운데 10개 이상의 은입자가 있는 세포를 표지세포로 간주하여 계수하였으며, 통계분석은 SPSS (Ver 11.0)을 이용하여 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 시행하였다.

결 과

1. 일반조직 관찰

막창자는 곧창자에 비하여 지름이 커서 속공간은 훨씬 넓었으나 점막은 그 두께가 얇았다. 점막은 점막근육관이 속공간으로 돌출된 점막주름이 부위에 따라 부분적으로 존재하나 발달정도가 미약하였으며 점막의 표면은 단층원주상피로 덮여 있었다. 또한 점막은 표면상피가 고유판 속으로 함몰되어 형성된 창자염 (intestinal crypt)으로 이루어졌다. 정상

대조군의 경우 창자염의 깊이는 점막주름의 위치에 따라 120~160 μm 로 비교적 다양하였으며 창자염 사이의 폭도 위치에 따라 40~50 μm 로 다양하였다. 창자염을 이루는 상피세포에는 술잔세포 (goblet cell)도 관찰되었는데 대체적으로 창자염의 바닥쪽에서 더 많이 관찰되었다. 또한 상피세포 속에는 림프구와 유사분열중인 핵들도 소수 관찰되었으며, 고유판에서는 림프구, 호산성백혈구 등이 관찰되었다 (Fig. 1). 막창자의 속공간에는 소화되지 않은 호염기성의 구조들이 많이 관찰되었다. 한편 생쥐의 막창자는 사람의 막창자꼬리처럼 고유판과 점막밑조직에 림프구들이 모여 커다란 림프절을 형성하는 경우도 가끔 관찰되었으나, 여러 개의 림프절로 이루어진 사람의 것과는 달리 단 하나의 커다란 림프절만 관찰되었다. 림프절이 있는 부분은 다른 부위에 비해 창자염이 미약하거나 또는 창자염이 없이 표면상피로만 덮여 있었다 (Fig. 2). 점막밑조직에는 림프관들이 자주 관찰되었고 근육층은 속돌림층과 바깥세로층이 뚜렷하였다.

암세포이식대조군과 mitomycin C 투여군은 조직학적 구조가 정상대조군에 비하여 고유판에서 림프구와 호산성백혈구가 비교적 많이 관찰된 것 외에는 정상대조군과 별다른 차이가 없었다 (Figs. 3, 6). 그러나 5-fluorouracil 투여군은 창자염의 속공간이 넓고, 점막을 이루는 상피세포들은 정상대조군의 핵과 세포질에 비하여 다소 더 크고 흐리게 염색되는 경우가 관찰되었다 (Fig. 4). 한편 adriamycin 투여군은 정상대조군보다 림프구가 더 많이 관찰되었으며, 창자염의 속공간이 넓고, 점막의 모습이 정상대조군의 것에 비하여 다소 흐트러져 보였으며, 창자염을 이루는 상피세포들이 호염기성을 띠는 경우가 많이 관찰되었다 (Fig. 5).

2. 자기방사표본의 관찰

정상대조군과 실험군의 막창자조직에는 은입자들이 관찰되는 표지세포들이 주로 창자염의 바닥쪽 1/2아래의 샘상피세포에서 관찰되었으며, 고유판 속의 림프절에서도 표지세포가 드물게 관찰되었다. 정상대조군에서는 창자염의 상피에 출현하는 표지세

Table 1. Relative number of labeled cells in the intestinal crypts in 3.5 mm width (6 μm thickness) of mouse cecal mucosa, after injection of ³H-thymidine in different groups

Group	Number	Ratio	
		Experiment/ normal	Experiment/ tumor control
Normal control	362.2 (±56.12)	1.00	1.03
Tumor control	350.7 (±42.65)	0.97	1.00
5-fluorouracil	215.7 (±80.55)	0.60*	0.62*
Adriamycin	125.0 (±37.47)	0.35**	0.36**
Mitomycin C	144.2 (±34.60)	0.40**	0.41**

Numbers in parenthesis denote standard deviation of means.
 *Difference between normal control and 5-fluorouracil-treated groups is significant at $p < 0.05$ from the results of one-way ANOVA.
 **Difference between normal control and mitomycin C (or adrimycin) treated groups are very highly significant at $p < 0.001$ from the results of one-way ANOVA. Difference between 5-fluorouracil and adrimycin-treated groups are significant at $p < 0.05$ from the results of one-way ANOVA.

포가 362.2개 관찰되었는데, 은입자를 많이 포함하고 있는 세포들이 많이 관찰되었다(Fig. 7, Table 1). 암세포이식대조군은 표지세포가 350.7개 관찰되어 정상대조군의 97%로 적었으나 은입자가 많이 표지된 세포가 많았다(Table 1).

5-fluorouracil 투여군은 표지세포가 215.7개로서 정상대조군의 60%, 암세포이식군의 62%로 감소하였으나 은입자가 많이 표지된 세포가 많이 관찰되었다(Fig. 8, Table 1). 그러나 adriamycin 투여군은 표지세포수가 125.0개로서 정상대조군의 35%, 암세포이식군의 36% 밖에 안 될 정도로 매우 유의하게 감소하였으며, 표지된 은입자 수도 아주 적은 세포들이 많이 관찰되었다(Fig. 9, Table 1). 또한 mitomycin C 투여군 역시 표지세포의 수가 144.2개로서 정상대조군의 40%, 암세포이식대조군의 41% 밖에 안 될 정도로 매우 유의하게 감소하였을 뿐만 아니라 표지된 은입자의 수가 적은 세포들이 많이 관찰되었다(Fig. 10, Table 1).

일원배치분산분석(one-way ANOVA)에서 항암제들 사이의 평균값을 5-fluorouracil 투여군을 기준으로 비교해 보았을 때 adriamycin 투여군의 평균값은 통계학적으로 유의하게 적은 것($p=0.047$)으로 나타났으나, mitomycin C 투여군의 평균값은 통계학적 유의성을 보이지 않았다($p=0.167$).

고 찰

Foster 등(1983)은 생쥐에는 막창자꼬리가 없다고 하였으나 학자에 따라서는 막창자꼬리를 별도로 구분(Mizoguchi 등 1996, Krieglstein 등 2001, Farkas 등 2005)하기도 한다. 그러나 많은 경우 막창자에서 림프구가 많이 모여 있는 끝부분을 막창자꼬리라고 별도로 구분하지 않고 막창자 속에 포함시키기도 한다(Jin과 Nagata 1993, Clark 등 1994, Poussier과 Julius 1994, Clark 등 1995, Hedrich와 Bullock 2004).

이 실험에서 사용한 ICR생쥐의 막창자는 돌창자와 오름갈록창자의 이행부위에서 아래쪽으로 길게 발달되어 있었으나 막창자꼬리부분이 육안적으로 구분되지 않았다. 그러나 조직학적으로는 큰림프절이 점막층에 존재하여 사람의 막창자꼬리처럼 보이는 구조가 관찰되었다. Mizoguchi 등(1996)은 TCR-alpha mutant 생쥐의 막창자꼬리는 막창자에서 연속되며 속공간이 넓고 하나의 큰 림프절이 존재하는데, 림프절은 Peyer's patch와 유사하게 한 층의 점막상피로 덮여 있고 술잔세포는 없다고 하였다. 한편 이 실험에서도 막창자는 속공간이 넓고 커다란 림프절이 한 개 존재하는 점은 Mizoguchi 등(1996)의 보고와 유사하였으나 창자음에 다수의 술잔세포가 관찰된 점은 Mizoguchi 등(1996)의 보고와 달랐다. 이와 같은 차이는 마치 ddY 생쥐의 막창자점막에서는 serotonin 면역반응세포만 관찰되었으나 C57BL/6 생쥐의 막창자점막에서는 chromogranin A (CGA) 면역반응세포와 serotonin 반응세포가 함께 관찰되어 같은 생쥐의 경우도 종(strain)에 따라 막창자점막의 내분비세포의 분포양상이 달랐다는 보고(Ku 등 2003, 2004)에 비추어 볼 때 실험에 사용한 종(strain)이 다르기 때문이 아닌가 추측된다.

5-fluorouracil은 pyrimidine nucleotide의 합성을 억제하고 더 나아가서 핵산의 합성을 방해함으로써 종양의 치료목적에 사용되며, 항암치료나 혈구형성에 중요한 역할을 하는 혈소판형성인자(platelet activating factor, PAF)의 생산을 조절하는데도 관여한다. 5-fluorouracil은 대부분 간에서 uracil과 같은 경로로 파괴되는데 혈중반감기가 10~20분으로 비

교적 빨리 혈장에서 제거된다. 그러나 투여후 9~14 일에 백혈구감소 및 혈소판감소가 나타나며 며칠 내에 회복되며, 주된 부작용으로는 위장관 점막의 궤양, 탈모증, 피부염 및 피부색소침착 등을 볼 수 있다(Hardman 등 1996). Adriamycin은 anthracene 유도체 가운데 가장 광범위하게 이용되는 항암성항생물질로서 DNA 염기쌍 사이에 작용하여 DNA 합성을 방해하며 중추신경계를 제외한 온몸에 분포하며, 반감기가 비교적 길어서(30시간 내지 50시간) 천천히 몸 밖으로 배출되는데, 간에서 대사되며 50%는 담즙을 통해 배출되고 10% 미만이 소변을 통해 배출된다. Adriamycin은 유방암치료에 효과가 매우 높으며, 육종(sarcoma), 위장관암, 방광암, 여성 생식기계통의 종양, 다발성골수종, 폐암, 급성백혈병 등의 치료에도 효과가 있다. 그러나 효과가 높은 반면에 독성도 강하여 육지기, 구토, 원형탈모증, 점막염(mucositis), 심근장애 등을 일으킬 수 있으며(DiPiro 등 1993, Craig와 Stitzel 1994, Hardman 등 1996), 백혈구가 감소하고 위장자관에 손상을 주며 체중이 감소되는 등 부작용이 있다(Killion 등 1996, Herman 등 1997, Kimura 등 2001). Mitomycin C는 *streptomyces caepitosus*에서 추출한 항암성항생제로서 세포 내에서 quinone이 환원된 후 alkyl화 작용을 나타낸다. DNA 구조 내에서 quinone과 cytosin 함량에 비례하여 DNA 합성을 억제하며, 일부는 유리기(free radical)를 만들어 DNA에 손상을 주기도 하는데, G1 후기와 S기 초기에 영향을 미친다. 주사 후 간에서 대사되며 신속히 혈액에서 제거되는데, 골수기능을 억제하는 부작용 외에도 구토, 설염, 설사, 피부염 및 발열 등을 볼 수 있다(Fisher와 Aristiff 1988, Hardman 등 1996).

이 실험에서 암세포이식대조군과 mitomycin C 투여군을 정상대조군과 비교하면 창자샘의 고유판에서 림프구와 호산성백혈구가 비교적 많이 관찰된 것 외에는 조직학적 구조에 별다른 차이가 없었다. 이와 같은 실험결과는 암세포를 이식하거나 mitomycin C를 투여하여도 2주일 정도의 짧은 기간에는 투여약물이 막창자점막조직에 직접적인 영향을 미치지 않았기 때문이라고 생각된다. 그러나 5-fluorouracil 투여군은 창자음의 속공간이 넓은 경우와

점막을 이루는 상피세포들의 핵과 세포질이 정상대조군의 것에 비하여 다소 더 크고 흐리게 염색되어 보이는 경우가 관찰되었다. 이와 같은 결과는 조직이 화학적, 생물학적 또는 물리적 자극을 받으면 일시적으로 세포질 내 이온농도조절에 이상이 생겨 액체가 세포 속으로 유입되어 종창(swelling)이 발생할 수 있다는 사실(Rubin과 Farber 1999)에 비추어 볼 때 5-fluorouracil 투여가 막창자점막 세포에 가벼운 종창현상을 초래하는 손상을 주었기 때문이라고 추측된다. 또한 adriamycin 투여군은 정상대조군에 비하여 림프구가 더 많이 관찰되었을 뿐만 아니라 창자음의 속공간이 넓고, 점막의 모습이 정상대조군의 것에 비하여 다소 흐트러져 보였으며, 창자음을 이루는 상피세포들이 호염기성을 띠는 경우가 많이 관찰되었다. 이 실험에서 adriamycin의 1회 투여량(2 mg/kg)은 생쥐에 대한 LD₅₀(21.1 mg/kg)의 1/10.5 미만이고, 5-fluorouracil의 1회 투여량(30 mg/kg)은 생쥐에 대한 LD₅₀(240 mg/kg)의 1/8로서 adriamycin이 5-fluorouracil에 비하여 상대적인 투여량이 적었는데도 불구하고 막창자점막에 더 심한 손상을 주었다는 실험결과는 adriamycin이 5-fluorouracil에 비하여 막창자조직에 더 손상을 입힌다고 생각된다.

Thymidine은 DNA에만 함유되어 있는 물질로서 thymidine pool에 저장되어 있다가 세포분열시에 thymidic acid로서 DNA 합성에만 이용되기 때문에 표지된 DNA의 전단체물질인 ³H-thymidine을 자기방사법적 연구에 많이 사용한다(Tielemans 등 1989, Ryberg 등 1990, Karam과 Leblond 1993). 이 연구에서도 DNA 합성능력을 비교하기 위하여 실험동물에 ³H-thymidine을 주사한 후 막창자조직을 떼어내어 자기방사법 조직표본을 만들었으며, 특히 하루주기에 따른 변화를 최소화하기 위하여 모든 실험동물을 오전 9시에서 10시 사이에 ³H-thymidine을 정맥 주사 하였다. 세포분열은 성숙된 개체에서도 세포의 노화 및 탈락에 대한 보상으로 세포갱신이 일어나며, 이러한 활동은 생체 내외의 조건에 따라 다양하게 이루어진다. 위와 샘창자를 비롯한 작은창자는 점막상피의 세포갱신이 왕성한 장기로서 생쥐의 경우 세대교체시간이 3일 정도 밖에 되지 않으나 잘록

창자는 다소 길어 10일 정도 된다(Cameron 1971). 생쥐 막창자상피세포의 DNA 합성능력과 합성장소에 대한 광학현미경적 자기방사법 연구에서 막창자점막의 창자움(crypts)의 아래 1/2에 방사표지세포가 위치한다고 하였는데(Jin과 Nagata 1993), 이 실험에서도 창자샘의 아래 1/2에서 방사표지세포가 가장 많이 관찰되었으며, 이와 같은 결과는 창자의 경우 창자샘의 아래부분에서 세포분열이 시작하여 위쪽으로 이동한다는 사실(Chung 2001)에 비추어 볼 때 타당한 결과라고 생각한다.

CD2F1 생쥐의 경우 24시간 단식을 시키면 DNA 합성이 잘록창자는 통계적으로 유의하게 감소하지 않았으나, 막창자는 DNA 합성이 통계적으로 매우 유의하게 감소하는 등 소화기관의 부위에 따라 DNA 합성 정도가 다르다(Scheving 등 1984). 한편 발생단계부터 생후 12월까지의 생쥐 막창자상피세포의 DNA 합성에 대한 자기방사법적 연구에서 방사표지지수(labeling index)는 발생 19일에 가장 높으며, 출생 1일에 급격히 감소한 후 12개월까지는 유지된다. 그러나 술잔세포는 방사표지지수가 임신 19일 가장 높고, 출생 1일부터 서서히 감소하여 출생 1개월에는 완전히 없어지고, 바닥과립세포는 방사표지지수가 임신 19일부터 생후 12개월까지 관찰되지 않는 등 세포의 종류에 따라 DNA 합성시기가 달랐다(Jin과 Nagata 1993). 이 실험에서도 막창자점막의 술잔세포에서는 방사표지세포를 관찰할 수 없었는데 이와 같은 결과는 출생 후 1개월 이후에는 술잔세포에서 방사표지세포를 관찰할 수 없었다는 보고(Jin과 Nagata 1993)에 비추어 볼 때 타당한 결과라고 생각된다.

한편 자기방사표본 관찰에서 암세포이식군의 표지세포 수가 정상대조군의 97%로 별다른 변화가 없었으며, 일부 세포는 표지된 은입자가 너무 많아서 은입자의 수를 헤아리기 어려운 세포들이 많았다. 이와 같은 결과는 EA21a 유방암조직을 이식한 생쥐의 경우 암세포를 이식하면 생체내의 면역기전이 샘창자움을 구성하는 상피세포의 분열능력을 조절하는 기전에 혼란을 주기 때문에 세포분열이 증가하였다는 보고(Barbeito 등 2002)와는 다소 다른 결과를 보였다. 또 지라조직과 샘창자조직에서는 암

세포를 생체에 이식하였을 경우 방사표지세포의 수가 정상대조군에 비하여 높아서 지라조직은 약 10%, 샘창자조직은 20% 정도 증가하였다는 보고(Ko 등 2000, Ahn 등 2002)에 비추어 볼 때 막창자점막조직은 지라조직과 샘창자조직과는 달리 생체내에 이물질이 침입하였을 경우에도 2주일 정도에는 세포분열지수에 별다른 변화가 없다고 추정된다. 그러나 곧창자점막의 경우 정상대조군과 암세포이식군 사이에 별다른 차이가 없었다는 보고(Ko 등 2005)와는 유사하였는데 이와 같은 결과는 곧창자와 막창자는 모두 큰창자에 속하며 세포교체시간이 작은창자에 비하여 느린 것과 관계가 있지 않나 추측된다. 한편 5-fluorouracil, adriamycin 투여군과 mitomycin C 투여군은 표지세포 수가 정상대조군에 비하여 현저하게 감소하였는데 그 중에 adriamycin 투여군(35%)이 가장 심하게 감소하였고, 그 다음이 mitomycin C 투여군(40%)과 5-fluorouracil 투여군(60%)의 순서로 감소하였다. 특히 adriamycin 투여군과 mitomycin C 투여군은 표지세포의 수 뿐만 아니라, 표지된 은입자의 수도 정상대조군을 비롯한 다른 실험군에 비하여 적은 세포가 많았다. 이와 같은 실험결과는 이번 실험에 사용한 약제 중 adriamycin이 막창자점막상피세포의 DNA 합성을 가장 심하게 억제하였으며, 그 다음 mitomycin C이 심하게 억제하였고 5-fluorouracil의 억제력이 가장 약했기 때문이라고 추측된다. 특히 이와 같은 실험결과는 mitomycin C의 1회 투여량(400 µg/kg)이 생쥐에 대한 LD₅₀(8.4 mg/kg)의 1/21이고, adriamycin의 1회 투여량(2 mg/kg)은 생쥐에 대한 LD₅₀(21.1 mg/kg)의 1/10.5인데 비하여 5-fluorouracil의 1회 투여량(30 mg/kg)은 생쥐에 대한 LD₅₀(240 mg/kg)의 약 1/8인 것(Budavari 등 1996)을 감안해 본다면 5-fluorouracil에 비하여 adriamycin과 mitomycin C가 막창자점막상피세포의 DNA 합성능력을 더 심하게 억제한다고 생각된다. 일원배치분산분석(one-way ANOVA)의 결과에서도 adriamycin 투여군의 평균값이 5-fluorouracil 투여군과 mitomycin C 투여군의 평균값보다 적은 것으로 나타났다.

이상의 고찰을 종합하여 보면 adriamycin과 mitomycin C가 5-fluorouracil에 비해 생쥐 막창자점막상

피의 DNA 합성에 더욱 억제적으로 작용하며, 특히 adriamycin은 mtomycin과 5-fluorouracil에 비해 막창자점막조직에 손상을 많이 준다고 생각된다.

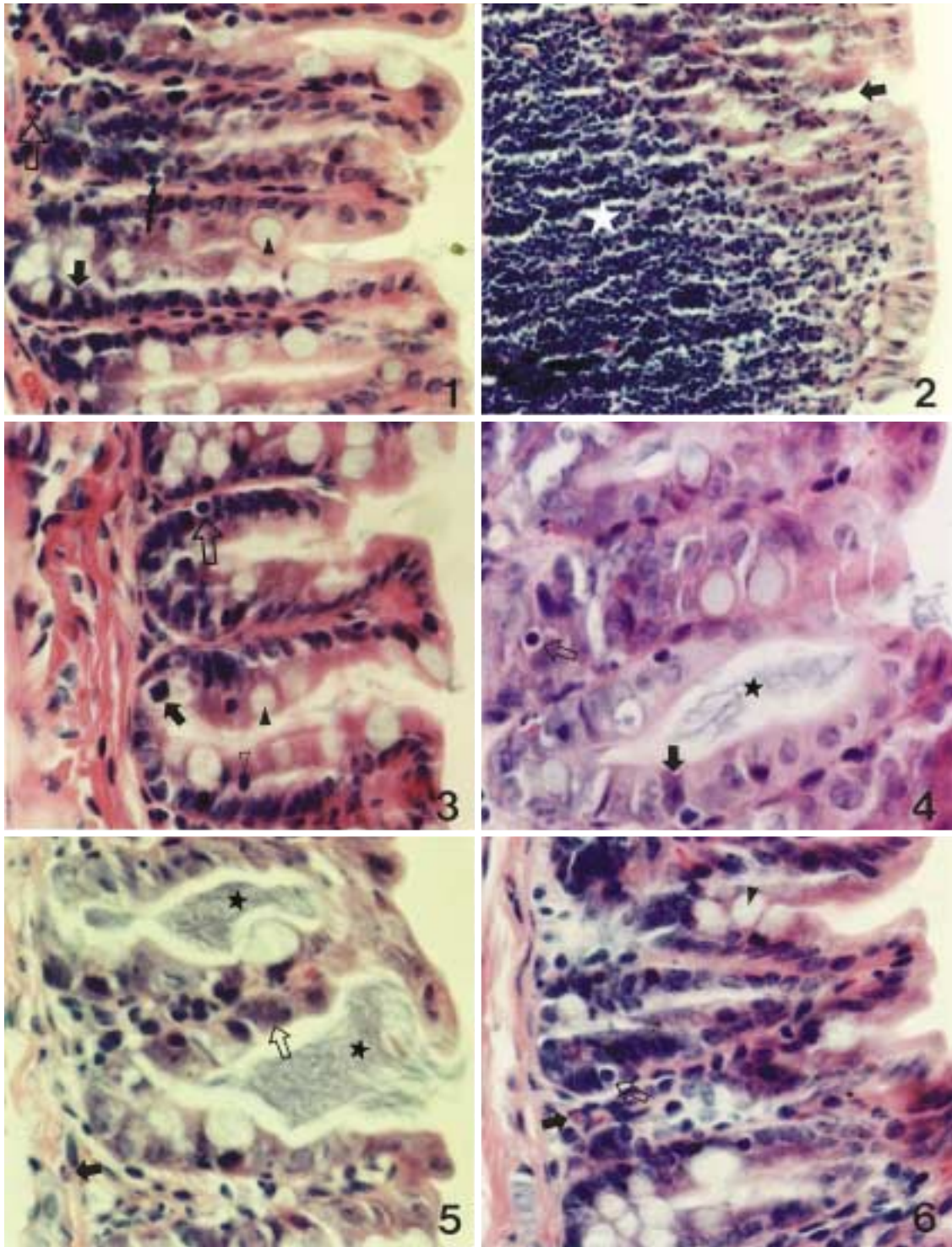
참 고 문 헌

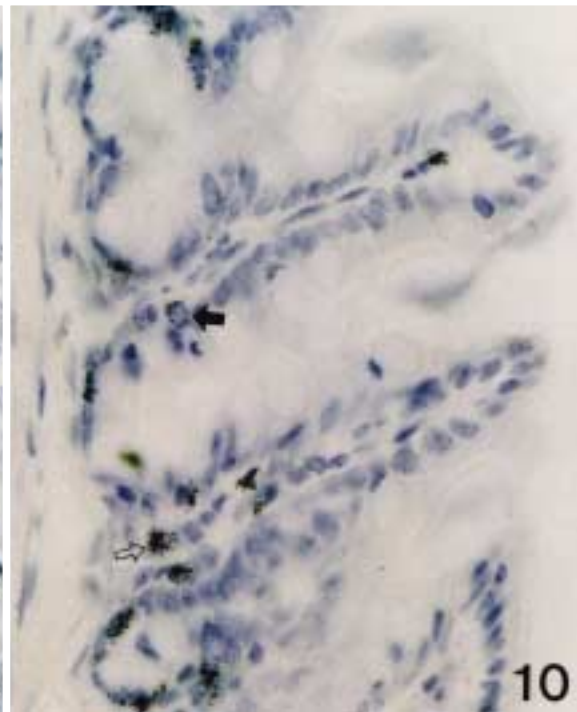
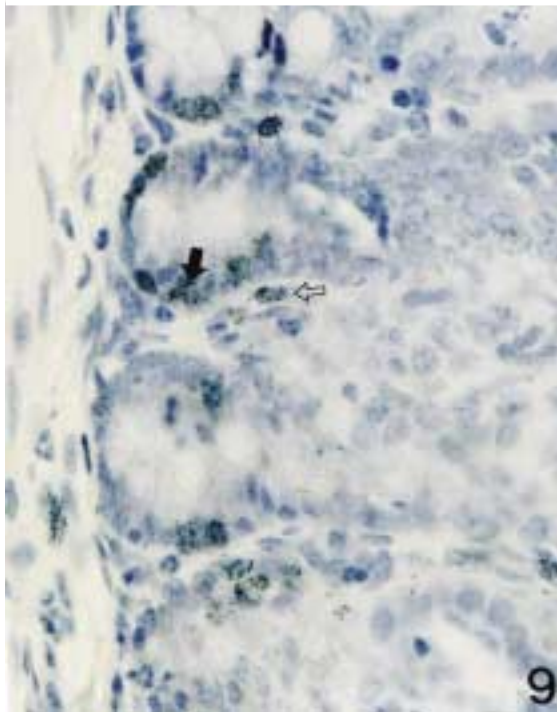
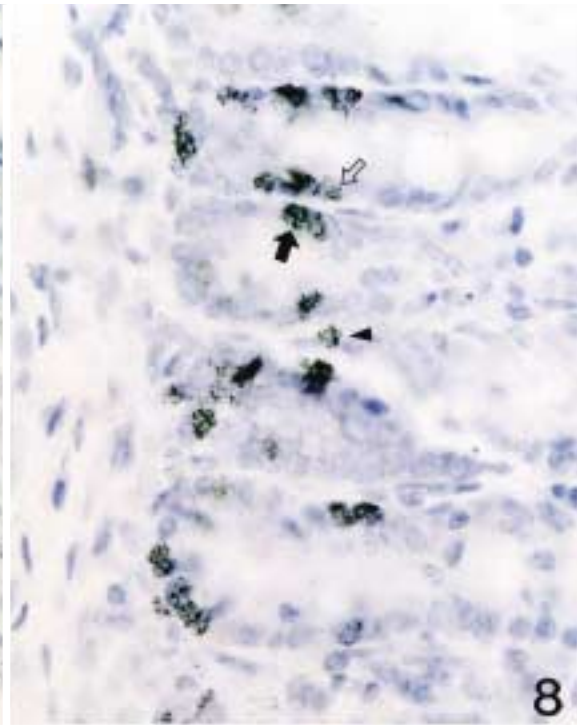
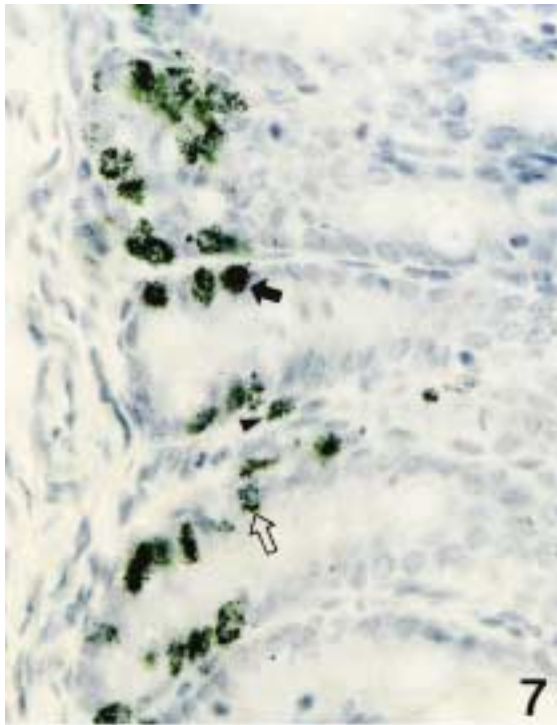
- Ahn BJ, Ahn ET, Park KH, Kim JG, Ko JS : Effects of Adriamycin or AG60 to the DNA synthesis of duodenal epithelium of mice implanted with Ehrlich carcinoma cells : An autoradiographic study. *Kor J Phy Anthropol* 15: 279-291, 2002. (in Korean)
- Barbeito CG, Albarenque SM, Reyna JC, Flamini MA, Laube PF, Badran AF : Mitotic activity of the duodenal crypt enterocytes in mice transplanted with EA21a mammary carcinoma. *Cell Biol Int* 26: 123-125, 2002.
- Bockman DE, Cooper MD : Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix and Peyer's patches. An electron microscopic study. *Am J Anat* 136: 455-478, 1973.
- Brandtzaeg P, Halstensen TS, Kett K, Krajci P, Kvale P, Rognum TO, Scott H, Sollid LM : Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa; humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol* 97: 1562-1584, 1989.
- Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, Kinneary JF : The merck index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Merck & Co. inc, Whitenhouse station, NJ, 581-582, 6302, 1996.
- Cameron IL : Cell proliferation and renewal in the mammalian body. In: Cellular and molecular renewal in the mammalian body, eds Cameron IL, Thrasher JD. New York, Academic Press, pp 45-79, 1971.
- Chung JW : In *Human Tissue Biology*. 2nd Ed, Seoul, Soomoonsa Pub, pp 538, 674-675, 2001. (In Korean)
- Clark WG, Brater CD, Johnson AR : *Goth's Medical Pharmacology*, 13th ed. St. Louis, Mosby Year Book, pp 704-714, 1992.
- Clark MA, Jepson MA, Hirst BH : Lectin binding defines and differentiates M-cells in mouse small intestine and caecum. *Histochem Cell Biol* 104: 161-168, 1995.
- Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, Hirst BH : Differential surface characteristics of M cells from mouse intestinal Peyer's and caecal patches *Histochem J* 26: 271-280, 1994.
- Craig CR, Stitzel RE : *Modern Pharmacology*. 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.
- Farkas SA, Hornung M, Sattler C, Steinbauer M, Anthuber M, Obermeier F, Herfarth H, Schlitt HJ, Geissler EK : Preferential migration of CD62L cells into the appendix in mice with experimental chronic colitis. *Eur Surg Res* 37: 115-122, 2005.
- Fisher JF, Aristiff PA : The chemistry of DNA modification by antitumour antibiotics. *Prog Drug Res* 32: 411-498, 1988.
- Foster HL, Small JD, Fox JG : The mouse in biomedical research. vol III. normative biology, immunology, and husbandry. Academic press, pp 113-114, 1983.
- 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.
- Hedrich HJ, Bullock G : The laboratory mouse. chapter 9. normative histology of organs. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp 142-144, 245-249, 2004.
- Herman EH, Zhang J, Hasinoff BB, Clark JR Jr, Ferrans VJ : Comparison of the structural changes induced by doxorubicin and mitoxantrone in the heart, kidney and intestine and characterization of Fe (III)-mitoxantrone complex. *J Mol Cell Cardiol* 29: 2415-2430, 1997.
- Jin C, Nagata T : Light microscopic autoradiographic study of DNA synthesis in cecal epithelial cells of aging mice. *J Histochem Cytochem* 43: 1223-1228, 1993.
- 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.
- Killion JJ, Bucana CD, Radinsky R, Dong Z, O'Reilly T, Bilbe G, Tarcsay L, Fidler IJ : Maintenance of intestinal epithelium structural integrity and mucosal leukocytes during chemotherapy by oral administration of muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine. *Cancer Biother Radiopharm* 11: 363-371, 1996.
- Kimura Y, Sawai N, Okuda H : Antitumour activity and adverse reactions of combined treatment with chitosan and

- doxorubicin in tumour-bearing mice. *J Pharm Pharmacol* 53: 1373-1378, 2001.
- King RJB : Principles of cancer treatment. In *Cancer biology*, Essex, Longman, pp 183-211, 1996.
- Ko JS, Ahn ET, Park KH, Kim JG, Kim EH, Chung YS : Effects of antitumor agents on the spleen of mouse implanted with Ehrlich carcinoma cells: An autoradiographic study. *Kor J Anat* 33: 315-326, 2000. (in Korean)
- Ko JS, Ahn ET, Park KH, Park DK, Jung EJ : Effects of 5-Fluorouracil, Mitomycin C or AG60 to the DNA synthesis of rectal epithelium of mice implanted with Ehrlich carcinoma cells. *Kor J Phy Anthropol* 18: 217-229, 2005. (in Korean)
- Krieglstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Grisham MB, Schurmann G, Bruwer M, Granger DN : 14. Role of appendix and spleen in experimental colitis. *J Surg Res* 101: 166-75, 2001.
- Ku SK, Lee HS, Lee JH : An immunohistochemical study of the gastrointestinal endocrine cells in the C57BL/6 mice. *Anat Histol Embryol* 32: 21-28, 2003.
- Ku SK, Lee HS, Lee JH : 16. An immunohistochemical study of the gastrointestinal endocrine cells in the ddY mice. *J Vet Sci* 5: 87-95, 2004.
- Malpas JS : Chemotherapy. In : *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*, eds Frank LM, Teich NM, 2nd ed. Oxford, Oxford Univ Press, pp 451-467, 1991.
- Martins MJ, Hipolito-Reis C, Azevedo I : Effect of fasting on rat duodenal and jejunal microvilli. *Clin Nutr* 20: 325-331, 2001.
- Mizoguchi A, Mizoguchi E, Chiba C, Bhan AK : Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR-alpha mutant mice. *J Exp Med* 184: 707-715, 1996.
- Owen RL : M cells-entryways of opportunity for enteropathogens. *J Exp Med* 180: 7-9, 1994.
- Parkhomenko IuG, Ali-Riza AE, Barkhina TG : The morphological characteristics of the cecum and its lymphoid tissue in BALB/C mice. *Arkh Anat Gistol Embriol* 100: 50-55, 1991.
- Poussier P, Julius M : Thymus independent T cell development and selection in the intestinal epithelium. *Annu Rev Immunol* 12: 521-553, 1994.
- Rubin E, Farber JL : *Pathology*, chapter 1. Cell injury. 3rd ed, Lippincott- Raven, Philadelphia, pp 1-35, 1999.
- Rubio CA, Sveander M, Tornling G, Uribe A : DNA synthesis in the gastro- duodenal mucosa during acute and chronic stress in the rat. *In Vivo* 2: 143-146, 1988.
- 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.
- Scheving LE, Scheving LA, Tsai TH, Pauly JE : Effect of fasting on circadian rhythmicity in deoxyribonucleic acid synthesis of several murine tissues. *J Nutr* 114: 2160-2166, 1984.
- Tielemans Y, Hakanson R, Sundler F, Willems G : Proliferation of enterochromaffin like cells in omeprazole-treated hypergastrinemic rats. *Gastroenterology* 96: 723-729, 1989.
- Varedi M, Greeley GH Jr, Herdon DN, Englander EW : A thermal injury-induced circulating factor (s) compromises intestinal cell morphology, proliferation, and migration. *Am J Physiol* 277 (1 pt 1): G175-182. 1999.

Legends for Figures

- Fig. 1.** Hematoxylin-eosin stained cecal mucosa of a normal mouse. ($\times 400$). The straight tubular intestinal glands are long and extend through the lamina propria to the muscularis mucosae. A number of the goblet cells (arrowhead) are seen in the intestinal crypts, and some intraepithelial lymphocytes (thin arrow), and some mitotic figures (thick arrow) are seen in the cecal epithelial cells. Some eosinophile leukocytes (vacant arrow) are found in the lamina propria.
- Fig. 2.** Hematoxylin-eosin stained cecal mucosa of a normal mouse. ($\times 400$). The lamina propria and submucosa are filled with large aggregations of lymphoid tissue (white asterisk). Cecal crypts (arrow) around the lymphoid tissue are poorly developed.
- Fig. 3.** Hematoxylin-eosin stained cecal mucosa of a tumor control mouse. ($\times 400$). A number of the goblet cells (arrowhead), some intraepithelial lymphocytes (vacant arrow) and a few mitotic figures (vacant arrowhead) are seen in the cecal epithelial cells.
- Fig. 4.** Hematoxylin-eosin stained cecal mucosa of a mouse, treated with 5-fluorouracil (30 mg/kg). ($\times 400$). Slightly swelled epithelial cells and basophilic structures (asterisk) within the expanded lumen of the cecal crypts are seen. Some intraepithelial lymphocytes (vacant arrow) and basophilic epithelial cells (arrow) are found in the cecal crypts.
- Fig. 5.** Hematoxylin-eosin stained cecal mucosa of a mouse, treated with adriamycin (2 mg/kg). ($\times 400$). Severely disrupted intestinal crypts are noted. A large number of the basophilic epithelial cells (vacant arrow) and a large amounts of the basophilic structures (asterisks) within the expanded lumen of the intestinal crypts are seen. An eosinophile leukocyte (arrow) is seen in the lamina propria.
- Fig. 6.** Hematoxylin-eosin stained cecal mucosa of a mouse, treated with mitomycin C (400 μ g/kg). ($\times 400$). Morphological features are similar to normal ones. An eosinophile leukocyte (arrow) is seen in the lamina propria. A number of the goblet cells (arrowhead), and some intraepithelial lymphocytes (vacant arrow) are seen in the cecal epithelial cells.
- Fig. 7.** An autoradiogram of the cecal mucosa of a normal mouse. ($\times 400$). Many labeled cells are distributed at the lower half of the crypts. The labeled epithelial cells contained massive (arrow) or moderate (vacant arrow) amounts of silver grains over their nuclei. Some labeled cells (arrowhead) in the lamina propria are seen.
- Fig. 8.** An autoradiogram of the cecal mucosa of a mouse, treated with 5-fluorouracil (30 mg/kg). ($\times 400$). Number of the labeled cells with massive silver grains are decreased as compared with those of normal control ones (as seen in Fig. 7). But labeled cells containing massive (arrow) or a few silver grains (vacant arrow) are relatively well identified. Some labeled cells (arrowhead) in the lamina propria are seen.
- Fig. 9.** An autoradiogram of the cecal mucosa of a mouse, treated with adriamycin (2 mg/kg). ($\times 400$). Amount of the silver grains over the epithelial cells are significantly decreased as compared with those of normal control ones (as seen in Fig. 7), and some labeled cells with a few silver grains (arrow) are seen in the glandular epithelial cells, and in the lamina propria (vacant arrow).
- Fig. 10.** An autoradiogram of the cecal mucosa of a mouse, treated with mitomycin C (400 μ g/kg). ($\times 400$). Number of the labeled cells with massive or moderate amount of the silver grains are significantly decreased as compared with those of normal control ones (as seen in Fig. 7). Some labeled cells with a few silver grains (arrow) are seen in the glandular epithelial cells, and in the lamina propria (vacant arrow).





Abstract

Effects of Antitumor Agents to the DNA Synthesis of Cecal Mucosa of Mouse

Ji-Ung Na, E-Tay Ahn, Kyung-Ho Park, Dae-Kyoon Park, Jeong-Sik Ko

Department of Anatomy, College of Medicine, Soonchunhyang University

This experiment was performed to evaluate the morphological responses of the cecal mucosa of the mouse, inoculated with Ehrlich carcinoma cells in the inguinal area, following administration of 5-fluorouracil, mitomycin C or adriamycin.

Healthy adult ICR mice weighing 25 gm each were divided into normal and experimental groups. In the experimental groups, each mouse was inoculated with 1×10^7 Ehrlich carcinoma cells subcutaneous in the inguinal area. From next day, 0.2 mL of saline, 5-fluorouracil (30 mg/kg), mitomycin C (400 μ g/kg) or adriamycin (2 mg/kg) were injected subcutaneously to the animals every other day, respectively. The day following the 7th injection of anticancer drugs, each mouse was injected with a single dose of 0.7 μ Ci/gm of methyl- 3 H-thymidine (25Ci/mmol, Amersham Lab, England) through tail vein. Seventy minutes after the thymidine injection, animals were sacrificed. The number of the labeled epithelial cells of the cecal crypts (mean number of labeled epithelial cells per 3.5 mm length of mucosa) were observed and evaluated.

On histological study, in the experimental control and mitomycin C-treated mice, general morphology of the cecal mucosae was similar. And in the 5-fluorouracil-treated mice, slightly swelled epithelial cells and expanded lumen of the intestinal crypts were observed. But in the adriamycin-treated groups, slightly disrupted intestinal crypts, a large number of basophilic epithelial cells and the expanded lumen of the intestinal crypts were observed. On autoradiographic study, number of the labeled cells of normal control, experimental control, 5-fluorouracil treated, mitomycin C-treated, or adriamycin-treated groups were 362.2 ± 56.12 , 350.7 ± 71.13 , 215.7 ± 80.55 , 144.2 ± 34.60 and 125.0 ± 37.45 , respectively. In the adriamycin and mitomycin C-treated groups, poorly-labeled cells containing only a few silver grains were observed more frequently than in those of the normal and experimental control groups.

From the above results, adriamycin and mitomycin C suppressed the DNA synthesis of the epithelial cells of the cecal mucosa more severely as compared with 5-fluorouracil did. Especially, adriamycin was more harmful than mitomycin C and 5-fluorouracil on the cecal mucosae.

Key words : Ehrlich carcinoma, Antitumor agents, DNA synthesis, Autoradiographic study