대 한 체 질 인 류 학 회 지
Korean J Phys Anthropol
18(3): 217 ~ 229, 2005

5-fluorouracil, mitomycin C, AG60이 Ehrlich 암세포를 이식한 생쥐 곧창자점막 상피세포의 DNA 합성에 미치는 영향

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

간추림 : 이 실험에서는 Ehrlich 암세포를 샅부위에 이식한 후 일반적으로 많이 사용되는 항암제인 5-fluorouracil, mitomycin C와 새로 개발된 항암제인 acriflavine-guanosine 복합제 (AG60)를 투여하였을 때, 곧창자조직의 형태학적 변화를 연구하고자 ^{3}H-thymidine 을 투여한 후 자기방사법적 연구를 시행하여 곧창자조직의 형태학적 변화 뿐만 아니라 DNA합성지수를 비교 연구하고자 하였다.

실험동물로는 체중 25 gm내외의 성숙한 생쥐 (ICR계통)를 사용하였다. 정상대조군 이외의 실험군 동물들은 샅부위의 피부밑조직에 각각 1×10^{7}개의 Ehrlich암세포를 이식한 후 다음날부터 실험군별로 5-fluorouracil 30 mg/kg, mitomycin C 400 μg/kg, AG60 5 mg/kg를 격일 간격으로 7회 투여하였다. 자기방사법적 관찰을 위하여 ^{3}H-thymidin 0.7 μCi/gm를 꼬리에 한 번 정맥주사하고, 70분 후 도살하여 곧창자조직을 떼어내어 10% formalin에 고정한 후 표본을 제작하였다.

일반조직관찰에서 암세포이식대조군과 AG60 투여군의 경우 조직학적 구조는 정상대조군에 비하여 고유판에서 림프구와 호산성백혈구가 비교적 많이 관찰된 것 외에는 별다른 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 5-fluorouracil 투여군은 창자움의 샘상피세포들이 정상대조군에 비하여 다소 위축되어 보였으며, mitomycin C 투여군은 창자움이 더욱 위축되어 정상대조군에 비하여 폭이 좁게 보였을 뿐만 아니라 호산성백혈구도 더욱 많이 관찰되었고, 핵이 농염되고 용해되는 과정의 세포들이 자주 관찰되었다. 자기방사법적 연구에서 정상대조군, 암세포이식대조군, 5-fluorouracil 투여군, mitomycin C 투여군, AG60 투여군은 점막길이 3.5 mm 당 출현하는 표지세포수가 각각 246.3±42.30, 253.8±20.54, 172.7±19.02, 108.7±17.67, 53.8±11.70 였다. 특히 mitomycin C 투여군과 AG60 투여군은 정상대조군에 비하여 은입자의 수가 적은 세포가 많았으나, 암세포이식대조군은 은입자가 밀집되어 있는 세포가 정상대조군에 비하여 더 많이 관찰되었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 생쥐 곧창자점막조직에는 5-fluorouracil에 비하여 mitomycin C와 AG60이 점막상피세포의 DNA합성에 더 억제적으로 작용하였으며, 특히 AG60은 5-fluorouracil에 비하여 점막상피세포의 DNA합성을 억제하는 효과가 더 높을 뿐만 아니라 곧창자점막조직에 형태적인 손상을 거의 주지 않는 항암제라고 생각한다.

찾아보기 낱말 : 곧창자움, DNA합성, 자기방사법적 연구, acriflavine-guanosine complex (AG60), 5-fluorouracil, mitomycin C, Ehrlich 암세포

서 론

각 종 암의 발생빈도가 높아짐에 따라 항암제의 개발과 작용기전에 대한 연구가 활발하게 진행되고

*본 연구과제는 2004년도 순천향대학교 학술연구조성비 일반연구과제로 지원을 받아 수행하였음.
교신저자 : 고정식(순천향대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편 : jeongsik@sch.ac.kr

있다. 암에 대한 치료방법으로는 수술요법, 방사선요법, 항암화학요법 및 생물학적요법 등으로 나눌 수 있다. 수술요법과 방사선요법은 제한된 범위내의 종양을 치료대상으로 하는 국소요법이고, 항암화학요법과 생물학적요법은 전신의 종양을 치료대상으로 하는 전신요법이다. 항암화학요법으로 쓰이는 항암제란 세포내에서 DNA의 복제, 전사 및 번역을 방해하고 세포분열을 저해함으로서 암세포의 증식을 억제하는 약제를 총칭한다(Gilman 등 1985, Clark 등 1992). 현재 쓰이고 있는 항암제들은 작용기전에 따라 대사길항제(5-fluorouracil, methotrexate), 항암성 항생물질(adriamycin, mitomycin- C, bleomycin), 세포분열억제제(vinblastine, vincristine), 호르몬제(androgen, estrogen, adrenal steroid) 등이 있다.

대부분의 항암화학요법이 기본적으로 세포분열을 억제하거나 핵산합성과 단백질합성을 억제하는 성질을 지니고 있어, 암세포에만 선택적으로 작용하기보다는 정상세포의 분열과 대사과정까지도 억제하기 때문에(Malpas 1991, King 1996) 세포에 상당히 큰 손상을 주고 있다. 대표적인 부작용으로는 골수기능에 장애를 주어 백혈구나 혈소판이 감소되며, 소화계통, 호흡계통, 생식계통에도 많은 손상을 초래한다(Gilman 등 1985). 암을 치료하는 가장 이상적인 방법은 암세포만을 찾아가는 항체에 세포독성물질을 부착하여 암세포만을 선별적으로 죽이는 것이지만 아직은 실효를 거두지 못하고 있다. 부작용이 적은 항암제를 개발하기 위해서는 암세포를 제거하는 약효용량과 정상세포에 미치는 유해용량 사이의 격차가 큰 약품을 개발하거나, 여러 가지 항암제를 복합 사용하여 암세포에 대한 선별력을 높이거나, 새로운 혈관의 발생을 억제시켜서 정상세포에 비하여 많은 영양을 필요로 하는 암세포를 영양결핍으로 사멸시키는 약제를 개발하기도 한다(King 1996). 실제로 5-fluorouracil 대신 5'-deoxy-5-fluorouridine을 사용한 결과, 항암효과는 더 높은 반면 소화관장애는 더 낮추는 등 상당한 효과가 있었으며(Ninomiya 등 1990), 기존 항암제와 nucleotide들을 복합 사용하였을 때도 항암효과가 증가하였다(Santelli와 Valeriote 1978, Osswald와 Yussef 1979, Iigo 등 1983, Iigo 등 1987).

5-fluorouracil은 세포주기에서 특정과정의 진행을 막는 항대사성물질로서 pyrimidine nucleotide의 합성을 억제하고 더 나아가서 핵산의 합성을 방해함으로 종양의 치료목적에 사용되며(Gilman 등 1985), mitomycin C는 streptomyces caepitosus에서 추출한 항암성항생제로서 세포의 DNA합성을 억제하며, 일부는 유리기(free radical)를 만들어 DNA에 손상을 주기도 하는데, G1 후기와 S기 초기에 영향을 미친다(Gilman 등 1985, Fisher와 Aristiff 1988). 한편 AG60은 acriflavine과 guanosine을 1:1의 비율로 섞은 복합제로서 in vitro에서 대장암(COLO205), 폐암(A549, NCI-H2226), 신장암(UO-31)과 전립선암(PC-3)세포주에 대해 뛰어난 항암효과를 보였고, 동물에 이식된 고형암(S-180)이나 Ehrlich 암세포에 대해서도 탁월한 항암효과를 보인데 비하여 부작용은 매우 적은 것으로 알려지고 있다(Hong 등 1997, Kim 등 1997, Kim 등 1998).

소화기계통을 이루는 위창자는 상피의 세포생활주기가 짧기 때문에(Cameron 1971) 항암치료과정에서 부작용이 심하여 욕지기를 비롯한 소화장애 등 부작용이 심한 장기이다(Gilman 등 1985, Clark 등 1992). 또한 곧창자를 비롯한 창자는 위와 함께 스트레스, 감염, 종양 등의 질병상태에 따라 민감하게 반응하는 장기이므로(Rubio 등 1988, Varedi 등 1999, Martins 등 2001) 소화기관과 직접적인 관련이 없는 부위에 종양이 발생하거나 이들 종양을 치료하기 위해 항암제를 투여하였을 때에도 그 기능이나 형태에 변화가 있으리라고 예상한다. 그러므로 이 실험에서는 Ehrlich 암세포를 샅부위에 이식한 생쥐에 일반적으로 종양치료에 사용되는 5-fluorouracil, mitomycin C와 새로 개발된 항암제인 AG60을 이용하여 실험적 종양을 치료할 때 곧창자조직에 미치는 영향을 형태학적으로 연구하고자 하였으며, ^{3}H-thymidine을 투여한 후 자기방사법적 연구를 시행하여 곧창자조직의 형태학적 변화뿐만 아니라 DNA합성지수를 비교 관찰하여 종양치료과정에 따른 곧창자의 변화를 연구하는데 기본정보를 제공하고자 이 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

실험동물로는 체중 25 g 내외의 성숙한 생쥐(ICR 계통)를 정상대조군, 암세포이식대조군, 암세포이식후 5-fluorouracil 투여군, 암세포이식후 mitomycin C 투여군, 암세포이식후 AG60 투여군으로 구분하였다. 각 약품의 주사량은 항암치료시에 사용되는 양과 LD_{50}를 참고하여 각 군별로 5-fluorouracil 30 mg/kg, mitomycin C 400 μg/kg 및 AG60 5 mg/kg (태림제약 중앙연구소)을 투여하였으며, 각 실험군당 5마리씩의 동물을 사용하였다.

정상대조군 이외의 암세포 이식군 동물들은 샅부위 피하에 각각 1×10^7개의 Ehrlich암세포를 이식한 후 다음날부터 실험군별로 5-fluorouracil, mitomycin C 또는 AG60을 각각 격일 간격으로 투여했으며, 암이식대조군은 암세포이식후에 약제 대신 0.2 mL의 생리식염수를 피하주사하였고, 정상대조군은 암세포를 이식하지 않은 동물을 사용하였다. 실험동물은 항암제를 각각 7회씩 투여한 후 다음날 ether마취하에 앞배벽을 열어 곧창자조직을 절취하였으며, 동물들은 희생시키기 전날 저녁부터 사료는 주지 않고 물만 공급하였다. 일반조직관찰을 위하여는 10% 중성 formalin으로 고정한 후 hematoxylin-eosin (H-E)염색법을 시행하였다. 한편 자기방사법적 관찰을 위하여 모든 실험동물에 마지막 주사 후, 일중주기에 따른 변화를 최소화하기 위하여 다음 날 오전 9시에서 10시 사이에 ^{3}H-thymidine (methyl-^{3}H-thymidine: specific activity 25 Ci/mmol, Amersham Lab., England) 0.7 μCi/gm를 꼬리에 한번 정맥주사하고, 70분 후 도살하여 곧창자조직을 떼어내어 10% formalin에 고정하였다.

광학현미경관찰을 위한 표본은 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 곧창자점막이 세로로 잘 절단된 부위를 택하여 점막근육판을 따라 250배율로 관찰하되, 접안렌즈의 사진촬영용 직사각형의 긴쪽 길이 (0.35 mm)내에 보이는 곧창자점막의 조직을 한 시야로 하여 각각 10시야씩 (점막길이 3.5 mm) 관찰하였다. 곧창자점막을 이루는 세포 가운데 10개 이상의 은입자가 있는 세포를 표지세포로 간주하여 계수하였으며, student-t test를 이용하여 통계처리하였다.

결 과

1. 일반조직 관찰

곧창자 점막은 점막근육판이 속공간으로 돌출되어 점막주름이 발달되었고 단층원주형의 상피로 덮여 있으며, 점막은 상피세포들이 고유판 속으로 함몰되어 형성된 창자움 (intestinal crypt)과 고유판으로 이루어졌다. 정상대조군 창자움의 깊이는 점막주름의 위치에 따라 240~360 μm로 비교적 다양하였으며 창자움의 폭도 위치에 따라 28~32 μm로 다양하였다. 창자움을 이루는 상피세포사이에는 술잔세포 (goblet cell)가 비교적 많이 관찰되었는데, 대체적으로는 속공간에 가까운 창자움부위에서 많이 관찰되었다. 또한 상피세포 속에는 림프구가 소수 관찰되었으며 유사분열중인 핵들도 소수 관찰되었고, 창자내분비세포로 보이는 세포질이 밝은 세포와 유사분열중인 핵들도 소수 관찰되었다. 한편 속공간에는 점막에서 떨어져 나온 것으로 보이는 세포성분들이 소수 관찰되었다 (Fig. 1).

암세포이식대조군과 AG60 투여군의 조직학적 구조는 정상대조군에 비하여 고유판에서 림프구와 호산성백혈구가 비교적 많이 관찰된 것 외에는 정상대조군 소견에 비하여 별다른 차이가 없었다 (Fig. 2). 그러나 5-fluorouracil 투여군과 mitomycin C 투여군은 정상대조군에 비하여 림프구와 핵이 농축된 상피세포들이 더 많이 관찰되었을 뿐만 아니라, 창자움의 샘상피세포들이 정상대조군에 비하여 다소 위축되어 좁아 보이는 부분과 창자움의 입구가 넓

게 벌어져 있는 부분들이 비교적 자주 관찰되었다 (Fig. 3). 또한 곧창자의 속공간에서 점막에서 떨어져 나온 것으로 보이는 세포성분들이 비교적 많이 관찰되었다. 특히 mitomycin C 투여군에서는 박리된 점막조직의 조각이 속공간에서 관찰되기도 하였다 (Fig. 4).

2. 자기방사표본의 관찰

정상대조군을 포함한 실험군의 곧창자조직에는 은입자들이 관찰되는 표지세포들이 주로 창자샘의 상피세포에서 관찰되었으며, 창자샘의 고유판에서는 표지세포가 드물게 관찰되었다. 정상대조군을 비롯하여 대부분의 실험동물에서 창자샘의 아래 1/3 부분에서 방사표지세포가 가장 많이 관찰되었다.

정상대조군 창자움의 상피에 출현하는 표지세포는 점막길이 3.5 mm당 246.3개가 관찰되었는데 은입자를 많이 포함하고 있는 세포들이 많이 관찰되었다 (Fig. 5, Table 1). 암세포이식대조군은 점막길이 3.5 mm 당 253.8개가 관찰되어 정상대조군의 103%였으며 은입자의 수가 많아서 밀집되어있는 세포가 많았다 (Table 1).

AG60 투여군은 53.8 개로서 정상대조군의 21.9%로 매우 유의하게 감소하였을 뿐만 아니라 은입자의 수가 적은 세포들이 주로 관찰되었다 (Fig. 6, Table 1). 한편 5-fluorouracil 투여군은 점막길이 3.5 mm 당 172.7개로서 정상대조군의 70.1%, 암세포이식군의 68.0%로 감소하였으나 은입자의 수가 많아서 밀집되어있는 세포가 많이 관찰되었으나 (Fig. 7, Table 1), mitomycin C 투여군은 표지세포의 수가 108.7개로서 정상대조군의 44.1%, 암세포이식대조군의 42.8% 밖에 안 될 정도로 매우 유의하게 감소하였으며 은입자가 헤아릴 수 있을 정도로 적은 세포가 많이 관찰되었다 (Fig. 8, Table 1).

Table 1. Relative number of labeled cells in the area of 3.5 mm width (6 μm thickness) of intestinal gland of mouse rectum, after injection of ^{3}H-thymidine in different groups

Group	Number	Ratio	
		Experiment/ Normal	Experiment/ Tumor control
Normal control	246.3 (±42.30)	1.00	0.97
Tumor control	253.8 (±20.54)	1.03	1.00
5-fluorouracil	172.7 (±19.02)*	0.70	0.68
Mitomycin C	108.7 ± (17.67)**	0.44	0.43
AG60	53.8 (±11.70)**	0.22	0.21

Numbers in parenthesis denote standard deviation of means.
*Difference between normal control and 5-fluorouracil-treated groups is significant at $p < 0.05$.
**Difference between normal control and mitomycin C-treated, and normal control and AG60-treated groups are very highly significant at $p < 0.01$.

고 찰

일반적으로 항암제는 분열이나 증식이 빠른 세포인 골수세포, 위창자상피세포, 털주머니세포에 많은 피해를 입히므로, 골수기능장애, 위장장애, 탈모증 등의 부작용이 생긴다 (Gilman 등 1985, Clark 등 1992).

5-fluorouracil은 pyrimidine nucleotide의 합성을 억제하고 더 나아가서 핵산의 합성을 방해함으로 종양을 치료할 목적에 쓰이며, 항암치료나 혈구형성에 중요한 역할을 할 수 있는 혈소판형성인자 (platelet activating factor, PAF)의 생산을 조절하는데 관여한다. 5-fluorouracil 은 대부분 간에서 uracil과 같은 경로로 파괴되는데 혈중반감기가 10～20분으로 비교적 빨리 혈장에서 제거되며 주된 독작용으로는 투여후 9～14일에 백혈구감소와 혈소판감소가 나타나나 며칠 내에 회복되며, 위장관 점막의 궤양, 탈모증, 피부염, 피부색소침착 등을 볼 수 있다 (Gilman 등 1985). Mitomycin C는 streptomyces caepitosus에서 추출한 항암성항생제로서 세포 내에서 quinone이 환원된 후 alkyl화 작용을 나타낸다. DNA구조 내에서 quinone과 cytosin함량에 비례하여 DNA합성을 억제하며, 일부는 유리기 (free radical)를 만들어 DNA에 손상을 주기도 하는데, G1 후기와 S기 초기에 영향을 미친다. 또한, 주사된 후 신속히 간에서 대사되기 때문에 혈액에서 빨리 제거되며 주된 독작용으로는 골수기능억제작용에 의한 부작용 외에도 구토, 설염, 설사, 피부염, 발열 등을 볼 수 있다 (Gilman 등 1985, Fisher와 Aristiff 1988).

AG60은 acriflavine과 guanosine을 1 : 1의 비율로 섞은 복합제로서 in vitro에서 대장암 (COLO205), 폐

암(A549, NCI-H2226), 신장암(UO-31)과 전립샘암(PC-3) 세포주에 대해 뛰어난 항암효과를 보이나 부작용은 매우 적은 것으로 알려져 있다(Hong 등 1997, Kim 등 1997, Kim 등 1998). Acriflavine은 acridine의 유도체로서 3,6-diamino-10-methylacridium chloride (trypaflavine)와 3,6-diaminoacridine (proflavine)이 2:1의 비율로 섞여 있는 화합물이다(Macadam과 Williamson 1974). Acriflavine은 항생제가 개발되기 전에는 항균제로서 상처의 치료에 이용되었으며(Browning 등 1917, McIlwain 1941), 현재도 trypanosoma로 인한 질병치료에는 많이 이용되고 있는 약품이다(Kasten 1967). Acriflavine은 그 외에도 항체형성에 영향을 미치는가 하면(Farr 등 1965), 암세포에 acriflavine을 처리하여 얻은 추출물이 암면역성을 나타내었고(Chakraborty와 Bose 1987), 이 약품이 DNA와 RNA에 친화력을 지니며(Bose 등 1966), DNA, RNA, 단백질합성을 억제하는 것이 밝혀졌다(Bose 등 1966, Roth 등 1967). Acriflavine 수용액은 강한 형광을 나타내며 10^{-4}~10^{-5} M의 저농도에서도 미생물의 발육을 억제하고 항암작용도 나타내는 것으로 알려져 있다(Bose 등 1966, Canellakis와 Chen 1979). 또한 acriflavine은 DNA topoisomerase II의 작용을 저해하여 세포분열을 억제하며, RNA 합성을 저해하고 핵소체와 세포질에서의 단백질 합성을 저해한다(Macadam과 Williamson 1974). 한편 세포막에 acriflavine이 결합하면 세포막의 구조나 세포 표면 항원을 변화시켜 암세포에 대한 면역성을 높인다는 보고도 있다(Charkraborty 등 1980, Charkraborty 등 1984, Chakraborty와 Bose 1987).

Guanosine은 화학명이 2-amino-9-β-D-ribofuranosyl-9H-purine-6(1H)-one으로서 guanine과 β-D-ribose가 배당체(glycoside)결합으로 된 nucleoside 중의 하나이다. Guanosine 유도체들은 항원에 의해 유도되는 T림프구의 증식을 촉진하고 TNF-*a*, IL-1, IL-6와 같은 lymphokines의 분비를 증가시키며(Feldbush와 Ballas 1985, Goodman 1988), 큰포식세포에 의한 세포독성을 향상시키고, 자연살해세포(NK cell)의 세포독성을 증가시킨다(Koo 등 1988, Pope 등 1993, Pope 등 1995). Guanosine은 단독으로 투여될 경우 세포독작용이 미약하며 어떠한 항암효과도 보고된바 없다. 그러나 guanosine을 다른 항암제와 병용 투여할 경우 항암제의 효과가 증진된다는 보고들이 있다(Osswald와 Yussef 1979, Iigo와 Hoshi 1984, Iigo 등 1987). 특히 [6-^{14}C] 5-fluorouracil과 guanosine을 병용 투여하면 암세포에서 guanosine에 의하여 [6-^{14}C] 5-fluorouracil과 RNA의 병합이 증가됨으로써 항암작용을 향상시킨다는 보고가 있다(Iigo 등 1983).

세포분열은 성숙된 개체에서도 세포의 노화와 탈락에 대한 보상으로 세포갱신이 일어나며, 이러한 활동은 생체내외의 조건에 따라 다양하게 이루어진다. 위와 샘창자를 비롯한 작은창자는 점막상피의 세포갱신이 왕성한 장기로서 생쥐는 세대교체 시간이 3일 정도 밖에 되지 않으나 곧창자는 다소 길어 6일 정도 된다(Stevens와 Leblond 1953, Cameron 1971). 그러나 나이에 따라서도 세포는 증식정도에 차이를 보이는데, 흰쥐에서는 작은창자의 점막상피세포가 젊은 쥐에 비하여 늙은 쥐에서 더욱 활발하게 증식한다(Holt와 Yeh 1989). 또한 사람에서는 노인이 젊은 사람에 비하여 점막상피세포의 증식이 많이 일어나나 미성숙세포가 많고 apoptosis가 많이 일어나기 때문에 전체적인 점막상피세포의 구조에는 큰 차이가 없다고 한다. 그러나 나이가 증가함에 따라 흡수기능이 감소하는 것은 점막상피세포의 구조적 차이 때문이 아니고 세포가 긴장상태가 되기 때문이라고 한다(Ciccocioppo 등 2002). 그러나 Thompson 등(1998)은 유아와 성인을 비교하였을 때 작은창자점막의 경우 조직학적 구조가 다소 달라서, 융모면적은 유아와 성인의 것이 유사하였으나 창자움의 길이는 유아가 성인보다 31% 나 더 길었고 상피세포의 길이는 성인의 것 보다 다소 짧았을 뿐만 아니라, 유사분열지수도 유아가 성인 보다 68%나 더 높았다고 하였다.

이 실험에서 암세포이식대조군과 AG60 투여군의 경우 정상대조군에 비하여 창자샘의 고유판에서 림프구와 호산성백혈구가 비교적 많이 관찰된 것 외에는 조직학적 구조에 별다른 차이가 없었다. 이와 같은 실험결과는 암세포를 이식하거나 AG60을 투여하여도 2주일 정도의 짧은 기간에는 곧창자점막

조직에 직접적인 영향을 미치지 않았기 때문이라고 생각한다. 그러나 5-fluorouracil 투여군은 창자움의 상피세포들이 다소 위축되고 고유판의 결합조직이 엉성해 보였으며, mitomycin C 투여군은 창자움이 더욱 위축되어 정상대조군에 비하여 창자샘의 폭이 좁게 보였을 뿐만 아니라, 호산성백혈구도 더욱 많이 관찰되었고 핵이 농염되고 용해되는 과정의 세포들이 자주 관찰되었다. 이러한 실험 결과는 5-fluorouracil (30 mg/kg) 또는 mitomycin C (400 μg/kg)를 7회 정도 투여하면 곧창자점막에 조직학적으로 구별될 정도의 손상을 주며, 5-fluorouracil에 비하여 mitomycin C가 곧창자점막에 더 심한 손상을 준다고 생각한다.

곧창자의 경우 여성이 남성보다 점막세포의 증식율이 높았으며, 같은 성의 경우에도 어류를 많이 섭취하고 육류를 소량 섭취하는 집단에서 곧창자의 증식비율이 유의하게 낮았다 (Caderni 등 1999). 땅콩식이가 곧창자점막상피의 증식율을 41% 증가시키며 (Ryder 등 1998), 실험동물에 만성적으로 알콜을 섭취시키면 곧창자점막이 과도하게 증식되어 암발생이 증가할 수 있다는 (Simanowski 등 2001) 등 곧창자점막상피의 증식율은 식이와 관련이 있다. 또한 발암물질을 투여하면 곧창자점막상피가 정상대조군에 비하여 과도하게 증식한다는 보고도 있다 (Okada 등 1996). 사람의 경우 세포증식은 연중 변화가 있어서 골수는 늦은 여름에, 곧창자점막은 가을에 세포분열이 가장 활발하며, 골수는 여름에, 곧창자점막은 봄과 여름에 일중변화가 가장 뚜렷하다 (Sothern 등 1995). 일중변화로는 오전 7시에 세포분열이 가장 활발하였으나 기아상태에서는 일중변화가 없다고 하였으며 (Buchi 등 1991), 암환자에서는 세포갱신율이 일중주기에 따라 변화가 심하다 (Brandi 등 2004).

Thymidine은 DNA에만 함유되어 있는 물질로서 thymidine pool에 저장되어 있다가 세포분열시에 thymidic acid로서 DNA합성에만 쓰이기 때문에 표지된 DNA의 전단계물질인 ^{3}H-thymidine을 자기방사법적 연구에 많이 사용한다 (Helpap 등 1981, Tielemans 등 1989, Ryberg 등 1990, Karam과 Leblond 1993). 이 연구에서도 DNA합성지수를 비교하기 위하여 실험동물에 ^{3}H-thymidine을 주사한 후 곧창자조직을 떼어내어 자기방사법 조직표본을 만들었으며, 특히 일중주기에 따른 변화를 최소화하기 위하여 모든 실험동물을 오전 9시에서 10시 사이에 ^{3}H-thymidine을 정맥주사 하였다.

정상인 곧창자에서는 창자샘의 아래 1/3에서 DNA합성이 활발하나 암환자는 중간 이나 상부 1/3에서 더 뚜렷하다 (Maskens와 Deschner 1977)고 하였는데, 이 실험에서도 창자샘의 아래 1/3에서 방사표지세포가 가장 많이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 창자의 경우 장샘의 아래부분에서 세포분열이 시작하여 위쪽으로 이동한다는 사실 (Chung 2001)에 비추어 볼 때 타당한 결과라고 생각한다.

한편 자기방사표본 관찰에서 암세포이식군의 표지세포 수가 정상대조군의 103%로 별다른 변화가 없었으며, 일부 세포는 표지 된 은입자가 너무 많아서 은입자의 수를 헤아리기 어려운 세포들이 많았다. 이와 같은 결과는 EA21a 유방암조직을 이식한 생쥐에 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 암세포를 생체에 이식하였을 경우 방사성표지세포의 수가 정상대조군에 비하여 높아서 지라조직은 약 10%, 샘창자조직은 20%정도 증가하였다는 보고 (Ko 등 2000, Ahn 등 2002)에 비추어 볼 때 곧창자조직은 지라조직과 샘창자조직과는 달리 생체 내에 이물질이 침입하였을 경우에도 2주일 정도에는 세포분열지수에 별다른 변화가 없는 것 같다. 그러나 AG60, 5-fluorouracil, mitomycin C 투여군은 표지세포 수가 정상대조군에 비하여 현저하게 감소하였는데 그 중에 AG60투여군 (22%)이 가장 심하게 감소하였고 그 다음이 mitomycin C 투여군 (44%)과 5-fluorouracil 투여군 (70%)의 순서로 감소하였다. 특히 AG60투여군과 mitomycin C 투여군의 경우 표지세포의 수 뿐만 아니라, 표지된 은입자의 수도 정상대조군을 비롯한 다른 실험군에 비하여 적은 세포가 많았다. 이와 같은 실험결과는 이번 실험에 사용한 약제 중 AG60이 곧창자점막상피를 구성하는 세

포의 DNA합성을 가장 심하게 억제하였으며, 그 다음 mitomycin C이 심하게 억제하였고 5-fluorouracil의 억제력이 가장 약했기 때문이라고 생각한다. 특히 이 실험에서 AG60투여군과 mitomycin C 투여군이 5-fluorouracil 투여군에 비하여 곧창자점막상피의 표지세포 수가 훨씬 더 감소하였다. 이와 같은 실험결과는 mitomycin C 1회 투여량 (400 μg/kg)이 생쥐에 대한 LD_{50}인 8.4 mg/kg의 1/21이고, AG60 1회 투여량 (5 mg/kg)은 흰쥐에 대한 LD_{50}인 80 mg/kg의 1/16인데 비하여 5-fluorouracil 1회 투여량 (30 mg/kg)은 생쥐에 대한 LD_{50}인 240 mg/kg의 약 1/8로서 5-fluorouracil의 상대적인 투여량이 훨씬 더 많았음에도 불구하고 AG60과 mitomycin C가 5-fluorouracil 보다 곧창자점막상피세포의 DNA합성능력을 더 심하게 억제하였기 때문이라고 생각한다. 즉 곧창자조직에는 AG60과 mitomycin C이 5-fluorouracil 보다 항암효과가 더 높다고 생각한다. 특히 AG60의 경우 DNA합성능력은 현저히 억제하면서도 곧창자점막의 조직학적 구조에는 별다른 영향을 주지 않은 결과는 매우 고무적인 결과라고 생각한다.

이상의 고찰을 종합하여 보면 생쥐 곧창자점막의 경우 5-fluorouracil에 비하여 AG60과 mitomycin C가 점막상피세포의 DNA합성에 더 억제적으로 작용하며, 특히 AG60는 mitomycin C와 5-fluorouracil에 비하여 점막상피세포의 DNA합성을 억제하는 효과가 더 높을 뿐만 아니라 곧창자점막조직에 형태적인 손상을 거의 주지 않는 항암제라고 생각한다.

참 고 문 헌

Ahn BJ, Ahn ET, Park KH, Kim JK, Ko JS : Effects of Adriamycin or AG60 to the DNA synthesis of duodenal epithelium of mice implanted with Ehrlich Carcinoma cells. Kor J phys 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.

Bose S, Gothoskar BP, Ranadive KJ : Studies of biological macromolecules: II. Effect of acriflavine exposure on the synthesis of macromolecules in liver cells in vitro. Exp Cell Res 42: 89-98, 1966.

Brandi G, Calabrese C, Pantaleo MA, Morselli Labate A, Di Febo G, Hakim R, De Vivo A, Di Marco MC, Biasco G : Circadian variations of rectal cell proliferation in patients affected by advanced colorectal cancer. Cancer Lett 208: 193-196, 2004.

Browning CH, Gulbransen R, Kennaway EL, Thornton LHD : Flavine and brilliant green powerful antiseptics with low toxicity to the tissues: their use in the treatment of infected wounds. Br Med J 20: 73-79, 1917.

Buchi KN, Moore JG, Hrushesky WJ, Sothern RB, Rubin NH : Circadian rhythm of cellular proliferation in the human rectal mucosa. Gastroenterology 101: 410-415, 1991.

Caderni G, Palli D, Lancioni L, Russo A, Luceri C, Saieva C, Trallori G, Manneschi L, Renai F, Zacchi S, Salvadori M, Dolara P : Dietary determinants of colorectal proliferation in the normal mucosa of subjects with previous colon adenomas. Cancer Epidemolo Biomark Prevent 8: 219-225, 1999.

Cameron IL : Cell proliferation and renewal in the mammalian body. In: Cellular and molecular renewal in the mammalian body. eds Cameron IL, Thrasher JD. Academic Press, New York, pp 45-79, 1971.

Canellakis ES, Chen T-K : Relationship of biochemical drug effects to their antitumor activity-I. Biochem Pharmacol 28: 1971-1976, 1979.

Chakraborty NG, Bose SR : Protective immunity by chemically modified tumor cell antigens extracted by 3 M KCl. Neoplasm 34: 427-430, 1987.

Charkraborty NG, Bose SR, Joy Chowdhury JR : Arcriflavine-induced surface changes in three tumor cell types and differential sensitivity to lectins. Tumori 70: 127-130, 1984.

Charkraborty NG, Bose SR, Joy Chowdhury JR : Enhancement of immunogenicity of tumor cells by modification of cell surface with acridine dyes. Indian J Experi Biol 18: 927-930, 1980.

Chung JW : Human Tissue Biology, Soomoonsa Publication, pp 542-555, 2001. (in Korean)

Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Luinetti O, Rossi M, Cifone MG, Corazza GR : Small bowel enterocyte apoptosis and proliferation are increased in the elderly. Gerontology 48:

204–208, 2002.

Clark WG, Brater CD, Johnson AR : Goth's Medical Pharmacology. 13th ed. St. Louis, Mosby Year Book, pp 704–714, 1992.

Farr RS, Samuelson JS, Stewart B : The suppression of anti–bovine serum albumin production in rabbits by acriflavinee hydrochloride N.F. J Immunol 94: 682–691, 1965.

Feldbush TL, Ballas ZK : Lymphokine–like activity of 8–mercaptoguanosine : induction of T and B cell differentiation. J Immunol 134: 3204–3211, 1985.

Fisher JF, Aristiff PA : The chemistry of DNA modification by antitumour antibiotics. Prog Drug Res 32: 411–498, 1988.

Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F : Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 7th ed, New York, Macmillan Pub Co, pp 1240–1306, 1985.

Goodman MG : Induction of interleukin I activity from macrophages by direct interaction with C8–substituted guanine ribonucleosides. Int J Immunopharmacol 10: 579–586, 1988.

Helpap B, Hattori T, Gedigk P : Repair of gastric ulcer. A cell kinetic study, Virchows Arch (Pathol Anat) 392: 159–170, 1981.

Holt PR, Yeh KY : Small intestinal crypt cell proliferation rates are increased in senescent rats. J Gerontol 44: B9–B14, 1989.

Hong EK, Kim HM, Lee KY, Jeong YS, Yoo BR, Kim SG, Ahn ET, Han YB : Anti–tumor effect of the complex of acriflavine and guanosine (AG60). Kor J Cancer, 29: 29–37, 1997. (in Korean)

Iigo M, Hoshi A : Effect of guanosine on antitumor activity of fluorinated pyrimidines against P388 leukemia. Cancer Chemother Pharmacol 13: 86–90, 1984.

Iigo M, Kuretani K, Hoshi A : Relationship between antitumor effect and metabolites of 5–fluorouracil in combination treatment with 5–fluorouracil and guanosine in ascites sarcoma 180 tumor system. Cancer Res 43: 5687–5694, 1983.

Iigo M, Miwa M, Ishitsuka H, Nitta K : Potentiation of the chemotherapeutic action of 5'–deoxy–5–fluorouridine in combination with guanosine and related compound. Cancer Chemother Pharmacol 19: 61–64, 1987.

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.

Kasten FH : Cytochemical studies with acridine orange and the influence of dye contaninants in the stainig of nucleic acids. Int Rev Cytol 21: 141–202, 1967

Kim SG, Cho JY, Chung YS, Ahn ET, Lee KY, Han YB : Suppression of xenobiotic–metabolizing enzyme expression in rats by acriflavine, a protein kinase inhibitor. Effects on epoxide hydrolase, glutathione S–transferases, and cytochrome p450. Drug Metab. Dispos, 26: 66–72, 1998.

Kim SG, Kim CW, Ahn ET, Lee KY, Hong EK, Yoo BI, Han YB : Enhanced anti–tumour effects of acriflavine in combination with guanosine in mice. J Pharm Pharmacol 49: 216–222, 1997.

King RJB : Principles of cancer treatment. In *cancer biology*, Essex, Longman, pp 183–211, 1996.

Ko JS, Ahn ET, Park KH, Kim JK, Kim EH, Chung YS : Effects of antitumor agents on the spleen of mouse implanted with Ehrlich Carcinoma cells. Kor J Anatomy 33: 315–326, 2000. (in Korean)

Koo GC, Jewell ME, Manyak CL, Sigal NH, Wicker LS : Activation of murine natural killer cells and macrophages by 8–bromoguanosine. J Immunol 140: 3249–3252, 1988.

Macadam RF, Williamson J : Drug effects on the fine structure of Trypanosome rhodesienes: acriflavine, ethidium and antrycide, Ann Trop Med Parasit 68: 291–299, 1974.

Malpas JS: Chemotheraphy. 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.

Maskens AP, Deschner EE : Tritiated thymidine incorporation into epithelial cells of normal–appearing colorectal mucosa of cancer patients. J Natl Cancer Inst 58: 1221–1224, 1977.

McIlwain H : A nutritional investigation of the antibacterial action of acriflavinee. Biochem J 35: 1311–1319, 1941.

Ninomiya Y, Miwa M, Eda H, Sahara H, Fujimoto K, Ishida M, Umeda I, Yokose K and Ishitsuka H : Comparative antitumor activity and intestinal toxicity of 5'–deoxy–5–fluorouridine and its prodrug trimethoxybenzoyl–5'–

deoxy-5-fluorocytidine, Jpn J Cancer Res 81: 188-195, 1990.

Okada H, Mizuno M, Ikeda N, Tomoda J, Tsuji T : Epithelial cell proliferation during colonic chemical carcinogenesis in the rat. J Gastroenterol Hepatol 11: 686-691, 1996.

Osswald H, Yussef M : Potentiation of the chemotherapeutic action of 5-fluorouracil by combination with cytidine or guanosine on HRS-sarcoma. J Cancer Res Clin Oncol 93: 241-244, 1979.

Pope BL, Chourmouzis E, Victorino L, MacIntyre JP, Capetola RJ, Lau CY : Loxorivine (7-allyl-8-oxoguanosine) activates natural killer cells primes cytolytic precursor cells for activation by IL-2. J Immunol 151: 3007-3017, 1993.

Pope BL, MacIntyre JP, Kimball E, Lee S, Zhou L, Taylor GR, Goodman MG : The immunostimulatory compound 7-allyl-8-oxoguanosine (Loxorbine) induces a distinct subset of murine cytokines. Cellular Immunol 162: 333-339, 1995.

Roth D, London M, Manjon M : Binding specificity and affinity of acriflavine for nucleic acids. Stain Technol, 42: 125-132, 1967.

Rubio CA, Sveander M, Tornling G, Uribe A : DNA synthesis in the gastroduodenal 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 nterochromaffin-like cells in the rat stomach, Gastroenterology 99: 935-942, 1990.

Ryder SD, Jacyna MR, Levi AJ, Rizzi PM, Rhodes JM : Peanut ingestion increases rectal proliferation in individuals with mucosal expression of peanut lectin receptor. Gastroenterology 114: 44-50, 1998.

Santelli G and Valeriote F : In vivo enhancement of 5- fluorouracil cytotoxicity to AKR leukemia cells by thymidine in mice. J Natl Cancer Inst 61: 843-847, 1978.

Simanowski UA, Homann N, Knuhl M, Arce L, Waldherr R, Conradt C, Bosch FX, Seitz HK : Increased rectal cell proliferation following alcohol abuse. Gut 49: 418-422, 2001.

Sothern RB, Smaaland R. Moore JG : Circannual rhythm in DNA synthesis (S-phase) in healthy human bone marrow and rectal mucosa. FASEB J 9: 397-403, 1995.

Stevens CE, Leblond CP : Renewal of the mucous cell in the gastric mucosa of the rat. Anat Rec 115: 231-243, 1953.

Thompson FM, Catto-Smith AG, Moore D, Davidson G, Cummins AG : Epithelial growth of the small intestine in human infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr 26: 506-512, 1998.

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: G175-182. 1999.

Legends for Figures

Fig. 1. Hematoxylin−eosin stained rectal crypts of a normal mouse. A large number of the goblet cells (arrowhead) are seen in the upper portion of the intestinal crypts, and intraepitheial lymphocyte (thin arrow) and mitotic figure (thick arrow) are seen in the rectal epithelial cells. LM, lamina muscularis mucosae. ×200

Fig. 2. Hematoxylin−eosin stained rectal crypts of a AG60 (5 mg/kg) treated mouse. Some endocrine cells (vacant arrow) with light cytoplasm is seen in the bottom of the intestinal crypts. A mitotic figure (thick arrow) of the epithelial cells and intraepitheial lymphocyte (thin arrow) are seen in the rectal epithelial cells. LM, lamina muscularis mucosae. ×200

Fig. 3. Hematoxylin−eosin stained rectal crypts of a mouse, treated with 5−fluorouracil (30 mg/kg). Flattened epithelial cells and expanded lumen (vacant asterisk) of the intestinal gland are seen in the upper portion of the rectal crypts. Some necrotic changed nuclei with large halo (arrow) in the intestinal crypts and some eosinophile leukocytes (vacant arrow) in the lamina propria are seen. LM, lamina muscularis mucose. ×200

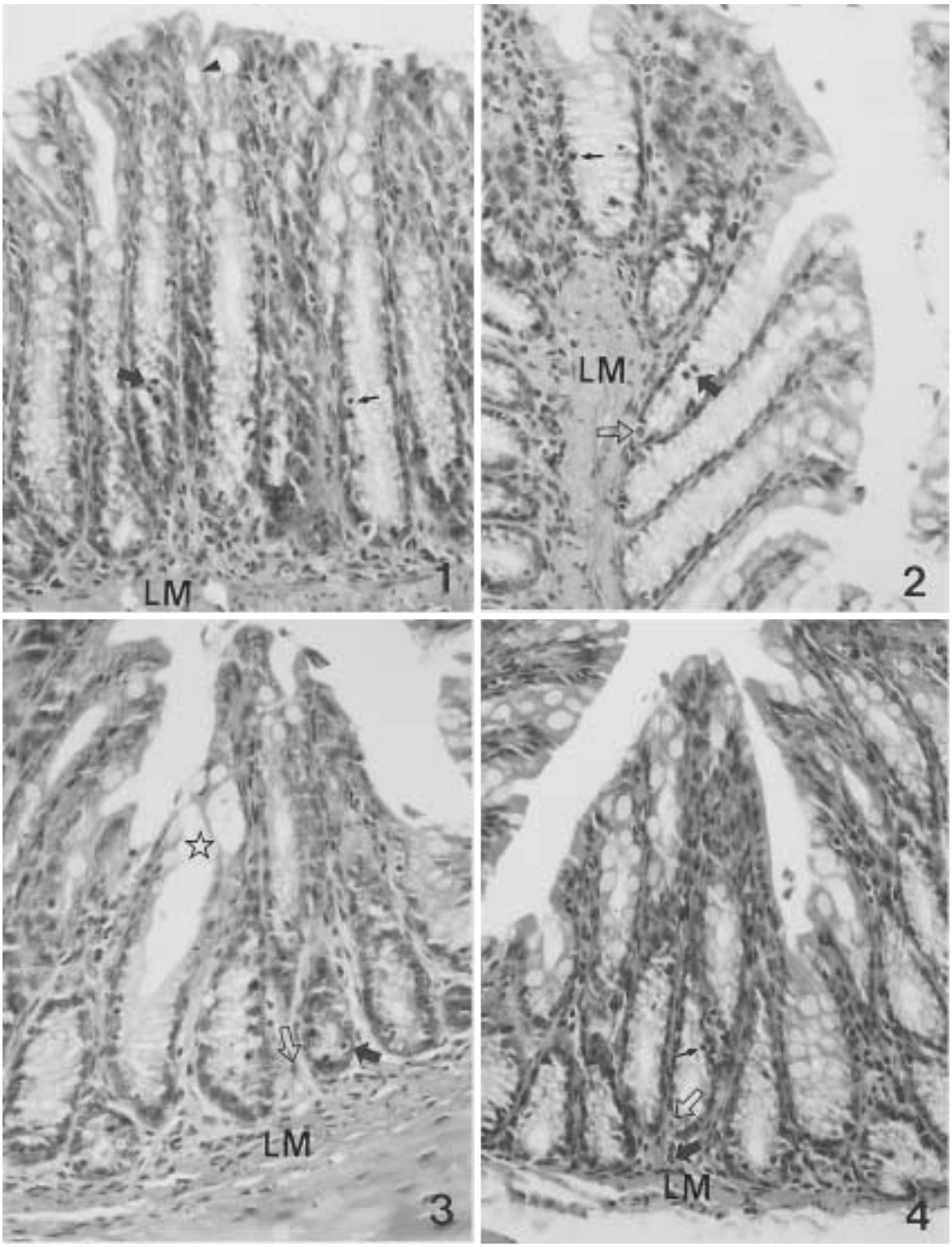
Fig. 4. Hematoxylin−eosin stained rectal crypts of a mouse, treated with mitomycin C (400 μg/kg). Some eosinophile leukocytes (thick arrow) are seen in the lamina propria. Some endocrine cells (vacant arrow) with light cytoplasm and intraepitheial lymphocyte (thin arrow) are seen in the bottom of the intestinal crypts. LM, lamina muscularis mucosae. ×200

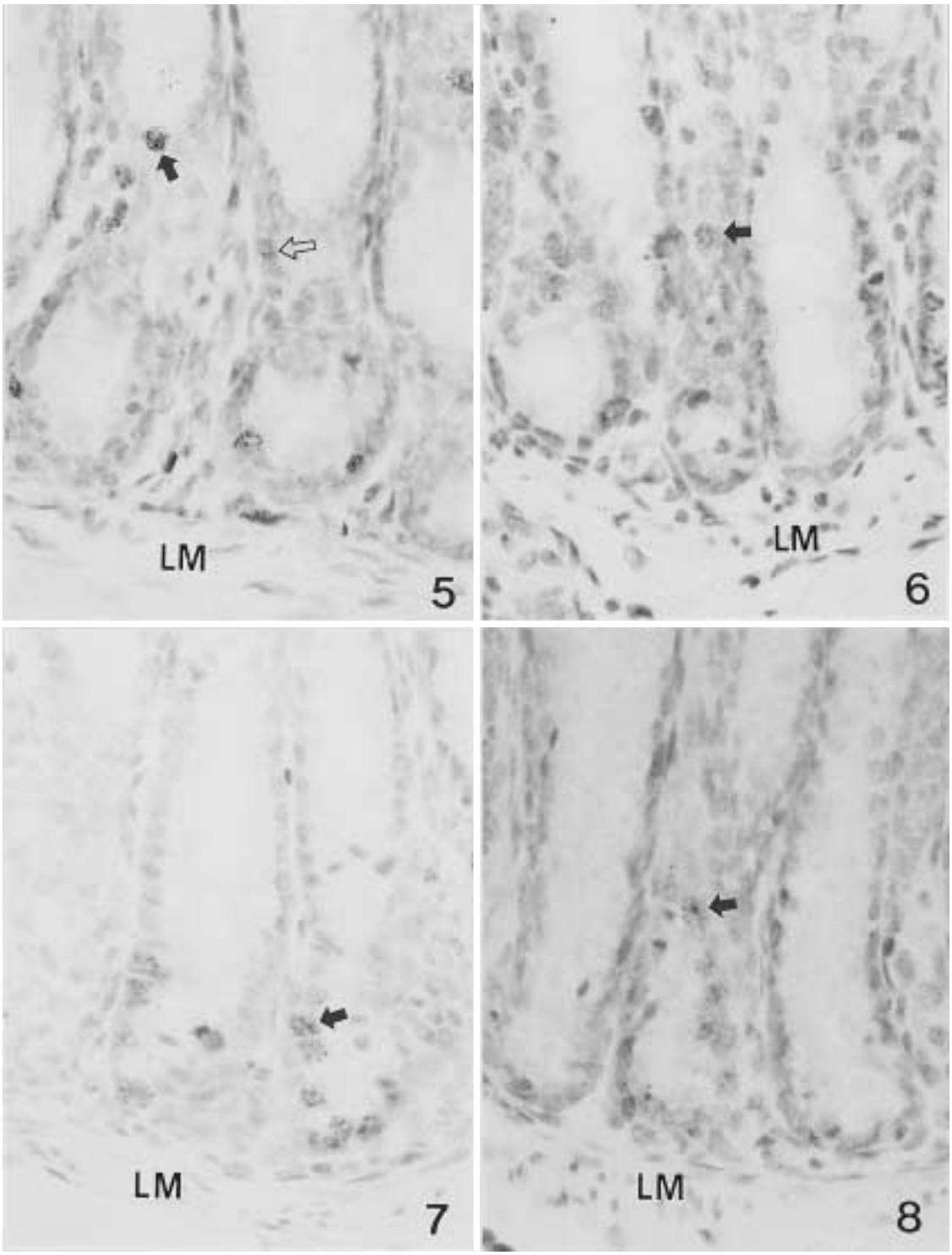
Fig. 5. An autoradiogram of the rectal crypts of a normal mouse. The labeled cells containing massive (arrow) or a few silver grains (vacant arrow) are seen over the nuclei of the epithelial cells. LM, lamina muscularis mucosae. ×400

Fig. 6. An autoradiogram of the rectal crypts of a mouse, treated with AG60 (5 mg/kg). Number of the labeled cells (arrow) and amount of the silver grains in the epithelial cells are significantly decreased as compared with those of normal control ones. LM, lamina muscularis mucosae. ×400

Fig. 7. An autoradiogram of the rectal crypts of a mouse, treated with 5−fluorouracil (30 mg/kg). Number of the labeled cells (arrow) with massive silver grains are decreased as compared with those of normal control ones. LM, lamina muscularis mucosae ×400

Fig. 8. An autoradiogram of the rectal crypts of a mouse, treated with mitomycin C (400 μg/kg). Number of the labeled cells (arrow) with massive silver grains or moderate amount of the silver grains are significantly decreased as compared with those of normal control ones. LM, lamina muscularis mucosae. ×400


LM
1
LM
2
LM
3
LM
4


LM
5
LM
6
LM
7
LM
8

Korean J Phys Anthropol
18(3): 217 ~ 229, 2005

Abstract

Effects of 5-Fluorouracil, Mitomycin C or AG60 to the DNA Synthesis of Rectal Epithelium of Mice Implanted with Ehrlich Carcinoma Cells

Jeong-Sik Ko, E-Tay Ahn, Kyung-Ho Park, Dae-Kyoon Park, Eun-Joo Jung

Department of Anatomy, College of Medicine, Soonchunhyang University, Cheonan, Korea

This experiment was performed to evaluate the morphological responses of the intestinal gland of the mouse, rectum inoculated with Ehrlich carcinoma cells, following administration of 5-fluorouracil, mitomycin C or AG60.

Healthy adult ICR mice weighing 25 gm each were divided into normal and experimental groups (tumor control group, 5-fluorouracil, mitomycin C treated group, and AG60 treated group). In the experimental groups, each mouse was inoculated with 1×10^7 Ehrlich carcinoma cells subcutaneously in the inguinal area. From next day, 0.2 mL of saline, 5-fluorouracil (30 mg/kg), mitomycin C (400 μg/kg) or AG60 (5 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 μCi/gm of methyl-^{3}H-thymidine through tail vein. Seventy minutes after the thymidine injection, animals were sacrificed. The number of the labeled epithelial cells of the rectal crypts (mean number of labeled epithelial cells per 3.5 mm length of mucosa) were observed and calculated.

On histological study, in the rectum of mitomycin C treated groups, narrowed intestinal gland, a number of the nectotic changed epithelial nuclei and loosely arranged lamina propria were observed. But in the AG60 treated group, morphological changes of the rectum were not observed. On autoradiographic study, number of the labeled cells of normal control, tumor control, 5-fluorouracil (30 mg/kg) treated, mitomycin C (400 μg/kg) treated and AG60 (5 mg/kg) treated groups were 246.3±42.30, 253.8±20.54, 172.7±19.02, 108.7±17.67 and 53.8±11.70, respectively. In the AG60 and mitomycin C treated group, poorly-labeled cells containing only a few silver grains of ^{3}H-thymidine were observed more frequently than in those of the normal control group.

From the above results, AG60 (5 mg/kg) and mitomycin C (400 μg/kg) are more suppressed the DNA synthesis of the cells of the rectal crypts as compare with 5-fluorouracil (30 mg/kg). And AG60 does not result any histological defect on the rectal mucosa. These results suggest that AG60 is expected as one of most effective anticancer drugs.

Key words : Rectal crypt, DNA synthesis, Autoradiographic study, Acriflavine-guanosine complex (AG60), 5-fluorouracil, Mitomycin C. Ehrlich carcinoma cell

Correspondence to : Jeong-Sik Ko (Department of Anatomy, College of Medicine, Soonchunhyang University)
E-mail : jeongsik@sch.ac.kr