

## 成長 hormone이 랫드 小腸上皮細胞 再生週期에 미치는 영향에 대하여

郭守東·金鍾涉·安東元\*

경상대학교 수의과대학

경상남도 가축위생시험소\*

(1992년 12월 1일 접수)

### Effect of growth hormone on migration and turnover rats of small intestinal epithelium in mice

Soo-dong Kwak, Chong-sup Kim, Dong-weon Ahn\*

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

Gyeongnam Animal Health Experimental Institute \*

(Received Dec 1, 1992)

**Abstract :** The purpose of this study was to examine the effect of growth hormone (GH) on the division and migration of the small intestinal epithelium in mice.

Twenty mice(ICR), weighing initially about 10 g, aged 18 days were randomly subdivided in two groups of control and GH-treated group.

Control group was sacrificed at 2 hr, 2, 3, 4 and 5 day after intraperitoneal injection of  $^3\text{H}$ -thymidine ( $^3\text{H}$ - TdR,  $4 \mu\text{Ci/gm}$  of BW/day for 2 days). GH-treated group was injected subcutaneously with somatotropin(10 IU/mouse/day for 4 days) from 2 day ago of first  $^3\text{H}$ -TdR injection and then was sacrificed at 2 hr, 2, 3, 4 and 5 day after intraperitoneal injection of  $^3\text{H}$ -TdR( $4 \mu\text{Ci/g}$  of BW/day for 2 days).

The small intestines were collected for autoradiography and Hematoxylin counterstain. The location of the labeled epithelial cells (LEC) in villi of the small intestine was investigated with light microscope.

1. In the control group, the LEC regions in the small intestine were located at crypts on 1 day, at 0% ~  $15.9 \pm 3.6\%$  of villus high value(VHV) on 2 day, at 0% ~  $49.8 \pm 16.5\%$  of VHV on 3 day, at 0% ~  $95.3 \pm 6.9\%$  of VHV on 4 day and  $62.9 \pm 16.7 \sim 100\%$  of VHV on 5 day, respectively.

2. In the GH-treated group, the LEC regions in the small intestine were located at crypts on 1 day, at 0% ~  $39.2 \pm 9.5\%$  of VHV on 2 day, at 0% ~  $81.5 \pm 18.2\%$  of VHV on 3 day, at  $45.2 \pm 11.5\% \sim 100\%$  of VHV on 4 day, at 85% ~ 100% of VHV on 5 day, respectively.

3. VHV of tops in the LEC regions appeared to be 23.3% and 31.7% higher on 2 and 3 day, and VHV of the LEC region bases appeared to be 45.2%, 22.1% higher on 4 and 5 day, respectively in the GH-treated group than those observed in the control group. These difference was very highly significant( $p < 0.01$ ).

**Key words :** somatosatatin, small intestine, villi, epithelium, radioautography, mouse.

### 緒 論

身體내 대부분의 세포들은 週期的으로 일정한 生存期

間이 경과하면 변성 탈락되고 새로운 세포로 再生되어  
대체됨이 연속되고 있다. 그 예로 小腸의 上皮細胞와  
Paneth세포, 睪丸의 曲細尿管 上皮, 脾臟의 導管上皮細胞

胞, 赤血球, 白血球은 항상 일정한 기간후에 변성 소멸되고 새로운 세포로 대체된다.<sup>1~14</sup>

消化器官의 粘膜炎細胞는 腸腺의 小窩에서 분화 증식한 후 Paneth 세포만은 小窩의 下부로 이동하나 그의 세포들은 絨毛의 첨부로 이동한 후 3~5일을 주기로 하여 연속적으로 재생 탈락하고 있다.<sup>3, 4, 6, 7, 12</sup> 再生하여 탈락하는 기간은 생리적으로 왕성하고 건강할 수록 빠르다.<sup>8, 14</sup> 그 예로 어린동물 일수록 再生力이 빠르고 존속기간이 짧다고 한다.<sup>14</sup>

腸上皮의 재생을 자극하는 물질로는 misoprostol이 보고된 바 있고,<sup>15~19</sup> 성장 hormone은 체내 모든 기능을 향상시킬 뿐 아니라 소화관의 上皮細胞를 증식토록 자극한다고 한 바 있다.<sup>20~23</sup>

본 실험은 腸上皮 세포의 再生週期에 성장 hormone이 미치는 영향을 조사하기 위하여 성장 hormone을 주사한 mice에 放射線 自記法으로 腸上皮가 재생된 후 이동양상을 조사코자 한다.

### 材料 및 方法

공시동물은 마우스(ICR) 18일령(체중 10g 내외) 20수를 각각 10수씩 2群으로 나누어 공시하였다.

**Table 1.** Autoradiographic experimental designs by intraperitoneal consecutive injection of <sup>3</sup>H-thymidine once daily for 2 days to mice

Days after first injection	2hr	2	3	4	5	Total
<sup>3</sup> H-TdR* Dose ( $\mu$ Ci)/g of BW	4	4				
No. of cumulative injection	1	2	2	2	2	
No. of mice injected	10	8				
No. of mice sacrificed	2	2	2	2	2	10

\* <sup>3</sup>H-TdR ; <sup>3</sup>H-thymidine.

**Table 2.** Autoradiographic experimental designs by intraperitoneal consecutive injection of <sup>3</sup>H-thymidine for 2 days and subcutaneous continuous injection of somatotropin for 4 days to mice

Days after first injection	-2	-1	2hr	2	3	4	5	Total
Dose injected (GH/ <sup>3</sup> H-TdR)*		10/0**	10/4	10/4				
No. of cumulative injection(GH/ <sup>3</sup> H-TdR)		1/0	2/0	3/1	4/2			
No. of mice injected (GH/ <sup>3</sup> H-TdR)		10/0	10/0	10/10	8/8			
No. of mice sacrificed		non	non	2	2	2	2	10

\* GH/<sup>3</sup>H-TdR ; somatotropin/<sup>3</sup>H-thymidine

\*\* Dose(IU) of growth hormone per mouse/dose( $\mu$  Ci) of <sup>3</sup>H-thymidine per gm of mice body weight.

**第 1 實驗群 :** Table 1과 같이 마우스 10수에 제 1일째는 오전 9시에서 10시 30분중에 먼저 대조적 실험목적으로 생리적 식염수를 首當 0.2ml씩 皮下注射하고 그후 10~30분이 경과한 후에 방사선 물질인 Thymidine- methyl- <sup>3</sup>H(Du Pone Co., specific activity 6.7 Ci/m mol, concentration of 1 milli Ci/ml, 이하 <sup>3</sup>H-TdR라고 함)에 생리적 식염수를 가하여 마우스에 체중 g당 4 $\mu$  Ci씩 복강내 주사하고 시간이 경과한 후에 경정맥을 切斷 放血하고 복강내 臟器를 분리하여 10% 중성 formalin에 固定하였다. 제 1일째는 주사후 2시간째에 10수 중에 2수의 臟器를 고정하고, 제 2일째는 나머지 8수에게 같은 방법으로 제 2차 注入하고 2首의 臟器를 固定하고 제 3일, 4일 및 5일째는 注入하지 않고 일자만 경과한 후 매 2수씩 臟器를 固定하였다.

**第 2 實驗群 :** Table 2와 같이 마우스 10수에 <sup>3</sup>H-TdR를 주사하기 2일전과 1일전에는 생리적 식염수에 성장 hormone(growth hormone, GH)인 somatotropin(Sigma)만을 희석하여 首當 10 IU씩 皮下注射하였고 제 1일째는 10수 전체에 1시간 전에 somatotropin을 주사하고 <sup>3</sup>H-TdR를 체중 g당 4 $\mu$  Ci씩 주사하여 2시간 정도 경과한 후 2수의 臟器를 적출하여 固定하였고 제 2일째는 나머지 8수에 1일째와 같은 방법으로 注入하고 2수를 固定하고 제 3일, 4일 및 5일째는 매 일자별로 somatotropin만을 注入한 후 매 2수씩 臟器를 固定하였다. 固定된 조직은 통상 방법과 같이 paraffin 切片을 만들어 脫 paraffin 또는 凍結切片을 만들었다. 다음 미리 豫熱液化的한 NTB-3 emulsion(Kodak)로 조직절편을 暗室에서 coating하고 방습제와 함께 4℃의 냉암소에서 4주~6주간 감작시킨 후 Kodak D-19 現像液과 Kodak 속성 定着液에서 현상하고 정착하여 hematoxylin으로 대조염색을 한 후 mount하여 腸上皮細胞의 核內 silver grains를 보유하여 세포분열이 표지된 세포의 출현양상을 관찰하였다.

## 結 果

성장 hormone이腸上皮의再生週期에 미치는 영향을 조사하기 위하여 mouse를 GH만을 투여한 제 1군과  $^3\text{H-TdR}$ 와 GH를 투여한 제 2군으로 구분하고 소장에서 전체의 길이가 거의 출현된 용모들 중에서絨毛上皮에 Silver grains를 기준치 이상으로 보유하여 유사분열이 표지된上皮細胞(이하 표지된 세포)들의最上部 높이까지의 분포위치를 용모 基部에서 첨부까지 100등분한 위치로 구분하고 환산한 바 Bar Fig 1과 같이  $^3\text{H-TdR}$ 만을 주사한 第 1實驗群에서 조사대상 용모의 길이는  $248 \pm 76 \mu\text{m}$  였는데 이 길이의 100분비 중에서 유사분열이 표지된 세포의 분포위치는 주사 2시간후인 제 1일째는 용모의 기저부의 하부인腸腺陰窩(crypts)에서만 분포되었고(Fig 1), 제 2일째는 용모의 기저부에서 시작하여  $15.9 \pm 3.6\%$ 의 높이까지(Fig 2), 제 3일째는 용모의 기저부에서 시작하여  $49.8 \pm 16.5\%$ 의 높이까지, 제 4일째는 용모의 기저부에서 시작하여  $95.3 \pm 6.9\%$ 의 높이까지 였고(Fig 4), 제 5일째는 용모 하부에는 없고,  $62.9 \pm 16.7\%$ 의 높이에서 시작하여 용모의 첨부까지 점유하고 있었고(Fig 5), 동일 개체에서도 용모별로 표지된細胞帶의 차이가 많았다. GH와  $^3\text{H-TdR}$ 를 주사한 第 2實驗群에서 용모의 길이는  $230 \pm 56 \mu\text{m}$  였는데 제 1일째는 기저부의 하부인腸腺陰窩에서만 관찰되어 第 1實驗群의 제 1일째와 같은 위치였고 제 2일째는 용모의 기저부에서 시작하여  $39.2 \pm 9.5\%$ 의 높이까지, 제 3일째는 용모의 기저부에서 시작하여  $81.5 \pm 18.2\%$  높이까지(Fig 3), 제 4일째는 기저부에는 없고  $45.2 \pm 11.5\%$ 의 높이에서 시작하여 용모의 첨부까지, 제 5일째는 기저부에는 없고 85% 높이 이상의 부위에서만 소수 관찰

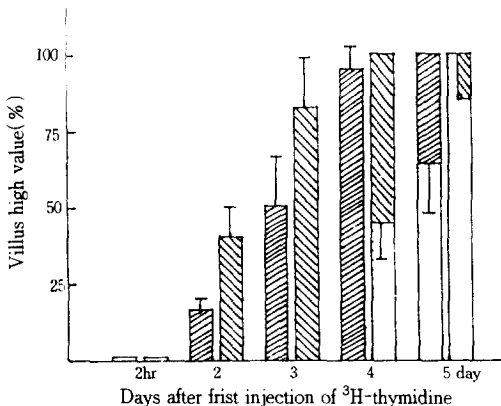


Fig 1. Villus high value (oblique line in bar) of labeled epithelial cells in small intestine of mice (left, control : right, GH-treated).

되었고(Fig 6), 동일 개체에서도 용모별 표지된細胞帶의 높이의 차이가 컸고, GH를 주사하지 않는 第 1實驗群 보다는 제 1일째는 위치의 차이는 인정되지 않고 2군 모두가陰窩내만 위치하고 있었으나 GH를 주사하지 않는 예보다 제 2일째는 23.3%, 제 3일째는 31.7%까지 더 상부로 이동되었고, 제 4일째는 용모의 기저부에 신생되어 표지되지 않는 세포가  $45.2 \pm 11.5\%$  높이까지 이동되어 있었다. 제 5일째는 표지된 세포가 거의 소실되고 소수의 용모에서만 85% 높이 이상에서 관찰되어 GH를 주사한 군은 주사하지 않는 군 보다小腸絨毛上皮細胞의 이동을 촉진시키는 작용이 있었다( $p < 0.01$ ).

## 考 察

小腸의 점막상피 세포는腸腺의陰窩에서 분화 증식하여 용모의 첨부로 이동되어 탈락 소실되는데<sup>1-19</sup> 小腸絨毛에서 분열이 표지된上皮細胞의 위치규정을 위한 구분에 대하여 Uddin et al<sup>12</sup>는 기저부, 중간부, 정부의 3부로 구분한 바 있으나上皮細胞數로서 대부분이 구분한 바가 많고<sup>17, 19, 23, 24</sup>, 용모上皮細胞 전체 수에 대한 100분비로 표시한 바도 있다.<sup>24</sup> 본 연구는 용모를 기저부에서 첨부까지 높이를 100분비(%)로 세분하고 분열細胞帶의 높이를下部에서上部까지 표시하였다.

소장상피의 소실되는 주기에 대하여는 마우스에서 Uddin et al<sup>12</sup>는 2~3일, Cheng<sup>4, 6</sup>은 3~5일, 광<sup>13</sup>은 대부분이 5일 이하이고 최장 7일을 초과하지 않는다고 하였고, 마우스 태아 12지장에 대하여 Calvert와 Pother<sup>25</sup>는 10일째까지 잔존하고 있었으나 12일째는 나타나지 않았다고 하였다.

본 실험에서 제 1군의 5일째는  $62.9 \pm 16.7\%$  이상의 부위에서 아직 잔존하고 있어 Uddin et al<sup>12</sup>의 2~3일과 Cheng<sup>4, 6</sup>의 3~5일 및 광<sup>13</sup>의 5일 보다는 긴편이고 완전 소실될 때까지는 관찰되지 않았으나 Calvert와 Pother<sup>25</sup>의 10일 보다는 짧을 것으로 생각된다.

腸上皮의再生週期는 휴지기 중에複製前期의 길이에 좌우되는데 Thrashar<sup>14</sup>는 연령이 증가할 수록 길어진다고 하였고 또 이들腸上皮細胞에 작용하는 요인으로는 GH가 소화관에 작용하는데 Lehy et al<sup>26</sup>은 GH가上皮細胞의 증식을 촉진한다고 한 바 있고, Yeh와 Moog<sup>23</sup>는 뇌하수체를 제거한 랫드에서 cortisone, thyroxine 및 GH는 소장음와와 용모의 높이와 유사분열에 영향을 미치지 못하였다고 하였는데 이는 뇌하수체 제거에 의한 여러가지 다른 hormone 기능장애가 작용한 것으로 생각되며, Lobe et al<sup>22</sup>은 GH는 체중을 증가시키며 장의 생리적 기능을 향상시킨다고 하였고, Castillo et al<sup>20</sup>는腸의 성장을 촉진시킨다고 하였으나腸上皮의 유사분열

지표에 대하여서는 조사된 바가 없다.

본 연구에는 GH 투여군은 투여하지 않는 군보다 mouse의 소장 용모상피에서 유사분열의 표지된 細胞帶의 이동에 영향을 미치는 것을 알 수 있었고( $p < 0.01$ ), 제 1, 2군 공히 2시간째는 陰窩에서만 표시된 세포가 존재하며 성장 hormone이 腸上皮세포 분열부위에 변화를 주지 못함을 알 수 있었다.

## 結 論

成長 hormone(Growth hormone, GH)이 腸上皮의 再生週期에 미치는 영향을 조사하기 위하여 마우스에 GH를 투여한 群과 투여하지 않은 群에 각각  $^3\text{H}$ -thymidine를 투여하고 放射線 自記法을 이용하여 小腸絨毛의 기저부에서 첨부까지 100등분으로 높이를 구분하고 분열이 표지된 上皮細胞帶의 분포부위를 측정한 바 다음과 같았다.

1.  $^3\text{H}$ -thymidine만을 투여한 群에서는 제 1일째는 용모기저부 아래의 腸腺陰窩에서만 분포하고 있었고 이후는 용모의 기저부에서 부터 시작하여 최상부까지의 높

이가 제 2일째는  $15.9 \pm 3.6\%$ , 제 3일째는  $49.8 \pm 16.5\%$ , 제 4일째는  $95.3 \pm 6.9\%$  높이까지 점유하였고, 제 5일째는 下部가  $62.9 \pm 16.7\%$ 의 높이에서 시작하여 상부는 용모의 끝까지 점유하고 있었다.

2. GH를 투여한 群에서는 제 1일째는 腸腺陰窩에서만 분포되었고 이후에는 下部는 용모의 기저부에서 부터 시작하여 最上部까지의 높이가 제 2일째는  $39.2 \pm 9.5\%$ , 제 3일째는  $81.5 \pm 18.2\%$ , 제 4일째는 下部가  $45.2 \pm 11.5\%$ 의 높이에서 시작하여 용모의 끝까지, 제 5일째는 下部가 85% 높이에서 시작되기는 하나 소수의 용모에서만 관찰되었다.

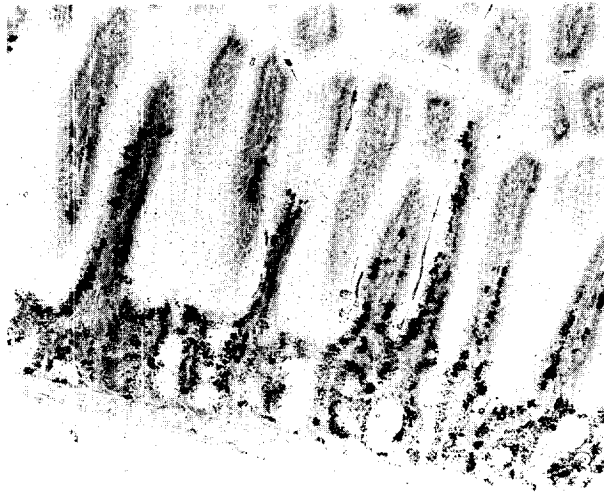
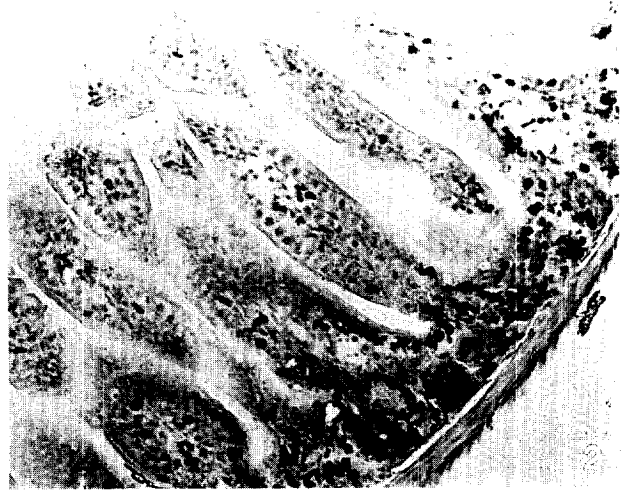
3. GH를 투여한 群은 투여하지 않는 群보다 제 1일째는 위치의 차이가 없었고 제 2일째는 23.3%, 제 3일째는 31.7%까지 上部로 더 이동되었고, 제 4일째는 GH를 투여한 群만이 하부가 45.2% 높이까지 상승되었고, 제 5일째는 두 群의 하부 높이의 차이는 22.1%였다. 이를 보아 GH는 腸上皮 再生과 移動을 촉진시키는 것으로 인정되었다( $p < 0.01$ ).

## Legends for figures

- Fig 1.** The labeled epithelial cells(LEC) were seen at the crypts of the small intestine on 2 hours after  $^3\text{H}$ -TdR injection to mice. Hematoxylin counterstain.  $\times 100$ .
- Fig 2.** LEC were seen at the crypts and low regions of small intestinal villi on 2 days after  $^3\text{H}$ -TdR injection to mice. Hematoxylin counterstain.  $\times 100$ .
- Fig 3.** Mice were injected consecutively with  $^3\text{H}$ -TdR for 2 days and with Somatotropin for 4 days. LEC were seen at the crypts and middle regions of small intestinal villi on 3 days after first injection. Hematoxylin counterstain.  $\times 100$ .
- Fig 4.** LEC (arrows) were seen at all regions of the crypts and villi on 4 days after  $^3\text{H}$ -TdR injection to mice. Hematoxylin counterstain.  $\times 200$ .
- Fig 5.** LEC (arrows) were seen at middle and top regions of small intestinal villi on the 5 days after  $^3\text{H}$ -TdR injection to mice. Hematoxylin counterstain.  $\times 200$ .
- Fig 6.** Mice were injected consecutively with  $^3\text{H}$ -TdR for 2 days and with Somatotropin for 4 days. LEC were seen at top regions of a few villi of small intestine on the 5 days after first injection. Hematoxylin counterstain.  $\times 100$ .

## 參 考 文 獻

1. Altmann GG. Renewal of the intestine epithelium : New aspects as indicated by recent ultrastructural observations. *J Electron Micro Tech* 1990 ; 16 : 2~14.
2. Arsenault P, Menard D. Autoradiographic localization of [ $^3\text{H}$ ] -thymidine incorporation in developing human esophagus. *Anat Rec* 1988 ; 220 : 313~317.
3. Bjercknes M, Cheng H. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse. *Am J Anat* 1981 ; 160 : 51~63.
4. Bjercknes M, Cheng H. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. II. Evidence from Paneth cells in the newborn mouse. *Am J Anat* 1981 ; 160 : 65~75.



5. Bissonnette R, Leblond CP, Lee ER, et al. Radioautographic comparison of RNA synthesis patterns in the epithelium cells of mouse pyloric antrum following  $^3\text{H}$ -uridine and  $^3\text{H}$ -orotic acid injections. *Am J Anat* 1987 ; 180 : 209~225.
6. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelium cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am J Anat* 1974 ; 141 : 461~480.
7. Cheng H. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. IV. Paneth cells. *Am J Anat* 1974 ; 141 : 521~536.
8. Dellmann and Brown. Digestive system in *Textbook of veterinary histology*. 3rd ed. Lea and Febiger. Philadelphia. 1987 ; 29~32, 209~254.
9. Leblond CP. The life history of cells in renewing systems. *Am J Anat* 1981 ; 160 : 113~158.
10. O'connor TM. Cell dynamics in the intestine of the mouse from late fetal life to maturity. *Am J Anat* 1966 ; 118 : 525~536.
11. Tsubouchi S, Kano E, Suzuki H. Dynamic features of duct epithelial cells in the mouse pancreas as shown by radioautography following continuous  $^3\text{H}$ -thymidine infusion. *Anat Rec* 1986 ; 214 : 46~52.
12. Uddin M, Altmann GG, Leblond CP. Radioautographic visualization of difference in the pattern of ( $^3\text{H}$ )uridine and ( $^3\text{H}$ ) orotic acid incorporation into the RNA of migrating columnar cells in the rat small intestine. *J cell Biol* 1984 ; 98 : 1619~1629.
- 13.곽수동. 家畜 및 實驗動物 消化管腺의 構造에 관한 연구, II. 哺乳 mouse 腸粘膜의 細胞 再生週期에 대하여. *대한수의학회지* 1992 ; 32 : 1~6.
14. Thrasheer JD. Age and the cell cycle of the mouse colonic epithelium. *Anat Rec* 1967 ; 157 : 621~626.
15. Assat RT, Dodd DC, et al. Effect of misoprostol. (prostaglandin  $\text{E}_1$  analogue) on epithelial proliferation of canine fundic mucosa. *Gastroenterology* 1985 ; 88 : 1310.
16. Bright-Asare P, Sontag SJ, et al. Efficacy of misoprostol (twice daily dosage) in acute healing of duodenal ulcer. Amulticenter double-blind controlled trial. *Digestive disease and science* 1986 ; 31 : 635~675.
17. Goodlad RA, Madgwick AJ, et al. Effects of misoprostol on cell migration and transit in the dog stomach. *Gastroenterology* 1990 ; 98 : 90~95.
18. Goodlad RA, Madgwick AJ, et al. Prostaglandins and the gastric epithelium : effects of misoprostol on gastric epithelial cell proliferation in the dog. *Gut* 1980 ; 30 : 316~321.
19. Uribe A, Rubion C, Johansson C. Cell kinetics of rat gastrointestinal mucosa. Autoradiographic study after treatment with 15(R)15-methyl- Prostaglandin  $\text{E}_2$ . *Gastroenterology* 1986 ; 21 : 246~252.
20. Castillo AO, Glasscock GF, et al. Pituitary regulation of postnatal small intestinal antigeny in the rat : Differential regulation of digestive hydrolase maturation by thyroxine and growth hormone. *Endocrinology* 1991 ; 129 : 1417~1423.
21. Glasscock GF, et al. Hormonal control of growth in the infant rat. *Endocrinology* 1981 ; 109 : 176~184.
22. Lobie RP, Breipohl W, Waters MJ. Growth hormone receptor expression in the rat gastrointestinal tract. *Endocrinology* 1990 ; 126 : 299~306.
23. Yeh KY, Moog F. Development of the small intestine in the hypophysectomized rat. *Dev Biol* 1975 ; 47 : 173~184.
24. Tielemans Y, Haekanson F, et al. Proliferation of enterochromaffinlike cells in omeprazole-treated hypergastrinemic rats. *Gastroenterology* 96 ; 723~729.
25. Calvert R, Pother P. Migration of fetal intestinal intervillous cells in neonatal mice. *Anat Rec* 1990 ; 227 : 199~206.
26. Lehy T, Accary JP, et al. Growth hormone-releasing factor (somatocinin) stimulates epithelial cell proliferation in the rat digestive tract. *Gastroenterology* 1986 ; 90 : 646~653.