

Adriamycin으로 유발된 생쥐의 간독성에 대한 Squalene의 영향

김 정 상* · 최 영 복 · 김 중 세

*동신대학교 한의과대학 해부학교실, 조선대학교 생물학과

Effect of Squalene on Adriamycin-Induced Cytotoxicity in Mice Liver

Kim Jeong Sang*, Young Bok Choi and Jong Se Kim

*Dept. of Oriental Medicine, Dongshin University

Dept. of Biology, Chosun University

(Received January 18, 1997)

ABSTRACT

The objective of the present study was to investigate the cytotoxicity of adriamycin in liver cells (group A), and the protective effect of squalene to the hepatocytes to which adriamycin-induced cytotoxicity (group B) was examined by transmission electron microscope.

In the group A, The cisternae of rough endoplasmic reitculum and smooth endoplasmic reticulum are dilated/disoriented at 24 hours and 48 hours. The inner and outer membrane of mitochondria are detached or destructed, and attached ribosomes of rough endoplasmic reticulum are diminished in number.

The cisternae of the smooth endoplasmic reticulum are dilated, and the cristae of mitochondria are disrupted at 72 hours and 96 hours.

In the group B, the cisternae of the rough endoplasmic reticulum and smooth endoplasmic resticulum are dilated at 24 hours. The cisternae of the smooth endoplasmic reticulum are dilated at 48 hours. The cell organelles of hepatocytes are recovered from cytotoxicity at 72 hours.

These results suggest that SQ is not only concerned with composition of the membrane system of the cell organelles but also decreased the cytotoxicity of the hepatocytes.

Key words : Adriamycin, Squalene, Hepatocytes

서 론

* 본 논문은 1996년도 세모(주)의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

Squalene (SQ)은 cholesterol 합성과정중 생성되는 데 이중결합의 탄화수소 사슬을 갖고 있기 때문에 불

안정하여 쉽게 산화된다(Saint-Leger 등, 1986). 천연물로는 심해 상어의 간에 가장 많이 함유되어 있으며 동물에서는 주로 간에서 합성되며, 피부, 피하지방 조직, 림프절 및 심장근 등에 다량 포함되어 있다(Liu 등, 1976). Budiarmo(1990)에 의하면 SQ은 6개의 이중결합을 갖고 있어 산소 이온과 쉽게 결합할 수 있기 때문에 유해 산소를 제거 할 수 있다고 하였다. Squalene synthetase(SQS)는 cholesterol 생합성 과정에 관여하는 효소이며, LDL(low density lipoprotein)의 혈중농도를 낮추기 위한 개선제로 사용하기 위하여 연구가 진행되고 있다(McTaggart 등, 1996). Nakamura 등(1996)에 의하면 내인성으로 생산된 sterol은 전사과정중에서 squalene epoxidase의 발현을 조절할 수 있다고 하였다.

Adriamycin(ADM)은 핵산의 합성을 억제하여 세포 증식을 저해하기 때문에 종양 세포의 치료제로 사용하는 항암제이다. 그러나 항암제는 정상 세포에도 독성을 야기시키는 것으로 알려져 있다(Koss, 1967; Kim과 Kim, 1996). 이와 같은 항암제의 독성을 최소화하면서 위암 환자의 고형암 치료 효과를 높이기 위한 치료 방법으로 interferon(IFN)과의 병용요법이나 recombinant human-IFN(rh-IFN)과 동시에 투여한 복합 화학요법으로 치료한 결과 항암제의 치료 효능이 증가하였다고 하였다(Hong 등, 1993). 한편, Park 등(1994)은 위암 환자에게 근치적 위절제술 후 보조적으로 5-fluorouracil(5-FU), ADM과 mitomycin-C(FAM) 복합 화학요법을 시행한 후 그 효과, 재발 양상, 무병 생존 기간과 전체 생존 기간에 미치는 영향을 조사한 바 유의성 있는 효과가 있음을 보고한바 있다.

사람에게 SQ을 투여한 후 흡수 정도와 혈청내 SQ의 농도에 관한 연구(Strandberg 등, 1990), 조혈조직의 높은 방사선 감수성에 따른 적혈구 세포막에서 streol과 SQ함량의 변화에 관한 연구(Palamarchuk, 1990), 흰쥐의 간세포에서 SQ의 합성에 관여하는 세포소기관에 관한 연구보고(Kostas 등, 1993)가 있었으며, Desai 등(1996)에 의하면 종양을 갖고 있는 생쥐에 SQ를 포함하는 화합물인 Roindex를 처치 했을 때 처치군의 33.34%에서 종양 증식이 억제되었다고 하였다.

본 연구자들은 앞선 연구에서 항암제인 cyclophosphamide의 투여에 따른 생쥐 간세포의 파괴 현상과 SQ의 동시 투여에 따른 간세포에 미치는 영향에 관한 연구(Kim과 Kim, 1996) 결과를 보고한 바 있으며, 본 실험에서도 SQ과 항암제의 병용 투여가 항암제에 의한 세포독성의 억제에 미치는 영향을 밝힘으로서 항암제와의 병용 요법을 개발하는데 필요한 기초 자료를 얻고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용한 생쥐는 삼육축산에서 공급한 생후 8~10주령(체중 25~30g) 정도의 ICR계의 음성 생쥐를 사용하였다.

2. 실험군 설정 및 투여 방법

1) 실험군 설정

ADM만 투여한 실험군(A군)과 SQ을 5일간 전처치 한 다음 6일째부터 SQ와 ADM을 동시에 투여한 군(B군)으로 구분하였으며, SQ는 세모(주), ADM은 동아제약회사 제품을 사용하였다.

2) SQ와 ADM 투여

A군은 SQ의 전처치 없이 ADM(2mg/kg)만 복강 투여하였고, B군은 SQ(150mg/kg)을 24시간 간격으로 5일간 전처치 한 후 6일 부터 SQ와 ADM을 복강 투여하였으며, SQ은 도살 직전까지 24시간 간격으로 투여하였다. 투여한 후 24시간, 48시간, 72시간, 96시간 경과 후 각 실험군당 생쥐 5마리의 간 조직을 적출 하였다.

3. 전자현미경 관찰

실험 동물에서 간 조직의 일부를 절취하여 전고정액 속에서 1mm³크기로 세절한 후 2.5% glutaraldehyde(phosphate buffer, pH 7.2)로 2시간 동안 전고정 하였다. 전고정이 끝난 조직은 동일 완충액을 사용 10분 간격으로 3회 세척한 후 1% osmium tetroxide(OsO₄)로 2시간 후 고정 한 다음 동일 완충액으로 3회 세척하였다. 세척후 시료들은 상승농도 순의 에탄

올로 탈수하여 propylene oxide로 치환한 후 Epon-Araldite 혼합액으로 포매 하였고 60°C 오븐에서 30 시간 중합시켰다. 포매된 조직들을 LKB-V형 ultramicrotome을 사용 1 μ m 두께로 절편을 제작하여 1% methylene blue나 1% toluidine blue로 hot plate (60°C)상에서 염색하였다. 염색된 시료를 광학 현미경으로 관찰하여 조직을 확인한 다음 동일한 부위에서 50 nm 두께로 초박절편을 제작하여 cooper grid에 부착하였고, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 다음 JEM 100 CX-II 투과형 전자현미경 (80 KV)으로 관찰하였다.

결 과

24시간 A군은 핵의 핵막은 둥글고 핵질은 비교적 고르게 나타났다. 핵소체는 핵의 중앙에서 뚜렷하게 관찰되었다. 핵의 주변 세포질에서 관찰되는 사립체는 내막과 외막이 대부분 파괴되어 나타날 뿐만 아니라 사립체 기질의 전자밀도가 매우 낮게 관찰되었다. 소수의 사립체에서는 내강이 매우 비대 되었을 뿐만 아니라 사립체들이 대부분 파괴되었고 내강에서 환상형의 구조물들이 관찰되기도 하였다. 과립형질내세망은 간세포에서 전형적으로 관찰되는 층판구조를 형성하지 않았을 뿐만 아니라 수조가 다소 팽대되어 나타났다. 무과립형질내세망은 과립형질내세망과 인접하여 관찰되는데 수조는 매우 팽창되어 나타났다. 과산화소체들은 세포질 전반에 걸쳐 다수 관찰되었다 (Fig. 1). SQ으로 5일간 전처치 한 다음 ADM과 SQ를 동시에 투여한 B군의 핵은 핵막이 매우 불규칙할 뿐만 아니라 핵질이 매우 응축되어 있었고 이질염색질이 핵막 주변부에서 많이 관찰되었다. 과립형질내세망의 수조는 A군에 비하여 매우 팽대되어 관찰되었으나 층판구조를 형성하고 있었다. 사립체들은 과립형질내세망의 주변부에서 다수 관찰되었는데 주로 환상형을 이루고 있었으며 cristae와 기질은 정상적인 소견을 보여 주었다. 무과립형질내세망은 과립형질내세망과 인접하여 있었는데 그 수조는 매우 팽창되어 있었다. 세포질 전반에 걸쳐 관찰되는 과산화소체들은 A군의 것에 비하여 다소 크고 뚜렷하게 관찰되었다 (Fig. 2).

48시간 A군의 핵은 핵질과 염색질이 대부분 파괴되

어 괴사현상을 보여주었다. 세포질 전반에 걸쳐 관찰되는 과립형질내세망은 막성구조들이 대부분 파괴된 양상을 보여주었을 뿐만 아니라 부착리보소체들이 대체로 분리되었고 세포질 전반에 걸쳐 많은 polysome이 집적되어 있었다. 무과립형질내세망은 24시간 군에 비하여 발달이 미약하였다. 세포질 전반에 걸쳐 관찰되는 사립체들은 대부분 그 내강이 팽창되어 있을 뿐만 아니라 내막의 파괴 현상이 뚜렷이 관찰되었다. 소수의 과산화소체들이 존재하였다 (Fig. 3). B군의 핵은 핵막이 다소 불규칙하게 관찰되긴 하였으나 핵질과 염색질은 정상적인 소견을 보여주었다. 세포질 전반에 걸쳐 과립형질내세망이 발달되어 있었으나 24시간 B군과 같은 수조의 팽대현상은 관찰되지 않았다. 핵의 상단부 세포질에서 골지복합체가 관찰되었다. 무과립형질내세망은 그들의 내강이 24시간 군에서 처럼 매우 팽창되어 나타났다. 세포질 전반에 걸쳐 다수 관찰되는 사립체는 다소 전자밀도가 낮게 관찰되지만 막성구조의 파괴현상은 관찰되지 않았다 (Fig. 4).

72시간 A군의 핵은 다소 불규칙한 핵막을 갖고 있으며 염색질은 진전염색질과 이질염색질이 비교적 고루게 나타났다. 핵 주변부에서 관찰되는 과립형질내세망은 전형적인 층판구조를 형성하고 있었으나, 이들과 인접한 세포질에서 관찰되는 무과립형질내세망은 그들의 수조가 매우 팽창되어 나타났다. 사립체들은 역시 다른 군에서 처럼 다수 관찰되었는데 정상적인 소견을 보여준 것과 내강이 매우 비대되고 cristae의 파괴 현상이 뚜렷한 것들이 함께 나타났다 (Fig. 5). B군은 전반적으로 48시간 B군과 유사한 소견을 보여 주었다 (Fig. 6).

96시간 A군의 핵은 핵막이 둥글고 염색질이 고루게 관찰되었다. 과립형질내세망은 세포질 전반에 걸쳐 고루게 발달되어 나타났다. 핵 주변부에서는 발달된 골지복합체가 나타났다. 무과립형질내세망은 매우 발달되어 있었으나 수조의 팽창현상은 관찰되지 않았다. 구형의 사립체들이 세포질 전반에 걸쳐 관찰되는데 cristae의 형태는 다소 불완전하였다. 다수의 과산화소체들이 세포질 전반에 걸쳐 관찰되었다 (Fig. 7). B군의 핵은 정상적인 소견을 보여 주었다. 과립형질내세망은 전형적인 층판구조를 형성하고 있었으며, 무과립형질내세망 또한 매우 발달되어 있었다. 세포질에서는 많

은 전이소낭들이 관찰되었다. 소수의 일차 용해소체와 이차용해소체들이 나타났다. 사립체들은 전반적으로 정상적인 소견을 보여주었다(Fig. 8).

고 찰

Squalene (hexamethyltetracosahexane, C₃₀H₅₀)는 *Centrophorus atromaginus*, garman, spiny dogfish, aezeme와 같은 심해상어 간에서 추출한 기름이다. 심해상어의 서식 환경은 햇빛이 도달하지 않은 깊은 곳에서 서식하기 때문에 산소의 공급이 부족하여 무거운 수압에 견디어야만 한다. 이러한 열악한 환경에서 생존하기에 아주 적합한 간을 가지고 있으며 다량의 SQ를 함유하고 있다. SQ은 카르복실기(-COOH)를 가지고 있지 않기 때문에 기름과는 다르며, 쉽게 산소와 결합할 수 있으며, 산소 분자를 방출할 수 있다. 심장의 작용을 상승시키고, 상처 치유에 효과적이며, 혈관의 확장과 동맥경화 방지 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Budiarso, 1990).

Shinozawa (1996)는 ADM으로 유발된 독성에 대응하여 생체막을 안정시키는 coenzyme Q10 (CoQ), dextran sulfate 및 환원형 glutathione의 방어효과에 대한 연구를 생쥐에서 시행하였는데, CoQ, dextran sulfate, 환원형 glutathione과 함께 ADM을 투여한 생쥐의 실험군이 ADM (15 mg/kg)만 투여한 대조군보다 생존 기간이 훨씬 길었다고 하였다. Storm 등 (1993)에 의하면 쥐의 사료에 2% SQ을 혼합하여 먹이를 섭취한 후 방사선을 조사한 결과 SQ을 섭취하지 않은 대조군에 비하여 생존 기간 훨씬 길었다고 하였다.

Kostas 등(1993)에 의하면 흰쥐는 간세포의 형질내세망에 SQ합성효소가 존재하여 섭취한 사료의 종류에 따라 SQ량을 조절한다고 하였으며, Jacob 등(1995)과 Krisans 등(1994)에 의하면 SQ은 과산화소체에서 합성된다고 하였다. 본 실험에서도 실험군 24시간과 96시간에서 특히 과산화소체들이 증가하여 나타나는 것으로 보아 SQ의 합성에 과산화소체가 관여하는 것으로 사료된다.

Yamanishi 등(1978)과 Tilvis와 Miettinen (1983)에 의하면 혈청 SQ 농도가 급성간염, 만성활동성 간

염 및 간경화 환자에서는 변하지 않았으나 담즙분비 장애 환자에서는 현저하게 감소하였다고 하였다. 또한 항암제인 cycloheximide의 투여가 간 실질세포에서 단백질합성의 억제, 과립형질내세망 층판구조의 손상(disorganization)을 가져왔다고 하였다. Koss (1967), Kim과 Kim(1996)에 의하면 흰쥐에 cyclophosphamide를 복강내 주사한 결과 과립형질내세망의 팽대 현상이 나타났다고 하였다. 본 실험에서도 ADM을 투여한 A군은 투여후 24시간과 48시간 경과 후 간세포의 세포소기관 중 과립형질내세망과 무과립형질내세망의 수조가 매우 팽대되어 나타났으며, 사립체의 내막과 외막의 분리 및 파괴현상이 관찰되었다. 또한 과립형질내세망의 부착리보솜체 탈락현상이 관찰되었다. 72시간과 96시간이 경과한 간세포에서는 과립형질내세망은 층판구조를 형성하고 있었으나 무과립형질내세망의 수조는 매우 팽창되어 있었으며, 사립체 내강의 비대 및 cristae의 파괴가 관찰되었다. 한편 B군은 24시간에서 과립형질내세망 수조의 팽대현상이 관찰되었으나 층판구조를 이루고 있었으며, 무과립형질내세망은 수조가 매우 팽창되어 있었다. 48시간에서는 과립형질내세망 수조의 팽대현상은 관찰되지 않았으나 무과립형질내세망의 수조는 매우 팽대되어 나타나는 것으로 보아 ADM의 독성에 대하여 해독작용의 기전에 관여하는 것으로 사료된다. 72시간에서부터 세포소기관의 손상 정도는 A군에 비하여 경미하였으며, 92시간에서는 정상적인 소견을 보여 주었다. 이와 같은 결과로 보아 SQ은 ADM의 간세포에 대한 세포독성에 보호 작용이나 세포소기관의 막계형성에 관여하는 것으로 사료되지만 앞으로 생화학적인 연구 필요하리라 본다.

결 론

ADM의 투여에 따른 간세포의 세포독성과 ADM으로 유발된 독성에 대한 SQ의 효능을 규명하기 위하여 ADM을 단독 투여한 A군과, SQ으로 전처리 한 다음 ADM과 SQ을 동시 투여한 B군으로 구분하여 실험한 결과를 투과형 전자현미경으로 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

A군은 투여후 24시간과 48시간에서 간세포의 과립

형질내세망과 무과립형질내세망 수조가 팽대되었으며, 과립형질내세망의 부착리보솜체의 수가 현저히 감소하였다. 사립체는 내막과 외막의 분리 및 파괴현상이 나타났다. 72시간과 96시간에서는 무과립형질내세망의 수조가 매우 팽창되었으며, 사립체에서는 내강의 비대 및 cristae 파괴현상이 나타났다.

B군은 24시간에서 과립형질내세망과 무과립형질내세망 팽대현상이 A군에서 처럼 관찰되었다. 48시간에서는 무과립형질내세망이 팽대되었다. 72시간에서부터 간세포는 ADM의 세포독성에서 회복되는 조건을 보여주었으며, 92시간에서는 정상적인 간세포를 관찰할 수 있었다.

이와 같은 결과로 보아 SQ은 ADM의 투여가 간세포에 미치는 세포독성에 대하여 보호 작용이나 세포소기관의 막계형성에 관여하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Budiarso IT, 1990. Fish oil versus olive oil. *The Lancet*, 24, 1313-1314.
- Desai KN, Wei H, Lamartiniere CA, 1996. The preventive and therapeutic potential of the squalene-containing compound, Roindex, on tumor promotion and regression. *Cancer Lett.* 19, 101(1), 93-96.
- Jacob G, Olsson JM, Dallner G, 1995. Estimation of dolichol and cholesterol synthesis in microsome and peroxisomes isolated from rat liver, *FEBS -lett.* 358, 230-232.
- Hong WS, Son YS, Kim CM, Kang YK, Lee CT, Kim YC, Im YH, Nam HS, Lee JO, Kang TW, 1993. Effect of Combination Timing of Recombination Human Interferon- γ and Adriamycin on Cytotoxicity to Human Stomach Cancer Cells. *Korean J. Immunol.* 15, 263-269.
- Kim JS, Kim JS, 1996. Effect of squalene on the rat liver treated with a anticancer agent. *Korean J. Electron Microscopy.* 26(1), 1-9.
- Koss LG, 1967. A light and electron microscopic study of the effects of a single dose of cyclophosphamide on various organs of the rat, *Labort. Invest.* 16, 44-65.
- Kostas DS, Shackelford JE, Shechter I, Jing G, Conrad D, Keller GA, Krisans SK, 1993. Subcellular localization of squalene synthase in rat hepatic cells. *J. Biol. Chem.* 268(17), 12825-12836.
- Krisans, SK, Erixsson J, Edwards PA and Keller GA, 1994. Farnesyl-diphosphate synthase is localized in peroxisome. *J. Biol. Chem.* 269(19), 14165-14169.
- Liu, GCK, Ahrens EH, Jr Sreibman PH, Crouse JR, 1976. Measurement of squalene in human tissues and plasma. *J. Lipid Res.* 17(1), 38-45.
- McTaggart F, Brown GR, Davidson RG, Freeman S, Holdgate GA, Mallion KB, Mirrees DJ, Smith GJ, Ward WH, 1996. Inhibition of squalene synthase of rat liver by novel 3' substituted quinulidines. *Biochem. Pharmacol.* 14, 51(11), 1477-1487.
- Nakamura Y, Sakakibara J, Izumi T, Shibata A, Ono T, 1996. Transcriptional regulation of squalene epoxidase by sterols and inhibitors in HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, 5, 271(14), 8053-8056.
- Palmarchuk VI, 1990. Characteristics of the radiation-induced changes in the content of sterols and squalene on the lymphoid system tissues and erythrocyte of rats, *Radiobiologia.* 30(3), 321-327.
- Park YS, Chang HM, Park KC, Heo DS, Bang YJ, Park JG, Lee KU, Choe KJ Kim ST, Kim NK, 1994. The Postoperative Adjuvant Chemotherapy of Gastric Cancer with 5-Fluorouracil, Adriamycin and Mitomycin-C(FAM). *Journal of Korean cancer Association* 26(6), 853-859.
- Saint-Leger D, Bague A, Cohen E, Chivot M, 1996. A possible role for squalene in the pathogenesis of acne, *British J. of Dermatology*, 114, 535-542.
- Shinozawa S, Kawasake H, Gomita Y, 1996. Effect of Biological membrane stabilizing drugs (coenzyme Q10, dextran sulfate and reduced glutathione) on adriamycin (doxorubicin)-induced toxicity and microsomal lipid peroxidation in

- mice. *Gan. To Kagaku Ryoho*, 23(1), 93-98.
- Storm, HM, Oh SY, Kuner BF, Norton S, 1993. Radioprotection of mice by dietary squalene. *Lipids*, 28(6), 555-559.
- Strandberg TE, Tilvis RS, Miettinen TA, 1990. Metabolic variables of cholesterol during squalene feeding in humans: comparison with cholestyramine treatment. *J. Lipid. Res.*, 31(9), 1637-1643.
- Tilvis RS, Miettinen TA, 1983. Dietary squalene increases tissue sterols and fecal bile acids in the rat. *Lipids*, 18, 32-36.
- Yamanishi A, Ikawa S, Mirayama C, 1978. Serum squalene levels in hepatobiliary disease. *Clinica Chimica Acta.*, 88, 105-110.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** An electron micrograph of two hepatocytes showing a number of swollen mitochondria and dilated smooth endoplasmic reticulum in the 24-hours group A treated with adriamycin. N, nucleus. Bar indicate; arrows indicate destructed membrane of mitochondria 1 μm .
- Fig. 2.** Electron micrograph of the hepatic cells of 24-hours group B treated with squalene and adriamycin. The cisternae of rough (rER) and smooth endoplasmic reticulum (sER) are dilated. Bar indicate 1 μm .
- Fig. 3.** Electron micrograph of the hepatocytes of 48-hours group A treated with adriamycin. The inner cavity mitochondria matrix of the mitochondria (M) are swelling, and rough endoplasmic reticulum are disorientation. N, nucleus. Bar indicate 1 μm .
- Fig. 4.** Electron micrograph of the hepatocytes of 48-hours group B treated with squalene and adriamycin. G, Golgi complex; N, nucleus. Bar indicate 1 μm .
- Fig. 5.** Electron micrograph of the hepatocytes of 72-hours group A treated with adriamycin. Electron micrograph showing the destruction of the mitochondrial membrane (arrows), and the dilated smooth endoplasmic reticulum (sER). N, nucleus. Bar indicate 1 μm .
- Fig. 6.** Electron micrograph of the hepatocyte of 72-hours group B treated with squalene and adriamycin. The cisterane of smooth endoplasmic reticulum are dilated. M, mitochondria. Bar indicate 1 μm .
- Fig. 7.** Electron micrograph of the hepatocytes of 96-hours group A treated with adriamycin. Electron micrograp showing two hepatocytes, a number of dilated mitochondria (M) and polysome (P) are observed. G, Golgi complex. Bar indicate 1 μm .
- Fig. 8.** Electron micrograph of the hepatocytes of 96-hours group B treated with squalene and adriamycin. Ly, lysosomes; rER, rough endoplasmic reticulum; sER, smooth endoplasmic reticulum. Bar indicate 1 μm .







