

위축된 흰쥐의 소장 점막의 회복에 미치는 Nucleosides와 Nucleotide 혼합물의 효과

이 선 영

충남대학교 식품영양학과

Effects of Nucleosides and a Nucleotide Mixture on Intestinal Mucosal Repair in Rats

Ly, Sun Yung

Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

ABSTRACT

This study was performed to determine whether the infusion of nucleosides and a nucleotide mixture directly into intestinal lumen can induce a regenerative effect on impaired intestinal mucosa. The effects of massive small bowel resection and also total parenteral nutrition were induced by surgical creation of Thiry-Vella fistula in male Sprague-Dawley rats. The rats received saline solution(Control group) or nucleosides and a nucleotide mixture(lower concentration group(Nuc1) or higher concentration group(Nuc2)) every two days into the fistula. Mucosal protein, DNA, ornithine decarboxylase(ODC) activity, and morphometry were evaluated at 9 or 21 days postoperation in the fistula and also in the residual ileal segment. On the 9th day, mucosal protein, DNA content, and villous surface area in the fistula and also in the residual ileum increased in rats that received nucleosides and a nucleotide mixture of lower concentration(Nuc 1). On the 21th day, there were no significant differences in intestinal mucosa between the control group and the lower level nucleoside nucleotide mixture-treated group. The fistula villous height of the higher nucleosides and a nucleotide mixture group was higher than in the control rats. Fistula mucosal ODC activities were not significantly different between groups although the mucosal ODC activity of the residual ileal segment was increased on the 9th day. Our data suggests that this animal model is suitable for studying the effect of dietary factors on intestinal mucosal growth and regeneration after villous atrophy, differentiating direct effects of diet on the intestine from systemic effects. It is also suggested that external nucleosides and nucleotides have supportive effects on intestinal mucosal regeneration. (*Korean J Nutrition* 31(4) : 679~686, 1998)

KEY WORDS : Intestinal mucosal regeneration · Nucleosides and a nucleotide mixture · Thiry-Vella fistula.

서 론

소장 음모의 정상적인 형태의 유지는 소장 내강에서 내용물을 소화시키는 소화효소를 분비하는 기능과 소화된 영양소를 흡수하는 기능에 필수적이다. 그러나 사람의 경우 나이가 들어 각 기능들이 퇴화되면서 여러 가지 장질환들이 빈번해지고 그에 따라 수술이나 약물 치료 및 다른 장기의 부전으로 인하여 소장의 소화, 흡수 기능이 퇴화되므로 소장점막의 활성을 유도하는 방법에 대해 여러 각도로 연구하게 되었고 아울러 이 생리적 기전을 밝히고자 하는 연구도 활발하다. 이러한 연구의 필요성은 단지 노화나 소장점막의 위축을 유발하는 질병으로부터의 회복에만 있는 것이 아니라 인체의 어느 기관의 세포보다 빠른 turnover rate를 가지고 있어 정상적인 형태와 활성을 유지하기 위해서는 세포의 성장과 증식에 필수적인 에너지와 영양성분이 지속적으로 공급되어야 하는 장의 건강 유지에도 있다고 볼 수 있다.

소장 점막의 빠른 분열과 증식 과정에서 에너지원으로 사용될 수 있는 영양소로는 glucose와 glutamine, glycine, valine 등의 아미노산과 짧은 사슬의 지방산, 섬유질, 핵염기의 유도체들 등이 알려져 있으며¹⁻⁸⁾ 그 중 특히 glutamine의 효과는 거의 입증되어 있다. Glutamine의 보충은 약제나 방사선 조사, 완전경관급식(total parenteral nutrition, TPN) 등으로 인하여 스트레스를 받아 위축된 소장점막에 회복 효과를 보여주었는데 작용기전상에서 보면 glutamine은 장세포의 가장 중요한 호흡연료인 중성의 아미노산으로서 에너지원이 될 뿐 아니라 핵산의 신생합성에 필요한 질소의 급원으로 알려져 있다⁹⁾.

그러나 glutamine의 경우와는 달리 직접적인 소장 세포의 연료가 되는 핵산 자체의 효과에 대해서는 아직까지 일관성 있는 결과들이 도출되고 있지 않으며 연구 보고도 많지 않은 실정이다. 식이내 포함되어 있는 핵산은 정상 소장점막 세포에서 흡수되어 세포의 성장에 이용되는 율이 비교적 적은 영양소이나 장점막이 위축되어 있을 때는 조금 다른 대사 기전을 갖게 된다. 즉, 장점막 위축시 대개는 신생합성 기전이 저하되어 있으며 그에 대한 보상으로 기존의 purine이나 pyrimidine 염기를 이용하여 핵산을 합성해내는 회수경로(salvage pathway)에 관여하는 효소가 활성화되고 그에 따라 점막세포내 purine과 pyrimidine의 pool은 감소되며 식이로부터의 nucleotides나 핵산염기를 흡수하여 회수경로에 이용하는 비율이 높아질 것으로 보

고 되고있다^{10,11)}.

본 연구실에서는 서로 다른 기전에 의해 소장점막세포의 재생과 증식에 도움을 주는 아미노산들(glycine과 glutamine)과 nucleosides와 nucleotide혼합물의 효과에 대하여 검토한 바 있다¹²⁾. 여기서 glycine이나 glutamine보다는 nucleosides와 nucleotide혼합물이 손상된 소장점막의 회복에 일관성 있는 효과를 보여주었으므로 본 연구에서는 nucleosides와 nucleotide혼합물의 투여 기간 및 dose에 따른 효과의 지속 정도를 보고자 하였으며 또한 소장점막세포의 성장 및 증식의 지표가 될 수 있는 ornithine decarboxylase(ODC)의 효소활성을 검토한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험설계 및 실험동물의 처리

Sprague-Dawley종의 흰쥐 수컷, 성체를 택하여 Thiry-Vella fistula를 시술하여 소장 점막의 위축을 유도한 후 누공에 직접 nucleosides와 nucleotide혼합물을 주입하여 각각 9일째와 21일째에 소장점막에 가해지는 효과를 비교 검토하였다. 우선 nucleosides와 nucleotide혼합물의 효과를 탐색하기 위하여 실시하였던 실험에서는 수술 후 9일째에 동물을 희생하였으며 nucleosides와 nucleotide혼합물의 농도는 한 가지로 하여 실험하였다. 그 후 여기서 얻은 결과를 토대로 nucleosides와 nucleotide혼합물을 더 오랜 기간 투여했을 때의 효과와 투여하는 nucleosides와 nucleotide혼합물의 농도에 따른 효과를 살펴보고자 앞서 사용하였던 농도의 용액과 그 두 배의 농도들을 갖는 nucleosides와 nucleotide혼합물 용액을 사용하여 21일간 투여하여 nucleosides와 nucleotide혼합물의 효과를 관찰하였다.

위와 같이 실험이 2회에 걸쳐 실시되었으므로 두 실험에서 쓰였던 흰쥐들의 초기 체중에는 다소 차이가 있었다. 소장의 대량 절제 효과와 함께 누공을 만든 부분에 대해서 비경구 영양시 볼 수 있는 장관내 변화를 실험적으로 얻을 수 있게 하는 Thiry-Vella fistula의 시술은 전보¹²⁾에 기술하였던 방법으로 하였다. 이러한 누공시술은 효과를 보고자하는 물질을 직접 소장관의 누공내로 투여하여 이 물질들의 소장 점막에 대한 직접적인 효과와 함께 흡수된 후 혈행을 통해 누공외의 소장 부분에 미치는 간접적인 영향을 관찰할 수 있게 해준다¹³⁾. 이것은 ligament of Treitz에서 5cm되는 부분과 그 이하에서 회·맹장까지 길이의 1/2되는 부분에서 절제한 공장 부분을 복부의 피부에 연결하여 외부와 통하

는 누공을 만들고 나머지 십이지장과 회장의 상부를 문합하여 일반 식이는 십이지장에서 회장으로 배출되며 누공은 식이와의 접촉을 피하도록 고안된 실험모델이다.

Thiry-Vella fistula시술후 24시간 동안은 물만 공급하고 이후 일반 사료로 자유 급식시켰으며 대조군과 실험군들에게는 수술 후 2일째부터 시작하여 2일에 한 번씩 0.9% NaCl용액(Cont군)과 nucleosides와 nucleotide혼합물들(Nuc군)을 십이지장 쪽 누공에 4ml 씩 투여하였다. Nucleosides와 nucleotide혼합물의 농도는 일본에서 정맥주사용으로 시판되고 있는 OG-VI (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc. Tokushima, Japan)에 준하였는데 이 제제는 여러 가지 병변이 있을 때 핵산의 회수 경로에 관여하는 효소의 활성이 낮아져 체내 핵산의 pool이 낮아지는 것을 보충해 주기 위해 쓰였던 것으로 이보다 10배 정도 낮은 농도 범위에서 정하였다.

본보에서 쓰였던 nucleosides와 nucleotide혼합물의 농도는 두가지로서 낮은 농도의 용액(Nuc 1군 용)은 0.75mg/ml guanosine-5'-monophosphate, 0.5mg/ml inosine, 0.5mg/ml cytidine, 0.5mg/ml uridine로, 높은 농도의 용액(Nuc 2군용)은 각각의 nucleosides와 nucleotide를 두 배의 농도로 하여 투여직전에 생리적 식염수에 녹여 제조하였고 37℃로 온도를 맞춘 후 누공에 주입하였다.

2. 시료수집

수술 후 9일째와 21일째에 쥐들을 희생하여 누공을 이루었던 공장 부분과 회장부분을 취하여 누공의 상부와 회장의 상부에서 조직 검사에 쓸 부분을 채취하고 그 이하부분에서 각각 같은 순서로 일정길이의 검체를 취하여 단백질과 DNA 및 ODC활성의 측정용 검체로 사용하였다.

3. 조직검사

소장의 각 부분을 약 1cm 정도의 길이를 갖게 2회 취하여 10% buffered formaline 용액내에서 고정시키고 파라핀에 함입시켰다. Microtome을 이용하여 환상과 종주상의 검체를 3~4회 취하여 slide에 놓고 hematoxylin과 eosin(H & E)으로 염색한 후 광학 현미경($\times 100$)하에서 관찰하였다.

검체에서 용모의 길이, 넓이, crypt depth의 측정은 동일 배율로 찍은 사진 상에서 하였으며 실험의 내용을 알지 못하는 사람이 한 동물의 환상 검체에서 10개의 용모와 crypt를 선정하여 용모의 길이와 넓이, crypt의

깊이를 재고 이 값을 실제의 길이로 환산하였다. 용모의 길이와 crypt의 깊이는 6마리 개체의 검체에서 얻은 값들의 평균치로 나타내었고 용모의 표면적은 원기둥의 표면적을 계산하는 식인 $2\pi rh$ (r은 용모 넓이의 1/2, h는 용모의 길이)를 이용하여 계산하였으며 용모의 넓이는 용모의 길이에 따라 상, 중, 하단의 세 군데 값을 측정하여 그 평균치를 사용하였다.⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾

4. 생화학적 분석

장막을 포함한 소장의 전 조직은 15000rpm에서 30초간 Polytron으로 균질화한 후 초음파 파쇄하여 단백질과 DNA 측정에 사용하였다. 소장의 단백질 함량은 Bradford법을 기초로 한 방법⁽¹⁶⁾에 의하여 제조된 Bio-Rad사의 시약을 사용하여 측정하였다.

소장의 DNA 함량은 균질화한 조직액을 0℃의 0.5N perchloric acid(PCA)와 100℃의 PCA에 각각 incubation시켜 얻은 핵산 추출용액에서 Giles과 Meyer⁽¹⁷⁾에 의해 보완된 Burton의 방법⁽¹⁸⁾에 따라 측정하였다.

ODC는 소장 용모 세포의 성장에 관여하는 mucosal polyamines의 생합성을 유도하는 최중적 효소이다. 이 효소의 측정은 Tabata 와 Johnson⁽¹⁹⁾에 의해 보고된 논문의 방법을 일부 수정하여 실시하였으며 간략하면 50 μ M pyridoxal phosphate, 0.1mM EDTA, 0.1mM ornithine을 함유한 50mM sodium-phosphate buffer(pH 7.2)에서 소장의 점막을 균질화한 후 초음파 파쇄하여 30000g에서 30분간 원심 분리시키고 상층액을 분리하여 분석시까지 냉동 보관하였다가 효소활성과 단백질 측정에 사용하였다. ODC 효소 활성은 25ml 삼각 플라스크에 200 μ l의 효소균질액을 ¹⁴C-Ornithine, 0.1mM Ornithine을 함유하는 800 μ l의 buffer에 넣어 37℃에서 30분간 배양하여 방출된 ¹⁴CO₂를 플라스크의 가운데에 plastic center well을 이용하여 띄운 filter paper에 흡착시켰다. Filter paper는 1.5 \times 2.5cm로 잘라 부채꼴로 접은 것을 2-aminoethanol과 ethylene glycol monomethyl ether의 1:2 혼합액 300 μ l에 적서 center well에 넣고 사용하였다. 30분 후 5% TCA를 400 μ l씩 넣어 효소의 활성을 억제하고 45분 더 방치하여 용기 내에 발생되어있는 CO₂를 충분히 흡착시킨 후 center well을 scintillation vial에 넣어 4~5시간 방치 후에 scintillation counter에서 동위원소 량을 측정하였다. Sample blank로는 3분간 끓는 물에서 열처리하여 변성시킨 조직 균질액을 동량 사용하여 측정된 값을 이용하였다.

5. 통계처리

모든 실험 결과는 각 군마다 6개의 측정치에 평균치와 표준오차로 표시하였으며 실험군에 따른 각 분석치들의 평균의 차이에 대한 유의성 검증은 one-way ANOVA test를 하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성이 있다고 판정된 분석치에 한하여 다중 검증법의 하나인 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계처리하였다. 두 군간의 비교는 Student's t-test를 이용하여 평균치의 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 체중변화

수술 후 체중의 증가는 수술 직후 감소하였다가 수술 후 2일째부터 차차 회복되기 시작하였으며 회복 속도는 매우 느렸다(Table 1). 체중의 회복이 느렸던 이유는 흡수 부위가 상당 부분 절제되었고 누공 부분에 충분한 열량원이 공급되지 못하였으며 수술로 인한 stress 등이었던 것으로 보인다.

2. 소장 점막의 단백질 및 DNA 함량

수술 후 누공 점막의 단백질 함량은 대조군이나 nucleosides와 nucleotide 혼합물을 투여한 군에서 모두 21일 후의 결과가 9일후의 결과보다 증가된 것으로 나타났으며 회장 점막의 단백질 함량은 초기에 급증하였다가 시간이 지남에 따라 감소되는 것을 볼 수 있었다. 소장의 대량 절제는 절제 수술 후 빠른 시간내에 남은 장에서 점막의 증식을 유도하는데 이 것은 흡수 부위의 절대적인 감소를 보상하려는 적응 현상으로 볼 수 있다.

Klimberg 등²⁾은 소장 절제 후 남은 장 점막의 증식은 수술 후 며칠내에 시작되어 1주일 후에 최대 속도에 이르며 2주 후에는 그 속도가 감소되었다고 하였는데 본보에서는 십이지장과 연결되어 있던 회장 점막에서 대량 소장절제에서 볼 수 있었던 것과 같은 점막의 증식 현상을 보여주었다. 한편, 누공 부분은 수술 후 심한 위축 증세를 보였는데 시간이 지남에 따라 조금씩 회복되어 3주 후에는 단백질 함량이 초기에 비해 증가된 것으로 나타났다.

Stringel과 Uauy¹³⁾가 어린 흰쥐의 상부 공장에 5cm 정도의 누공을 시술하였을 때는 형태적인 변화가 크게 나타나지 않았던 점을 고려할 때 Thiry-Vella fistula의 점막의 형태나 기능상 저하 정도는 누공의 길이가 길어질수록 심하게 나타나고 따라서 누공 점막의 회복 속도나 과성장 변화는 소장 절제의 정도나 수술 후 누공 부분에 자극원의 유무등에 의해 달라지는 것으로 보

Table 1. Body weight changes for 21 days after surgery

Group ¹⁾	9 days		21 days	
	initial	final	initial	final
CONT	239.6±5.0 ²⁾	239.1±4.6	295.7± 8.9	306.0±8.4
NUC 1	246.4±4.0	240.7±8.1	300.0± 3.6	311.4±6.3
NUC 2	—	—	328.3±11.9	318.8±9.6

- 1) CONT : control group,
Nuc 1 : group which received a nucleosides and a nucleotide mixture in lower concentration
Nuc 2 : group which received a nucleosides and a nucleotide mixture in higher concentration
- 2) Values are mean±SEM of 6 rats per group

Table 2. Protein contents of Thiry-Vella fistula and ileum after 9 and 21 days of infusion(mg protein/cm intestine)

Group	9 days		21 days	
	fistula	ileum	fistula	ileum
CONT	1.44±0.13 ¹⁾	6.84±0.78	3.10±0.30 ²⁾	4.46±0.41
NUC 1	2.57±0.30 ^{**23)}	9.19±0.62*	3.87±0.41 ^{a)}	5.00±0.69
NUC 2	—	—	5.35±0.33 ^{b)}	5.95±0.42

- 1) Values are mean±SEM of 6 rats per group
- 2) Values with different superscripts in the same column are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test
- 3) * $p < 0.05$, ** $p < 0.025$ as compared with control

인다. 위와 같은 결과에서 이 실험 모델은 기대했던 두 가지 효과, 즉, 소장의 대량 절제 효과와 TPN에 따른 장관내 변화를 동시에 잘 나타내 줌을 알 수 있었다.

수술 후 소장 점막의 단백질 함량은 수술 시점에서 9일이 경과하였을 때 누공과 누공을 이루지 않았던 회장 부분에서 모두 nucleosides와 nucleotide 혼합물을 투여한 군(Nuc1군)이 유의하게 높았다. 그러나 21일후의 결과에서는 같은 nucleosides와 nucleotide의 농도에서는 그 효과가 거의 사라졌으며 단지 좀 더 농도가 높았던 nucleosides와 nucleotide 혼합물을 투여한 군(Nuc2군)에서만 점막의 단백질 함량이 증가되었고 그 효과도 누공 부분으로 제한되었다. 이 경우 회장 점막의 단백질 함량에서도 농도에 따라 nucleosides와 nucleotide 혼합물 투여군에서 비례적으로 증가하는 경향을 보여주기는 하였으나 통계적인 유의성을 갖지는 못하였다(Table 2).

위의 결과에서 누공 부분의 점막이 증식됨은 수술 후 누공으로 주입된 핵산이 직접적으로 작용하여 나타난 결과이나 회장 부분은 누공과 분리되어 십이지장에 연결되어 있었으므로 대조군이나 비교군에서 동일하게 일반 사료와의 접촉만 있었을 뿐 nucleosides와 nucleotide 혼합물의 직접적인 효과는 없었다. 그럼에도 불구하고 수술 후 9일째 nucleosides와 nucleotide 혼합물

Table 3. DNA contents of Thiry-Vella fistula and ileum after 9 and 21 days of infusion(μg DNA/cm intestine)

Group	9 days		21 days	
	fistula	ileum	fistula	ileum
CONT	290.7 \pm 22.6 ¹⁾	732.9 \pm 34.0	192.9 \pm 11.2	354.6 \pm 14.3 ²⁾
NUC 1	394.2 \pm 24.8 ³⁾	919.0 \pm 60.8*	171.6 \pm 7.5	377.4 \pm 31.4 ^{ab}
NUC 2	—	—	201.4 \pm 9.7	469.4 \pm 39.4 ^b

- 1) Values are mean \pm SEM of 6 rats per group
- 2) Values with different superscripts in the same column are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test
- 3) * $p < 0.05$ as compared with control

을 투여받은 군의 회장 점막의 단백질 함량이 대조군에 비해 높은 것으로 나타난 이유는 누공의 점막을 통해 흡수된 nucleosides와 nucleotide들이 소장 점막의 형태에 영향을 미칠 수 있는 호르몬들의 분비를 유도하여 혈행을 통해 누공 이외의 부분에 영향을 미친 것이라 볼 수 있다.

이러한 호르몬으로는 장점막의 단백질 및 DNA와 RNA를 증가시키는 것으로 보고되어있던 gastrin²⁰⁾과 위장관에서 DNA합성을 유도하는 것으로 보고되었던 glucagon²¹⁾, somatostatin²²⁾, epidermal growth factor²³⁾, 그외에 갑상선 절제나 거세된 경우 소장 crypt세포의 성숙부진이 나타나는 것으로 미루어 보아 thyroxine, testosterone등의 효과가 거론되고 있는데²⁴⁾ 본 연구의 결과에서도 외인성 nucleosides와 nucleotide혼합물 역시 소장관내에서 이러한 류의 호르몬을 분비하게 하여 직접 접촉이 없었던 회장의 장점막 세포의 활성화에 영향을 주었던 것으로 보인다.

소장의 DNA함량은 수술 후 9일째에는 소장 단백질 함량에서와 같이 유의적으로 누공이나 회장에서 모두 nucleosides와 nucleotide혼합물을 투여받은 군이 높은 것으로 나타났으나 21일 후에는 높은 농도의 nucleosides와 nucleotide혼합물을 투여받은 군의 회장 점막에서의 DNA함량만 증가하였고 다른 결과에서는 두 군간에 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 9일 후의 실험 결과와 21일 후의 실험 결과를 비교하여 보았을 때 누공이나 회장의 전역에서 DNA함량은 감소되는 것을 볼 수 있었고 감소폭은 회장에 비해 누공에서 더욱 크게 나타났다(Table 3).

Luk와 Baylin²⁵⁾은 공장 절제 후에 흰쥐의 소장 점막 증식 과정을 검토한 연구에서 소장 점막의 DNA함량은 7일째 최고의 수준을 유지하였다고 보고하였는데 본보의 결과에서 보면 nucleosides와 nucleotide혼합물을 투여받은 쥐의 회장 점막 뿐만 아니라 누공 부분에서도 비슷한 결과를 보여주는 것을 알 수 있었다. 그러나 본

보에서 수행하였던 실험과 가장 비슷한 실험 방법을 이용하여 연구하였던 Frankel 등²⁶⁾은 다른 개체의 소장을 흰쥐의 복부에 이식하여 누공을 만들고 이 누공을 통하여 glutamine용액을 지속적으로 주입한 후 소장 점막의 형태와 기능을 관찰한 연구보고에서 수술 후 14일째에 용모의 길이, 표면적등이 증가하였고 단백질 함량도 증가하는 경향을 보였으나 DNA 함량의 증가는 변화가 없어 점막 세포의 표면적 변화는 세포의 수적 증가가 아니라 각 세포의 크기가 증가한데 기인하는 것 같다고 하였다.

그러므로 본보의 9일째 결과에서 nucleosides와 nucleotide혼합물의 투여에 의해 누공내 소장 점막 단백질과 DNA함량이 함께 증가했던 것으로 보아 nucleosides와 nucleotide혼합물의 위축된 소장점막에 대한 작용 기전은 glutamine과는 다소 차이가 있는 것으로 사료되며 nucleosides와 nucleotide혼합물은 점막 세포의 수에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 보였다.

3. 소장 조직의 변화

소장 점막의 단백질과 DNA함량의 변화에서 나타난 결과가 소장 조직에서 어떻게 반영되었는지 알아보고자 하여 조직의 절편을 염색하고 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 1에서와 같이 나타났다.

조직의 절편을 slide glass에 놓고 H & E 염색하여 현미경으로 관찰한 결과는 한 개체 내에서도 용모의 길이와 넓이에 차이가 많았으며 단순히 사진을 제시함으로서 비교하기 어려운 한 환상 검체에서 무작위로 10개의 용모를 선택하여 그 크기나 crypt 깊이를 재고 각각의 값을 평균값으로 나타내었다. 결과는 수술 후 9일째에는 누공의 용모의 길이와 표면적이 유의적으로 증가한 것으로 보아 흡수 부위가 넓어진 것으로 나타났으며 crypt의 깊이는 유의한 차이를 볼 수 없었다. 회장 점막의 용모의 길이와 crypt 깊이에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 용모의 표면적은 증가한 것으로 나타났다.

그러나 21일 후에 관찰하여 보았을 때는 각 군간의 차이가 축소되어 Nuc2군의 누공 부분의 용모의 길이와 crypt 깊이, 회장 부분의 crypt 깊이와 용모 표면적이 소폭으로 증가한 경향을 보였을 뿐 유의적인 차이를 보여주지는 못하였다.

본 연구의 9일째 실험 결과는 소장 대량 절제 후 TPN을 공급하였을 때 nucleosides와 nucleotide혼합물의 보충 투여가 장 점막의 단백질과 DNA 함량 또한 용모의 길이를 증가시켰다는 보고²⁷⁾나 어린 쥐에게 대량의 유당을 공급하여 만성 설사를 유발시킨 후 식이에

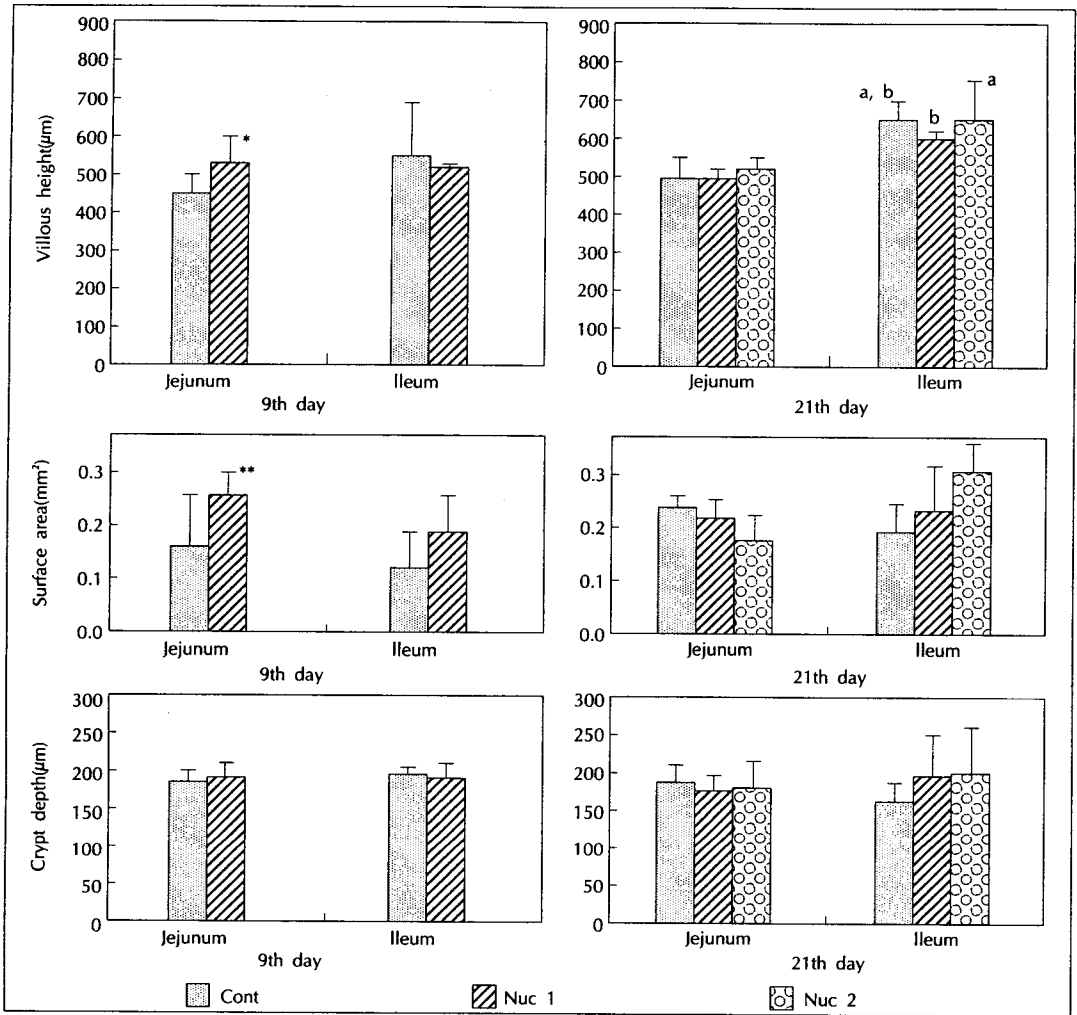


Fig. 1. Effects of infusion of nucleosides and a nucleotide mixture for 9 and 21 days into the Thiry-Vella fistula on villous height, villous surface area and crypt depth. Significantly different by the Student's t-test at * $p < 0.05$, ** $p < 0.025$. Bar with different letter are significantly different at $p < 0.05$.

nucleosides와 nucleotide혼합물을 보충해 주었을 때 점막의 단백질과 DNA나 용모의 길이가 증가하였다는 연구 보고²⁶⁾와 일치하는 것이었다. 그러나 수술 후 21일이 지나서는 장점막의 형태에 대한 nucleosides와 nucleotide혼합물의 효과가 감소되는 것으로 나타났다.

한편, 본 실험에서와 마찬가지로 위의 두 연구에서도 nucleosides와 nucleotide혼합물이 장 점막의 crypt의 깊이는 유의적으로 변화시키지 못하였다고 하여 crypt cell의 turnover에 대한 좀 더 자세한 연구의 필요성을 느낄 수 있었다.

4. 소장 점막의 ODC활성

소장 점막의 증식과 관련된 사항으로 점막에서의 ODC의 활성을 측정해 본 결과 9일 후의 소장 점막

Table 4. Ornithine decarboxylase activity of Thiry-Vella fistula and ileum mucosa after 9 and 21 days of infusion($\text{pmol}^{14}\text{CO}_2$ liberated/mg protein/h)

	9 days		21 days	
	fistula	ileum	fistula	ileum
CONT	34.87 ± 3.44 ¹⁾	42.79 ± 3.26	13.25 ± 1.50	15.87 ± 0.72
NUC 1	33.42 ± 3.26	63.51 ± 9.89 ²⁾	9.43 ± 1.32	24.21 ± 2.02
NUC 2	—	—	5.44 ± 0.31	11.25 ± 1.88

¹⁾ Values are mean ± SEM of 6 rats per group

²⁾ * $p < 0.05$ as compared with control

ODC의 활성에 비해 21일 후의 소장 점막 ODC의 활성은 많이 저하된 것으로 나타났다(Table 4). 그리고 9일 후의 결과에서는 nucleosides와 nucleotide혼합물을 투여 받은 군의 회장 점막에서만 ODC 활성이 증가한 것으로 나타나 앞에서 나타났던 소장 단백질과

DNA나 점막 형태의 변화에 대한 결과를 크게 뒷받침해 주지는 못하였다.

이에 대한 이유로는 ODC 활성이 유도되는 시기가 비교적 빠르기 때문에 수술 후 9일째에는 nucleosides와 nucleotide혼합물의 효과를 발휘할 수 있는 유용한 지표가 되지 못할 것이라 짐을 들 수 있다. 소장 점막의 변화를 나타낼 수 있는 지수들의 시간에 따른 변화를 보기 위해 Luk와 Baylin²⁵⁾은 공장 절제 후의 흰쥐의 소장 점막 증식에 대하여 살펴보았는데 DNA내로 ³H-thymidine incorporation과 crypt cell production rate(CCPR)는 수술 후 2일째에 가장 크게 증가하였다가 7일째에는 약 50% 정도 감소하였으며 점막의 DNA함량은 7일째까지 계속 증가하였고 소장 점막내 polyamine의 함량은 polyamine의 종류에 따라 증가폭의 차이는 있으나 수술 후 2일째에 가장 크게 나타나는 것으로 보고하였다.

실험의 결과로부터 Luk와 Baylin²⁵⁾은 소장 점막에 자극 원이 가해진 후 소장 점막의 증식에 이르기까지는 약 5일의 시간이 필요로 된다고 발표하였다. 이러한 결과는 Wang 등²⁹⁾이 선모충(旋毛蟲, *Trichinella spiralis*)으로 감염시킨 흰쥐의 소장 각 부분에서 점막의 증식을 관찰한 연구결과에서도 볼 수 있었는데 특히 공장에서는 ODC활성이 감염 후 7일째에 최대 값을 보였고 14일째까지 효과가 지속되었으며 경우에 따라 각 단계에서 걸리는 시간의 차이는 있으나 그 과정은 ODC효소의 활성 유도와 polyamine의 합성, 핵산의 합성, 단백질 합성, 소장점막의 구조 변화라는 일관된 과정을 따르는 것으로 보여진다.

본 연구에서는 수술 후 9일째와 21일째에만 소장 점막을 관찰하였으므로 위의 다른 연구에서와 같이 정확하게 단계별 과정을 모두 볼 수는 없었으나 대체로 같은 과정을 거치는 것으로 생각되며 따라서 연구 결과 중 특히 ODC의 활성의 측정은 수술 후 좀 더 빠른 시기에 행해졌어야만 그 변화가 더 잘 나타났을 것임을 추측할 수 있었다. 그러나 본 연구에서 택한 nucleosides/nucleotide mixture의 투여 방법은 지속적이지 못하였고 2일 한 번 정도이었으므로 더 이상의 빠른 회복은 투여 물질의 효과를 볼 수 없을 것이라 사료되어 첫 시기를 9일 제로 하였다.

한편, 본보에서 사용되었던 nucleosides와 nucleotide혼합물의 농도는 Iijima 등³⁰⁾의 논문에서 TPN제제에 보충 급여하였을 때 썼던 것 보다 약 1/10에 해당하는 낮은 농도이었음에도 불구하고 소장 점막의 증식에 유의적인 효과를 보였으므로 소장 점막의 위축을 방지하고자 TPN제제에 보충 투여하는 OG-VI와 같은 제

제는 그 핵산의 농도를 좀 더 낮추어도 좋을 것이라 짐을 제시하고자 한다.

결 론

소장의 대량 절제 효과와 함께 비경구 영양시 볼 수 있는 장관내의 변화를 갖는 실험 모델로서 Thiry-Vella fistula를 수컷의 흰쥐에 시술하고 누공을 통하여 nucleosides와 nucleotide의 혼합물을 단독 투여하여 소장 점막의 증식 효과가 있는지 살펴보았다. 소장 점막의 증식을 알아보기 위해서는 단백질 함량, DNA 함량, ODC활성과 함께 형태학적인 관찰을 하였다.

핵산은 수술 후 9일째에 누공 점막과 누공을 이루지 않았던 회장 부분의 DNA함량과 단백질 함량을 증가시켰으며 소장 용모의 흡수 면적을 증가시켰다. 수술 후 21일째에는 9일 실험에서 사용하였던 핵산의 농도에서 소장점막의 증식 효과는 많이 감소되었고 핵산의 농도가 더 높았던 경우에만 누공 부분에서 용모의 길이, crypt 깊이, 회장 부분의 crypt깊이와 용모의 표면적을 소폭으로 증가시키는 경향을 보여주었다. ODC활성은 수술 후 9일째가 21일째 보다 높게 나타났으며 군간의 차이는 9일째의 회장 점막에서만 증가되는 것으로 나타났다.

이상의 결과로부터 본 실험에 이용되었던 실험 모델은 소장 점막에 다른 식이 성분이나 장관의 자극에 의한 호르몬의 영향을 배제한 상황에서 투여 물질만이 소장 점막에 미치는 효과를 보고자하는 연구에서 이용될 수 있으며 소장관내로 직접 주입된 핵산이 위축된 소장의 점막의 형태를 회복시키는데 효과가 있음을 알 수 있었다.

Literature cited

- 1) O'Dwyer ST, Smith RJ, Hwang TL, Wilmore DW. Maintenance of small bowel mucosa with glutamine-enriched parenteral nutrition. *JPEN* 13 : 579-585, 1989
- 2) Klimberg VS, Souba WW, Salloum RM, Holley DT, Hautamaki RD, Dolson DJ, Copeland EM. Intestinal glutamine Metabolism after massive small bowel resection. *Am J Surg* 159 : 27-32, 1990
- 3) Jiang ZM, Wang LJ, Qi Y, Liu TH, Qiu MR, Yang NF, Wilmore DW. Comparison of parenteral nutrition supplemented with L-glutamine or glutamine dipeptides. *JPEN* 17 : 134-141, 1993
- 4) Bierhoff ML, Levine GM. Luminal and metabolic regulation of jejunal amino acid absorption in the rats. *Gas-*

- troenterology* 95 : 63-68, 1988
- 5) Koruda MJ, Rolandelli RH, Bliss DZ, Hastings J, Rombeau JL, Sattle RG. Parenteral nutrition supplemented with short-chain fatty acids : effects on the small bowel mucosa in normal rats. *Am J Clin Nutr* 51 : 685-689, 1990
 - 6) Kripke SA, Fox AD, Berman JH. Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short chain fatty acids. *JPEN* 13. 109-116, 1989
 - 7) Jacobs LR. Effects of dietary fiber on mucosal growth and cell proliferation in the small intestine of the rat : a comparison of oat, bran, pectin and guar with total fiber deprivation. *Am J Clin Nutr* 37 : 954-960, 1983
 - 8) Tutton PJ, Barkla DH. Further studies on the effect of adenosine cyclic monophosphate derivatives on cell proliferation in jejunal crypts of rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 9 : 671-674, 1982
 - 9) Windmueller HG. *Glutamine utilization by the small intestine. Adv Enzymol* 53 : 209-237, 1982
 - 10) Sonoda T, Tatibana M. Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice. *Biochim Biophys Acta* 521 : 55-66, 1978
 - 11) LeLeiko NS, Bronstein AD, Baliga S. De novo purine nucleotide synthesis in the rats small and large intestine : Effect of dietary protein and purine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2 : 313-319, 1983
 - 12) Ly SY, Oh HI. Effects of glutamine, glycine and nucleosides/nucleotide mixture on intestinal mucosal growth in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26 : 130-136, 1997
 - 13) Stringel G, Uauy R. A model to study the direct effect of diet on early intestinal growth and maturation using Thiry-Vella loops. *J Pediatr Surgery* 23 : 80-83, 1988
 - 14) Seidel ER. Hormonal regulation of postprandial induction of gastro-intestinal ornithine decarboxylase activity. *Am J Physiol* 251(4 Pt1) : G460-466, 1986
 - 15) Shrader RE, Ferlatte MI. Early postnatal development of the intestine in progeny of protein-deprived rats. *Biol Neonat* 31 : 181-198, 1977
 - 16) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72 : 248-254, 1976
 - 17) Giles KW, Myers A. An improved diphenylalanine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 206 : 93, 1965
 - 18) Burton K. A study of conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 62 : 315-323, 1965
 - 19) Tabata K, Johnson LR. Ornithine decarboxylase and mucosal growth in response to feeding. *Am J Physiol* 251 : G 270-G275, 1986
 - 20) Johnson LR. The trophic action of gastrointestinal hormones. *Gastroenterology* 70 : 278-284, 1976
 - 21) Johnson LR. New aspects of the trophic actions of gastrointestinal hormones. *Gastroenterology* 72 : 788-792, 1977
 - 22) Konturek SJ, Radecki T, Brzozowski T, Piastucki I, Dembinski A, Dembinska-Kiec A, Zmuda A, Gryglewski R, Gregory H. Gastric cytoprotection by epidermal growth factor. *Gastroenterology* 81 : 438-443, 1981
 - 23) Johnson LR, Guthrie PD. Stimulation of rat oxyntic gland mucosal growth by epidermal growth factor. *Am J Physiol* 238(Gastrointest. Liver Physiol.1) : G45-G49, 1980
 - 24) Carriere RM. The influence of thyroid and testicular hormones on the epithelium of crypts of Lieberkuhn in the rat's intestine. *Anat Rec* 156 : 423-428, 1966
 - 25) Luk GD, Baylin SB. Inhibition of intestinal epithelial DNA synthesis and adaptive hyperplasia after jejunectomy in the rat by suppression of polyamine biosynthesis. *J Clin Invest* 74 : 698-704, 1984
 - 26) Frankel WL, Zhang W, Afonso J, Klurfeld DM, Don SH, Laitin E, Daeton D, Furth EE, Piarta GG, Naji A, Rombeau JL. Glutamine enhancement of structure and function in transplanted small intestine in the rat. *JPEN* 17 : 47-54, 1993
 - 27) Lijima S, Tsujinaka T, Kishibuchi M, Kido Y, Ebisui C, Kan K, Yano M, Mori T. A total parenteral nutrition solution supplemented with a nucleoside and nucleotide mixture sustains intestinal integrity, but does not stimulate intestinal function after massive bowel resection in rats. *J Nutr* 126 : 589-595, 1996
 - 28) Nunez MC, Ayudarte MV, Morales D, Suarez MD, Gil A. Effects of dietary nucleotides on intestinal repair in rats with experimental chronic diarrhea. *JPEN* 14 : 598-604, 1990
 - 29) Wang JY, Johnson LR, Tsai YH, Castro GA. Mucosal ornithine decarboxylase, polyamines, and hyperplasia in infected intestine. *Am J Physiol* 260 : G45-51, 1991
 - 30) Iijima S, Tsujinaka T, Kido Y, Hayashida Y, Ishida H, Homma T, Yokoyama H, Mori T. Intravenous administration of nucleosides and a nucleotide mixture diminishes intestinal mucosal atrophy induced by total parenteral nutrition. *JPEN* 117 : 265-270, 1993