

## Cis-Platin이 흰쥐 난관의 섬모형성에 미치는 영향에 대한 면역조직학적 및 면역도금법에 의한 전자현미경적 연구

김진국, 김원규, 백두진, 정호삼\*  
한양대학교 의과대학 해부학교실, 의과학연구소

### Immunohistochemical and Immunogold Electron Microscopic Studies on Effects of Cis-platin on the Ciliogenesis of Rat Oviducts

Jin-Kook Kim, Won Kyu Kim, Doo Jin Paik and Ho Sam Chung\*

Dept. of Anatomy, Institute of Biomedical Science, Hanyang University, Seoul, 133-791, Korea

(Received December 1, 1999)

#### ABSTRACT

Cis-platin is a widely used anticancer drug against certain solid tumors such as malignant ovarian tumor, malignant carcinoma of head and neck, bladder cancer and cervical cancer of uterus, and its major mechanism of action is inhibition of DNA synthesis of the tumor cell.

To investigate the inhibitory effects of cis-platin on the ciliogenesis of the ciliated cells in the mucosa of oviduct, the author pursued the alterations of  $\alpha$ -tubulin, which is the main constituent of the microtubules in cilia, after cis-platin treatment.

To eliminate the possible variations due to ovarian cycle, female Spargue-Dawley rats (150~200 gm in B.W.) were pretreated with estradiol benzoate (20 mg/kg, once a day, for 4 consecutive days). Animals were administrated with cis-platin (6 mg/kg, i.p.) and sacrificed at 1day, 3days, 5days and 7days after treatment, respectively. Immunohistochemistry for  $\alpha$ -tubulin using mouse anti-rat  $\alpha$ -tubulin monoclonal antibody as primary antibody was done. Immunogold electronmicroscopy for intracellular distributions of  $\alpha$ -tubulin was also performed with same primary antibody and Goat anti-mouse IgM which is preconjugged with gold particles of 15 nm as secondary antibody.

The results obtained were as follows;

1. Strong immunoreactivity of  $\alpha$ -tubulin was observed in ciliated cells of oviducts at 1, 3 and 5 days after estradiol pretreatment.
2. Weak immunoreactivity of  $\alpha$ -tubulin was observed in ciliated cells of oviducts at 1 and 3 days after cis-platin treatment but it was recovered to strong immunoreactivity in 5 days
3. In immunogold electronmicroscopy, density of gold particles for  $\alpha$ -tubulin reactions was decreased in apical cytoplasm, but few changes were observed in basal body or cilia at 1 and 3 days after cis-platin

\*Correspondence and reprint request should be addressed to Dr. Ho Sam Chung, Department of Anatomy, Hanyang University, Sungdong-Ku, Seoul 133-791, Korea.

treatment.

From these above results, it is indicated that synthesis of  $\alpha$ -tubulin in ciliated cells of rat oviduct is inhibited by cis-platin treatment.

**Key words** : Ciliogenesis, Cis-platin, Immunogold, Oviducts

## 서 론

cis-Dichlorodiammineplatinum (cis-platin)은 백금 원소에 염소기와 암모니아기가 수평면의 cis-위치에 결합되어 있는 금속화합물이다. Rosenberg (1975)와 Choie et al. (1980)은 cis-platin은 인체의 충실성 종양 (solid tumor)에 상당한 항암효과가 있음을 보고했으며 정소의 배아성종양, 악성난소종양, 두경부의 악성 상피종양, 방광암, 갑상선암, 신경아세포종, 골육종 및 자궁경부암에 효과가 있다고 보고했다. Roberts & Pascoe (1972), Hawkins et al. (1996)은 HeLa cell에 cis-platin을 투여하여 cis-platin의 세포내 작용기전을 추기한 결과 cis-platin은 세포내에서 DNA의 complementary strand와 crosslink되어 DNA 합성을 억제한다고 했으며, Mansy et al. (1973)과 Rosenberg (1972)에 의하면 cis-platin은 세포내에서 DNA의 이중나선구조와 결합하여 DNA의 성상을 변화시켜 DNA 합성을 억제한다고 했고 Plooy et al. (1984)은 cis-platin은 동물의 체세포내로 주입되면 가수분해되어 DNA, RNA 및 단백질과 결합되어 DNA 합성을 억제한다고 하였다.

이 (1996)는 기관, 난관 등의 섬모세포에서 섬모형성의 기작을 종합적으로 기술한 바 있다. 섬모와 기저체 (basal body) 및 중심소체 (centriole)의 기본구조인 미세소관은 각  $\alpha$ 와  $\beta$ 폴리펩타이드가 결합하여 안정된  $\alpha$ - $\beta$ 이합체를 형성한 후, tubulin 이합체는 중합하여 고리구조가 되며 고리구조가 풀려서 된 선상의 원섬유가 측면 배열하여 소관 (tube)이 형성된다. 이관이 성장하여 말리게 되고 13개 원섬유로 둘러싸여 있는 닫혀진 미세소관을 형성하며 원섬유의 끝에 tubulin 이합체가 더 첨가되어 계속 신장하게 된다고 하였다. 섬모형성과정은 tubulin이 Golgi에서 형성되어 전중심체 (procentriole)로 형성되어 기저체를 거쳐

섬모로 되는 과정이 있고 또 중심소체를 거쳐 기저체에서 섬모형성이 되는 2가지 방식이 있다고 하였다. 섬모의 구조는 미세소관과 미세소관 결속 단백질 (microtubule associated protein, MAP)이 얽혀서 되어 있으며 미세소관이 가장자리로 9개 중심에 2개가 구성되어 섬모를 형성한다고 하였다. Wade & Chrétien (1993)은 미세소관은  $\alpha$ 와  $\beta$  tubulin으로 이루어진 tubulin heterodimer로 assembly와 disassembly를 통하여서 균형 (dynamic equilibrium)을 유지한다고 하였고 deBrubander (1986)은 미세소관은 유사분열억제 약제에 민감하여 그 구조가 매우 불안정해진다고 보고했으며 Kopf-Maier et al. (1992)은 cis-platin은 microtubule과 microfilament를 변형시키고 핵에 근접하여 cap-like structure를 형성한다고 보고했으며 Christen et al. (1993)은 cis-platin은 비정상 tubulin의 형성과 관련이 있다고 했다. 또 Boekelheide et al. (1992)은 cis-platin은 미세소관의 disassembly dynamics에 변화를 초래하여 그 결과로 peripheral neuropathy를 유발시킨다고 하였으며 Burris et al. (1995)은 docetaxel과 cis-platin을 병용투여한 결과 튜블린해축 (tubulin depolymerization)을 억제하여 미세소관다발을 형성한다고 보고했으며 Wall & Wani (1995)와 Jekunen (1994)은 taxol과 cis-platin을 병용투여한 결과 taxol은 tubulin에 결합하고 cis-platin은 복제과정에서 DNA에 손상을 입혀 유사분열 억제를 가져온다고 보고했고 또 Forastiere (1993)은 paclitaxel과 cis-platin을 병용해서 두경부암 환자에게 적용한 결과 미세소관 구축 (microtubule assembly)을 촉진시키고 중합체를 안정 시킨다고 보고하였다.

이상과 같이 tubulin합성과 섬모형성과정에서 cis-platin은 어떤 결과를 초래할 것인지에 대한 연구결과가 아직 미진하여 본 연구자는 cis-platin이 섬모형성의 중간과정에 미치는 영향을 흰쥐의 난관섬모세포에서 면역조직염색법과 면역도금법을 이용한 면역

전자현미경법을 이용하여 형태적으로 증명하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본실험에 사용된 실험동물은 청정동물실에서 사육한 체중 150~200 gm의 건강한 흰쥐 암컷(Sprague-Dawley strain)을 사용하였다. 체중 200 gm 정도의 건강한 흰쥐를 실험군으로 분류하고, 정상대조군에 10마리를 배정하였다. 실험동물의 발정주기(estrous cycle)를 일정하게 유지하여 난관내 섬모세포의 성장과 증식을 촉진시키고 세포내 단백질합성을 지속시키기 위해 매일 estradiol benzoate (삼일제약)을 투여한 흰쥐를 estradiol 투여군으로 분류하고 estradiol benzoate 투여후 희생한 시간에 따라 5군으로 분류하여 각군에 5마리의 흰쥐를 배정하였다. 실험동물에 estradiol benzoate를 4일간 투여한 후 cis-platin을 6 mg/kg로 복강내 1회 주사하고 희생한 동물을 cis-platin 투여군으로 분류하고 cis-platin 투여군은 희생한 시간에 따라 5개의 소군으로 다시 분류하였으며 각군에 5마리의 실험동물을 배정하였다.

### 2. 실험방법

Estradiol benzoate 투여는 흰쥐 체중 kg당 20 µg을 매일 1회, 4일간 근육주사했고, cis-platin은 4일간 매일 estradiol benzoate를 이미 투여한 흰쥐에 주사하였다. 이상과 같이 약제 투여후 1일, 3일, 5일 및 7일 후에 희생하고 난관의 팽대부를 절취하였다. 면역염색을 위하여 0.1% glutaldehyde-4% paraformaldehyde 혼합용액으로 고정된 후, 4°C paraformaldehyde 용액에서 4시간동안 후고정하였고 25% sucrose-PBS 용액에서 조직이 완전히 가라앉을 때까지 침적하였다.

이어서 동결절편기로 14 µm의 두께로 세절하였고, 절편은 부유법으로 24 well culture plate에서 PBS 용액으로 15분간 세척후 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-methanol 혼합액으로 30분간 반응시켰으며 PBS 용액과 3% goat serum을 첨가한 PBS 용액으로 각각 15분간 세척했다. Mouse anti-rat α-tubulin monoclonal antibody (SIGMA Co.)를 1:1000으로 희석하여 24시간 동안 실온에서 반응시킨 후 PBS 및 PBS-B 용액으로 각각 15분씩

세척하였고, PBS-B 용액으로 희석한 biotinylated Goat anti-mouse IgM을 2차 항체로 30분간 반응시킨 후 PBS 및 PBS-B 용액으로 각 15분간 세척하였으며 ABC (avidin-biotin complex) kit로 1시간 반응시키고 PBS 용액으로 세척하였다.

발색제로는 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 용액을 사용하였으며 사용직전 0.03%의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 5분간 반응시키고 PBS 용액으로 세척한 후 acidic alcohol로 세척한 slide에 옮겨서 24시간 이상 실온에서 건조시키고 탈수, 청명후 per-mount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

면역도금법에 의한 전자현미경적 관찰을 위하여 각군의 난관조직을 4% parafor-maldehyde-0.5% glutaldehyde-3% sucrose solution에 실온에서 고정한다 음, 탈수과정을 거친후 LR White로 포매후 열중합을 거쳐 완성된 block을 초박절편기 (ultramicrotome)로 800 nm의 두께로 ultrathin section하였다. 1차 항체로는 mouse anti-rat α-tubulin monoclonal antibody를 사용했으며 2차 항체로는 직경 15 nm의 금입자 (gold particle)가 결속된 goat anti-mouse IgM을 사용하여 면역반응 시킨 후 2% uranyl acetate로 2분간 단일 염색하고 H-600형 투과전자현미경 (가속전압 80 kv)으로 관찰하였다. 1차 항체의 특이성을 검증하기 위해서 일부조직은 1차 항체없이 2차 항체만을 사용하여 반응시키고 동일한 염색을 시행한 후 관찰하였다.

## 결 과

### 1. Tubulin 면역반응 염색조건

#### 1) Estradiol 투여군

Estradiol benzoate를 4일간 투여한 후 24시간 경과된 흰쥐의 난관팽대부에서 tubulin 면역반응은 상피의 일부 세포층에서 강한 반응이 관찰되었으나 대부분 상피세포는 중등도의 반응을 나타내었다 (Fig. E1). Estradiol 투여후 3일 경과군과 5일 경과군에서 흰쥐 난관 팽대부 난관상피의 tubulin 면역반응은 비교적 강한 반응을 나타내었으며 특히 표면세포의 침부에서 강한 반응이 관찰되었다 (Fig. 1. E3, E5). Estradiol 투여 7일군의 난관상피세포의 tubulin반응은 일부 강한 반응이 있었으나 대부분 중등도의 반응을 나타내

었다(Fig. 1. E7).

## 2) Cis-platin 투여군

Cis-platin 투여후 24시간이 경과된 흰쥐 난관의 섬모세포에서 tubulin의 면역반응은 대부분 약한 반응을 보였으나 일부 중등도의 반응도 나타내었다(Fig. EC1). Cisplatin 투여 3일군에서는 난관상피 전역에 중등도의 tubulin 면역반응이 관찰되었으며 2차~3차로 점막 주름의 분지를 이룬 상피는 약한 반응을 보였다(Fig. 1. EC3). Cis-platin 투여 5일 경과군의 난관상피에서 tubulin 면역반응은 강하게 비교적 넓은 지역에 나타났었다(Fig. 1. EC5). Cis-platin 투여 7일 경과군의 난관상피에서 tubulin 면역반응은 중등도로 고르게 나타났었다(Fig. 1. EC7).

## 2. Tubulin 면역반응에 대한 면역전자현미경적 소견

1차 항체의 반응없이 금과립을 결속시킨 2차 항체로만 반응시킨 정상대조군의 흰쥐 난관 팽대부에서 섬모세포의 섬모, 기저체, 첨부세포질(apical cytoplasm) 및 세포내 소기관에 금과립이 관찰되지 않았다(Fig. 2). 정상대조군의 흰쥐난관 섬모상피세포에서는 기저체, 섬모 및 첨부세포질에 소수(+)의 금과립이 관찰되었다(Fig. 3). Estradiol 투여 제 1일군의 흰쥐 난관섬모세포에서 기저체, 섬모세포질내 금과립은 다량(+++) 관찰되었으나 cis-platin 투여 제 1일군의 흰쥐 난관 섬모세포에서는 기저체 및 섬모에서는 다량(+++) 관찰되었지만 세포질에서는 소량(+)의 금과립이 세포질내 소기관 사이에 분포되어 있었다(Figs. 4, 5). Estradiol 투여 제 3일군에서는 섬모세포의 기저체, 섬모 등과 세포질에 다수(+++)의 금과립이 분포되어 있었다(Fig. 6). Cis-platin 투여 제 3일군에서는 난관섬모세포의 세포질에는 금과립이 소수(+)만이 관찰되고 기저체와 섬모에는 다량(+++)의 금과립이 분포되어 있었다(Fig. 7). Estradiol 투여 제 5일군과 cisplatin 투여 제 5일군의 난관상피세포에서는 세포질, 기저체 및 섬모에 다량(+++)의 금과립이 관찰되었다(Figs. 8, 9). Estradiol 투여 제 7일군과 cis-platin 투여 제 7일군의 난관 섬모세포에서는 세포질에는 소량(+)의 금과립이 분포되지만 기저체 및 섬

모에서는 다량(+++)의 금과립이 관찰되었다(Figs. 10, 11).

## 고 찰

흰쥐의 난관은 깔대기(infundibulum), 팽대부(ampulla), 잘록부(isthmus) 및 자궁부분(intramusal part) 등 4부분으로 나누어져 있고 난관 각부분은 섬모원주상피로 구성되어 있으며 섬모원주상피는 섬모상피세포, 분비세포, Peg 세포 및 기저세포들로 구성되어 있으며(Beck, 1970; Beck, 1972), 사람의 난관에서 난관상피세포의 배열은 생식주기에 따라 다른 구성형태를 나타낸다고 알려져 있다. Schultka(1963)는 사람의 난관에서 난포시기(follicular stage)에는 섬모세포가 다수 관찰되고 황체시기(luteal stage)에는 분비세포가 다수 상피를 차지한다고 주장한다. Brenner(1969)는 원숭이의 월경주기에 따라 난관의 섬모변화를 관찰한 결과 난소절제를 한 경우 난관상피가 현저하게 위축되었고 상피세포의 섬모는 완전히 소실되었으나 estrogen을 투여한 후에는 섬모가 완전히 회복되었다고 하였다. Laucier et al.(1983)은 메추리에서의 난관세포의 증식에 대한 estrogen 영향을 밝히기 위해 estradiol-17 $\beta$ 를 이용한 실험 결과 세포의 증식과 세포특이적(cell-type specific) 단백질합성을 일으킨다고 주장했다. Donnez et al.(1985)은 사람의 월경주기에서는 난관의 섬모세포의 섬모형성은 배란기에 가장 높았고, fimbria에 가장 많이 나타났으며 무섬모현상은 progesterone 투여때 관찰되었고 또 상피의 높이의 감소는 배란후나 progesterone 투여시에 나타났으며, estrogen은 난관상피의 유사분열을 촉진시켰고 내인성 progesterone과 progestogens는 estrogen의 효과를 감소시킨다고 주장했다. Abe & Oikawa(1992)는 신생 golden hamster의 난관상피세포의 분화과정에서 estradiol과 progesterone의 영향을 기술한 바 있다. 매일 estradiol-17 $\beta$ 를 주사하면 신생난관의 미분화상피세포에 여러 가지 미세구조적 변화가 야기되었다고 하였다. Estradiol을 처리한 1~4일간에는 섬모형성으로 섬모삭(ciliary buds) 등이 몇 개 형성되는 등 섬모형성이 빈번히 관찰되고 제 2일과 제 3일에는 다른

세포에서 Golgi complex와 조면내형질세망이 발달되고 세포질내 분비과립이 다소 많이 관찰되는 분비세포의 분화가 구분되었다고 밝혔다. Estradiol은 난관상피세포중에서 섬모세포와 분비세포의 분화를 촉진시킨다고 주장했다. 그러나 progesterone을 동일하게 처리한 결과 섬모세포는 분화가 증진되는 것을 볼 수 있으나 분비세포(secretory cells)는 전혀 분화가 되지 않았다고 했다.

이상과 같이 포유동물의 난관상피세포는 월경주기에 따라 형태적 변화가 일어나며 섬모세포는 증식기에 다수 나타나며 난소호르몬인 estrogen에 의해 섬모형성이 증진된다는 것이 밝혀졌으며 따라서 배란주기에 따른 섬모에 대한 연구는 배란전기에 행하여져야 된다고 생각되었다.

난관의 섬모세포에서 섬모와 섬모운동에 대한 연구는 1970년대에서부터 현재에 이르기까지 수정, 불임 및 난관의 질병과 관련하여 많은 학자들에 의해 연구대상이 되어 왔다.

Staprans & Dirksen (1974)는 mouse의 난관의 섬모형성과정의 tubulin (microtubule protein)에 관한 연구에서 mouse 난관조직의 균질분획(homogenate fractions)을 만들어 tubulin을 분석하는 방법으로 중심소체 형성과 섬모형성의 마지막 단계까지 tubulin을 정량 분석한 결과 중심소체 전구체 구조는 3~5일 사이에 tubulin형성이 왕성하고 중심소체가 구축되는 시기에 최고조에 달한다고 하였다. 생체내 실험과 tubulin에서 미세소관의 중합(polymerization)에 대한 연구는 뇌의 tubulin (Borisy & Olmsted, 1972), 성게알(sea urchin eggs) (Rafe et al., 1971), Chlamydomonas (Rosenbaum et al., 1969), Tetrahymena (Tamura, 1971) 등에 의하여 이루어져 왔고, tubulin과 섬모에 대한 형성기전이 동일하다고 연구되어 있으며, tubulin의 자가구축(self assembly) 과정도 비슷하다고 주장했다.

Dirksen & Staprans (1975)는 mouse의 난관섬모세포내 tubulin은 출생 제 3 일째 90%, 출생 제 5 일째에 75%가 새로이 중합 형성된다고 하였다. 생체내 실험과 배양실험에서 tubulin pools가 난관에 있지만 이것들은 항상 새로이 합성된 단백질에 의해서 새로 채워진다고 주장했다. 그리고 tubulin은 용액과 과립형

태에서 기저체와 섬모와 같은 구조로 급속하게 변형된다고 주장했다. 새로운 tubulin 합성은 전자현미경적 자기방사법으로 확인되었고 중심체전구체, 기저체 등에 더욱 많이 나타났다고 하였다.

Sandoz et al. (1988)과 Lemullois et al. (1988)은 중심소체형성과 섬모형성은 섬모세포의 극성화(polarization)와 함께 시작되고 섬모형성은 세포골격의 형태에 의해서 영향을 받게 된다고 했으며 그러나 기저체의 세포내이동에 대한 기전은 아직 정립되어 있지 않았다고 했다. 기저체와 세포골격과의 관계, 즉 기저체와 미세소관의 상호 역할에 대하여 Boisvieux-Ulrich et al. (1989)이 Taxol을 이용한 실험과 미세소관의 억제제인 colchicine과 nocodazole을 이용한 실험에서 기저체는 세포골격을 경유하여 생성된다고 암시하였고 Klotz et al. (1986)과 Lemullois et al. (1987)이 myosin이 기저체의 이동통로에 분포된다는 주장으로 섬모형성에 참여한다고 주장했다. Boisvieux-Ulrich et al. (1990)은 cytochalasin D (CD)가 메추리의 난관 상피세포에서 기저체의 이동과 섬모의 길이 성장을 억제한다고 주장했다. 이들은 메추리의 난관상피세포에서 섬모의 분화를 투과 및 주사전자현미경을 이용해서 연구하였다. 미성숙 메추리는 estradiol benzoate를 투여하여 미분화된 난관에서 섬모형성을 유도하였으며 이때 CD를 투여한 섬모세포에서는 섬모형성이 정지되었고 타세포의 미세소용소가 사라졌다고 하였고, CD에 의해서 중심소체 형성은 억제되지 않았으나 CD 투여 24시간에 행위에 기저체가 구축되었다고 하였으며, 그러나 섬모세포의 첨부(apical surface)로 기저체의 이동은 없었다고 하였다. 섬모의 길이성장도 균형을 잃었고 짧은 섬모가 비정상적으로 나타나고, 섬모의 끝이 팽대되고 미세소관은 정확하게 형성되지 않았다고 보고하였다. Hagiwara et al. (1992)은 정상적인 월경주기동안에 섬모형성과정을 사람의 난관상피에서 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 중심소체경로와 비중심체 경로 등 두가지 경로가 기저체의 DNA복제(replication)에서 거의 인정된다고 했다. 중심체 방법은 세포질내 이미 존재해 있는 diplosomes에 의해서 전중심소체에 의해서 섬모형성이 되는 난관세포에서는 소역할(minor role)에 의하는 것이고, 비중심소체 방법에 의한 섬모형성은 제일 먼저

Golgi체와 ribosome과 결속하여 섬유성과립이 먼저 형성되고 이 섬유성과립의 응집체에서 deuterosomes가 생기며 여기에서 미세소관 포함한 전중심소체가 형성되어 deuterosomes를 동반한 새로 형성된 중심소체가 첨부세포질로 이동하여 여기서 섬모주기(ciliary shaft)가 난관표면에서 난관 lumen으로 뻗어나가게 된다 주장했다. 섬유성과립과 마찬가지로 deuterosomes가 기저체의 세근(rootlet)형성과 관계가 있다고 하였다. 기저체의 복사와 섬모줄기가 난관으로 빠치는 것은 월경주기의 증식기에 일어나고 분비기에 섬모형성을 일으키는 섬유성과립이 소수 섬모세포에서 관찰된다고 하였다.

Cis-platin이 생체내 섬모의 형성과 성장등에 억제적으로 작용한다는 보고는 흔치 않지만 그 기작이 확실히 밝혀져 있지 않은 상태에서 1900년대에 이르러 소수의 보고가 있다.

Mount et al. (1995)은 제 2세대 platinum analog인 carboplatin (cis-Diammine-1, 1-cyclobutane dicarboxylate platinum II)은 와우유모세포 (cochlear hair cell)에 독성으로 작용한다고 하였으며 이때 감각세포 섬모(sensory cell cilia)가 팽대릉(crista)과 난형낭(utricle)에서 박리되거나 이상 형태를 초래한다고 하였다. 이때 손상의 형태는 aminoglycosides와 cis-platin을 포함한 귀독성물질로 발생한 것과 비슷하다고 하였다. Nakayama (1992)는 cis-platin은 내이(inner ear)에 유독물질이며 cis-platin 치료로 인하여 와우 손상과 청각장애가 있음을 보고하였다. Guinea pig에 체중 kg당 5~10mg을 복강내로 투여한 결과 즉각 병적변화가 일어났는데 팽대부(ampullae)의 중간부위에 섬모의 파괴와 난형낭의 섬모가 형태 이상을 일으킨 것이 주사전자현미경으로 관찰되었고 지지세포의 박리도 관찰되었다고 하였으며 이러한 결과는 cis-platin이 세포내 단백질 대사에 관련된 세포내 소기관의 파괴와 효소 및 핵산의 파괴가 원인이 된다고 암시했다. Jekunen et al. (1994)은 tubulin의 중합촉진제인 taxol과 cis-platin을 사람의 난소암에 동시에 투여했을 때 약제간 협력치료 효과가 있으며 특히 세포분열의 정지에 taxol과 함께 cis-platin도 영향력이 있다고 암시했다. Christen et al. (1993)은 사람의 난소암세포(cis-platin-sensitive carcinoma)에서

forskolin과 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)은 cis-platin의 축적을 증진시킨다고 하였다. 이때 cis-platin의 축적은 protein kinase에 의해서 조절된다고 하였고, 미세소관(microtubule) 안정제인 Taxol의 전처치는 cis-platin 축적을 유도한다고 하였다. 이로써 tubulin의 약리적인 변화는 cis-platin의 축적을 결과적으로 증진시킨다고 주장했다. Boekelheide et al. (1992)은 cis-platin은 말초신경조직병변을 유발시키는 매우 높은 효율의 화학요법제로 알려져 있으며 cis-platin의 독성이 미세소관의 변성과의 관련이 있다고 주장했다. 체중 300 gm의 흰쥐에 매 2일에 2 mg/kg의 cis-platin을 복강내로 주사하고 마지막 주사한 날 흰쥐를 희생하여 고환조직에서 tubulin을 정량한 결과 정상 흰쥐에서 보다 cis-platin 투여 흰쥐에서 미세소관 disassembly의 최대치가 일관되게 느리게 일어났다고 하였다. 그러나 cis-platin과 중합된 bovine brain tubulin을 in vitro에서 혼합 배양시켜 하루밤을 지난후 tubulin의 assembly와 disassembly의 cycle이 형태적으로 정상적 형성이 가능했으며, 미세소관이 짧아졌다고 했다(control 3.7  $\mu$ m, cisplatin-treated 2.5  $\mu$ m). 이러한 결과는 미세소관 disassembly의 변화에 cis-platin이 작용하고 cis-platin에 의한 미세소관의 비정상은 말초신경조직병변을 유도한다고 하였다. Kopf et al. (1992)은 cis-platin이 세포골격의 구조적 성분에 미치는 영향을 위와 폐장의 편평상피암세포를 대상으로 in vitro에서  $\alpha$ -tubulin을 단클론항체를 이용하여 면역형광법으로 관찰한 바 cis-platin의 영향으로 거미줄 모양으로 세포질전역에 분포된 세포골격소관(cytoskeletal tubule)이 핵주위에 압축되거나 응고되어 있고 나선형으로 배열된 띠를 이루었다고 하였다. 그러나 cis-platin 투여후 24시간이 경과하면 일부가 회복된다고 하였다. 이러한 현상은 cis-platin이 단순히 DNA에만 손상을 주어 단백질합성이 억제되므로써 항암 작용을 일으키는 것이 아니고 세포질내 세포소기관의 구조적 변태에도 영향을 미쳐 간접적인 항암작용을 한다고 주장했다.

이상과 같이 난관의 섬모세포에서 섬모형성에 대한 연구는 불임과 난관의 질병과 연관하여 많은 학자들에 의해 연구되어 왔다.

본 실험에서 흰쥐의 난관섬모세포의 섬모형성을

일관되게 유지하기 위해 estradiol benzoate를 매일 투여하여 4일간 계속한 것은 흰쥐의 발정주기가 4일인 것을 감안한 것이며 Schultka(1963)가 주장한 난포기에서 섬모세포가 다수 관찰된다는 연구에 기인한 것이며 Brenner(1969)가 estrogen 투여로 난관섬모세포의 증식이 계속된다는 보고를 기반으로 한 것이다. 본 실험에서 estradiol benzoate를 4일간 투여했을 때 난관의 상피세포층에 계속적인 tubulin 양성반응이 계속되었고 전자현미경관찰에서 침부세포질에 금과립이 계속 관찰되는 것은 섬모형성을 위한 전중심소체의 지속적인 형성에 기인 되는 것으로 결론 지을 수 있었으며, estradiol benzoate를 4일간 계속투여한 후 제 4일째부터 cis-platin을 1일간 투여한 결과 24시간 경과군과 3일 경과군에서는 tubulin 면역반응이 난관 상피 전역에 약하게 나타났었다. 이러한 결과는 Mount et al.(1995)이 주장한 cis-platin이 섬모형성에 관련이 있는 단백질대사에 독성으로 작용한다는 주장과 맥을 같이 하는 것 같으며 Jekunen(1994)이 주장한 cis-platin이 섬모세포의 유사분열을 억제한다는 연구보고와도 관련이 있는 것 같다. 특히 Boekelheide(1992)이 주장한 cis-platin이 미세소관의 disassembly와 관련이 있다는 설과 거의 일치하는 것이라고 생각되었고 Kopf et al.(1992)이 주장한 세포내 세포골격의 손상으로 미세소관의 기저체형성에 구조적 억제와 관련이 있는 것으로 생각되었다. 따라서 cis-platin은 난관의 섬모세포에서 계속적으로 일어나는 섬모형성에 억제적으로 작용하는 약제인 것이 분명하였다.

## 참 고 문 헌

- Abe H, Oikawa T: Effects of estradiol and progesterone on the cytodifferentiation of epithelial cells in the oviduct of the newborn golden hamster. *Anat Rec* 235 : 390-398, 1993.
- Beck LR: Comparative anatomy and histology of the mammalian oviduct. Ph.D. Thesis, Library Washington State university. Pullman Washington pp. 383, 1970.
- Beck LR: Comparative observations on the morphology of the mammalian perivarial. *Sac J Morph* 136 : 247, 1972.
- Boekelheide K, Arcila ME, Eveleth J: cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin) alters microtubule assembly dynamics. *Toxicol Appl Pharmacol* 116 : 146-161, 1992.
- Boisvieux-Ulrich E, Laine MC, Sandoz D: Cytochalasin D inhibits basal body migration and ciliary elongation in quail oviduct epithelium. *Cell Tissue Res* 259 : 443-454, 1990.
- Boisvieux-Ulrich E, Lainé MC, Sandoz D: In vitro effects of taxol on ciliogenesis in the quail oviduct. *J Cell Sci* 92 : 9-20, 1989.
- Borisy GG, Olmsted JB: Nucleated assembly of microtubules in porcine brain extracts. *Science* 177 : 1196-1199, 1972.
- Brenner RM: Renewal of oviduct cilia during the menstrual cycle of the Rhesus monkey. *Fertil Steril* 20 : 599-611, 1969.
- Burris HA 3rd, Fields S, Peacock N: Decetaxel (taxotere) in combination: a step forward. *Semin Oncol* 22 : 35-40, 1995.
- Choi DD, del Campo AA, Guarino AM: Subcellular localization of cis-dichlorodiammineplatinum (II) in rat kidney and liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 55 : 245-252, 1980.
- Christen RD, Jenkunan AP, Jones JA, Thiebaut F, Shalinsky DR, Howell SB: In vitro modulation of cisplatin accumulation in human ovarian carcinoma cells by pharmacologic alternation of microtubules. *J Clin Invest* 92 : 431-440, 1993.
- deBrubander, G Fuens G, Nuydens, et al: Microtubule dynamics during the cell cycle: the effects of taxol and nocodazol on the microtubule system of PtK2 cells at different stages of mitotic cycle. *Int Rev Cytol* 101 : 215-274, 1986.
- Dirksen ER, Staprans I: Tubulin synthesis during ciliogenesis in the mouse oviduct. *Developmental Biol* 46 : 1-13, 1975.
- Donnez J, Casanas-Roux F, Caprasse J, et al: Cyclic changes in ciliation, cell height, and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life. *Fertil Steril* 43 : 554-559, 1985.
- Forastiere AA: Use of paclitaxel (Taxol) in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Semin Oncol* 20 : 56-60, 1993.
- Hagiwara H, Shibasaki S, Ohwada N: Ciliogenesis in the human oviduct epithelium during the normal menstrual cycle. *J Electron Microsc Tokyo* 41 : 321-329, 1992.
- Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA: Inactivation of P<sup>53</sup>

- enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 56 : 892-898, 1996.
- Jekunen AP, Christen RD, Shalinsky DR, Howell SB: Synergistic interaction between cisplatin and taxol in human ovarian carcinoma cells in vitro. *Br J Cancer* 69 : 299-306, 1994.
- Klotz C, Bordes N, Lain MC, et al: Myosin at the apical pole of the ciliated epithelial cells as revealed by a monoclonal antibody. *J Cell Biol* 103 : 613-620, 1986.
- Kopf-Maier P, Muhlhausen SK: Changes in the cytoskeleton pattern of tumor cells by cisplatin in vitro. *Chem Biol Interact* 82 : 295-316, 1992.
- Laucier CL, Pageaux JF, Soto AM, Sonnenschein C: Mechanism of estrogen action: Indirect effect of estradiol-17 $\beta$  on proliferation of quail oviduct cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 1621-1625, 1983.
- Lemullos M, Klotz C, Sandoz D: Immunocytochemical localization of myosin during ciliogenesis in quail oviduct. *Eur J Cell Biol* 43 : 429-437, 1987.
- Lemullos M, Boisvieux-Ulrich E, Lainé MC, et al: Development and functions of the cytoskeleton during ciliogenesis in metazoa. *Biol Cell* 63 : 195-208, 1988.
- Mansy S, Rosenbery B, Thomson JA: Binding of cis- and trans-Dichlorodiammine-platinum (II) to nucleosides. 1, location of the binding sites. *J Am Chem Soc* 95 : 1633-1640, 1973.
- Mount RJ, Takeno S, Wake N, Harrison RV: Carboplatin ototoxicity in the chinchilla: lesion of the vestibular sensory epithelium. *Acta Otolaryngol Stockh (Suppl)* 519 : 60-65, 1995.
- Nakayama M: Cisplatin induced vestibular damage. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 95 : 81-94, 1992.
- Plooy ACM, Van dijk M, Lohman PHM: Induction and repair of DNA cross-links in chinese hamster ovary cells treated with various platinum coordination compounds in relation to platinum binding to DNA ototoxicity mutagenicity and antitumor activity. *Cancer Res* 44 : 2043-2051, 1984.
- Rafe R, Greenhouse AG, Gross KW, Gross PR: Synthesis and storage of microtubule proteins by sea urchin embryo. *J Cell Biol* 50 : 516-520, 1971.
- Roberts JJ, Pascoe JM: Cross-linking of complementary platinum compounds. *Nature* 235 : 282-294, 1972.
- Rosenbaum JL, Moulder JE, Ringo DL: Flagellar elongation and shortening in chlamydomonas. *J Cell Biol* 4 : 600-612, 1969.
- Rosenberg B: Possible mechanisms for antitumor activity of platinum coordination complex. *Cancer Chemother Rep* 59 : 589-598, 1975.
- Rosenberg JJ, Pascoe JM: Cross-linking of complementary platinum compounds. *Nature (London)* 235 : 282-284, 1972.
- Sandoz D, Gounon P, Karsenti E, Sauron ME: Immunocytochemical localization of tubulin, actin, and myosin in axonemes of ciliated cells from quail oviduct. *Proc Natl Acad Sci USA* 79 : 3198-3202, 1988.
- Schultka R: Der Sekretionseyklus der Flimmerzellen der menschlichen tube uterina auf Grund cytologischer und cytotochemischer untersuchung. *Acta Histochem (Jena)* 15:285, 1963.
- Staprans I, Dirksen ER: Microtubule protein during ciliogenesis in the mouse oviduct. *J Cell Biol* 62 : 164-174, 1974.
- Tamura S: Synthesis and assembly of microtubule proteins in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp Cell Res* 68 : 180-191, 1971.
- Wade RH, Chrétien D: Cryoelectron microscopy of microtubules. *J Struct Biol* 110 : 1-17, 1993.
- Wall ME, Wani MC: Camptothecin and taxol: discovery to clinic-thirteenth Bruce F. Cain Memorial award lecture. *Cancer Res* 55 : 753-760, 1995.
- 이영환: 세포골격과 세포운동: 세포생물학, 강빈구 외, 서울 정문각, pp. 207-225, 1996.

#### < 국문초록 >

항암제로 널리 사용되는 cis-platin은 백금(platinum) 원소에 염소기와 암모니아기가 수평면의 cis-위치에 결합되어 있는 금속화합물이다. Cis-platin은 인체의 종양에 상당한 항암효과가 있어 악성 난소종양, 두경부의 악성상피종양, 방광암 및 자궁경부암에 효과가 있다고 알려져 있으나 이 약제는 세포의 DNA 합성을 억제하는 기능이 이미 밝혀져 있다.

저자는 cis-platin을 가입기의 여성에 투여되었을 때 난관상피 세포를 구성하는 섬모세포의 섬모형성에도 필연적으로 손상 및 억제적인 작용이 있을 것으로 생각되어 섬모의 주요 구성분인 미세소관의  $\alpha$ -tubulin과 cis-platin과의 관계를 추구하고자 하였다.

실험동물로는 건강한 체중 150~200gm의 자성흰쥐를 사용하였으며 estradiol benzoate를 4일간 매일 투여



함으로써 섬모세포를 난관내에서 지속적인 활성을 유지 시킨 뒤 cis-platin을 실험군의 복강내로 주사한 후 1일, 3일, 5일 및 7일 경과시에 각각 실험동물의 난관내 상피세포내  $\alpha$ -tubulin의 발현을 관찰하기 위해 mouse anti-rat  $\alpha$ -tubulin monoclonal antibody 와 2차 항체로 biotinylated goat anti-rat IgG를 각각 사용하여 면역조직 화학법을 시행한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 또 일부 조직은 전자현미경 조직절편을 제작하여 1차 항체로 mouse anti rat  $\alpha$ -tubulin monoclonal antibody와 2차 항체로 직경 15 nm의 금과립을 결합시킨 goat anti-mouse IgG를 사용하여 면역조직 반응을 시행하고 투과전자현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Estradiol benzoate를 4일간 매일 일정량을 투여한 흰쥐의 난관섬모세포내  $\alpha$ -tubulin의 면역반응은 estra-

diol 투여후 1일, 3일 및 5일군에서 강한 반응을 나타내었다.

2. Estradiol benzoate를 4일간 투여한 후 cis-platin을 투여한 흰쥐 난관섬모세포내  $\alpha$ -tubulin 반응은 cis-platin 투여 1일군과 3일군에서 약한 반응을 나타내었으나 제 5일군에서는 강한 반응으로 회복되었다.

3. Cis-platin 투여한 후 제 1일 및 3일군의 흰쥐 난관섬모세포내  $\alpha$ -tubulin 반응은 침부세포질에서는 감소되었고 기저체, 섬모동에서는  $\alpha$ -tubulin 반응이 대조군과 비교하면 변동이 없었다.

이상의 결과로 미루어 난관섬모세포내  $\alpha$ -tubulin은 cis-platin 투여에 의해 감소되는 것으로 결론 지을 수 있었다.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Light microscopical findings of  $\alpha$ -tubulin immunoreactivity in oviductal epithelia in estradiol pretreatment group and cis-platin treatment group after estradiol pretreatment. E-1; 1 day after estradiol pretreatment, EC-1; 1 day after cis-platin treatment after estradiol pretreatment, E-3; 3 days after estradiol pretreatment, EC-3; 3 days after cis-platin treatment after estradiol pretreatment, E-5; 5 days after estradiol pretreatment, EC-5; 5 days after cis-platin treatment after estradiol pretreatment, E-7; 7 days after estradiol pretreatment, EC-7; 7 days after cisplatin treatment after estradiol pretreatment. Moderate or strong positive immunoreactivities of  $\alpha$ -tubulin are observed in oviductal epithelia of estradiol pretreatment groups.  $\alpha$ -tubulin immunoreactivities were decreased to weak or moderate positive reactions at 1 day and 3 days after cis-platin treatment but those were recovered to moderate or strong positive reactions at 5 and 7 days after cis-platin treatment. Peroxidase method,  $\times 100$
- Fig. 2.** Immunogold electron microscopic finding of  $\alpha$ -tubulin immunoreactivity in oviductal epithelia. Control specimen immunostained with secondary antibody preconjugated with gold particles without primary antibody. No gold particles are observed at cilia, basal body and apical cytoplasm of ciliated cell. Uranyl acetate stain,  $\times 30,000$
- Fig. 3.** Immunogold electron microscopic finding of  $\alpha$ -tubulin immunoreactivity in oviductal epithelia of control group without estradiol pretreatment. Small amount of gold particles are distributed in cilia, basal body and apical cytoplasm of ciliated cell. Uranyl acetate stain,  $\times 30,000$
- Fig. 4.** Immunogold electron microscopic finding of  $\alpha$ -tubulin immunoreactivity in oviductal epithelia of estradiol-pretreated group, 1 day after pretreatment. Large amount of gold particles are distributed in basal body and apical cytoplasm of ciliated cell. Uranyl acetate stain,  $\times 30,000$
- Fig. 5.** Immunogold electron microscopic finding of  $\alpha$ -tubulin immunoreactivity in oviductal epithelium of cis-platin treated group, 1 day after treatment. Large amount of gold particles in cilia and basal body, and small amount of particles in cytoplasm are observed in ciliated cell. Uranyl acetate stain,  $\times 30,000$
- Fig. 6.** Immunogold electron microscopic finding of  $\alpha$ -tubulin immunoreactivity in oviductal epithelia of estradiol-pretreated group, 3 days after pretreatment. Large amount of gold particles are distributed in cilia, basal body and apical cytoplasm of ciliated cell. Uranyl acetate stain,  $\times 30,000$
- Fig. 7.** Immunogold electron microscopic finding of  $\alpha$ -tubulin immunoreactivity in oviductal epithelium of cis-platin treated group, 3 days after treatment. Large amount of gold particles in cilia and basal body, small amount of particles in cytoplasm are observed in ciliated cell. Uranyl acetate stain,  $\times 30,000$
- Fig. 8.** Immunogold electron microscopic finding of  $\alpha$ -tubulin immunoreactivity in oviductal epithelia of estradiol-pretreated group, 5 days after pretreatment. Large amount of gold particles are distributed in cilia, basal body and apical cytoplasm of ciliated cell. Uranyl acetate stain,  $\times 30,000$
- Fig. 9.** Immunogold electron microscopic finding of  $\alpha$ -tubulin immunoreactivity in oviductal epithelium of cis-platin treated group, 5 days after treatment. Large amount of gold particles are distributed in cilia, basal body and apical cytoplasm of ciliated cell. Uranyl acetate stain,  $\times 30,000$
- Fig. 10.** Immunogold electron microscopic finding of  $\alpha$ -tubulin immunoreactivity in oviductal epithelium of estradiol-pretreated group, 7 days after pretreatment. Large amount of gold particles in cilia and basal body, and small amount of particles in apical cytoplasm are observed in ciliated cell. Uranyl acetate stain,  $\times 30,000$
- Fig. 11.** Immunogold electron microscopic finding of  $\alpha$ -tubulin immunoreactivity in oviductal epithelia of cis-platin treated group, 7 days after treatment. Large amount of gold particles in cilia and basal body, and small amount of particles in apical cytoplasm are observed in ciliated cell. Uranyl acetate stain,  $\times 30,000$









