

## 배양된 흰쥐 담관 섬유모세포에 대한 간흡충 분비배설 물질의 영향

권정남, 민병훈, 이행숙, 김수진<sup>1,\*</sup>, 주경환\*

고려대학교 의과대학 기생충학교실, <sup>1</sup>한림대학교 자연과학대학 생명과학과

## Effect of *Clonorchis sinensis* Excretory-secretory Product on the Cultured SD Rat Bile Duct Fibroblast

Jung-Nam Kwon, Byoung-Hoon Min, Haeng-Sook Lee,  
Soo-Jin Kim<sup>1,\*</sup>, Kyoung-Hwan Joo\*

Department of Parasitology, Korea University College of Medicine, Seoul 136-705, Korea

<sup>1</sup>Department of Life Science, College of Natural Science, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

(Received April 16, 2009; Accepted June 22, 2009)

### ABSTRACT

*Clonorchis sinensis* is the most important widely distributed parasite of the human bile duct in East Asia and the most prevalent parasitic helminth in Korea. The prevalence rate of human clonorchiasis has remained at about 2.9% in Korea. *C. sinensis* induces dilatation of the duct, hyperplasia of the mucosa, metaplasia or neoplasia of the mucosal epithelium, periductal inflammation and fibrosis, and thickening of the ductal wall.

Fibroblast are the most common cells in connective tissue and are responsible for the synthesis of extracellular matrix components. The fibrosis associated with chronic inflammation and injury may also contribute to cholangiocarcinoma pathogenesis, particularly through an increase in extracellular matrix components, which participate in the regulation of bile duct differentiation during development.

In this study, ultrastructural changes, the distribution of lectin receptors and actin protein in cultured SD rat bile duct fibroblast after infection of *C. sinensis* were observed. Experimental group had been divided into four groups: normal bile duct fibroblast cultured in basal media (G1); *C. sinensis* infected bile duct fibroblast cultured in basal media (G2); normal bile duct fibroblast cultured in basal media containing excretory-secretory product (ESP) (G1-1); *C. sinensis* infected bile duct fibroblast cultured in basal media containing ESP (G2-1).

Overall, once a host is infected by *C. sinensis*, it affects the host to the extent that sialic acid of ductal fibroblast is increased. Number of cytoplasmic process of SD rat bile duct fibroblast was increased. Actin protein and sialic acid were located in cell surface. Fibroblast induced by *C. sinensis* was not recovered to normal fibroblast. The cytoplasm bulk and cytoplasmic process were increased whereas the growth rate of the fibroblast of infected SD rat was reduced rather than that of normal fibroblast. In result, it inhibits fibroblast proliferation and increases actin protein on fibroblast cytoplasm, and so causes fibroblast metamorphosis and cellular mutation.

**Keywords** : *Clonorchis sinensis*, Excretory-secretory product (ESP), Fibroblast

\* Correspondence should be addressed to Prof. Kyoung-Hwan Joo, Department of Parasitology, Korea University College of Medicine, Seoul 136-705, Korea. Ph.: (02) 920-6161, Fax: (02) 924-4905, E-mail: kyhwjoo@korea.ac.kr or Prof. Soo-Jin Kim, Department of Life Science, College of Natural Science, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea. Ph.: (033) 248-2091, Fax: (033) 256-3420, E-mail: sjkim@hallym.ac.kr

## 서 론

간흡충(*Clonorchis sinensis*)은 우리나라에서 높은 감염률(2.9%)을 나타내는 기생충으로(KAHP, 2004) 감염에 따른 병변의 진행 및 증상의 발현 정도는 충체의 직접적인 물리, 화학적 작용에 의한 것으로 알려져 있다. 간흡충에 감염된 조직은 담관염이 발생하고, 충체가 성장할 때 주위의 담관 구성 세포의 증식, 조직의 염증 및 섬유화가 일어나며(Hou, 1955; Bhamarapravati et al., 1978; Lee et al., 1978; Min & Soh, 1986), 담관암 및 담석증 등의 임상 소견이 보고되었다(Sullivan & Koep, 1980). 충체에 의한 담관 조직의 숙주 반응은 호산구나 림프구의 침윤을 일으키며, 비후된 담관은 정상 조직으로 회복되기 어려운 것으로 알려져 있다(Hong et al., 1994).

담관에 분포하는 섬유모세포(fibroblast)는 결합조직을 구성하는 세포의 한 종류로서 세포질돌기가 발달하며, 단백질과 탄수화물 복합체인 당단백, tubulin, actin 등을 생성한다. Actin은 supervillin과 flightless I 등으로 변형되어 세포의 형태 유지, 신호전달, 인접세포와의 연결 등에 관여하기도 한다(Ting et al., 2002; Chen et al., 2003). 또한 조직을 발달시키고, 손상된 조직에 콜라겐 층을 형성하여 조직을 복구하기도 하며(Albert & Bray, 1994), 상처의 반흔(scar) 형성과 지방축적, 염증 발생 과정에서 비정상적인 섬유모세포의 작용은 섬유증(fibrosis)을 발생시키기도 한다(Koumas et al., 2003). 섬유모세포의 세포질돌기는 actin을 포함하는 망상구조의 미세섬유와 세포 표면 당단백 말단에 의해 세포의 이동, 세포막 수송 및 면역항체에 대한 세포 인식, 주변 세포의 인식 등의 역할이 보고되었다(Peters et al., 1979; Schauer, 1982).

세포 표면에 존재하며 세포 인식에 관여하는 당단백 말단 중 sialic acid(Bouchard et al., 1976)는, 왜소조충(*Hymenolepis nana*)과 *Hymenolepis microstoma* 표피의 microtriches에 분포하며, 숙주로부터 충체 내로 물질을 흡수하는 과정에서 세포막 투과성에 관여한다(Schmidt & Peters, 1987). 이러한 sialic acid는 여러 종류의 lectin을 이용하여 세포표면에 분포하는 당단백을 밝히는데 중요한 역할을 한다(Damjanov, 1987; Spier & Schulte, 1992).

지금까지 기생충 감염에 따른 물리적 자극에 의해 발생하는 담관 확장에 대한 연구는 많이 이루어져 왔으나, 담관 결합조직에 분포하는 섬유모세포가 간흡충에 감염되어 충체의 분비배설 물질(*C. sinensis* excretory-secretory product, ESP)에 노출되었을 때, 섬유모세포에 발생하는 형태적 변화와 actin, sialic acid 등의 분포양상의 변화가 어떻게 이루어지는가에 대한 연구는 미흡하였다.

이 연구에서는 간흡충 분비배설 물질 자극에 따른 섬유

모세포의 변화를 관찰하여, 흰쥐 담관 섬유모세포와 간흡충 감염시 이루어지는 화학적 자극에 대한 연관성을 알아보고자 하였다. 이에 따라 우선 정상 흰쥐의 담관으로부터 분리한 섬유모세포와 간흡충 감염 흰쥐의 담관으로부터 분리한 섬유모세포를 배양하고, 대조군과 실험군에 간흡충 분비배설 물질(ESP)을 첨가하여 배양한 다음 배양중의 섬유모세포의 형태적 변화를 광학현미경으로 관찰하고, 배양된 섬유모세포에 존재하는 actin과 sialic acid의 분포양상을 면역황금입자표지를 이용한 전자현미경법으로 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 간흡충 피낭유충 수집 및 실험동물

참붕어(*Pseudorasbora parva*)를 인공 위액으로 37°C에서 6시간 소화시키고, 소화된 참붕어를 여과하여 수회 세척 후 피낭유충을 분리하였다. 분리된 간흡충 피낭유충은 흰쥐(Sprague-Dawley rat, 8주령, 암컷, 샘타코)에 각각 50개씩 경구투여한 후 2개월간 사육하였다.

#### 2) 분비배설 물질 수집

간흡충 성충을 배양액(RPMI 1640)에서 배양하고, 배양액을 모아 배양중에 분비되는 물질을 수집하였다. 수집된 배양액은 원심분리하고 투석한 후, 동결 건조하여 Bradford 법으로 정량하였다.

#### 3) 세포배양배지

섬유모세포를 배양하기 위한 기본배지로 HG-DMEM, 10% FBS, 1% 항생제(Gibco)를 첨가하여 사용하였다. 실험군은 기본배지에 간흡충 분비배설 물질(ESP, 50 µg/mL)을 첨가하여 사용하였다.

#### 4) Lectin WGA

당단백 말단 sialic acid의 분포를 확인하기 위하여 lectin의 일종인 wheat germ agglutinins(WGA)에 황금입자가 표지된 lectin WGA gold complex(10 nm)를 사용하였다.

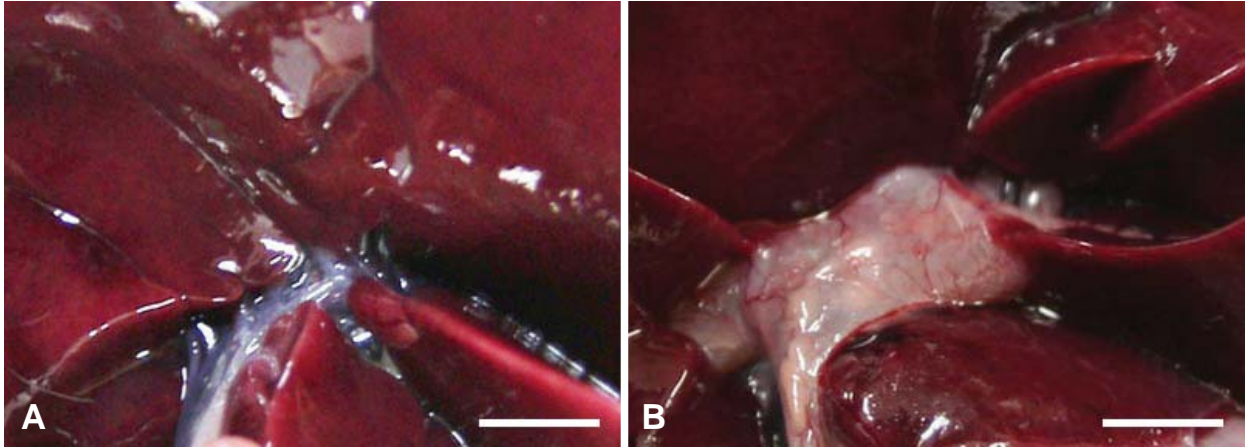
#### 5) Actin 항체

세포내의 actin을 확인하고자 rabbit polyclonal antibody(InnoGenex)를 사용하였고, 전자현미경 관찰을 위해 10 nm Aurion ImmunoGold(EMS)를 사용하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 실험군

실험군은 정상 흰쥐 담관의 섬유모세포를 배양한 대조군(G1), 간흡충에 감염된 흰쥐 담관의 섬유모세포를 배양한



**Fig. 1.** Extracted abdominal organs of a SD rat in the normal control group (A) and the infection group at 2 months after *C. sinensis* infection (B), showing marked dilatation of the common bile duct and of the extrahepatic bile duct (B). Scale bar=1 cm.

실험군(G2), 정상 흰쥐의 담관 섬유모세포에 분비배설 물질을 첨가하여 배양한 실험군(G1-1), 간흡충에 감염된 흰쥐의 담관 섬유모세포에 분비배설 물질을 첨가하여 배양한 실험군(G2-1)으로 구분하였다.

## 2) 세포배양

적출한 담관은 간흡충 충체를 제거하기 위해 완충용액과 항생제가 포함된 배양배지에서 세척하였다. 조직은 배양배지에서 세척한 후, 배양용기(NUNC)에서 36.5°C, 4.5% CO<sub>2</sub> 조건으로 7일간 배양하였다. 배양중의 섬유모세포는 도립현미경(Nikon TMS)으로 관찰하고, 디지털 카메라(polaroid DMC 1e)로 촬영하였다.

## 3) 전자현미경 관찰을 위한 배양 세포 고정

배양된 섬유모세포는 0.25% trypsin을 처리하여 배양용기로부터 분리한 후 1% paraformaldehyde-1% glutaraldehyde (pH 7.4) 고정액으로 전고정하고, 완충용액으로 세척하여 2% osmium tetroxide 고정액으로 후고정 하였다. 고정된 세포들은 ethanol 탈수 후 Lowicryl HM 20으로 포매하고, 포매된 세포들은 ultramicrotome (Reichert, Austria)으로 초박절편을 제작하였다.

## 4) 전자현미경 관찰을 위한 항체 반응

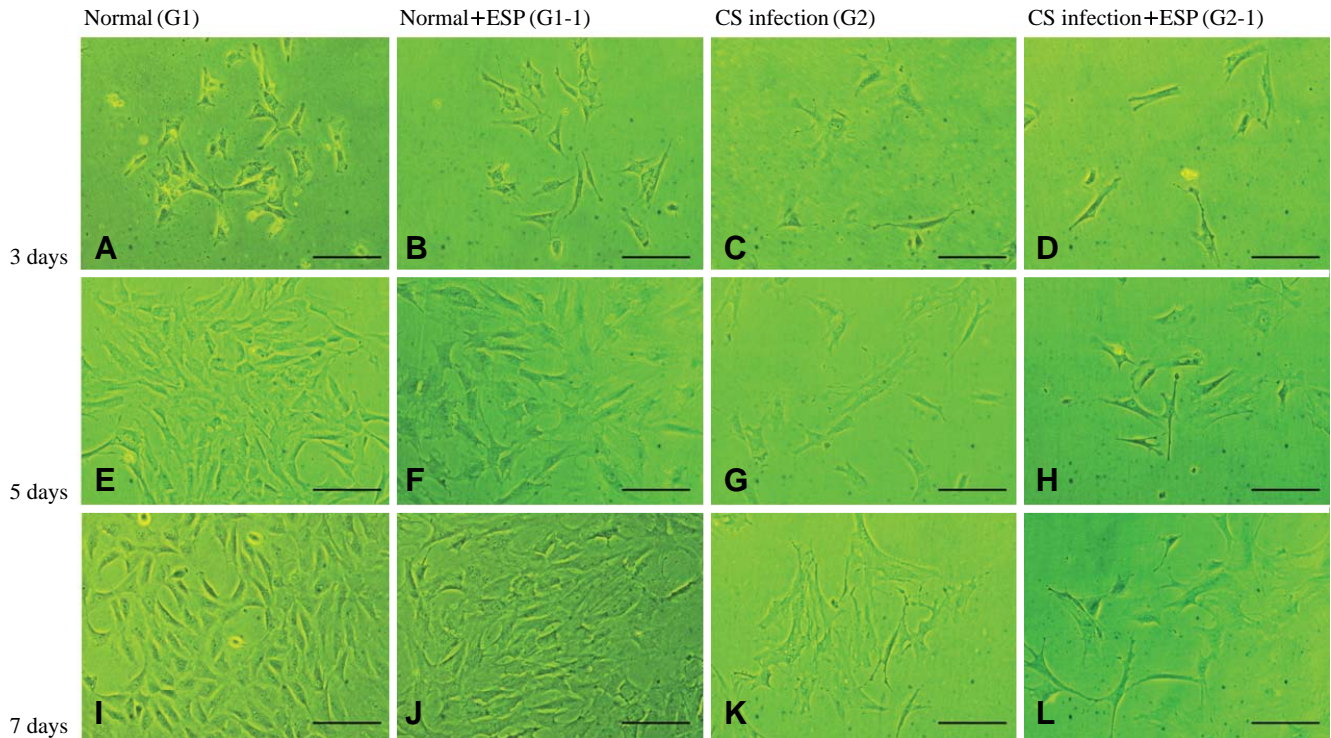
배양세포 초박절편은 1% periodic acid로 항원상기를 수행하였다. 처리된 재료는 lectin WGA gold complex를 반응시켰다. Actin 항체반응의 경우, 제작된 초박절편은 1% periodic acid로 항원상기를 수행하고, 일차항체로 actin을, 이차항체는 10 nm Aurion ImmunoGold를 반응시켰다. 처리된 시료는 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하고 투과전자현미경(Zeiss EM 109, Germany)으로 관찰하였다.

## 결 과

정상 흰쥐의 총담관의 직경은 약 2 mm로 관찰되었고(Fig. 1A), 간흡충에 감염된 흰쥐의 총담관은 감염 2개월 후 직경이 10~13 mm로 확장되었다(Fig. 1B). 확장된 담관의 내벽은 비후되어 있었으며, 간흡충이 다수 존재하였다.

정상 흰쥐 담관과 간흡충에 감염된 흰쥐 담관으로부터 분리된 섬유모세포는 기내배양 2일 후 배양용기에 부착하여 성장하는 모습이 관찰되었다(Fig. 2). 정상 담관으로부터 분리되어 3일 배양된 경우 G1, G1-1 두 실험군은 2~3개의 세포질돌기를 가지는 방추형이었으며(Fig. 2A, B), G1-1의 경우 몇몇 섬유모세포는 세포질의 확장이 관찰되기도 하였다(Fig. 2B). G2의 경우 G1에 비해 세포의 증식속도가 느리고, 세포질돌기가 5~6개 형성된 별모양으로 확장된 세포들이 관찰되었다(Fig. 2C). G2-1의 경우 3~5개의 세포질돌기를 가지는 방추형의 세포들이 주로 관찰되었다(Fig. 2D). 5일 배양된 섬유모세포의 경우, G1은 3일 배양된 섬유모세포에 비해 수적인 증가가 이루어졌으며, 세포의 형태는 방추형으로 관찰되었다(Fig. 2E). G1-1의 경우 G1에 비해 세포질이 확장되었으며, 4~5개의 세포질돌기가 존재하였다(Fig. 2F). G2의 경우 정상대조군, 또는 정상대조군에 분비배설 물질을 처리한 실험군에 비해 세포증식 속도가 저하되었으며, 5~9개의 세포질돌기와 정상에 비해 확장된 세포질이 관찰되었다(Fig. 2G). G2-1의 경우 각각의 섬유모세포는 그 형태가 다르게 관찰되었다. 정상대조군과 유사한 방추형의 세포질과 3~6개의 세포질돌기를 가지는 세포가 관찰되었으며, 감염된 실험군(G2)에 비해 확장된 세포질을 가지고 있는 섬유모세포가 관찰되었다. 한편 증식속도는 G2와 유사한 것으로 확인되었다(Fig. 2H). 7일 배양된 섬유모세포의 경우, G1은 배양용기의 85% 면적에 섬유모세포가 관찰





**Fig. 2.** Morphological change of 7-day cultured fibroblast in each experimental group. G1: Fibroblasts showed cytoplasmic process surrounding a cytoplasm. G1-1: They showed a morphological pattern similar to the fibroblast of the bile ducts of SD rats infected with *C. sinensis* (G2). G2: Cell proliferation got slower remarkably during culture and cellular metamorphosis was observed. G2-1: Fibroblast showed a decrease of cytoplasmic process as compared with the fibroblast of the bile ducts of SD rats infected with *C. sinensis* (G2). In result, fibroblast proliferation got slower and cytoplasmic process developed. Scale bar=100  $\mu$ m.

**Table 1.** Growth rate and cytoplasmic process number of 7-day cultured fibroblast

	G1	G1-1	G2	G2-1
Growth rate	++++	+++	++	+
Cytoplasmic process	+	++	++++	+++

\*G1: Normal bile duct fibroblast cultured in basal media. G1-1: normal bile duct fibroblast cultured in basal media containing excretory-secretory product (ESP). G2: *C. sinensis* infected bile duct fibroblast cultured in basal media. G2-1: *C. sinensis* infected bile duct fibroblast cultured in basal media containing ESP.

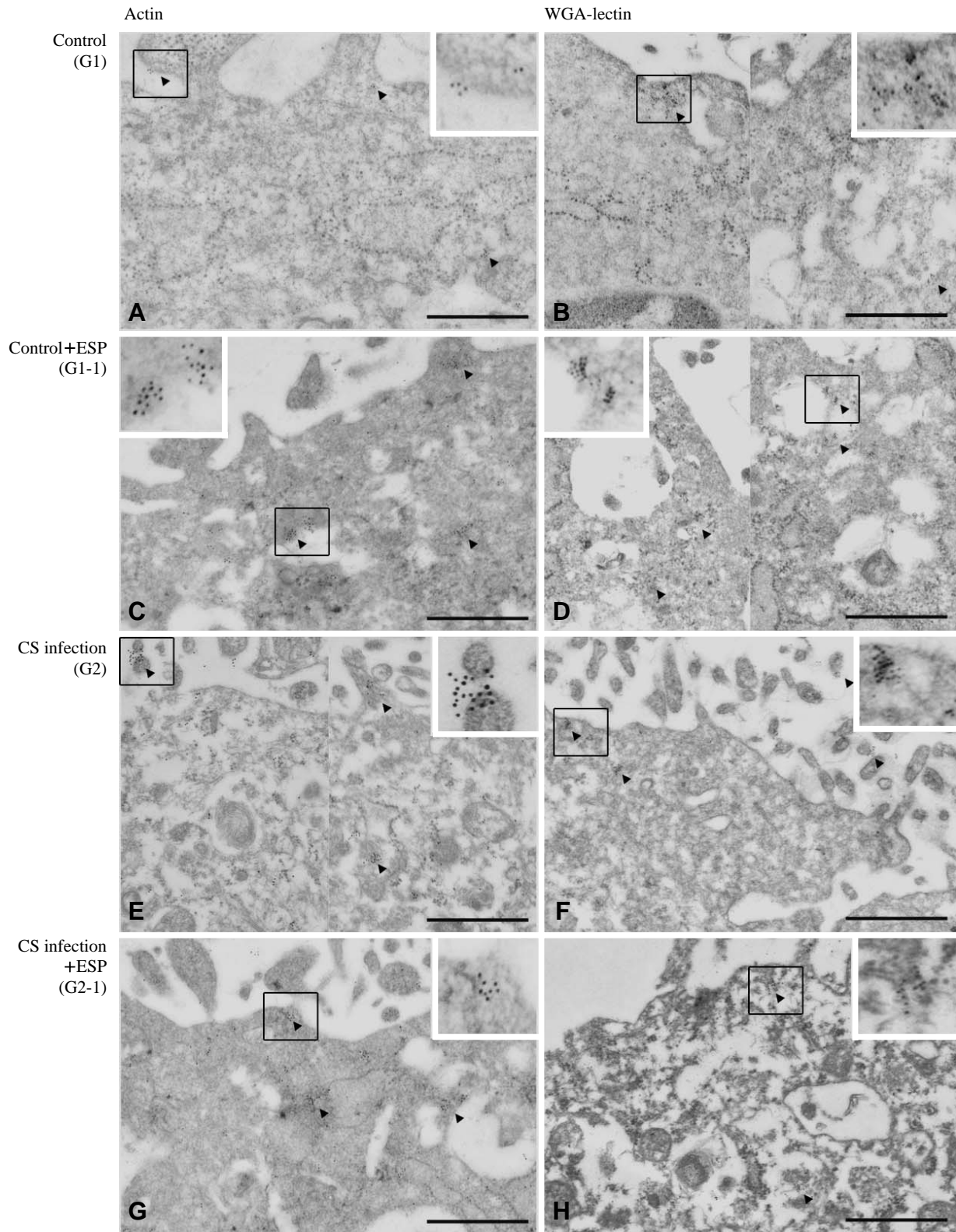
되었고, 방추형의 세포질과 2~3개의 세포질돌기가 존재하였다(Fig. 2I). G1-1은 정상대조군보다 확장된 세포질과 약 4~7개의 세포질돌기가 존재하였다(Fig. 2J). G2의 경우 G1보다 약 4배 확장된 세포질과, 약 7~10개의 세포질돌기가 관찰되었다(Fig. 2K). G2-1의 세포질돌기에서는 길이 신장이 이루어진 세포질돌기와 방추형의 세포들이 관찰되며, 일부 섬유모세포는 G2에 비해 확장된 세포질이 관찰되기도 하였다(Fig. 2L). 배양된 섬유모세포의 증식속도는 정상 대조군(G1)이 가장 빠르고 G1-1, G2, G2-1 순서로 관찰되었으며, 세포질돌기의 수는 간혹중에 감염된 실험군(G2)이 가

장 많고, G2-1, G1-1, G1 순으로 적었다(Table 1).

담관으로부터 분리되어 7일 배양한 섬유모세포를 투과전자현미경으로 관찰한 결과 정상대조군(G1)에서는 발달된 세포질돌기가 관찰되었다(Fig. 3A). G1-1은 G1보다 세포질돌기가 발달되었으며(Fig. 3C), G2의 경우 세포질돌기의 수적증가가 관찰되었다(Fig. 3E). G2-1의 경우 G2보다 세포질돌기의 감소가 이루어졌다(Fig. 3G).

세포질에 존재하는 actin을 확인하고자 각 실험군에 반응시킨 결과, 정상대조군(G1)에서는 actin이 세포질과 세포질돌기에 분포하였다(Fig. 3A). G1-1의 경우 세포질돌기의 수가 증가되었으며, 세포질에 황금입자가 표지되어 actin이 분포하는 것이 확인되었다(Fig. 3C). 감염된 실험군(G2)에서는 G1에 비하여 actin의 분포가 증가하였으며, actin은 세포질돌기가 수적으로 증가한 곳, 길이신장이 이루어진 곳 그리고 세포질에서 주로 관찰되었다(Fig. 3E). G2-1의 경우, actin의 분포는 G2보다 감소하였다(Fig. 3G).

섬유모세포에 존재하는 sialic acid를 확인하고자 WGA gold complex를 각 실험군에 반응시킨 결과, 정상대조군(G1)에서는 황금입자가 주로 세포막 주변의 소포낭에서 관찰되었다(Fig. 3B). G1-1은 소포낭 주변에(Fig. 3D), G2는



**Fig. 3.** Transmission electron microscopical observation of the fibroblast which was reacted with WGA gold complex and actin antibody in a SD rat bile duct at 7 days after *in vitro* culture. G1: WGA-gold particles were labeled in cytoplasm and cytoplasmic process. G1-1: More WGA-gold particles were labeled in comparison with control group (G1). G2: Distribution of actin protein was increased in comparison to the fibroblast of the control group (G1). G2-1: Distribution of actin protein was decreased in comparison to infected fibroblast (G2) and WGA-gold particles showed a pattern similar to those of infected SD rats (G2). Scale bar=1  $\mu$ m.

**Table 2.** Distribution of anti-actin and WGA gold complex labeling in the 7-day cultured fibroblast

	G1	G1-1	G2	G2-1
Anti-actin	+	++	++++	+++
WGA gold complex	++	+++	++++	+++

\*G1: Normal bile duct fibroblast cultured in basal media. G1-1: normal bile duct fibroblast cultured in basal media containing excretory-secretory product (ESP). G2: *C. sinensis* infected bile duct fibroblast cultured in basal media. G2-1: *C. sinensis* infected bile duct fibroblast cultured in basal media containing ESP.

세포질돌기와, 세포표면 그리고 세포질에 황금입자가 각각 표지되었다. 표지된 황금입자는 세포질보다 세포질돌기에서 주로 관찰되었다(Fig. 3F). G2-1의 경우 주로 소포낭 주변에 황금입자가 표지되었으며, 실험대조군(G1)보다 WGA gold complex의 반응이 증가되었다(Fig. 8D). 정상대조군(G1)에 비하여 정상대조군에 분비배설 물질을 처리한 경우 반응이 증가하는 양상이 나타나고, 간흡충에 감염된 실험군이 actin과 WGA gold complex가 가장 많이 증가하는 것으로 확인되었다(Table 2).

## 고 찰

간흡충 감염에 따른 물리적 자극이 지속되면 모세담관의 신생, 상피조직의 섬유화가 일어나고, 담관의 확장 및 낭포상변화(cystic change)가 발생한다(Cha et al., 1991). 또한 기생충 감염에 의한 세포 상해에서 나타나는 담관 확장은 치료 후에도 정상으로 회복되기 어렵다(Choi et al., 2004). 본 연구에서도 정상 흰쥐는 총담관의 직경이 약 2 mm, 간흡충에 감염된 흰쥐는 총담관이 직경 10~13 mm까지 확장되었다. 정상 흰쥐 담관에서 분리된 섬유모세포와 간흡충에 감염된 흰쥐 담관으로부터 분리된 섬유모세포를 배양하고, 여기에 간흡충 분비배설 물질이 포함된 배지에서 배양하여 분비배설 물질이 섬유모세포에 어떠한 변화를 일으키는 지 관찰한 결과, 정상 흰쥐 담관으로부터 분리된 섬유모세포가 가장 빠르게 분열하였고, 간흡충에 감염된 흰쥐 담관 섬유모세포를 분비배설 물질이 포함된 배양배지에서 배양한 경우가 가장 느리게 분열하였다. 세포질돌기의 수는 간흡충 감염 흰쥐 담관으로부터 분리된 섬유모세포가 가장 많고, 정상 흰쥐 담관으로부터 분리된 섬유모세포(G1)를 배양한 경우 세포질돌기의 수가 가장 적은 것으로 관찰되었다. 또한 정상 담관으로부터 분리된 섬유모세포를 제외한 나머지 실험군에서 모두 섬유모세포의 세포질이 확장되어 부피가 증가하였다. 이러한 결과로 보아 간흡충에 감염되면 물리, 화학적 자극으로 인해 담관의 섬유화가 이루어져, 정상 담관보다 확장된 형태를 보이는 것으로 생각된다. 섬유화로 인해 확장된 담관의 결합조직에 분포하는 섬유모세포는 섬

유화에 의해 감염되지 않은 담관 섬유모세포의 형태에 비해 세포질의 확장, 세포질돌기의 길이, 수적 증가와 같은 형태적 변화가 이루어지는 것으로 추측된다. 정상 담관으로부터 분리된 섬유모세포에 간흡충 분비배설 물질을 첨가하여 배양하였을 때, 정상 섬유모세포는 간흡충의 물리적 자극 뿐 아니라 간흡충에서 분비되는 물질에 대하여도 형태적 변화가 이루어질 수 있는 것으로 보인다. 분비배설 물질을 첨가하여 배양한 섬유모세포의 형태적 변화는 감염된 담관으로부터 분리된 섬유모세포와 유사하지만, 섬유모세포가 분열하는 속도는 정상군에 비해 조금 늦어지고 감염된 경우에 비해 빠르게 이루어지는 것은 물리적 자극이 배제된 상태에서 배양이 이루어졌기 때문이라고 추측된다.

흡충류의 일종인 일본주혈흡충(*Schistosoma japonicum*)과 오히라페흡충(*Paragonimus ohirai*)에서는 표피와 맹관 상피 표면에 sialic acid가 존재하며, sialic acid는 충체가 숙주의 조직 사이로 이동할 때 숙주의 면역계로부터 자신을 방어하고 생존하는데 중요한 역할을 하는 물질로 보고되었다(Fujino & Harata, 1990). 또한 sialic acid는 섬유모세포의 세포표면에 있는 당 단백질 말단의 lectin WGA 수용체이며, 세포 인식과 세포의 물질대사 등 섬유모세포의 다양한 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다(Myllyharju & Nokkala, 1996a, b). 본 연구에서는 sialic acid의 분포를 확인하기 위하여 WGA 황금입자 복합체를 각 실험군에 반응시킨 결과, 각 실험군의 섬유모세포는 황금입자가 소포낭 주변에 주로 분포하였으며, 정상 담관으로부터 분리된 섬유모세포보다 감염된 담관으로부터 분리된 섬유모세포에서 더 많은 황금입자가 표지되었다. 간흡충 분비배설 물질을 첨가하여 배양하였을 경우, 정상과 감염된 경우 유사한 양상이 관찰되었다. 따라서 감염된 담관 섬유모세포와 간흡충 분비배설 물질을 포함하여 배양된 섬유모세포는 기생충의 물리, 화학적 자극에 의해 세포의 물질대사의 변화가 이루어지고, 이러한 세포내 물질대사의 변화에 따라 세포질과, 신생된 세포질 돌기에 sialic acid의 분포가 증가하는 것으로 생각된다. 또한 정상인 경우에서 분비배설 물질에 노출되었을 때 섬유모세포 외부에 존재하는 분비배설 물질이 섬유모세포의 면역작용의 활성을 일으키고, 이에 따라 sialic acid의 증가가 이루어지는 것으로 추측된다.

섬유모세포는 세포질돌기가 형성되는 것이 특징으로 세포질돌기는 섬유모세포의 종류, 배양시간, 환경 등에 따라 다양한 형태로 나타나고, 세포질돌기는 세포질에서 형성된 높은 밀도의 actin을 포함하는 망상구조의 미세섬유로 구성되며 세포표면 형성, 세포운동과 이동, 세포인식 등에 중요한 역할을 한다(Fem, 1985; Damjanov, 1987). 섬유모세포의 증식 억제 확인을 위해 섬유모세포에 Taxol을 처리하면 섬유모세포의 세포질 내에 미세소관이 증가하지만 정상적인 기능을 수행할 수 없는 미세소관 다발들이 형성되기도 한

다(Hamel et al., 1981; Schiff & Horwitz, 1981). 전자현미경을 이용하여 배양된 섬유모세포의 actin 분포를 확인한 결과, 세포표면과 세포질돌기에서 주로 actin이 관찰되었으며, 정상 섬유모세포보다 간흡충에 감염된 섬유모세포에서 actin이 증가하였고, 간흡충 분비배설 물질을 첨가하여 배양한 정상 섬유모세포는 actin이 증가하는 반면, 간흡충 분비배설 물질을 첨가하여 배양한 간흡충 감염 섬유모세포는 상대적으로 actin의 감소가 관찰되었다. 이러한 미세섬유 형성과 세포형태 형성 및 신호전달에 관여하는 actin은 간흡충의 물리 화학적 상해에 의해 actin 합성이 증가하는 것으로 생각된다. 간흡충 분비배설 물질에 대한 섬유모세포의 면역작용으로 actin의 분포양상이 증가되며, 세포질돌기의 길이신장과 수축증가가 이루어지는 것으로 생각된다. 간흡충 감염이 이루어진 후 분비배설 물질이 포함되어 배양된 섬유모세포에서 actin의 분포가 감소하는 것은 이미 진행되었던 간흡충의 물리, 화학적 자극에 분비배설 물질에 의한 손상이 더해져 섬유모세포의 대사과정이 저해된 것으로 추측된다.

이상의 결과로 간흡충에 감염된 담관은 충체의 자극에 의해 담관 결합조직이 손상되어 섬유화가 이루어지고, 섬유화된 결합조직 내의 섬유모세포는 섬유화에 따른 손상을 입는 것으로 생각된다. 또한 간흡충 분비배설 물질을 첨가하여 배양된 섬유모세포에서도 형태적 변이가 확인되었다. 이는 간흡충 분비배설물질이 섬유모세포에 작용하여 섬유모세포의 대사과정에 영향을 미치게 되고, 이는 섬유모세포의 분열양상, 형태적 변이, actin과 sialic acid의 증가를 초래하는 것으로 생각된다.

이상의 결과로써 결합조직을 구성하는 섬유모세포가 간흡충에 감염되면 형태 및 물질대사의 변이가 이루어지고, 변이가 나타난 섬유모세포는 섬유화가 이루어진 담관 결합조직에 침적되어 정상담관에 비해 확장된 형태를 나타내는 것으로 생각된다. 본 연구에서 관찰된 섬유모세포의 형태적 변이는 확장된 담관을 구성하는 결합조직의 섬유모세포가 물리적인 자극 외에 간흡충의 분비배설 물질에 의한 화학적 자극에도 영향을 받는 것으로 추측된다. 따라서 간흡충에 감염되었을 경우 담관 결합조직은 섬유화가 이루어지고, 결합조직 내의 섬유모세포는 물리, 화학적 자극에 의해 형태적 변이와 성장속도의 감소가 일어나 결과적으로 확장된 담관은 정상적으로 회복되기 어려운 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

Albert B, Bray D: Molecular biology of the cell. Garland publishing Inc, New York, pp. 1179-1180, 1994.  
Bhamarapravati N, Thamavit W, Vajrasthira S: Liver changes in

hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini*. Am Soc of Trop Med Hyg 27 : 787-794, 1978.  
Bouchard P, Moroux Y, Tixier R, Monsigny M: An improved method for purification of wheat germ agglutinin (lectin) by affinity chromatography. Biochimie 58 : 1247-1253, 1976.  
Cha SH, Lee JH, Rim HJ: Histopathological changes of the bile duct in the experimental animals by the superinfection of *Clonorchis sinensis*. Korea Univ Med J 28(3) : 741-757, 1991.  
Chen Y, Takizawa N, Crowley JL, Oh SW, Gatto CL, Kambara T, Sata O, Li X, Ikebe M, Luna EJ: F-actin and myosin II binding domains in supervillin. J Biol Chem 278 : 46094-46106, 2003.  
Choi DI, Hong ST, Li S, Chung BS, Lim JH, Lee SH: Bile duct changes in rats reinfected with *Clonorchis sinensis*. Korean J Parasitol 42(1) : 7-17, 2004.  
Damjanov I: Biology of disease: Lectin cytochemistry and histochemistry. Lab Invest 57(1) : 5-20, 1987.  
Fem T: Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrates structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. Nature 314 : 53, 1985.  
Fujino T, Ishii Y, Hirata M: Lectin receptors in the gut epithelium of *Schistosoma japonicum* and *Paragonimus ohirai*. Jpn J Parasitol 39(5) : 455-461, 1990.  
Hamel E, Del Cam Po AA, Lowe MC: Interactions of taxol, microtubule associated proteins, and glanine nucleotides on tubulin polymerization. J Biol Chem 256 : 11887-11894, 1981.  
Hong ST, Park KH, Seo M, Choi BI, Chai JY, Lee SH: Correlation of sonographic findings with histopathological changes of the bile ducts in rabbits infected with *Clonorchis sinensis*. Korean J Parasitol 32(4) : 223-230, 1994.  
Hou PC: The pathology of *Clonorchis sinensis* infestation of the liver. J Pathol Bacteriol 70 : 53-64, 1995.  
Korea Association of Health Promotion(KAHP): Prevalence of intestinal parasitic infections in Korea, The 7th report. Korea Association of Health Promotion, Seoul, pp. 63-66, 2004. (Korean)  
Koumas L, Smith TJ, Feldon S, Blumberg N, Phipps RP: Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes. Am J Pathol 163(4) : 1291-1300, 2003.  
Lee SH, Shim TS, Lee SM, Chi JG: Studies on pathological changes of the liver in albino rats infected with *Clonorchis sinensis*. Korean J Parasitol 16 : 148-155, 1978.  
Min HK, Soh CT: The effect of a carcinogen, dimethylnitrosamine, in cholangiocarcinoma in the albino rats experimentally infected with *Clonorchis sinensis* metacercaria. Yonsei Rep Trop Med 17 : 1-10, 1986.  
Myllyharju J, Nokkala S: Glycoproteins with N-acetylglucosamine and mannose residue in Chinese hamster metaphase chromosomes. Hereditas 124 : 251-259, 1996a.  
Myllyharju J, Nokkala S: Fucosylated glycoproteins in Chinese hamster metaphase chromosomes. Hereditas 125 : 285-288, 1996b.  
Peters BP, Ebisu S, Goldstein IJ, Flashner M: Interaction of wheat



- germ agglutinin with sialic acid. *Biochemistry* 18 : 5505-5511, 1979.
- Schauer R: Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acid. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 40 : 131-234, 1982.
- Schiff PB, Horwitz SB: Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous GTP or microtubule-associated proteins. *Biochemistry* 20 : 3247-3252, 1981.
- Schmidt J, Peters W: Localization of glycoconjugates at the tegument of the tapeworms *Hymenolepis nana* and *H. microstoma* with gold labelled lectins. *Parasitol Res* 73 : 80-86, 1987.
- Spier SS, Schulte BA: Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: A perspective. *J Histochem Cytochem* 40 : 1-38, 1992.
- Sullivan WG, Koep LJ: Common bile duct obstruction and cholangiohepatitis in clonorchiasis. *JAMA* 243 : 2060-2061, 1980.
- Ting HJ, Yeh S, Nishimura K, Chang C: Supravillin associates with androgen receptor and modulates its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 661-666, 2002.

#### < 국문초록 >

간흡충 (*Clonorchis sinensis*)은 우리나라에서 높은 감염률(2.9%)을 나타내는 기생충으로 (KAHP, 2004), 간흡충에 감염된 담관은 간흡충의 흡반에 의한 물리적 자극과 대사산물 및 분비물 등의 화학적 자극에 의해 담관염이 일어나고, 간흡충이 성장할 때 충체 주위의 담관 상피세포의 증식, 탈락, 담관 주위의 염증 및 섬유화가 일어난다. 담관 점막에 분포하는 섬유모세포는 결합조직을 구성하는 세포의 한 종류로서 세포질돌기들이 잘 발달된 형태적 특징이 있으며, 세포질 내에 세포의 형태 유지, 신호전달, 인접세포와의 연결 등에 관여한다. 또한 조직을 발달시키고, 조직이 손상된 부위에서 콜라겐 층을 형성하여 손상된 조직이 복구되도록 하기도 한다. 상처의 반흔 (scar) 형성과 지방축적, 염증 (inflammation) 발생 과정에서 섬유모세포의 작용이 제대로 조절되지 못하면 섬유증 (fibrosis)이 발달하게 된다는 연구 보고도 있다.

본 연구에서는 정상 흰쥐에서 분리된 담관 섬유모세포와 간흡

충 감염 흰쥐에서 분리된 담관 섬유모세포를 배양하고, 각각의 실험군에 간흡충 분비배설 물질 (Cs excretory-secretory product, ESP)을 첨가하여 배양하였다. 배양된 섬유모세포의 미세구조 변화와 세포 표면에 존재하는 sialic acid 및 actin의 분포를 전자현미경으로 관찰하여, 간흡충 감염에 따른 섬유모세포의 변화 및 간흡충 분비배설 물질의 자극에 따른 섬유모세포의 변화를 관찰하여 흰쥐의 담관 섬유모세포와 간흡충 감염과의 연관성을 알아보고자 하였다.

정상 흰쥐 담관에서 분리한 섬유모세포(G1)에 비하여 간흡충에 감염된 흰쥐 담관에서 분리한 섬유모세포(G2)와 간흡충 분비배설 물질을 첨가하여 배양한 섬유모세포(G1-1, G2-1)의 증식 속도가 느린 것이 확인되었다. 세포질돌기의 수는 간흡충에 감염된 흰쥐의 담관으로부터 분리된 섬유모세포(G2)에서 가장 많은 수가 관찰되었고, 배양매지에 분비배설 물질을 첨가하면 정상 담관의 섬유모세포에서도 세포질돌기가 증가하였다. 따라서 간흡충 대사물질은 섬유모세포의 세포질돌기형성을 촉진시키는 것으로 생각된다. 간흡충에 감염된 흰쥐 담관에서 분리한 섬유모세포(G2)의 소포체는 정상 담관에서 분리된 섬유모세포(G1)의 것에 비하여 감소하는 양상을 나타내었고, 여기에 분비배설 물질을 첨가하면 섬유모세포의 소포체가 증가하는 것이 관찰되었다. 그리고 세포표면에 분비되는 sialic acid는 주로 세포질의 소포낭 주변에서 관찰되었으며, 정상 섬유모세포(G1, G1-1)보다 감염된 섬유모세포(G2, G2-1)에서 증가하였다. Actin은 세포표면과 세포질돌기에서 주로 관찰되었으며, 정상 섬유모세포(G1, G1-1)보다 감염된 섬유모세포(G2, G2-1)에서 반응이 증가하였고, 간흡충 분비배설 물질을 첨가하면 G1-1은 반응이 증가하고, G2-1은 반응이 감소하는 것이 관찰되었다.

이상의 결과로 간흡충에 감염된 흰쥐 담관의 섬유모세포는 세포질돌기들이 매우 발달하며, actin단백과 sialic acid가 증가하여 세포변형을 초래하게 된다. 또한 간흡충 감염으로 손상된 담관의 섬유모세포로 구성된 결합조직은 정상으로 회복되지 않으며, 세포질 부피 및 세포질돌기의 증가는 이루어지지만 간흡충 대사물질의 영향으로 섬유모세포의 분열 및 성장 속도가 억제되는 것으로 확인되었다. 이 결과 간흡충 감염으로 손상된 숙주의 담관 결합조직과 섬유모세포들은 간흡충 대사물질에 의하여 변형을 일으키고, 세포 활성 및 증식이 저하되므로 팽대된 담관은 간흡충이 사멸된다 하더라도 원상회복이 불가능할 것으로 생각된다.