

Bacillus Calmette-Guerin (BCG) 투여가 Ehrlich 종양세포를 이식한 생쥐 샘창자 상피세포의 DNA 합성에 미치는 영향

고정식*, 김홍노, 박경호, 박대균, 김덕수
순천향대학교 의과대학 해부학교실

Effects of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) on the DNA Synthesis of Mouse Duodenal Mucosal Epithelial Cells Inoculated with Ehrlich Carcinoma Cells

Jeong-Sik Ko*, Heung-No Kim, Kyung-Ho Park,
Dae-Kyoon Park, Duk-Soo Kim

Department of Anatomy, College of Medicine Soonchunhyang University, Cheonan 331-946, Korea
(Received October 16, 2010; Revised December 17, 2010; Accepted December 20, 2010)

ABSTRACT

This experiment was performed to evaluate the morphological responses of the duodenal epithelial cells of the mouse, inoculated with Ehrlich carcinoma cells in the inguinal area, following administration of Bacillus Calmette-Guerin (BCG).

In the experimental groups, each mouse was inoculated with 1×10^7 Ehrlich carcinoma cells subcutaneously in the inguinal area. From next day after inoculations, 0.2 mL of saline or BCG (0.5 mL/25 g B.W.: $0.03 \times 10^8 \sim 0.32 \times 10^8$ CFU) were injected subcutaneously to the animals every other day, respectively. The day following the 7th injection of saline or BCG, each mouse was injected with a single dose of $0.7 \mu\text{Ci/g}$ of methyl- ^3H -thymidine (25 Ci/mmol, Amersham Lab, England) through tail vein. Seventy minutes after the thymidine injection, animals were sacrificed, and duodenal tissues were taken and fixed in 10% neutral formalin. Deparaffinized sections were coated with autoradiographic emulsion EM-1 (Amersham Lab, England) in a dark room and dried and were placed in a light-tight box. The number of labeled epithelial cells in the duodenal mucosae (mean number of labeled epithelial cells per 3.5 mm length of mucosa) were observed and calculated.

On the light microscopic study, duodenal mucosae had no severe morphological changes following the injection of BCG. In the tumor control and BCG treated groups, a number of small lymphocytes and eosinophile leucocytes are slightly increased as compared with those of the normal control ones. On the autoradiographic study, number of the labeled cells of normal control, tumor control and BCG-treated mice were $632.3 (\pm 14.47)$, $761.7 (\pm 27.65)$ and $505.0 (\pm 17.09)$ respectively.

From the above results, BCG may suppress the DNA synthesis of the duodenal epithelial cells, but does not results severe structural defect on the duodenal mucosae. And it is suggested that BCG may greatly improve the anticancer therapy on certain kind of cancer.

Keywords : Duodenal epithelial cell, BCG (Bacillus Calmette-Guerin), Anticancer drug, Autoradiography, DNA synthesis

* Correspondence should be addressed to Jeong-Sik Ko, Department of Anatomy, College of Medicine Soonchunhyang University, Cheonan 331-946, Korea. Ph.: (041) 570-2472, Fax: (041) 574-1770, E-mail: jeongsik@sch.ac.kr

서 론

결핵예방백신으로 이용되는 BCG (Bacillus Calmette-Guérin)를 투여하면 사람과 실험동물의 경우 일부 항원에 대한 알레르기의 위험을 감소시킨다. 생체에 BCG를 접종하면 창자점막 상피내림프구 (intraepithelial lymphocyte (IEL))가 증가하고 호산성백혈구의 침윤을 유도하여 고유판내 mononuclear 감염세포가 증가하며 혈장내 IgE 농도를 감소시킨다 (Rytönen et al., 2004). 또한 BCG를 투여하면 IgE 생산과 호산성백혈구증가증 (eosinophilia) 및 슬잔세포의 발생이 현저히 억제되며, ovalbumin으로 면역을 시키면 BCG를 투여한 생쥐가 BCG를 투여하지 않은 생쥐에 비해 IFN- γ 를 현저히 많이 생산하며, 이러한 결과는 BCG 감염이 주위 환경의 항원에 의해 유도된 항원특이 IgE 생산을 억제하였으며 T 림프구의 사이토카인 (cytokine) 생산 패턴이 변하였기 때문이라 한다 (Yang et al., 1999). BALB/c 생쥐에 지질 (lipid)을 입힌 BCG를 구강으로 투여하면 투여된 BCG가 창자간막림프절에서 주로 관찰되나 목림프절과 Peyer 반점에서도 관찰되며, 체계적인 세포매개 면역반응이 일어나서 세균 감염으로부터 생체를 보호한다 (Aldwell et al., 2005).

또한 BCG는 세포독성 T세포를 억제하는 큰포식세포와 같은 억제세포 (suppressor cell)가 지라내에 발달하기 때문 (Klimpel & Henney, 1978)에 방광암환자의 방광에 투여하면 종양의 재발생율이 현저히 감소한다 (El-Demiry et al., 1987). Ratliff et al. (1987)은 가슴샘이 없는 nude mouse를 이용한 실험에서 BCG를 방광내에 투여하였을 때의 항암작용에는 BCG에 감각된 지라의 림프구가 필요한 것으로 보아 가슴샘의존면역반응이 필요하다고 하였다. 위암환자의 경우에도 화학요법 (FAM; 5-Fluorouracil+Adriamycin+Mitomycin C)을 단독으로 시행한 경우에 비해 화학요법과 더불어 면역요법제로서 BCG를 함께 투여하면 항암성인 사이토카인이 증가한다 (Popiela et al., 1988; Zembala et al., 1993). 면역요법으로서 BCG를 사용하면 alpha-interferon에 비하여 종양의 재발생률을 현저히 낮출 뿐 아니라 BCG와 함께 비타민 (A, B₆, C, E)을 대량으로 투여하면 이들 비타민이 면역방어력을 향상시켜서 자연살해세포 (natural killer cell)의 활성을 높여 주어 종양의 재발생률이 더욱 낮아진다 (Lamm et al., 1994; Lamm, 1995).

세포갱신에 대한 연구에는 ³H-thymidine을 많이 이용하는데, thymidine은 DNA에만 함유되어 있는 물질로서 thymidine pool에 저장되어 있다가 세포분열시에 DNA합성에만 이용되기 때문에 DNA의 전단계물질인 ³H-thymidine을 투여하면 증식기 세포핵에 표지되어 나타난다. 또한 ³H는 방사능에너지가 낮은 β 선을 방출하므로 그 해상력이 매우 우수하여 자기방사법적 연구에 많이 쓰이고 있다 (Helpap et

al., 1981; Tielemans et al., 1989; Ryberg et al., 1990; Karam & Leblond, 1993).

소화기계통을 이루는 위창자는 상피세포의 세포생물학 주기가 짧기 (Cameron, 1971) 때문에 항암치료과정에서 육지기를 비롯한 소화장애 등 부작용이 심한 장기이다 (Gilman et al., 1985; Clark et al., 1992). 샘창자도 위와 함께 스트레스, 감염 및 종양 등의 질병상태에 따라 민감하게 반응하는 장기이다 (Rubio et al., 1988; Varedi et al., 1999; Martins et al., 2001). 한편 위암환자에게 화학요법 (FAM)을 단독으로 시행한 경우에 비해 화학요법과 더불어 면역요법제로서 BCG를 함께 투여하면 항암성인 사이토카인이 증가한다 (Popiela et al., 1988; Zembala et al., 1993)는 보고 등으로 보아 종양세포를 이식한 후 BCG만을 투여하였을 경우에도 위점막 상피세포는 물론 샘창자점막도 상피세포의 기능적 및 형태학적 변화가 예상된다. 따라서 Ehrlich 종양세포를 살부위에 이식한 후 고농도의 BCG를 피부밑조직에 반복 투여하였을 때 샘창자점막 상피세포에 미치는 영향을 형태학적 변화뿐 아니라 DNA합성능을 비교 관찰하여 종양치료과정에 따른 샘창자점막의 변화를 연구하는 데 기본정보를 제공하고자 이 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

실험동물로는 체중 25g 내외의 ICR 흰생쥐를 사용하였으며 이들을 정상대조군, 종양세포이식대조군 (종양대조군) 및 종양세포이식 후 BCG투여군 (BCG투여군)으로 나누었으며, 각 실험군당 5마리씩의 동물을 사용하였다. 정상대조군 이외의 종양대조군과 BCG투여군의 동물들은 살부위 피하에 각각 1×10^7 의 Ehrlich 종양세포를 이식하였다. BCG투여군은 종양세포이식 다음날부터 방광암 치료용으로 사용되는 농축 건조된 BCG ($0.6 \times 10^8 \sim 6.4 \times 10^8$ CFU, 27 mg/vial, Connaught Lab. Canada)를 10 mL의 생리식염수에 용해시킨 다음, 일정량 (0.5 mL/25 g B.W.: $0.03 \times 10^8 \sim 0.32 \times 10^8$ CFU)을 하루건너 한 번씩 피부밑조직에 주사하였다. 종양대조군은 암세포이식 후에 약제 대신 0.2 mL의 생리식염수를 피부밑조직에 주사하였고, 정상대조군은 암세포를 이식하지 않은 동물을 사용하였다. 실험동물은 생리식염수 또는 BCG를 각각 하루건너 한 번씩 7회 투여한 후, 다음날 에테르 (ether) 마취하에 앞배벽을 열어 샘창자조직을 절취하였다. 실험에 사용된 동물들은 모두 희생시키기 전날 저녁부터 사료는 주지 않고 물만 공급하였다. 자기방사법적 관찰을 위해서는 모든 실험동물을 마지막 주사 후, 일주기에 따른 변화를 최소화하기 위하여 다음 날 오전 9시에서 10시 사이에 ³H-thymidine (methyl-³H-thymidine: specific activity 25 Ci/mmol, Amersham Lab., England) 0.7 μ Ci/gm를 꼬리에 한 차례 정

맥주사하고, 70분 후 도살하여 썬창자조직을 떼어내어 10% 포르말린에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법에 따라 수세 및 탈수한 후 파라핀에 포매하였고, 절편을 만들어 젤라틴을 입힌 슬라이드에 부착시킨 다음 파라핀을 제거하고 암실에서 감광유제 (autoradiographic emulsion EM-1, Amersham Lab., England)를 입혀 건조시켰다. 감광유제를 입힌 표본은 4°C 냉암소에서 5주일간 노출시켰고, D-19 (Kodak, USA)로 현상한 다음, Meyer's hematoxylin으로 핵을 염색하여 영구표본을 만든 후 광학현미경으로 관찰하였다. 관찰 방법으로는 썬창자조직이 세로로 잘 절단된 부위의 창자샘 부위를 택하여 점막근육판을 따라 250배율로 관찰하되, 집안렌즈의 사진촬영용 직사각형의 긴 쪽 길이(0.3 mm) 내에 보이는 창자샘조직을 한 시야로 하여 각각 10시야씩 (점막 길이 3.5 mm) 관찰하였다. 창자샘을 이루는 세포 가운데 5개 이상의 은입자가 있는 세포를 표지세포로 간주하여 계수하였으며, 통계분석은 SPSS (Ver 13.0)을 이용하여 일원배치분산분석 (One-way ANOVA)을 시행하였고, 일반조직 관찰을 위해서는 hematoxylin-eosin (H-E)염색을 시행하였다.

결 과

1. 일반조직 관찰

정상대조군 썬창자의 점막은 단층원주형의 상피세포와 성긴결합조직의 고유판과 얇은 점막근육판으로 이루어졌는데 점막의 표면에는 길이 약 380 μm인 손가락모양의 창자용모가 돌출되어 있었다. 용모 사이에는 상피세포들이 고유판 속으로 함몰되어 창자움 (intestinal crypt)을 이루었는데, 창자움은 단순대롱형 썬이며 썬의 깊이가 약 110 μm로서 용모의 길이에 비하여 짧았다. 용모 상피세포의 표면에는 줄무늬가장자리 (striated border)가 비교적 뚜렷이 구별되었으며 술잔세포 (goblet cell)가 사이사이에 관찰되었다. 이 실험에서는 BCG를 투여한 후 썬창자점막 상피세포의 DNA 합성 능력에 미치는 영향을 관찰하기로 하였기 때문에 점막상피의 생성부위인 창자움 부위를 주로 관찰하였다. 창자움의 썬상피는 용모상피와 마찬가지로 단층원주형 세포로 구성되어 있었는데 상피세포 사이에 술잔세포들이 끼어 있었고, 상피세포 속에서 림프구가 소수 관찰되기도 하였다. 또한 유사분열중인 핵들과 함께 바닥부위에서 붉은 과립을 함유하고 있는 호산성과립세포 (Paneth cell)가 소수 관찰되었으며, 창자움의 썬상피주위의 고유판은 성긴결합조직으로 이루어졌다 (Fig. 1).

종양대조군의 경우 조직학적 구조는 정상대조군에 비하여 고유판에서 림프구와 호산성백혈구가 비교적 많이 관찰된 것 외에는 정상대조군 소견에 비하여 별다른 차이가 없었

Table 1. Relative number of labeled cells in the area of 3.5 mm width (6 μm thickness) of intestinal gland of mouse duodenum, after injection of ³H-thymidine in different groups

Group	Number	Ratio	
		Experiment/ normal	Experiment/ tumor control
Normal control	632.3 (±14.47)	1.00	0.83
Tumor control	761.7 (±27.65)	1.20*	1.00
BCG	505.0 (±17.09)	0.80*	0.66

Numbers in parenthesis denote standard deviation of means.

*Difference between normal control and BCG treated groups, and normal control and tumor control groups are significant at $p < 0.05$ from the results of One-way ANOVA.

다 (Fig. 3). 또한 BCG투여군의 경우 조직학적 구조가 종양대조군의 소견과 유사하였다 (Fig. 5).

2. 자기방사표본의 관찰

정상대조군, 종양대조군 및 BCG투여군의 썬창자조직에는 은입자들이 세포핵 위에서 관찰되었으며 은입자가 표지된 세포들은 주로 창자샘의 상피세포에서 관찰되었는데 특히 창자샘의 아래쪽부위에서 더 많이 관찰되었으며, 용모부위의 상피세포에서는 거의 관찰되지 않았다. 그러나 정상대조군과 종양대조군은 용모와 창자샘의 고유판에서 표지세포가 비교적 자주 관찰되었으나 BCG투여군에서는 매우 드물게 관찰되었다. 이 실험에서는 썬창자점막 상피세포의 상대적인 DNA 합성정도를 관찰하기로 하였기 때문에 일정한 면적의 썬창자 창자샘의 상피세포에서 관찰되는 은입자가 표지된 세포의 수를 헤아렸다.

정상대조군의 경우 창자샘상피에 출현하는 표지세포는 점막길이 3.5 mm당 632.3개가 관찰되었는데 은입자의 수가 많아서 은입자의 수를 구별하기 어려운 세포가 많았다 (Table 1, Fig. 2). 종양대조군은 점막길이 3.5 mm 당 761.7개가 관찰되어 정상대조군에 비하여 120% 더 많았으며 은입자의 수가 많아서 치밀하게 밀집되어있는 세포가 많았다 (Table 1, Fig. 4). BCG투여군은 점막 길이 당 표지세포수가 505.0개로서 정상대조군의 80%로 감소하였고, 종양대조군에 비하여는 66%로 유의하게 감소하였다 (Table 1, Fig. 6).

고 찰

썬창자를 비롯한 창자의 점막상피는 세포갱신이 왕성하여 생쥐의 경우 세대교체시간이 3일 정도밖에 되지 않는 것으로 알려져 있다 (Stevens & Leblond, 1953; Cameron, 1971). 설치류의 창자점막에 대한 자기방사법적 연구에서 성체는 상피세포의 증식이 창자움 (intestinal crypt)에서만 일어나

발생단계에서는 용모에서도 일어난다(Beaulieu & Calvert, 1987). 나이에 따라서도 세포는 증식정도에 차이를 보이며, 흰쥐의 경우 작은창자점막의 상피세포는 젊은 쥐에 비하여 늙은 쥐에서 더욱 활발하게 증식한다(Holt & Yeh, 1989). 또한 사람에서 노인이 젊은 사람에 비하여 점막상피세포의 증식이 많이 일어나나 미성숙세포가 많고 세포자멸사(apoptosis)가 많이 일어나기 때문에 전체적으로 점막상피세포의 구조에는 큰 차이가 없으며, 나이가 증가함에 따라 흡수기능이 감소하는 것은 세포가 긴장상태가 되기 때문이라고 한다(Ciccocioppo et al., 2002). 그러나 유아와 성인을 비교하였을 때 유아의 작은창자의 용모면적은 성인의 것과 유사하였으나 창자움의 길이는 성인 것보다 31%나 더 길었고, 유사분열지수도 유아가 성인보다 68%나 더 높았으나 상피세포의 길이는 성인의 것보다 다소 짧았다(Thompson et al., 1998).

샘창자는 음식물이나 스트레스에 의해서도 형태적으로 변화하는데 흰쥐를 굶긴 후 음식을 주었을 때 샘창자는 상피세포의 증식이 활발하고 세포자멸사(apoptosis)가 감소하며 상피세포의 탈락이 촉진되었다(Martins et al., 2001). 한편 뜨거운 물로 몸표면에 화상을 입히는 스트레스를 주었을 때 흰쥐의 샘창자 용모의 폭과 창자샘의 면적이 현저히 감소하였으며, 용모상피세포는 그 모습이 원주형에서 입방형으로 변화했다(Varedi et al., 1999). 또한 인위적으로 운동을 억제하였을 때 위턱샘, 위샘 및 샘창자샘은 점액다당류가 감소하고 창자점막에 분포하는 술잔세포내에 공포가 출현하였다(Groza et al., 1979). 또 흰쥐를 물속에 잠그거나 수영을 시키는 등 스트레스를 주었을 때는 위 창자점막의 DNA 합성율이 감소하였으나 스트레스 기간이 길어지면 적응 및 보상작용에 의해 DNA 합성율이 회복되었다(Rubio et al., 1988). 한편 만성간염이나 간경화 등 간에 질환이 있을 때는 샘창자의 점막이 위축되는 현상을 관찰할 수 있었는데, 이와 같은 현상은 샘창자움의 세포증식이 억제되기 때문이라고 한다(Gerlovich et al., 1977).

이 실험에서 종양대조군과 BCG투여군의 경우 정상대조군에 비하여 창자샘의 고유판에서 림프구와 호산성백혈구가 비교적 많이 관찰된 것 외에는 조직학적 구조가 정상대조군 소견에 비하여 별다른 차이가 없었는데, 이와 같은 결과는 BCG를 7회 정도 투여해서는 생체에 심한 스트레스를 주었을 때에 비하여 샘창자점막에 주는 손상의 정도가 미약했기 때문이라고 추측된다.

이 연구에서 BCG 반복투여가 샘창자 점막상피세포의 DNA합성에 미치는 영향을 비교하기 위하여 실험동물에 ^3H -thymidine을 주사하였으며, 특히 하루주기에 따른 변화를 최소화하기 위하여 모든 실험동물을 오전 9시에서 10시 사이에 ^3H -thymidine을 꼬리정맥에 주사하였다. 이 실험에서 창자움의 아래쪽에서 방사성표지세포가 가장 많이 관찰

된 결과는 창자의 경우 창자샘의 바닥부분에서 새로운 세포가 생겨서 위쪽으로 이동한다는 사실(Chung, 2001)에 비추어 볼 때 타당한 결과라고 생각한다.

종양대조군은 자기방사표본 관찰에서 표지세포 수가 정상대조군의 120%로 증가하였으며, 일부 세포는 표지된 은입자가 너무 많아서 각각의 은입자들을 구별할 수 없는 세포들이 많았다. 이와 같은 결과는 EA21a 유방암조직을 이식한 생쥐의 경우 암세포를 이식하면 생체내의 면역기전이 창자움을 구성하는 상피세포의 분열능력을 조절하는 기전에 혼란을 주기 때문에 세포분열이 증가하였다는 보고(Barbeito et al., 2002)에 비추어 볼 때 타당한 결과라고 생각된다. 또 지라조직에서는 암세포를 생체에 이식한 실험대조군의 경우 방사성표지세포의 수가 정상대조군에 비하여 약 10% 정도 증가하였다는 보고(Ko et al., 2000)에 비추어 볼 때 샘창자조직은 지라조직에 비하여 암세포이식과 같은 생체내 이물질 침입에 더욱 예민하게 반응하는 것 같다.

BCG는 *Mycobacterium bovis*의 독성을 약화시킨 것으로서 Mathe et al. (1974)이 암과 백혈병환자에 대한 치료에 면역역자극물질로서 처음 이용하였으며, 근래에는 표면방광암치료에 보조제로 사용되고 있다. 표면방광암환자의 방광내에 BCG를 투여하면 BCG는 비특이적 감염반응을 보여 종양조직을 부분적으로 떨어져나가게 할 뿐 아니라 자연살해세포의 활성을 증가시키고, 사이토카인(IFN- γ , IL-2, TNF- α)을 분비하도록 하여 종양조직의 증식을 억제한다(Chirigos, 1992). 그러나 많은 양(100 mg ($9.6 \times 10^8\text{ CFU}$)/ 30 g)의 BCG를 생쥐의 복강내에 투여하였을 때 동물들이 5일안에 모두 사망하였고, 사망한 동물들을 부검한 결과 육안적으로는 간, 콩팥 및 림프절은 정상이나 지라가 쭈그러져 있었다는 보고(DeHaven et al., 1992)에 비추어 볼 때 BCG를 과량 투여하면 생체에 치명적인 영향을 준다고 생각된다. 그러나 투여량을 반으로 줄여 50 mg ($4.8 \times 10^8\text{ CFU}$)/ 30 g 을 투여하였을 때는 체중은 감소했으나 모두 생존하였으며, 주사 후 15일 정도 지나면 체중도 정상으로 회복되었다(DeHaven et al., 1992). 그러나 같은 동물에 2회 반복하여 50 mg ($4.8 \times 10^8\text{ CFU}$)/ 30 g 의 BCG를 주사하였을 때는 모두 사망하였는데, BCG를 반복 주사한 동물들이 사망한 원인은 과민반응에 의한 것 같으며 BCG를 반복 주사하였을 때의 LD_{50} 의 양은 약 10 mg ($0.96 \times 10^8\text{ CFU}$)이었다(DeHaven et al., 1992).

이 실험에서는 BCG를 하루 간격으로 7회 계속 주사하였으나 사망한 동물이 한 마리도 없었는데 그 이유는 매회 투여량($0.5\text{ mL}/25\text{ g B.W.}$: $0.03 \times 10^8 \sim 0.32 \times 10^8\text{ CFU}$)이 BCG의 LD_{50} 의 양에 비해 매우 적었기 때문인 것 같다. 그러나 이 실험에서 비록 투여량은 적었을지라도 여러 번(7회)에 걸쳐 반복 주사하였기 때문에 미약하나마 지연성과민반응이 유발되었으리라고 생각된다. 과민반응은 T림프구가 자극되어 림프카인을 생산하여 일련의 염증반응을 매개한다는

사실(Roitt et al., 1993)에 비추어 볼 때, BCG를 반복 투여함으로써 유발된 과민반응이 샘창자 창자샘의 DNA 합성에 억제적으로 작용한 것으로 추측된다. 또한 이 실험에서 BCG 투여군의 경우, 표지세포의 수가 정상대조군의 80%로 유의하게 감소하였는데 BCG는 자연살해세포의 활성을 증가시키고, 사이토카인(IFN- γ , IL-2, TNF- α)을 분비하도록 하여 종양조직의 발달을 억제한다는 보고에 비추어 볼 때 BCG의 반복 투여가 샘창자 점막상피세포의 DNA 합성을 억제하였다고 추측된다. 그러나 이와 같은 결과가 과민반응에 의한 결과인지 또는 BCG 자체의 독성에 의한 것인지를 밝히기 위해서는 좀 더 자세한 연구가 필요하다.

이상의 결과를 종합해보면 Ehrlich 종양세포를 이식한 동물에 BCG를 반복 투여하면 샘창자 점막상피세포의 DNA 합성을 유의하게 억제하면서도 형태적인 변화가 경미하였으며, 이러한 실험결과로 보아 BCG는 항암치료시 항암효과를 높일 수 있는 약제라고 생각된다.

참 고 문 헌

- Aldwell FE, Baird MA, Fitzpatrick CE, McLellan AD, Cross ML, Lambeth MR, Buchan GS: Oral vaccination of mice with lipid-encapsulated Mycobacterium bovis BCG: anatomical sites of bacterial replication and immune activity. *Immunol Cell Biol* 83(5) : 549-553, 2005.
- Barbeito CG, Albarenque SM, Reyna JC, Flamini MA, Laube PF, Badran AF: Mitotic activity of the duodenal crypt enterocytes in mice transplanted with EA21a mammary carcinoma. *Cell Biol Int* 26(1) : 123-125, 2002.
- Beaulieu JF, Calvert R: Hormonal regulation of epithelial cell proliferation in the fetal mouse duodenum in vitro. *Anat Rec* 217(3) : 250-255, 1987.
- Cameron IL: Cell proliferation and renewal in the mammalian body. In: Cameron IL, Thrasher JD, eds, *Cellular and Molecular Renewal in the Mammalian Body*, pp. 45-79, Academic Press, New York, 1971.
- Chirigos MA: Immunomodulators: Current and future development and application. *Thymus* 19(suppl 1) : S7-S20, 1992.
- Chung JW: *Human tissue biology*. Soononsa Publishing, Seoul, pp. 538, 674-675, 2001. (Korean)
- Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Luinetti O, Rossi M, Cifone MG, Corazza GR: Small bowel enterocyte apoptosis and proliferation are increased in the elderly. *Gerontology* 48(4) : 204-208, 2002.
- Clark WG, Brater CD, Johnson AR: *Goth's medical pharmacology*. 13th ed. Mosby Year Book, St. Louis, pp. 704-714, 1992.
- DeHaven JI, Traynellis C, Rigg DR, Ting E, Lamm DL: Antibiotic and steroid therapy of massive systemic Bacillus Calmette-Guerin toxicity. *J Urol* 147 : 738-742, 1992.
- El-Demiry MIM, Smith G, Ritchie AWS, James K, Cumming JA, Hargreave TB, Chisholm GD: Local immune responses after intravesical BCG treatment for carcinoma in situ. *Brit J Urol* 60 : 543-548, 1987.
- Gerlovich ESh, Iakhontova OI, Puzyrev AA, Shul'man VSh, Kazaev IS: Proliferative properties of the epithelium of the duodenal mucosa in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Arkh Patol* 39(1) : 43-47, 1977.
- Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F: *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 7th ed. Macmillan Pub Co, New York, pp. 1240-1306, 1985.
- Groza P, Bordeianu A, Cananau S, Ungureanu D, Dragomir CT: The gastrointestinal tract in hypokinetic rats. *Life Sci Space Res* 17 : 199-204, 1979.
- Helpap B, Hattori T, Gedigk P: Repair of gastric ulcer. A cell kinetic study. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 392 : 159-170, 1981.
- Holt PR, Yeh KY: Small intestinal crypt cell proliferation rates are increased in senescent rats. *J Gerontol* 44(1) : B9-14, 1989.
- Karam SM, Leblond CP: Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. I. Identification of proliferative cell types and pinpointing of the stem cell. *Anat Rec* 236 : 259-279, 1993.
- Klimpel GK, Henney CS: BCG-induced suppressor cells I. Demonstration of a macrophage-like suppressor cell that inhibits cytotoxic T cell generation in vitro. *J Immunol* 120 : 563-569, 1978.
- Ko JS, Ahn ET, Park KH, Kim JG, Kim EH, Chung YS: Effects of antitumor agents on the spleen of mouse implanted with ehrlich carcinoma cells: An autoradiographic study. *Korean J Anat* 33(3) : 315-326, 2000. (Korean)
- Lamm DL: BCG in perspective: Advances in the treatment of superficial bladder cancer. *Eur Urol* 27(suppl 2) : 2-8, 1995.
- Lamm DL, Riggs DR, DeHaven JI: Enhanced natural killer(NK) cell activity with BCG and vitamin treatment (abstract 991). *J Urol* 151 : 475A, 1994.
- Martins MJ, Hipolito-Reis C, Azevedo I: Effect of fasting on rat duodenal and jejunal microvilli. *Clin Nutr* 20(4) : 325-331, 2001.
- Mathe G, Halle-Pannenko O, Bourut C: Immune manipulation by BCG administered before or after cyclophosphamide for chemioimmunotherapy of L1210 leukemia. *Eur J Cancer* 10 : 661-670, 1974.
- Popiela T, Zembala M, Kulig J, Czupryna A, Uracz W: Postoperative immunochemotherapy (BCG+5-FU) in advanced gastric cancer. *Anticancer Res* 8 : 1423-1428, 1988.
- Ratliff TL, Gillen D, Catalona WJ: Requirement of a thymus dependent immune-response for BCG-mediated antitumor activity. *J Urol* 137 : 155-158, 1987.
- Roitt I, Brostoff J, Male D: *Immunology*. 3rd ed. Mosby-Year Book, London, pp. 33-44, 1993.
- Rubio CA, Sveander M, Tornling G, Uribe A: DNA synthesis in the gastroduodenal mucosa during acute and chronic stress in the rat. *In Vivo* 2(2) : 143-146, 1988.
- Ryberg B, Tielemans Y, Axelson J, Carlsson E, Hakanson R, Mattsson H, Sundler F, Willems G: Gastrin stimulates the self replication rate of the enterochromaffin-like cells in the rat stomach. *Gastroenterology* 99 : 935-942, 1990.

- Rytönen J, Karttunen TJ, Karttunen R, Valkonen KH, Björkstén B, Kokkonen J: BCG vaccine modulates intestinal and systemic response to beta-lactoglobulin. *Pediatr Allergy Immunol* 15(5) : 408-414, 2004.
- Stevens CE, Leblond CP: Renewal of the mucous cell in the gastric mucosa of the rat. *Anat Rec* 115 : 231-243, 1953.
- Thompson FM, Catto-Smith AG, Moore D, Davidson G, Cummins AG: Epithelial growth of the small intestine in human infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 26(5) : 506-512, 1998.
- Tielemans Y, Hakanson R, Sundler F, Willems G: Proliferation of enterochromaffin like cells in omeprazole-treated hypergastrinemic rats. *Gastroenterology* 96 : 723-729, 1989.
- Varedi M, Greeley GH Jr, Herdon DN, Englander EW: A thermal injury-induced circulating factor(s) compromises intestinal cell morphology, proliferation, and migration. *Am J Physiol* 277(1 pt 1) : G175-182, 1999.
- Yang X, Wang S, Fan Y, Zhu L: Systemic mycobacterial infection inhibits antigen-specific immunoglobulin E production, bronchial mucus production and eosinophilic inflammation induced by allergen. *Immunology* 98(3) : 329-337, 1999.
- Zembala M, Czupryna A, Wieckiewicz J, Jasinski M, Pryjma J, Ruggiero I, Siedlar M, Popiela T: Tumour-cell-induced production of tumour necrosis factor by monocytes of gastric cancer patient receiving BCG immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 36 : 127-132, 1993.

< 국문 초록 >

이 실험은 Ehrlich 종양세포를 살부위에 이식한 후 고농도의

BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*)를 피부밑조직에 반복 투여하였을 때, 샘창자점막의 형태학적 변화와 함께 DNA합성지수를 비교 연구하고자 ^3H -thymidine을 투여한 후 자기방사법적 연구를 시행하였다.

실험동물로는 체중 25g 내외의 ICR 흰생쥐를 사용하였으며 정상대조군을 제외한 종양대조군과 BCG투여군의 동물에는 살부위 피부밑조직에 각각 1×10^7 의 Ehrlich 종양세포를 이식하였다. BCG투여군은 종양세포이식 다음날부터 농축 건조된 BCG를 생리식염수에 용해시킨 다음, 일정량을 하루건너 한 번씩 7회 피부밑조직에 주사하였다. 종양대조군은 종양세포이식 후에 생리식염수를 하루건너 한 번씩 7회 피부밑조직에 주사하였고, 정상대조군은 종양세포를 이식하지 않은 동물을 사용하였으며 각 군에는 5마리씩의 동물을 배정하였다. 자기방사법적 관찰을 위하여는 약제를 마지막으로 주사한 다음날 ^3H -thymidine 0.7 $\mu\text{Ci/gm}$ 를 꼬리에 한차례 정맥주사하고, 70분 후 도살하여 샘창자조직을 떼어내어 10% 포르마린으로 고정하였다. 관찰은 샘창자조직이 세로로 잘 절단된 창자음 부위를 택하여 점막근육판을 따라 점막길이 3.5 mm의 창자샘상피에 분포하는 ^3H -thymidine 표지세포의 수를 계수하였으며, 일반조직 관찰을 위해서는 hematoxylin-eosin (H-E)염색을 시행하였다.

일반조직관찰에서 종양대조군과 BCG투여군은 정상대조군에 비해 샘창자 점막 고유판에 림프구와 호산성백혈구가 다수 관찰된 것 이외에는 형태적으로 큰 변화를 볼 수 없었다. 자기방사법적 연구에서 정상대조군, 종양대조군 및 BCG투여군은 점막길이 3.5 mm 당 출현하는 표지세포수가 각각 $632.3 (\pm 14.47)$, $761.7 (\pm 27.65)$ 및 $505.0 (\pm 17.09)$ 개였다.

이상의 결과를 종합해보면 Ehrlich 종양세포를 이식한 생쥐에 BCG를 반복 투여하면 샘창자 점막상피세포의 DNA합성을 유의하게 억제하면서도 형태적인 변화가 경미하였으므로 BCG는 항암치료시 항암효과를 높일 수 있는 좋은 약제라고 생각된다.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Hematoxylin-eosin stained duodenal crypts of a normal mouse ($\times 400$). Some Paneth cells (P) with eosinophilic granules are seen in the bottom of the intestinal crypts, and mitotic figures (M) are seen in the duodenal epithelial cells. A ganglion cell (G) is seen between longitudinal and circular muscular layer.

Fig. 2. An autoradiogram of the duodenal crypts of a normal mouse ($\times 400$). The labeled cells containing massive (arrow) or moderate amount (arrowhead) of silver grains are seen over the nuclei of the epithelial cells.

Fig. 3. Hematoxylin-eosin stained duodenal crypts of a tumor control mouse ($\times 400$). Some Paneth cells (P) containing eosinophilic granules are seen in the bottom of the intestinal crypts. Some intraepithelial lymphocytes (arrow) and mitotic figures (M) are seen in the duodenal epithelial cells. The number of small lymphocyte (L) is increased as compared with those seen in the normal control ones. A ganglion cell (G) is seen between longitudinal and circular muscular layer.

Fig. 4. An autoradiogram of the duodenal crypts of a tumor control mouse ($\times 400$). Number of the labeled cells with massive silver grains (arrow) are increased as compared with those of normal control ones.

Fig. 5. Hematoxylin-eosin stained duodenal crypts of a mouse, treated with BCG ($\times 400$). Some intraepithelial lymphocytes (arrow), mitotic figures (M) and Paneth cells (P) are seen in the intestinal crypts, and some eosinophile leucocytes (E) and a number of small lymphocytes (L) are seen in the lamina propria. A ganglion cell (G) is seen between longitudinal and circular muscular layer.

Fig. 6. An autoradiogram of the duodenal crypts of a mouse, treated with BCG ($\times 400$). Number of the labeled cells and amount of the silver grains (arrow) are decreased as compared with those of normal control ones.

