

5-Fluorouracil, Mitomycin C 및 Acriflavine-Guanosine 복합제가 Ehrlich 암세포를 이식한 생쥐 위점막 점액상피세포의 미세구조에 미치는 영향

고은주, 박경호, 박대균, 김덕수, 고정식*

순천향대학교 의과대학 해부학교실

Ultrastructural Alterations in the Gastric Mucous Epithelial Cells of Mouse Inoculated with Ehrlich Carcinoma Cells, Induced by 5-Fluorouracil, Mitomycin C or Acriflavine-Guanosine Compound (AG60)

Eun-Ju Ko, Kyung-Ho Park, Dae-Kyoon Park, Duk-Soo Kim, Jeong-Sik Ko*

Department of Anatomy, College of Medicine, Soonchunhyang University, Cheonan, 330-090 Korea

(Received December 23, 2010; Revised March 23, 2011; Accepted March 23, 2011)

ABSTRACT

This experiment was performed to evaluate the morphological responses of the gastric epithelial cells of the mouse, inoculated with Ehrlich carcinoma cells in the inguinal area, following administration of 5-fluorouracil, mitomycin C or Acriflavine-Guanosine compound (AG60).

In this study, 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, 5-fluorouracil (30 mg/kg), mitomycin C (400 μ g/kg) or AG60 (30 mg/kg) were injected to the animals every other day, respectively. Each animals were sacrificed after 7th injection and tissue were taken from the gastric mucosa. Thereafter, the ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. In the 5-fluorouracil-, mitomycin C- or AG60-treated mice, myelin figures and multivesicular bodies within the gastric mucous epithelial cells were observed more frequently than those of the normal control. In the 5-fluorouracil-treated mice, membrane structures containing a few mucous granules in the luminal space were observed. Indeed, bulging cytoplasmic process containing mucous granules protruding into the gastric lumen were observed in the mitomycin C-treated mice.

Therefore, this study suggested that AG60 as compared with 5-fluorouracil and mitomycin C may effective medicine without damage to the secretion ability of gastric mucous epithelial cells.

Keywords : AG60, gastric epithelial cells, 5-fluorouracil, mitomycin C, ultrastructure

* Correspondence should be addressed to Jeong-Sik Ko, Department of Anatomy, College of Medicine, Soonchunhyang University, Cheonan, 330-090 Korea. Ph.: (041) 570-2472, Fax: (041) 574-1770, E-mail: Jeongsik@sch.ac.kr

서 론

점액상피세포는 위점막의 잘록부분(isthmus)에서 증식 분화되어 위쪽으로 이동하는데 수명이 다된 세포들은 속공간으로 배출된다. 마우스 위점막의 점액상피세포는 위오목에 분포하는 세포에 비하여 속공간쪽 점막표면에 분포하는 세포가 점액과립을 많이 포함하고 있다(Helander, 1981). ³H-thymidine을 이용한 자기방사법적 연구를 통해서 위점막을 이루는 세포들 중에서도 점액상피세포는 세대교대시간이 매우 짧아 3일 정도밖에 걸리지 않는 것으로 알려져 있다(Cameron & Thrasher, 1971; Helander, 1981; Lee & Leblond, 1985; Magami et al., 2002). 미성숙 점액상피세포를 비롯한 미분화세포들은 잘록부분의 아래 부분 또는 목 부위의 위쪽에 분포하는데 점액상피세포는 점막쪽으로, 목점액세포는 목 아래쪽으로 갈수록 성숙된 모습을 보인다(Kataoka & Sakano, 1984; Kataoka et al., 1984).

5-fluorouracil은 세포주기에서 특정과정의 진행을 막는 항대사성물질로서 pyrimidine nucleotide의 합성을 억제할 뿐 아니라 핵산의 합성을 방해하여 세포의 성장을 억제함으로써 종양치료제로 사용된다. 또한 5-fluorouracil은 항암치료나 혈구형성에 중요한 역할을 할 수 있는 혈소판활성인자(platelet activating factor)의 생산을 조절하는데 관여한다(Denizot et al., 1995). 그러나 대부분 간에서 우라실(uracil)과 같은 경로로 파괴되며 혈중반감기가 10~20분으로 비교적 빨리 혈장에서 제거된다. 종양치료시에 볼 수 있는 부작용으로는 백혈구감소 및 혈소판감소가 나타나며 며칠 내에 회복되며, 위장관 점막의 궤양, 탈모증, 피부염 및 피부색소 침착 등이 있다(Gilman et al., 1985; Clark et al., 1992).

한편 mitomycin C는 *Streptomyces caepitosus*에서 추출한 항암성항생제로서 세포 내에서 퀴논(quinone)이 환원된 후 알킬(alkyl)화 작용을 나타낸다. DNA구조 내에서 퀴논과 시토신(cytosine)함량에 비례하여 DNA합성을 억제하며, 일부는 유리기(free radical)를 만들어 DNA에 손상을 주기도 하는데, G1후기와 S기 초기에 영향을 미친다. 그러나 투여 후 간에서 신속히 대사되므로 체내에서 비교적 빠르게 제거된다. 생체에 투여되었을 때의 부작용으로는 골수의 기능을 심하게 억제하며, 구토, 설염, 설사, 피부염 및 발열 등이 있다(Gilman et al. 1985; Fisher & Aristiff, 1988).

Acridavine-Guanosine compound (AG60)은 아크리플라빈(acriflavine)과 구아노신(guanosine)을 1:1의 비율로 섞은 복합제로서 동물에 이식된 고형암(S-180)이나 Ehrlich carcinoma에 대해서도 탁월한 항암효과를 보인데 비하여 부작용은 매우 적은 것으로 알려져 있다(Hong et al., 1997; Kim et al., 1997, 1998). 아크리플라빈은 항체형성에 영향을 미치며(Farr et al., 1965), 암세포에 아크리플라빈을 처리하여 얻

은 추출물이 암세포에 대해 면역성을 나타낸다는 보고도 있다(Chakraborty & Bose, 1987). 또한 아크리플라빈은 현재도 트리파노소마(trypansomoma)로 인한 질병치료에는 이용되고 있는 약품으로서 형광을 나타내며 핵산(nucleic acid), 특히 DNA에 특이적으로 결합하기 때문에 세포핵의 형광염색에도 많이 쓰이고 있다(Kasten, 1967). 또한 구아노신(guanosine)은 강력한 림프구 활성화물질로서 강한 보강제(adjuvants) 성격을 지닌 것으로 알려졌는데 생체에서는 곧바로 세포막을 통과하여 세포내의 대사과정에 영향을 준다(Goodman & Weigle, 1981, 1983; Goodman, 1988). 이 물질은 림프구뿐만 아니라 큰포식세포에 대해서도 강력한 활성화물질로 작용하여 모노카인(monokine, 단핵구활성물질), 림프카인(lymphokine), 면역글로불린(immunoglobulin) 등을 분비하도록 하며(Goodman, 1988), 다른 종양치료제들과 함께 투여하면 항암효과가 증진된다는 보고가 있다(Osswald & Yussef, 1979; Iigo & Hoshi, 1984; Iigo et al., 1987). 한편 아크리플라빈(acriflavine)과 구아노신(guanosine)을 함께 사용하면 아크리플라빈을 단독 사용했을 때에 비하여 일반세포에 대한 세포독성은 약화되고 항암효과는 높아진다는 보고가 있다(Hong et al., 1997; Kim et al., 1997). 또 실제로 생체에 이식된 Ehrlich 종양세포에 대한 실험에서도 적은 용량에서도 뛰어난 항암효과를 발휘한다(Ahn et al., 2000).

위는 소화기계통에서 중요한 역할을 할 뿐 아니라 연령, 식이, 스트레스 및 종양 등의 질병상태에 따라 서로 민감하게 반응한다. 위점막에서 생산되는 위액의 대부분을 이루는 성분인 염산(HCl, hydrochloric acid)과 펩시노겐(pepsinogen)을 분비하는 벽세포와 으뜸세포의 변화에 대한 연구는 비교적 많이 있다(Miyauchi et al., 1999; Murayama et al., 2000; Ogata et al., 2000; Ko et al., 2002a, b, 2008; Ryoo et al., 2005; Kim et al., 2005). 그러나 위점막을 보호하기 위해 점액을 분비하는 점액상피세포에 대한 형태학적 연구로는 BCG (Bacillus Calmette-Guérin)백신을 투여한 위점막상피세포의 DNA합성과 미세구조적 변화에 대한 보고(Ko et al., 2009)를 제외하고는 드물다. 그러므로 Ehrlich 종양세포를 살부위에 이식한 후 과거에 화학요법으로 많이 사용하던 5-fluorouracil, mitomycin C와 근래에 새로 개발된 아크리플라빈과 구아노신 복합제인 AG60을 투여하였을 때 위점막 점액상피세포에 미치는 미세구조적 변화를 비교 관찰하여 종양치료과정에 따른 위점막의 변화를 연구하는데 기본정보를 제공하고자 이 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

실험동물로는 체중 25g 내외의 ICR생쥐를 사용하였으며 이들을 정상대조군, 종양세포이식대조군(종양대조군), 종양

세포이식후 5-fluorouracil 투여군(5-fluorouracil 투여군), 종양세포이식후 mitomycin C 투여군(mitomycin C 투여군) 및 종양세포이식후 AG60 (acriflavine : guanosine=1 : 1로 Aldrich chemical CO. USA 제품을 태림제약 중앙연구소 조제) 투여군(AG60 투여군)으로 나누었다. 정상대조군 이외의 종양대조군, 5-fluorouracil, mitomycin C 및 AG60 투여군의 동물들은 살부위 피부밑조직에 각각 1×10^7 의 Ehrlich종양세포를 이식하였다. 각각의 실험군은 종양세포를 이식한 다음 날부터 30 mg/kg의 5-fluorouracil, 400 μ g/kg의 mitomycin C 및 30 mg/kg의 AG60을 격일 간격으로 한번씩 피부밑조직에 주사하였다. 종양대조군은 종양세포이식 후에 0.2 mL의 생리식염수를 피부밑조직에 주사하였고 정상대조군은 종양세포를 이식하지 않은 동물을 사용하였으며, 각 군당 5마리씩 사용하였다. 이 실험에 사용된 동물들은 희생시키기 전날 저녁부터 사료는 주지 않고 물만 공급하였으며, 종양대조군을 비롯한 실험군은 생리식염수 또는 각각의 약제를 7회씩 투여한 다음날, 일중주기(circadian rhythm)에 따른 변화를 최소화하기 위해 오전 10시에 에테르(ether)마취하에 앞배벽을 열어 위조직을 절취하였다.

절취한 조직은 2.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)-1.5% 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 혼합액(Millonig's phosphate buffer, pH 7.3)에 고정된 후, 1% 오스뮴사산화물(osmium tetroxide)용액(Millonig's phosphate buffer, pH 7.3)에 다시 고정하였으며 고정이 끝난 조직은 탈수과정을 거쳐 아랄다이트(araldite) 혼합액에 포매하였다. 포매된 조직은 1 μ m 두께의 절편을 만든 후 톨루이딘 블루(toluidine blue)로 염색하여 위점막의 잘록부분(isthmus)이 잘 절단된 부위를 택하여 60~70 nm 두께의 얇은 절편을 만들었다. 각 절편은 우라닐아세테이트(uranyl acetate)용액과 구연산납(lead citrate)용액으로 대조염색한 후, JEM 100CX-II 전자현미경으로 비교 관찰하였다.

결 과

1. 정상대조군

위점막의 점액상피세포들은 잘록부분에서 기원한 세포들이 속공간쪽으로 이동하여 탈락하므로 점액상피세포는 있는 위치에 따라 다소 모습이 다르다. 점막표면이나 위오목의 위쪽부분에 위치하는 세포는 폐쇄띠(zonula occludens)와 부착띠(zonula adherens)로 이루어진 연접복합체(junctional complex)가 발달되어 있으나 부착반점(macula adherens)이하 부위는 이웃세포사이의 세포사이간극이 넓고 불규칙한 세포질돌기들이 돌출되어 있다. 그러나 위오목의 아래쪽 부분에 위치하는 세포들은 서로 밀접하게 배열되어 있어 세

포사이간극이 거의 없고 세포질돌기들이 손가락을 낀 모양으로 배열되어 있어 위치에 따른 차이를 구별할 수 있다. 그러므로 이 실험에서는 점막내의 위치에 따른 세포형태의 차이를 최소화하기 위해 위오목의 바닥부위에 위치하는 벽세포 주위에서 관찰되는 점액상피세포들을 대상으로 관찰하였다. 일반적으로 점액상피세포는 단층원주형으로서 자유면에는 짧은 미세융모가 성글게 나 있고, 그 표면은 당질층(glycocalyx)으로 덮여 있고, 세포의 가쪽에는 불규칙한 세포질돌기가 짧게 형성되어 있으며 자유면 쪽 가까이에는 연접복합체가 잘 이루어져 있다. 핵은 난원형으로 바닥막쪽에 치우쳐 위치하고 멩친염색질(heterochromatin)을 가지고 있다. 세포질에는 긴 난원형 사립체와 납작한 수조의 과립세포질세망, 소수의 용해소체, 미세섬유 및 리보솜체가 널리 분포하며, 골지복합체는 핵상부에 위치하였다. 또한 자유면 쪽 세포질에는 세포소기관들이 거의 분포하지 않고, 미세섬유가 많은 종말그물(terminal web)부분이 구별되었으며, 미세융모 속의 액틴미세섬유들이 뚜렷이 관찰되었다. 또한 구형, 난원형 등 다양한 모습의 점액과립들은 바탕질의 전자밀도가 비교적 높고 단위막에 싸여 있으며 자유면 쪽 세포표면부위에 많이 모여 있었다(Fig. 1).

2. 실험군

종양대조군을 포함한 실험군의 동물들은 외관상 큰 변화가 없었고, 실험기간내에 사망한 동물이 없었다. 종양대조군의 점액상피세포는 그 모습이 정상대조군의 소견과 유사하였으나 골지복합체의 수조는 정상군의 것에 비해 다소 더 확장된 모습을 보이는 경우가 자주 관찰되었으며, 골지복합체의 자유면 쪽에는 전자밀도가 다소 다른 구형 또는 난원형의 분비과립들이 모여 있었다. 또한 정상대조군에 비해 세포질 속에서 수초구조(myelin figure)가 자주 관찰되었으며, 일부 세포의 경우 이웃하는 세포의 전자밀도가 달라 밝은 세포와 어두운 세포가 구별되었다(Fig. 2).

Mitomycin C 투여군의 경우 종양대조군에 비해 수초구조가 더 자주 관찰되었으며, 골지복합체 수조가 다소 확장되고 흐트러져 보이는 세포들과 과립을 포함하고 있는 세포질이 풍선처럼 속공간 쪽으로 돌출되어 보이는 세포가 관찰되었다(Fig. 3).

5-fluorouracil 투여군의 점액상피세포는 종양대조군에 비해 수초구조가 더 자주 관찰되었으며, 분비과립들이 몇 개씩 세포질을 포함한 막성구조에 싸여있는 상태로 위점막의 속공간으로 배출된 모습을 보이는 세포들이 자주 관찰되었는데, 이와 같은 경우 세포소기관들은 그 모습을 유지하고 있으나 전체적인 모습이 다소 흐트러져 보였다(Fig. 4).

AG60 투여군은 종양대조군에 비해 수초구조와 다세포체(multivesicular body)가 더 많이 관찰되었으나 전체적인 모

습은 중앙대조군의 소견과 유사하였다(Figs. 5, 6).

고 찰

위점막의 표면과 위오목을 덮고 있는 점액상피세포는 위 오목의 바닥과 고유위샘의 목부분에 위치하는 미분화세포가 분화되어 생성되며, 분화된 세포는 위오목의 벽을 따라 표면 쪽으로 이주하여 속공간면에 이르고 수명이 다한 세포는 속공간으로 탈락하여 없어진다(Fawcett, 1994; Jeung, 2006).

생쥐 위점막의 미성숙 점액상피세포는 미세과립을 포함한 골지(Golgi) 소포를 갖고 있으며 잘룩부분에서 위오목 쪽으로 이동함에 따라 전자밀도가 높은 점액과립을 포함하는 점액상피세포가 된다(Karam & Leblond, 1995). 생쥐의 위오목을 이루는 점액상피세포에 대한 전자현미경적 및 자기방사법적 연구에서 위오목을 이루는 점액상피세포의 87%는 미분화점액세포에서 기원하고 13%는 유사분열에 의해 생기며, 미분화점액세포에서 성숙한 점액상피세포로 분화되는 기간은 3.1일이 소요된다(Karam & Leblond, 1993). 위오목의 바닥쪽에 있는 점액상피세포는 미분화점액세포에 비해 점액과립이 많고 크며, 점막표면 쪽으로 올라갈수록 핵소체와 사립체의 크기가 감소하고 자유리보소체(free ribosome)의 양이 감소한다. 미분화점액상피세포는 점액과립의 양이 적고 점액과립이 세포질에 분산되어 있다. 그러나 점차로 분화됨에 따라 점막표면 쪽으로 이동하면서 점액과립은 점차로 세포소기관이 적은 자유면쪽 세포표면 부위에 밀집되어 분포한다(Karam & Leblond, 1993). 한편 위점막 표면과 위오목의 상부에 위치하는 점액상피세포는 연접복합체로 연결되어 있으나 세포사이공간이 넓고 불규칙하다. 그러나 위오목의 아래쪽부분에 위치하는 세포는 연접복합체 아래의 세포사이공간이 좁고 세포질돌기들이 손가락을 낀 듯이 밀접하게 배열되어 있다(Helander, 1981). 또한 위점막의 잘룩부분에는 미성숙 점액상피세포가 위치하는데 점액과립의 수가 적을 뿐 아니라 과립의 크기도 작으나 속공간쪽에 위치하는 성숙한 점액상피세포는 분비과립, 과립세포질세망, 미세섬유가 상대적으로 발달되어 있다. 그러나 일반적으로 점액상피세포는 과립세포질세망이 빈약하고 자유리보소체가 많고, 1~2개의 골지복합체가 핵상부에 위치하고 비교적 긴 사립체를 포함하고 있다(Helander, 1981).

이 실험에서도 점액상피세포는 있는 위치에 따라 다소 모습이 달라 점막표면에 위치하는 세포들은 세포사이공간이 넓고 불규칙하였으나, 위오목의 아래쪽부분, 즉 벽세포 근처에 위치하는 세포들은 서로 밀접하게 배열되어 있어 세포사이공간이 거의 없고 세포질돌기들이 손가락을 낀 모양으로 배열되어 있었다. 그러므로 이 실험에서는 가급적

점막내의 위치에 따른 세포형태의 차이를 줄이기 위해 벽세포가 관찰되는 위오목의 바닥쪽 부위에 위치하는 점액상피세포들을 관찰하였다. Helander (1981)의 보고와 같이 생쥐 위점막의 점액상피세포는 원주형으로서 자유면에는 짧은 미세융모가 성글게 나 있고 그 표면은 당질층(glycocalyx)으로 덮여 있었으며, 세포의 가쪽에는 불규칙한 세포질 돌기가 짧게 형성되어 있었고 자유면 쪽 가까이에는 연접복합체가 잘 이루어져 있었다. 핵은 난원형으로 바닥막 쪽에 치우쳐 위치하였고 많은 몽친염색질(heterochromatin)을 가지고 있었다. 세포질에는 긴 난원형 사립체와 납작한 수소의 과립세포질세망, 소수의 용해소체, 약간의 리보소체가 분포하며, 골지복합체는 핵상부에 위치하였다. 또한 자유면쪽 세포질에는 단위막으로 싸여 있으며 비교적 전자밀도가 높은 구형, 난원형 등 다양한 모습의 점액과립이 모여 있었다.

위점막에서 상피세포의 증식은 위샘의 목부위에서 일어나는데(Lee & Leblond, 1985; Fawcett, 1994; Jeung, 2006), 세포갱신이 왕성하여 생쥐의 경우 표면상피세포와 목점액세포는 세대교체시간이 3일 정도밖에 안될 정도로 빠르나, 위샘을 구성하는 세포들은 세대교체시간이 느리다(Cameron & Thrasher, 1971; Helander, 1981; Lee & Leblond, 1985). 이와 같이 위의 점막상피는 세포갱신이 왕성하기 때문에 위는 항암제 투여시에 부작용이 많이 나타나는 조직으로 알려져 있다. 실제로 5-fluorouracil 또는 mitomycin C를 투여하였을 때 위점막 벽세포는 미세구조에 큰 손상을 받아 분비기능이 매우 억제되었다(Ko et al., 2002a). 그러나 으뜸세포의 경우에는 5-fluorouracil 또는 mitomycin C를 투여하였을 때 미세구조에 별다른 손상을 주지 않아 위점막을 이루는 세포의 종류에 따라 반응이 다르다(Kim et al., 2005).

이 실험에서 5-fluorouracil, mitomycin C 및 AG60을 격일 간격으로 2주일간 피부밑조직에 주사하였으나 동물은 외견상 변화가 없었으며 사망한 동물이 한 마리도 없었다는 사실은 피부밑주사는 주사부위에 분포하는 모세혈관은 물론 림프모세관을 통해서도 서서히 흡수됨으로 생체에 급격한 영향을 주지 않았을 뿐 아니라 투여된 5-fluorouracil, mitomycin C 및 AG60이 체내에 축적되지 않고 비교적 빨리 분해되어 배출되었기 때문이라고 추측된다.

5-fluorouracil를 정맥주사로 투여한 후 위점막혈류량과 위산분비를 측정했을 때 저농도의 5-fluorouracil (50 mg/kg)를 투여하여하였을 때에는 별다른 변화가 없었으나, 고농도의 5-fluorouracil (100 or 200 mg/kg)을 투여하였을 때에는 용량에 비례해서 위점막의 혈류량이 현저하게 감소하였으나 위산분비는 크게 감소하지 않았다(Kakinuma & Ohwada, 1997). 또한 육안적으로는 위점막의 부종이나 발적현상이 관찰되었으나 출혈이나 궤양상태를 보이는 동물은 없었고, 조직학적으로는 점막표면에 충혈(hyperemia)은 있었으나 점막손상이나 감염은 없었다(Kakinuma & Ohwada, 1997).

그러나 이 실험에서는 비록 적은 양이지만 5-fluorouracil (30 mg / kg)을 반복 투여하였을 때 정상 및 종양대조군에 비해 점액상피세포에 수초구조(myelin figure)가 자주 관찰되었을 뿐 아니라 분비과립들이 몇 개씩 세포질을 포함한 막성구조에 싸여있는 상태로 위점막의 속공간으로 배출된 모습을 보이는 세포들이 자주 관찰되었다. 이와 같은 차이는 Kakinuma & Ohwada (1997)는 육안 및 광학현미경으로 관찰한데 비해 이 실험에서는 전자현미경을 이용하여 미세구조를 관찰하였으므로 육안 및 광학현미경으로는 볼 수 없었던 미세구조적 변화가 관찰된 결과라고 생각된다. 그리고 이와 같은 미세구조적 변화는 위점막을 이루는 점액상피세포들이 비교적 심한 자극을 받았을 때 보일 수 있는 형태적 표현이라고 추측된다. 일반적으로 점액세포는 분비물만 배출하는 샘분비(merocrine secretion) 방식으로 분비하는데 (Chung et al., 2006), 이 실험에서 분비물과 세포질이 함께 배출된 부분분비(apocrine secretion) 방식의 분비 모습을 보인 것은 5-fluorouracil 투여로 자극받은 점액상피세포가 과다 분비되는 과정에서 세포질을 포함한 막성구조와 분비과립이 함께 배출되었기 때문이라고 추측된다.

또한 mitomycin C 투여군의 경우에도 종양대조군에 비해 골지복합체 수초가 다소 확장되고 흐트러져 보이는 세포들과 수초구조가 더 자주 관찰되었고, 일부세포의 경우에는 과립을 포함하고 있는 세포질이 속공간 쪽으로 돌출되어 부풀어 보이는 것도 관찰되었다. 그러나 자기방사법적 연구에서 mitomycin C를 투여하였을 때 방사선포지세포수가 정상대조군의 46%로 감소하였다는 보고(Ko et al., 2005)에 비추어 볼 때, 이 실험에서 점액상피세포의 미세구조가 큰 손상을 보이지 않은 결과는 mitomycin C가 위점막 상피세포의 DNA합성에는 크게 억제적으로 작용을 하나 미세구조에는 큰 손상을 주지 않은 결과는 이해하기 힘들다. 그러므로 mitomycin C 투여가 위점막 점액상피세포의 DNA합성을 크게 억제하면서도 미세구조에는 큰 손상을 주지 않은 원인을 밝히기 위해서는 좀 더 자세한 추가 연구가 필요하다고 생각한다.

AG60은 acriflavine과 guanosine을 1:1의 비율로 섞은 복합제로서 시험관실험(in vitro)에서 대장암(COLO205), 폐암(A549, NCI-H2226), 신장암(UO-31)과 전립선암(PC-3) 세포주에 대해 뛰어난 항암효과를 보인데 비하여 부작용은 매우 적은 것으로 알려져 있다(Hong et al., 1997; Kim et al., 1997, 1998). AG60은 주사방법에 따라서도 동물에 미치는 독성효과가 달라서 AG60을 복강 내에 주사하였을 경우에는 LD₅₀가 30 mg/kg였으나 근육주사의 경우에는 55 mg/kg로서 거의 두 배에 달하였다(Kim et al., 1997). 이 실험에서 복강주사의 경우 LD₅₀에 해당하는 30 mg/kg의 AG60을 격일간격으로 7회나 주사하였는데도 불구하고 동물의 외견상 변화가 없었다는 사실은 피하주사가 복강주사에 비해 생체

에 서서히 흡수되어 생체에 급격한 영향을 주지 않았을 뿐 아니라, 투여된 AG60이 체내에 축적되지 않고 빨리 분해되어 배출(48시간 이내)되었기 때문이라고 추측된다. 한편 자기방사법적 연구에서 AG60을 투여하였을 때 방사선포지수가 정상대조군의 29%로 감소하였다는 보고가 있다(Park et al., 1999). 그러나 이 실험에서 AG60 투여군의 경우 종양대조군에 비해 수초구조와 다소포체(multivesicular body)가 좀 더 많이 관찰되었으나 전체적인 모습은 종양대조군의 소견과 유사하였으며, 이와 같이 AG60이 위점막 점액상피세포의 DNA합성에는 크게 억제적으로 작용을 하나 세포의 미세구조에는 큰 손상을 주지 않은 결과는 이해하기 힘들다. 그러므로 AG60 투여가 위점막 점액상피세포의 DNA합성을 크게 억제하면서도 미세구조에는 큰 영향을 미치지 않은 원인을 밝히기 위해서는 좀 더 자세한 추가 연구가 필요하다고 생각한다.

세포의 미세구조 가운데 수초구조(myelin figures)는 글루타르알데히드(glutaraldehyde) 고정용 오래된 표본이나 또는 지방성분이 용해소체와 결합할 때 형성되는데 노화세포와 질병상태의 세포에서 자주 관찰된다(Ghadially, 1997). 이 실험에서 정상대조군에 비해 종양대조군을 비롯한 실험군에서 수초구조가 세포질 속에서 더 많이 관찰된 것은 고정에 의한 영향보다는 세포 자체의 활성도와 관계가 있다고 생각된다. 즉 이물질인 종양세포의 이식, 5-fluorouracil, mitomycin C 또는 AG60의 반복투여로 형성된 과민반응이 위점막 점액상피세포의 활성에 영향을 준 형태적 변화가 아닌가 생각된다. 그러나 AG60투여군의 경우 수초구조가 정상대조군에 비하여 다소 많이 관찰된 것 이외에는 미세구조에 별다른 변화가 없었다. 이와 같은 실험 결과는 AG60을 투여하면 가슴샘세포의 방출이 급격히 일어나나 상피세포의 영역이 늘어나고 림프모세포가 증가하는 등 다른 항암제와는 달리 가슴샘에 기능적인 손상을 입히지는 않았으며 (Ahn et al., 1997), 지라조직에 대한 자기방사법적 연구에서 AG60은 mitomycin C와 5-fluorouracil에 비하여 지라조직에 별다른 손상을 입히지 않으면서도 세포의 DNA 합성을 효과적으로 억제했다는 보고가 있다(Ko et al., 2000). 또한 AG60투여가 위점막 벽세포와 으뜸세포의 형태와 분비기능에 큰 영향을 주지 않았다는 보고(Ko et al., 2002b; Kim et al., 2005)에 비추어 볼 때, AG60은 면역기관인 가슴샘과 지라 뿐 아니라 위점막을 구성하는 샘상피와 점액상피세포에 대해서도 독성이 적은 약제라고 생각된다.

세포의 미세구조 가운데 다소포체(multivesicular body)는 세포막에서 포음작용으로 생겨난 섭취소체(endosome)가 세포 속으로 이동하여 트랜스골지망에서 기원한 일차용해소체와 융합함으로써 형성되고, 그 과정에 바탕질 속의 작은 소포들은 섭취소체 막의 합입에 의해 생긴 것으로 알려졌으므로 다소포체는 이차용해소체의 한 형태로 간주하고 있다.

또한 기능으로는 낡은 세포막이 미세포음소포가 되면 다소포체에 포음되어 소화 처리됨으로써, 골지복합체에서 생산된 분비과립의 경계막이나 소포막에 의해 생산된 막이 새로운 세포막으로 대체하게 하는 세포막의 순환에도 기여한다. 또한 일부 세포에서는 생산된 분비과립을 자가포식함으로써 분비과정에도 관여하는 것으로 알려졌다(Ghadially, 1997, Chung et al., 2006).

이 실험에서 5-fluorouracil, mitomycin C 및 AG60 투여군의 경우 다소포체가 정상대조군과 중앙대조군에 비해 자주 관찰되었는데, 이와 같은 결과는 확인하기는 어려우나 다소포체가 세포막의 순환에 관여하고, 일부 세포에서는 생산된 분비과립을 자가포식함으로써 분비과정에도 관여한다는 주장(Ghadially, 1997, Chung et al., 2006)에 비추어 볼 때 5-fluorouracil, mitomycin C 및 AG60의 반복적 투여가 점액상피세포의 분비기능 등에 다소 억제적으로 작용한 것으로 추측된다.

이상의 결과를 종합해보면 5-fluorouracil을 반복 투여하면 점액상피세포에 수초구조가 자주 관찰되고 과도한 자극으로 분비과립이 부분분비 현상으로 분비될 정도로 손상을 받았고, mitomycin C 역시 분비과립을 함유한 세포질이 속공간으로 돌출되는 등의 미세구조적 변화를 보였다. 그러나 Ag60의 경우는 수초구조와 다소포체가 비교적 자주 관찰되는 외에는 별다른 미세구조적 변화를 관찰할 수 없었다. 이와 같은 실험결과로 보아 AG60은 5-fluorouracil 또는 mitomycin C에 비해 위점막 점액상피세포의 분비기능에 큰 손상을 주지 않는 약제라고 생각된다.

참 고 문 헌

- Ahn ET, Park KH, Ko JS, Cheong KS, Hang YB, Hong EK, Chung YS, Yoo BI, Kim SG, Kang JK, Lee KY: Ultrastructure of mice thymic cortex following treatment with acriflavine in combination with guanosine. *Korean J Anatomy* 30(6) : 595-608, 1997. (Korean)
- Ahn ET, Cheong KS, Ko JS, Park KH, Kim JG: Effects of lower dose-injections of acriflavine-guanosine compound (AG60) on the DNA synthesis and ultrastructure of the ehrlich carcinoma cells inoculated to the mouse. *Korean J Anatomy* 33(6) : 651-664, 2000. (Korean)
- Cameron IL, Thrasher JD: Cell proliferation and renewal in the mammalian body. In: Cameron IL, Thrasher JD, ed, *Cellular and molecular renewal in the mammalian body*. pp. 45-48, Academic Press, New York, 1971.
- Chakraborty NG, Bose SR: Protective immunity by chemically modified tumor cell antigens extracted by 3 M KCl. *Neoplasm* 34 : 427-430, 1987.
- Clark WG, Brater CD, Johnson AR: *Goth's Medical Pharmacology*. 13th ed. *Mosby Year Book*, St. Louis, pp. 704-714, 1992.
- Denizot Y, Dupuis F, Comte L, Dulery C, Praloran V: PAF and haematopoiesis. IV. Modifications of spleen and thymus PAF contents after a single dose of the chemotherapeutic drug 5-fluorouracil in mice. *Cancer Lett* 88 : 185-189, 1995.
- Farr RS, Samuelson JS, Stewart B: The suppression of anti-bovine serum albumin production in rabbits by acriflavine hydrochloride NF. *J Immunol* 94 : 682-691, 1965.
- Fawcett DW: *A textbook of histology*, 12th Ed, New York, Chapman and Hall, pp. 460-472, 1994.
- Fisher JF, Aristiff PA: The chemistry of DNA modification by antitumor anti-biotics. *Prog Drug Res* 32 : 411-498, 1988.
- Ghadially FN: *Ultrastructural pathology of the cell and matrix*. 3rd ed, London, Butterworths, pp. 310-313, 632-639, 646-659, 1997.
- Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 7th ed, New York, Macmillan Pub Co, pp. 1240-1306, 1985.
- Goodman MG: Induction of interleukin 1 activity from macrophages by direct interaction with C8-substituted guanine ribonucleosides. *Int J Immuno-pharmacol* 10 : 579-586, 1988.
- Goodman MG, Weigle WO: Activation of lymphocytes by brominated nucleoside and cyclic nucleotide analogues: Implications for the "second messenger" function of cyclin GMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 7604-7608, 1981.
- Goodman MG, Weigle WO: Manifold amplification of in vivo immunity in normal and immunodeficient mice by ribonucleosides derivatized at C8 of guanosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 3452-3455, 1983.
- Helander HF: The cells of the gastric mucosa. *Int Rev Cytol* 70 : 217-289, 1981.
- Hong EK, Kim HM, Lee KY, Chung YS, Yoo BI, Kim SG, Ahn ET, Han YB: Anti-tumor effect of complex of acriflavine and guanosine (AG60). *J Korean Cancer* 29(1) : 29-37, 1997. (Korean)
- Iigo M, Hoshi A: Effect of guanosine on antitumor activity of fluorinated pyrimidines against P388 leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 13 : 86-90, 1984.
- Iigo M, Miwa M, Ishitsuka H, Nitta K: Potentiation of the chemotherapeutic action of 5'-deoxy-5-fluorouridine in combination with guanosine and related compound. *Cancer Chemother Pharmacol* 19 : 61-64, 1987.
- Chung JW, Kim J, Park SS, Uhm CS, Yoon S: *Histobiology* 3th ed. Korea Medical Book Publisher, pp. 41-43, 51, 510-523, 2006.
- Kakinuma S, Ohwada S: Gastric mucosal blood flow and gastric secretion following intravenous administration of 5-fluorouracil in anesthetized rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 39 : 357-360, 1997.
- Karam SM, Leblond CP: Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. II. Outward migration of pit cells. *Anat Rec* 236(2) : 280-96, 1993.
- Karam SM, Leblond CP: Origin and migratory pathways of the eleven epithelial cell types present in the body of the mouse sto-

- mach. *Microsc Res Tech* 31(3) : 193-214, 1995.
- Kasten FH: Cytochemical studies with acridine orange and the influence of dye contaminants in the staining of nucleic acids. *Int Rev Cytol* 21 : 141-202, 1967.
- Kataoka K, Sakano Y, Miura J: Histogenesis of the mouse gastric mucosa, with special reference to type and distribution of proliferative cells. *Arch Histol Jpn* 47(5) : 459-74, 1984.
- Kataoka K, Sakano Y: Panoramic observation of the mouse gastric mucosa by superwide-field electron microscopy. *Arch Histol Jpn* 47(2) : 209-221, 1984.
- Kim MS, Ahn HT, Ko JS: Ultrastructural alterations in the gastric chief cells of mouse, induced by 5-fluorouracil or mitomycin C. *Korean J Anatomy* 38(5) : 421-431, 2005. (Korean)
- Kim SG, Cho JY, Chung YS, Ahn ET, Lee KY, Han YB: Suppression of xenobiotic-metabolizing enzyme expression in rats by acriflavine, a protein kinase inhibitor. Effects on epoxide hydrolase, glutathione S-transferases, and cytochrome p450. *Drug Metab Dispos* 26: 66-72, 1998.
- Kim SG, Kim CW, Ahn ET, Lee KY, Hong EK, Yoo BI, Han YB: Enhanced anti-tumour effects of acriflavine in combination with guanosine in mice. *J Pharm Pharmacol* 49 : 216-222, 1997.
- 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 Anatomy* 33(3) : 315-326, 2000. (Korean)
- Ko JS, Choi PC, Ahn ET, Park KH, Park DK: Effects of antitumor agents th DNA synthesis in the gastric epithelia of mice implanted with ehrlich carcinoma cells: an autoradiographic study. *Korean J Anatomy* 38(6) : 495-504, 2005. (Korean)
- Ko JS, Jeong IG, Park KH, Ahn ET: Effects of BCG or AG60 on gastric parietal cells of the mouse implanted with ehrlich carcinoma cells. *Korean J Anatomy* 35(6) : 529-542, 2002b. (Korean)
- Ko JS, Ryoo IS, Park KH, Park DK: Effects of BCG on the DNA synthesis and ultrastructure of mouse gastric mucosal epithelial cells inoculated with ehrlich carcinoma cells. *Korean J Electron Microscopy* 39(3) : 205-218, 2009. (Korean)
- Ko JS, Shin BS, Ahn ET, Park KH, Kim JG: Ultrastructural alterations induced by 5-fluorouracil or mitomycin C on the gastric parietal cells of mouse. *Korean J Anatomy* 35(5) : 363-375, 2002a. (Korean)
- Ko JS, Wang JW, Park KH, Park DK: Effects of AG60 on gastric chief cells of the mouse implanted with ehrlich carcinoma cells. *Korean J Anatomy* 41(3) : 193-204, 2008. (Korean)
- Lee ER, Leblond CP: Dynamic histology of the antral epithelium in the mouse stomach; IV. ultrastructure and renewal of gland cells. *Am J Anat* 172 : 241-259, 1985.
- Magami Y, Azuma T, Inokuchi H, Moriyasu F, Kawai K, Hattori T: Cell kinetics of slow renewing cell populations in mice stomach. *J Gastroenterol Hepatol* 17(3) : 262-269, 2002.
- Miyauchi M, Tsuyama S, Yang DH, Ohmori J, Kato K, Nakayama J, Katsuyama T, Murata F: Ontogeny of the rat parietal cell; Analysis using anti-parietal cell antibody and transmission electron microscopy. *Kaibogaku Zasshi* 74(2) : 197-207, 1999.
- Murayama Y, Miyagawa J, Shinomura Y, Kanayama S, Yasunaga Y, Nishibayashi H, Yamamori K, Higashimoto Y, Matsuzawa Y: Morphological and functional restoration of parietal cells in helicobacter pylori associated enlarged fold gastritis after eradication. *Gut* 47(2) : 313-314, 2000.
- Ogata T, Yamasaki Y: Morphological studies on the translocation of tubulovesicular system toward the intracellular canaliculus during stimulation of the gastric parietal cell. *Microsc Res Tech* 48(5) : 282-292, 2000.
- Osswald H, Yussef M : Potentiation of the chemotherapeutic action of 5-fluorouracil by combination with cytidine or guanosine on HRS-sarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 93 : 241-244, 1979.
- Park KH, Ahn ET, Ko JS, Ha SS, Chung YS, Hong EK, Yoo BI, Kim SG, Lee KY, Kang JK, Han YB: Autoradiographic study on the effect of AG60 to the DNA synthesis of gastric epithelium of mouse inoculated with ehrlich carcinoma. *Korean J Anatomy* 32(1) : 95-104, 1999. (Korean)
- Ryoo IS, Ahn ET, Park KH, Park DK, Kim MS, Ko JS: Effects of BCG on gastric chief cells of the mouse implanted with ehrlich carcinoma cells. *Korean J Electron Microscopy* 35(3) : 153-163, 2005. (Korean)

< 국문초록 >

이 실험은 Ehrlich 종양세포를 이식한 후 5-fluorouracil, mitomycin 및 acriflavine-guanosin 복합제 (AG60)을 투여하였을 때, 위점막 점액상피세포의 미세구조적 변화를 연구하고자 시행하였다.

실험동물로는 ICR생쥐를 사용하였으며 정상대조군 이외의 종양대조군, 5-fluorouracil, mitomycin C 및 AG60 투여군의 동물들은 살부위 피부밑조직에 각각 1×10^7 의 Ehrlich 종양세포를 이식하였다. 각각의 실험군은 종양세포를 이식한 다음날부터 5-fluorouracil (30 mg/kg), mitomycin C (400 µg/kg) 및 AG60 (30 mg/kg)을 격일 간격으로 한번씩 피부밑조직에 주사하였다. 종양대조군은 종양세포이식 후에 0.2 mL의 생리식염수를 피부밑조직에 주사하였고 정상대조군은 종양세포를 이식하지 않은 동물을 사용하였다. 종양대조군을 비롯한 실험군은 생리식염수 또는 각각의 약제를 격일 간격으로 7회씩 투여한 다음날, 에테르(ether) 마취하에 앞배벽을 열어 위조직을 절취하였다.

절취한 조직은 2.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)-1.5% 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 혼합액에 고정된 후, 1% 오스뮴사산화물(osmium tetroxide)용액에 다시 고정된 후 탈수와 정을 거쳐 에럴다이트(araldite) 혼합액에 포매하였다. 포매된 위점막 조직은 얇은 절편을 만들었으며, 각 절편은 우라닐아세테이트(uranyl acetate)용액과 구연산납(lead citrate)용액으로 대조염색한 후, 전자현미경으로 비교 관찰하였다.

5-fluorouracil 투여군은 종양대조군에 비해 점액상피세포에 수초구조(myelin figure)가 자주 관찰되고, 분비과립이 세포질을 포함한 막성구조에 싸여 속공간으로 함께 분비되는 부분분비현상

이 보일 정도로 손상을 받았다. 그리고 mitomycin C 역시 수초구조가 자주 관찰되고 분비과립을 함유한 세포질이 속공간으로 돌출되는 등의 미세구조적 변화를 보였다. 그러나 AG60의 경우는 수초구조와 다소포체가 비교적 자주 관찰되는 외에는 별다른 미세구조적 변화를 관찰할 수 없었다.

이상의 결과를 종합해보면 mitomycin C, 5-fluorouracil 및

AG60을 반복 투여 하면 위점막 점액상피세포의 분비기능이 억제되었음을 시사하는 미세구조적 변화를 보였다. 그러나 세포의 손상 정도가 mitomycin C와 5-fluorouracil 투여군에 비해 AG60 투여군에서 매우 경미하였으므로 AG60은 위점막 점액상피세포의 분비기능에 큰 손상을 주지 않는 약제라고 생각된다.

FIGURE LEGENDS

each scale bar indicates 1 μ m

Fig. 1. The mucous epithelial cell of a normal mouse stomach.

A heterochromatic nucleus (N), scanty granular endoplasmic reticulum (er), Golgi complex (G), some mitochondria (m), a few bundle of the microfilaments (mf), and multivesicular body (M) are seen in the cytoplasm. Bundle of the actin filaments (vacant arrow) in the root of microvilli (mv) are seen. A large number of the mucous granules (g) are aggregated in the terminal web portion of the cytoplasm. Intercellular junction (arrowhead) between the neighbor cells is seen. A parietal cell (P) is seen right upper corner of the figure.

Fig. 2. The mucous epithelial cells of a tumor control mouse.

A few myelin figures (arrows), a large number of the mucous granule (g), some mitochondria (m), slightly flattened cisternae of the Golgi complex (G), a multivesicular body (M) and granular endoplasmic reticulum (er) are seen in the cytoplasm. Intercellular junctions (arrowheads) between the neighbor cells are seen. Bundles of the actin filaments (vacant arrow) in the root of microvilli (mv) are seen. The other mucous epithelial cells are seen left upper and right lower corner of the figure.

Fig. 3. The mucous epithelial cell of a mouse, treated with mitomycin C.

Note bulging cytoplasmic process (vacant asterisk) containing mucous granules protruding into the gastric lumen, slightly dilated cisternae of Golgi complexes (G) and myelin figures (arrow). Some mucous granules (g), a heterochromatic nucleus (N), granular endoplasmic reticulum (er), some mitochondria (m) and an intercellular junctions (arrowheads) between the neighbor cells are seen in the cytoplasm. Two parietal cells (P) are seen left lower and right upper corner of the figure.

Fig. 4. The mucous epithelial cell of a mouse, treated with 5-fluorouracil.

Note membrane structures containing a few mucous granules (vacant asterisks) in the luminal space and small cavities (solid asterisks) of the apical cytoplasm. Some mitochondria (m), a multivesicular body (M) and a large number of the mucous granules (g) are seen in the cytoplasm. Intercellular junctions (arrowhead) between the neighbor cells is seen. mv, microvilli.

Fig. 5. The mucous epithelial cell of a mouse, treated with AG60.

Numerous mitochondria (m), fine and elongated myelin figures (arrows) and a multivesicular body (M) are seen in the cytoplasm. Numerous mucous granules (g) are aggregated in the apical cytoplasm. Intercellular junction (arrowhead) between the neighbor cells are seen. mv, microvilli.

Fig. 6. The mucous epithelial cell of a mouse, treated with AG60.

Golgi complex (G), elongated myelin figures (arrows), granular endoplasmic reticulum (er), numerous mitochondria (m) and a multivesicular body (M) are seen in the cytoplasm. Intercellular junction (arrowhead) between the neighbor cells are seen. Numerous mucous granules (g) are aggregated in the terminal web portion of the cytoplasm. mv, microvilli.





