

5-Fluorouracil이 생쥐의 간에 미치는 세포독성에 대한 Squalene의 영향

김정상* · 김재성** · 박정석 · 최완수 · 최영복 · 김종세

*동신대학교 한의학과

**전남대학교 병원 해부병리과

조선대학교 생물학과

The Effect of Squalene on the Cellular Toxicity of 5-Fluorouracil to the Mouse Liver

Kim, Jeong Sang*, Jae Sung Kim**, Jung Suk Park
Wan Soo Choi, Young Bok Choi and Jong Se Kim

*Dept. Oriental-Medicine, Dongshin Univ.

**Dept. Anatomical Pathology, Chunnam Univ. Hospital.

Dept. Biology, Chosun Univ.

(Received April 24, 1997)

ABSTRACT

This paper aims to prove the effects of Squalene (SQ) on the cellular toxicity of 5-FU to the mouse which pretreated with SQ and then treated with 5-FU.

The results of the group A (treated with only 5-FU) are as follows. The nucleus was destroyed at 24 hours and 48 hours group, however, somewhat repaired at 72 hours group. The dilated inner cavity and the irregular lamellae of the rough surfaced endoplasmic reticulum (RER) were observed continually until 72 hours group. The inner cavity of the smooth surfaced endoplasmic reticulum (SER) were dilated in all groups.

However, the destroyed and the normal membrane were observed simultaneously at 72 hours group. The inner membrane of the mitochondria were almost repaired at 96 hours group.

The results of the group B (treated with 5-FU and squalene) are as follows. The nucleus was a little influenced by the toxicity of 5-FU at 24 hours and 48 hours, RER were observed to keep the typical lamella structure of cisternae from 24 to 72 hours group, but inner cavity kept on dilating. In SER, inner cavity were also observed to flatten from 24 to 72 hours group. Mitochondria were always shown normal. All cell organelles were similar to those of normal groups at 96 hours.

* 이 논문은 조선대학교 교내연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

Accordingly, it can be said that the treatment of SQ prevents the cytotoxicity of 5-FU on cell organelles of liver cell and that is concerned with the formation of membrane system of cell organelles.

Key words : 5-fluorouracil, Squalene, Liver

서 론

5-Fluorouracil (이하 '5-FU' 라 함)은 Heidelberg와 Scheiner (1957)에 의해 암치료를 위한 화학요법제로 사용한 이후 널리 이용되고 있다. 5-FU은 합성된 pyrimidine base이며 핵산의 합성을 억제하여 세포 증식을 저해하는 항대사성 물질로 알려져 있다. Ansfield와 Curreri (1959), Zubrod (1962), Nadler와 Moore (1968), Watkins 등(1970)은 5-FU이 재생이 빠른 조직세포의 RNA 및 DNA 합성시에 편입(incorporation)되어 세포의 성장을 억제하거나 치사 시키므로 성장이 빠른 악성 종양의 치료를 위한 항암제로 사용된다고 보고하였다.

Cohen 등(1958), Heidelberg 등(1960), Keyomaris와 Moran (1985) 및 Tsukamoto와 Kojo는 5-FU 및 5-Fluorodeoxyuridine (FdUR)이 5-Fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP)로 전환되어 thymidylate synthetase (TS)를 억제하여 deoxyuridylic acid로 합성되지 않으므로 DNA 합성이 억제된다고 하였으며, Danneberg와 Heidelberg (1958)나 Goldberg와 Pardee (1966)은 5-FU이 pyrimidine nucleotide의 합성을 저해하여 ribonucleic acid (RNA), deoxyribonucleic acid (DNA)의 생성을 저해한다고 하였다.

Squalene (hexamethyltetracosahexane, $C_{30}H_{50}$, 이하 'SQ' 라 함)은 생체내에서 콜레스테롤 합성과정의 중간 산물이며 여러 척추동물 및 식물들에서 합성되며 특히 심해상어(*Centrolophus atromarginatus* Garman, spiny dogfish)의 간에서 많이 함유된 탄화수소 화합물이다. Saint-Lenger 등(1986)은 SQ의 합성은 콜레스테롤 합성과정 중 mevalonate의 인산화과정 후 farnesyl pyrophosphate를 거쳐 합성되고, squalene epoxide와 lanosterol을 거쳐 콜레스테롤이

합성되어지는데 탄화수소 사슬들이 이중결합을 갖고 있어 불안정하며 쉽게 산화할 수 있다고 하였다.

Strandberg (1990) 등에 의하면 7~30일 동안 하루에 900 mg SQ를 사람에게 투여한 결과 약 60%가 흡수되었으며 serum triglyceride와 콜레스테롤 함량은 변하지 않았다고 하였으며, Desai 등(1996)은 종양을 일으킨 생쥐에 SQ이 포함된 화합물인 Roindex를 처치했을 때, Roindex 처치군은 종양의 33.34%가 억제 되었으나, 처치하지 않은 군에서는 3.44%만이 억제되었다고 보고하였고, Storm 등(1993)은 C_3H 수컷 생쥐에게 2%의 SQ이 함유된 먹이를 먹인 후 방사선을 조사하였을 경우 대조군보다 훨씬 오래 생존하였다고 하였다. Tilvis와 Miettinen (1983)에 의하면 1% SQ이 함유된 먹이를 먹은 흰쥐는 SQ과 methylsterol이 현저하게 증가하였다고 하였다. McTaggart 등(1996)에 의하면 SQ합성효소는 콜레스테롤 생합성과정에 관여하며, LDL (low density lipoprotein)의 혈중농도를 높여준다고 하였다. Curreri 등(1958), Floch와 Hellman (1965), 그리고 Stalzer (1965)는 5-FU의 세포성장·증식 및 억제작용은 종양세포에만 선택적으로 작용하지 않고, 정상 세포조직 특히 재생이 빠른 위장관의 상피세포, 골수의 조혈세포, 및 간장의 간실질세포에도 증식 억제작용을 일으켜 독성작용을 나타낸다고 보고하였다.

이와 같이 SQ에 관한 연구는 SQ 합성효소 위치나 작용기전에 대한 생화학적 연구가 주를 이루었으며, 항암치료가 암세포에 대한 치료효과 이외에도 원하지 않는 부작용이 큰 장애요인이 되고 있는 것이 사실이다. 암환자에게 항암치료를 투여하는 것은 이러한 항암제의 세포독성 때문에 많은 제약을 받게 된다.

SQ의 처치가 세포 및 조직에 미치는 영향, 특히 간세포의 작용에 대한 연구는 소수에 지나지 않는다. 특히 항암제인 5-FU을 투여 하였을 때 전처치한 SQ의 작용에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본

실험에서는 SQ의 처치가 5-FU의 세포독성에 미치는 효과를 생쥐의 간을 실험재료로 하여 밝히고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용된 생쥐는 삼육축산에서 생산, 공급하고 있는 8~10주령 (체중 25~30 g) 정도인 ICR 계통의 외관상 건강한 웅성 생쥐 (각 군당 5마리 씩)를 조선대학교 동물사육장에서 분양받아 실험실에서 clean rack에 넣고 동일한 환경에서 생쥐용 배합사료 (재일유지사료, Co.)와 물을 *ad libitum* 방식으로 공급하였다.

2. 실험군 설정 및 투여방법

1) 실험군 설정은 다음과 같다.

SQ을 5일간 전처치를 하지 않고 5-FU만 투여한 실험군 (이하 'A군'이라 함), SQ을 5일간 전처치한 후, 6일째 SQ와 5-FU을 동시에 투여한 군 (이하 'B군'이라 함) 등으로 분류하였으며, SQ은 세모(주) 제품을 사용하였다.

2) SQ와 5-FU 투여

A군은 SQ으로 전처치 하지 않고 5-FU (5 mg/kg)만 복강 투여 하였고, B군은 SQ (150 mg/kg)을 24시간 간격으로 5일간 전처치 한후 6일째 SQ과 5-FU을 복강 투여 하였으며, SQ은 도살 직전까지 24시간 간격으로 투여하였다. 투여후 24시간, 48시간, 72시간, 96시간 경과후 각 실험군당 5마리의 간조직을 적출하였다.

3. 전자현미경관찰

실험 동물에서 간 조직의 일부를 절취하여 전고정액 속에서 1 mm³ 크기로 세절한 후 2.5% glutaraldehyde (phosphate buffer, pH 7.2)로 2시간 동안 전고정하였다. 전고정이 끝난 조직은 동일 완충액을 사용 10분 간격으로 3회 세척한 후 1% osmium tetroxide (OsO₄)로 2시간 후 고정 한 다음 동일 완충액으로 포매하였고 60°C 오븐에서 30시간 중합시켰다. 포매된 조직들을 LKB-V형 ultramicrotome을 사용 1 μm 두

께로 절편을 제작하여 1% methylene blue나 1% toluidine blue로 hot plate (60°C)상에서 염색하였다. 염색된 시료를 광학현미경으로 관찰하여 조직을 확인한 다음 동일한 부위에서 50 nm 두께로 초박절편을 제작하여 copper grid에 부착하였고, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 다음 JEM 100CX-II 투과형 전자현미경 (80 KV)으로 관찰하였다.

결 과

24시간 A군에서 핵의 핵막은 정상군에서처럼 둥글게 나타났으나, 핵질과 염색질은 대부분 파괴되어 전자밀도가 매우 낮게 나타났다. 조면소포체는 층상배열을 이루고 있지 않았을 뿐만 아니라 내강이 매우 팽대되어 있었으며 부착리보솜은 정상군에 비하여 매우 드물게 나타났다. 한편 이들 조면소포체의 주변부에서는 전이소낭들이 다수 관찰되었다. 사립체는 내강이 매우 팽대되었을 뿐만 아니라 내막이 대부분 파괴되어 사립체능선이 거의 관찰되지 않거나 일부는 소포를 형성하여 내강내에 존재하기도 하였다. 소수의 효소원관립들과 지방방울들이 관찰되었는데 전반적으로 간세포의 괴사현상이 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 1). B군의 핵은 핵막이 등글고 염색질은 진정염색질과 이질염색질이 비교적 고르게 나타나 정상군과의 차이를 관찰할 수 없었다. 조면소포체는 세포질 전반에 걸쳐 매우 발달되어 있을 뿐만 아니라 수조가 전형적인 층판구조를 이루고 있었으나, 내강은 매우 팽대되어 나타났다. 조면소포체 주변에서는 전이소낭들이 다수 관찰되었다. 다수의 사립체가 조면소포체의 수조와 인접하여 나타나는데 A군에 비하여 팽대현상이나 내막의 파괴현상은 관찰되지 않았다. 활면소포체는 세포질의 외연부에서 주로 관찰되었는데 이들의 내강은 매우 팽대되어 있었다 (Fig. 2).

48시간 A군은 핵의 핵막이 다소 불규칙하고 이질염색질이 정상군에 비하여 많이 관찰되었다. 조면소포체의 수조들은 층판구조를 이루고 있었으나 수조사이의 간격이 정상군에 비하여 다소 넓게 나타났다. 24시간 군에서 관찰되었던 내강의 팽대현상은 관찰되지 않았다. 활면소포체는 세포질의 외연부에서 주로 관찰되는

데 내강이 매우 팽대되어 있었다. 사립체는 정상군에 서처럼 세포질 전반에 걸쳐 다수 관찰되었고 사립체능선은 뚜렷이 나타났으나, 이들 기질의 전자밀도는 정상군에 비하여 매우 낮게 관찰되었다(Fig. 3). B군은 핵의 핵막이 24시간 군에 비하여 다소 불규칙하지만 핵질과 염색질은 정상군과 유사한 소견을 보여주었다. 활면소포체는 세포질 전반에 걸쳐 존재하였으며, 내강은 매우 팽대되어 있었다. 사립체는 세포질 전반에 걸쳐 고르게 관찰되었는데, 사립체능선의 형태가 비교적 뚜렷하게 나타났으며 기질은 비교적 전자밀도가 높게 관찰되었다(Fig. 4).

72시간 A군은 핵의 핵막이 불규칙하나 염색질은 비교적 고르게 나타났다. 조면소포체를 구성하는 수조들은 정상적인 층판구조를 형성하고 있었을 뿐만 아니라 부착리보솜의 수도 정상군과 유사하게 관찰되었다. 사립체는 세포질 전반에 걸쳐 나타났으나 일부의 것은 매우 팽대되어 나타났을 뿐만 아니라 사립체능선이 파괴되었고 기질은 약간의 섬유성 물질을 제외하고는 공포화되어 있었다. 나머지 사립체는 정상군에서 관찰되었던 것과 유사한 소견을 보여주었다. 두 간세포들 사이에서 담세관이 관찰되었다(Fig. 5). B군은 핵의 핵막이 둥글고 염색질은 정상군에서 처럼 비교적 고르게 나타났다. 조면소포체는 수조들이 정상군에서처럼 층판구조를 이루고 있었으나 내강은 매우 팽대된 양상을 보여주었다. 이들 주변에서는 전이소낭들이 다수 관찰되었다. 활면소포체는 잘 발달되어 있었으나 앞의 실험군에서 관찰되었던 내강의 팽대현상은 없었다. 사립체는 대부분 구형으로 관찰되며 정상군과 유사한 소견을 보여 주었으나 소수의 것은 크고 분지되어 있었다. 다수의 용해소체들이 사립체의 수조 끝 부분에 인접하여 나타났다(Fig. 6).

96시간 A군은 핵의 핵막이 비교적 둥글고 이중막의 형태를 관찰할 수 있었다. 핵질과 염색질은 정상군과 유사한 소견을 보여주었다. 조면소포체의 수조들은 층판구조를 이루고 있었으며, 부착리보솜체들도 정상군에서 처럼 다수 관찰되었다. 사립체는 둥근형과 막대형으로 관찰되었는데 일부의 것은 정상군에서 관찰되었던 것보다 다소 크게 관찰되었을 뿐만 아니라 내강에서는 일부 파괴된 양상도 보여주었다. 활면소포체는 매우 발달되어 있었으며 앞의 실험군에서 관찰되었던

팽대과립들이 세포질 전반에 걸쳐 나타났다(Fig. 7). B군의 핵은 핵의 핵막이 다소 불규칙하긴 하나 핵질과 염색질은 정상군과 유사한 소견을 보여주었다. 조면소포체들의 수조도 정상군에서 관찰되었던 것처럼 전형적인 층판구조를 이루고 있었으며, 부착리보솜 역시 정상군과 유사한 소견을 보여주었다. 사립체는 대부분 둥근형이었으며, 사립체능선의 형태와 기질은 정상군의 것과 유사하였다(Fig. 8).

고 찰

암치료에 있어 이상적인 약물투여의 형태는 충분한 양의 항암제를 암 부위로 직접 공급하고 기타 일반조직에는 영향이 미치지 않도록 하는 것이다. 최근 고품암에 대한 효과적인 치료제로서 생물학적 제제에 관심이 높아지고 있는데 이는 재조합 DNA 기술의 발달에 따라 이를 물질의 임상응용이 용이해졌기 때문이다.

Willen과 Stenram (1967)은 5-FU를 투여한 백서의 간장에서 ribosomal RNA의 불투명하지만 전구물질이 cytoplasmic ribosomal RNA로 전환되지 않으므로 ribosomal RNA의 합성이 억제된다고 하였다. 또, Danneberg와 Heidelberger (1958), Goldberg와 Pardee (1966)는 5-FU와 그 대사물질인 5-fluorodeoxyuridylate가 thymidylate synthetase를 억제하여 pyrimidine nucleotide 형성을 저해하므로 RNA 및 DNA의 합성을 저해한다고 보고하였으며, Skalko 및 Jacobs (1978)은 임신중인 생쥐에 5-FU를 투여한후 nucleotide편입을 측정하여 DNA 합성 억제와 세포치사 간의 상호관계를 연구한 결과 5-FU이 thymidylate synthetase에 작용하여 DNA 합성이 억제됨에 따라 세포가 치사하게 된다고 보고하였다.

본 실험에서도 5-FU만 투여한후 A군의 24시간에서 핵의 핵막은 둥글게 나타났으나 핵질과 염색질의 파괴현상이 뚜렷하였고, 48시간에서는 24시간보다 핵막이 더욱 불규칙하고 핵질과 염색질의 전자밀도가 정상군보다 다소 높게 나타났는데 이것은 5-FU이 핵산의 합성을 저해하기 때문이라고 사료된다.

이러한 5-FU의 핵산억제 작용은 악성 종양세포에만 선택적으로 작용하는 것이 아니라, 정상조직세포 특히 재생이 빠른 위장관 상피세포, 골수의 조혈세포

와 간장의 간실질세포에도 영향을 미치기 때문에 구내염, 설사, 구토, 백혈구 및 혈소판의 감소출혈 및 케양, 피부염 등의 독성작용을 나타낸다고 보고되고 있다(Stalzer, 1965). 송 등(1974)은 생쥐에 5-FU를 투여하여 관찰한 바 1~2일 사이에는 핵분열이 없었고, 3일째부터 나타나기 시작하여 3~6일 사이에 많은 핵분열을 볼 수 있었다고 하였다.

본 실험에서도 A군의 24시간과 48시간에서 핵질과 염색질의 파괴현상이 뚜렷하였지만, 72시간에서부터 핵막은 불규칙하나 염색질이 고르게 분포하는 양상을 보였고, 96시간에서는 핵막이 비교적 둥글고 염색질이 고르게 보였으며 이중막이 관찰되는 것으로 보아 72시간 이후부터 세포가 회복되는 것으로 사료된다.

이 등(1981)은 5-FU를 투여한 생쥐의 간실질세포에서 조면소포체, 사립체 및 Golgi복합체가 손상되고, 용해소체는 증가되었다고 보고하였다.

본 실험 A군 24시간과 48시간 이후군에서도 조면소포체에 층판구조의 파괴현상 및 소관의 절단이 두드러지게 보였고, 활면소포체가 분리된 현상이 나타나 전반적으로 세포의 파괴현상이 두드러졌으며, 조면소포체, 사립체와 Golgi복합체가 손상되고, 용해소체가 증가되었다. 이러한 현상은 5-FU의 핵산 합성 억제작용으로 인해 간의 실질세포가 손상되기 때문이라 사료된다.

SQ는 불포화탄화수소로서 심해상어(sharks)의 간에서 많은 양이 추출 되고, 식물에서는 olive유에 많은 양을 함유하고 있다. 특히 인체의 기관에서는 지방조직(240.0±33.0 µg/g), 횡문근(12.5±2.9), 담낭(6.4±1.4) 등에 포함되어 있는데, 인간의 지방조직은 특히하게도 SQ의 농도가 높게 나타난다. 80%는 지방방울에 있고, 20%는 세포내에 부착된 microsome 막내에 존재하는데, 지방적보다는 microsome 막내에 존재하는 SQ이 막계(membrane system)에 훨씬 빠르게 작용한다고 보고하였다(Tilvis와 Miettine, 1980).

본 실험에서도 SQ과 5-FU를 투여한 군에서는 24시간에서 그물처럼 배열된 조면소포체와 활면소포체는 다소 팽대되었고, 사립체의 전자밀도가 높게 나타났으며 48시간에서는 24시간과 커다란 변화가 보이지 않았으나, 조면소포체와 활면소포체는 내강이 약간 팽대

되어 나타났고, 사립체는 정상군에서 처럼 다수 관찰되었다. 또 72시간에서 조면소포체는 정상군과 비슷하였으며, 사립체 내강이 약간 팽대되었고 층판구조를 한 모양도 관찰되었다. 96시간에서 조면소포체는 전형적인 층판구조를 이루었으며 사립체도 정상군과 유사하였다. 위와 같은 결과는 사립체 막내에 존재하는 SQ과 외부로 부터 투여한 SQ이 조면소포체, 활면소포체, 사립체 등 세포 소기관에 작용하는 것으로 사료된다.

Tilvis와 Miettinen (1983)는 1%의 SQ가 함유된 사료를 흰 쥐에 투여하였을 때 혈청인지질단백질계와 장점막, 간 및 지방조직에서 SQ의 축적 정도가 현저하게 증가하였으며 혈청초저비중지단백(very low density lipo-protein, VLDL)의 농도 또한 증가하였다고 하였는데, 이는 식이에 의한 SQ의 함량과 연관이 있다고 보고하였다. Strandberg 등(1990)은 사람에게 SQ(900 mg/day)을 7~30일 동안 투여한 결과 약 60%가 흡수 되었으며 혈청 SQ농도는 17배 증가하였으나 혈청이 가장 많은 지중해 연안의 사람들은 혈중 콜레스테롤 농도가 Olive유를 사용하지 않는 사람들보다 적었다고 보고하였다.

본 실험에서도 5-FU과 SQ를 계속 투여한 72시간과 96시간군의 핵, 조면소포체, 활면소포체와 사립체가 높은 회복율을 나타낸 것은 투여한 SQ의 작용이라고 사료된다.

SQ이 포함된 화합물인 Roindex를 종양이 유발된 생쥐에 처치했을 때 처치군은 종양의 33.34%가 억제되었으며, 처치하지 않은 군에서는 3.44%만이 억제되었다고 하였고(Desai, 등 1996), 흰쥐의 간에서 SQ의 합성효소는 소포체와 microsome fraction에 위치해 있으며, SQ합성효소는 hypolipodemic drugs와 dietary treatment로도 조절된다고 보고하였다(Stamelos 등, 1993). 김과 김(1996)에 의하면 SQ과 항암제인 cyclophosphamide를 흰쥐에 투여한 결과 간실질세포들의 손상정도가 낮게 나타나는 것은 전처치한 SQ의 효과라고 보고하였다.

이것으로 보아 SQ은 전반적으로 5-FU의 세포독성을 억제하기 때문에 SQ 처치군이 처치하지 않은 군보다 세포소기관들의 손상정도가 낮게 나타나며, 결과적으로 SQ이 세포소기관의 막계형성에 관여하고 간에

미치는 세포의 독성을 약화 시키는 것으로 사료된다.

결 론

핵산의 합성을 억제하여 세포증식을 저해하는 항대사성물질인 5-FU의 세포독성에 대한 SQ의 효과를 알아보기 위해 생쥐에 SQ를 전치한 다음 5-FU를 투여하고 간조직을 전자현미경으로 관찰 한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

A군에서는 핵의 파괴현상은 24시간과 48시간군에서 뚜렷하게 관찰되다가 72시간 군에서부터 다소 회복되어 갔다. 조면소포체는 24시간에서부터 내강의 팽대현상과 수조의 불규칙한 증판구조가 두드러지게 나타나기 시작하였으며, 72시간에 이르기 까지 내강의 팽대현상이 관찰되었다. 활면소포체는 24시간에서부터 96시간군까지 내강의 팽대현상이 뚜렷하게 나타났다. 사립체는 24시간에서부터 내막의 파괴현상이 두드러지게 나타나는데 72시간에서는 괴사된 것과 정상적인 소견을 갖는 것이 함께 관찰되었고, 96시간에서도 5-FU의 세포독성에 의해 다소 파괴된 양상을 보여주었다.

B군에서는 24시간과 48시간에서 핵은 5-FU 독성에 다소 영향을 받았지만 A군에서 관찰되었던 핵의 파괴현상은 나타나지 않았다. 조면소포체는 24시간에서 72시간군에 이르기 까지 수조의 증판구조가 전형적인 형태를 유지하고 있었지만 내강의 팽대현상은 계속 나타났다. 활면소포체 또한 24시간에서 72시간군에 이르기까지 내강의 팽대현상을 관찰할 수 있었다. 사립체는 모든 실험군에서 정상적인 소견을 보여주었다. B군의 96시간군에서는 모든 세포소기관들이 정상군과 유사한 소견을 보여주었다. 이와 같은 결과는 SQ의 처치가 5-FU의 세포독성이 간 세포의 세포소기관에 미치는 영향에 대한 보호작용과 세포소기관의 막계형성에 관여하는 것으로 사료된다.

REFERENCE

김정상, 김종세, 1996. Squalene이 항암제를 투여한 흰 쥐의 간에 미치는 영향, 한국전자현미경학회지 26(1), 1-9.
송달호, 이태숙, 1974. 5-Fluorouracil이 장절막에 미치

는 병리조직학적 변화 대한 실험연구, 충남의대잡지 1(1).
이광수, 이규식, 1981. 5-Fluorouracil이 절식시킨 생쥐의 간실질세포에 미치는 영향, 한양의대잡지 1, 5-32.
Ansfield FJ, Curreri AR, 1959. Further clinical studies with 5-fluorouracil, J. Nat. Inst. 22, 497-507.
Cohen SS, Flaks JG, Dichenstem, 1958. The mode of action 5-fluorouracil and its derivatives, Proc. Nat. Acad. U.S. 44, 1004-1012.
Curreri AR, Ansfield FJ, Heiderger C, 1958. Clinical studies with 5-fluorouracil, Cancer Res. 18, 478-489.
Danneberg PB, Heidelberger C, 1958. Studies on fluorinated pyrimidines. IV. Effect on nucleic acid metabolism in vitro, Cancer Res. 18, 329-332.
Desai KN, Wei H, Lamartiniere CA, 1996. The preventive and therapeutic potential of the squalene-containing compound, Roindex, on tumor promotion and regression, Cancer Lett. 19, 101(1), 93-96.
Flock NH, Hellman L, 1965. The effect of 5-Fluorouracil on rectal mucosa, Gastroenterology 48, 430-437.
Goldberg AR, Pardee AB, 1966. On the action of fluorouracil on leukemia cells, Cancer Res. 26, 1611-1615.
Heidelberger C, Danneberger PB, 1960. Studies on fluorinated pyrimidines. XI. In vitro studies on tumor resistance, Cancer Res. 20, 903-909.
Heidelberger C, Scheiner J, 1957. Fluorinated pyrimidines. A new class of tumor inhibitory compounds, Nature 179, 663-666.
Keyomari K, Moran R, 1985. Folinic acid augmentation of the effects of fluoropyrimidines on murine and human leukemic cells, Cancer Res. 46, 5229-5235.
McTaggart F, Brown GR, Ward WH, 1996. Inhibition of squalene synthase of rat liver by novel 3' substituted quinuclidines, Biochem. pharmacol. 51(11), 1477-1487.
Nadler SH, Moore GE, 1968. A clinical study of

- fluorouracil, Surg. Gyn. Obs. 126, 1210-1214.
- Saint-Leger, Bague DA, Coheu E, Chivot M, 1986. A possible role for squalene in the pathogenesis of acne. Brit. J. Dermatology 114, 535-542.
- Skalko RG, Jabobs DM, 1978. The effect of 5-fluorouracil on (3H)nucleoside incorporation into the DNA mouse embryos and maternal tissues, Exp. Mol. Pathol. 29, 309-315.
- Stalzer RC, 1965. Effect of 5-fluorouracil on human hematopoiesis. A morphologic study, Cancer 18, 1071-1078.
- Stamellos MD, Shaxkelfkord JE, Sbechter I, Krisand SK, 1993. Subcellular localization of squalene synthase in rat hepatic cells, J. Biol. Chem. 268(17), 12825-12836.
- Storm HM, Kuner BF, Norton S, 1993. Radioprotection of mice by dietary squalene, Lipids 28(6), 555-559.
- Strandberg TE, Tilvis RS, Miettinen TA, 1990. Metabolic variables of cholesterol during squalene feeding in humans: comparison with cholestyramine treatment, J. Lipids Res. 31(9), 1637-1643.
- Tilvis RS, Miettinen TA, 1980. Squalene, methyl sterol, and cholesterol levels in human organs, Arch. Pathol. Lab. Med. 104, 35-40.
- Tilvis RS, Miettinen TA, 1983. Dietary squalene increase tissue sterols and fecal bile acid in the rat, Lipids 18, 32-36.
- Tsukamoto I, Kojo S, 1991. The effects of fluorouracil on thymidylate synthase and thymidine kinase in regenerating rat liver after partial hepatectomy, Biochem. Biophys. Acta. 1074(1), 52-55.
- Watkins E, Khazei AM, Nahra KS, 1970. Surgical basis for arterial infusion chemotherapy of the liver, Surg. Gyn. Obs. 130, 582-605.
- Willen R, Stenram U, 1967. RNA synthesis in the liver of rats treated with 5-fluorouracil, Arch. Biochem. Biophys. 119, 501-503.
- Zubrod CG, 1962. Effect of 5-fluorouracil and 5-fluorodeoxyuridine on gastrointestinal cancer, J.A.M.A. 178, 295-299.

FIGURE REGENDS

- Fig. 1.** Electron micrograph of the hepatic cell after 24-hours treated with 5-FU. Electron micrograph showing that the cisternae of rough endoplasmic reticulum (RER) and smooth endoplasmic reticulum are destructed or dilated. A number of zymogen granule (Zy) and transition vesicles (arrow) are observed. The outer and inner membrane of the mitochondria are detached or destructed. L, lipid droplet; N, nucleus. Bar indicates 1 μ m.
- Fig. 2.** Electron micrograph of the hepatic cell after 24-hours treated with squalene and 5-FU. The cisternae of the rough endoplasmic reticulum (RER) and smooth endoplasmic reticulum (SER) are dilated. A number of mitochondria (M) are observed. N, nucleus. Bar indicates 1 μ m.
- Fig. 3.** Electron micrograph of the hepatocyte after 48-hours treated with 5-FU. A number of mitochondria (M) which was dilated more or less are observed. N, nucleus; RER, rough endoplasmic reticulum; SER, smooth endoplasmic reticulum. Bar indicates 1 μ m.
- Fig. 4.** Electron micrograph of the hepatocytes after 48-hours treated with squalene and 5-FU. Electron micrograph showing a number of mitochondria (M) and zymogen granule (Zy). The cisternae of rough endoplasmic reticulum (RER) and smooth endoplasmic reticulum (SER) are dilated. N, nucleus. Bar indicates 1 μ m.
- Fig. 5.** Electron micrograph of the hepatocytes after 72-hours treated with 5-FU. A number of dilated mitochondria (M) are observed, but the cristae of mitochondria are destructed. BC, bile canaliculi; N, nucleus; RER, rough endoplasmic reticulum; SER, smooth endoplasmic reticulum. Bar indicates 1 μ m.
- Fig. 6.** Electron micrograph of the hepatocytes after 72-hours treated with squalene and 5-FU. The cisternae of rough endoplasmic reticulum (RER) are dilated, and a number of transition vesicles are observed. M, mitochondria; N, nucleus; SER, smooth endoplasmic reticulum; Zy, zymogen granule. Bar indicates 1 μ m.
- Fig. 7.** Electron micrograph of the hepatocytes after 96-hours treated with 5-FU. A number of mitochondria (M) which was destructed at cristae are observed. N, nucleus; RER, rough endoplasmic reticulum; P, polysome. Bar indicates 1 μ m.
- Fig. 8.** Electron micrograph of the hepatocytes after 96-hours treated with squalene and 5-FU. M, mitochondria; N, nucleus; RER, rough endoplasmic reticulum. Bar indicates 1 μ m.





