

BCG가 Ehrlich 암세포를 이식한 생쥐 위점막 으뜸세포의 미세구조에 미치는 영향

류인상, 안의태, 박경호, 박대균, 김명수¹, 고정식*
순천향대학교 의과대학 해부학교실
¹한서대학교 보건대학 방사선학과

Effects of BCG on Gastric Chief Cells of the Mouse Implanted with Ehrlich Carcinoma Cells

In-Sang Ryoo, E-Tay Ahn, Kyung-Ho Park,

Dae-Kyoon Park, Myeong-Soo Kim¹ and Jeong-Sik Ko*

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

¹Department of Radiological Science, Division of Health Science, Hanseo University, Seosan, Korea

(Received August 29, 2005; Accepted September 20, 2005)

ABSTRACT

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

Healthy adult ICR mice weighing 25 gm each were divided into normal and experimental groups (experimental control group and BCG treated group). 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 last injection, each mouse was sacrificed. Pieces of the tissue were taken from the stomach, prefixed with 2.5% glutaraldehyde 1.5% paraformaldehyde solution, followed by post fixation with 1% osmium tetroxide solution. The ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. The size of zymogen granule and the size of the mitochondrion of the gastric chief cells were observed and calculated.

In the BCG treated group, most chief cells did not show any difference in ultrastructure, except that myelin figures were more frequently observed, in comparison with that of normal control group. The size of zymogen granule in the gastric chief cells of normal control, experimental control and BCG treated groups were $0.98 (\pm 0.108)\mu\text{m}$, $1.05 (\pm 0.092)\mu\text{m}$ and $0.93 (\pm 0.053)\mu\text{m}$, respectively. And the mitochondrial size of the gastric chief cells of normal control, experimental control and BCG treated groups were $0.80 (\pm 0.130)\mu\text{m}$, $0.83 (\pm$

*Correspondence should be addressed to Dr. 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

0.143 μm and 0.72 (± 0.078) μm , respectively.

From the above results, it was concluded that BCG may slightly suppress function of the gastric chief cells.

Key words : BCG, Ehrlich carcinoma cell, Gastric chief cell, Mitochondria, Secretory granule

서 론

결핵예방백신으로 이용되는 BCG(Bacillus Calmette-Guerin)를 투여하면 지라 내에 세포독성 T세포를 억제하는 큰포식세포 같은 억제세포(suppressor cell)가 발달되어 면역반응을 조절하기 때문(Klimpel & Henney, 1978)에 방광암환자에게 투여하면 항암효과가 높으며 종양의 재발생율도 현저히 감소한다(El-Demiry et al., 1987). 방광암환자에 BCG를 투여하기 전에는 종양조직에서 형질세포와 림프구만 관찰되지만 BCG를 투여한 후에는 종양조직에서 조직구, 호중성백혈구 또는 호산성백혈구들도 관찰된다(Kudo et al., 1993). 위암환자의 경우에도 화학요법(FAM; 5-Fluorouracil + Adriamycin + Mitomycin)을 단독으로 시행한 경우에 비해 화학요법과 더불어 면역요법제로서 BCG를 함께 투여하면 항암성물질인 cytokine이 증가한다(Popiela et al., 1988; Zembala et al., 1993). 면역요법으로서 BCG를 사용하면 α -interferon에 비하여 종양의 재발생율을 현저히 낮출 뿐만 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).

위점막을 구성하는 표면상피세포, 점액목세포, 으뜸세포, 벽세포 및 내분비세포 중 고유위샘의 몸통부분과 바닥부분에 널리 분포하고 있는 으뜸세포는 큰급이를 따라 좀더 많이 분포하며 동물에 따라 그 수가 다양한데, 마우스의 위점막에는 약 900만개의 으뜸세포가 있다(Helander, 1981). 으뜸세포는 위점막의 잘록부위(isthmus)에서 증식 분화되어 샘아래쪽으로 이동하는데 수명이 다된 세포들은 속공간으로 배출되며 일부세포는 핵이 농축된 후 큰포식세포에 의해 제거된다(Lee & Leblond, 1985; Karam et al., 1993, 2003; Kressin, 1997). 마우스의 으뜸세포는 분화정도에 따라

분비과립의 분포와 크기가 달라서, 미성숙세포는 샘바닥의 상부에 분포하며 과립이 작고 진하며 과립세포질세망의 발달정도가 미약하다(Kressin, 1997). ³H-thymidine을 이용한 연구에서 위점막 세포들 중 표면상피는 세대교대시간이 매우 짧아 3일 정도인데 비하여 샘을 이루는 세포들은 그 수명이 훨씬 길어서 벽세포는 2~3개월, 으뜸세포는 2~20개월 걸린다고 한다(Cameron & Thrasher, 1971; Helander, 1981; Lee & Leblond, 1985; Magami et al., 2002). 위점막에서 생산되는 위액의 대부분은 HCl과 pepsinogen으로 이루어졌으며 하루에 500~1,000 mL 분비되는데 식사 사이에는 시간당 수 mL 쯤만 분비되는 반면, 식사 중에는 시간당 수백 mL 쯤 분비된다. 위액분비는 신경계통과 내분비계통에 의해 조절되며, 되돌아오는 신경반사를 통해 미주신경은 위샘과 표면상피의 분비를 증가시킨다. 또한 위액분비는 음식을 씹을 때 급격히 증가하는데 그 이유는 음식을 씹는 자극이 뇌에 전달되면 미주신경을 통해서 되돌아오는 신경반사를 통해 벽세포를 자극하므로 위산분비를 촉진하고, 위산분비는 gastrin(G) 분비를 자극하기 때문이다(Fawcett, 1994). 공복일 때는 음식에 의한 중화효과가 없어서 위액의 pH가 낮아지므로 D 세포에서 분비된 somatostatin에 의해 gastrin분비가 억제된다. 한편 으뜸세포의 pepsinogen 분비는 신경자극에 의해 촉진될 뿐만 아니라 음식소화 때 위산분비에 의해서도 촉진되며, 위속공간의 낮은 pH는 pepsinogen을 pepsin으로 변화시키는데 필요하다(Fawcett, 1994; Chung, 2001). 위점막의 으뜸세포는 corticosterone 또는 thyroxin 등 호르몬을 투여하면 과립세포질세망과 골지복합체가 발달하여 기능이 활성화되지만, 부신을 제거하거나 갑상샘기능저하증이 되면 과립세포질세망과 골지복합체가 미약해져 세포의 활성이 떨어진다(Tseng et al., 1987). 또한 pilocarpine을 투여하면 미주신경이 자극되어 으뜸세포의 과립의 크기와 양이 감소되는 반면에 atropine을 투여하면 미주신경이 억제되어 과립의 크기와 양이 증가

하며 pepsin의 활성이 증가(Helander, 1981)하는 등 여러 가지 여건에 따라 세포가 예민하게 반응한다.

위점막에서 생산되는 위액의 대부분을 이루는 HCl과 pepsinogen 중 HCl을 분비하는 벽세포의 변화에 대한 연구는 비교적 많이 있으나(Miyauchi et al., 1999; Murayama et al., 2000; Ogata et al., 2000; Ko et al., 2002a, b), pepsinogen을 분비하는 으뜸세포에 대한 연구는 드물다. 특히 우리나라 사람들에서 가장 많이 발병하는 종양 중의 하나인 위암의 치료과정 중에 위점막 으뜸세포의 변화에 대한 연구는 찾아보기 힘들다. 위는 소화기계통에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 연령, 스트레스 및 종양 등의 질병상태에 따라서도 민감하게 반응한다. 따라서 결핵균에 대한 면역기능을 향진시켜서 결핵을 예방하는 목적으로 이용될 뿐만 아니라 근래에는 방광암 치료보조제로 이용되고 있는 BCG를 생체에 투여하면 위점막을 이루는 세포들은 그 기능이나 형태에 변화가 있으리라 예상된다. 또한 위점막 이외의 부위에 종양이 발생하거나, 이들 종양을 치료하기 위해 항암제를 투여하였을 때에도 그 기능이나 형태에 변화가 있으리라 예상된다. 따라서 Ehrlich 종양세포를 살부위에 이식한 후 고농도의 BCG를 피부밑조직에 반복 투여하였을 때 위점막 으뜸세포에 미치는 영향을 형태적으로 밝혀 종양치료과정에 위점막의 변화를 연구하는데 기본정보를 제공하고자 이 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

실험동물로는 체중 25g 내외의 ICR생쥐를 사용하였으며 이들을 정상대조군, 종양세포이식대조군(종양대조군) 및 종양세포이식후 BCG투여군(BCG투여군)으로 나누었다. 정상대조군 이외의 종양대조군과 BCG투여군의 동물들은 살부위 피하에 각각 1×10^7 개의 Ehrlich종양세포를 이식하였다. BCG투여군은 종양세포이식 다음날부터 방광암 치료용으로 제조된 농축건조된 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 주

사하였다. 종양대조군은 종양세포이식 후에 0.2 mL의 생리식염수를 피부밑조직에 주사하였고 정상대조군은 종양세포를 이식하지 않은 동물을 사용하였으며, 각 군당 5마리씩 사용하였다. 이 실험에 사용된 동물들은 모두 희생시키기 전날 저녁부터 사료는 주지 않고 물만 공급하였으며, 다음날 오전 10~11시 사이에 희생시켰다. 종양대조군과 BCG투여군은 각각 7회씩 생리식염수 또는 BCG를 투여한 다음날 ether마취하에 앞배벽을 열어 위조직을 절취하였다.

절취한 조직은 2.5% glutaraldehyde-1.5% paraformaldehyde 혼합액(Millonig's phosphate buffer, pH 7.3)에 고정된 후, 1% osmium tetroxide 액(Millonig's phosphate buffer, pH 7.3)에 다시 고정하였으며, 고정이 끝난 조직은 탈수과정을 거쳐 araldite 혼합액에 포매하였다. 포매된 조직은 1 μ m 두께의 절편을 만들어 toluidine blue 액으로 염색하여 위샘이 잘 절단된 부위를 택하여 60~70 nm 두께의 얇은 절편을 만들었다. 각 절편은 uranyl acetate 액과 lead citrate 액으로 대조염색한 후, JEM 100CX-II 전자현미경으로 비교 관찰하였다. 각 세포는 5,300배율로 촬영한 후 3배로 확대인화한 사진에서 각 실험군당 200개 이상의 과립의 지름과 사립체의 크기를 측정하였는데, 사립체는 모양이 구형 또는 긴타원형 등 다양했기 때문에 긴축의 지름을 측정하였으며 student-t test를 이용하여 통계처리 하였다.

결 과

1. 정상대조군

위점막의 으뜸세포는 고위위샘의 몸통부분과 바닥부분에 널리 분포하고 있으며, 세포의 모습은 낮은 원주형이며 자유면에 짧은 미세융모가 불규칙하게 나있고 이웃세포와 접하는 옆면에 연접복합체가 발달되어 있다. 핵은 난원형으로 바닥쪽쪽으로 치우쳐 위치하며 핵소체가 뚜렷하고 핵막을 따라 문지염색질이 분포되어 있었다. 핵주위와 바닥쪽 세포질에는 층판모양의 과립세포질세망 수조가 조밀하게 배열되어 있고 핵상부에는 골지복합체가 발달되어 있었으며 구형, 난

원형 또는 막대모양의 사립체가 산재하였다. 또한 전자밀도가 낮은 구형 또는 난원형의 분비과립들이 핵상부의 세포질에 분포하고 있었다. 이와 같은 특징적인 구조 때문에 세포질 속에 세포속모세관 (intracellular canaliculus)이 관찰되며 사립체가 많고 무과립세포질세망이 발달되었고 분비과립이 없는 벽세포와는 쉽게 구별되었다. 으뜸세포의 분비과립은 단위막에 싸여 있고 전자밀도는 과립에 따라 다소 차이가 있었으나 대체로 미약했으며 크기는 평균지름이 $0.98 (\pm 0.108) \mu\text{m}$ 였다 (Table 1, Fig. 1). 사립체의 크기는 주위에 있는 벽세포의 것에 비해 수가 적을 뿐만 아니라 그 크기도 다소 작아서 지름이 대부분 $0.47 \mu\text{m}$ 에서 $1.15 \mu\text{m}$ 사이에 있으며 평균 크기는 $0.80 (\pm 0.130) \mu\text{m}$ 였다 (Table 2, Fig. 1).

2. 실험군

1) 종양대조군

으뜸세포의 모습은 정상대조군의 소견과 유사하였으나 과립세포질세망의 수조와 골지복합체의 수조가 다소 더 확장된 모습을 보였다. 또한 정상대조군과 같이 골지복합체의 자유면쪽에는 전자밀도가 다소 다른 구형 또는 난원형의 분비과립이 모여 있었으며 과립의 평균 크기는 지름이 $1.05 (\pm 0.092) \mu\text{m}$ 로서 정상대조군에 비해 7% 정도 컸으나 통계적으로 유의성은 없었다 (Table 1, Fig. 2). 한편 정상대조군에 비해 세포질 또는 과립 속에서 수초구조가 자주 관찰되었으며 같은 과립 속에 전자밀도가 다른 물질이 포함된 경우도 관찰되었다. 또한 사립체는 그 지름이 대부분 $0.42 \mu\text{m}$ 에서 $1.13 \mu\text{m}$ 사이에 있으며 평균 크기는 $0.89 (\pm 0.149) \mu\text{m}$ 로서 정상대조군에 비해서는 4% 정도 컸으나 통계적으로는 유의성이 없었다 (Table 2, Fig. 2).

2) BCG 투여군

으뜸세포의 전체적인 모습은 종양대조군의 소견과 유사하게 과립세포질세망의 수조와 골지복합체의 수조가 다소 확장되었다. 그러나 골지복합체의 수조가 다소 흐트러진 모습을 보였고 정상대조군에 비해 용해소체가 자주 관찰되었으며 수초구조가 골지복합체 주위와 과립주위에서 자주 관찰되었다 (Figs. 3, 4). 으뜸세포의 핵은 핵막을 따라 뭉친염색질이 분포하며

Table 1. The zymogen granular size (μm) of the gastric chief cells in different groups

Group	Size	Ratio	
		Experiment/ normal	Experiment/ tumor control
Normal control	$0.98 (\pm 0.108)$	1.00	0.93
Tumor control	$1.05 (\pm 0.092)$	1.07	1.00
BCG	$0.93 (\pm 0.053)$	0.95	0.88*

Numbers in parenthesis denote standard deviation of means

*Difference between the tumor control and BCG-treated group is significant at $p < 0.05$

Table 2. The mitochondrial size (μm) of the gastric chief cells in different groups

Group	Size	Ratio	
		Experiment/ normal	Experiment/ tumor control
Normal control	$0.80 (\pm 0.130)$	1.00	0.96
Tumor control	$0.83 (\pm 0.143)$	1.04	1.00
BCG	$0.72 (\pm 0.078)$	0.90	0.87*

Numbers in parenthesis denote standard deviation of means

*Difference between the tumor control and BCG-treated group is significant at $p < 0.05$

핵소체가 뚜렷했으며, 핵 주변부를 따라서 전자밀도가 높은 밝은 테두리를 지닌 염색질주위과립 (perichromatin granule)이 가끔 관찰되었다. 으뜸세포의 분비과립의 크기는 $0.93 (\pm 0.053) \mu\text{m}$ 로서 정상대조군에 비해 5% 정도 작았으나 통계적으로 유의성이 없었다. 그러나 종양대조군에 비해서는 12% 정도 작아 통계적으로 유의하였다 (Table 1). 한편 사립체는 그 크기가 $0.48 \mu\text{m}$ 에서 $0.87 \mu\text{m}$ 사이에 있으며 평균 크기는 $0.72 (\pm 0.078) \mu\text{m}$ 로서 정상대조군의 것에 비해서는 10% 정도 작았으나 통계적으로 유의성이 없었다. 그러나 종양대조군의 것에 비해서는 13% 정도 작아서 통계적으로 유의하였다 (Table 2).

고 찰

BCG는 *mycobacterium bovis*의 독성을 약화시킨 것으로서 Mathe et al. (1974) 이 암환자와 백혈병환자에게 면역자극물질로서 처음 이용하였으며, 근래에는 표

면방광암치료시에 보조제로 사용되고 있다. BCG는 방광 내에서 비특이적 감염반응을 보여서 종양조직은 물론 정상조직이 부분적으로 떨어져나가는 현상을 유발시킬 뿐만 아니라 자연살해세포의 활성을 증가시키고 여러 cytokine들(IFN, IL-2, TNF)을 분비하도록 하여 종양조직의 성장을 억제한다(Chirigos, 1992). 그러나 BCG의 항암효과는 BCG와 접하는 부위에 한정되며 신체 전체에는 영향을 미치지 않는다(Bartlett et al., 1972). 방광암의 경우 가슴샘이 없는 nude마우스(BALB/c mice)에서 BCG를 방광 내에 단독 투여하였을 경우에는 항암작용이 미약하거나 없었으나, BCG로 감염된 다른 동물의 비장세포를 1시간전에 정맥 주사한 후에 다시 BCG를 방광 속에 주입하면 암조직의 성장이 현저히 억제되는 것으로 보아, BCG의 항암작용에는 가슴샘의존성 면역반응이 필요하다고 하였다(Ratliff et al., 1987). 또 Kudo et al.(1993)은 방광암 환자에 BCG를 투여하면 투여전의 방광암조직의 사이질에서는 림프구와 형질세포가 관찰되었으나 조기구, 호중성백혈구 또는 호산성백혈구는 거의 관찰할 수 없었다. 그러나 BCG투여로 인해서 종양조직이 줄어든 경우에는 종양조직의 사이질에 이들 세포들의 침윤이 많아졌으며, 특히 종양조직의 사이질과 점막밑조직에 조구구가 현저히 증가하였다. 그러나 BCG투여 효과가 없는 경우에는 종양조직의 사이질부위에만 림프구가 증가되었다.

한편 위암환자들에게 면역화학요법(BCG+5-FU 또는 BCG+FAM)을 시행하면 화학요법만 단독으로 시행한 경우에 비하여, 단핵구와 암세포 사이의 상호관계를 증가시키도록 유도하여 항암성 사이토카인의 생산을 증가시키는 효과가 있다(Popiela et al., 1988; Zembala et al., 1993). 그러나 많은 양의 BCG를 생체에 투여하면 치명적인 영향을 주기도 한다. 마리당 100 mg (9.6×10^8 CFU)의 BCG를 생쥐의 복강 내에 주사하였을 때 실험동물들이 5일 안에 모두 사망하였으며, 부검한 결과 육안적으로는 간, 콩팥 및 림프절은 정상이나 지라는 쭉그러져 있었다. 그러나 마리당 50 mg (4.8×10^8 CFU)이하를 투여한 동물은 체중은 감소했으나 모두 생존하였으며, 주사 후 15일 정도 지나면 체중도 정상으로 회복되었다. 그러나 같은 동물에 2회 반복하여 50 mg (4.8×10^8 CFU)의 BCG를 주사하였을

때는 모두 사망하였으며, 이와 같은 예는 피부흑색소암 부위에 BCG를 반복 투여하였을 경우에도 보고된 바 있다(McKhann et al., 1975). BCG를 반복주사한 동물들의 사망은 과민반응에 의한 것 같으며 반복주사시의 BCG의 LD₅₀는 약 10 mg (0.96×10^8 CFU)이었다(DeHaven et al., 1992).

한편 이 실험에서는 BCG를 하루간격으로 7회 계속 주사하였으나 사망한 동물이 한 마리도 없었는데, 그 이유는 매회 투여량(0.5 mL/25 g B.W.: $0.03 \times 10^8 \sim 0.32 \times 10^8$ CFU)이 매우 적었기 때문인 것 같다. 그러나 비록 투여량은 적었을 지라도 여러 번(7회)에 걸쳐 반복 주사하였기 때문에 미약하나마 지연성과민반응이 유발되었으리라고 생각된다. 과민반응은 T림프구가 자극되어 림포카인을 생산하여 일련의 염증반응을 매개한다는 사실(Roitt et al., 1993)에 비추어 볼 때, 이 실험에서 으름세포의 과립세포질세망의 수조와 골지복합체의 수조가 다소 확장되었고 골지복합체의 수조가 다소 흐트러진 모습을 보이는 경우와 용해소체와 수초구조가 골지복합체 주위와 과립주위에서 자주 관찰된 결과는 BCG를 반복 투여함으로써 유발된 과민반응으로 위점막 으름세포의 기능이 억제되었기 때문이 아닌가 생각된다. 그러나 이와 같은 결과가 과민반응에 의한 결과인지 또는 BCG자체의 독성에 의한 것인지를 밝히기 위해서는 좀더 자세한 연구가 필요하다.

위점막에서 상피세포의 증식은 위샘의 목부위에서만 일어나는데(Lee & Leblond, 1985; Fawcett, 1994; Chung, 2001), 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 위창자관은 항암제 투여시에 부작용이 많이 나타나는 조직으로 알려져 있다. 실제로 BCG를 투여하였을 때 위점막벽세포는 미세구조에 손상을 받아 분비기능이 억제된다는 보고가 있다(Ko et al., 2002a). 그러나 이 실험에서는 BCG투여가 위점막으름세포의 미세구조에 별다른 큰 손상을 주지 않았는데, 이와 같은 실험결과는 일정량의 BCG(0.5 mL/25 g B.W.: $0.03 \times 10^8 \sim 0.32 \times 10^8$ CFU)를 하루건너 한번씩 7회 정도 투여하면 벽세포

에는 손상을 주나 으뜸세포에는 형태적으로 큰 손상을 주지 않는 것 같다. 또한 위점막세포가 ammonia와 같이 세포에 유해한 환경에 노출되었을 때 벽세포는 먼저 샘에서 분리되어 파괴되는 반면, 으뜸세포는 세포질이 농축되면서 큰 수포(bleb)가 생기고 핵이 농축된 후 작게 나누어지는 apoptosis가 일어난다는 보고(Hagen et al., 1997)에 비추어 볼 때 항암제를 장기간 투여한다면 먼저 벽세포가 큰 손상을 입어 기능이 매우 억제된 후 으뜸세포도 손상을 입을 수 있다고 예상된다. 이와 같이 BCG를 투여하였을 때 으뜸세포가 벽세포에 비해 손상을 가볍게 받는 것은 위샘을 구성하는 세포들의 세대교체시간이 벽세포에 비해 으뜸세포가 길다는 보고(Cameron & Thrasher, 1971; Helander, 1981; Lee & Leblond, 1985)에 비추어 볼 때 DNA합성에 영향을 주는 항암제의 특성상 세대교체시간이 긴 으뜸세포의 손상정도가 가벼웠다고 생각된다.

이 실험에서 BCG 투여군의 경우 위점막 으뜸세포에서 미세구조적으로 큰 변화를 볼 수 없었고 단지 분비과립의 크기가 종양대조군의 경우 정상대조군에 비해 7% 증가하였고, BCG 투여군은 5% 정도 감소하였으나 통계적으로 유의한 변화는 아니었다. 이와 같은 결과는 methotrexate, cyclophosphamide, 5-FU을 일주일 5일씩 3주일간 마우스에 구강으로 투여하였을 때 위와 간조직에서는 미세구조적 변화를 관찰할 수 없었다는 보고(Bessler et al., 1996)에 비추어 볼 때 이해할 수 있는 결과라고 생각된다. 그러나 종양대조군의 분비과립은 그 크기가 정상대조군의 것에 비해 증가한 반면 BCG 투여군은 감소하였기 때문에 종양대조군에 비해서는 BCG 투여군의 분비과립의 크기가 12% 정도 작아서 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$). 이와 같은 결과는 종양세포를 위조직에 직접 이식하지는 않고 살부위에 이식하였으나, 종양세포의 이식으로 인한 자극으로 으뜸세포가 다소 활성화되나 BCG를 투여하면 으뜸세포의 분비활성이 다소 억제되었기 때문이라고 생각된다.

Methotrexate, cyclophosphamide, 5-FU와 같은 항암제를 구강으로 투여하였을 때 빈창자의 상피세포는 사립체가 현저히 커지고 공포와 수초구조가 자주 관찰되었으며, 항암물질 투여 후 볼 수 있는 작은창자의

액체정체현상은 상피세포의 사립체팽대 때문인 것 같다는 보고(Bessler et al., 1996)가 있다. 그러나 이 실험에서는 정상대조군에 비해 종양대조군과 BCG 투여군의 경우 사립체의 크기가 다소 감소하였으나 유의한 정도는 아니었다. 그러나 종양대조군의 경우 사립체의 크기가 정상대조군의 것에 비해 다소 증가(4%)한 반면 BCG 투여군은 10% 정도 감소하였기 때문에, 종양대조군과 비교하면 BCG 투여군의 분비과립의 크기가 13% 정도 작아 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$). 이와 같이 항암제를 투여하였을 때 빈창자상피세포와 위점막 으뜸세포의 반응이 다른 원인이 구강투여의 경우 투여된 항암제가 창자관 상피와 직접 접촉할 수 있는 데 비하여 이 실험에서 이용한 피부밑조직 투여는 항암제가 혈류를 통해서만 세포에 영향을 줄 수 있기 때문에 생긴 차이라고도 생각할 수 있다. 그러나 구강을 통한 항암제 투여에서 빈창자와는 달리 위점막과 간조직에서는 미세구조적 변화를 관찰할 수 없었다는 보고(Bessler et al., 1996)는 투여방법에 따른 차이보다는 장기의 세포조직학적 특성에 따른 차이이거나 또는 세포의 세대교체시간이 작은창자의 상피세포는 3일 정도로 빠르며 비해 위점막 으뜸세포는 2~20개월로 매우 느리므로 항암제에 대한 반응도 느리기 때문이라고 생각된다.

세포의 미세구조 가운데 수초구조(myelin figures)는 glutaraldehyde 고정을 오래한 표본이나 또는 지방성분이 용해소체와 결합할 때 형성되는데 노화세포와 질병상태의 세포에서 자주 관찰된다(Ghadially, 1988). 이 실험에서 정상대조군과 종양대조군에 비하여 BCG 투여군에서 수초구조가 더 자주 많이 관찰된 것으로 보아 고정에 의한 영향보다는 세포 자체의 활성화도와 관계가 있다고 생각된다. 즉 이물질(BCG)의 반복투여로 형성된 과민반응이 위점막 으뜸세포의 활성화에 영향을 준 형태적 표현이라고 생각된다. 한편 BCG 투여군의 으뜸세포의 핵 속에서 염색질주위과립(perichromatin granules)이 관찰되었는데, 염색질주위과립은 지름이 30~35 nm이며 과립주위에 밝은 테두리를 갖고 있는 구조로서 단백질합성이 억제된 세포나 각종 암세포에서 자주 관찰된다(Ghadially, 1988)는 보고에 비추어 볼 때, BCG 반복투여로 인한 과민반응으로 으뜸세포의 분화과정이 다소 억제된 상태에 있거나 또

는 면역계통에 자극을 주었기 때문에 염색질주위과립이 증가된 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해보면 BCG를 반복 투여하면 위점막 벽세포의 미세구조에 손상을 주어 분비기능이 다소 억제되나, 그 정도가 매우 경미하였으므로 BCG는 스폴세포의 분비기능에 큰 손상을 주지 않는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Chung JW: Human Tissue Biology. 2nd, SooMoonSa, pp. 515-525, 2001.
- Bartlett GL, Zbar B, Rapp HJ: Suppression of murine tumor growth by immune reaction to the Bacillus Calmette Guern strain of Mycobacterium bovis. J Natl Cancer Inst 48 : 245-257, 1972.
- Bessler H, Straussberg R, Alexandrova S, Beilin B, Djaldetti M, Hart J: Effect of oral chemotherapy on the mitochondrial size of mouse intestinal cells. Cancer Chemother Pharmacol 38 : 35-38, 1996.
- Cameron IL: Cell proliferation and renewal in the mammalian body. In Cellular and molecular renewal in the mammalian body. eds Cameron IL, Thrasher JD, Academic Press, New York, pp. 45-85, 1971.
- Chirigos MA: Immunomodulators: Current and future development and application. Thymus 19 (suppl 1) : S7-S20, 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.
- Fawcett DW: A textbook of histology, 12th Ed, New York, Chapman and Hall, pp. 460-472, 1994.
- Ghadially FN: Ultrastructural pathology of the cell and matrix. 3rd ed, London, Butterworths, pp. 80-85, 1160-1164, 1988.
- Hagen SJ, Takahashi S, Jansons R: Role of vacuolation in the death of gastric epithelial cells. Am J Physiol 272(1 pt 1) : C48-58, 1997.
- Helander HF: The cells of the gastric mucosa. Int Rev Cytol 70 : 217-289, 1981.
- Karam SM, Leblond CP: Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. III. Inward migration of neck cells followed by progressive transformation into zymogenic cells. Anat Rec 236 : 297-313, 1993.
- Karam SM, Stratton T, Hassan WM, Leblond CP: Defining epithelial cell progenitors in the human oxyntic mucosa. Stem Cells 21 : 322-336, 2003.
- 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, Jeong IG, Park KH, Ahn ET: Effects of BCG or AG60 on gastric parietal cells of the mouse implanted with Ehrlich carcinoma cells. Kor J Anatomy 35(6) : 529-542, 2002a. (in Korean)
- Ko JS, Shin BS, Ahn ET, Park KH, Kim JG: Ultrastructural alterations induced by 5 fluorouracil or mitomycin C on gastric parietal cells. Kor J Anatomy 3. 35(5) : 363-375, 2002b. (in Korean)
- Kressin M: Ultrastructure of the zymogenic cell lineage in abomasal mucosa of adult cattle. Anat Histol Embryol 26 : 217-22, 1997.
- 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.
- Kudo S, Suzuki T, Inazumi H: The role of lymphocytes and histiocytes as mechanism of action of BCG of bladder cancer. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi 84 : 303-312, 1993.
- Lamm DL, Riggs DR, DeHaven JI: Enhanced natural killer (NK) cell activity with BCG and vitamin treatment (abstract 991). J Urol 151 : 475A, 1994.
- Lamm DL: BCG in perspective: Advances in the treatment of superficial bladder cancer. Eur Urol 27 (suppl 2) : 2-8, 1995.
- Mathe G, Halle Pannenko O, Bourut C: Immune manipulation by BCG administered before or after cyclophosphamide for chemoimmunotherapy of L1210 leukemia. Eur J Cancer 10 : 661-670, 1974.
- 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 7 : 262-269,

2002.

- McKhann CF, Hendrickson CG, Spittler LE, Gunnarsson A, Banerjee D, Nelson WR: Immunotherapy of melanoma with BCG: Two fatalities following intralesional injection. *Cancer* 35 : 514-520, 1975.
- 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.
- Popiela T, Zembala M, Kulig J, Czupryna A, Uraz 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, London, Mosby Year Book. pp. 33-44, 1993.
- Tseng CC, Schmidt KL, Johnson LR: Hormonal effects on development of the secretory apparatus of chief cells. *Am J Physiol* 253 (3 pt 1) : G 274-283, 1987.
- Zembala M, Czupryna A, Wieckiewicz J, Jasinski M, Fryjma 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.

<국문초록>

이 연구는 생쥐의 살부위에 Ehrlich 암세포를 이식한 후 BCG(Bacillus Calmette Guerin)를 투여하였을 때, 위 점막 으뜸세포의 미세구조에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시행하였다. 실험동물로는 체중 25g 내외의 ICR생쥐를 사용하였으며 정상대조군과 실험군으로 구분하였다. 정상대조군 이외의 실험군 동물들은 살부위 피부밑조직에 각각 1×10^7 개의 Ehrlich암세포를 이식한 후, 다음날부터 BCG 투여군은 BCG를 피부밑조직에 격일 간격으로 7회 투여했으며, 중앙대조군은 암세포이식 후에 약제 대신 0.2mL의 생리식염수를 피부밑조직에 격일간격으로 7회 주사하였고, 정상대조군은 암세포를 이식하지 않은 동물을 사용하였다. 모든 실험군은 마지막 주사한 다음날 오전 10시에서 11시 사이에 ether마취하에 알배벽을 열어 위조직을 절취하였다. 절취한 조직은 통상적인 방법으로 전자현미경관찰을 위한 표본을 작성한 후, JEM 100 CX II 전자현미경으로 비교 관찰하였다. 각 세포는 5,300배율로 촬영한 후 3배로 확대 인화한 사진을 비교 관찰하였으며, 각 실험군마다 200개 이상의 과립의 지름과 사립체의 크기(장경)를 측정하였으며 student t test를 이용하여 통계처리 하였다.

BCG 투여군의 으뜸세포는 과립세포질세망과 골지복합체의 수조가 다소 팽대되고 수초구조가 다소 많이 관찰되는 이외는 정상대조군에 비해 큰 차이가 없었다. 으뜸세포의 분비과립의 크기는 정상대조군, 중앙대조군 및 BCG 투여군의 경우 각각 $0.98 (\pm 0.108) \mu\text{m}$, $1.05 (\pm 0.092) \mu\text{m}$ 및 $0.93 (\pm 0.053) \mu\text{m}$ 였다. 으뜸세포의 사립체의 크기는 정상대조군, 중앙대조군 및 BCG 투여군이 각각 $0.80 (\pm 0.130) \mu\text{m}$, $0.83 (\pm 0.143) \mu\text{m}$ 및 $0.72 (\pm 0.078) \mu\text{m}$ 였다.

이상의 결과를 종합해보면 BCG를 반복 투여하면 위 점막으뜸세포의 분비과립이 약간 작아지는 등 분비기능이 다소 억제되나 그 정도가 경미하여 으뜸세포의 분비기능에 큰 손상을 주지 않는 것으로 생각된다.

FIGURE LEGENDS

Each scale bar indicates 1 μ m

- Fig. 1.** The chief cell of a normal mouse stomach. The cytoplasm contains abundant granular endoplasmic reticulum (rER), Golgi complex (G), numerous zymogen granules of various electron densities, and a few mitochondria (m). An ovoid heterochromatic nucleus (N) is seen.
- Fig. 2.** The chief cell of a tumor control mouse stomach. A chief cell contains numerous zymogen granules of various electron densities and a few mitochondria (m). Slightly dilated cisternae of the Golgi complexes (G), the zymogen granules containing slightly electron dense core (vacant asterisk), and the myelin figures in zymogen granule (vacant arrow) are seen.
- Fig. 3.** The gastric chief cell of a mouse, treated with BCG. Note large myelin figures (arrows) near the Golgi complexes (G) and perichromatin granule (vacant arrow) in the nucleus (N). Numerous zymogen granules of various electron densities, well developed Golgi complexes, and a few mitochondria (m) are seen in the cytoplasm.
- Fig. 4.** The gastric chief cell of a mouse, treated with BCG. Note numerous lysosomes (ly) and a myelin figures (arrow). Slightly dilated cisternae of Golgi complexes (G) and granular endoplasmic reticulum (rER), some zymogen granules of various electron densities, and a few mitochondria (m) are seen in the cytoplasm. An intercellular junction (vacant arrow) between two chief cell is seen.



