

간흡충 (*Clonorchis sinensis*) 감염에 의한 흰쥐 담관 섬유모세포 미토콘드리아 전자전달효소의 감소

민병훈, 홍순학, 이행숙, 김수진^{1,*}, 주경환*

고려대학교 의과대학 기생충학교실, ¹한림대학교 자연과학대학 생명과학과

Reduction of Mitochondrial Electron Transferase in Rat Bile duct Fibroblast by *Clonorchis sinensis* Infection

Byoung-Hoon Min, Soon-Hak Hong, Haeng-Sook Lee,
Soo-Jin Kim^{1,*} and Kyoung-Hwan Joo*

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

¹Department of Life Science, College of Natural Science, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

(Received May 31, 2010; Revised June 13, 2010; Accepted June 15, 2010)

ABSTRACT

Fibroblasts 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 contribute to cholangiocarcinoma pathogenesis, particularly through an increase in extracellular matrix components, which participate in the regulation of bile duct differentiation during development.

Mitochondria produce ATP through oxidative metabolism to provide energy to the cell under physiological conditions. Also, mitochondrial dysfunction and oxidative stress have been implicated in cellular senescence and aging. Alternations in mitochondrial structure and function are early events of programmed cell death or apoptosis and mitochondria appear to be a central regulator of apoptosis in most somatic cell.

Clonorchis sinensis, one of the most important parasite of the human bile duct in East Asia, arouses epithelial hyperplasia and ductal fibrosis. Isolated fibroblast from the bile ducts of rats infected by *C. sinensis* showed increase of cytoplasmic process. In addition, decrease of cellular proliferation was observed in fibroblasts which was isolated from normal rat bile duct and then cultured in media containing *C. sinensis* excretory-secretory product. However, the effects of *C. sinensis* infection on the mitochondrial enzyme distribution is not clearly reported yet. Therefore, we investigated the structural change of *C. sinensis* infected bile duct and mitochondrial enzyme distribution of the cultured fibroblast isolated from the *C. sinensis* infected rat bile duct.

As a result, *C. sinensis* infected SD rat bile ducts showed the features of chronic clonorchiasis, such as ductal connective and epithelial tissue dilatation, or ductal fibrosis. In addition, fibroblast in ductal connective tissue was damaged by physical effect of fibrotic tissue and chemical stimulation. Immunohistochemically detected mitochondrial electron transferase (ATPase, COXII, Porin) was decreased in *C. sinensis* infected rat bile duct and cultured fibroblast from infected rat bile duct. It can be hypothesized that the reason why number of electron transferase decrease in fibroblast isolated from the rat bile duct infected with *C. sinensis* is because dysfunction of electron transport system is occurred

* 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

mitochondrial dysfunction, increase of ROS (reactive oxygen species) and apoptosis after chemical damage on the cell caused by *C. sinensis* infection.

Overall, *C. sinensis* infection induces fibrotic change of ductal connective tissue, mutation of cellular metabolism in fibroblast and mitochondrial dysfunction. Consequently, ductal fibrosis inhibits fibroblast proliferation and decreases mitochondrial electron transferase on fibroblast cytoplasm. It was assumed that the structure of bile duct could not normalized and ductal fibrosis was maintained for a long period of time according to fibroblast metamorphosis and death induced by mitochondrial dysfunction.

Keywords : *Clonorchis sinensis*, Fibroblast, Mitochondria, ATPase, Cytochrome-c-oxidase

서 론

담관 상피조직에 분포하는 섬유모세포(fibroblast)는 결합 조직의 주된 세포이다. 섬유모세포는 주위환경에 따라 형태가 쉽게 변하며(Kang & Ko, 1994), 대부분 결합조직 내에 고정되어 분포하고 있지만 염증이 일어났을 때나 조직배양 중에는 세포들이 이동하기도 한다(Bloom & Fawcett, 1972). 또한 조직이 손상되었을 때 상처부위로 이동하여 대량의 콜라겐 층을 형성함으로써 손상된 조직을 복구시키기도 한다(Albert & Bray, 1994). 섬유모세포는 세포질돌기(cytoplasmic process)가 형성되는 것이 특징이다. 세포질돌기는 섬유모세포의 종류, 배양시간, 환경 등에 따라 다양한 형태로 나타나고 높은 밀도의 actin을 포함하는 미세섬유로 구성되어 세포표면형성, 세포운동과 이동, 세포인식 등에 중요한 역할을 한다(Fem, 1985; Damjanov, 1987).

섬유모세포는 손상된 조직을 복구하기 위해서 이동하고 증식하기 때문에 섬유모세포 유도 인자(Akimoto et al., 1998)나 손상된 조직의 빠른 회복을 위한 섬유모세포의 단백질 합성(McLeod et al., 1987) 등에 대한 다양한 연구가 이루어졌다.

미토콘드리아(mitochondria)는 전자전달계(electron transport system)를 통해 세포대사에 필요한 ATP를 생산한다. 세포 내 미토콘드리아의 기능 이상으로 인해 전자전달계 효율이 감소된다는(Navarro & Boveris, 2004; Navarro et al., 2005) 보고가 있으며, 미토콘드리아에 의존적으로 일어나는 apoptosis의 생화학 및 세포내 대사과정이 Bustamante et al. (2004)에 의해 밝혀졌다. 미토콘드리아에서 방출되는 cytochrome-c-oxidase에 의해 caspase의 활성화와 세포사로 진행되는 과정이 조절되기도 한다(Duke et al., 1996; Green & Kroemer, 1998).

간흡충(*Clonorchis sinensis*)의 국내 감염률은 약 2.9%이며(KAHP, 2004), 담관암은 간흡충의 발생지역인 동북아 및 동남아시아 지역에서 자주 발생된다(Lee et al., 1968; Belamaric, 1973; Purtillo, 1976; Flavell, 1981; Schwartz, 1986; Choi et al., 1988; Kim et al., 1989; Sher et al., 1989).

간흡충에 감염되면 흡반(sucker)에 의한 물리적 자극과 대사산물 및 분비물질 등의 화학적 자극에 의해 담관염이 일어나고, 충체 주위 담관 상피세포의 증식, 탈락, 담관 주위의 염증 및 섬유화가 일어나며(Hou, 1955; Bhamarapavati et al., 1978; Lee et al., 1978; Min & Soh, 1986; Cha et al., 1991), 담관암 및 담석증 등의 임상 소견을 보인다(Sullivan & Koep, 1980).

지금까지 간흡충 감염에 의한 물리, 화학적 자극이 섬유모세포의 세포질 돌기와 세포표면의 형태에 미치는 영향(Kim & Min, 2004), 배양 중의 섬유모세포에 간흡충 분비배설물질(*C. sinensis* excretory-secretory product)이 미치는 영향에 대한 연구(Kwon et al., 2009) 등이 이루어졌다. 하지만 기생충에 감염된 후 비정상적으로 확장되는 담관 결합조직에 존재하는 섬유모세포의 변화가 세포의 에너지 대사를 위한 미토콘드리아 전자전달효소(electron transferase) 변화와 어떤 관련이 있는지에 대한 연구는 미흡하다.

따라서 이 연구에서는 간흡충에 감염된 담관과, 담관으로부터 분리하여 배양한 섬유모세포에 미토콘드리아 전자전달효소 항체를 이용한 면역조직화학법을 적용하여 미토콘드리아 전자전달효소의 분포가 어떻게 변화하는지 관찰하였다. 또한 전자현미경을 이용하여 담관 조직 내의 섬유모세포의 형태적 변화와 담관에 분포하는 섬유모세포 미토콘드리아의 형태 및 분포 양상을 확인하였다. 이러한 실험을 통하여 간흡충 감염이 담관에 존재하는 섬유모세포의 미토콘드리아의 형태 및 전자전달효소의 분포에 미치는 영향을 알아보고, 섬유모세포의 미토콘드리아의 형태와 기능 이상이 간흡충 감염으로 인한 담관의 섬유화와 어떠한 연관이 있는지 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 피낭유충 수집 및 실험동물

참붕어(*Pseudorasbora parva*)를 인공 위액으로 37°C에서 6시간 소화시키고, 소화된 참붕어를 여과하여 수회 세척 후 피낭유충을 분리하였다. 분리된 피낭유충을 실험쥐(SD rat,

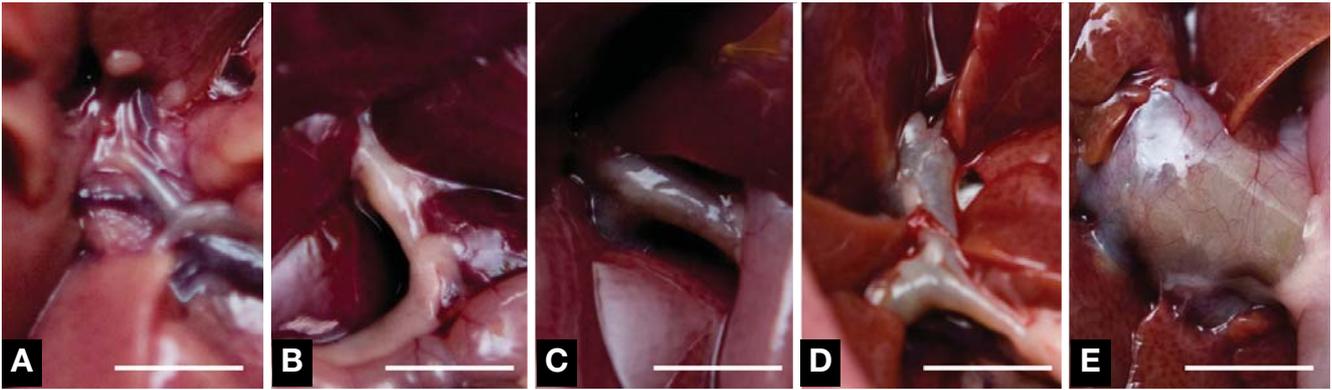


Fig. 1. Extracted abdominal organs of a SD rat in the normal control group (A) and the infection group at 2 weeks (B), 4 weeks (C), 8 weeks (D) and 12 weeks (E) after *Clonorchis sinensis* infection, showing marked dilatation of the common and extrahepatic bile duct (E). Scale bar=1 cm.

female, 8W)에 각각 50개씩 경구투여한 다음 12주 동안 사육하였다. 간흡충 감염 후 2, 4, 8, 12주 경과한 실험쥐로부터 담관을 적출하여 간흡충 감염 여부를 확인한 다음 실험 재료로 사용하였다(동물실험계획, KUIACUC-20090609-1).

2. 세포배양배지

섬유모세포를 배양하기 위해 10% FBS (Gibco, 16000), 1% Penicillin-Streptomycin-Neomycin Antibiotic Mixture (Gibco, 15640-055)가 포함된 DMEM (Gibco 11995-065)을 사용하였다.

3. 항 체

섬유모세포와 담관 조직에 존재하는 미토콘드리아의 전자전달효소를 확인하기 위하여 COXII (cytochrome-c-oxidase subunit II, Mitoscience, MS405), ATPase (Mitoscience, MS505), porin (Mitoscience, MSA05)을 일차항체로 사용하였다.

4. 실험군

간흡충 피낭유충 감염 2~12주 후 감염이 확인된 실험쥐의 담관을 적출하였으며, 담관으로부터 분리한 조직과 이를 배양하여 얻은 섬유모세포를 실험에 사용하였다.

실험군은 정상대조군(G0), 간흡충 감염 후 2주(G1), 4주(G2), 8주(G3), 12주(G4)로 구분하였으며, 실험군 마다 5마리의 실험쥐를 이용하였다.

5. 실험방법

1) 세포배양

실험쥐의 담관은 인산완충액(PBS, pH 7.4)에서 세척 후,

배지에서 세절하여 T25 배양용기(NUNC 136196)에서 배양하였다. 섬유모세포가 배양용기 바닥에 부착되면 상등액을 제거하여 부착되지 않은 조직을 제거하고 배지를 첨가하여 36.5°C, 4.5% CO₂ 환경의 배양기에서 7일간 배양하였다.

2) 광학현미경 관찰을 위한 항체반응

실험쥐로부터 적출된 담관과 배양된 섬유모세포는 10% BNF (Buffered Neutral Formalin, pH 7.4)에 고정하고, 에탄올 탈수 후 파라핀으로 포매하였다. 절편제작기를 이용하여 포매된 조직의 절편을 제작하고, xylene으로 탈 파라핀 처리 후 함수, 항원상기, blocking 과정을 수행하였다. 준비된 슬라이드에 미토콘드리아 전자전달효소에 대한 일차항체를 반응시키고, 이차항체와 DAB 발색을 위하여 EnVision™+ Kits를 사용하였다. 염색된 슬라이드는 광학현미경 (Zeiss Axioscope)으로 관찰하고, 디지털 카메라(Zeiss Axiocam)로 촬영하였다.

3) 전자현미경 관찰

실험쥐로부터 적출된 담관은 1% paraformaldehyde 1% glutaraldehyde에 전고정하고 2% osmium tetroxide로 후고정 하였다. 고정된 조직은 에탄올 탈수 후 lowicryl HM20으로 포매하였다. 포매된 조직은 초박절편기를 이용하여 60 nm 두께의 초박절편을 제작하였다. 제작된 절편은 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경 (Zeiss EM 109, Germany)으로 관찰하였다.

4) 형광현미경 관찰을 위한 항체반응

실험쥐로부터 분리되어 배양된 섬유모세포는 4% paraformaldehyde 고정액에 고정하고, 에탄올 탈수 후 파라핀으로 포매하였다. 절편제작기를 이용하여 포매된 조직의 절편을 제작하였다. 제작된 절편은 xylene으로 탈 파라핀 처리 후 함수, 항원상기, 비특이적 반응을 줄이기 위한 형광약화 (fluorescence quenching) 과정을 수행하였다. 준비된 슬라이

Table 1. Dilatation of SD rat bile duct during *Clonorchis sinensis* infection.

	G0	G1	G2	G3	G4
Width of bile duct (mm)	+(1.6)	+(2.2)	+(2.1)	++(4.3)	++++(10.2)
Thickness of connective tissue (μm)	+(101)	++++(317)	++++(291)	++++(323)	++++(348)
Thickness of epithelial tissue (μm)	+(10)	++(92)	++++(234)	+++ (152)	+++ (178)
Size of inner cavity (cm^2)	+(0.2)	++(0.5)	+++ (5.7)	++++(8.1)	++++(9.6)

*G0: Normal control group of SD rat bile duct. SD rat bile duct at 2 weeks (G1), 4 weeks (G2), 8 weeks (G3) and 12 weeks (G4) after *C. sinensis* infection.

드는 COXII, ATPase, porin을 일차항체로 반응시키고, Fluorescence dye (FITC, TexasRed)를 이용하여 이차항체를 반응시켰다. DAPI를 이용하여 핵 대비염색 후 형광현미경 (Leica DM 2000)으로 관찰하고, 디지털 카메라 (Leica DFC 360FX)로 촬영하였다.

결 과

1. 간흡충 감염 후 담관 조직의 변화

간흡충에 감염된 실험쥐 담관 폭의 변화를 직접 측정하였다. 감염된 담관은 시간이 지날수록 정상대조군에 비해 확장되었다. 정상 담관의 폭은 1.6 mm였으며 (Fig. 1A), 감염 후 시간이 지날수록 담관의 폭이 증가되었다. 감염 후 3개월이 지난 담관은 10.2 mm로 정상대조군에 비해 약 6.4배 확장되었다 (Fig. 1E).

분리된 담관을 광학현미경으로 관찰한 결과 간흡충에 감염된 실험쥐의 담관은 정상대조군 (Fig. 2. G0)에 비해 확장되었으며, 담관의 내강에는 간흡충 충체가 존재하였다 (Fig. 2. G1~G4). 간흡충에 감염된 담관은 2주 지난 후 이미 결합조직의 확장이 관찰되었다. 담관 상피조직의 경우 결합조직이 확장된 이후 증가하는 것으로 관찰되었으며, 감염 4주 이후 부터는 결합조직과 상피조직의 두께가 유지되었다. 담관의 내강 (inner cavity)은 시간이 지날수록 점차 확장되었으며 감염 8주 후부터 확장된 내강의 크기가 유지되었다 (Table 1). 담관벽의 두께는 감염 시간이 지날수록 두꺼워졌다. 정상 담관의 두께는 111 μm 였으며, 감염이 이루어지고 12주 지난 담관의 경우 정상 담관보다 약 4.7배 확장된 약 526 μm 로 관찰되었다. 담관의 상피조직은 감염이 이루어진 후 시간이 경과함에 따라 확장되었다. 약 10 μm 의 단층으로 구성되었던 정상 담관의 상피조직은 감염되고 4주 지났을 때 평균 234 μm 두께까지 증가하였다. 감염이 이루어지고 8주, 12주 지난 담관조직은 약 152~178 μm 높이의 상피조직층을 형성하였다 (Fig. 2. G1~G4). 담관 내강의 크기는 감염 후 2주가 경과한 담관의 경우 정상 대조군에 비해 약 2.5배 이상 증가하였고 (Fig. 2. G1), 감염 8주후부터 12주까지는 약 40배 이상 증가한 두께로 관찰되었다 (Fig. 2. G2~G4).

2. 미토콘드리아 전자전달효소 (COXII, ATPase)의 분포

담관 결합조직 내 미토콘드리아 전자전달효소의 활성을 확인하기 위해 COXII (cytochrome-c-oxidase subunit II), ATPase 항체를 이용한 면역조직화학법을 시행한 실험 결과는 다음과 같다.

정상 담관조직 (G0)의 경우 담관 결합조직에 COXII (Fig. 2A), ATPase (Fig. 2C)의 분포가 관찰되었으나, 선세포 (glandular cell)가 포함된 담관 상피세포에는 발색이 이루어지지 않았다. 간흡충에 감염된 담관의 경우 정상 조직보다 담관 상피조직과 결합조직이 확장되어 있었다. 확장된 결합조직에서 COXII, ATPase의 발현양상은 감소되었다. 간흡충 감염 후 2주 경과한 담관 (G1) 결합조직에서 COXII (Fig. 2E)는 감소되었으며, ATPase의 경우 확장된 담관 결합조직에 포함된 일부 세포들에 발색이 이루어졌다 (Fig. 2K). 감염 후 4주 경과한 담관조직 (G2)의 경우 G1에 비해 담관 상피조직은 더욱 확장되었고, 결합조직은 감소하는 경향이 관찰되었다. COXII는 담관 가장자리에 존재하는 결합조직의 일부 세포에서 확인되었고 (Fig. 2I), ATPase의 경우 결합조직 일부와 확장된 상피조직 주변에서 부분적으로 발색되었다 (Fig. 2K). 8주 경과한 담관 (G3)의 경우 G2보다 확장된 결합조직이 관찰되며, COXII, ATPase는 결합조직의 가장 바깥쪽에 일부 분포하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 2M, O). 12주 경과한 담관조직 (G4)은 G3과 유사한 형태를 가지고 있으며, 담관 결합조직 가장 바깥쪽에서 COXII, ATPase의 발색이 관찰되었다 (Fig. 2Q, S).

광학현미경을 이용하여 400배 배율로 관찰한 결과 G0의 경우 담관 결합조직을 구성하는 대부분의 세포에 COXII, ATPase에 대한 발색이 이루어졌으며, 담관 상피조직에는 발색이 이루어지지 않았다 (Fig. 2B, D). G1의 경우 COXII (Fig. 2F)는 G0보다 현저히 감소되었으며, 섬유조직이 증가한 것으로 관찰되었다. ATPase의 경우 결합조직을 구성하는 세포에서 발색이 이루어졌으나, 결합조직을 구성하는 세포 사이에 형성된 섬유조직에는 발색이 이루어지지 않았다 (Fig. 2H). G2와 G3의 경우 COXII, ATPase는 간조직과 인접한 결합조직에서 발색이 이루어졌다 (Fig. 2J, L, M, P). G4의 경우 담관 결합조직 가장 바깥쪽에 국한되어 발색이 이루어졌으며, 결합조직 중간부분은 G3에 비해 섬유화가 많

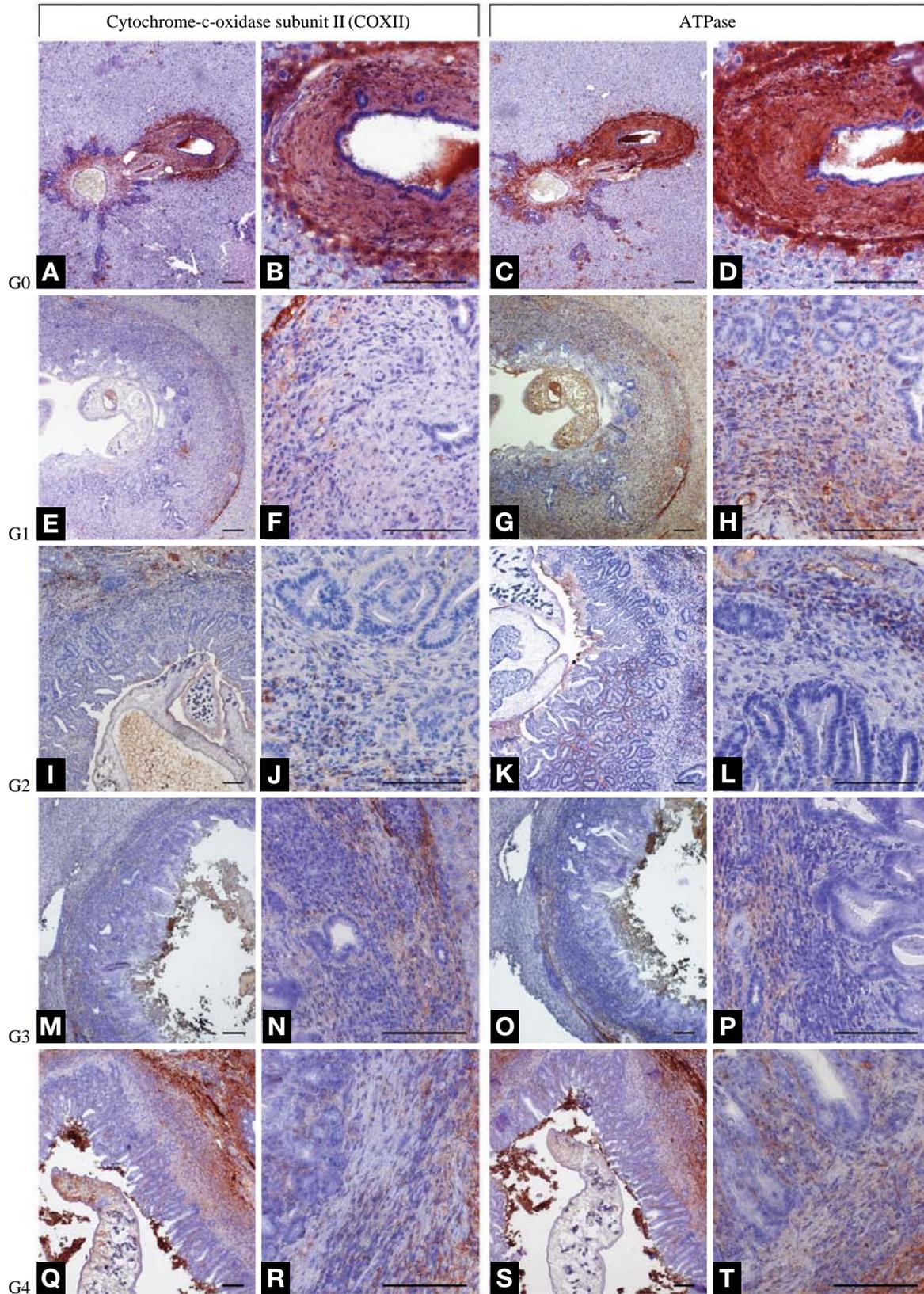


Fig. 2. Light micrograph of the SD rat bile duct at normal (G0), 2 weeks (G1), 4 weeks (G2), 8 weeks (G3) and 12 weeks (G4) after *C. sinensis* infection which was reacted with cytochrome-c-oxidase subunit II (COXII) and ATPase (stained as brown color). Mitochondrial electron transferase (ATPase, COXII) was decreased in *C. sinensis* infected rat bile duct according to infection period. Scale bar=100µm.

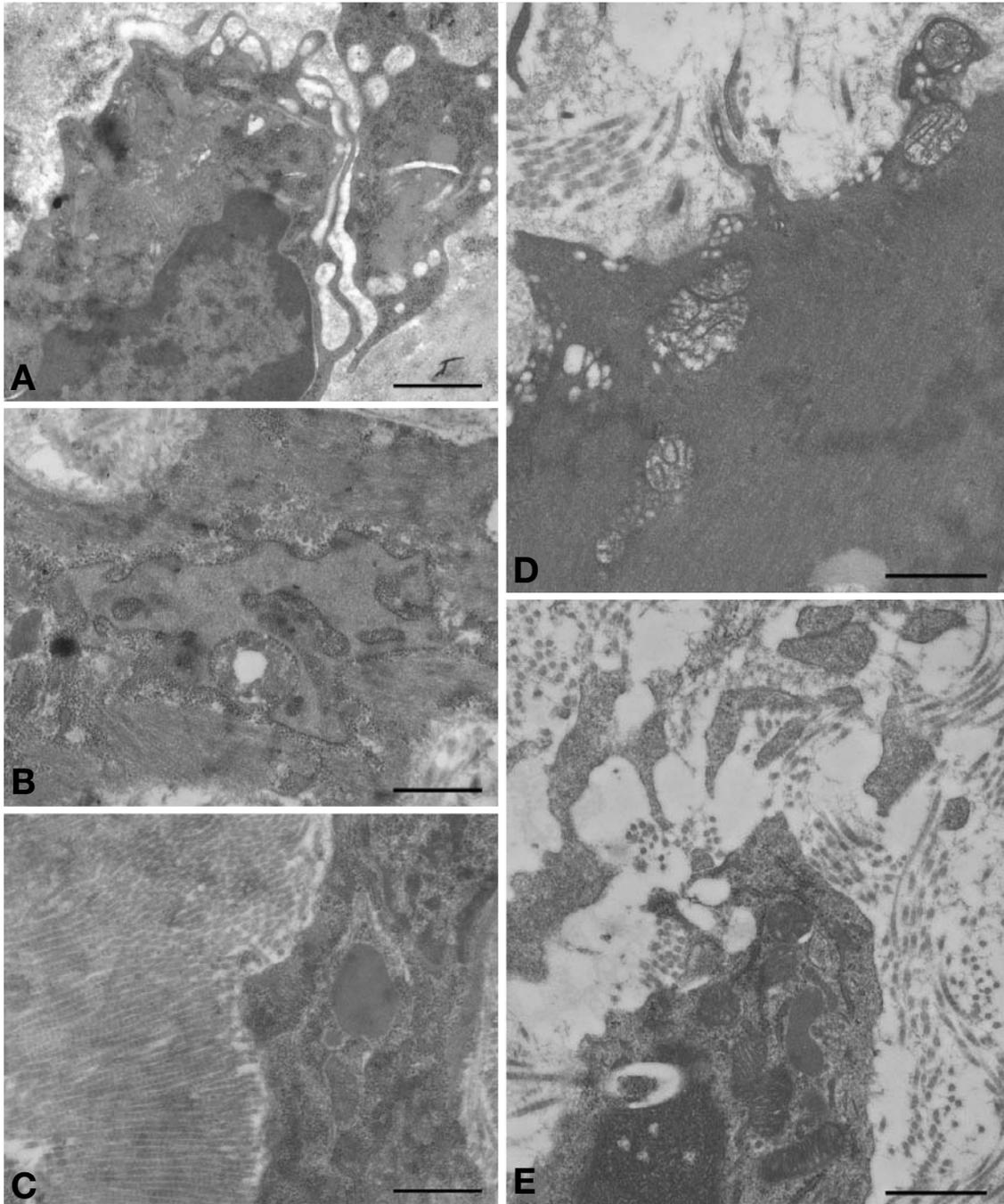


Fig. 3. Transmission electron micrograph of the SD rat bile duct at normal (A), 2 weeks (B), 4 weeks (C), 8 weeks (D) and 12 weeks (E) after *C. sinensis* infection. Endoplasmic reticulum was developed in the fibroblast of SD rat bile duct infected with *C. sinensis* (B), and irregular structure of mitochondrial cristae were observed (D). Scale bar=1 μ m.

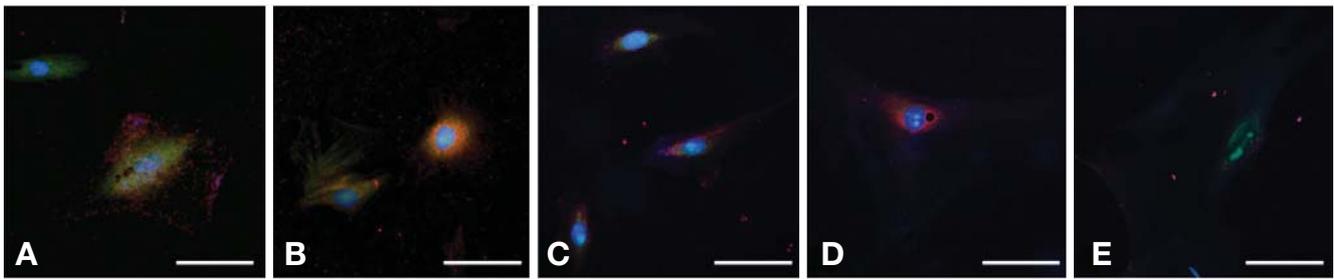
이 이루어졌다(Fig. 2R, T).

3. 간흡충에 감염된 담관 조직의 미세구조 관찰

실험쥐로부터 적출한 담관 조직의 미세구조를 투과전자현미경을 이용하여 관찰하였다. G0의 섬유모세포는 세포질 돌기가 형성되어있는 정상적인 형태가 관찰되었다(Fig.

3A). G1의 담관에 분포하는 섬유모세포의 경우 세포질에 소포체의 증가가 관찰되고 미토콘드리아의 내막이 손상된 형태가 관찰되었다. 또한, 생성된 섬유조직의 섬유다발로 인해 세포막과 세포질이 파괴되었다(Fig. 3B). G2의 경우 담관 결합조직에 존재하는 섬유모세포 주변에 밀도가 높아진 섬유조직이 존재하였으며 섬유모세포의 세포질에는 리소좀

Cytochrome-c-oxidase subunit II+Porin



ATPase+Porin

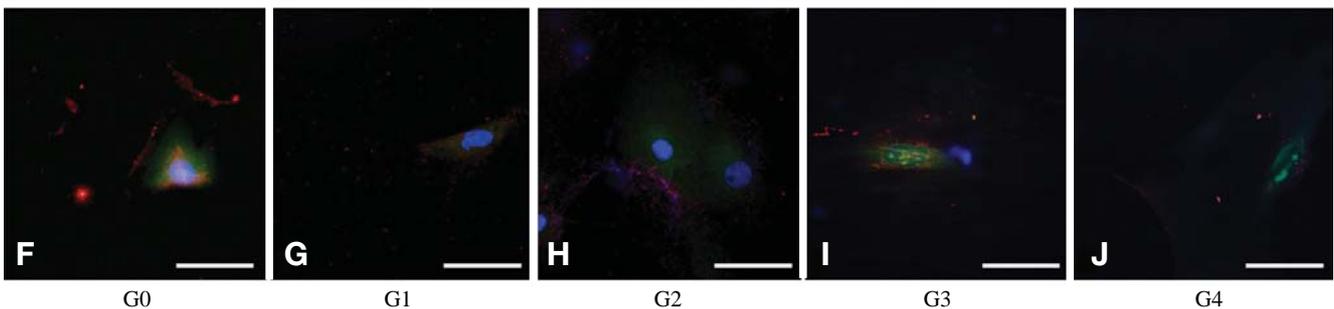


Fig. 4. Fluorescence micrograph of the 7-day cultured fibroblast obtained from SD rat bile duct at normal (G0), 2 weeks (G1), 4 weeks (G2), 8 weeks (G3) and 12 weeks (G4) after *C. sinensis* infection. Fibroblast was labeled with cytochrome-c-oxidase subunit II (FITC, green color) and porin (TexasRed, red color) monoclonal antibody (A~E), and ATPase (FITC, green color) and porin (TexasRed, red color) monoclonal antibody (F~J). Mitochondrial electron transferase(ATPase, COXII) was decreased in cultured fibroblast of rat bile duct infected with *C. sinensis*. Scale bar=100 μ m.

이 관찰되기도 하였다(Fig. 3C). G3의 경우 섬유조직에 의해 손상된 섬유모세포가 존재하며, 세포내 미토콘드리아의 내막이 손상된 형태가 관찰되었다(Fig. 3D). G4의 경우 담관 결합조직에 존재하는 섬유모세포들은 섬유조직에 의해 세포막, 세포질, 핵의 손상이 이루어졌다. 섬유조직이 발달한 결합조직에는 파괴된 세포질의 일부가 관찰되기도 하였다(Fig. 3E).

4. 배양된 섬유모세포에서 COXII, ATPase, porin의 분포

담관으로부터 분리하여 7일간 배양된 섬유모세포에 존재하는 미토콘드리아 전자전달효소의 분포를 알아보기 위하여 COXII, ATPase, porin 항체에 대한 면역 형광 염색법 (immunofluorescence staining method)을 수행하였다.

COXII와 porin을 일차항체로 형광염색을 한 결과, 감염 시간이 경과할수록 COXII와 porin의 분포가 감소하였다. G0 (Fig. 4A)은 섬유모세포의 핵 주변에 COXII와 porin의 분포가 확인되었으나, G1, G2, G3의 경우 핵 주변에 COXII와 porin의 발현 양상이 점차 감소하였다(Fig. 4B, C, D). G4의 경우 G3에 비해 COXII와 porin의 분포가 감소되었다(Fig. 4E).

ATPase와 porin를 일차항체로 형광염색을 한 결과, 감염 시간이 경과할수록 ATPase와 porin의 감소가 나타났다. G0

의 경우 섬유모세포의 핵 주변에 ATPase와 porin이 분포하며(Fig. 4F), G1의 경우 G0 보다 감소된 분포양상이 관찰되었다(Fig. 4G). G2의 경우 섬유모세포의 확장된 세포질에 ATPase가 분포하였고, porin의 분포가 확인되는 섬유모세포와, 확인되지 않는 섬유모세포가 관찰되었다(Fig. 4H). G3의 경우 확장된 세포질에 ATPase와 porin의 분포가 감소하였고(Fig. 4I), G4는 G3 보다 ATPase와 porin의 분포가 감소하였다(Fig. 4J).

고 찰

간흡충증은 우리나라에서 높은 감염률(2.9%)을 나타내는 기생충 감염질환으로 급성 혹은 만성감염을 일으킨다(KAHP, 2004). 간흡충 감염에 따른 병변의 진행 및 증상의 발현 정도는 충체의 직접적인 물리적 자극과 대사산물의 독성작용에 의해 결정되며, 충체의 감염으로 인한 기계적 자극에 의해 담관 점막 및 점막하층에 염증성 세포침윤이 일어나고, 점막상피의 증식과 탈락이 이루어지는 것으로 알려져 있다(Rim, 1990).

이 연구에서 간흡충에 감염된 실험쥐의 담관은 감염 시간이 경과할수록 확장된 형태로 관찰되었다. 간흡충에 감염된 담관은 정상 조직에 비해 결합조직과 상피조직이 확장

되었으며, 담관의 내강에는 간흡충의 충체가 확인되었다. 확장된 담관 결합조직에는 섬유모세포, 림프구 그리고 섬유조직이 존재하였으며, 감염 후 결합조직의 확장이 먼저 이루어지고, 이후 내강이 확장되는 것으로 확인되었다. 감염 2개월 후 부터는 담관 결합조직의 두께와 담관 내강의 크기는 일정하게 유지되는 것으로 관찰되었다. 이러한 담관의 변화는 간흡충 감염 초기에 충체의 물리적 자극과 간흡충 분비 물질에 의한 담관 결합조직의 상해로 인한 조직의 확장으로 생각된다. 간흡충에 감염되어 일정 시간이 경과한 후에 담관 결합조직의 확장이 느리게 이루어지는 것은 이미 이루어진 담관 결합조직의 섬유화가 유지되기 때문인 것으로 추측되며, 간흡충 감염 4~12주 경과된 실험군에서 담관 내강의 크기가 유지되는 것은 감염된 피낭유충이 약 3~4주 후 성충으로 발육한 뒤 충체가 총담관에 국한되어 기생하는 실험쥐의 숙주 특성 때문인 것으로 추측된다.

결합조직에 존재하는 일반적인 섬유모세포는 골지체와 소포체의 발달이 미약하지만, 발육 또는 재생중의 결합조직에 분포하는 경우 이들 세포소기관의 발달이 이루어지는 것으로 알려져 있다(Albert & Bray, 1994).

전자현미경을 사용하여 간흡충 감염 담관 결합조직에 존재하는 섬유모세포에 어떠한 미세구조의 변화가 일어나는지 관찰하였다. 정상 담관 조직에 분포하는 섬유모세포의 경우 핵과, 미토콘드리아 등의 세포소기관이 존재하는 일반적인 형태로 관찰되었으나, 감염된 담관에 존재하는 섬유모세포의 경우 세포질 돌기의 수적인 증가와 더불어 길이 신장이 일어났으며, 확장된 섬유모세포의 세포질에 발달된 소포체와 미토콘드리아의 수적증가가 일어났다. 간흡충에 감염된 담관의 섬유모세포를 배양하면, 간흡충에 의한 물리 화학적 자극으로 인하여 세포표면의 변이와 소포체의 발달이 이루어진다는 보고가 있었다(Kim & Min, 2004). 이 결과에서 간흡충에 감염된 담관에 존재하는 섬유모세포의 형태적인 변이는 간흡충 감염에 의해 물리 화학적 자극을 받아 손상된 결합조직을 복구하기 위해 섬유모세포의 물질대사 활성이 이루어지는 것을 의미한다.

상처의 반흔(Scar) 형성과 지방축적, 염증 발생 과정에서 섬유모세포의 작용이 정상적으로 조절되지 못하면 섬유증(fibrosis)이 일어나고(Koumas et al., 2003), 간흡충에 감염된 담관에서 확장된 담관은 치료 후에도 정상으로 회복되기 어려운 것으로 보고되었다(Choi et al., 2004).

간흡충이 감염된 실험쥐에서 확장된 담관의 형태가 관찰되었으며, 확장된 담관에는 섬유모세포의 형태변이가 일어났을 뿐만 아니라, 감염시간이 경과할수록 담관 결합조직 대부분에 섬유조직이 증가하였다. 섬유조직 사이에는 섬유모세포, 림프구 등이 존재하였다. 전자현미경 관찰결과, 결합조직에 존재하는 섬유모세포에는 섬유조직에 의한 세포막 파괴와 같은 물리적 손상이 나타났다. 섬유조직에 의해 손

상된 섬유모세포는 세포질에 섬유조직이 침범하여 손상된 형태, 세포질이 모두 파괴되어 핵을 제외한 세포소기관의 분포를 확인할 수 없는 형태 그리고 미토콘드리아의 내막이 손상된 섬유모세포가 일부 존재하였다. 일부 섬유모세포에서는 섬유조직에 의해 손상되지 않은 형태가 관찰되기도 하였다. 이러한 결과는 앞서 기술한 Koumas et al. (2003)과 Choi et al. (2004)의 연구보고에 미루어 보았을 때, 간흡충에 감염되어 손상된 조직을 복구하기 위해 이루어지는 숙주반응의 결과로 결합조직에 존재하는 섬유모세포는 섬유화를 복구하기 어려울 것으로 생각된다. 감염된 조직의 섬유모세포는 손상된 조직을 복구하기 위해 소포체 발달 및 미토콘드리아의 증가와 같은 세포 활성이 나타나기도 하지만, 조직의 숙주반응 결과로 생성된 섬유조직이 섬유모세포의 물리적인 손상을 일으켜, 결과적으로 섬유모세포 본래의 기능인 손상된 조직의 복구 및 세포분열 등의 기능을 수행하지 못하고 사멸되며, 담관 결합조직에는 섬유조직이 축적되는 것으로 생각된다.

간흡충 감염 후 이루어지는 섬유모세포의 변이와 세포 내 미토콘드리아 에너지 대사의 연관성을 알아보기 위하여 담관과 담관으로부터 분리된 섬유모세포에 면역조직화학법 실험을 하였다. 미토콘드리아와 세포 사멸에 관련된 선행 연구 결과를 살펴보면, 신경조직 발생과정에서 미토콘드리아의 기능이상과 apoptosis의 연관성(Gould & McEwen, 1993)이 보고된 후, 미토콘드리아 DNA(mtDNA)의 변이가 ATP합성 저하에 의한 세포사멸(Cottrell & Turnbull, 2000; Dirks et al., 2006), 세포 내 산화질소(NO)의 증가에 의한 미토콘드리아 의존적 apoptosis(Bustamante et al., 2004), 미토콘드리아 기능이상으로 발생하는 mitoptosis(mitochondria suicide)에 의한 세포사멸(Skulachev, 2006) 등의 연구 결과가 보고되었다.

위 연구결과를 토대로 감염된 담관 섬유모세포의 에너지 대사를 확인하기 위해 미토콘드리아 전자전달계에 분포하는 전자전달효소(COXII, ATPase)와 에너지 대사과정에 관여하는 porin에 대한 항체를 사용하여 면역조직화학법을 시행하였다. 그 결과 간흡충에 감염된 담관의 경우 감염시간이 길수록 COXII, ATPase의 분포가 감소되었으며, 담관 상피조직 주위의 섬유화가 이루어진 부분에서는 COXII, ATPase의 분포가 거의 확인되지 않았다.

이러한 결과로 보아 간흡충에 감염된 후 이루어지는 숙주반응에 의해 결합조직의 섬유화가 이루어지며, 섬유화 과정에서 생성되는 섬유조직의 물리적인 자극에 의한 세포 파괴가 이루어져 정상적인 대사과정을 수행할 수 없는 것으로 생각된다. 또한 담관의 섬유화가 진행되는 동안 섬유모세포의 활성이 존재하는 세포들의 경우 COXII, ATPase의 분포양상이 관찰되며, 이 섬유모세포는 감염에 대한 조직의 복구를 위해 세포 대사과정이 활발하게 이루어지고

있는 것으로 추측된다.

실험쥐의 담관에 간흡충을 감염시키고 3개월 지난 후 분리된 섬유모세포의 경우, 배양기에서 7일 배양 되었을 때, 세포분열이 거의 이루어지지 않으며, 섬유모세포의 수축이 이루어졌고, 섬유모세포의 미토콘드리아 전자전달 효소 (COXII, ATPase) 및 당, 이온 아미노산의 수송들을 담당하는 porin 단백질의 분포가 거의 확인되지 않았다. Bruce & Deamond (1991)는 섬유모세포의 증식은 노화와 관련이 있으며, 그 결과 상처부위에서 섬유모세포의 수가 감소된다고 하였으며, 노화가 이루어진 세포에서 미토콘드리아 전자전달 복합체 I, IV의 기능 감소 (Navarro & Boveris, 2004; Navarro et al., 2002, 2004, 2005)에 대한 보고가 있었다. 또한 FOF1-ATP 합성효소의 활성을 저해하는 3,3'-Diindolylmethane (DIM)과 같은 화학물질 (Roy et al., 2008)과, mtDNA가 결핍된 143B 세포주에서 미토콘드리아 전자전달 효소 (complex I, II, III, IV)의 억제 (Indo et al., 2007)는 세포내 활성산소 (ROS, reactive oxygen species)를 증가시키고 이에 따른 세포의 apoptosis가 일어난다고 하였다. 따라서 간흡충에 감염된 담관 조직에 존재하는 섬유모세포를 배양했을 때, 정상 또는 감염 지속 시간이 상대적으로 짧은 섬유모세포보다 감염 지속 시간이 긴 섬유모세포의 세포 사멸이 빠르게 이루어지는 것은 미토콘드리아 전자전달효소의 기능 감소와 관련이 있는 것으로 생각된다. 간흡충으로부터 분리되는 화학물질은 섬유모세포에 존재하는 미토콘드리아 전자전달효소를 감소시키고, 전자전달효소의 감소는 세포 내 활성산소를 증가시키며, 그 결과 감염된 담관에 존재하는 섬유모세포는 정상 담관에 존재하는 섬유모세포보다 더 빨리 노화가 이루어지고 또한 활성산소 증가에 따른 세포사멸이 유도되는 것으로 추측된다.

간흡충에 감염된 담관의 경우 간흡충의 물리적인 자극에 의해 결합조직의 섬유화로 인한 확장, 담관 상피조직의 확장 등의 병변이 나타났다. 확장된 담관에 존재하는 섬유모세포는 결합조직에 생성되는 섬유조직에 의한 물리적 상해로 인하여 세포 피사가 이루어지며, 상처 치유를 위해 섬유모세포의 대사과정 활성이 이루어지는 것으로 생각된다. 또한 감염이 지속적으로 유지된 담관으로부터 분리된 섬유모세포에 미토콘드리아 에너지 생성과정에 필요한 효소 중 ATPase, COXII의 감소와 미토콘드리아의 막에 존재하는 porin 등의 단백질 분포가 감소하는 것으로 보아 담관에 존재하는 섬유모세포는 간흡충 감염에 의한 화학적 자극으로 인해 세포 내 에너지 대사과정이 정상적으로 이루어지지 않는 것으로 확인되었다. 이러한 에너지 대사과정의 이상은 간흡충에 감염된 담관에 존재하는 섬유모세포의 사멸과 관계가 있을 것으로 추측된다.

따라서 간흡충에 감염되면 물리적 자극에 의한 담관의 섬유화로 세포피사와 상처치유를 위한 섬유모세포의 빠른

증식이 일어나고, 화학적 자극에 의한 섬유모세포 대사과정의 손상이 발생하는 것으로 생각된다. 이 과정에서 간흡충 감염에 의해 미토콘드리아 전자전달효소의 감소와 이에 따른 활성산소의 증가와 같은 섬유모세포 내의 에너지 대사과정의 변이가 이루어져 세포사멸이 유도되는 것으로 판단된다. 이러한 섬유모세포의 변이에 따른 결과로 간흡충에 감염된 담관의 섬유모세포는 정상 조직에 존재하는 섬유모세포와 같은 기능을 수행하지 못하게 되어 담관의 섬유화가 유지되는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Akimoto M, Hangai M, Okazaki K, Kogishi J, Honda Y, Kaneda Y: Growth inhibition of cultured human Tenon's fibroblastic cells by targeting the E2F transcription factor. *Exp Eye Res* 67(4) : 395-401, 1998.
- Albert B, Bray D. *Molecular biology of the cell*. Garland publishing Inc, New York, pp. 1179-1180, 1994.
- Belamaric J: Intrahepatic bile duct carcinoma and *C. sinensis* infection in Hong Kong. *Cancer* 31(2) : 468-473, 1973.
- Bhamarapravati N, Thamavit W, Vajrasthira S: Liver changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini*. *Am Society of Trop Med Hyg* 27 : 787-794, 1978.
- Bloom W, Fawcett DW: *A textbook of histology*, 10th ed. Saunders, Philadelphia, pp. 171-172, 1972.
- Bruce SA, Deamond SF: Longitudinal study of *in vivo* wound repair and *in vitro* cellular senescence of dermal fibroblasts. *Exp Gerontol* 26 : 17-27, 1991.
- Bustamante J, Di LE, Fernandez-Cobo M, Monti N, Cadenas E, Boveris A: Kinetic analysis of thapsigargin-induced thymocyte apoptosis. *Free Radic Biol Med* 37 : 1490-1498, 2004.
- 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.
- Choi BI, Park JH, Kim YI, Yu Es, Kim SH, Kim WH, Kim CY, Han MC: Peripheral cholangiocarcinoma and clonorchiasis: CT finding. *Radiology* 169 : 149-153, 1988.
- 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.
- Cottrell DA, Turnbull DM: Mitochondria and ageing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3(6) : 473-478, 2000.
- Damjanov I: Biology of disease: Lectin cytochemistry and histochemistry. *Lab Invest* 57(1) : 5-20, 1987.
- Dirks AJ, Hofer T, Marzetti E, Pahor M, Leeuwenburgh C: Mitochondrial DNA mutations, energy metabolism and apoptosis in aging muscle. *Ageing Res Rev* 5 : 179-195, 2006.
- Duke RC, Ojcius DM, Young JD: Cell suicide in health and disease. *Sci Am* 275(6) : 80-87, 1996.
- Fem T: Demonstration by monoclonal antibodies that carbohy-

- drates structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature* 314 : 53, 1985.
- Flavell DJ: Liver-fluke infection as an aetiological factor in bile duct carcinoma of man. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 75 : 814-824, 1981.
- Gould E, McEwen BS: Neuronal birth and death. *Curr Opin Neurobiol* 3 : 676-682, 1993.
- Green D, Kroemer G: The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?. *Trends Cell Biol* 8(7) : 267-271, 1998.
- Hou PC: The pathology of *Clonorchis sinensis* infestation of the liver. *J Pathol Bacteriol* 70 : 53-64, 1995.
- Indo HP, Davidson M, Yen HC, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, Higuchi M, Koga Y, Ozawa T, Majima HJ: Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion* 7(1-2) : 106-118, 2007.
- Kang HS, Ko JS: *Histology* 2nd ed., Komunsa publishing Inc, Seoul, pp. 92-93, 1994. (Korean)
- 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)
- Kim SJ, Min BH: Ultrastructural change of the bile duct fibroblast at infected rat with *Clonorchis sinensis*. *Korean J Electron Microscopy* 34(2) : 121-130, 2004.
- Kim YI, Yu ES, Kim ST: Intraductal variant of peripheral cholangiocarcinoma of the liver with *Clonorchis sinensis* infection. *Cancer* 63 : 1562-1566, 1989.
- 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.
- Kwon JN, Min BH, Lee HS, Kim SJ, Joo KH: Effect of *Clonorchis sinensis* excretory-secretory product on the cultured SD rat bile duct fibroblast. *Korean J Microscopy* 394(2) : 117-124, 2009.
- Lee SH, Shim TS, Lee SM: Studies on pathological changes of the liver in albino rats infected with *Clonorchis sinensis*. *Korean J Parasitol* 16 : 148-155, 1978.
- Lee YH, Lee HP, Kim YU, Lee YI, Song WY: Primary carcinoma of liver induced by *Clonorchis sinensis*. *J Korean Surg Soc* 10(4) : 273-281, 1968.
- McLeod KJ, Lee RC, Ehrlich HP: Frequency dependence of electric field modulation of fibroblast protein synthesis. *Science* 12 : 1465-1469, 1987.
- Min HK, Soh CT: The effect of a carcinogen, dimethylnitrosamin, in cholangiocarcinoma in the albino rats experimentally infected with *Clonorchis sinensis* metacercaria. *Yonsei Rep Trop Med* 17 : 1-10, 1986.
- Navarro A, Boveris A: Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287 : R1244-1249, 2004.
- Navarro A, Gomez C, Lopez-Cepero JM, Boveris A: Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286 : R505-511, 2004.
- Navarro A, Gomez C, Sanchez-Pino MJ, Gonzalez H, Bandez MJ, Boveris AD, Boveris A: Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance, and brain mitochondrial function in aging male mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289 : R1392-1399, 2005.
- Navarro A, Sanchez-Pino MJ, Gomez C, Peralta JL, Boveris A: Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282 : R985-R992, 2002.
- Purtillo DT: Clonorchiasis and hepatic neoplasm. *Trop Geogr Med* 28 : 21-27, 1976.
- Rim HJ: Clonorchiasis in Korea. *Korean J Parasitol* 28(suppl) : 63-78, 1990.
- Roy A, Ganguly A, BoseDasgupta S, Das BB, Pal C, Jaisankar P, Majumder HK: Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of F0F1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Mol Pharmacol* 74(5) : 1292-1307, 2008.
- Schwartz DA: Cholangiocarcinoma associated with liver fluke infection: a preventable source of morbidity in Asian immigrants. *Am J Gastroenterol* 81(1) : 76-79, 1986.
- Sher L, Iwatsuki S, Lebeau G, Zaiko AB: Hilar cholangiocarcinoma associated with clonorchiasis. *Dig Dis Science* 34(7) : 1121-1123, 1989.
- Sullivan WG, Koep LJ: Common bile duct obstruction and cholangiohepatitis in clonorchiasis. *JAMA* 243 2060-2061, 1980.
- Skulachev VP: Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* 11 : 473-485, 2006.

< 국문초록 >

섬유모세포 (fibroblast)는 결합조직을 구성하는 세포의 한 종류로서, 결합조직 전체에 분포하는 것으로 알려져 있다. 섬유모세포는 주위환경에 따라 형태가 쉽게 변하며, 대부분 결합조직 내에 고정되어 분포하고 있지만 염증이 일어났을 때나 조직배양 중에는 세포들이 이동하기도 한다. 또한 조직이 손상되었을 때 상치부위로 이동하여 대량의 콜라겐 층을 형성함으로써 손상된 조직을 복구시키기도 한다.

미토콘드리아는 전자전달계 (electron transport system)를 통해 세포대사에 필요한 ATP를 생산하는 것을 주 기능으로 한다. 미토콘드리아의 형태적 변이와 산화적 스트레스 그리고 전자전달 효소 결핍으로 인한 세포내 활성산소의 증가 등의 기능이상으로 세포의 노화가 이루어지기도 하며, apoptosis의 주요 원인이 되기도 한다.

지금까지 간흡충 (*Clonorchis sinensis*)에 감염된 담관 조직으로부터 분리하여 배양된 섬유모세포에서 나타나는 세포질돌기의 증가와 같은 형태적인 변화양상과 배양중의 섬유모세포에 간흡

충 분비배설물질을 첨가할 경우 섬유모세포의 형태와 세포분열 양상의 변화가 이루어진다는 보고가 있었다.

하지만 간흡충의 감염이 미토콘드리아 효소의 분포에 미치는 영향에 대한 연구는 미흡하다. 따라서 이 연구에서는 간흡충 피낭유충을 실험쥐에 감염시킨 후 시간 경과에 따른 담관의 형태 변화를 관찰하고, 간흡충에 감염된 담관과 담관으로부터 분리하여 배양한 섬유모세포의 미토콘드리아 전자전달효소 분포를 확인하여 간흡충에 감염된 담관에 존재하는 섬유모세포가 미토콘드리아 전자전달계 이상으로 인한 변이와 관련이 있는지 확인하였다.

간흡충에 감염된 담관에 분포하는 섬유모세포에서는 주변 섬유성조직에 의한 물리적 손상으로 세포질이 파괴되고, 소포체의 확장 및 미토콘드리아 내막의 손상이 관찰되었다. 미토콘드리아 전자전달 효소는 간흡충에 감염된 담관 조직과 담관 섬유모세포

를 분리하여 배양하였을 경우에 정상대조군에 비해 ATPase, COXII, porin의 분포가 감소하였다.

간흡충에 감염된 담관은 충체의 자극으로 인해 결합조직의 섬유화가 이루어지고, 이러한 담관에 존재하는 섬유모세포는 섬유조직에 의한 물리적 상해로 세포가 파괴되었다. 감염된 담관으로부터 분리된 섬유모세포는 간흡충 감염에 의한 화학적 손상으로 미토콘드리아 전자전달효소가 감소되었다. 그 결과, 섬유모세포는 미토콘드리아의 전자전달계 기능이상으로 인한 세포사멸이 유도될 것으로 추측된다. 따라서 간흡충의 감염은 물리적 자극에 의한 담관의 섬유화, 화학적 자극에 의한 섬유모세포 대사과정의 변이를 유발하며, 미토콘드리아의 경우 ATP 생성을 위한 섬유모세포의 전자전달효소의 분포를 감소시켜 정상 조직에 존재하는 섬유모세포와 같은 기능을 수행하지 못하고 담관의 섬유화가 유지되는 것으로 생각된다.