

흰쥐소장에서 Taxol에 의한 병리소견에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 병리학교실
연세대학교 의과대학 병리학교실*

장 선 희 · 윤 회 수 · 이 시 내
조 민 선* · 구 혜 수 · 한 운 섭

Taxol-induced Pathological Findings in Rat Small Intestine

Sun Hee Chang, M.D., Hee Soo Yoon, M.D., Shi Nae Lee, M.D.
Min Sun Cho, M.D.* Heasoo Koo, M.D. and Woonsup Han, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine, Ewha Womans University
Department of Pathology, College of Medicine, Yonsei University*, Seoul, Korea

Taxol is an active chemotherapeutic agent against a variety of solid tumors and a potentially useful drug for augmenting the cytotoxic action of radiotherapy against certain cancers. Taxol blocks cells in the mitotic phase of cell cycle. The aim of this study was to define the in vivo response of rapidly dividing cells of the small intestinal mucosa to taxol. We studied the numbers of apoptotic and mitotic cells and the expression of bcl-2 and p53 in rat jejunal crypt cells at 1, 2, 4, 8, 12, 16, and 24 hours and 3 and 5 days after intraperitoneal injection of taxol. Mitosis peaked at 2 and 4 hours and 12 and 16 hours. Apoptosis peaked at 16 hours and returned to normal after five days. The glands in crypts showed marked distortion with atypical lining cells after three days, which returned to normal at 5 days. bcl-2 expression was markedly decreased at 8 to 24 hours and subnormally recovered after three to five days. p53 showed no significant changes throughout. The histopathological changes in small intestine due to taxol were transient with complete recovery. bcl-2 expression was inversely corresponded to numbers of apoptosis. The changes were p53 independent. Further studies to understand the conditions that maximize the cell-cycle modulating effects of taxol may greatly enhance its anti-tumor effectiveness. (Korean J Pathol 1997; 31: 1291 ~ 1296)

Key Words: Taxol, Small intestine, Mitosis, Apoptosis, bcl-2, p53

서 론

Taxol(paclitaxel)은 *Taxus brevifolia*에서 추출한 항

암제로 1963년 National Cancer Institute Natural Products Branch Program에 의해 발견되었고 다양한 세포 증식성 종양 특히 난소암, 유방암, 식도암, 악성흑색종, 비소세포성 폐암에서 치료효과가 입증되었으며 방사선 감작제로의 이용가능성도 높아지고 있다.

미세소관 조합 속도를 증가시키고 해중합을 억제하여 세포를 G2/M기에 정지시키는 taxol은 또한 미

접 수: 1997년 4월 11일, 게재승인: 1997년 9월 30일

주 소: 서울시 양천구 목동 911-1, 우편번호 158-056

이화여자대학교 의과대학 병리학교실, 장선희

ISSN : 0379-1149

세소관을 안정화시켜 정상적인 기능을 방해하고 비정상적인 구조를 가진 미세소관속과 방추체 형성을 유도하기 때문에 염색체가 분리되지 않으므로 세포 소멸(apoptosis)을 통한 세포의 사멸을 촉진한다. 이러한 현상은 HeLa 세포, 배양한 백서 림프구, 햄스터 세포, 쥐의 정낭 등을 이용한 실험에서 확인되었고 G2/M기의 세포가 방사선 조사에 민감하기 때문에 방사선에 대해 저항성이 있는 정상세포종 세포주(astrocytoma G18)에서 방사선 치료에 의한 세포의 파괴를 증가시키는 것이 보고되었다.^{2,3}

Taxol은 정상적으로 빠르게 증식하는 조직인 골수, 구강 점막, 위장관 점막, 모낭에 심한 독성을 보이므로 골수억제와 위장관 독성이 중요한 부작용이며 그 외에 탈모증, 오심, 구토, 설사, 설염, 신경병증, 혈중 트리글리세라이드 농도 증가, 과민반응도 나타날 수 있다.

정상조직에 미치는 영향이 항암제 치료에서 중요한 인자 중의 하나이므로 taxol 투여 후 소장점막세포에서 발생하는 조직학적 변화를 규명하기 위해 본 실험을 계획하였다. 또한 taxol을 투여받은 세포가 세포소멸을 거쳐 죽으므로 세포소멸을 조절한다고 알려진 유전자들 중 대표적인 bcl-2와 p53 유전자 발현정도를 면역조직화학적 검사를 통해 평가하였다.

방 법

25 마리의 성숙 흰쥐 (Sprague-Dawley계)에서 taxol을 복강내 주입 (10 mg/Kg) 후 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 시간, 3, 5일 후에 각각 2~3마리의 쥐를 희생시켰다. 광학현미경상 가장 빈도가 높은 부위에서 공장 음와세포 1,000개 중 유사분열 또는 세포소멸을 일으킨 세포를 각각 계수하였다. 세포소멸체(apoptotic body)는 Kerr와 Milas의 정의에 합당한, 막으로 싸인 응축된 세포질을 가진 작은 세포 입자가 분명하게 구분되는 응축된 염색질괴를 가지고 있고 염색 반응을 동반하지 않는 것으로 규정하였다.

bcl-2와 p53에 대한 면역조직화학적염색은 다음과 같은 방법으로 시행하였다. 포르말린 처리 파라핀 포매 조직을 5 μm 두께로 박절한 후 통상의 방법에 따라 탈파라핀하고 0.3% 과산화수소수로 처리하였다. 차단 항체로 30분간 반응시킨 후 일차 항체를 작용시켜 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후의 과정은 labelled streptavidin-biotin kit(Dako)를 이용하여 통상의 avidin-biotin complex법에 따라 진행하였

고, 헤마톡실린으로 대조 염색을 하였다. 일차항체 bcl-2(sc-509; Santa Cruz), p53(BP53.12; monoclonal, Zymed)은 각각 1:100, 1:50으로 희석 사용하였고 bcl-2는 세포질과 핵이, p53은 핵이 염색되는 세포를 양성으로 판정하였다. bcl-2의 경우 등급을 나누어 음성 반응을 0, 약양성 반응인 경우 1+, 전체 세포의 30% 이하에서 분명한 강양성 반응인 경우 2+, 전체 세포의 30% 이상에서 분명한 강양성 반응인 경우 3+로 하였다.

결 과

Taxol 투여 후 유사분열은 1시간 후부터 증가하기 시작하여 4시간에 1000개의 세포 중 206개로 최대치에 도달했으며 1 일부터 정상으로 회복되었다 (Table 1, Fig. 1 and 2B). 다수 세포에서 세포막의 주변부에 염색질이 배열되는 차바퀴양상(wagon-wheel appearance)이 관찰되었다. 세포소멸은 8시간 부터 증가하기 시작하여 16시간에 최대치에 도달했으며 3 일부터 정상으로 회복되었다 (Table 1, Fig. 1 and 2C). 음와선 표면상피세포의 이형성 변화가 3일에 심하게 관찰되었다가 5일에 정상으로 회복되었다 (Fig. 2D). bcl-2 발현은 초기에는 양성반응(3+)을 보였으나 세포소멸이 증가된 8 시간에서 24시간에 음성 반응을 보였으며 3일 부터 다시 양성 반응(1+)을 보였다 (Table 1, Fig. 3). p53은 일관되게 음성 반

Table 1. Effect of taxol on mitosis, apoptosis, and bcl-2 and p53 expression in jejunal mucosa

Time(n)	(/1,000 crypt cells)		bcl-2	p53
	Mitosis	Apoptosis		
Control(4)	9	2	3+	-
1 hr(2)	44	4	3+	-
2 hr(2)	118	3	3+	-
4 hr(2)	206	5	3+	-
8 hr(3)	97	76	-	-
12 hr(3)	199	67	-	-
16 hr(3)	154	146	-	-
24 hr(2)	2	69	-	-
3 d(2)	16	13	1+	-
5 d(2)	22	7	1+	-

n: number; hr: hour; d: day



Fig. 1. Taxol induced mitosis and apoptosis. Mitosis started to increase at 1 hour and peaked at 2 and 4 hours (118 and 206 per 1,000 crypt cells, respectively), and 12 and 16 hours (199 and 154 per 1,000 crypt cells, respectively) after taxol injection and returned to normal at 24 hours (2 per 1,000 crypt cells). Apoptosis peaked at 16 hours (146 per 1,000 crypt cells) and returned to normal at 5 days (7 per 1,000 crypt cells).

응을 보였다.

고 찰

본 실험에서 백서에 taxol을 투여했을 때 소장음와세포는 1시간 후부터 유사분열수의 증가가 시작되어 4시간에 최대치에 도달하여 16시간까지 증가되어 있다가 24시간에 감소하였고 세포소멸은 8시간부터 증가하기 시작하여 16시간에 최대치에 도달하고 정상으로 회복되기 시작하여 유사분열수의 증가와 세포소멸 증가가 발생한 시간이 다른 것이 확인되었다.

Pulkkinen⁶은 10 nM의 taxol에 노출시킨 후두 상피세포 종양 세포주가 6~24시간 동안 유사분열을 일으킨 후 세포소멸을 거쳐 죽는 것을 관찰하였다. Jordan⁷은 Hela 세포를 taxol과 함께 20시간 배양한

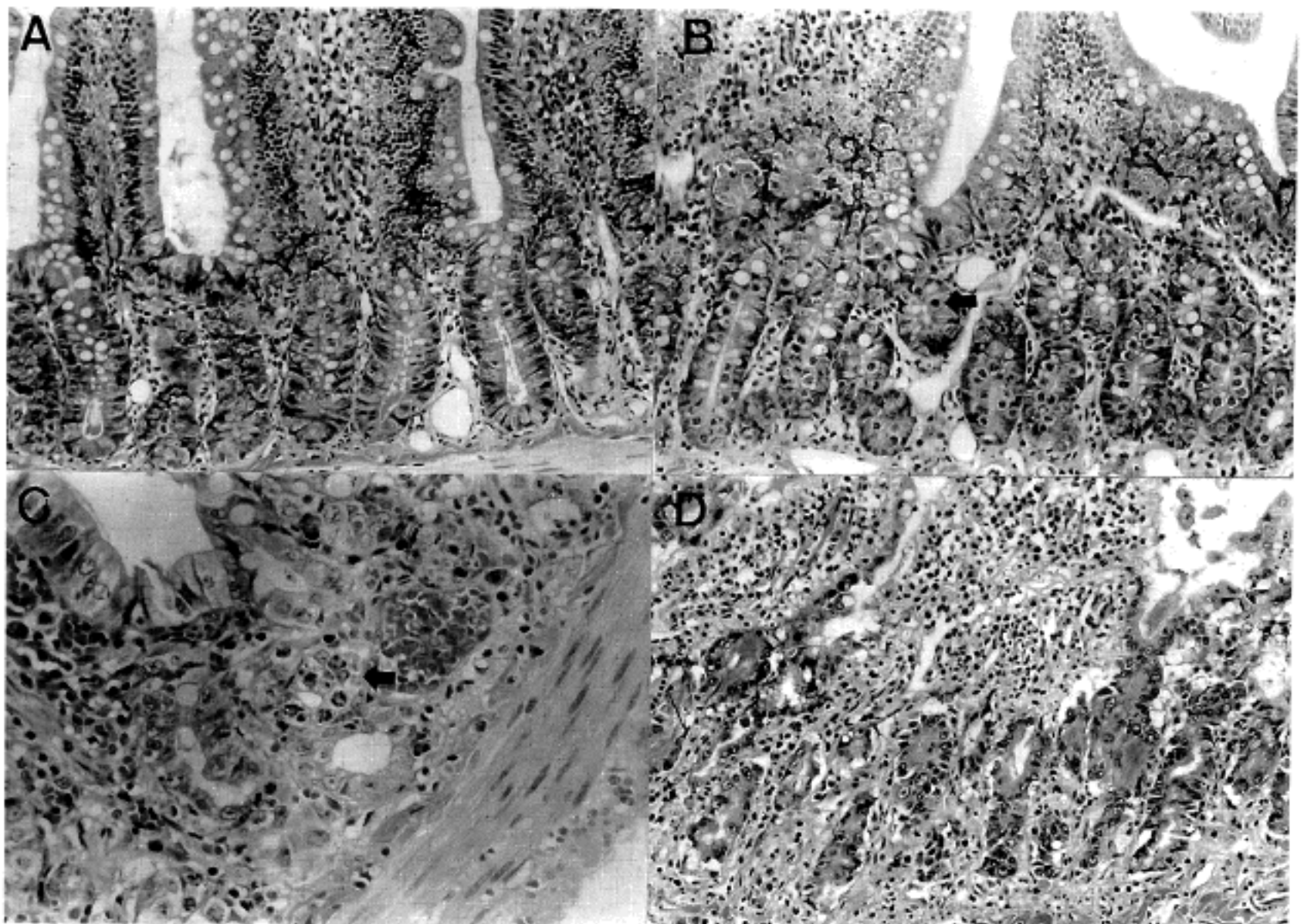


Fig. 2. A: Normal jejunal mucosa. Rare mitotic figures are seen. B: 4 hour after taxol injection, showing the peak of mitosis. Numerous mitotic figures are seen with a wagon-wheel appearance of chromatin pattern (arrow). C: 16 hours after taxol injection, showing the peak of apoptosis. Many apoptotic bodies are seen (arrow). D: 3 days after taxol injection, showing marked distortion of the glands with atypical lining cells.

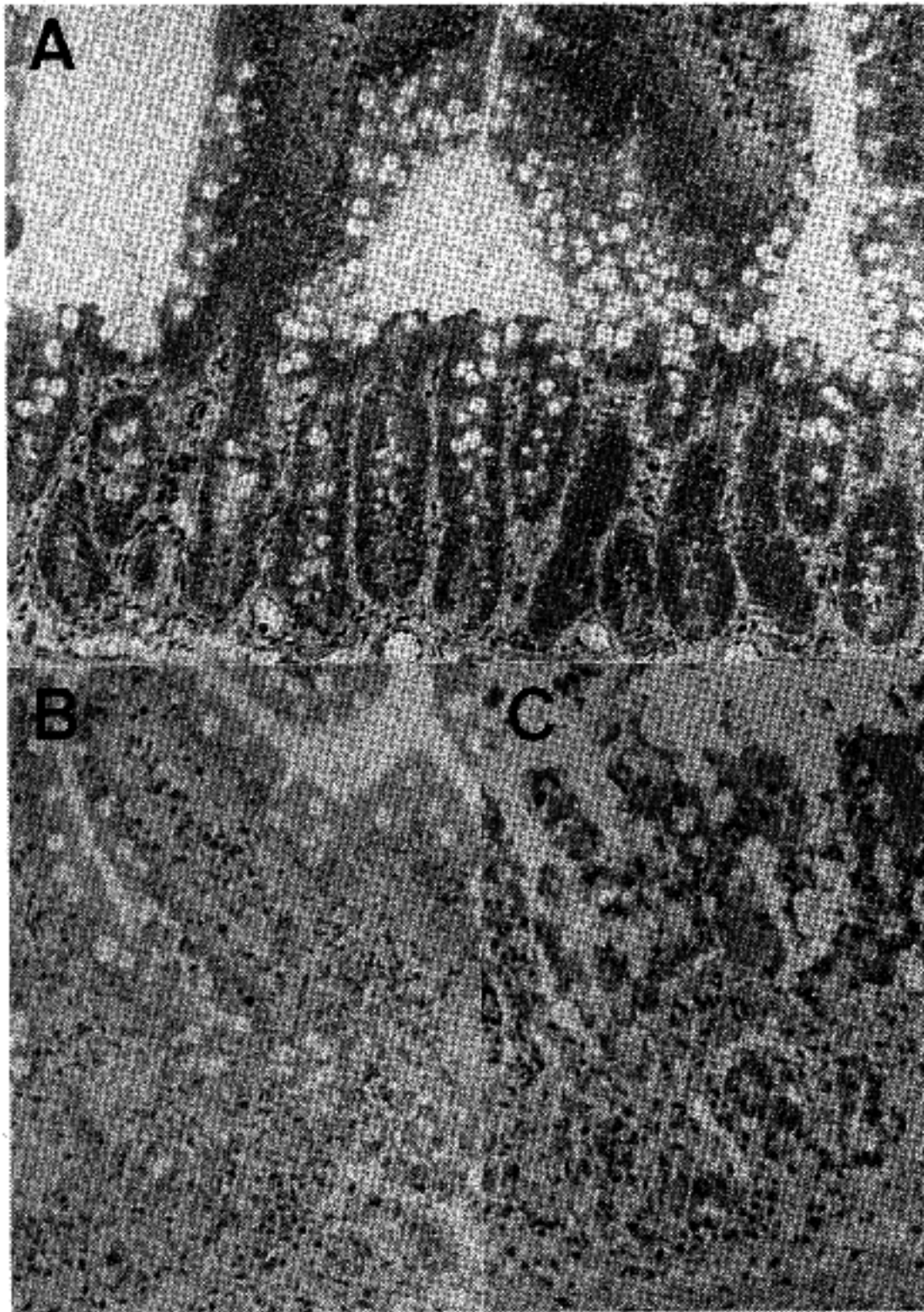


Fig. 3. Immunostain with bcl-2 antibody. A: Normal jejunal mucosa, showing strong positive reaction of crypt cells. B: 16 hours after taxol injection at the peak of apoptosis, showing negative reaction of crypt cells. C: 3 days after taxol injection, showing weakly positive reaction of crypt cells.

실험에서 taxol의 농도가 10 nM 이하에서는 taxol 제거 후 세포가 정상적인 유사분열을 재개하였으나 10 nM 이상에서는 taxol 제거 후 24시간 이내에 비정상적인 유사분열을 시작하여 48~72시간 내에 세포소멸을 일으킴을 관찰하였다. Milas 등⁸은 MCA-4 (murine mammary carcinoma)와 OCA-I (murine ovarian carcinoma)를 백서에 이식한 후 taxol을 10~80 mg/Kg 정주하였을 때 유사분열은 1시간에 시작되어 9시간에 최대치에 도달하고 세포소멸은 이 시기부터

시작되어 18~24시간에 최대치에 도달한 후 3일 후에는 정상으로 회복됨을 관찰하였다. 이와같이 종양 세포주를 실험관내에서 또는 생체내에서 taxol에 노출시켰을 때 관찰된 유사분열과 세포소멸의 최대치를 보이는 시간의 상관관계가 본 실험에서 관찰한 정상 소장집막에서와 비슷하였다.

임상에서 taxol을 두여 받던 중 죽은 5명의 환자들의 부검에서는 taxol 두여 후 11일 이내 사망한 3예에서는 위상관 상피세포에서 유사분열 정지 증가

가 관찰되었지만 17일 이후 사망한 2예에서는 이런 변화가 발견되지 않았다. 임상적으로 taxol을 투여받은 환자에서 관찰할 수 있는 골수억제도 8~12일에 최저치로 떨어진 후 다시 정상으로 회복되었다.⁹ 이상의 결과들이 서로 다른 것은 각각의 경우 사용한 용량과 방법, 대상이 다르기 때문으로 생각되지만 유사분열 억제를 거쳐 세포소멸이 일어나는 변화가 가역적이라는 점에서는 유사하였다.

본 실험에서는 taxol 투여 후 3일에 소장 선상피 세포에 이형성 변화가 나타났다가 5일에 정상으로 회복되었는데 문헌에서 taxol에 의한 세포의 이형성 변화에 대한 기술을 찾을 수 없었다. 그러나 기존의 항암제 중 발암물질로 작용하는 것이 다수 보고되었으므로 추후 검증이 필요할 것으로 사료된다.

*Caenorhabditis elegans*의 *ced* 유전자를 이용한 연구를 통해 다양한 유전자가 세포소멸 조절에 관여하는 것과 그에 대응하는 포유동물 유전자가 확인되었다. *C. elegans*에서 세포소멸을 억제하는 *ced-9*과 유사한 구조를 가지고 있는 *bcl-2* 유전자는 18q21에 위치해 있으며 t(14;18)이 일어난 여포성 B 세포 림프종에서 처음 발견되었고 모든 외분비선의 관상피 세포, 간세포 (stem cell), 장상피세포, 자궁내막, 전립선에서 발현된다는 것이 알려졌다. *bcl-2*를 인위적으로 제거한 (knock out) 쥐에서 흉선과 비장에 세포소멸이 증가하는 현상이 관찰되어 *bcl-2* 단백질이 세포생존기간을 연장시켜 세포소멸을 억제하며 그 결과 전암유전자나 종양억제유전자에 돌연변이를 유발하게 되는 것으로 생각되고 있다. 이것은 사람의 *bcl-2*를 과발현시킨 돌연변이쥐 (transgenic mice)에서 다클론성 B 세포 증식이 일어나는 장기간의 잠복기를 거쳐 림프종이 발생한 실험을 통해 입증되었다. Willingham 등은 사람의 비인두암종세포주인 KB와 사람의 난소상피암종세포주인 OVCAR-3에서 taxol에 의해 유도된 유사분열 동안 *bcl-2*가 발현되다 세포소멸이 나타남과 동시에 소실되는 것을 관찰하여 본 실험과 유사한 결과를 보였고 이것은 taxol에 의한 세포소멸이 *bcl-2*와 관련이 있음을 시사한다.

세포소멸과 p53의 관계는 세포소멸과 *bcl-2*의 관계처럼 명확하지는 않으나 세포소멸이 p53 의존성 또는 비의존성으로 발생하는 것으로 알려져 있다. 설치류 골수성 백혈병 세포에서 발견되는 돌연변이를 일으킨 wild type p53이 세포소멸을 일으키는 것¹⁴과 p53 유전자가 없는 쥐의 흉선세포가 방사선조사와 etoposide에 저항성을 갖는 것은 p53 의존성 세포소멸의 예인 반면, 남성호르몬에 대한 전립선 선세포

의 반응과 sodium butyrate에 대한 대장선암세포의 반응은 p53과 무관한 세포소멸의 예이다. 본 실험에서 세포소멸에 따른 p53 발현의 유의한 변화는 관찰되지 않았으므로 taxol에 의한 세포소멸 증가는 p53과 무관한 것으로 생각된다.

결 론

본 실험의 결과로 성숙 흰쥐에서 taxol을 1회 복강내 투여했을 경우 투여 5일 이내 소장 음와세포에서 나타나는 유사분열과 세포소멸, 세포의 이형성은 나타나는 시기가 서로 다르고 가역성이었으며 *bcl-2* 발현이 세포소멸과 반비례 관계를 보이는데 반해 p53의 발현은 무관한 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Wani MC, Taylor HL, Wall Me, et al. Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Am Chem Soc* 1971; 93: 2325-7.
2. Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. Taxol: A novel investigational antineoplastic agent. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1247-59.
3. Pulkkinen JO, Elomaa L, Joensuu H, Marikainen P, Servomaa K, Grenman R. Paclitaxel-induced apoptotic changes followed by time lapse video microscopy in cell lines established from head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 214-8.
4. Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V, Arbuck SG, Donehower RC. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Semin Oncol* 1993; 20: 1-15.
5. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-26.
6. Pulkkinen JO, Elomaa L, Joensuu H, et al. Paclitaxel induced apoptotic changes followed by time lapse video microscopy in cell lines established from head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 214-8.
7. Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, et al. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of taxol results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* 1996; 56: 816-25.
8. Milas L, Hunter NR, Kurdoglu B, et al. Kinetics of mitotic arrest and apoptosis in murine mammary and ovarian tumors treated with taxol. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995; 35: 297-303.

9. Hurban RH, Yardley JH, Donehower RC, Boitnott JK. Epithelial necrosis in the gastrointestinal tract associated with polymerized microtubule accumulation and mitotic arrest. *Cancer* 1989; 63: 1944-50.
 10. Hengartner MO, Ellis RE, Horvits HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992; 356: 494-9.
 11. Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 1993; 74: 777-9.
 12. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulation of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-86.
 13. Willingham MC, Bhalla K. Transient mitotic phase localization of bcl-2 oncoprotein in human carcinoma cells and its possible role in prevention of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 441-50.
 14. Youniss-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, et al. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 352: 345-7.
 15. Clarke AR, Purdie CA, Harrison KJ, et al: Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993; 362: 849-52.
-