

5-Fluorouracil이 白鼠肝臟細胞의 蛋白合成에 미치는 影響에 관한 自記放射法的 研究

서울대학교 大學院 齒醫學科 口腔解剖學 專攻
(指導: 金 明 國 副教授)

白 基 碩

EFFECTS OF 5-FLUOROURACIL ON PROTEIN SYNTHESIS OF RAT LIVER CELL

—A STUDY BY QUANTITATIVE RADIOAUTOGRAPHY—

Ki Suk Paek, D.D.S.

Dept. of Oral Anatomy, Graduate School, Seoul National University.

(Director: Myung Kook Kim, D.D.S., M.S.D., Ph.D.)

.....> Abstract <.....

The author observed the effects of 5-fluorouracil on protein synthesis of liver cell of the rat. For this study, forty-two young adult male rats were used. Experimental animals were given an intramuscular injection of 5-fluorouracil 50mg per kg of body weight. Animals were sacrificed 1, 3, 5, 7, 10, 14 and 21 days after 5-fluorouracil. The animals were given an intraperitoneal injection of $3\mu\text{c}$ leucine- ^3H per g of body weight at 30 minutes prior to sacrifice.

The specific activity of the leucine- ^3H was 250mc per mM. Under ether anesthesia, liver tissues were taken out and dipped in 2% paraformaldehyde-glutaraldehyde (24.5%) EM in phosphate buffer. Tissues were approximately sliced 1mm^3 in size and fixed for 3 hours in 2% paraformaldehyde-glutaraldehyde (24.5%) EM in phosphate buffer, and embedded in a mixture of Epon in a routine manner.

One micron sections were made on Sorvall Porter Blum MT-1 ultramicrotome. The slides were coated with Kodak NTB-3 liquid emulsion, and kept in a sealed Drierite at 4°C for 3 weeks. Radioautographs were developed in Kodak dolmi and fixed in rapid fixer, and stained with toluidine blue O.

The purpose of this investigation was to assess, by means of quantitative autoradiography, the effect of 5-fluorouracil on the protein synthesis of the rat liver cell.

The results were as follows;

1. Body weight of rat by 5-fluorouracil was significant decreased on day 5, followed a gradual recovery thereafter.
2. Liver weight of rat following an injection of 5-fluorouracil was significant decreased on day 5, followed a gradual recovery thereafter.
3. Results of grain counts of radioautographs of the liver cell in rats receiving 5-fluorouracil were reached a maximum decrease on day 7 and regenerated to a near normal value on day 21.

I. 緒 論

1957年 Heidelberger¹⁾가 5-Fluorouracil이 抗癌作用을 한다고 報告한 以來 그동안 이 方面의 研究가 많이 進展되었고, 特히 胃腸管, 乳房, 女性生殖系 및 皮膚等에 發生한 癌患者의 治療에 效果가 있다고 立證된 後부터 많이 利用하여 왔다.^{2, 5, 6, 8, 17, 20)} 5-Fluorouracil이 細胞毒性이 된다고 看做되는 可能한 機轉은 Thymidylate Synthetase의 形成을 抑制하여 DNA 合成이 停止되고, Uracil의 5-Position에 있는 水素가 弗素와 置換하므로서 非正常 RNA가 合成되고, Pyrimidine Nucleotide의 合成을 抑制하므로서 RNA 或은 DNA 또는 이들 兩者의 生産을 阻止한다는 等의 報告가 있다¹⁸⁾. 現在 알려진 抗癌劑는 數百種이 되나, 實際로 治療의 目的으로 使用되는 것은 40餘種에 不過하고, 特히 5-Fluorouracil은 副作用이 적고, 細胞의 增殖을 抑制한다는 點에서 Clinical Cancer의 治療劑로 使用되어 오고 있다. 이 研究는 抗癌劑인 5-Fluorouracil을 白鼠(Rat)에 注射하여, 肝臟細胞의 蛋白合成에 어떠한 影響을 미치는 가를 追求하려고, Leucine-³H에 依하여 定量的인 自記放射法의 實驗을 하였고, 其 結果를 이에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗動物: 體重 150g 內外의 雄性白鼠(Rat) 42頭를 使用하였고, 42頭中 21頭는 實驗群에 配當하고, 나머지 是 對照群에 使用하였다. 實驗群과 對照群의 各 21頭는 動物犧牲時間에 따라서 各各 3頭씩 配當하였다.

2. 實驗方法: 5-Fluorouracil을 體重 kg當 50mg을 筋肉內注射하고, 注射後 24時間이 經過한 다음을 第 1日로 하여, 1日, 3日, 5日, 7日, 10日, 14日 및 21日 때마다 動物을 犧牲시켰고, 犧牲 30分前에 Leucine-³H을 體重 g當 3 μ c(Specific Activity 250mc/mM)를 腹

腔內 注射하고, 犧牲直前에 體重을 測定하였다. Ether로 麻醉한 後 肝臟을 떼어내어, 무게를 測定하였고, 肝臟의 一部를 떼어내어 一但 固定液에 넣었다가 이를 면도칼로 1mm³의 크기로 細切하였다.

3. 組織標本製作: 電子顯微鏡標本製作法에 依하여 1 μ 의 非薄한 切片을 만들었고, 組織을 2% Paraformaldehyde-Glutaraldehyde(24.5%) EM in Phosphate Buffer에 3時間 固定한 다음, 이를 4% Sucrose가 含有된 Phosphate Buffer로 洗滌하고, 脫水는 50% Alcohol로 始作하여 70%, 80%, 90%, 95%, 100% Alcohol, 그리고 Propylene Oxide+100% Alcohol, Propylene Oxide를 使用하여 完全 脫水하고, 包埋는 Epon Mixture(Mixture A:Epon 812+DDSA, Mixture B: Epon 812+NMP, Mixture A+B+DMP-30)로 하였다. Epon Mixture를 먼저 Plastic Capsule에 넣고, 이속에 組織을 넣어 밑으로 가라앉을 때까지 기다린 後, 이 Capsule을 60°C의 oven에 넣어 2-3日 동안 放置하여 重化시켰다. Sorvall Porter Blum MT-1 Ultramicrotome을 使用하여 유리칼로 1 μ 두께의 細片을 만들었다.

4. 自記放射法: 暗室에서 Oven(45°C)에 Kodak NTB-3 Nuclear Track Emulsion을 넣어 固體의 Emulsion이 液體가 되도록 溶解시키고, 使用時는 45°C의 Water Bath에 담고 使用하였다. 슬라이드를 [核乳液에 2-3秒間 담근 後, 60度 傾斜가 되게끔 만든 木構板에 꽂아 乾燥시켰고, 乾燥된 슬라이드를 25枚入 플라스틱製標本箱子에 넣어 뚜껑을 닫은 後, 箱子뚜껑 틈사이를 검은 電氣테이프를 감고, 다시 鉛板으로 縱橫二重으로 감았다. 이를 은증으로 싸고, 模造紙로 다시 싸 後 비닐주머니에 넣었다. 이를 冷藏庫(4°C)에 넣어 3週間 露出케 하고, 暗室에서 DoImi液(2, 4-Diaminophenol Dihydrochloride 0.9g, Sodium Sulfit 10g, Potassium Bromide 0.2g, Water 200ml)에 1分間 現像하고, 2分間 洗滌하고, 固定은 Kodak Rapid Fixer 固定液에 3分間하고, 5分間 洗滌하였다. 染色은 Toluidine Blue

○로 하였다.

5. 自記放射法의 定量分析 및 統計의 處理: 自記放射法에 依하여 還元된 銀粒子의 判讀에는 450倍로 찍어서 印畫紙에서 20個의 肝細胞를 選擇하여 銀粒子數를 算出하였다. 여기서 얻은 數値의 統計的 處理는 算術平均(M), 標準偏差(S.D.), 有意性檢査(P) 및 百分比(%)를 各各 算出하였다.

III. 實驗成績

1. 5-Fluorouracil에 依한 體重의 變動: 第1表 및 第1圖에서 보는바와 같이 注射後 第1日에는 147.2g, 第3日에는 126.4g, 第5日에는 115.6g, 第7日에는 120.7g, 第10日에는 127.9g, 第14日에는 135.1g, 第21日에는 146.0g이었다. 또 對照群에 對한 百分比를 보면 第1日에는 93.2%, 第3日에는 80.0%, 第5日에는

Table 1. Body Weight of Rat by 5-Fluorouracil(g)

Day	Mean±(S.D.)	Probability	% of Control
1	147.2 (9.2)	<0.05	93.2
3	126.4 (8.4)	<0.001	80.0
5	115.6 (7.1)	<0.001	71.9
7	120.7 (8.8)	<0.001	76.4
10	127.9 (7.3)	<0.001	80.9
14	135.1 (9.4)	<0.005	85.5
21	146.0 (11.2)	<0.03	92.4

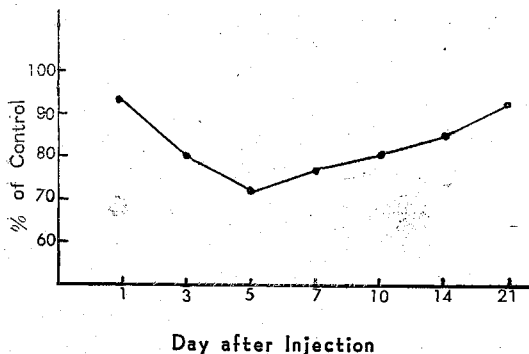


Fig. 1. Percent Change in Body Weight of Rats following an Injection of 5-Fluorouracil (50mg/kg)

Table 2. Liver Weight of Rat following an Injection of 5-Fluorouracil(g)

Day	Mean±(S.D.)	Probability	% of Control
1	5.3 (0.7)	<0.04	91.4
3	4.1 (0.6)	<0.001	70.7
5	3.6 (0.3)	<0.001	62.1
7	4.0 (0.4)	<0.001	69.0
10	4.3 (0.5)	<0.001	74.1
14	4.9 (0.4)	>0.004	84.5
21	5.6 (0.6)	>0.06	96.6

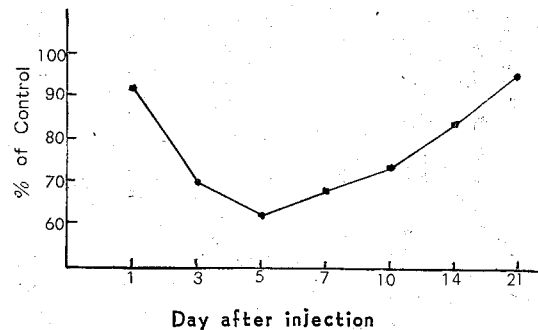


Fig. 2. Percent Change in Liver Weight of Rats following an Injection of 5-Fluorouracil (50mg/kg)

71.9%, 第7日에는 76.4%, 第10日에는 80.9%, 第14日에는 85.5%, 第21日에는 92.4%이었다. 注射後 第1日에는 若干의 體重의 減少를 가져왔고, 時日의 經過에 따라 甚해져서 第5日에는 가장 낮은 數値를 보였고, 其以後부터는 回復되어 第21日에는 거의 對照群의 數値에 가까웠다.

2. 5-Fluorouracil에 依한 肝臟重量의 變動: 第2表 및 第2圖에서 보는바와 같이 注射後 第1日에는 5.3g, 第3日에는 4.1g, 第5日에는 3.6g, 第7日에는 4.0g, 第10日에는 4.3g, 第14日에는 4.9g, 第21日에는 5.6g이었다. 對照群에 對한 百分比는 第1日에는 91.4%, 第3日에는 70.7%, 第5日에는 62.1%, 第7日에는 69.0%, 第10日에는 74.1%, 第14日에는 84.5%, 第21日에는 96.6%이었다. 以上の 結果를 보면 體重에서와 같이 5日에 가장 낮은 數値를 보였고, 其以後에는 回復

Table 3. Incorporation of Leucine-³H by Liver Cell in Rats Receiving 5-Fluorouracil(50mg/kg)

Day	Experiment		Control		% of Control	Probability
	Mean Grain No.	S. D.	Mean Grain No.	S. D.		
1	24.1	2.3	26.6	1.7	92.3	<0.05
3	20.3	1.7	25.3	2.0	77.8	<0.007
5	15.1	1.2	27.0	1.4	57.9	<0.001
7	11.8	0.8	26.1	1.5	45.2	<0.001
10	14.9	1.0	25.9	2.1	57.1	<0.001
14	21.7	1.3	26.7	1.3	83.1	<0.005
21	24.9	1.4	25.0	1.1	95.4	>0.07

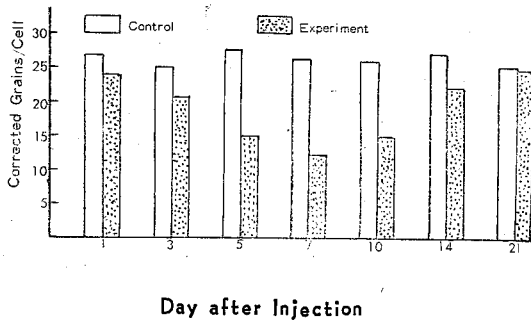


Fig. 3. Quantitative Radioautography of the Effects of 5-Fluorouracil on the Liver cell of the Rat

되어, 第21日에는 거의 對照群에 가까운 數値를 보였다

3. 5-Fluorouracil이 肝臟細胞의 蛋白合成에 미치는 影響: 5-Fluorouracil이 肝臟細胞의 蛋白合成에 미치는 影響은 第3表 및 第3,4圖에서 보는바와 같은 實驗群은 注射後 1日에는 銀粒子의 平均値가 24.1이고, 第3日에는 20.3, 第5日에는 15.1, 第7日에는 11.8, 第10日에는 14.9, 第14日에는 21.7, 第21日에는 24.9이었다. 對照群은 有意할만한 變化가 없었다. 實驗群 對 對照群의 百分率은 實驗群은 注射後 第1日에는 對照群보다 7.7%(92.3%) 減少되고, 第3日에는 22.2%(77.8%), 第5日에는 42.1%(57.9%), 第7日에는 54.8%(45.2%), 第10日에는 42.9%(57.1%), 第14日에는 16.9%(83.1%), 第21日에는 4.6%(95.4%)씩 各各 減少하였다. 注射後 第1日에는 有意할만한 變化가 없었고, 第3日부터 뚜렷한 減少를 보이기 始作하여 第7日이 가장 낮은 數値를 보였고, 其以後는 回復되어 第21日에는 거의 對照群

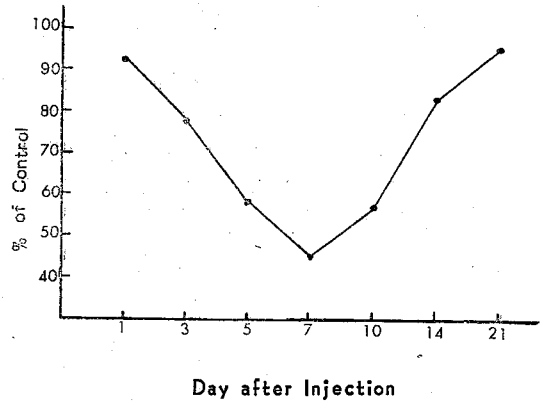


Fig. 4. Percent Change in Protein Synthesis in Rats after 5-Fluorouracil (50mg/kg)

의 數値에 가까웠다.

IV. 總括 및 考察

5-Fluorouracil은 抗生劑中에서도 抗癌劑의 하나로서 蛋白과 核酸의 合成을 抑制하는 Nucleotide Analogue 이다. 이러한 作用機轉을 究明하려고, 그동안 5-Fluorouracil에 依한 蛋白合成에 關하여 많은 研究가 行하여졌는데, 特히 消化腺細胞의 蛋白合成抑制, 癌患者의 治療 및 副作用의 解消等の 報告는 많으나 肝臟에 關한 研究는 찾아 본 範圍內에서는 적었다. 現在 알려진 癌에 對한 治療法으로는 外科的 治療, 放射線療法, 化學療法, 內分泌治療 및 免疫療法이 있는데 5-Fluorouracil은 化學療法에 該當되며, 그동안 여러 方面에 많이 應用되어온 抗癌劑의 하나이다. 本實驗의 成績을 總括하여 보면, 5-Fluorouracil에 依한 體重의 變動은 注

射後 第1일부터 體重의 減少를 보이고, 第5일이 가장 낮은 數値를 보이고, 其以後부터는 漸次回復되어 第21日에는 거의 對照群의 數値에 이르렀다. 또 5-Fluorouracil에 의한 肝臟重量의 變動도 注射後 第1일부터 減少를 보이고, 第5일이 가장 낮은 數値를 보이고, 其以後부터는 回復되어 第21日에는 對照群에 가까운 數値를 보이었다. 5-Fluorouracil이 肝臟細胞의 蛋白合成에 미치는 影響은 注射後 第1日에는 有意할만한 變化가 없었고 第3일부터 減少하기 始作하여 第7일이 가장 낮은 數値를 보였고, 其以後부터는 回復되어 第21日에는 對照群에 가까운 數値를 나타냈다. 本實驗과 關係가 되는 先人の 業績을 考察하면 Martin 外 2人(1968)¹⁴⁾은 5-Fluorouracil이 白鼠肝臟에 어떠한 影響을 미치는가를 光學顯微鏡 및 電子顯微鏡으로 調査하였는데, 肝臟이 長大하여지고 監基性染色度가 減少되고, 分泌顆粒이 蓄積되고, 粗面小胞體에 變化가 있음을 指摘하였고, 特히 小胞體의 變化는 蛋白合成에 影響을 미치는 要因이 된다고 하였고, Levin (1968)¹⁵⁾은 5-Fluorouracil이 小腸에 미치는 機能的 變化를 調査하였는데, Crypt Mitosis의 抑制로 因하여 細胞의 數가 減少되고, 腸의 機能이 低下된다고 하였다. Kuehl(1969)¹³⁾은 代謝拮抗劑가 白鼠肝臟의 Nuclear Protein Synthesis에 影響을 준다고 하였고, Stenram(1966)¹⁹⁾은 5-Fluorouracil은 肝臟細胞의 RNA Labeling의 減少를 가져 온다고 하였고, Kim과 Han(1972)¹²⁾은 5-Fluorouracil에 의하여 肝臟 및 三大口腔腺의 重量은 注射後 第5일까지는 增加하다가 其以後부터는 減少하고, 體重은 이와 反對로 第5일까지 減少하다가 其以後부터는 增加한다고 하였다. 以上 先人の 業績을 綜合하여 보면, 5-Fluorouracil은 正常 RNA 및 DNA의 合成을 障礙하여 蛋白合成에 影響을 주는것 같다.

V. 結 論

體重 150g 内外의 雄性白鼠(Rat) 42頭를 使用하였고 實驗群과 對照群으로 區分하고, 實驗群은 5-Fluorouracil을 體重 kg當 50mg을 筋肉內注射하였고, 注射後 24時間이 經過한 날을 第1日로 하여 第1日, 3日, 5日, 7日, 10日, 14日 및 21日에마다 動物을 犧牲시켰고, 犧牲 30分前에 Leucine-³H(Specific Activity 250mc/mM)을 體重 g當 3 μ c를 腹腔內注射하였고, 體重을 測定後 動物을 犧牲시켰다. 2% Paraformaldehyde-Glutaraldehyde(24.5%) EM in Phosphate Buffer에 3時間 固定하고, 組織標本製作은 電子顯微鏡標本製作法에 依하였고, 유리칼은 LKB 7800 B Knife Maker로 만들

었고, Sorvall Porter Blum MT-1 Ultramicrotome을 使用하여 유리칼로 1 μ 의 組織切片을 만들었다. 自己放射法은 通法에 依하였고, Toluidine Blue O로 染色하였다. 本實驗은 Leucine-³H에 依한 5-Fluorouracil이 白鼠肝臟細胞의 蛋白合成에 어떠한 影響을 미치는가를 調査한 것으로 其 結果는 다음과 같다.

1. 5-Fluorouracil이 體重에 미치는 影響은 注射後 第1일부터 體重減少를 보이고, 第5일이 가장 낮은 數値를 보였으며, 其以後부터는 回復되어 第21日에는 거의 對照群의 數値에 가까웠다.

2. 5-Fluorouracil이 肝臟重量에 미치는 影響은 注射後 第1일부터 重量의 減少를 가져오고, 第5일이 가장 낮은 數値를 보이고, 其以後부터는 回復되어 實驗最終日인 第21日에는 거의 對照群의 數値에 이르렀다.

3. 5-Fluorouracil이 肝臟細胞의 蛋白合成에 미치는 影響은 注射後 곧 蛋白合成의 抑制를 보이고, 第7일이 가장 甚하고, 其以後부터는 回復되어 第21日에는 거의 正常值에 到達하였다.

4. 本實驗을 통하여 5-Fluorouracil은 白鼠肝臟細胞의 蛋白合成을 抑制함을 알수 있었고, 將次 肝臟癌의 治療에 應用할 경우에 參考點이 될 것이 아닌가 한다.

References

- 1) Ahman, D.L., Bisel, H.F. and Hahn, R.G.: An Evaluation of 5-Fluorouracil in the Treatment of Advanced Breast Cancer. Mayo Clin. Proc. 42:193-199, 1967.
- 2) Ansfield, F.J., Schroeder, J.M. & Curreri, J.M.: Five Years Clinical Experience with 5-Fluorouracil. J.A.M.A. 181:295-299, 1962.
- 3) Baserga, R. and Malamud, D.: Autoradiography Techniques and Application. Harper & Row Publishers, 1969.
- 4) Bloom, W. and Fawcett, D.W.: A Textbook of Histology. 9th Edit. :582-604, Saunders, 1968.
- 5) Brennan, M.T. & Vaitkevicius, V.K.: 5-Fluorouracil in Clinical Cancer. Chemother. Rep. 6:8-11, 1960.
- 6) Cornell, G.N., Cahow, C.E. & Frey, C.: Clinical Experience with 5-Fluorouracil in Treatment of Malignant Disease. Cancer Chemother. Rep. 9:23-30, 1960.
- 7) Ferguson, D. and Humphrey, E.: Preliminary

- Clinical Notes of 5-Fluorouracil. Cancer Chemother. Rep. 8:153—154, 1960.
- 8) Gold, G.L., Hall, T.C., Schnider, B.I. et al: Clinical Study of 5-Fluorouracil. Cancer Res. 19:939, 1959.
 - 9) Greenwald, E.S.: Cancer Chemotherapy. 2nd Edit.: 198—212, Medical Examination Publishing Co. Inc., 1973.
 - 10) Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Dannenberg D., Mooren, D. et al: Fluorinated Pyrimidines. New Class of Tumor-Inhibitory Compound. Nature 179:663—666, 1957.
 - 11) Kennedy, B.J. & Theologides, A.: The Role of 5-Fluorouracil in Malignant Disease. Ann. Intern. Med. 55:719~730, 1961.
 - 12) Kim, M.K. and Han, S.S.: Effects of 5-Fluorouracil on Exocrine Glands. I. Gland Weights in Mice Receiving Synthetic Polynucleotides. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 139:1246—1251, 1972.
 - 13) Kuehl, L.: Effect of Various Inhibitors on Nuclear Protein Synthesis in Rat Liver. J. Cell Biol. 41:660~668, 1969.
 - 14) Leeson, T.S. and Leeson, C.R.: Histology. 2nd Edit.: 319—334, Saunders, 1970.
 - 15) Levin, R.J.: Anatomical and Functional Changes of the Small Intestine Induced by 5-Fluorouracil. J. Physiol. Lond. 197:73—74, 1968.
 - 16) Martin B.F., Levin, R.J. & Kugler, J.H.: A Light and Electron Microscope Study of the Exocrine Pancreas Following Administration of 5-Fluorouracil. J. Anat. 104:93—107, 1969.
 - 17) Nadler, S.H. and Moore, G.E.: A Clinical Study of 5-Fluorouracil. Surg. Gynec. Obstet. 127:121, 1968.
 - 18) Reeves, W.J. & Cailleu, R.: Mechanism of Growth Inhibition by 5-Fluorouracil. Reversal Studies with Pyrimidine Metabolites in Vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131:1068—1072, 1969.
 - 19) Stenram, U.: Cytological, Radioautographic and Ultrastructural Studies on the Effect of 5-Fluorouracil on Rat Liver. 2. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 71:207~216, 1966.
 - 20) Zubrod, C.G.: Effects of 5-Fluorouracil and 5-Fluorodeoxyuridine on Gastrointestinal Cancer. J. A. M. A. 178:832—834, 1961.

— EXPLANATION OF FIGURES —

Fig. 1. Autoradiograph of liver cell of the control rat sacrificed at 7 days. Notice the heavy labeling of liver cell. ($\times 450$)

Fig. 2. Experimental animal sacrificed at 7 days. Notice the few grains compared to control rat sacrificed at 7 days. ($\times 450$)

Fig. 3. Radioautograph of liver cell at 21 days after 5-fluorouracil. Notice the distinct increase in the amount of labeling of liver cell. ($\times 450$)

写真附图

