

Diethylnitrosamine(DENA)에 의한 흰쥐 간세포의 변화

이혜영 · 류재혁 · 지관자

인하대학교 이과대학 생물학과

화학적 암 유발물인 diethylnitrosamine(DENA) 투여로 야기되는 흰쥐(Sprague Dawley) 간세포의 변화 양상을 전자현미경과 silver 염색방법으로 관찰하였다. DENA는 간세포내의 핵, 미토콘드리아, 담즙관에 뚜렷한 형태적 변화를 일으켰으며 인(nucleolus)의 크기와 수도 증가하였다. 또한 정상세포보다 인(nucleolus) 부위의 염색 정도도 강하였는데 이것은 silver granule 이 서로 연결되어 망상구조를 형성하기 때문인 것으로 생각되며 이들 망상구조는 순수한 rDNA 부분과 핵내 단백질이 인내에서 서로 엉키어 나타나는 현상일 것으로 사료된다. 또한 DENA 투여 결과 나타난 인의 크기와 인부위의 수적 증가현상의 결과로 rRNA 합성율의 변화를 유추할 수 있었다.

KEY WORDS: Rat liver, Diethylnitrosamine, Nucleolus, Ultrastructure

암의 발생에는 여러가지 원인이 있으나 약 80% 정도가 화학적 유발물질에 의한 환경적 요인에 기인된다고 추정하고 있으며(Miller, 1970) 최근 환경오염으로 인한 화학물질에의 노출 기회가 증가되면서 이들 화학적 요인에 의하여 발생된 암에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Miller and Miller, 1981; Needle, 1981; Custer and Sorof, 1984). 특히 MNNG, AAF azo dye 등에 의한 암세포의 연구가 광범위하게 수행되었으며(Fink *et al.*, 1970; Lin *et al.*, 1977) 이들 물질이 DNA와 공유결합함으로써, 암으로 이행되는 기작이 시작되는(initiation 과정) 것으로 생각되고 있다(Eadie *et al.*, 1984). 그러나 화학적 유발물질의 투여로 변화되는 조직학적 양상은 투여된 물질의 종류나 투여량, 또는 실험동물에 따라 차이가 있으며(Daoust and Calamai, 1971) 같은 조직내에서도 유전학적 차이를 나타냄으로써(Esumi *et al.*, 1986) 그 변화가 매우 복잡하여 정확한 유전학적 특성을 구명하기 어려우며 암세포로 변화하는 기작을 밝히기도 쉽지 않다. 또한 완전한 암세포의 생성은 initiation 과정과 함께 계속적인 promotion 과정이 수행되어야만 한다(Foulds, 1954). 이러한 과정으로 완전히 transformation된 세포는 특정 유전인자의 변화를 초래하여 정상적인 유전자의 조절능력이 소실되어 세포의 성장속도가 조

절되지 못하거나 특정 단백질의 과잉 생산을 유발시키는 등의 여러가지 특성을 변화시킨다(Daoust, 1979; Peters and Berger, 1972; Kirsch-Volders *et al.*, 1985). 본 실험은 단일 투여로서 흰쥐의 간암을 유발시킨다고 알려진 diethylnitrosamin(DENA)을 일정기간 투여하여 흰쥐의 간세포를 변화시킴으로써 간세포의 transformation 과정을 밝히는 일련의 과정으로 우선 변화된 간세포의 미세구조를 관찰하였고 RNA 전구물질을 생성함으로써 유전학적으로 매우 중요한 부위로 인식되는 핵내 인부위의 구조를 정상체와 비교하여 조직내의 가능한 변화 기작을 논하였다.

재료 및 방법

생후 1-2개월된 체중 100-150 g의 흰쥐(Sprague Dawley계)의 수컷을 표준사료로 사육하였다. Diethylnitrosamine은 0.01%의 농도로 6주 동안 투여하였으며(drinking water) 대조군은 같은 기간 동안 0.89% 생리식염수를 주었다. 실험군의 흰쥐를 경추 파괴로 도살한 후 해부하여 간조직의 가장자리를 적출하여 실험에 사용하였다.

전자현미경의 관찰을 위한 시료제작은 Ringer 용액(pH 7.3)내에서 간조직을 적출하여 4°C의 2% paraform-glutaraldehyde(0.1 M phosphate buffer, pH 7.3)로 1시간씩 3회 반복하여 세척하고 동일 완충용액내의 1% osmium tetroxide로 후 고정하였다. 고정된 조직은 증류수로 1시간씩 3회 세척하여 ethyl alcohol로 일련의 과정을 거쳐 탈수하였다. 완전히 탈수하여 propylene oxide로 치환시킨 후 Epon 812 혼합액으로 포매하여 재료를 경화시켰다. 초박편 절단기(Ultratom V, LKB)를 사용하여 제작된 초박편은 uracyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 전자현미경(JEOL 100, CX II)으로 검경, 촬영하였다. Silver 염색을 위하여 배어번 간조직은 적출과 동시에 저장액(0.075 M KCl)에 넣고 잘게 자른 후 37°C에 20분간 방치한 후 Carnoy 용액에서 3회 고정하고 미리 세척한 slide로 표본을 제작하였다. 완전히 건조된 표본은 Howell과 Black(1980) 방법으로 silver 염색하였다.

결 과

간세포의 미세구조

흰쥐의 간세포는 DENA의 투여로 인하여 핵막, 미토콘드리아 및 담즙소관의 변화가 나타남을 확인하였다. 정상적인 세포내의 핵은 구형이었으며 핵내부에 고루 분포된 진정염색질과 가장 자리에 분포하는 이질염색질을 관찰할 수 있었다. 소포체는 핵을 중심으로 발달되어 있었으며 미토콘드리아는 타원형 혹은 긴 간상으로 발달하여 내막(cristae)의 형태가 명확히 관찰되었다(Fig. 1A). 그러나 DENA를 투여한 간세포는 핵막의 형태가 굴곡을 이룬 불규칙적인 거치형으로 변화되었으며(Fig. 1B) 핵막의 인접부위에 존재하는 이질염색질이 정상세포보다 다소 증가되었고 그 내부에 흰 반점이 나타났다. 소포체는 미토콘드리아를 중심으로 분포하고 있었으나 정상적인 세포와 비교하였을 때 분획이 빈약한 형태로 관찰되었다. 미토콘드리아는 응축된 구형을 이루고 있고 미토콘드리아 내막의 cristae도 퇴행되어 명확히 관찰되지 않았다. 또한 세포질내에 많이

산재되어 있던 glycogen particle들의 감소가 관찰되었다. 그외의 현상으로는 세포와 세포 사이에 위치하는 담즙소관(bile canaliculus)의 확장과 담즙소관 내면으로 분화된 미세융모(microvilli)의 감소가 관찰되었다. DENA가 투여된 간세포의 세포질에서는 미토콘드리아와 유사한 크기의 이중막 구조의 함유물이 관찰되었는데 이것은 형태적으로 보아 미토콘드리아가 퇴행되어 나타나는 것으로 추측된다(Fig. 1B).

Ag-NORs 관찰

Ag-NORs 부위는 핵 내에서만 관찰되었으며 불규칙적으로 산재되어 나타났다. 핵 내 silver granule들은 크기와 수에서 차이를 나타내어 정상인 세포 내에서는 주로 2-4개의 silver granule cluster를 이루는 인부위를 가지며 DENA를 투여한 세포에서는 6-12개로 증가하였다(Fig. 2). DENA가 투여된 세포 내에서도 2-3개 정도의 인부위가 나타나는 경우도 있었으나(1-2/100 cells) 드문 현상이었으며 이런 경우는 인의 크기와 염색정도가 작고 커서 뚜렷이 구별되었다(Fig. 3). 정상 세포내의 인의 크기는 0.1 μm 이었고 이것은 각기 서로 떨어져 있는 점(dot)의 형태로 존재하는 silver granule이 2-6개씩 모여서 하나의 인(nucleolus) 부위를 형성하고 있으며 DENA가 투여된 경우는 인부위의 크기가 0.4 μm 였으며 이 인부위내에는 14-22개의 silver granule이 망상조직과 같은 형태로 서로 엉키어 있는 상태로 관찰되었다(Fig. 4). 두 세포에서 관찰된 인의 수와 인내의 silver granule 수는 Table 1에서 비교하였다.

고 찰

DENA에 의한 hepatocarcinoma의 유발은 8주(Grundmann and Sieburg, 1962) 또는 10주로 알려졌으나(Fontaniere and Daoust, 1973) 미세한 조직이나 효소의 변화는 4주 정도의 투여로도 가능하다고 알려졌다(Daoust, 1972). 본 연구에서는 DENA 투여 1주 경과 후 흰쥐는 황달 등 외견상의 변화를 나타내기 시작하였으며 6주 후 해부

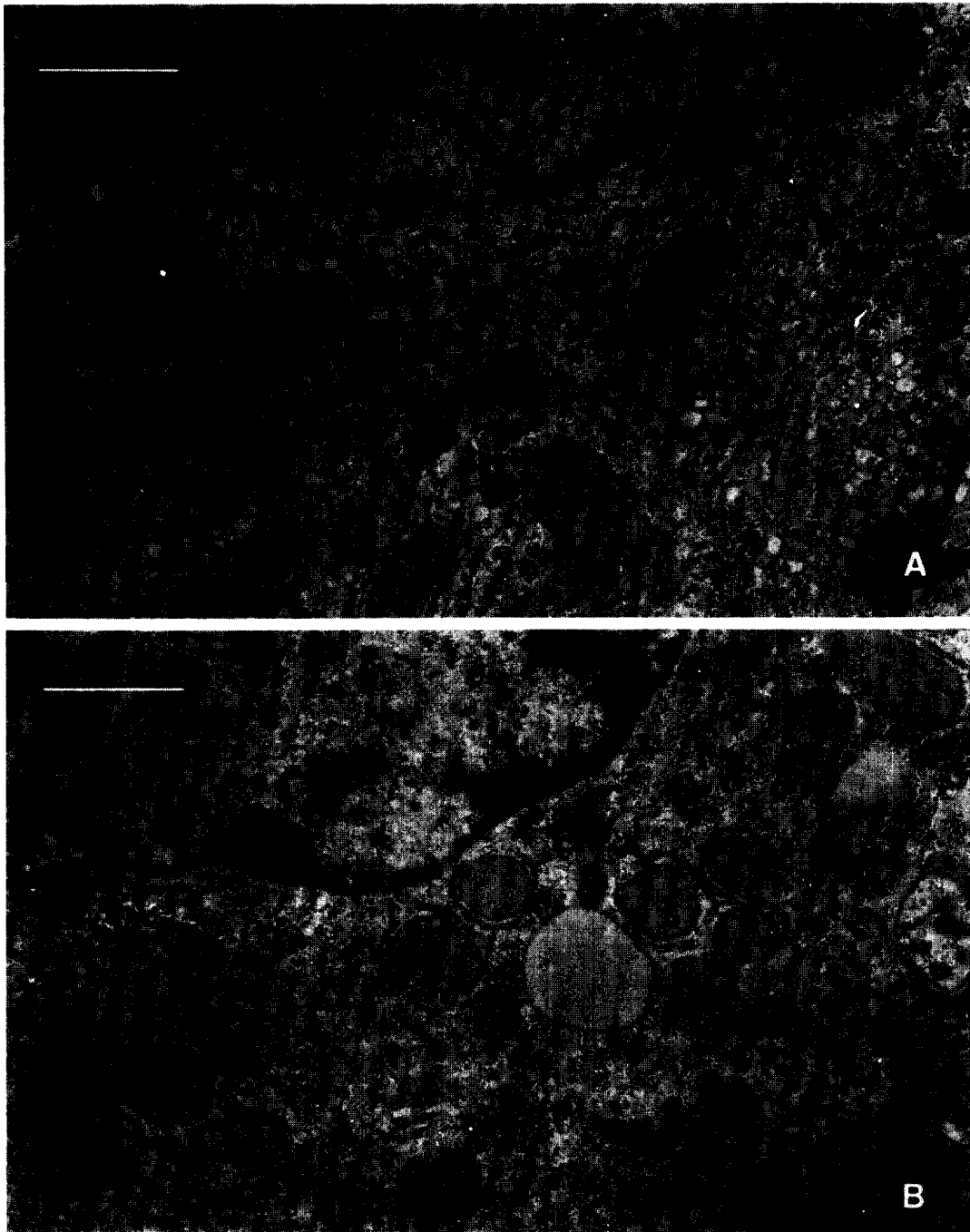


Fig. 1. Electron micrograph of rat liver cells. A: Normal cell with round nucleus (Nu), mitochondria of rod shape (Mi) and abundant endoplasmic reticulum (ER). B: DENA-treated cell with reduced endoplasmic reticulum (ER), round shape mitochondria, irregular contour nucleus, and double membrane-bound clear circle was observed (large arrows).

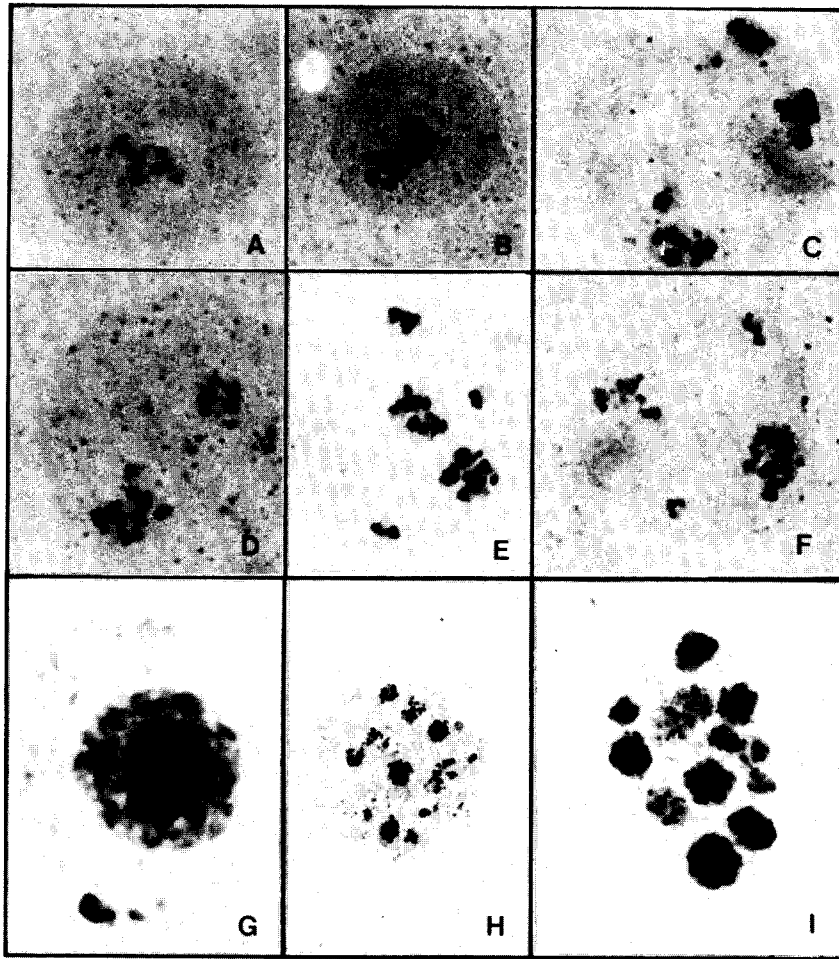


Fig. 2. The silver-stained granules in nucleolus of normal cells (A-F) and DENA-treated cells (G-I). ($\times 1000$).

하여 전체 간조직의 증식, 외형상의 변화와 가장 자리의 침윤을 관찰하였다. 전자현미경으로 관찰된 핵막의 변화, 미토콘드리아 응축 및 glycogen 감소는 일반적인 간암의 양상과 유사하였으나 (Lapis and Schuler, 1971; Williams, 1980) 세포 질내에 존재하는 미토콘드리아와 유사한 크기의 이중막 구조물은 매우 특이한 현상으로 관찰되었다. 이것은 비정상적인 미토콘드리아가 퇴행되는 과정에 나타난 현상일 것으로 생각되었으나 정확한 설명에는 조직화학적 방법 등의 상세한 관찰이 요구된다. 이들 구조물에 대해서는 Farhi 등 (1982)에 의해 섬유성 간암에서 보고된 경우가 있으나 섬유성 간암의 경우, 미토콘드리아 수가 증

가되어 있어 본 결과와는 연관시킬 수 없었다. 한편 특정 조직이 암상태로 변화하는 일차적 기작은 initiation 과정으로 투여된 물질과 DNA와의 결합이며 이후 지속적인 promotion 과정이 세포막에 의하여 중재되어야 하는데 (Foulds, 1954) DENA 투여로 변화된 핵막은 이들 조직이 promotion 과정임을 나타낸다. 또한 핵내부 가장자리에 위치하는 이질염색질 사이에서 흰부분을 관찰할 수 있는데 이것의 기능이나 역할은 알 수 없으나 핵내의 이질염색질이 서로 합쳐져 cluster를 이루는 과정에서 나타나는 간극일 것으로 사료된다.

유전자의 amplification에 대한 연구로는 인형성부위(NORs)에 관한 연구가 활발하게 이루어지

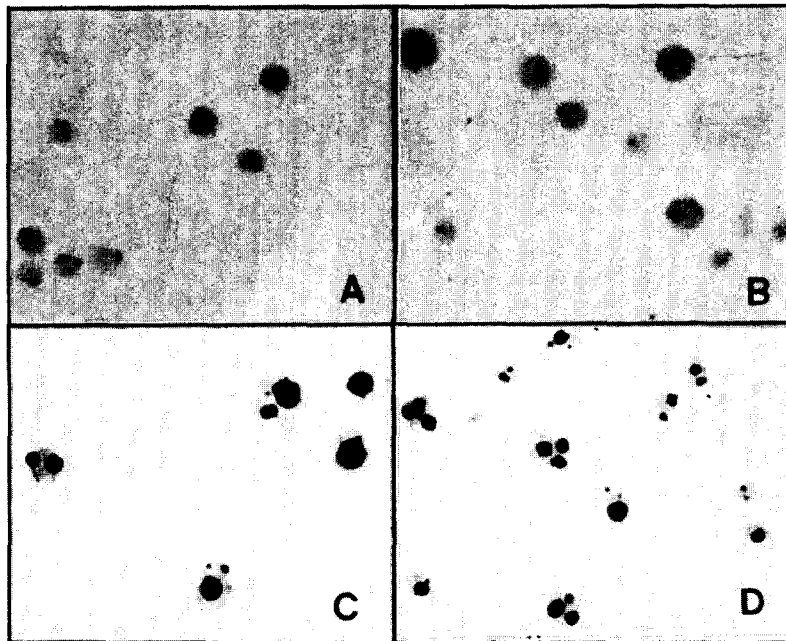


Fig. 3. The intensity and size of nucleoli were different in normal cells (A-B) and DENA-treated cells (C-D). ($\times 1000$).

Table 1. The number of silver granules in nucleolus and nucleoli in the cell.

Cells	No. of nucleolus /Nucleus	No. of silver granules /Nucleolus	No. of cell examined
Normal	2.9 \pm 0.6	4.2 \pm 1.4	100
DENA treated	9.3 \pm 1.7	19.3 \pm 1.2	100

고 있으며(Howell, 1977) 정상 간세포, Novikoff 간암, Hella cell에서 비교된 인부위는 그 크기나 수에서 차이를 나타내고 있다(Bush et al., 1979). 본 실험에서 나타난 인의 수(Ag-NORs 부위)와 silver granule의 수는 Novikoff 간암에서 보다 많았으며 인부위의 크기나 염색정도도 다소 다르다. 인(nucleolus)의 수의 증가는 rDNA 유전자군의 부가로서 설명할 수 있을 뿐 아니라 전체 rDNA의 양과 rDNA를 포함하는 유전자수 등의 변화에 기인될 수 있을 것이다. 특히 Novikoff hepatoma에서 관찰된 인부위는 rDNA의 NTS (nontranscribed spacer) 부위의 amplification임이 밝혀진 바 있으나(Parker et al., 1985) 본 연구

에서는 직접적인 유전자의 전사정도를 설명할 수는 없었으며 다만 인부위의 증가현상의 결과로서 rDNA 유전자의 합성을 증가를 추론할 수 있었다. Ag-NORs 염색에서는 rDNA 자체가 염색되는 것이 아니라 이와 연관된 산성 단백질인 B23, C23, Ag-NORs 단백질이 염색되는 것이다(Hubbell, 1985). 따라서 정상 세포보다 DENA 투여 세포가 염색정도가 강한 것은 silver granule이 망상구조로 연결되어 함께 염색되어 nucleonema 형태로 나타나기 때문이며 이들 망상구조는 순수한 rDNA만의 반응이 아니라 핵내 단백질이 인내에서 서로 엉키어 형성된 것으로 사료된다.

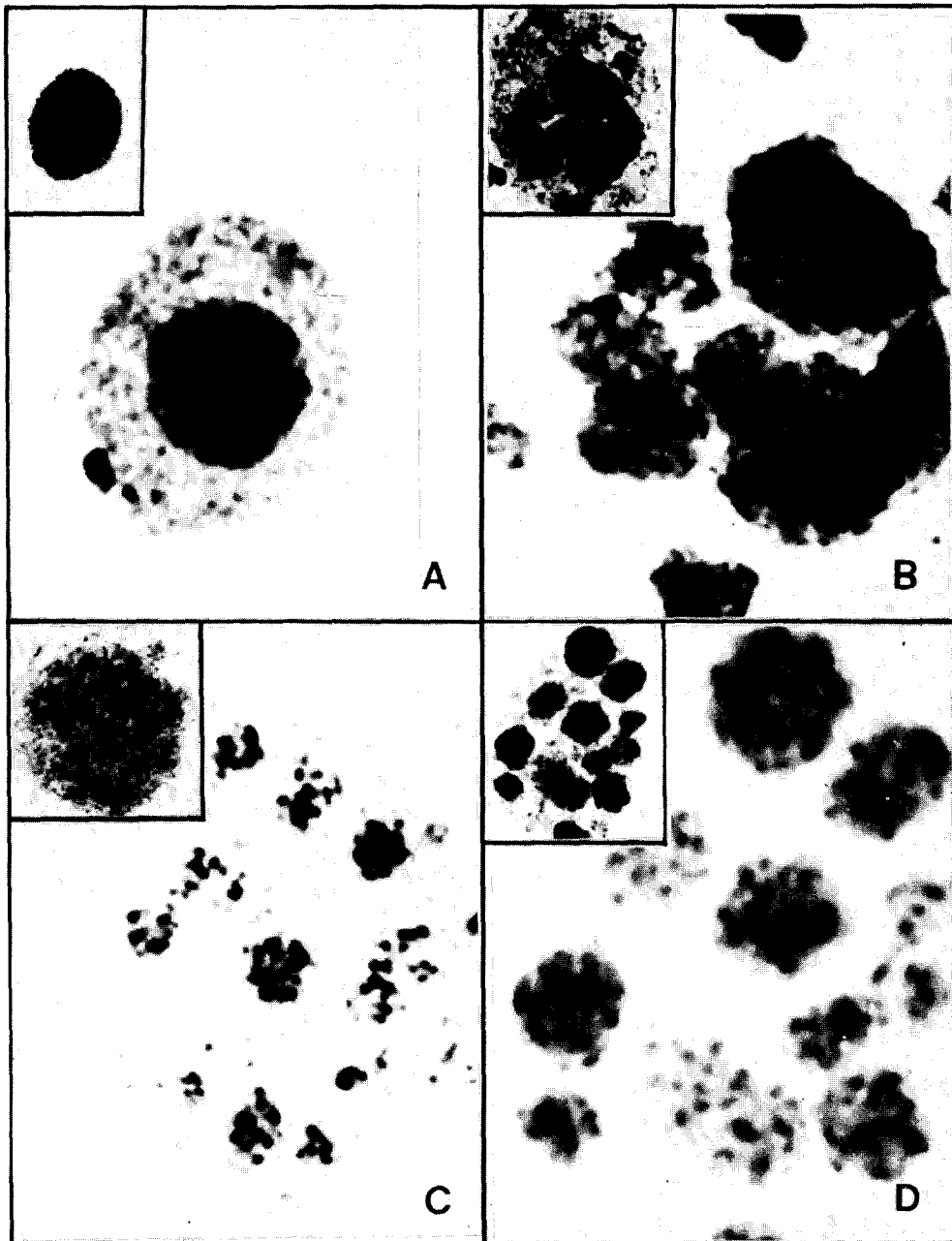


Fig. 4. Different mode of nucleoli in the DENA-treated cells. Silver granules were connected with one or several cluster. ($\times 1000$).

인용문헌

- Busch, H., Y. Daskal, F. Gyorkey, and K. Smetana, 1979. Silver staining of nucleolar granules in tumor cells. *Cancer Res.* **39**: 857-863.
- Custer, R. P. and S. Sorof, 1984. Target polypeptide of a carcinogen is associated with normal mitosis and carcinogen-induced hyperplasias in adult hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 6738-6742.
- Daoust, R., 1979. Histochemical comparison of focal losses of RNase and ATPase activities in preneoplastic rat liver. *J. Histochem. Cytochem.* **27**: 663-656.
- Daoust, R. and R. Calamai, 1971. Hyperbasophilic foci as sites of neoplastic transformation in hepatic parenchyma. *Cancer Res.* **31**: 1290-1296.
- Eadie, J. S., M. Conrad, D. Toorchen, and M. D. Topal, 1984. Mechanism of mutagenesis by O⁶-methylguanine. *Nature* **308**: 1-203.
- Esumi, M., T. Aristaka, M. Arai, K. Suzuki, K. Tanikawa, H. Mizuno, T. Mima, and T. Sikata, 1986. Clonal origin of human hepatoma determined by integration of hepatitis B virus DNA. *Cancer Res.* **46**: 5767-5771.
- Farhi, D. C., R. H. Shikes, and S. G. Silvergery, 1982. Ultra structure of fibrolamella oncocyctic hepatoma. *Cancer* **50**: 702-709.
- Fink, L. M., S. Nishimura, and I. B. Weinstein, 1970. Modifications of ribonucleic acid by chemical carcinogens. *Biochemistry* **9**: 496-503.
- Foulds, L., 1954. The experimental study of tumor progression. *Cancer Res.* **14**: 327-328.
- Fontaniere, B. and R. Daoust, 1973. Histochemical studies on nuclease activity and neoplastic transformation in rat liver during diethylnitrosamine carcinogenesis. *Cancer Res.* **33**: 3108-3111.
- Grundmann, E. and H. Sieburg, 1962. Die histogenese und cytogenese des lebercarcinoms der ratte durch diethylnitrosamin im lictmikroskopischen bild. *Beitr. Pathol. Anat. Pathol.* **126**: 57-90.
- Howell, M. W., 1977. Visualization of the ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma* **62**: 361-368.
- Howell, W. M. and D. A. Black, 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. *Experientia* **36**: 1014-1015.
- Hubbell, H. R., 1985. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technol.* **60**: 285-294.
- Kirsch-Volder, M., A. Deleener, M. Lans, and J. de Gerlache, 1985. Increased silver stainable of metaphase chromosomes from rat hepatocytes during *in vivo* hepatocarcinogenesis. *Experientia* **41**: 1182-1183.
- Lapis, K. and D. Schuler, 1971. Effect of tetra-O-methylsulpho-d-manitol (R-52) on the ultra structure of lymphoid cells in tissue culture. *Haematologia* **5**: 5-23.
- Lin, J. K., J. A. Miller, and E. C. Miller, 1977. 2,3-Dihydro-2-3hydroxyafatoxin B₁, a major acid hydrolysis product of aflatoxin B₁-DNA or -rDNA adducts formed in hepatic microsome-mediated reactions and in rat liver *in vivo*. *Cancer Res.* **37**: 4430-4436.
- Miller, J. A., 1970. Carcinogenesis by chemicals; An overview. *Cancer Res.* **30**: 559-576.
- Miller, E. C. and J. A. Miller, 1981. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer* **47**: 2327-2332.
- Needle, S., 1981. New twists to DNA and DNA-carcinogen interaction. *Nature* **292**: 292-293.
- Parker, D. L., D. L. Mroczka, and L. I. Rothblum, 1985. Amplified DNA of the Novikoff Hepatoma Nucleolus is arranged in a 7.3-kilobase tandem repeat. *Biochemistry* **24**: 4229-4233.
- Peters, J. and A. Berger, 1972. The effect of inorganic arsenic on DNA-synthesis of human lymphocytes *in vitro*. *Arch. Dermatol. Forsch.* **243**: 343-352.
- Williams, G. M., 1980. The pathogenesis of rat liver cancer by chemical carcinogens. *Biochim. Biophys. Acta.* **605**: 167-189.

(Accepted March 12, 1991)

The Characteristics of Rat Hepatocyte Treated with Diethylnitrosamine

Hei Yung Lee, Chai Hyeock Yu, and Kowan Ja Jee (Department of Biology, Inha University, Incheon 402-751, Korea)

Morphological change of rat hepatocytes treated with carcinogen diethylnitrosamine (DENA) was observed by electromicroscope and Ag-NORs staining for size of nucleolus. DENA induced change of nuclear shape, mitochondria and bile canaliculus in hepatocytes. The nucleolus was enlarged and markedly increased the number of Ag-NORs granules which suggested that the rate of rRNA synthesis was increased by DENA. Also the high intensity of nucleolus was caused by the silver granules in the nucleolus connected with reticulum like structure which may be related to nucleolar protein.