

랫드의 간발암화과정에서 분리한 간세포의 ploidy 분포변화에 관한 연구

최 경 철·이 영 순
서울대학교 수의과대학 공중보건학교실
(1992년 11월 10일 접수)

Studies on the ploidy distributions of the hepatocytes isolated in hepatocarcinogenesis of rats

Kyung-chul Choi, Yong-soon Lee
College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received Oct 10, 1992)

Abstract : This study was performed to compare DNA content by flow cytometer (FCM) and glutathione S-transferase placental form (GST-P) positive foci for searching objective and accurated properties of tumor.

Sprague-Dawley rats aged six weeks were divided into three groups and group 1 and 2 of rats were given an intraperitoneal injection of diethylnitrosamine at 200mg/kg body weight and group 3 of rats were given saline. Three weeks after beginning of the experiment, all groups were performed partial hepatectomy. Group 1 of rats were begun to feed on diets containing 0.02% 2-acetylaminofluorene as a promoter for six weeks, group 2 and 3 of rats were begun to feed on basal diets. At 4, 6, and 8 weeks after initiation, all groups of rats were killed, livers were extracted for H & E stain, immunohistochemical stain, and DNA ploidy analysis.

In quantitative analysis for GST-P positive lesion number and area by using Image Analyzer, group 1 and 2 represented significant difference in comparison with group 3. In ploidy distribution, diploid cells of group 1 and 2 were increased significantly in comparison with those of group 3 at 4, 6, and 8 weeks after initiation, respectively tetraploid cells were reduced. But S-phase cells were not changed significantly.

It is concluded that ploidy change by FCM is useful as objective data for early detection in hepatocarcinogenesis. Therefore, methodology and study of DNA content are carried out for more objective and accurate ploidy analysis in liver tumor.

Key words : flow cytometer, glutathione S-transferase placental form positive foci, DNA content, ploidy, diploid, tetraploid, S-phase, hepatocarcinogenesis.

서 론

암은 현대의학의 난치병종의 하나로서 오랫동안 암의 원인이 밝혀지지 않았으나 최근들어 세포를 분자수준에

서 해명할 수 있는 생명공학의 발달로 점차 그 원인이 규명되어 가고 있다. 그러나 아직 암의 생성기전이나 성장에 대한 의문이 많이 남아있어 이에 대한 다방면의 연구와 노력들이 현재에도 시도되고 있다.

암의 발생원인은 크게 유전적 요인과 환경적 요인으로 대별할 수 있는데 사람의 암발생원인중 80~90%가 환경적 요인에 의한 것으로 알려져 있다.^{4,20} 한편 과학이 발달함에 따라 사람이 살아가는 생활환경이 천연적으로 존재하지 않는 많은 합성화학물질들에 의해 오염되고 있다. 요즘음 의약품, 농약, 첨가물, 화학약품 및 산업폐기물 등 화학물질의 증가와 방사선, 바이러스 및 자외선에 의한 암발생, 곰팡이 독소^{2,7}, 식물성 독소²⁷, 스테로이드⁵ 및 담즙산^{5,51} 등의 발암성 또는 발암촉진작용이 보고되고 있다. 최근 산업의 발달과 식생활 양식의 변화로 이러한 물질에 노출될 수 있는 위험성이 날로 증가하는 가운데 각종 물질의 발암성을 빠르고 정확하게 검색할 필요성이 요구되고 있다.

사람에서의 발암은 직접적이든 간접적이든 화학물질에 의한 것이 대부분이다. 이러한 화학적 발암물질에 의한 암의 발생은 유발(initiation) 및 촉진(promotion)과정을 거쳐 이루어진다는 2단계 이론^{22,26,33,51}의 기초아래 종양으로의 진행과정(progression)을 거쳐서 암세포를 형성한다는 다단계 이론^{14,30,32}이 정립되고 이러한 이론에 기초를 두고 여러가지 생체내 발암성 검색법이 개발되었다.^{23,35,43,45,50} 이러한 방법들 중에서 Ito 등²²이 개발한 나고야대학법은 시험기간이 8주로서 짧고 장기생체시험에의 적응율이 높으며^{5,31}, 위양성이 없다는 점²³에서 화학물질의 발암성 유무를 검색하는데 매우 유용한 방법으로 인정되고 있다. 그러나 이러한 발암성 검색법을 확립하는데는 발암을 인정할 수 있는 지표(marker)가 중요하다.

랫드 간의 preneoplastic cell의 지표로서 Glutathione S-transferase placental form(GST-P)이 발견되었는데 이 GST-P와 기존의 간의 preneoplastic cell의 지표인 γ -glutamyltranspeptidase(γ -GTP)와 비교해보면 preneoplastic foci의 cytosol내에 있는 GST-P의 양은 plasma membrane에 국한되어 있는 γ -GTP의 양보다 수백배 많다. γ -GTP는 신장에 고농도로 분포하고 있으나 GST-P는 hyperplastic nodule이 있는 간이나 종양조직에 많고, γ -GTP는 여러가지 약제에 의해서 쉽게 유도되나 GST-P는 소수 화학물질에 의해서만 유도된다.

최근 세포주기에 대한 연구가 활발히 진행되면서 종양에서도 이러한 방법들을 이용해 이질적인 종양세포의 정량적인 분석을 함으로써 종양의 병리조직학적, 면역조직화학적 진단을 보완하게 되었다. 이러한 cell kinetic에 대한 연구를 가능하게 했던 요인은 단클론항체의 생산, 레이저와 컴퓨터의 발달, 특수염색법의 개발 등을 들 수 있는데 특히 flow cytometry(FCM)을 이용한 종양세포의 분석은 세포내 DNA량에 대한 측정과 단클

론항체를 이용한 세포표면 표현형(cell surface phenotype)의 평가로 크게 나눌 수 있다.

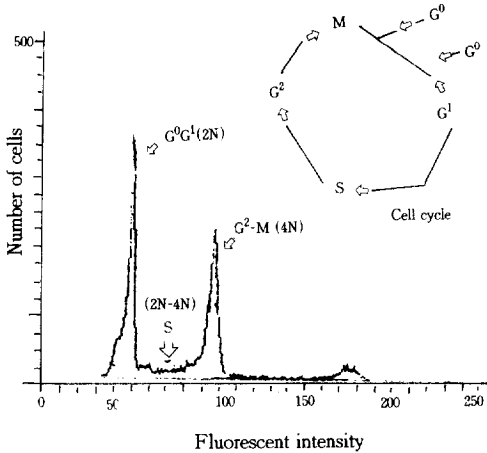
세포주기에 대한 내용을 간략히 기술하면 비활동성 혹은 휴지기 세포는 2배체에 해당하는 DNA량을 가지고 있으며 이 시기를 "G₀(gap 0)기"라고 한다. G₀기를 거친 세포는 "G₁(gap 1)기"를 거치는데 이때에 세포는 DNA합성을 준비하게 되며 그 다음시기인 "S(synthesis)기"를 지나면서 세포에서는 DNA합성이 일어난다. S기를 지난 세포는 다시 비활성인 시기를 거치는데 이 시기를 "G₂(gap 2)기"라고 한다. 이때에 염색체수는 G₀기의 2배인 4배체(tetraploid)에 해당한다. G₂기를 거친 세포는 "M(mitosis)기"를 지나는데 이 시기에 세포는 체세포 분열을 하여 완전히 2개의 자세포로 분리되며 분리된 자세포는 G₀기(휴지기) 상태로 들어가다가 아니면 G₁-S-G₂-M기로 다시 순환하게 된다(Text-fig 1)

정상 세포의 경우 DNA량은 정배수체성(euploid)이며 증식성 결절이나 종양같은 악성세포는 이배수체성(aneuploid)의 상태를 나타내게 되는데 암연구에 있어서 flow cytometry를 이용한 cell kinetic의 측정은 진단적 의미가 있다고 할 수 있다.³

이미 사람의 종양에 있어서 DNA 분석은 암진단에 있어서 보조적인 역할을 하고 있으며 분석할 수 있는 해당 장기는 간장, 뇌, 신장, 전립선, 난소, 직장 등으로 거의 전 장기가 다 가능하다고 볼 수 있다.^{9,14,15,18,25,47}

정상적인 성숙 랫드 간장의 경우 10% 내외의 diploid(2N), 70~80%의 tetraploid(4N)와 5~20%의 octaploid(8N) 세포들을 가지고 있으며 각 품종간의 차이도 나타날 수 있다.^{36,37} Schwarze 등⁴⁰은 diethylnitrosamine(DEN)과 2-acetylaminofluorene(2-AAF)를 투여한 랫드에서 diploid의 증가를 보고하였으며 Saeter 등^{40,41}도 전암병변(preneoplastic lesion)이나 악성간종양(hepatocellular carcinoma)에서도 이러한 diploidization은 계속 유지되며 유발후 아주 짧은 시간 즉, 4주나 6주에서도 diploid hepatocyte의 증가가 나타난다고 보고하였다. 그리고 2-AAF만을 투여한 랫드에서 γ -glutamyltranspeptidase 양성병소와 flow cytometry에 의한 ploidy를 조사한 결과 γ -GTP 양성 병소는 유의성있는 증가가 나타나지 않았으나 ploidy의 변화는 4주부터 나타나 diploid가 증가하고 tetraploid가 감소하는 경향을 나타낸다고 주장하였다.²⁴ 이러한 악성 간종양에서 나타나는 polyploidization에서 diploidization으로의 전환(shift)은 암의 일반적인 성장인듯 하다고 보고하였다.^{37,42}

종양의 검색에 있어서 이른 시기에 나타날 수 있는 가장 민감하고 정확한 지표를 찾는 것이 암의 진단이나 치료에 있어서 무엇보다도 중요한데 현재까지는 주로 조



Text-fig 1. Relationship between cell cycle and DNA histogram by flow cytometry.

직병리학적, 면역조직화학적 기법들이 전암병변을 검색하는데 이용되어 왔다. 그러나 최근에 도입된 FCM을 이용하면 종양세포의 객관적이고 정량적인 분석이 가능하여 종양세포에 대한 세포학적 성상을 알 수 있게 되었으며 암의 진단과 치료에 대한 예측을 보완할 수 있게 되었다.

따라서 본 실험은 가장 믿을 만한 증기발암성 검색법으로 인정되는 Ito 등²³이 주장한 증기발암성 모델을 이용하여 얻은 glutathione S-transferase placental form 양성 병소(GST-P positive lesions)에서 세포를 분리하고 이것을 FCM으로 분석함으로써 암의 일반적인 성상을 세포학적 수준에서 조사하여 암의 기전을 밝히는데 일부 도움을 주고자 함과 동시에 이러한 유전적 성상(genetic property)이 효과적으로 전암병소를 검색하는데 있어서 다른 지표들보다 더 유용한 방법인가를 알아보기 위해서 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 서울대학교 실험동물사육장에서 분양받은 4주령의 Sprague-Dawley(SD)계 수컷 랫드 80마리를 사용하였다. 2주일동안 실험실 환경에 적응시킨후 6주령에 실험을 시작하였다. 사육 및 실험기간동안 사육실 환경은 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $60 \pm 10\%$ 를 유지하였고 자연 채광하에서 랫드용 케이지(polycarbonate, $26 \times 42 \times 18\text{cm}$, 명진기계제작)에 3마리씩 넣어서 사육하였으며 실험동물용 사료(제일사료)와 식수는 충분히 급여하였다.

실험설계 및 시험물질 : 실험설계는 실험군인 1, 2군

에 각 30마리씩, 대조군인 3군에 20마리로 나누어 배치하였으며(Text-fig 2), 제 1, 2군은 시험개시일에 간암 유발물질(initiator)인 diethylnitrosamine(DEN, Sigma Co.)을 생리식염수에 용해시켜 체중 kg^{-1} 200mg씩 복강내로 투여하였으며 제3군은 생리식염수만을 복강내로 투여하였다.

제1군은 시험개시 2주부터 8주까지 6주동안 강력한 간암발생 촉진물질(promoter)인 2-acetylaminofluorene(2-AAF)이 0.02% 되도록 사료에 혼합하여 급여하였으며, 시험개시(DEN과 saline 투여) 3주후에 간변화의 증폭효과를 보기 위하여 모든 군에서 간의 좌우 중심엽 및 좌측외엽(약 2/3)을 잘라버리는 간부분 절제술(partial hepatectomy)을 실시하였다.¹⁹

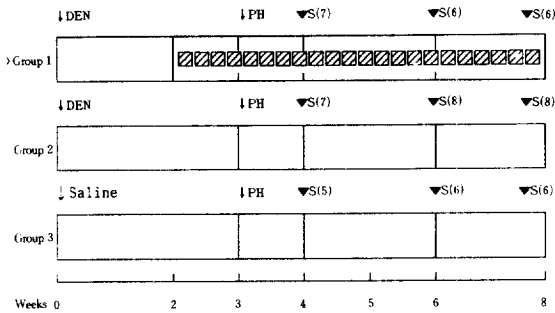
장기의 처리 : 시험종료 하루전에 모든 군의 동물을 절식시켰으며 체중을 측정후 부검하여 간을 적출하고 간의 무게를 측정하여 체중에 대한 간의 무게비를 계산하였다.

간부분 절제술 후에 남아있는 우측외엽의 후엽(caudal part)은 반씩 나누어서 하나는 H-E 염색용으로 나머지는 GST-P 염색용으로 사용하였고 우측외엽의 전엽(cranial part)과 미상엽은 FCM 분석용으로 사용하였다.

광학 현미경적 관찰 : 간의 외측 우엽의 후엽의 중앙을 잘라 한쪽은 냉아세톤에 고정하여 파라핀 블럭을 만든후 $4 \mu\text{l}$ 두께의 조직절편을 만들어 전암병소의 지표 효소인 glutathione S-transferase placental form(GST-P) 양성 병소에 대한 면역조직화학적 염색을 하였고³¹, 나머지 다른 한쪽은 10% phosphate buffered formalin액에 고정후 일반적인 파라핀 절편을 만들어 hematoxylin 및 eosin 염색을 하여 병변을 관찰하였다.

GST-P 양성 병소의 수와 면적은 칼라 화상분석기(color image analyzer, Q520, Cambridge)를 이용하여 1cm^2 당으로 계산하였다.⁵⁴

면역조직 화학적 염색 : 간 조직내의 GST-P 양성병변의 분포를 확인하기 위해 avidin biotin peroxidase complex(ABC)법을 이용하여 염색을 하였다.³⁵ Rabbit-anti-GST-P antibody(1차 항체)는 나고야시립대학교 의과대학으로부터 공급받았으며 0.01M phosphate buffered saline(PBS)으로 항체를 10배 희석후 bovine serum albumin이 1%가 되도록 첨가하여 냉장보관하면서 사용하였다. Biotin-labeled goat anti-rabbit IgG(2차 항체)와 Avidine-Biotin-Peroxidase Complex(Vectastain Elite ABC kit, PK 6101)는 Vector Laboratories에서 구입해 사용하였다. Paraffin 조직절편은 xylene에서 paraffin을 녹여내고, 농도하강순의 단계적 알콜과정을 거쳐 moist-



Text-fig 2. Design of Experiment.

↓ DEN : Diethylnitrosamine 200mg/kg body weight, I.P.
 ↓ Saline : 0.9% NaCl, I.P.
 ↓ PH : 2/3 Partial hepatectomy
 ▼S() : Number of sacrificed animals

□ : Basal diet
 ▨ : Diet containing 0.02% 2-Acetylaminofluorene

ure chamber에서 비특이 반응을 줄이기 위해 정상 goat 혈청(1 : 5 희석 ; 0.01M PBS pH 7.4)으로 처리하였고, rabbit anti-GST-P antibody(1 : 6000 희석), biotin labeled goat anti-rabbit IgG(1 : 4000 희석), avidin biotin peroxidase complex(ABC)를 각각 moisture chamber에서 반응시킨 후 H₂O₂ 0.02% diaminobenzidine(DAB ; 0.2M Tris buffer, pH 7.6)에 배양시켜 정색반응을 일으킨 후 hematoxylin으로 대조염색(counterstain)하여 광학현미경으로 관찰하였다.

Flow cytometry 분석 : 간의 외측 우엽의 전엽과 미상엽을 적출하여 95% ethyl alcohol에 고정하여 냉장보관하였다. 고정된 조직을 섬세한 칼이나 가위로 잘게 자른 후 0.01M phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)에 부유시켜 nylon mesh(40 μm)로 거르고 원심분리하여(2500rpm×7분) 세척하였다. 상층액을 거른 후 0.5% pepsin(pH 1.5~2.0)을 2ml를 넣어서 37°C water bath에서 30분간 배양시켰다. 다시 PBS로 세척한 후 DNA만을 남기기 위해 0.01% RNase(180unit/ml)을 2ml 넣어서 마찬가지로 37°C water bath에서 30분간 배양시켰다. 다시 세척과정을 거친 후 nylon mesh로 거른 다음 형광색 소인 propidium iodide(P.I)로 DNA를 염색한 다음 flow cytometry (FACScan, Bector Dickinson 사)로 측정하였다.

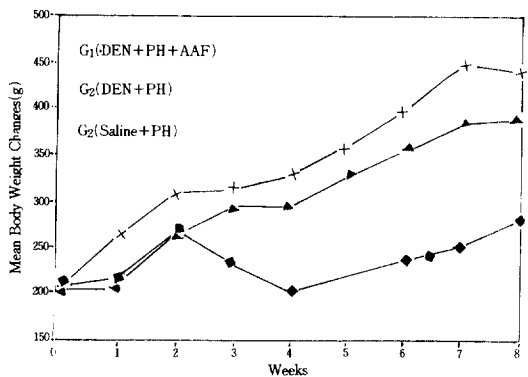
분석에 용이한 세포의 수가 부유액 1ml당 십만개에서 백만개 정도이므로 hemacytometer로 세포수를 측정하여 알맞은 정도로 세포의 밀도를 조절한 후 측정에 이용하였다.

자료의 통계처리 : 시험결과치는 two-tailed t-test를 이용하여 대조값과 비교, 분석하였다. 전항목에 대하여 공히 5% (p<0.05), 1% (p<0.01) 및 0.1% (p<0.001)의 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

체중변화 및 사료섭취량 : 간암유발물질인 diethylnitrosamine을 투여한 후 제 1, 2군의 체중이 다소 감소하다가 1주후부터 다시 증가하기 시작하였고, 간암촉진물질인 2-Acetylaminofluorene을 투여한 제1군의 경우 2주부터 급격히 체중이 감소하여 정상적인 체중곡선을 나타내는 제3군과는 체중변화에 있어 큰 차이를 보였다(Text-fig 3).

2/3 간부분 절제를 실시한 시험개시 3주후부터는 제 2, 3군의 경우 완만한 체중의 변화를 나타냈으나 제1군의 경우는 급격히 감소하여 대조군인 제3군과는 심한 차이를 나타냈다(Text-fig 3).



Text-fig 3. Mean body weight changes.

DEN : diethylnitrosamine, Saline : 0.9% NaCl, PH : Partial hepatectomy. AAF : 2-Acetylaminofluorene

사료섭취량에 있어서 실험기간동안 제 2, 3군의 차이는 없었으나 제 1군의 경우 간암 촉진물질인 2-AAF를 투여하기 시작한 시험개시 2주부터 급격한 감소를 보였으나 4주후부터 다시 증가하기 시작하여 시험종료 8주에는 제 2, 3군과 큰 차이가 없었다.

간의 무게비 : 체중에 대한 간의 무게비에 있어서 4주 부검의 경우 제 2군과 3군과의 차이는 나타나지 않았으나 제 1군의 경우 제 3군보다 유의성있게 감소하였다(p < 0.001, Table 1).

그러나 발암촉진물질인 2-AAF를 급여한 제 1군에서 그 이후 간의 증식이 활발히 일어나서 6주부검의 경우 간의 무게비가 유의성있게(p<0.01) 증가하였고(Table 2), 8주부검의 경우 더욱 유의성있게 증가하여(p<0.

Table 1. Final body weight and liver/body weight ratios at 4 weeks

Group treatment	Animal number	Final body weight(g)	Final liver weight(g)	Liver/body weight ratio(%)
1 DEN+PH+AAF	7	197.86±21.12 ***	4.64±0.71 ***	2.34±0.26 ***
2 DEN+PH	7	318.50±13.64	11.91±0.52	3.74±0.14
3 Saline+PH	5	312.90±10.11	12.14±1.02	3.88±0.28

Each value : mean±S.D

DEN : Diethylnitrosamine, Saline : 0.9% NaCl, PH : Partial hepatectomy,

AAF : 2-Acetylaminofluorene

*** : Significantly different from group 3(p<0.001)

Table 2. Final body weight and liver/body weight ratios at 6 weeks

Group treatment	Animal number	Final body weight(g)	Final liver weight(g)	Liver/body weight ratio(%)
1 DEN+PH+AAF	6	228.33±18.30 ***	11.43±1.43 *	5.01±0.57 **
2 DEN+PH	8	333.75±55.41	11.24±3.00	3.31±0.43
3 Saline+PH	6	368.50±18.12	13.72±1.24	3.62±0.24

Each value : mean±S.D

DEN : Diethylnitrosamine, Saline : 0.9% NaCl, PH : Partial hepatectomy,

AAF : 2-Acetylaminofluorene

* : Significantly different from group 3(p<0.05)

** : Significantly different from group 3(p<0.01)

*** : Significantly different from group 3(p<0.001)

Table 3. Final body weight and liver/body weight ratios at 8 weeks

Group treatment	Animal number	Final body weight(g)	Final liver weight(g)	Liver/body weight ratio(%)
1 DEN+PH+AAF	6	278.00±26.43 ***	19.08±3.43 *	6.82±0.70 ***
2 DEN+PH	8	386.19±35.37 *	12.71±1.86 **	3.28±0.30
3 Saline+PH	6	435.30±30.12	15.33±0.67	3.53±0.11

Each value : mean±S.D

DEN : Diethylnitrosamine, Saline : 0.9% NaCl, PH : Partial hepatectomy,

AAF : 2-Acetylaminofluorene

* : Significantly different from group 3(p<0.05)

** : Significantly different from group 3(p<0.01)

*** : Significantly different from group 3(p<0.001)

Table 4. Number and total area of glutathione S-transferase placental form (GST-P) positive lesions at 4, 6 and 8 weeks

Weeks	Group 1 (DEN+PH+AAF)		Group 2 (DEN+PH)		Group 3 (Saline+PH)	
	No/cm ²	Area/cm ²	No/cm ²	Area/cm ²	No/cm ²	Area/cm ²
4 Week	37.13 ***	4.45 **	17.07	0.62	-	-
	±6.29	±1.83	±6.51	±0.31		
6 Week	60.87 ***	37.61 ***	23.56	0.98	-	-
	±12.98	±9.32	±6.31	±0.40		
8 Week	28.79 ***	47.35 ***	26.41	1.15	-	-
	±17.31	±7.90	±14.05	±0.79		

Each value : mean±S.D

DEN : Diethylnitrosamine, Saline : 0.9% NaCl, PH : Partial hepatectomy,

AAF : 2-Acetylaminofluorene

** : Significantly different from group 3(p<0.01)

*** : Significantly different from group 3(p<0.001)

001) 간의 무게비가 제 3군보다 거의 두배정도 증가하였다(Table 3). 6주, 8주부검의 경우에는 제 2군과 3군의 차이가 유의성있게 인정되지 않았다.

육안 및 광학현미경적 소견 : 간암유발물질인 DEN을 투여한후 발암촉진물질인 2-AAF를 급여한 제 1군의 경우 전 개체의 간표면에서 많은 수의 회백색 증식결절(h-

yperplastic nodule)을 육안으로 확인할 수 있었고, 4주 부검의 경우는 매우 작은 결절(직경 1mm이내)이 산발적으로 나타났으나 6주, 8주부검의 경우는 직경 1~3mm 크기의 결절들이 간표면에 전체적으로 나타나 간표면이 매끄럽지 못하고 간의 변연부는 대체적으로 증식으로 인해 둔탁하게 관찰되었다. 그러나 DEN만을 투

Table 5. Ploidy distribution in sample from rat livers

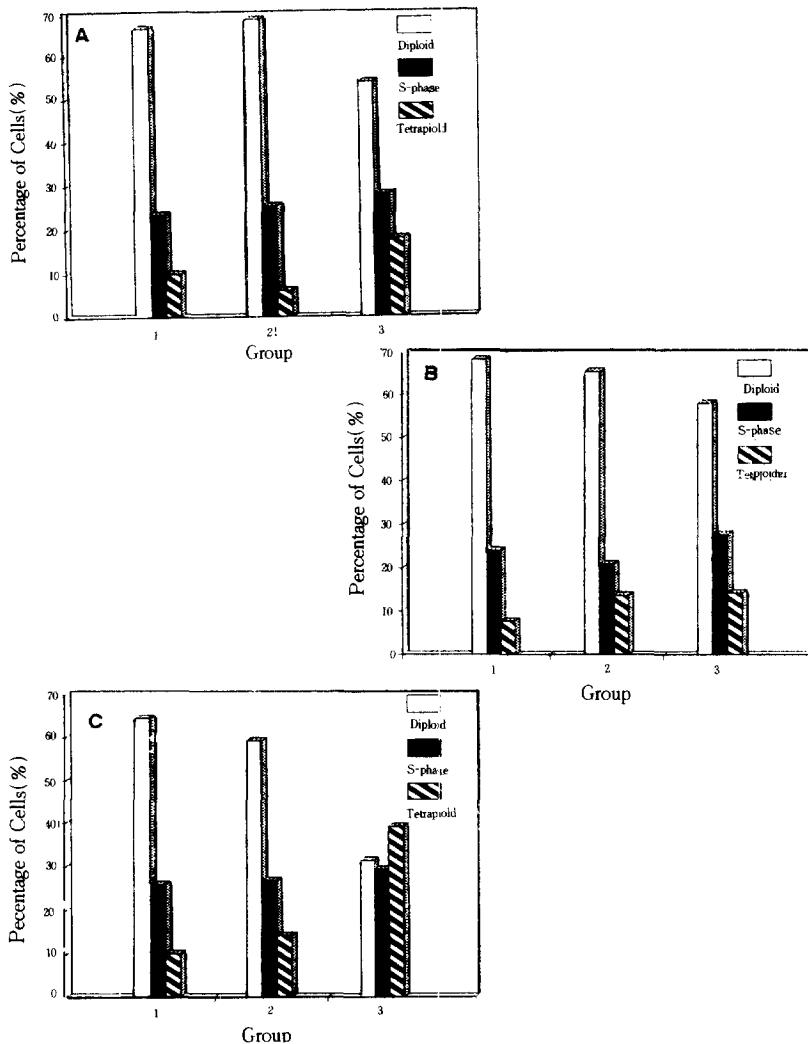
Weeks after initiation	Group	Number of samples	Percentages of cells		
			G ₁ -cell(2N)	S-cell(2N-4N)	G ₂ M-cell(4N)
4	1	5	66.76±4.30**	23.38±1.69	9.86±3.47
	2	5	68.86±5.00**	25.44±3.44	5.86±1.95**
	3	5	54.06±5.95	28.08±5.08	17.86±7.03
6	1	5	68.32±4.79**	24.00±4.00	7.70±2.25*
	2	5	65.60±6.16	20.98±3.58*	13.42±5.00
	3	5	58.22±4.52	27.64±2.95	14.12±4.53
8	1	5	64.42±6.59***	25.76±3.45	9.80±3.54***
	2	5	59.22±3.36***	26.70±3.66	14.08±6.71***
	3	5	31.40±8.41	29.34±6.17	39.24±3.16

Each value : mean±S.D

* : Significantly different from group 3(p<0.05)

** : Significantly different from group 3(p<0.01)

*** : Significantly different from group 3(p<0.001)



A, 4-weeks after initiation : B, 6-weeks after initiation : C, 8-weeks after initiation.

Text-fig 4. Percentages of DNA ploidy in rat liver.

여한 제 2군과 Saline을 투여한 제 3군에서는 육안적 증식결절이 거의 관찰되지 않았다.

제 1군과 2군에서 확인된 GST-P 양성 병소의 광학현미경적 소견은 주위의 정상 간조직과 경계가 뚜렷한 원형으로 결절의 크기가 다양하게 나타났으며 간 전체에 산재해 있는 것이 관찰되었다. 제 1군의 경우 4주부검 시 GST-P 양성 병소들이 주위조직과 비교하여 매우 선명하게 나타났으나(Fig 2), 8주부검의 경우는 많은 부분에서 GST-P 양성 병소가 나타나서 정상조직의 반 이상을 차지하였다(Fig 4 및 7).

병변내 세포들의 염색성은 약간의 호산성, 또는 호염기성을 나타냈고 핵이 확대되어 있었으며, 일부의 병변에서는 공포성 변화를 보이는 것도 있었다(Fig 1 및 3). Clear cell foci에서는 세포들이 약간 종창되었고 세포질은 투명한 공간을 많이 보였으며 핵은 과염색되어 있었다(Fig 5 및 6).

전암 병변의 수와 면적: GST-P 양성 병소의 수와 면적은 Table 4에서 보는 바와 같이 제 1군의 경우 4주, 6주, 8주부검 모두의 경우 제 2군, 3군보다 유의성있게 증가하였으며, 유발물질인 DEN만 투여한 제 2군에 있어서도 수와 면적에서 제 3군보다 상당히 증가하였다.

그러나 Saline을 투여한 대조군인 제 3군의 경우 GST-P 양성 병소가 나타나지 않았기 때문에 제 1군을 제 2군과 비교한 결과 GST-P 양성병소의 수와 면적에 있어서 제 1군이 제 2군보다 유의성있는 증가를 보였다($p < 0.01$, $p < 0.001$).

GST-P 양성 병소의 수는 8주부검에서 제 1, 2군의 차이가 유의성있게 나타나지 않았다. 이러한 결과는 GST-P 양성 병소들이 서로 융합되어서 병소의 면적은 커졌으나 병소의 수가 대조군에 비해 적게 나타났기 때문이다.

FCM에 의한 Ploidy 분포: Ploidy 분포에 있어서 간암유발 4주후에 제 1, 2군 모두 대조군인 제 3군보다 diploid가 유의성있게 증가하였으나($p < 0.01$) S phase-cell은 유의성있는 변화가 없었다(Table 5). 상대적으로 tetraploid는 제 2군에서 감소하는 양상을 나타내었다.

간암유발 6주후에는 제 1군만이 diploid가 유의성있게 증가하였으며($p < 0.01$) S-phase cell과 tetraploid의 경우 각각 제 2군과 1군에서 유의성있게 감소하였다($p < 0.05$).

간암유발 8주후에는 증감양상이 뚜렷이 나타나 제 1, 2군의 diploid가 제 3군에 비해 상당히 유의성있게 증가한 반면($p < 0.001$) tetraploid는 유의성있게 감소하였다($p < 0.001$). 그러나 S-phase cell의 경우는 유의성있는 변화가 나타나지 않았다. 그리고 제 1군과 제 2군에서

ploidy 변화는 비슷한 양상을 나타내서 간발암에 있어서 간암유발만시킨 제 2군의 ploidy 변화도 유의성있게 증감하였다(Text-fig 4).

고 찰

화학적 발암제에 의한 암발생의 연구는 유발(initiation)과 촉진(promotion)과정을 거쳐 암이 발생한다는 2단계이론^{21, 26, 33, 51}과 발암유발 이후에 암으로 진행되는 모든 과정을 진행(progression)과정으로 보는 견해가 있다.¹⁶ 그러나 오늘날에 와서는 많은 다단계 발암화 과정에 대한 연구결과 2단계 이론과 진행과정을 결합한 개념인 유발, 촉진 그리고 진행과정의 3단계 이론으로 종양의 발생을 설명하고 있다.³⁴ 즉, 유발과정은 유전자에 직접작용하는 발암물질의 투여로 일어나는 유전자 구조변화와 관련을 맺고 있는 비가역적인 과정으로, 비교적 짧은 시간 노출되어도 가능하며, 세포증식이 활발하게 일어나는 간에서 그 유발율이 높은 것으로 보고되고 있다.⁷ 한편 촉진과정은 긴 기간동안 직접적으로 유전자에 작용하지 않고 유발단계 때 생긴 변이세포의 발현을 도우면서 변이세포군들이 가역적으로 증식하도록 하는 과정이며 진행단계는 유발, 촉진된 세포군이 악성 종양으로 자율적으로 발달해 나가는 비가역적인 과정을 말한다.³⁴

암의 물리적, 화학적 성상을 알아내기 위해 여러가지 분자생물학적 기법들이 최근에 이용되어 지고 있는데 flow cytometer을 이용한 DNA량의 연구도 이 중의 한 방법이라고 볼 수 있다. 그러나 정상적인 cell kinetic이 종별, 장기별, 분석시기별로 다양하게 나타나기 때문에 결과분석을 위한 해석에는 많은 기초데이터가 필요하다.

이미 의학분야에서는 FCM을 이용해서 사람의 종양을 각 장기별로 연구해 많은 결과들을 얻고 있으며^{9, 12, 13, 15, 18, 23, 44, 47}, ploidy 분포뿐만 아니라 단클론 항체를 이용해 c-myc과 같은 발암유전자(oncogene)를 분석하여 임상에 응용하고 있다.⁵³ 특히 Saeter 등³⁸은 사람의 간에서 발암화됨에 따라 diploid cell의 증가와 polyploid cell의 감소를 보고하였다. 한편 DNA량이나 ploidy 분포가 전암병변에서의 유용한 지표가 될 수 있다는 긍정적인 기대만이 있는 것이 아니라 부정적인 면도 나타나는데 Danielson 등⁸은 마우스의 발암화 과정에서 ploidy 분포는 발암화보다는 실험적 protocol에 더 관련된 듯하며 간발암에 있어 꼭 필수적이라고는 말할 수 없다고 보고하였으며, Castelain 등⁶도 전암 병변들이 diploidization을 나타낸다 할지라도 필수불가결적으로 이것이 암의 특성이라고는 단정지을 수 없고 유전적 불안정성(genet-

ic instability)과 연관되어 있다고 보고하였다. Digemesis¹¹는 dimethylnitrosamine(DMN)을 신생 마우스에 투여하고 2-acetylaminofluorene(2-AAF)을 랫드에 투여하여 발암화과정에서 나타나는 euploidy에서 aneuploidy(clastogens과 turbagens)로의 전환(shift)을 설명하였고, Mori 등²⁸은 2-AAF를 투여한 랫드에서 정상적인 경우의 DNA value는 euploid형(2C~6C)을 나타내는 반면 hyperbasophilic foci는 aneuploid형(2C~18C)을 나타내는데 이것은 hepatocellular carcinoma의 DNA value(2C~23C)와 유사하므로 hyperplastic foci가 hepatocellular carcinoma의 직접적인 전구병변(precursor lesion)으로 사료된다고 증명하였다. 또한 간발암에 있어 ploidy 변화에 대한 연구를 많이 하고 있는 Schwarze 등⁴¹은 DEN와 2-AAF를 투여한 랫드에서 원심세정법(centrifugal elutriation technique)에 의해 순수한 fraction을 얻어서 분석한 결과, 정상 랫드의 경우 tetraploid hepatocyte를 많이 가지는 반면 발암물질로 유도된 간의 경우 대부분 diploid hepatocyte를 가지고 있다고 보고하였다. 이렇게 발암화 과정에서 나타나는 ploidy 변화를 연구할 때 간을 많이 사용하는 이유는 간의 경우 결합조직이나 기타 세포보다도 실질 세포가 상대적으로 많아서 세포를 분리하기 용이하기 때문으로 사료된다.

간은 생체로 들어온 많은 화학물질들을 여러 대사작용을 통하여 생체외로 배설이 가능한 물질로 바꾸어 주는 중요한 기관으로서 많은 효소들을 가지고 있는데 간의 전암병소와 관련하여 증감하는 것으로 알려져 있다.¹⁴ 특히 그 중에서 γ -glutamyltranspeptidase와 glutathione S-transferase placental form 등은 전암 병소에서 증가하는 효소들로서 잘 알려져 있다. Sargent 등³⁹은 Peraino모델과 Solt-Farber모델을 이용한 다단계 간발암화과정에서 GGT⁺ hepatocyte GGT⁻ hepatocyte를 분리하여 각각의 ploidy 분포를 조사한 결과 GGT⁻ hepatocyte가 23~33%의 diploid인 반면 GGT⁺ hepatocyte는 75~80%가 diploid를 나타내 전암과정에서는 diploidization을 나타낸다고 보고하였다.

FCM을 이용한 세포의 물리화학적 성상의 분석은 객관적이고 정확하다는 장점을 가지고 있는 반면 몇가지의 단점을 가지고 있다. 첫째로 FCM으로 분석하기 위해서는 세포를 부유화(cell suspension)시켜야 하는데 세포의 이질화(heterogeneity)때문에 중앙부분의 병변만을 채취하여 분석하기가 어렵고 병변외의 정상조직의 혼재 그리고 실질세포 이외의 기타 세포 예를 들면 간의 경우 endothelial cell이나 kupffer cell 등의 혼재가 나타난다. 둘째로 단핵세포(mononucleated cell)와 이핵세포(binucleated cell)의 구분을 명확하게 해주어야 한다

(Fig 8). 예를 들면 mononucleated tetraploid(4N), binucleated diploid(2×2N)와 2개의 mononucleated diploid(2N+2N) 세포들은 모두 tetraploid로 분석되는 실수가 발생할 수 있으므로 이러한 것을 보정해 주거나 명확히 구분을 해주어야 한다.^{37,49} 셋째로 시료의 준비와 기기의 정렬(alignment)에 의해 오차가 발생하는데 이런 경우에는 Coefficient of Variance(CV)가 크게 나타난다. CV 값은 표준편차를 평균으로 나눈 값으로 수치가 작을수록 resolving power가 좋아지고 CV 값이 클수록 peak가 넓어지므로 G₀/G₁에 가깝게 위치하는 비정상 세포군을 찾아내지 못할 위험이 커진다. 그러면 발암화과정에 있어서 이러한 DNA 량이나 ploidy의 변화가 특이적인가 하는 의문이 생기는데 많은 연구에서는 긍정적인 결과들이 나오고 있는 반면^{1,10}, 부정적인 견해들도 나오고 있다. Danielson 등⁸은 마우스 발암화과정에서 ploidy 변화는 실험적 protocol에 더 관련된 듯 하다고 주장하였고, Castelain 등⁶도 diploidization이 필수불가결적으로 암의 특성이라고 단정지을 수는 없고 유전적 불안정성과 연관되었을지도 모른다고 보고하였다.

본 실험에서 DNA ploidy 분석결과 이른시기 즉, 유발후 4주부터 diploid(2N)가 제 1, 2군에서 대조군인 제 3군보다 유의성있게 증가하여 ploidy 변화가 발암화과정에 있어 특이적인 변화로 나타났다. 8주부검의 경우 이러한 현상은 더욱 뚜렷하여 제 3군의 diploid cell과 tetraploid cell의 비율이 거의 1:1로 비슷한 정도로 나타났으나 제 1, 2군의 diploid cell과 tetraploid cell의 비율은 약 7:1에서 4:1 정도로 diploid cell의 증가가 매우 뚜렷하였다. 특히 주목해야 할 점은 GST-P 양성소의 수와 면적이 2-AAF를 촉진물질로 사용한 제 1군과 사용하지 않은 제 2군과의 차이가 심하게 나타났으나 ploidy 변화는 이 두군의 차이가 별로 나타나지 않은 것으로 미루어 보아 FCM을 사용한 DNA ploidy 분석은 강한 carcinogen에서 뿐만이 아니라 미약한 carcinogen에 의한 간발암에서도 간세포의 변화를 측정하는데 유용한 것으로 사료된다. 그러나 아직 ploidy에 대한 기초적인 자료가 많이 부족하고 같은 종이라도 품종에 따라 정상적인 ploidy 분포의 차이가 있으므로⁴² 기초자료에 대한 연구가 더 많이 이루어져야 할 것이다.

간세포의 ploidy ratio가 변화하는 기전은 아직 정확하게 밝혀져 있지 않지만 Tulp 등⁵²은 4N을 가진 핵이 2N을 가진 핵보다 더 발암물질과 결합할 수 있는 능력이 크기 때문에 더 민감하다고 보고하였으며 Neal과 Butler²⁹는 polyploid cell들이 발암물질에 더 민감하고 diploid 세포군으로부터 저항적인 polyploid cell들에 의해 대치되어 진다고 주장하였다. 그와는 반대로 Steele 등⁴⁶은

diploid cell이 더 발암물질에 민감하다고 보고하였다. 그리고 병리학적 소견과 ploidy ratio와의 상관성은 없으며 이러한 변화는 발암물질의 발암효과와 관련이 있지만 발암물질의 양과는 상관성이 없다고 보고하였다.⁴⁸

결론적으로 발암화과정에 있어서 ploidy 변화에 대한 연구가 발암화기전을 이해하는데 중요한 자료를 제공하므로 이러한 발암화 과정에 있어 DNA 변화에 대한 연구가 더 많이 이루어져야 하고 FCM에 의한 ploidy 분포는 간발암화과정에 있어서 조기에 검색되어질 수 있는 객관적인 자료로 유용하다고 사료되며 더 정확하고 객관적인 분석을 위해 방법학적 모색과 기초자료의 연구가 더 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

본 실험은 간발암화 과정에서 경시적으로 세포를 분리하고 이것을 flow cytometer(FCM)로 분석함으로써 암의 일반적인 성상을 세포학적 수준에서 분석함과 동시에 이러한 유전적 성상이 효과적으로 전암병소를 검색하는데 있어서 다른 지표들보다 더 유용한 방법인가를 알아보기 위해 수행되었으며 다음과 같은 결과를 얻

었다.

1. Ploidy 분포에 있어서 간암유발 4주후 제 1, 2군 모두 대조군인 제 3군보다 diploid가 유의성있게 증가하였으나($p < 0.01$), S-phase cell은 유의성있는 변화가 없었다.

2. 간암유발 6주후에는 제 1군만이 diploid가 유의성있게 증가하였으며($p < 0.01$) S-phase cell과 tetraploid의 경우 각각 제 2군과 1군에서 유의성있게 감소하였다($p < 0.05$).

3. 간암유발 8주후에는 증감양상이 뚜렷이 나타나 제 1, 2군의 diploid가 제 3군에 비해 상당히 유의성있게 증가한 반면($p < 0.001$) tetraploid는 유의성있게 감소하였다($p < 0.001$). 그러나 S-phase cell의 경우 유의성있는 변화는 역시 나타나지 않았다.

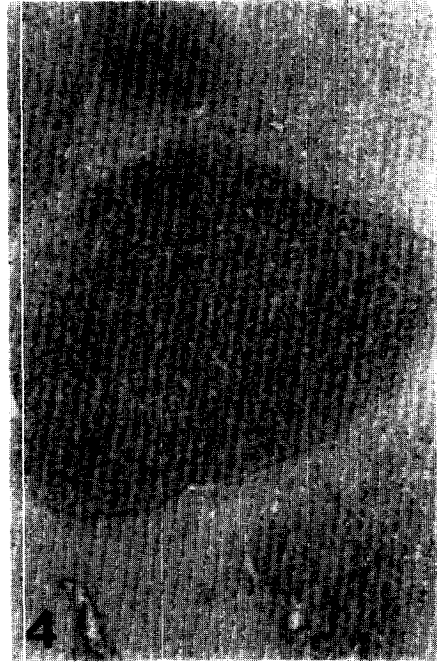
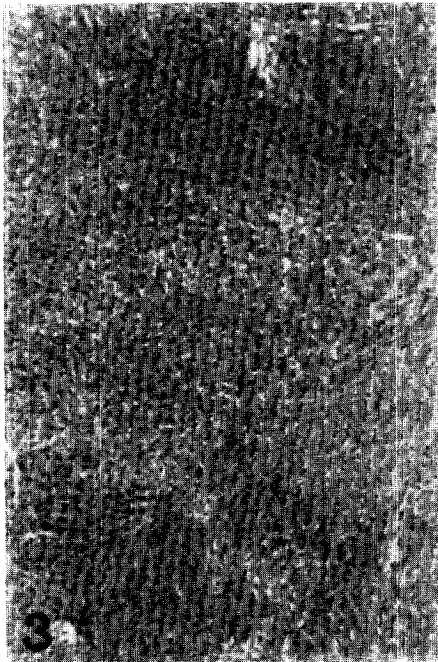
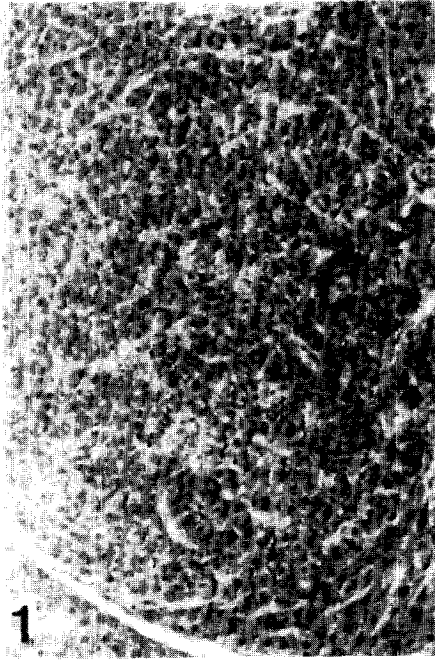
이상과 같은 결과로써 FCM에 의한 ploidy 분포는 간발암화 과정에 있어서 조기에 검색되어질 수 있는 객관적인 자료로 유용하다고 사료되며 더 정확하고 객관적인 분석을 위해 방법학적 모색과 기초자료의 연구가 더 이루어져야 할 것으로 생각된다.

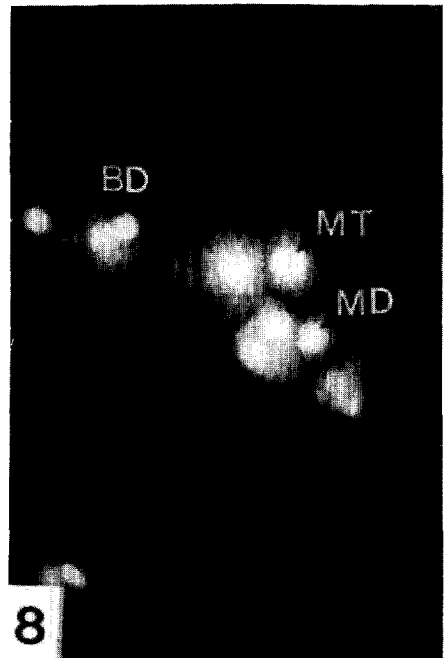
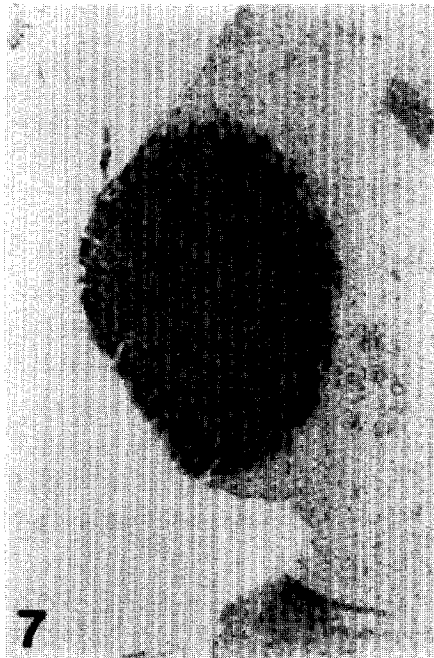
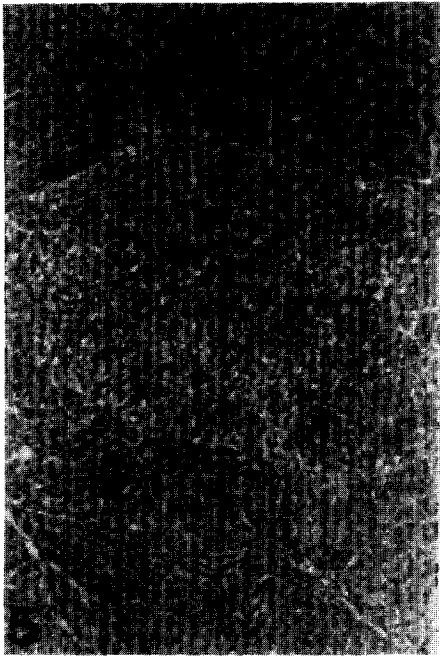
Legends for figures

- Fig 1.** Preneoplastic lesion induced with diethylnitrosamine (DENA) as an initiator and promoted by 2-acetylaminofluorene(2-AAF) for 2 weeks in partially hepatectomized rat(H&E staining, $\times 100$).
- Fig 2.** GST-P positive preneoplastic lesion. Serial section to that of Fig 5(ABC staining, $\times 100$).
- Fig 3.** Hyperplastic nodules induced with DENA as an initiator and promoted by 2-AAF for 6 weeks(H&E staining, $\times 40$).
- Fig 4.** GST-P positive hyperplastic nodules. Serial section to that of Fig 7(ABC staining, $\times 40$).
- Fig 5.** A clear cell foci of the rat liver induced by liver carcinogen(H&E staining, $\times 40$).
- Fig 6.** Magnified figure to that of Fig 9(H&E staining, $\times 100$).
- Fig 7.** Large GST-P positive hyperplastic nodules induced with DENA as an initiator and promoted by 2-AAF for 2 weeks(ABC staining, $\times 40$).
- Fig 8.** Fluorescence micrograph of hepatocytes from normal rat liver in cell suspension(stain : propidium iodide, $\times 400$). MD = mononucleated diploid cell ; BD = binucleated diploid cell ; MT = mononucleated tetraploid cell.

참 고 문 헌

1. Abraham R, Benitz KF, Mankes R. Ploidy patterns in hepatic tumors induced by mirex. *Exp and Molecular Pathology* 1983 ; 38 : 271~282.
2. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 1983 ; 221 : 1256~1264.
3. Barlogie B, Raber MN, Schmann J. et al. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 1983 ; 43 : 3982~3997.
4. Bridges BA. Short-term screening tests for carcinogens. *Nature* 1976 ; 261 : 195~200.
5. Cameron RG, Imaida K, Tsuda H. et al. Promotive effects of steroids and bile acids on hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine in male rats. *Gann* 1982 ; 72 : 2426~2428.





6. Castelain PH, Deleener A, Dirsch-Volders M, et al. Cell population kinetics and ploidy rate of early focal lesions during hepatocarcinogenesis in the rat. *Br J. Cancer* 1989 ; 60 : 827~833.
7. Columbano A, Rajalakshmi S, Sarma DSR. Requirement of cell proliferation for the initiation of liver carcinogenesis as assayed by three different procedures. *Cancer Res* 1981 ; 41 : 2079~2083.
8. Danielsen HE, Steen HB, Lindmo T, et al. Ploidy distribution in experimental liver carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* 1988 ; 9 : 59~63.
9. Danova M, Riccardi A, Mazzini G, et al. Ploidy and proliferative activity of human brain tumors. *Oncology* 1987 ; 44 : 102~107.
10. Deleener, A, Castelain, Ph, Preat V, et al. Changes in nucleolar transcriptional activity and nuclear DNA content during the first steps of rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1987 ; 8 : 195~201.
11. Digernes V. Chemical liver carcinogenesis : Monitoring of the process by flow cytometric DNA measurements. *Environmental Health Perspectives* 1983 ; 50 : 195~200.
12. Erhardt K, Auer G, Bjorkholm E, et al. Prognostic significance of nuclear DNA content in serous ovarian tumors. *Cancer Res* 1984 ; 44 : 2198~2202.
13. Ezaki T, Kanematsu T, Okamura T, et al. DNA analysis of hepatocellular carcinoma and clinicopathologic implications. *Cancer* 1988 ; 61 : 106 ~ 109.
14. Farber E. The multistep nature of cancer development. *Cancer Res* 1984 ; 44 : 4217~4223.
15. Forsslund G, Zetterberg A. Ploidy level determinations in high-grade and low-grade malignant variants of prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1990 ; 50 : 4281~4285.
16. Foulds L. The experimental study of tumor progression : a review. *Cancer Res* 1954 ; 14 : 327~339.
17. Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas WFO, et al. Fumonisin-Novel mycotoxin with cancer-promoting activity produced by *Fusarium Moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 1988 ; 54 : 1806~1811.
18. Harry F. van den Ingh, Griffioen, G, et al. Flow cytometric detection of Aneuploidy in colorectal adenomas. *Cancer Res* 1985 ; 45 : 3392~3397.
19. Hasegawa, R, Tsuda, H, Shirai, T, et al. Effect of timing of partial hepatectomy on the induction of preneoplastic liver foci in rats given hepatocarcinogens. *Cancer Letters* 1986 ; 32 : 15~23.
20. Heidelberger C. Chemical carcinogenesis. *Ann. Rev. Biochem.* 1975 ; 44 : 79~121.
21. Ito N. Tatematsu M, Imaida K, et al. Effects of various promoters on the induction of hyperplastic nodules in rats liver. *Gann* 1980a ; 71 : 415~416.
22. Ito N. Tatematsu M, Nakanishi K, et al. The effects of various chemicals on the development of hyperplastic liver nodules in hepatectomized rats treated with N-nitroso-diethylamine or N-2-acetylaminofluorene. *Gem* 1980b ; 71 : 832~842.
23. Ito N. Inoue T, Tagawa Y, et al. Development of new rapid bioassay for carcinogens to predict the results of long term carcinogenicity test. *Toxicol Forum* 1986 ; 9 : 601~611.
24. Klose U, Thierau K, Greim H, et al. Centrifugal elutriation of hepatocytes from 2-acetylaminofluorene-treated rats and their characterization by flow cytometry. *Carcinogenesis*. 1989 ; 10 : 553~556.
25. Ljungberg B, Forsslund G, Stenling R, et al. Prognostic significance of the DNA content in renal cell carcinoma. *The J. of Urology* 1986 ; 135 : 422~426.
26. Marx JL. Tumore promoters : Carcinogenesis gets more complicated. *Science* 1978 ; 201 : 515~518.
27. Miller JA, Miller EC. Carcinogens occurring naturally on foods. *Federation Proc* 1976 ; 35 : 1316~1321.
28. Mori H, Tanaka T, Sugie, S, et al. DNA content of liver cell nuclei of N-2-fluorenylacetamide-induced altered foci and neoplasms in rats and human hyperplastic foci. *JNCI* 1982 ; 69 : 1277~1282.
29. Neal GE, Butler WH. A comparison of the changes induced in rat liver by feeding low levels of Aflatoxin B₁ or an azo dye. *Br. J. Cancer* 1976 ; 37 : 55~60.
30. Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 1986 ; 46 : 2203~2207.
31. Ogiso T, Tatematsu M, Tamano S, et al. Comparative effects of glutathione S-transferase-positive liver nodules in a long-term assay. *Toxicol Patho* 1985 ; 13 : 257~265.
32. Pitot HC, Sirica AE. The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochim Biophys*

- Acta* 1980 ; 605 : 191~215.
33. Pitot HC. Biological and enzymatic events in chemical carcinogenesis. *Ann Rev Med* 1979 ; 30 : 25~39.
 34. Pitot HC. Progression : The terminal stages in carcinogenesis. *Gann* 1989 ; 80 : 599~607.
 35. Pitot HC, Barsness L, Golworthy T, et al. Biochemical characterization of stages of hepatocarcinogenesis after single dose of diethylnitrosamine. *Nature* 1978 ; 271 : 456~458.
 36. Saeter G, Schwarze PE, Nesland JM, et al. The polyploidizing growth pattern of normal rat liver is replaced by divisional, diploid growth in hepatocellular nodules and carcinomas. *Carcinogenesis*, 1988a ; 9 : 939~945.
 37. Saeter G, Schwarze PE, Seglen PO. Shift from polyploidizing growth in carcinogen-treated rat liver. *J Natl Cancer Inst* 1988b ; 80 : 950~957.
 38. Saeter G, Lee CZ, Schwarze PE, et al. Changes in ploidy distributions in human liver carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1988c ; 80 : 1480~1484.
 39. Sargent L, Xu Y, Sattler GL, et al. Ploidy and karyotype of hepatocytes isolated from enzyme-altered foci in two different protocols of multistage hepatocarcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis* 1989 ; 10 : 387~391.
 40. Schwarze PE, Pettersen EO, Seglen PO. Characterization of hepatocytes from carcinogen-treated rats by two-parametric flow cytometry. *Carcinogenesis* 1986a ; 7 : 171~173.
 41. Schwarze PE, Pettersen EO, Tolleshaug H, et al. Isolation of carcinogen-induced diploid rat hepatocytes by centrifugal elutriation. *Cancer Res* 1986b ; 46 : 4732~4737.
 42. Schwarze PE, Saeter G, Armstrong D, et al. Diploid growth pattern of hepatocellular tumours induced by various carcinogenic treatments. *Carcinogenesis* 1991 ; 12 : 325~327.
 43. Sherer E, Hoffmann M, Emmelot P, Friedrich-Freksa M. Quantitative study on foci of altered liver cells induced by diethylnitrosamine and partial hepatectomy. *J Natl Can Inst* 1972 ; 49 : 93~106.
 44. Shimomatsuya T, Taigawa N, Muraoka R. Proliferative activity of human tumors : Assessment using bromodeoxyuridine and flow cytometry, *Jpn J Cancer Res* 1991 ; 82 : 357~362.
 45. Solt D, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 1976 ; 263 : 701~703.
 46. Steele PRM, Yim APC, Herbertson BM, et al. Some flow cytofluorimetric studies of the nuclear ploidy of mouse hepatocytes. II. Early changes in nuclear ploidy of mouse hepatocytes following carbon tetrachloride administration : evidence for polyploid nuclei arrested in telophase. *Br J Exp Pathol* 1981 ; 62 : 474~479.
 47. Stephenson RA, James BC, Gay, H, et al. Flow cytometry of prostate cancer : Relationship of DNA content to survival. *Cancer Res* 1987 ; 47 : 2504~2509.
 48. Styles J, Elliott BM, Lefevre PA, et al. Irreversible depression in the ratio of tetraploid : diploid liver nuclei in rats treated with 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'M). *Carcinogenesis* 1985 ; 6 : 21~28.
 49. Styles JA, Bybee A, Pritchard NR, et al. Studies on the hyperplastic responsiveness of binucleated rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 1990 ; 7 : 1149~1152.
 50. Tatematsu M, Nakanshi K, Murasaki G, et al. Enhancing effects of inducers of liver microsomal enzymes on induction of hyperplastic liver nodules by N-2-fluorenylacetylamine in rats. *J Natl Can Inst* 1979 ; 63 : 1411~1416.
 51. Tsuda H, Masui T, Imaida K, et al. Promotive effect of primary and secondary bile acids on the induction of γ -glutamyl transpeptidase positive liver cell foci as a possible endogenous factor for hepatocarcinogenesis in rats. *Gann* 1984 ; 75 : 871~875.
 52. Tulp A, Welagen JJMN, Westra JG. Binding of the chemical carcinogen N-hydroxy-acetylaminofluorene to ploidy classes of rat liver nuclei as separated by velocity sedimentation at unit gravity. *Chem Biol Interactions* 1978 ; 23 : 293~303.
 53. Watson JV, Stewart J, Evan GI, et al. The clinical significance of flow cytometric c-myc oncoprotein quantitation in testicular cancer. *Br J Cancer* 1986 ; 53 : 331~337.
 54. 김종수, 이영순. 새로운 단기 항암성 스크리닝법에 의한 영지 추출물의 효과에 대한 연구. 한국독성학회지, 1989 ; 5 : 135~149.