

간흡충 감염 햄스터의 담관암발생에서 small cell과 oval cell의 역할

서일복 · 김학엽* · 이재현** · 김대용***

세명대학교 한의학과, C&C 신약연구소*
고려대학교 의과대학**, 서울대학교 수의과대학***
(1995년 9월 18일 접수)

The role of small cells and oval cells in the cholangiocarcinogenesis in hamsters infected with *Clonorchis sinensis*

Il-bok Seo, Hak-yeop Kim, Jae-hyun Lee, Dae-yong Kim***

Department of Oriental Medicine, Semyung University, C&C Research Laboratories**, College of Medicine, Korea University**, College of Vet. Medicine, Seoul National University***

(Received Sep 18, 1995)

Abstract : This study was carried out to examine the role of small cells and oval cells in cholangiocarcinogenesis in the hamsters infected with *Clonorchis(C) sinensis*.

Forty two female Syrian golden hamsters were divided into two groups. Group I was for the induction of the cholangiocarcinoma, which was infected orally with *C. sinensis* and given dimethylnitrosamine(15ppm) in drinking water for 4 weeks. Group II was served as control.

More than 5 heads of hamsters in each group were sacrificed at 4, 7, 11 and 15 weeks after the beginning of the experiment. The livers were examined histopathologically, electron microscopically and immunohistochemically.

The results obtained were as follows;

1. Cholangiocarcinomas were occurred in 1 of 6 animals at 11 weeks and in 4 of 6 animals at 15weeks after the beginning of the experiment.

2. Small cells and oval cells were proliferated around the portal triads from 4 weeks and peaked at 11 weeks, and slightly decreased after then.

3. The strong positive reaction to the α -fetoprotein was shown in many of small cells and oval cells. But ductlike oval cells, which were arranged rosette form, showed weak positive reaction to the α -fetoprotein.

4. Most of small cells and oval cells showed negative reaction to the cytokeratin. But weak positive reaction in ductlike oval cells, and moderate positive reaction in cholangiocarcinoma cells were observed.

These results suggested that cholangiocarcinoma induced by infection of *C. sinensis* was believed to originate from the proliferated small cells around the portal triads which would be able to differentiate to the oval cells, ductlike oval cells, and cholangiocarcinoma cells gradually.

Key words : *Clonorchis sinensis*, cholangiocarcinogenesis, hamster, small cells, oval cells.

서 론

담관암은 원발성 간암종의 6.4~25%를 차지하고^{1,2,3}, 지역적으로 태국, 한국, 홍콩, 일본 등을 포함한 동북아 및 동남아시아에서 흔히 발생되는 것으로 보고되어 왔으며^{1,2,3,4}, 역학적으로 담관내에 기생하는 간흡충인 *Clonorchis sinensis*나 *Opisthorchis viverrini*의 감염이 주원인인 것으로 밝혀졌다.

지금까지의 연구결과로는 간흡충에 의한 담관암은 간흡충의 일반적 병리현상과 더불어 생체의 내적, 외적요인과 환경요인이 복합적으로 작용하여 담관상피세포가 역분화되어 발생되는 것으로 이해되어 왔으나 최근에 많은 연구자들에 의해 간발암 모델에서 화학물질 투여시 보이는 enzyme altered foci나 nodules은 유독성 반응으로 나타나는 비암적 병소이고 이들 세포들이 이형성되어 암화되기보다는 물리, 화학적 독성물질에 의해 초기에 증식하는 새로운 세포집단(oval cell populations) 또는 기존의 pluripotent liver stem cell에서 암세포가 유래한다는 새로운 이론이 제시되고 있다^{5,6}.

랫드에서 화학물질로 인한 간암발생과정 중 재생성 결절이나 간암이 발생하기전에 문맥부주위에 난 원형 또는 불규칙한 핵을 나타내는 세포집단이 출현하는 것으로 보고되었다^{7,8}. 이들 세포집단은 서로 다른 분화상태와 능력을 갖고 있는 oval cell 또는 bile ductlike cell이라 불리우는 상피세포와 아직도 유전적 특성이 잘 밝혀지지 않은 small periductal cell들로 구성되어 있다⁹. 많은 연구자들^{10,11}은 oval cell 집단은 이질성인 세포의 집단으로 정상 담관상피세포의 특징인 isozyme를 갖고 있는 세포들과 담관상피세포와 간세포사이의 중간단계 분화의 특징인 α -fetoprotein과 albumin을 생산하는 mRNA를 갖고 있는 세포들로 구성되어 있다고 하였다. Oval cell 집단이 이질성 세포집단임은 투여된 발암물질의 종류에 따라 α -fetoprotein을 분비하는 세포와 분비하지 않는 세포가 다르게 나타난다는 Sell¹²의 결과에 의해서도 입증되었다.

간암이나 담관암의 발생과정에 있어서 이러한 oval cell의 증식 및 기원에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. Woodchuck 간염 virus¹³와 인체의 B형 간염바이러스의 large envelope protein¹⁴에 의한 간세포암도 oval cell의 증식과 관련하여 발생한다고 하며, 간흡충감염에 의한 담관암도 oval cell의 증식과 관련하여 발생한다고 보고되었다¹⁵.

Farber¹⁶는 choline-deficient ethionine을 투여한 랫드에서 oval cell은 문맥부주위에서 발생하여 관강을 형

성하거나 소담관에서 보이는 핵분열상을 나타내고 있기 때문에 담관세포 유래라고 하였으며, Grisham과 Porta¹⁷는 미세구조학적 관찰을 통하여 oval cell은 담소관과 담세관의 연접부위에 존재하며, 그곳의 transitional cell이 전구체일 것이라고 주장하였다. 그러나 Sell 등¹⁸은 oval cell이 미성숙 또는 간세포암에서 보여야 할 α -fetoprotein을 분비하는 특성을 보이고 있기 때문에 oval cell의 기원은 따로 존재하며 기존하는 stem cell로부터 분화되었을 것이라 추정하였다. Sell과 Dunsford¹⁹는 기존의 화학적 간발암 모델을 재검토하여 새로운 발암기원 세포로서 stem cell이 존재함을 주장하였으며, Sell²⁰은 정상 간장조직에서도 간세포와 담관세포로 분화될 수 있는 stem cell이 존재할 가능성이 있다고 보고하였다.

그러나 간흡충 감염에 의한 담관암의 발생에 있어서 감염초기부터 문맥주위에서 증식되는 oval cell이 담관암세포로 진행되는지의 여부는 여전히 해결되지 못하고 있다. 본 연구는 간흡충 감염 햄스터의 담관암발생에 있어서 small cell 및 oval cell과 담관암세포의 관련성을 병리학적 및 면역조직화학적 방법으로 규명하기 위해서 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 실험동물은 고려대학교 동물사육장에서 번식시킨 5-6주령 Syrian golden hamster로 체중이 60-70g인 암컷 42마리를 사용하였다. 랫드용 polycarbonate cage에 5마리씩 합사하여 실험실 환경에 1주간 적응시킨 후 실험에 공시하였다. 실험기간동안 사료는 실험동물용 펠렛사료(삼양사료)를, 식수는 수돗물을 자유롭게 공급하였으며, 자연채광하에서 사육온도가 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도가 $60 \pm 10\%$ 로 유지된 사육실에서 사육하였다.

간흡충감염 : 간흡충(*Clonorchis sinensis*)의 피낭유충은 낙동강의 한 하구에서 잡은 참붕어에서 얻었다. 참붕어의 근육을 모아서 인공위액으로 37°C 에서 30분간 소화시킨 후 소화된 내용물을 지름이 0.147mm인 체로 여과하고 0.85% NaCl용액에 여러번 세척하였다. 간흡충피낭유충을 입체현미경하에서 10개씩 모아서 실험개시일에 1회 경구적으로 투여하여 감염시켰다.

Dimethylnitrosamine의 투여 : Dimethylnitrosamine(Sigma Co., USA)을 최종농도가 미발암성용량인 15ppm이 되도록 수돗물에 희석하여 음수로 공급하였다.

실험군의 설정 : 총 42마리의 햄스터를 실험군인 I 군에는 22마리, 대조군인 II 군에는 20마리를 배정하였다. I 군은 *Clonorchis(C.) sinensis* 감염후 dimethylnitrosamine(DMN)을 4주까지 음수의 형태로 연속 투여하였다. 각 군에서 실험개시 후 4, 7, 11 및 15 주에 각각 5마리 이상을 희생시켜 부검을 실시하였으며 실험종료일 이전에 폐사되는 개체는 폐사 당일 부검을 하여 각 군의 부검주령에 가까운 주로 편입시켜 검사하였다.

광학현미경적 관찰 : 부검하여 채취한 간장을 10% 중성포르말린에 고정한 후 좌엽, 중간엽, 우엽 및 미상엽의 동일한 부위를 절편하여 일반적인 조직처리과정을 거친후 hematoxyline and eosin 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

전자현미경적 관찰 : 각 부검시마다 결절이 관찰되는 부위와 그 주변조직을 채취하여 60-90nm두께로 초박절편한 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경(Philips CM12)으로 80kV에서 관찰하였다.

면역조직화학적 관찰 : 간분맥부주위에 증식된 세포들의 특성과 담관암 발생기전에서 담관형성상피세포의 특성을 확인하기 위하여 각 세포에서의 cytokeratin, α -fetoprotein의 발현정도를 Hsu 등^[1]이 사용한 ABC법을 변형하여 실시하였다. 사용된 1차항체는 mouse anti-human α -fetoprotein(Zymed Labs, INC, USA)과 rabbit anti-cytokeratin(Zymed Labs, INC, USA)이었다. Biotin이 부착된 2차항체 및 avidin complex는 Elite ABC Kit(Vector Co., USA)를 사용하였다.

결 과

병리조직학적 소견 : 전 실험기간동안 II 군에서는 정상범위의 소견만이 관찰되었으며 I 군에서는 실험 4주부터 실험 15주까지 현저한 변화를 나타내었다.

실험 4주 : 간분맥 주변에 위치한 간세포의 세포질과 핵이 거대하게 종대되는 심한 megalocytosis가 관찰되었으며 많은 부위에서 이를 거대세포의 세포질은 과립상으로 나타났다. 대부분의 주담관벽은 섬유화가 진행되어 현저히 비후되어 있었으며 많은 수의 호중구의 침유가 관찰되었다. 이러한 소견은 실험 15주까지 계속해서 관찰되었다. 대부분의 예에서 간분맥 주변에서 세포의 증식이 관찰되었다. 증식된 세포는 농염되고 모양이 불규칙하며 편심성으로 위

치한 핵과 소량의 세포질을 지닌 small cell과 비교적 크고 밝은 난원형의 핵을 지니고 세포질이 풍부한 oval cell이 서로 혼재되어 있었다(Fig 1).

실험 7주 : 실험 4주부터 관찰된 megalocytosis는 7주에서도 현저하게 관찰되었으나 실험 7주에서는 이를 megalocytes의 변성괴사가 진행되어 많은 megalocyte의 핵은 소실되고 세포질이 균질화되어 있었다. 4예에서 주담관상피세포의 가벼운 점액세포화생이 관찰되었다. I 군의 모든 예에서 간문맥 주위에서 small cell과 oval cell의 증식이 실험 4주에 비해 더욱 현저하게 나타났으며 small cell과 oval cell들이 혼재하여 증식되어 림프소설과 같은 형태를 취하기도 하였다. Oval cell이 증식된 부위에서는 몇개의 oval cell들이 rosette 형태로 배열되어 미약한 관강의 구조를 취하는 소견이 자주 관찰되었다. 난원형의 밝은 핵을 지닌 세포들이 일정하게 배열되어 내강을 이루며 주위에 섬유아세포의 증식이 동반되어 있는 담관섬유증의 소견이 3예에서 관찰되었으며 밝고 큰 난원형의 핵을 지닌 세포들이 치밀하게 증식하면서 불규칙한 내강을 형성하고 간실질과 불분명한 유파를 지니면서 증식하는 담관종은 1예가 관찰되었다.

실험 11주 : 실험 7주에 비해 small cell 및 oval cell의 증식이 더욱 진행되었으며 모든 예에서 담관섬유증이 관찰되었다.

6예 중 3예에서 담관종이 발생되었으며 이를 종양조직사이에서 oval cell의 증식이 빈번하게 관찰되었으며 많은 부위에서 oval cell은 rosette 형태로 미세한 관강을 이루고 있었다.

6예 중 1예에서 담관암이 발생되었으며 담관암조직은 주변의 간실질내로 침윤 또는 결절상으로 성장하여 간실질의 대부분을 대치하고 있었으며 종양조직은 크기가 다양한 핵을 지닌 세포들이 중층으로 배열하여 내강내에 유두상으로 증식되어 있거나 또는 커다란 낭포를 형성하면서 성장하고 있었다. 부위에 따라서는 내강을 형성하는 종양조직 사이사이에 종양세포들이 충실히 배열되어 있었으며 많은 부위에서 이를 세포들의 중심에 미세한 내강이 형성되어 있었다(Fig 2). 담관암조직 주변에서는 small cell과 oval cell의 수가 현저히 감소되어 있었다.

실험 15주 : 실험 15주에서는 실험 11주에서와 유사한 정도의 병변이 관찰되었으며 담관암은 6예 중 4예에서 관찰되었다.

전자현미경적 소견 : 실험 4주에 담관주위에 증식된 small cell들은 구형 또는 난원형의 핵을 가지고 있었다. 이를 세포들의 핵은 이질염색질을 갖고 있었으며 세포질의 내용물은 거의 없거나 소량의 po-

lyribosome을 함유하고 있었다(Fig 3). Small cell과 더불어 다수 관찰된 oval cell은 진정염색질의 핵을 갖고 있었으며 기저막의 발달과 함께 비교적 세포질이 풍부하였다. 실험 7주에 관찰된 어떤 small cell은 세포질내에 rough endoplasmic reticulum(RER)의 확장, 중식과 cisternae 내에는 전자밀도가 높은 물질로 가득 차있는 소견이 관찰되기도 하였다. 또한 비교적 분화가 잘된 ductlike oval cells이 모여서 세단관을 형성하는 것이 자주 관찰되었는데 그 내강은 microvilli가 거의 없는 평활한 상태를 나타내고 있었다. 실험 11주의 담관암 상피세포 사이에서 관찰된 소견으로써 이질염색질의 핵과 세포질내에 mitochondria와 polyribosome 중식의 특징을 지닌 활성을 나타내는 어떤 small cell들은 intercellular space가 넓고 세포질이 유두상으로 돌기를 내고 있는 형태를 보였다 (Fig 4). 또한 주위의 담관세포들은 세포와 세포사이에 interdigitation이 잘 발달되어 있었다. 실험 11주에 관찰된 담관암 상피세포들은 핵이 크고 합입되어 나타났으며 세포질내에는 polyribosome과 사립체가 잘 발달되어 있었다. 또한 세포사이에서는 desmosome과 interdigitation이 잘 관찰되었다.

면역조직화학적 소견 : 실험초기부터 실험종료시 까지 관찰되었던 small cell 및 oval cell과 그리고 cholangiofibrosis, 담관종, 담관암이 형성된 예의 상피세포에서 α -fetoprotein과 cytokeratin의 발현정도는 Table 1 및 2에서 표시한 바와 같다.

α -fetoprotein의 발현 : Small cell의 경우 1군 모두

에서 실험 4주부터 실험 15주까지 시간의 경과에 차이없이 강한 양성반응이 발현되었으며 oval cell의 경우 실험 4주에서는 많은 예에서 양성반응이 관찰되었으나 실험 7주와 11주에 실험 4주에서와 동일하거나 약간 강한 양성반응을 보이다가 실험 15주에는 양성반응을 보이는 수가 현저히 감소되었다.

Small cell과 oval cell의 α -fetoprotein 양성반응은 주로 비후된 담관벽의 주위에서 중식한 세포와 림프소질의 형태로 중식한 부위의 변연부쪽에서 관찰되었다(Fig 5). Oval cell이 몇개씩 모여서 rosette 형태로 배열된 ductlike oval cells의 대부분은 양성반응이 관찰되지 않았으나 독립적으로 또는 몇개의 세포가 군을 형성한 oval cell에서는 강한 양성반응이 발현되었다(Fig 6). 담관섬유증, 담관종 및 담관암의 상피세포 및 기존의 담관상피세포에서는 양성반응이 관찰되지 않았으나 이들 세포사이에서 중식된 small cells과 oval cells에서는 강한 양성반응이 관찰되었다 (Fig 7).

Cytokeratin의 발현 : Cytokeratin에 대한 양성반응은 기존의 담관상피세포와 oval cell 및 담관섬유증, 담관종, 담관암의 상피세포에서 양성반응이 관찰되었다. 그러나 실험초기부터 실험종료까지 중식되었던 small cell에서는 양성반응이 관찰되지 않았다(Fig 8).

Oval cell에서의 cytokeratin의 양성반응은 림프소질과 유사하게 중식된 곳에서는 관찰되지 않았으나 oval cell이 rosette 형태로 배열되거나 또는 몇개의 세

Table 1. Expression of α -fetoprotein in small cell, oval cell, and epithelia of cholangiofibrosis, cholangioma and cholangiocarcinoma

Group	Weeks	No.of animal	Small cell	Oval cell	Cholangiofibrosis	Cholangioma	Cholangiocarcinoma
I	4	5	++	++	NO	NO	NO
	7	5	++	++	—	—	—
	11	6	++	++	—	—	—
	15	6	++	++	—	—	—

– : absent, + : weak, ++ : strong, NO : not occurred.

Table 2. Expression of cytokeratin in small cells, oval cells, and epithelia of cholangiofibrosis, cholangioma and cholangiocarcinoma

Group	Weeks	No.of animal	Small cell	Oval cell	Cholangiofibrosis	Cholangioma	Cholangiocarcinoma
II	4	5	—	—	NO	NO	NO
	7	5	—	+	+++	+++	NO
	11	6	—	+	+++	+++	++
	15	6	—	+	+++	+++	++

– : absent, + : weak, ++ : moderate, +++ : strong, NO : not occurred.

포들이 뭉쳐져 있는 곳에서는 대부분이 양성반응을 나타내었으며 독립적으로 존재하는 몇몇 oval cells에서도 간혹 양성반응이 관찰되었다(Fig 9). 담관섬유증 또는 담관종이 형성된 부위에서 이들 상피세포 사이에 독립적으로 존재하는 oval cell에서는 약한 양성반응이 관찰되었다. 담관섬유증 및 담관종을 이루고 있는 상피세포에서는 강한 양성반응이 관찰되었다(Fig 10). 담관암을 이루고 있는 상피세포에서도 중등도 또는 강한 양성반응이 관찰되었으며 낭상으로 확장된 담관암상피세포에서는 양성반응이 미약하게 나타났다.

고 찰

본 실험에서는 간흡충으로 담관암 유발시 발암성 화학물질인 dimethylnitrosamine(DMN)을 개시인자로 투여하였으며 실험개시 11주에 17%, 15주에는 67%의 담관암 발생이 관찰되었다. 이와같은 담관암의 발생은 Lee 등¹⁰과 Thamavit 등¹¹의 보고와 일치하였으나 발생율에 있어서는 약간의 차이를 보였다. 그러나 본 실험의 결과 Lee 등¹⁰보다 DMN 처리기간이 짧고 Thamavit 등¹¹보다는 짧은 실험기간과 낮은 농도의 DMN 처리로도 담관암을 유발시킬 수 있음을 알 수 있었다.

지금까지 많은 발암모델에서 간암의 전구체로서 결절을 중요시하여 전암세포 집단에 대해서 집중적인 연구가 계속되어 왔다. 따라서 대부분은 암발생 과정에서 여러가지 효소의 변화를 나타내는 간장의 foci나 nodule의 발육을 관찰하는데 초점을 맞추었다^{12,13}. 그러나 diethylnitrosamine을 간세포의 과사가 나타날 수 있는 과용량으로 투여하거나¹⁴, 인체에서 알콜성 간염과 같은 간장질환이 있거나¹⁵, 실험동물에서 부분적인 간절제수술 후에 볼 수 있는 재생성 변화¹⁶에서도 간장의 문맥부주위에 간실질세포와 구분되는 oval cell이 출현한다는 사실이 보고되었다¹⁷.

본 실험에서는 실험시작 후 4주에 부검한 경우 문맥부주위에 oval cell 집단의 증식을 관찰할 수 있었으며 11주 증식은 11주까지 계속 증가되어 Price 등¹⁸의 결과와 같은 양상을 보였다. 이¹⁸는 본 실험에서와 같은 담관암 모델에서 발암과정을 관찰하면서 bile ductlike cell의 증식에 대해 보고하고 Grisham과 Porta¹⁹가 보고한 oval cell과 동일한 세포라고 하였다. 이러한 oval cell이 본 실험에서는 실험 4주에 문맥부주위에서 세포질이 비교적 풍부하고 핵이 난원형인 상태로 단독으로 증식하는 경우가 많았으며 간혹 몇

개씩 모여 군집을 이루고 있거나 불분명한 내강을 형성하고 있는 것이 관찰되었다. 실험 7주에는 단독으로 존재하는 oval cell 보다는 소담관을 형성하고 있는 경우가 더 자주 관찰되었으며 그 주위에는 결합조직의 증식이 심한 섬유화가 관찰되기도 하였다.

최근에 다양한 상피세포암의 기원으로서 stem cell의 존재가 거론되고 있는 것과 같이 간장에서도 stem cell 존재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 간암 발생에서 stem cell의 존재를 주장하는 것은 발생학적 측면에서 비롯된 것으로, oval cell이 간세포와 담관세포로 분화할 수 있다는 연구결과들에 근거한 것이다²⁰. 랫드에 화학물질 투여로 나타나는 oval cell뿐만 아니라 비발암 물질로 처리했을 때 발생하는 종식성 담관상피세포들은 정상 간장의 담관상피세포와 많은 부분에서 유전적 표현 형질을 공유한다²¹. 그러나 발암물질 투여에 의해 증식된 oval cell은 albumin, α -fetoprotein, glucose-6-phosphatase 등의 유전형질을 나타낸다는 점에서 구별되며, 이러한 생화학적 유전형질을 보이는 특성이 간세포와 유사하여 transitional cell이라고도 불려지고 있다.* 많은 연구자들은 간세포 종양의 기원은 간장에 존재하는 stem cell에서 유래될 것으로 생각하고 있다^{22,23}. Grisham²⁴은 oval cell이 사실상 facultative stem cell이라 하였는데 그 이유는 다양한 간발암 화학물질을 투여 할 때 심한 간장의 손상시만 활성화되어 증식하기 때문이라고 하였다. Sell²⁵은 간장에서 추정상의 stem cell을 재검토하면서 간세포와 담관세포로 분화할 수 있는 미성숙한 multipotent stem cell의 존재를 보고한 바 있다. 본 실험에서 실험개시 후 4주에 부검시 문맥주변에서 small cell들이 림프소결과 같은 형태로 증식한 소견이 관찰되었다. 이러한 small cell은 담관암이 발생한 후 실험종료시까지 계속해서 존재하는 것으로 관찰되어 oval cell(bile ductlike cell)과 밀접한 관련성이 있는 것으로 생각되었다. 실험초기에 관찰된 small cell은 크기가 다양하고 놓여진 핵을 갖고 있었으며, 전자현미경 관찰시 주위 세포들과 intercellular connection을 이루고 있었고 지상돌기가 발달되어 있었다. 어떤 small cell의 핵은 이질염색질로 놓여되었고 세포질에는 세포소기관이 거의 없었으며 polyribosome이 풍부하였다. 또 다른 세포는 RER이 확장 증식되어 그 내강에는 전자밀도가 높은 물질이 가득 차 있었다. 이러한 소견으로 보아 small cell은 미숙한 세포라고 판단되며 또한 세포의 증식과 분열에 필요한 내인성 단백질이 활발하게 합성되고 있음을 짐작할 수 있었다. 즉, small cell의 빠른 성장과 분화가 이루어지고 있음을 추정할 수 있다. 본 실험에서의 결과로 미루어 볼 때 이 세포들이

Sell 등⁹과 Sell과 Dunsford¹⁰가 주장하는 추정상의 stem cell일 것으로 생각되었다.

Hixson과 Allison¹¹에 의하면 oval cell은 항원적으로 분명히 다르게 반응하는 적어도 3종류 이상의 세포 아군으로 구성되어 있으며 이러한 세포집단에는 bile duct cells과 간세포로 분화할 수 있는 어떤 stem cell 집단이 포함될 것이라고 하였다. Dunsford와 Sell¹²은 랫드의 neoplastic and preneoplastic 간장에서 oval cell과 간세포에 대한 2종의 단크론 항체에 관해서 보고하였는데 Solt-Farber 모델에서 서로 다른 단계에 존재하는 oval cell과 bile duct에 서로 다르게 반응하는 것으로 알려졌다. α -fetoprotein은 원발성 간암에서 간세포 분화의 독특한 marker이고 cytokeratin은 담관 상피세포 분화의 독특한 marker이다¹³. α -fetoprotein은 태생기의 주요 혈청단백질로 성숙한 개체에서는 거의 검출되지 않으나 간발암 물질에 노출되면 초기에 현저히 증가한다¹⁴. 이러한 α -fetoprotein의 증가는 oval cell의 증식에 의한 것으로 보고되었다¹⁵. α -fetoprotein 생산과 방출은 세포주기¹⁶, 세포증식능력¹⁷ 및 세포분화¹⁸와 밀접한 관계가 있다는 것이 밝혀졌다. 또한 cytokeratin은 상피세포의 intermediate filament를 구성하는 단백질로 서로 다른 조직의 상피세포의 특징을 연구하고 그들의 분화와 기원을 연구하는 도구로 유용하다고 하였다.

본 실험에서도 small cell과 oval cell의 분화와 기원을 알아보기 위해서 α -fetoprotein과 cytokeratin의 면역조직화학적 관찰을 실시한 결과 small cell은 α -fetoprotein에 대한 강한 양성반응을 나타내었다. Ductlike oval cell에서는 cytokeratin에는 강한 양성반응을 보인 반면에 α -fetoprotein에 대한 반응을 보이지 않은 경우가 대부분이었다. 담관섬유종과 담관암 상피세포는 cytokeratin에는 반응하였으나 α -fetoprotein에는 반응하지 않았다. 이러한 결과로 보아 small cell은 oval cell에 비해서 분화정도가 낮은 세포라 생각되며 많은 연구자들이 생각하는 추정상의 stem cell이라고 판단되었다. 따라서 본 실험에서 DMN과 간흡충 투여로 인한 담관암의 발생은 small cell에서 비롯되어 oval cell로 분화된 후 이것은 다시 세담관을 형성하는 ductlike oval cell로 더욱 분화되어 발생하는 것으로 믿어진다.

결 론

햄스터에 간흡충(*Clonorchis sinensis*)를 감염시킨 다음, DMN을 음수로 투여하여 유발되는 담관암의

발생과정을 병리조직학적, 전자현미경적, 면역조직화학적 방법으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었

1. 담관암은 실험 11주에 6예 중 1예(17%)가 발생되었으며 15주에는 6예 중 4예(67%)가 발생하였다.
2. Small cell과 oval cell은 실험 4주부터 문맥부주위에서 증식하기 시작하여 실험 11주에 최대에 달하였으며 그 후부터 점차 감소하였다.
3. 많은 수의 small cell과 oval cell에서 α -fetoprotein의 강한 양성반응이 확인되었으나 oval cell이 rosette 형태로 밀집된 ductlike oval cell에서는 미약한 양성반응이 확인되었다.

4. 대부분의 small cell과 oval cell은 cytokeratin의 음성반응을 나타냈으나 ductlike oval cell에서는 미약한 양성반응이, 담관암세포에서는 중정도의 양성반응이 확인되었다.

이상을 종합하여 볼 때 간흡충에 의한 담관암의 발생은 문맥부주위에 증식된 small cell에서 비롯된 oval cell이 ductlike oval cell로 분화과정을 거쳐 담관암세포로 진행된다고 판단되었다.

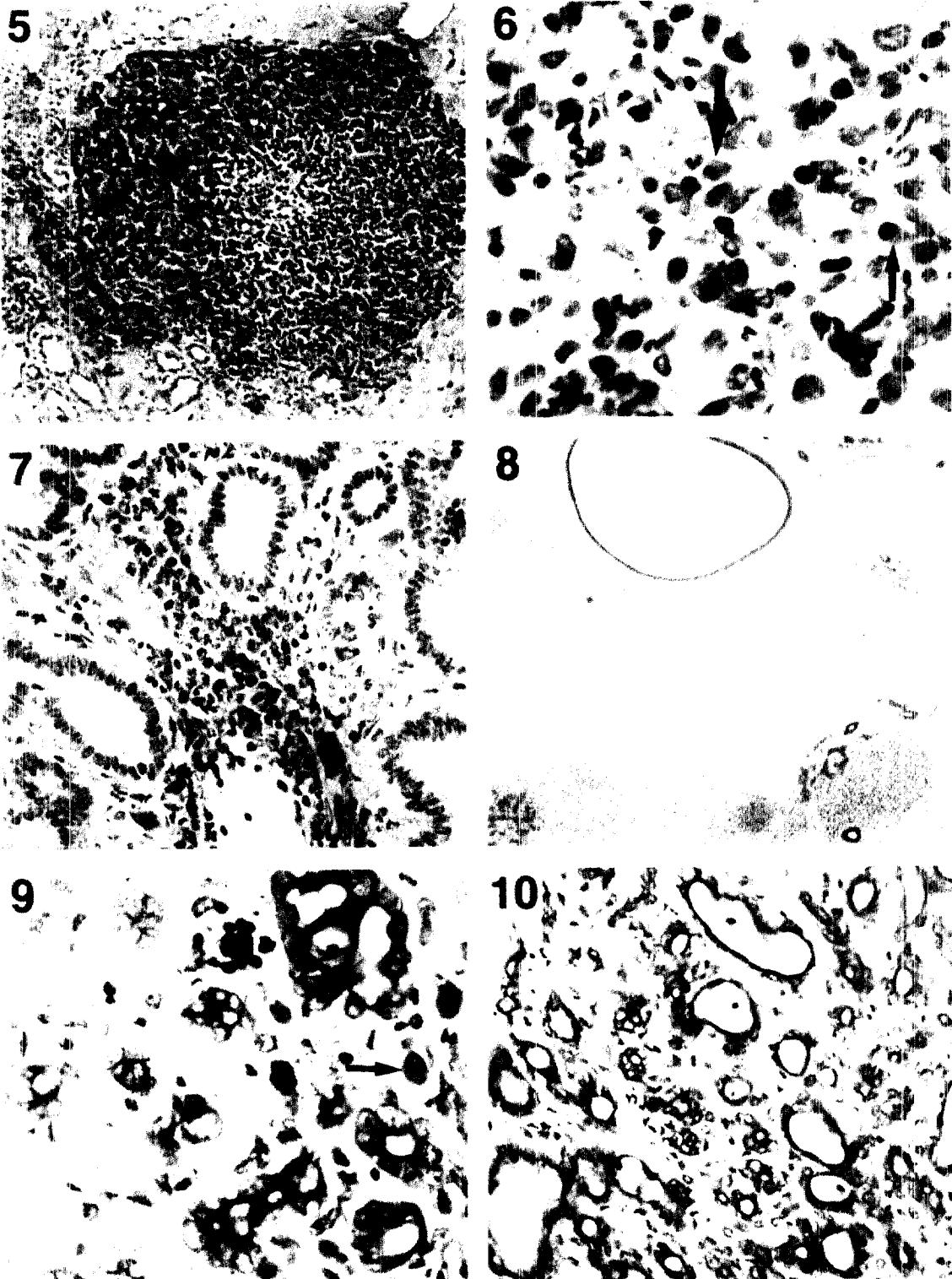
참 고 문 헌

1. Belamaric J. Intrahepatic bile duct carcinoma and *C sinensis* infection in Hong Kong. *Cancer* 1973; 31: 468~473.
2. Carthew P, Edwards RE, Hill RJ, Evans JG. Cytokeratin expression in cells of the rodent bile duct developing under normal and pathological conditions. *Br J Exp Path* 1989; 70: 717~725.
3. Dempo K, Chisaka N, Yoshida Y, Kaneko A, Onoe T. Immunofluorescent study on α -fetoprotein producing cells in the early stage of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene carcinogenesis. *Cancer Res* 1975; 35: 1282~1287.
4. Dunsford HA, Sell S. Production of monoclonal antibodies to preneoplastic liver cell populations induced by chemical carcinogens in rats and to transplantable Morris hepatomas. *Cancer Res* 1989; 49: 4887~4893.
5. Dunsford HA, Sell S, Chisari FV. Hepatocarcinogenesis due to chronic liver cell injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Cancer Res* 1990; 50: 3400~3407.
6. Evarts RP, Nakatsukasa H, Marsden ER, Hsia CC, Dunsford HA, Thorgeirsson SS. Cellular and Molecular changes in the early stages of chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Cancer Res* 1990; 50: 3439~

Legends for figures

- Fig 1.** Liver of the hamster infected with *C. sinensis* and followed by treatment with DMN, 4 weeks after treatment, showing nodular hyperplasia of small cells(large arrows) and oval cells(small arrows). H&E, $\times 400$.
- Fig 2.** Liver of the hamster infected with *C. sinensis* and followed by treatment with DMN, 11 weeks after treatment, showing cholangiocarcinoma Note irregularly proliferated stratified tumor epithelia and "gland in gland"(arrow). H&E, $\times 400$.
- Fig 3.** Electron micrograph of small cells and oval cells of liver in the hamster infected with *C. sinensis* and followed by treatment with DMN, 4 weeks after treatment. A small cell(s) has poor cytoplasm and few cytoplasmic organelles and more condensed nuclear hetero-chromatin, and another small cells are rich in dilated RER(r). Oval cell(o) shows euchromatic nucleus and basal lamina(arrow). Uranyl acetate & lead citrate stain, $\times 6,400$.
- Fig 4.** Electron micrograph of small cell and cholangiocarcinoma cells of liver in the hamster infected *C. sinensis* and followed by treatment DMN, 11 weeks after experiment. Abundant mitochondria and free ribosomes are remarkable in the activated small cell with heterochromatic nucleus. Distended intercellular spaces(s) are also obvious between cholangiocarcinoma cells. Interdigititation of cytoplasms of cholangiocarcinoma cells are obvious(arrow). Uranyl acetate & lead citrate stain, $\times 6,400$.
- Fig 5.** Liver of the hamster infected with *C. sinensis* and followed by treatment with DMN, 7 weeks after treatment showing α -fetoprotein positive reaction in periportal nodular hyperplastic cells. ABC stain, $\times 100$.
- Fig 6.** Liver of the hamster infected with *C. sinensis* and followed by treatment with DMN, 11 weeks after treatment, showing α -fetoprotein positive reaction in the small cell(small arrow) and individual oval cell(large arrow), but not in ductlike oval cells. ABC stain, $\times 400$.
- Fig 7.** Liver of the hamster infected with *C. sinensis* and followed by treatment with DMN, 15 weeks after treatment, showing α -fetoprotein positive reaction in the proliferated small cells and oval cells among cholangiocarcinoma cells. ABC stain, $\times 400$.
- Fig 8.** Liver of the hamster infected with *C. sinensis* and followed by treatment with DMN, 7 weeks after treatment, showing cytokeratin positive reaction in intact ductal epithelia and epithelia of proliferative bile ductule, but not in nodular hyperplastic cells. ABC stain, $\times 40$.
- Fig 9.** Liver of the hamster infected with *C. sinensis* and followed by treatment with DMN, 11 weeks after treatment, showing cytokeratin positive reaction in most of ductlike oval cells and some individual oval cells(arrow). ABC stain, $\times 400$.
- Fig 10.** Liver of the hamster infected with *C. sinensis* and followed by treatment with DMN, 7 weeks after treatment, cytokeratin positive reaction in cholangioma cells. ABC stain, $\times 200$.





7. Farber E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetyl-amino-fluorene and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 1956; 16: 142~148.
8. Fu XX, Su CY, Lee Y, Hintz R, Biempica L, Snyder R, Rogler CE. Insulin-like growth factor II expression and oval cell proliferation associated with hepatocarcinogenesis in woodchuck hepatitis virus carriers. *J Virol* 1988; 62: 3422~3430.
9. Goldfarb S. A morphological and histochemical study of carcinogenesis of the liver in rats fed 3-methyl-4-dimethylamino-azobenzene. *Cancer Res* 1973; 33: 1119~1128.
10. Goodman ZD, Ishak KG, Langloss JM, Sesterhenn IA, Rabin L. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma : A histologic and immunohistochemical study. *Cancer* 1985; 55: 124~135.
11. Grisham JW. Cell types in long-term propagable cultures of rat liver. *Ann NY Acad Sci* 1980; 349: 128~137.
12. Grisham JW, Porta EA. Origin and fate of proliferated hepatic ductal cells in the rat : Electron Microscopic and autoradiographic studies. *Exp Molecul Path* 1964; 3: 242~261.
13. Hixson DC, Allison JP. Monoclonal antibodies recognizing oval cells induced in the liver of rats by N-2-fluorenylacetamide or ethionine in a choline-deficient diet. *Cancer Res* 1985; 45: 3750~3760.
14. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of Avidin-biotin peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques : A comparison between ABC and unlabeled antibody(AAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577~580.
15. Inaoka Y. Significance of the so-called oval cell proliferation during azodye hepatocarcinogenesis. *GANN* 1967; 58: 355~366.
16. Kim YI, Park CK, Kim JR, Chang JJ. Primary malignant epithelial neoplasms of the liver. *Kor J Cancer Res* 1980; 12: 33~53.
17. Kim YI, Yu ES, Kim ST. Intraductal variant of peripheral cholangiocarcinoma of the liver with Clonorchis sinensis infection. *Cancer* 1989; 63: 1562~1566.
18. Lee JH, Rim HJ, Bak UB. Effects of Clonorchis sinensis infection and dimethylnitrosamine administration on the induction of cholangiocarcinoma in syrian golden hamsters. *Korean J Parasit* 1993; 31(1): 21~30.
19. Price JM, Harmen JW, Miller EC, Miller JA. Progressive microscopic alterations in the liver of rats fed the hepatic carcinogens 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene and 4'-fluoro-o-4-dimethyl-aminoazobenzene. *Cancer Res* 1952; 12: 192~200(cited from Sirica et al., 1990).
20. Pugh TD, Goldfarb S. Quantitative histochemical and autoradiographic studies of hepatocarcinogenesis in rat fed 2-acetylaminofluorene followed by phenobarbital. *Cancer Res* 1978; 38: 4450~4457.
21. Schwartz DA. Cholangiocarcinoma associated with liver flukes infection ; A preventable source of morbidity in Asian immigrants. *Am J Gastroenterol* 1986; 81: 76~79.
22. Sell S. Comparison of oval cells induced in rat liver by feeding N-2-fluorenylacetamide in a choline-devoid diet and bile duct cells induced by feeding 4,4-diaminodiphenylmethane. *Cancer Res* 1983; 43: 1761~1767.
23. Sell S. Is there a liver stem cell. *Cancer Res*, 1990; 50: 3811~3815.
24. Sell S, Becker FF. Guest editorial : alpha-fetoprotein. *J Natl Cancer Inst* 1978; 60: 19~26.
25. Sell S, Dunsford HA. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Am. J Pathol* 1989; 134: 1347~1363.
26. Sell S, Hunt JM, Knoll BJ, Dunsford HA. Cellular events during hepatocarcinogenesis in rats and the question of premalignancy. *Adv Cancer Res* 1987; 48: 37~111.
27. Sell S, Leffert HL, Shinozuka H, Lombardi B, Gochman N. Rapid development of large numbers of alpha-fetoprotein-containing "oval" cells in the liver of rats fed N-2-fluorenylacetamide in a choline devoid diet. *GANN* 1981a; 72: 479~487.
28. Sell S, Osborn K, Leffert HL. Autoradiography of "oval cells" appearing rapidly in the livers of rats fed N-2-fluorenylacetamide in a choline devoid diet. *Carcinogenesis* 1981b; 2: 7~14.
29. Sell S, Skelly H, Leffert HL, Muller-Eberhard U, Kida S. Relationship of the biosynthesis of α -fetoprotein, albumin, hemopexin, and haptoglobin to the growth state of fetal rat hepatocyte cultures. *Ann NY Acad Sci* 1975; 259: 45~58.
30. Sher L, Iwatsuki S, Lebeau G, Zajko AB. Hilar cholangiocarcinoma associated with clonorchiasis. *Dig Dis*

- Sci 1989; 7: 1121~1123.
31. Shinozuka H, Sells M.A, Katyal SL, Sell S, Lombardi B. Effects of a choline-devoid diet on the emergence of glutamyl-transpeptidase positive foci in the liver of carcinogen treated rats. *Cancer Res* 1979; 39: 2515~2521.
 32. Shipova LY, Gleberman AS. AFP-synthesis induction in mouse hepatomas. *Int J Cancer* 1985; 35: 135~138.
 33. Sirica AE, Cihla HP. Isolation and partial characterizations of oval and hyperplastic bile ductular cell-enriched populations from the livers of carcinogen and noncarcinogen-treated rats. *Cancer Res* 1984; 44: 3454~3466.
 34. Sirica AE, Mathis GA, Sano N, Elmore LW. Isolation culture and transplantation of intrahepatic biliary epithelial cells and oval cells. *Pathobiology* 1990; 58: 44~64.
 35. Thamavit W, Bhamarapravati N, Sahaphong S, Vajrasthira S, Angsubhakorn S. Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini*-infected syrian golden hamsters. *Cancer Res* 1978; 38: 4634~4639.
 36. The liver cancer study group of Japan: Primary liver cancer in Japan sixth report. *Cancer* 1987; 60: 1400~1411.
 37. Tournier I, Legres L, Schoevaert D, Feldmann G, Bernau D. Cellular analysis of α -fetoprotein gene activation during carbon tetrachloride and D-galactosamine-induced acute liver injury in rats. *Lab Invest* 1988; 59: 657~665.
 38. Tsukada Y, Hirani H. α -fetoprotein and albumin synthesis during the cell cycle. *Ann NY Acad Sci*, 1975; 259: 37~44.
 39. Uchida T, Peters RL. The nature and origin of proliferated bile ductules in alcoholic liver disease. *Am J Clin Pathol* 1983; 79: 326~333.
 40. Yaswen P, Goyette M, Shank P.R, Fausto N. Expression of c-Ki-ras, c-Ha-ras, and c-myc genes in rat liver tumors. *Mol Cellular Biol* 1985; 5: 780~786.
 41. 이재현: 간흡충 감염 햅스터에 있어서 담관의 발암 기전에 관한 연구. 수의학 박사학위 논문, 1993.