

7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA) 투여에 의한 랫드 유선암 모델에서 *ex-vivo* 면역치료 효과

정자영* · 김옥희 · 이영순¹

식품의약품안전청, 병리부, ¹서울대학교, 수의과대학

Effects of the *ex-vivo* Immunotherapy on the Mammary Gland Tumorigenesis Induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in rats

Ja Young Jeong*, Ok Hee Kim and Yong Soon Lee¹

Department of Pathology, Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-Dong,
Eunpyung-Gu, Seoul, 122-704, Korea

¹College of Veterinary Medicine, Seoul Nat'l University, Suwon 441-744, Korea

(Received september 12, 1998)

(Accepted November 11, 1998)

ABSTRACT : This study was examined on the effect of *ex-vivo* immunotherapy in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary carcinogenesis. Sprague-Dawley female 40 rats were divided into four groups. As a positive control, Group I was intubated with DMBA, 5 mg/100 g body weight and single dose, at experimental onset. Group II was treated *ex-vivo* immunotherapy with polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I : C) and Group III was treated with Interleukin-2 (IL-2). Group IV was negative control. All rats were sacrificed at 16 weeks after DMBA intubation. Mammary gland wet weight, dry fat free tissue weight, incidence of tumor, and the number of lobules, alveolar buds, terminal end buds, and terminal ducts were examined. Morphological changes of the mammary gland after treated with DMBA were analyzed by whole mount and histopathological method. As results, the induced mammary tumors of Group I, II and III were 60%, 33% and 0%, respectively. Histopathological types of induced-mammary tumors were adenoma, adenocarcinoma and carcinosarcoma. In analysis of the whole mount method, the number of the terminal end buds, terminal ducts and lobules were significantly lower in Group II ($p < 0.01$) and III ($p < 0.01$) than DMBA alone treated Group I. In microscopic observation, hyperplastic alveolar nodules were significantly lower in Group III than Group I ($p < 0.01$). In conclusion, IL-2 had strong inhibitory effect on the mammary gland tumorigenesis induced by DMBA in rats. Whole mount method may be a useful technique to assess the mammary carcinogenesis. Moreover, hyperplastic alveolar nodules were very sensitive parameter to assess the mammary carcinogenesis.

Key Words : Rat mammary gland, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), Whole mount method, Terminal end buds, Poly I : C, Interleukin-2, *ex-vivo* immunotherapy

I. 서 론

사람 유방암의 동물모델로서 유용하게 이용되고 있는 것은 랫드의 유선암 모델이다. 특히 Sprague-Dawley계 랫드에서 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)으로 유발한 유선암은 사람 유방암과 조직학적 특성이 유사한 것으로 보고되고 있어(Russo *et al.*, 1990; Russo and

Russo, 1993) 사람 유방암 발생의 예방 물질 검색(Pereira *et al.*, 1996; Hirose *et al.*, 1997)이나 기전연구(Haslam and Bern, 1977; Russo and Russo, 1978)에 많이 이용되고 있다. 조직학적 특성 이외에도 랫드의 유선암은 호르몬 의존적인 발생양상 그리고 출산 경험이 없는 랫드에서의 높은 발생률 등도 사람의 유방암 발생양상과 유사한 공통점이다(Russo and Russo, 1988; Russo and Russo, 1993). 랫드 유선암 모델은 일회 투여에 의해 비교적 짧은 기간에 종양 발생률이 높게 나타나며

*To whom correspondence should be addressed

(Russo and Russo, 1978), 종괴의 육안적 관찰 및 촉진 등이 가능한 장점이 있어서 랫드의 유선은 화학물질을 노출시킨 후 발암성 및 암 발생 예방 효과를 조사하는 가장 흔한 장기 중의 하나이다. 또한 발암화 과정에서 나타나는 랫드 유선의 전암병변으로는 terminal end bud 및 terminal duct의 수적 증가 그리고 hyperplastic alveolar nodule의 출현 등이다(Russo and Russo, 1987; Russo and Russo, 1996; Ball, 1998). 이러한 특성은 정상적인 유선의 조직처리에 의해서도 확인될 수 있지만, 유선의 발생과정 연구에 이용되고 있는 whole mount method(Strum, 1979; Cooper and Sutcliffe, 1991)를 응용하면, 더욱 쉽고 정확한 결과를 얻을 수 있으며, 본 연구에서 처음으로 이 방법을 응용하였다.

한편 암의 면역치료(adoptive immunotherapy)는 기존의 화학요법에 의한 항암제의 내성발현과 정상조직에의 독성유발이라는 큰 한계점을 극복하며, 종양세포만을 살해하거나, 용해시킬 수 있는 정상적인 체내의 면역기능에 의존한다는 장점을 가지고 있다(Mertelsmann, 1995; Chang and Shu, 1996). 따라서 이러한 특징 때문에 암의 면역치료법은 현재 '4차원의 치료법'이라 명명되고 있으며, 연구자 및 임상에서 많은 관심이 집중되고 있다. 본 연구에서는 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 투여에 의하여 랫드 유선암이 발생하는 과정에서 분리한 말초혈액 림프구에 interleukin-2(IL-2) 및 polyinosinic-polycytidylic acid(Poly I : C)를 *ex-vivo* 처치한 면역치료법이 랫드의 유선암 발생 및 성장억제에 미친 효과에 대하여 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 특정 병원체 부재(Specific Pathogen Free, SPF) 8주령의 암컷 Sprague-Dawley계 랫드(국립독성연구소) 40마리를 이용하였다. 사육조건은 온도 $23 \pm$

2°C , 상대습도 $55 \pm 5\%$ 그리고 명암교대 12시간을 각각 유지하였다. 모든 동물은 분양 후 사육실내에서 1주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 또한 사료(신촌사료, 서울)와 음수는 자유로이 급식 시켰고, polycarbonate 케이지에 3마리씩 넣어 사육하였다.

2. 실험설계

4개의 실험군을 두었으며, 그 각각의 처치는 Table 1과 같이 하였다.

즉 제 I군은 유선암 유발을 위한 양성 대조군으로서, 실험 개시일에 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA, Sigma, U.S.A.)을 체중 100 g당 5 mg씩 경구로 1회 투여하였다. 제 II군은 polyinosinic-polycytidylic acid(Poly I : C, Sigma, U.S.A.)를 이용하여 *ex-vivo* 면역치료 방법을 적용한 군으로서, 제 I군과 같은 방법으로 DMBA를 투여하고, 12주 및 14주째에 각각의 랫드에서 심장채혈 방법으로 5~6 ml의 혈액을 채취한 다음 말초 혈액 림프구(peripheral blood lymphocytes, PBL)를 분리하고, 분리된 림프구($10^3/\mu\text{l}$) 2 ml에 polyinosinic-polycytidylic acid(Poly I : C) 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 추가하여 CO_2 배양기에서 3시간 동안 림프구의 활성을 강화시킨 후 다시 동물의 혈관 내로 주입하였다. 제 III군은 DMBA 처치 후, 제 II군과 같은 방법으로 총 림프구를 분리한 후, 분리된 림프구($10^3/\mu\text{l}$) 2 ml에 interleukin-2 (IL-2, human recombinant, Sigma, U.S.A.)를 25 U/ml 추가하여, II군과 같은 방법으로 처치하였다. 제 II군과 III군은 이와 같은 처치를 실험 개시 12주 및 14주째에 각각 두번 실시한 후, 16주 후 부검하였다. 제 IV군은 무처리 대조군으로 설정하였다.

3. PBL의 분리 및 *ex-vivo* 처치

말초혈액으로부터 림프구를 분리하기 위하여 헤파린(100 I.U./ml blood) 처리된 10 ml 주사기로 5~6 ml의 혈액을 심장 채혈하여, PBS(Ca^{++} , Mg^{++} free)로 동량

Table 1. Experimental design for the mammary gland tumorigenesis induced by 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene in rats

Groups	Ini. No	Carcinogen Treatment	<i>Ex-vivo</i> Immunotherapy (12- & 14-week, respectively)	Autopsy at
I	10	DMBA	Non-treatment	16 weeks
II	10	DMBA	2 ml PBL ($10^3/\mu\text{l}$)+25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Poly I : C → 3 hours incubation → i.v.	16 weeks
III	10	DMBA	2 ml PBL ($10^3/\mu\text{l}$)+25 U/ml IL-2 → 3 hours incubation → i.v.	16 weeks
IV	10	Saline	Non-treatment	16 weeks

Ini. No: Initial number of animals, DMBA: 5 mg/100 g b.w., i.g., single dose, Poly I : C: polyinosinic-polycytidylic acid, IL-2: interleukin-2.

회석한 다음, 원심 분리관에 ficoll-hypaque (LKB, Sweden) 5 ml을 넣은 다음 그위에 회석된 동량의 혈액을 중층하고, 1500 rpm으로 20분간 원심하여 림프구를 분리 하였다. 이렇게 분리된 림프구는 PBS(-)로 2회 씻어낸 후, 100 unit penicillin, 100 µg streptomycin, 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate와 10 mM HEPES를 첨가한 10% 소태아 혈청이 들어 있는 RPMI 1640 배지에 다시 부유 시켰다. 부유액에서 150 µl를 채취하여 H*1 system(Technicon Co., U.S.A)을 이용하여 분리된 PBL의 수를 계산하고, 분리된 림프구($10^5/\mu\text{l}$) 2 ml에 polyinosinic-polycytidylic acid(Poly I : C)는 25 µg/ml를, interleukin-2 (IL-2, Sigma, U.S.A.)는 25 U/ml씩 각각 추가하여, CO₂ 배양기에서 3시간 동안 림프구의 활성을 강화 시켰다. 이상의 과정에서 회수되고, 배양 유지된 림프구의 생존률을 확인하기 위하여 10 µl의 세포 부유액과 0.4% trypan blue(GIBCO, U.S.A) 10 µl를 슬라이드 위에서 잘 회석한 후 혈구 계산판(hemocytometer)을 이용하여 현미경하에서 세포의 생존율을 결정하였다. 모든 예에서 세포의 생존률이 95% 이상 유지됨을 확인하였으며, 3시간의 배양 후 10% 소태아 혈청이 들어 있지 않은 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다. 이상의 과정으로 활성강화시킨 PBL은 즉시 랫드의 혈관내로 다시 투여 하였다.

4. 유선의 장기중량 측정

유선의 장기 중량 측정은 좌·우 및 흉부와 복부를 구분하여 측정하였으며, 부검시 측정된 wet weight와 유선에서 지방을 제거한 후 건조시킨 dry weight의 중량을 각각 측정하였다. Wet weight의 측정은 랫드의 모든 유선을 대상으로 실시하였으며, dry weight의 측정은 왼쪽에 위치한 흉부와 복부의 유선에 한하여 측정하였다. Dry weight의 측정은 methanol/chloroform (2 : 1, v/v), 100% ethanol 그리고 diethyl ether에 각각 1주일씩 담그어 유선내 지방을 제거하고 건조한 후 무게를 측정하였다.

5. 유선의 whole mount method 및 병리조직학적 관찰

랫드의 오른쪽에서 적출한 흉부와 복부 두개의 유선에서 일부는 병리 조직처리를 위하여 10% 중성 포르말린에 고정하였고, 나머지 부분은 whole mount method에 이용하였다. 유선의 whole mount 처리를 위하여, 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정한 후, 아세톤에 3일에서 7일 정도 담가두면서 과도한 지방의 함량을 제거하였다. 이어서 70% 에탄올에 30분간 담가두었다가 0.5% methylene blue에 염색하고, 에탄올 35%에서 100%까지 단계별로 탈수과정을 거친 후, xylene으로 조직을 청정화 시킨다. Methylene blue에 염색된 유선의 조직을 세절하여 봉입한 후 관찰하면 된다. 한편, 유선의 병리조직학적 검사를 위하여 고정된 유선을 자동조직 처리기(MVP II, Laboratory Instruments, Inc., U.S.A.)로 처리하고, 파라플라스트 폼, 4 µm의 두께로 절편 제작 그리고 hematoxylin 및 eosin 염색 후 광학현미경하에서 관찰하였다.

자료에 대한 통계적 처리는 체중, 장기무게, 및 유선의 형태변화에 대한 계량적 자료에 대하여는 ANOVA 후 구간 다중비교(Student's *t* test)를 하였으며, 혈액학적 검사 자료는 독성시험 처리프로그램인 LABCAT (Innovative Programming Associates, Inc. U.S.A)을 이용하여 구간 다중비교(Dunnett's test)를 하였다.

III. 결 과

1. 체중 및 유선의 장기중량 변화

DMBA 투여에 의한 체중의 변화는 관찰되지 않았으며, DMBA 투여 후에도 완만한 성장곡선을 나타내었다. 본 실험에서 동물의 체중 증가에 대한 구간 통계적 유의성은 인정되지 않았다. 한편, 부검시 측정된 유선의 wet weight와 지방을 제거한 후에 측정된 dry weight에 대한 장기 중량은 Table 2에 요약하였다.

Table 2. Final body weight, mammary gland wet and dry fat free weight in mammarygland tumorigenesis rats induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene

Groups	Body Weight	Wet Weight (g)				Dry Weight (mg)	
		Pec. Rt.	Pec. Lt.	Abd. Rt.	Abd. Lt.	Pec. Lt	Abd. Lt
I	356.9±59.7	0.90±0.58	0.80±0.55	3.26±1.76	2.89±1.53	86±41	240±86
II	352.1±38.2	0.78±0.44	0.79±0.45	2.70±1.11	2.58±1.22	90±40	220±110
III	361.7±29.8	0.64±0.24*	0.69±0.42	2.45±0.81*	2.33±0.78*	80±30	200±40*
IV	384.6±56.1	0.91±0.38	0.74±0.35	3.99±1.96	3.52±1.68	72±31	269±93

All values are mean±S.D.

Pec. Rt.; right pectoral part of the mammary gland, Pec. Lt.; left pectoral part, Abd. Rt.; right abdominal part, Abd. Lt.; left abdominal part.

*: Significantly different from Group IV (p<0.05).

Wet weight의 측정결과는, 처치와 관계없이 모든 유선에서 오른쪽이 왼쪽의 유선보다 더 무거운 것으로 조사되었으나, 통계적 유의성은 관찰되지 않았다. DMBA를 투여한 양성대조군과 *ex-vivo* 면역치료법을 적용한 제 II군과 III군과의 비교에 의하면, 유의성은 인정되지 않았으나, 제 II군과 III군에서 유선의 무게가 약간 감소한 것으로 나타났다. 특히 IL-2를 이용하여 *ex-vivo* 면역치료법을 적용한 제 III군의 유선무게가 가장 가볍게 조사 되었으며, 무처치 대조군과 비교해 볼 때 흉부의 오른쪽, 복부의 좌·우측 유선의 무게에서 통계적 유의차가 인정되었다($p < 0.05$). 지방을 제거한 dry weight의 결과에서는 흉부의 왼쪽 유선에서는 유의차가 인정되지 않았으나, 복부의 왼쪽 유선 중량은 무처치 대조군과 비교해 볼 때, III군에서 유의수준으로 가볍게 관찰되었다($p < 0.05$).

2. 혈액학적 자료 및 비장의 장기 중량 변화

부검시 채혈한 혈액으로 부터 혈액학적 자료, 백혈구의 감별 및 비장의 장기 무게를 측정하여 Table 3에 정리 하였다.

백혈구의 수에 있어서는 유선암 유발을 위한 양성대조군인 제 I군에서 값의 변이가 크게 나타났으나, 다른 군과의 유의차는 인정되지 않았다. 적혈구 및 이와 관련된 항목의 값들은 모든 군에서 비슷하게 나타났으며, 모두 정상범위 내에 존재하는 것으로 조사되었다. 백혈구의 감별계산에서도 모든군에서 차이가 인정되지 않았으며, 림프구는 80~85%의 범위 내에 존재하는 것으로 조사되었다. 또한 비장의 무게에 있어서는 모든군에서 통계적 유의차가 인정되지 않았고, 비교적

일정하게 조사되었다.

3. 유선암의 발생을 및 면역치료 효과

육안 및 병리조직학적으로 관찰된 유선암의 발생율은 Table 4에 정리하였다.

DMBA만을 투여한 양성 대조군인 I군에서 유선암의 발생율은 60%(6/10)이었으며, DMBA와 Poly I : C를 처치한 II군에서는 33%(3/9), 그리고 DMBA와 IL-2를 처치한 III군에서는 유선암의 발생이 관찰되지 않았다. 이상으로 보아 랫드 유선암에 대한 면역치료 효과는 III군에서 가장 확실하게 나타났으며, II군에서도 확인 되었다. 또한 본 연구에서 유발된 유선암은 DMBA가 투여된 27마리 중 9마리로 33%의 유발율로 조사되었고, 이들의 조직학적 패턴은 유선상피 세포 기원으로 adenoma 33%(3/9), adenocarcinoma 56%(5/9), 그리고 유선 상피세포와 간질세포 기원으로 carcinosarcoma 11%(1/9)가 관찰되었다.

4. 유선의 whole mount 및 병리조직학적 관찰

Whole mount에 의한 유선의 관찰에서는 발암물질 투여군과 비투여군의 형태적 차이가 뚜렷하게 나타났다. 즉 무처치 대조군의 유선은 duct의 분지 정도가 낮았으며, terminal end bud의 수가 적게 관찰된 반면 (Fig. 1), DMBA가 투여된 군에서는 duct의 분지정도가 높게 관찰되었고, 유선 말단부위 및 duct의 두께가 비후되었으며, terminal end bud 및 alveolar bud를 포함한 lobule의 수적 증가 그리고 대조군에서 관찰되지 않은 다수의 hyperplastic alveolar nodule이 관찰되었다

Table 3. Hematological data and spleen weight in mammary gland tumorigenesis rats induced by 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene

Groups	WBC ($10^3/uI$)	RBC ($10^6/uI$)	HGB (g/dl)	MCV (fl)	NEUT (%)	LYMP (%)	SPLEEN (g)
I	9.01±4.34	7.30±0.97	13.68±1.55	64.3±2.69	13.51±17.82	80.5±18.9	0.73±0.28
II	8.56±3.97	7.50±0.53	15.46±1.02	68.43±0.91	10.94±5.84	81.49±8.19	0.60±0.08
III	7.62±3.18	7.22±0.43	14.51±0.84	67.96±1.25	9.16±4.02	84.66±6.49	0.65±0.11
IV	7.51±2.15	7.78±0.38	14.50±0.67	64.49±1.89	8.06±4.01	84.21±6.93	0.71±0.17

All values are mean ± S.D.

Table 4. Mammary tumor incidence rate in rats treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and/or adoptive immunotherapy

Groups	No. Animal	Treatment	Tumor Incidence (%)	Histopathological Type
I	10	DMBA	6 (60)	Adenoma (2) ^{a)} Adenocarcinoma (3) Carcinosarcoma (1)
II	9	DMBA+Poly I : C	3 (33)	Adenoma (1) Adenocarcinoma (2)
III	8	DMBA+IL-2	0 (0)	-
IV	10	Saline	0 (0)	-

^{a)}: Number of incidence, DMBA; 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, Poly I : C; polyinosinic-polycytidylic acid, IL-2; interleukin-2.

(Fig. 2, Fig. 5, Fig. 7). 병리 조직학적 관찰 소견으로서, duct를 구성하는 세포는 외층과 내층의 세포로 구분되어 지며, 내층의 세포는 입방형에서 원주형으로 되어 있고, 외층에 존재하는 세포들은 세포질이 결여된 타원형의 myoepithelial cell 층이 둘러 싸고 있다. Alveoli는 원주형 세포의 내부층과 완전히 분화되지 못한 myoepithelial cell의 불연속적인 외부층으로 구성되



g. 1. Whole mount of mammary gland of 24-week-old virgin non-treated rat. Methylene blue, $\times 25$.



Fig. 2. Whole mount of mammary gland with lobuloalveolar outgrowth in tumor-free rat 16 weeks after DMBA intubation. Note numerous alveolar buds, lobules and thickening ducts. Methylene blue, $\times 25$.

어 관찰되었다. Terminal end bud는 전체적인 형태가 곤봉모양을 하고 있으며(Fig. 3), 3~6층의 세포로 구성되어 있고, 발암물질이 투여되지 않은 개체에서는 내부의 세포 밀도가 느슨하지만, 발암물질이 투여된 개체는 내부의 세포 밀도가 높아 내강이 유선 상피세포로 꽉 차있을 정도로 높은 밀도의 세포 덩어리로 관찰되었다(Fig. 4). 또한 발암물질 투여군에서 관찰되는 lobule 및 hyperplastic alveolar nodule는 terminal end bud에서 기원되어 발생하는 것으로 관찰되었다(Fig. 5,



Fig. 3. Whole mount of mammary gland with numerous club-shaped terminal end buds and terminal ducts. Methylene blue, $\times 25$.



Fig. 4. Histological section of terminal end buds. H&E, $\times 400$.

Fig. 6). 발암물질 투여군에서만 관찰된 hyperplastic alveolar nodule은 유즙 분비물이 내강에 꽉 차있어, 내강이 확장된 alveoli가 존재하는 경우(Fig. 9)와 유선상피 세포의 과도한 증식과 더불어 크고 작은 alveoli의 수가 증가 되고, desmoplastic reaction이 함께 나타나는 특성을 보이는 것으로 관찰되었다(Fig. 8, Fig. 10). 본 연구에서 유발된 종양은 adenoma, adenocarcinoma 그리고 carcinosarcoma가 관찰되었다. Adenoma의 조직

학적 소견으로는 papillary, tubular 그리고 lactating 패턴이 모두 혼재하여 나타났다. 유선상피 세포의 현저한 증식으로 alveolar 또는 tubular 구조를 이루고 있으며, 정상보다 약간 증가된 결합조직이 이들 구조 주위를 감싸고 있는 것으로 관찰되었다. 악성의 유선상피세포 종양은 모두 ductal carcinoma로서 cribriform 과 papillary 패턴이 관찰되었다(Fig. 11). 또한 유선상



Fig. 5. Whole mount of mammary gland with alveolar buds and lobules. Methylene blue, $\times 40$.



Fig. 7. Whole mount of mammary gland of DMBA intubation rat showing lobules and hyperplastic alveolar nodules. Methylene blue, $\times 25$.

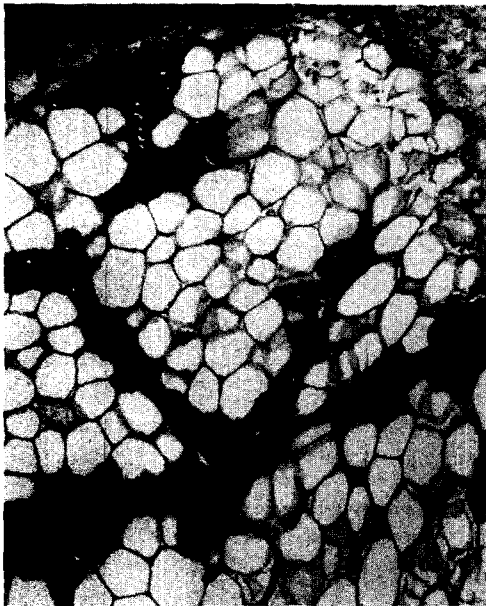


Fig. 6. Histological section of branching structure and lobules. H&E, $\times 60$.

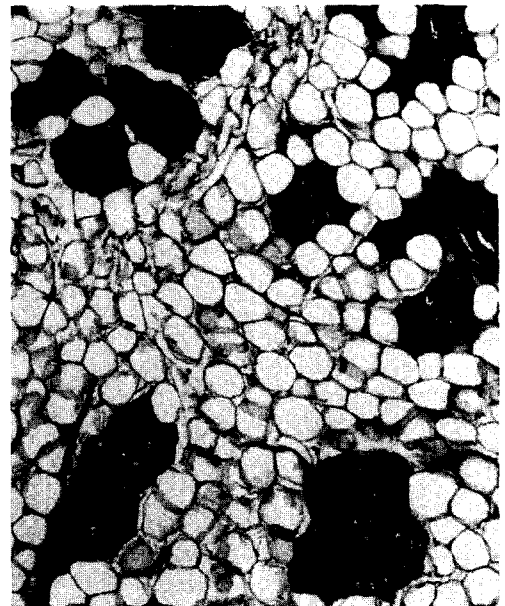


Fig. 8. Histological section of lobules and hyperplastic alveolar nodules. H&E, $\times 60$.

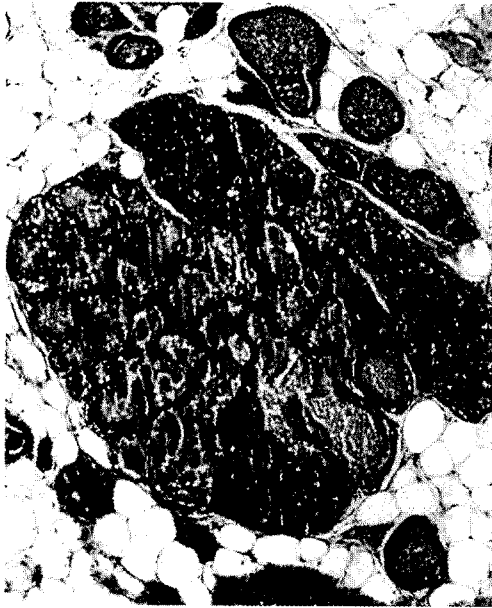


Fig. 9. Precancerous lesion of mammary gland in DMBA intubation rat. Note distended alveoli and secretory material in lumen. H&E, $\times 150$.



Fig. 11. Invasive ductal cribriform carcinoma of mammary gland in DMBA intubation rat. H&E, $\times 150$.

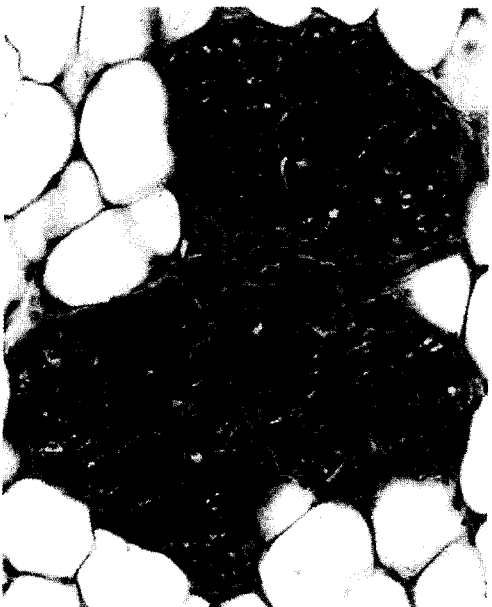


Fig. 10. Hyperplastic alveolar nodules of mammary gland in DMBA intubation rat. Note moderately desmoplastic reaction and proliferation of alveoli. H&E, $\times 200$.

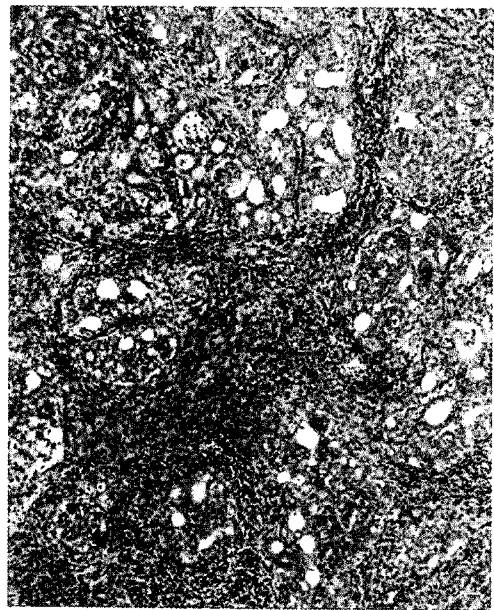


Fig. 12. As an epithelial-stromal neoplasm, carcinosarcoma of mammary gland in DMBA intubation rat. H&E, $\times 40$.

피 세포와 주위 결합조직에서 기인된 악성종양으로 carcinosarcoma가 관찰되었는데, 이는 과도한 결합조직의 증식이 유선을 둘러싸고 있으며, 결합조직의 증식 소견은 spindle한 세포가 여러방향으로 얽혀 있는 것으로 관찰되었다. 또한 종양조직 내에는 많은 림프구의 침윤, 세포분열 및 비만세포들이 쉽게 관찰되었다 (Fig. 12).

5. DMBA 투여에 의한 유선의 형태적 변화에 대한 계량적 평가

발암물질 투여에 따른 유선의 형태적 변화가 있는 항목으로는 terminal end bud, terminal duct, alveolar bud를 포함한 lobule 및 hyperplastic alveolar nodule로 알려져 있다. 이들 항목에 대한 계량적 평가를 위하여 whole mount와 병리조직학적 처리로 얻은 슬라이드를

Table 5. Terminal ductal structures in mammary glands of female rats treated with adoptive immunotherapy and/or 7,12-dimethylbenz[a]anthracene

Groups	No. of Structures			
	Terminal end buds	Terminal ducts	Lobules ^{a)}	Hyper. Alveolar Nodules
I	93±10	88±9	185±20	17±6
II	82±7 ^{**b)}	47±14 ^{**b)}	125±19 ^{**b)}	19±5
III	70±9 ^{**b)}	43±5 ^{**b)}	97±13 ^{**b)}	9±3 ^{**c)}
IV	26±15 ^{**d)}	30±4 ^{**d)}	23±4 ^{**d)}	0 ^{**d)}

All values are the number of structures per square centimeter and expressed as means ± SD.

a); Lobules contain the alveolar buds.

**b); Significantly different from Group I at $p < 0.01$.

**c); Significantly different from Group I at $p < 0.01$.

**d); Significantly different from Group I, II and III at $p < 0.01$.

화상분석하여 단위 면적당(1 cm²) 각 항목의 갯수를 세어서 평가하였다. 즉, whole mount method로 처리한 슬라이드에서는 terminal end bud 및 terminal duct의 수를 조사 하였으며, 병리조직학적 관찰에 의하여는 alveolar bud를 포함한 lobule 및 hyperplastic alveolar nodule의 수를 조사하였다. 이에 대한 결과를 Table 5에 정리 하였다.

모든 측정항목에서 DMBA를 처리한 군과 처리하지 않은 IV군 사이에 통계적 유의차가($p < 0.01$) 인정되었으며, whole mount method를 이용하여 측정한 terminal end bud 및 terminal duct 수는 면역치료를 적용한 제 II, III군에서 DMBA만 투여된 I 군보다 유의있는 감소가 각각 나타났다($p < 0.01$). 또한 병리조직학적 처리에 의한 검경 결과에 의하면, alveolar bud를 포함한 lobule의 수적 평가에서는 역시 양성 대조군인 제 I군에 비하여 면역치료군인 제 II군과 III군에서 통계적 유의수준으로($p < 0.01$) 감소하는 결과를 확인하였다. 또한 hyperplastic alveolar nodule은 DMBA가 투여된 군에서만 관찰되었으며, 면역치료 효과가 가장 확실하게 나타난 제 III군에서 제 I군과 비교해 볼 때 유의성 있는 감소를 보였다($p < 0.01$). 그러나 DMBA가 투여되지 않은 제 IV군에서는 hyperplastic alveolar nodule은 관찰되지 않았다.

IV. 고 찰

본 연구는 DMBA 투여에 의해 랫드 유선암이 유발되는 과정에서 적용한 *ex-vivo* 면역 치료방법의 효과가 얼마나 나타나는지에 대하여 조사를 하였다. 또한 DMBA투여에 의한 유선의 형태적 변화에 대한 계량적 평가를 수행하기 위하여 whole mount method 와 병리조직학적 관찰을 실시하였고, 이 방법이 유선암의 치료 및 예방효과를 평가하기에 적절한 시험항목이 될 수 있는지에 대하여 조사하였다.

본 연구에서 유발된 유선암의 발생율과 면역치료효

과를 살펴보면, DMBA만을 투여한 I군에서 유선암의 발생율은 60%이었으며, DMBA와 Poly I : C를 처리한 II군에서는 33%, 그리고 DMBA와 IL-2를 처리한 III군에서는 유선암의 발생이 없었다. 이상으로 보아 랫드 유선암에 대한 면역치료 효과는 IL-2를 이용하여 *ex-vivo* 처리한 III군에서 가장 확실하게 나타났으며, poly I : C를 처리한 II군에서도 확인되었다. 본 연구에서 확인된 이러한 효과들이 어떤 기전에 의해 나타난 것인지에 대하여는 앞으로 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다. 그러나 본 연구에서 이용한 방법은 현재 많은 임상 및 연구분야에서 응용하여 좋은 결과를 얻고 있다(Hamblin, 1990; Sussman *et al.*, 1994; Mertelsmann, 1995). 본 실험에서 유발된 유선암의 조직학적 패턴은 기존의 연구보고와 일치하여 나타났다(Wellings *et al.*, 1975; Haslam and Bern, 1977; Russo and Russo, 1996). 즉, 유선상피 세포 기원으로 adenoma, adenocarcinoma 그리고 유선 상피세포와 간질세포 기원으로 carcinosarcoma가 관찰되었다. 유선의 형태적 변화 관찰을 위하여 whole mount와 병리조직학적 방법을 병행하여 실시하였다. Whole mount에 의한 유선의 관찰에서는 발암물질 투여군과 비투여군의 형태적 차이가 뚜렷하게 나타났다. 즉 무처리 대조군의 유선은 duct의 분지 정도가 낮았으며, terminal end bud의 수가 적게 관찰되는 반면, DMBA가 투여된 군에서는 duct의 분지정도가 높게 관찰되었으며, 유선 말단부위 및 duct의 두께가 비후되었고, terminal end bud 및 alveolar bud를 포함한 lobule의 수적 증가 그리고 대조군에서 관찰되지 않은 다수의 hyperplastic alveolar nodule이 관찰되었다. Terminal end bud 및 terminal duct 수는 면역치료를 적용한 II, III군에서 DMBA를 투여한 I군과 비교할때 유의차 있는 감소가 확인되었다. 뿐만아니라, DMBA가 투여되지 않은 무처리 대조군에서는 이들 항목의 측정수가 유의수준으로 현저하게 낮게 나타났다. 따라서 whole mount에 의한 terminal end bud 및 terminal duct의 수적 평가는 유선의 발암화

과정에서 나타나는 민감한 변화이며, 또한 유선암의 예방 및 치료효과를 검증할때에도 유용한 항목이 될 것으로 사료된다. 이와 같이 사람 유선암의 경우와는 달리, 동물모델에서는 whole mount에 의한 연구를 가능하게 하며, 이는 유선의 정상구조와 비교하여, 국소적 병변과 변화에 대한 확인 및 통계적 분석을 가능하게 한다.

DMBA 투여에 따른 병리 조직학적 관찰 소견으로서, terminal end bud는 전체적인 형태가 곤봉모양을 하고 있으며, 3~6층의 세포로 구성되어 있고, 내부의 세포 밀도가 높아 내강이 유선 상피세포로 꽉 차있을 정도로 높은 밀도의 세포 덩어리로 관찰되었다. 또한 발암물질 투여군에서 관찰되는 lobule 및 hyperplastic alveolar nodule은 terminal end bud에서 기원되어 발생되는 것으로 관찰되었다. 기존의 연구 보고에 의하면, 유선의 악성종양은 종종 intraductal carcinoma로서 duct에서 기인된다(Sinha and Dao, 1975; Thompson et al., 1995). 그러나 intraductal carcinoma의 진행단계별 변화는 관찰이 어려우며, 이의 기원은 아직 밝혀져 있지 않다. 또한 duct, small(terminal) duct 그리고 acini의 내면을 구성하는 세포의 증식 역시 전암병변으로 생각된다. 유방암의 가장 보편적인 기원은 terminal duct나 acini에서 시작되는 것으로 알려지고 있다(Russo and Russo, 1987; Russo and Russo, 1992).

발암물질 투여군에서만 관찰된 hyperplastic alveolar nodule은 유즙 분비물이 내강에 꽉 차있어 내강이 확장된 alveoli가 존재하는 경우와, 유선상피 세포의 과도한 증식과 더불어 크고 작은 alveoli의 수가 증가 되고, desmoplastic reaction이 함께 나타나는 특성을 보이는 것으로 관찰되었다. Alveolar bud를 포함한 lobule의 수적 평가에서는 I군에 비하여 면역치료군인 II군과 III군에서 통계적 유의수준으로 감소하는 결과를 확인하였다. 또한 hyperplastic alveolar nodule은 DMBA가 투여된 군에서만 관찰되었으며, 면역치료 효과가 가장 확실하게 나타난 III군에서 I군과 비교해 볼 때 유의성 있는 감소를 보였다. 그러나 DMBA가 투여되지 않은 제 IV군에서는 hyperplastic alveolar nodule이 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 DMBA로 유발한 랫드의 유선암에 대한 면역치료 효과는 IL-2를 이용하여 ex-vivo 처치한 군에서 가장 확실하였으며, hyperplastic alveolar nodule은 DMBA 투여에 의한 유선암의 모델에서 확실한 전암병변이며, 또한 예방 및 치료효과도 예견할 수 있는 유용한 지표로 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한 병리조직학적 방법과 더불어 whole

mount method를 이용한 유선의 형태적 변화에 대한 계량적 평가는, 랫드 유선암 모델을 이용한 각종 실험에서 유용한 결과를 제시해줄 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ball, S.M. (1998): The development of the terminal end bud in the prepubertal-pubertal mouse mammary gland. *Anat. Rec.*, **250(4)**, 459-464.
- Chang, A.E. and Shu, S. (1996): Current status of adoptive immunotherapy of cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **22(3)**, 213-228.
- Cooper, D.J. and Sutcliffe, M. (1991): Use of whole mount sections for reporting mammographic specimens. *J. Clin. Pathol.*, **44(6)**, 524.
- Hamblin, T.J. (1990): Ex vivo activation and retransfusion of white blood cells. The immunotherapy of cancer. *Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.*, **57**, 249-266.
- Haslam, S.Z. and Bern, H.A. (1977): Histopathogenesis of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74(9)**, 4020-4024.
- Hirose, M., Mizoguchi, Y., Yaono, M., Tanaka, H., Yamaguchi, T. and Shirai, T. (1997): Effects of green tea catechins on the progression or late promotion stage of mammary gland carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats pretreated with 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene. *Cancer Lett.*, **112(2)**, 141-147.
- Mertelsmann, R. (1995): The impact of cytokines on high dose chemotherapy followed by transplantation of purified and ex vivo expanded peripheral blood stem cells: achieving a state of minimal residual disease for tumor immunotherapy with cytokine gene transfected cells. *Eur. Cytokine Net.*, **6(2)**, 79-82.
- Pereira, M.A., Grubbs, C.J., Barnes, L.H., Li, H., Olson, G.R., Eto, I., Juliana, M., Whitaker, L.M., Kelloff, G.J., Steele, V.E. and Lubet, R.A. (1996): Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced mammary cancer in rats. *Carcinogenesis*, **17(6)**, 1305-1311.
- Russo, I.H. and Russo, J. (1978): Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *J. Natl. Cancer Inst.*, **61**, 1439-1449.
- Russo, I.H. and Russo, J. (1988): Hormone prevention of mammary carcinogenesis: a new approach in anticancer research. *Anticancer Res.*, **8(6)**, 1247-

- 1264.
- Russo, I.H. and Russo, J. (1996): Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect*, **104(9)**, 938-967.
- Russo, J., Gusterson, B.A., Rogers, A.E., Russo, I.H., Wellings, S.R. and van Zwieten, M.J. (1990): Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab. Invest.*, **62(3)**, 244-278.
- Russo, J. and Russo, I.H. (1987): Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab. Invest.*, **57(2)**, 112-137.
- Russo, J. and Russo, I.H. (1992): The pathology of breast cancer: staging and prognostic indicators. *J. Am. Med. Womens Assoc.*, **47(5)**, 181-187.
- Russo, J. and Russo, I.H. (1993): Development pattern of human breast and susceptibility to carcinogenesis. *Eur. J. Cancer Prev.*, **Suppl 3**, 85-100.
- Sinha, D. and Dao, T.L. (1975): Site of origin of mammary tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in the rat. *J. Natl. Cancer Res.*, **54(4)**, 1007-1009.
- Strum, J.M. (1979): A mammary gland whole mount technique that preserves cell fine structure for electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, **27(9)**, 1271-1274.
- Sussman, J.J., Shu, S., Sondak, V.K. and Chang, A. E. (1994): Activation of T lymphocytes for the adoptive immunotherapy of cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, **1(4)**, 296-306.
- Thompson, H.J., McGinley, J.N., Rothhammer, K. and Singh, M. (1995): Rapid induction of mammary intraductal proliferations, ductal carcinoma in situ and carcinomas by the injection of sexually immature female rats with 1-methyl-1-nitrosourea. *Carcinogenesis*, **16(10)**, 2407-2411.
- Wellings, S.R., Jensen, H.M. and Marcum, R.G. (1975): An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J. Natl. Cancer Inst.*, **55(2)**, 231-273.