

Diethylnitrosamine을 투여한 rat 간장의 tumorigenesis에 관하여

1. 간장의 육안적 소견

곽수동 · 강정부 · 하우송*

경상대학교 수의과대학 동물의학연구소
경상대학교 의과대학*
(1998년 1월 15일 접수)

Diethylnitrosamine-induced hepatic tumorigenesis in rats

1. Gross findings of livers

Soo-dong Kwak, Chung-boo Kang, Woo-song Ha*

*Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
College of Medicine, Gyeongsang National University**

Received Jan 15, 1998)

Abstract : The study was designated to investigate the gross findings following treatment with diethylnitrosamine (DEN) in rats. Forty four male rats (Sprague Dawley), initially 5 to 6 weeks of age and 120 to 150gm in body weight were continuously given water containing 0.01% DEN for 13 weeks and 3~6 rats per week were randomly sacrificed at intervals of a week from 8 weeks to 17 weeks.

The numbers of rats died until 17 weeks were 11 rats and first death occurred at 10 weeks.

Body, liver and spleen weights were weighed and the relative weight levels of the liver and spleen per body weights were increased from 4.4% and 0.5% at control groups to 15.1% and 1.1% at 17 weeks.

The numbers of RBC were not varied but PCV were decreased from 44.5% in control group to 27.5% in 16 weeks.

A few of greyish-white foci or nodules of tumors were developed or not on the surfaces of the livers at 8 weeks but were developed on all livers after 9 weeks.

The diameter of the largest tumor from all rat livers was 35.8 mm at 12 weeks.

The numbers of developed tumors per a rat liver were appeared to be about 20 in 13 weeks and about 50~60 in 17 weeks.

The diameter of some larger tumors were found to be 3~9mm in 13 weeks and 7~15mm in 17

이 연구는 1996년도 한국과학재단의 특정기초연구과제 (96-04-02-01-3)에 의해 수행되었음.
Address reprint requests to Dr. Soo-dong Kwak, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju, 660-701, Republic of Korea.

weeks and more number of tumors were developed in the visceral surfaces than in the diaphragmatic surfaces of the livers. The parenchymae of livers were fragility.

Key words : liver, hepatocellular carcinoma, diethylnitrosamine, rat.

서 론

근래에 도시의 인구집중과 산업화, 공업화로 인하여 많은 오염물질이 배출되어 환경위생에 대한 문제가 심각하게 대두되고 있고 종양의 직접적인 발생도 미생물, virus, 방사선 등에 의한 원인에 화학적 물질에 의한 공기 또는 음식물의 오염, 직간접적인 접촉 등의 환경위생이 가장 많은 문제가 되고 있고 사람의 암의 발생원인의 약 80%는 화학적 물질에 의한 것이라고 한 바 있다¹.

종양발생의 기원과 진행과정 결과, 항암효과, 예방과 치료, 식품과 환경위생 등의 연구에 중요한 자료를 얻기 위하여는 실험동물에 종양을 인위적으로 발생시켜야 한다². 그러나 실험동물에 발암물질(carcinogen)을 투여하면 암을 발생시키기 보다는 중독 등의 부작용으로 인하여 폐사되기 쉽고 암이 발생된다고 하더라도 효과적인 실험을 하기 위하여 특징적 부위나 어떤 장기에만 한국적 또는 집중적으로 발생되고 대조군 보다 많은 장기에 빠르게 발생되었다고 평가되어야 한다¹.

일반적으로 종양이 많이 발생하는 기관은 간, 폐, 소화기관, 생식기관 등이며 특히 간은 위장관에서 섭취한 모든 물질이 저장, 분해, 해독을 하며 기능이 복잡하기 때문에 가장 많이 발생하는 기관이다.

실험동물의 어떤 장기에 국한하여 종양을 일으키는 독성물질 중에서 1,2-dimethylhydrazine(DMH)³⁻⁵와 azoxymethane⁶⁻⁷은 소화기관에 실험적 종양발생에 많이 이용하고 있고, diethylnitrosamine(DEN)은 유전자 독성발암물질(genotoxic carcinogen)으로 다른 기관에는 거의 영향이 없고 간장에만 종양을 발생시키므로 간암발생, 진행, 치료 및 약 효과 등의 실험에 많이 응용되고 있다⁸⁻¹⁴. 특히 Dragan *et al*⁸은 DEN은 간세포가 피사로 인해 증식이 향상될 때 이를 투여하면 암발생에 계기가 된다고 하여 발암에 대해 소개한 바 있다. 그러나 DEN이 체중과 간장

에 미치는 영향과 간장에서의 종양에 관한 소견에 대하여는 마우스에서 주었고 보고자에 따라 차이가 많을 뿐 아니라 구체적 제시가 없었다.

본 실험은 DEN을 랫드에 장기간 투여하여 간장에 암을 발생시켜 랫드의 체중, 간장의 중량, 비장의 중량 등에 미치는 영향과 발생된 간암의 육안적 조사결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

Sprague Dawley(삼육실험동물 연구소 공급) rat 수컷 44수를 사육실내 온도 $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 상대습도, 환기, 조명 등의 조건이 구비된 사육환경에서 사육하면서 5~6주령(120~150gm)정도 되었을 때 DEN 제제인 N-nitrosodiethylamine(Sigma, USA)을 음수에 0.01% 되게 하여 무제한 자유롭게 13주까지 공급하였다. 8주째 부터 17주째까지 매주별로 Table 1과 같이 2~5두씩 임의로 선택하여 체중을 측정하고 ether로 마취하여 개복하고 일부의 랫드는 혈액을 채취하여 적혈구수와 그 용적(PCV) 변화를 조사하였고 부검한 후 간장과 비장의 중량을 측정하고 간장과 다른 장기에서 발생한 종양의 발생수와 형태 등을 육안적으로 관찰하고 조직표본의 재료는 간장을 주로 하였고 그외 장기는 육안적으로 병변이 확인된 비장, 폐 등의 장기를 필요에 따라 채취하여 간장과 같이 paraffin 절편을 만들고 통상방법과 같이 hematoxylin-eosin 염색과 PAS 염색을 실시하여 발생된 암의 형태와 진행과정 등을 광학현미경적으로 관찰하였고 실험기간중에 폐사한 두수는 해당주간에 포함시켜 관찰하였다.

결 과

성숙한 랫드에 DEN을 0.01% 되게 음수에 가하여 자유롭게 공급하며 17주째까지 경과시키며 폐사한 두수를

합하여 매주 3~5두씩 부검하여 간장과 비장의 중량의 변화, 적혈구의 수와 용적의 변화, 발생된 종양의 육안적 소견에 대하여 조사하였다.

DEN을 투여하며 17주까지 경과하는 동안 총 44두중에서 폐사한 두수는 Table 1와 같이 10주째부터 처음 발생되어 17주째까지 매주간 1~3두씩 총 11두(25%)가 폐사되었다.

간장의 증대를 조사하기 위하여 주별로 실험대상 전 두수의 체중에 대한 간장중량의 비율을 조사한 바 Table 1과 같이 대조군은 4.4%였으나 DEN 투여후 10주째는 8.5%, 17주째는 15.1%로 시일이 경과할 수록 증가되어 거간증(hepatomegaly)을 일으킴을 알 수 있었다.

체중에 대한 비장의 중량의 비율을 조사한 바, Table 1과 같이 대조군은 0.5%였으나 DEN 투여후 10주째는 0.6%, 17주째는 1.1%로 시일이 경과할 수록 증가하였으나 간장의 증가 비율보다는 낮았다.

혈액의 변화를 조사하기 위하여 Table 2와 같이 packed cell volume (PCV)와 ml당 적혈구의 수를 조사한 바, 대조군은 PCV가 44.5%와 적혈구수가 $6.70 \times 10^6 / \text{mm}^3$ 이 었으나 DEN 투여후 14주째는 27%와 $5.48 \times 10^6 / \text{mm}^3$, 16주째는 27.5%와 $5.11 \times 10^6 / \text{mm}^3$ 로서 적혈구의 수의 변화는 인정되지 않았으나 용적의 비율은 감소하여 빈혈상태임을 알 수 있었다.

경과한 주별로 간장표면에 발생된 종양의 크기, 수 및 간장의 취약성 등을 조사한 바, Table 3과 같이 8주째는 간의 증대나 표면색갈의 육안적 변화는 거의 없는 정상 상태이거나 약간 증대되었고 회색색 내지 백색의 경계 불명한 소수의 반점들이나 소절상의 결절들이 간의 표면에 산재하였고 9주째 부터는 모든 두수에서 반점이나 결절을 관찰할 수 있었다. 종양의 진행은 처음 반점상태에서 결절상으로 되며 점차 증대되었다(Fig 1, 2).

큰 종양결절들의 크기의 보통범위가 8주째는 직경이

Table 1. Changes of body, liver and spleen weights after DEN treatment

	Period after first DEN treatment(weeks)											Total
	Control	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
No. of rats killed	3	3	5	3	3	3	4	3	3	3	2	33
No. of rats died	0	0	0	2	1	1	1	3	1	1	1	11
Body WT*(gm)	280.0	315.5	309.6	377.8	299.0	293.0	278.0	273.5	314.3	329.3	325.0	
Liver WT(gm)	12.3	20.4	17.9	32.0	28.7	27.4	30.0	35.2	31.8	37.5	49.1	
Liver WT/body WT(%)	4.4	6.5	5.8	8.5	9.6	9.4	10.8	12.9	10.1	11.4	15.1	
Spleen WT(gm)	1.5	2.6	1.8	2.3	2.7	2.7	2.7	2.5	2.6	3.4	3.6	
Spleen WT/body WT(%)	0.5	0.8	0.6	0.6	0.9	0.9	1.0	0.9	0.8	1.0	1.1	

WT* : weight.

Table 2. Mean PCV and number of RBC of rats by DEN treatments

Reports	Control	Period after first DEN treatments(weeks)					
		2	3	14	15	16	
PCV*(%)	45.1±0.4 44.2±2.2	44.5	33	38	27	29.5	27.5
Number of RBC($10^6 / \text{mm}^3$)	5.2±0.2 8.88±0.91 8.81±0.57	6.70	5.57	4.94	5.48	7.16	5.11

PCV* : packed cell volume of RBC.

Table 3. Development of tumors in livers of rats by DEN treatments

	Period after first DEN treatment(weeks)									
	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Diameter(mm) of tumors or foci	0.5~1.5	2~4	2~3	3~4	3~5	3~9	2~5		5~9	7~15
No. of tumors > 1.5mm in diameter		3~5	5~10	10~20	47	18, 27, 12	50, 55		55	66, 48

0.5~1.5 mm, 13주째는 3~9mm, 17주째는 7~15mm였고 특히 보다 큰 종양들을 측정할 바 11주째는 28.5mm, 12주째는 35.8mm였고 14주째는 25.2mm와 33.5mm, 16주째는 각각 9.2mm, 8.0mm 및 6.7mm, 17주째는 1두에서 각각 14.8mm, 12.4mm, 11.0mm 및 7.0mm로 시일이 경과할수록 큰 종양의 수가 더 많아지고 크기가 증대되었다(Fig 1, 2).

출혈소견은 12주째와 14주째에 폐사한 각 1두에서 혈종의 직경이 각각 15mm 정도, 17주째는 폐사한 1두에서 작은 출혈반 내지 혈종의 수가 15개정도가 관찰되었다.

종양이 보다 많이 발생된 몇몇 두수를 대상으로 하여 육안적으로 구별이 가능한 간표면의 종양의 수를 조사한 바, Table 3과 같이 12주째는 폐사한 1두에서 총 47개, 13주째는 3두에서 18개, 27개 및 12개로 20개 정도였고, 16주째는 1두에서 55개, 17주째는 2두에서 66개와 48개로 50~60개 정도였고, 횡격면보다 내장면에 더 많았고 시일이 경과할수록 종양의 수가 증가되어 간의 전표면을 덮고있는 것 같이 보였으며 개체별로 종양수의 차이가 많았다.

폐에서는 9주째에 생존한 1두의 한엽에 국한하여 백색의 반점이, 다른 2두는 직경 2~8mm 정도의 10개 전후의 농양이, 10주째는 폐사한 1두에서 수개의 백색종양이, 14주째는 폐사한 1두에 충출혈과 응혈괴가 부착되어 있었다.

이상에서 폐에서는 44두중에 생존한 3두와 폐사한 2두에서만 병변이 소수 관찰되어 폐에 직접적인 영향이 적거나 아닌 것으로 간주되었고 다른 장기에는 병변이 관찰되지 않았다.

고 찰

동물에서 체중과 간장의 중량의 비율에 대하여서는

김 등¹⁵은 국내 정상 2세 이상의 한우에서 간장의 평균중량은 4.55kg이고, 체중의 평균은 332.4kg으로 체중대 간장의 비율은 1.37% 였다고 한 바 있고, James와 Muskhelishvili¹⁶는 마우스에서 체중은 32.2~39.3gm이고, 간장의 중량은 1.5~1.6gm으로 체중대 간장중량의 비는 0.040~0.045% 였다고 하였으나 Lagopoulos와 Stalder¹⁰는 마우스에서 대조군과 DEN 투여군의 비율은 12주째는 4.46%과 4.78%, 24주째는 4.36%와 4.64%, 36주째는 4.18%와 4.61%로 간장이 증대되었다고 하였고, Tamano *et al*¹²는 MT42 마우스에서 대조군은 5.0~5.6% 였으나 DEN 투여 10주째는 6.3±0.2%, 23주째는 12.2±1.9%, 37주째는 26.9±3.6%로 증가되었다고 하였다. 랫드에서는 Mills *et al*¹¹와 Tritscher *et al*¹³는 수치의 제시없이 대조군 보다 간장의 중량이 증대되었다고 하였다. 본 실험에서도 전체 체중에 대한 간장 중량의 비율은 대조군은 4.4%, 투여후 8주째는 6.5%, 17주째는 15.1%로 현저히 증대되어 거대간이 형성되었다.

비장의 중량의 변화에 대하여는 조사된 바가 없으나 본 조사에서는 대조군은 0.5%에서 17주째는 1.1%로 비장의 중량이 증가되었다.

혈액소견에 관하여는 Goven *et al*¹⁷은 간암에서 적혈구 증가증은 간경화와 erythropoietin과의 관계가 있다고 한 바 있다. 본 조사에서는 적혈구수의 변화는 적었으나 PCV는 현저히 감소되어 적혈구 크기가 감소되었음을 알 수 있었다.

DEN 투여 실험중의 폐사에 대하여는 여러조건에 따라 차이가 있겠으나 Tamano *et al*¹²는 마우스에서 종양 발생 실험의 목적으로 투여후 29주째 처음 폐사두수가 발생하였고 33주째는 실험군 8두 전체가 폐사하였다고 하였다. 본 조사에서는 투여시작후 10주째부터 처음 발생되어 17주째까지 총 11두가 폐사하여 25.0%가 폐사하였으며 주별로 부검에 제공된 전두수가 17주째까지 공

시하지 않고 경과시켰다면 25.0% 보다 더 많았을 것이다.

간의 육안적 소견에 관하여는 이¹⁴는 4주째는 간의 외형, 색깔, 크기의 변화가 없고 10주째는 간표면이 많은 소들기가 발생되었다고 하였고, *Tritscher et al*¹³은 간은 증대되고 색깔이 짙어지고 백색의 무수한 반점이 형성되었다고 하였고, *Tamano et al*¹²은 간표면에 황갈색 불규칙한 종양이 형성되었다고 하였으나 종양의 크기에 대하여 보고된 바 있었다. 본 조사에서는 간표면에 처음 8주째는 소수의 백색의 반점이나 종양이 산재하거나 또는 정상이었고 9주째는 전두수에서 반점과 종양이 형성되어 차차 경과할수록 결절상으로 되어 크기가 증대되고 수가 많아졌고 융합되어 17주째 큰 종양들은 7~15 mm 범위까지 큰 것도 여러개 형성되었고 최대 큰 종양은 12주째 35.8mm 되는 예도 있었다.

간 표면에 육안적 구별이 가능한 종양의 수에 관하여는 한계불명하고 융합된 예가 많아서 인지 조사된 바 없다. 본 연구에서는 처음에는 반점상에서 소 결절상으로 되며 경과주별로 증가되는 경향이였으나 개체별로 차이가 많았고 17주째는 50~60개 전후가 되어 간의 표면을 덮고 있는 것 같이 보였고 횡격면 보다 내장면에 종양의 수가 더 많았다.

결 론

성숙한 랫드(SD)에 diethylnitrosamine (DEN)을 0.01% 되게 음수에 가하여 13주까지 자유롭게 공급하며 8~17주까지 매주 3~5두씩 부검하며 관찰한 바, 10주째 처음 폐사가 발생하였고 투여한 44두중에 17주째까지 11두가 폐사하였고 체중에 대한 간장과 비장의 증가한 비율을 조사한 바 대조군은 간장 4.4%와 비장 0.5%에서 17주째는 간장 15.1%와 비장 1.1%로 간장과 비장의 증량이 증가되었고, 적혈구의 수의 변화는 없었으나 PCV는 대조군은 44.5%에서 16주째는 27.5%로 감소하였다.

간장의 표면은 처음 8주째는 정상이거나 또는 회백색의 반점 또는 종양이 소수 발생하며 약간 증대되었고 9주째는 전두수에서 이러한 변화가 관찰되었고 12주째는 가장 큰 종양이 직경이 35.8mm 되는 예도 있었고, 13주째는 종양의 수는 20개 전후며 큰 종양들의 직경은 3~9mm 정도였다. 17주째는 50~60개 전후며 큰 종양들의 직경은 7~15mm 정도까지 증대되었고 간의 전표면이 점유되었고 종양은 횡격면 보다 내장면에 더 발달되었고 전 간장이 취약하였다.

Legends for figures

Fig 1. Numerous greyish-white foci or nodules of tumors, a large hematoma(arrow head) and a clot(arrow) are seen on the liver surface of a rat at 13 weeks after first treatment of diethylnitrosamine.

Fig 2. Numerous tumor nodules and some hemorrhage (black spots) are seen on the greyish-swelled liver surface of a rat at 16 weeks after first treatment of diethylnitrosamine.



참 고 문 헌

1. 김대중, 김정진, 이동신. 환경발암물질과 그 위험성 평가에 대하여. 한국실험동물학회지, 9:7-15, 1993.
2. 김신일. 인삼의 항암성분에 관한 연구. 충남대 약학과 박사학위논문. 1988.
3. Glauert HP, Weeks JA. Dose-and time-response in fischer-344 rats after a single dose of 1,2-dimethylhydrazine. *Toxicology Letters*, 48:283-287, 1989.
4. Maskens AP. Histogenesis and growth pattern of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon adenocarcinoma. *Cancer Research*, 36:1585-1592, 1976.
5. 강원화, 박수동. 1,2-dimethylhydrazine을 투여한 rat 장관의 증식세포 분포와 종양발생에 대한 면역조직화학적 연구. 대한수의학회지, 37:167-176, 1997.
6. Shamsuddin AKM, Trump BF. Colon epithelium. II. *In vivo* studies of colon carcinogenesis. Light microscopic, histochemical, and ultrastructural studies of histogenesis of azoxymethane-induced colon carcinomas in fischer 344 rats. *JNCI*, 66:389-401, 1981.
7. Watanabe K, Reddy BS, Welsburger JH, *et al.* Effect of dietary alfalfa, pectin, and wheat brain on azoxymethane or methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *JNCI*, 63:141-145, 1979.
8. Dragan YP, Hully J, Crow R, *et al.* Incorporation of bromodeoxyuridine in glutathione S-transferase-positive hepatocytes during rat multistage hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 15:1939-1947, 1994.
9. Lagopoulos L, Sunahara GI, Wurznner H, *et al.* The effect of alternating dietary restriction and as libitum feeding of mice on the development of diethylnitrosamine-induced liver tumours and its correlation to insulinaemia. *Carcinogenesis*, 12:311-315, 1991.
10. Lagopoulos L, Stalder R. The influence of food intake on the development of diethylnitrosamine-induced liver tumours in mice. *Carcinogenesis*, 8:33-37, 1987.
11. Mills JJ, Chari RS, Boyer II, *et al.* Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Research*, 55:979-983, 1995.
12. Tamano S, Merlino GT, Ward JM. Rapid development of hepatic tumors in transforming growth factor α transgenic mice associated with increased cell proliferation in precancerous hepatocellular lesions initiated by N-nitrosodiethylamine and promoted by phenobarbital. *Carcinogenesis*, 15:1791-1798, 1994.
13. Tritscher AM, Clark GC, Sewall C, *et al.* Persistence

- of TCDD-induced hepatic cell proliferation and growth of enzyme altered foci after chronic exposure followed by cessation of treatment in DEN initiated female rats. *Carcinogenesis*, 16:2807-2811, 1995.
14. 이혜영. Diethylnitrosamine에 의한 흰쥐 간세포의 유전적 변화에 관한 연구. 인하대학교 대학원 박사학위논문, 1991.
15. 김종섭, 조태순, 박봉조, 하정기. 한빈우의 생체중과 장기중량에 관한 연구. 대한수의학회, 22:91-98, 1982.
16. James SJ, Muskhelishvili L. Rates of apoptosis and proliferation vary with caloric intake and may influence incidence of spontaneous hepatoma in C57BL/6 x C3HF1 mie. *Cancer Reserach*, 54:5508-5510, 1994.
17. Goven ADT, Macfarlane PS, Callander R. Primary carcinoma of liver In "*Pathology illustrated*" 4th ed, Churchill Livingstone, New York, 463-466, 1995.
-