

발암제에 의해 간종양이 유발된 쥐에서 간기능과
형태학적 변화에 관한 연구
(I . 간기능 변화에 관하여)

김철호, 문평일, 강정부*

경상남도 축산진흥연구소 북부지소, 경상대학교 수의과대학*

Changes on function and morphology of liver
in carcinogen-induced hepatoma rats
(I . Changes on function of liver)

Cheol-Ho Kim, Pyoung-Il Moon, Chung-Boo Kang*

*Northern Branch of Keyongnam Livestock Promotion Research Institute.
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University**

Abstract

This study is concerned with assessment of diethylnitrosamine(DEN) induced liver cell carcinogenesis by measurement of changes preceding the development of neoplasms. Therefore, it was undertaken to investigate the changes of liver-specific enzyme activities in rats (Sprague-Dawley) by ad libitum feeding of DEN. And also, as another objective index in urine, the level of urinary bipterin was measured by high performance liquid chromatography(HPLC) method. The results were as follows ;

1. Minor behavioral change, brittleness of hair and decreased amount of water and diet intake were observed in rats 7 weeks after DEN administration.
2. The body and liver weights were significantly($p<0.05$) decreased in rats 11 weeks after DEN administration.
3. The ratio of liver weight to body weight was rather stable and not significantly decreased in the all treatment groups.
4. The liver specific enzyme activities(AST, ALT, γ -GTP) were significantly($p<0.05$) increased in all treatment groups compared to control group.
5. Compared to normal level, urine bipterin level was significantly ($p<0.05$) increased in all treatment groups($p<0.05$).

In conclusion, this result confirmed that the DEN was one of the potent hepatocarcinogens. In experimental model of rats exposed to DEN, the results indicated that values of liver specific enzyme activities(AST, ALT, γ -GTP) and urine biopterin level could be useful complementary tumor indices.

Key words : Rat, Carcinogenesis, Enzyme activities, HPLC.

서 론

1. 실험 목적

본 실험에서는 현재 實驗動物에서 肝癌 誘發에 많이 쓰이고 있는 化學的 發癌劑 중 단순 투여로 發癌 형성이 비교적 용이한 diethylnitrosamine(DEN)을 흰쥐에 단독 투여하여 肝癌(hepatocellular carcinoma)을 유발시켜 쥐의 臨床的 所見, 體重 및 肝重量 등 生體變化와 血液化學值 變化(간특이효소 활성치) 그리고 尿中 biopterin의 변화를 측정하여 肝癌 診斷 指標로 활용하고 그 결과를 서로 비교함으로써 肝癌 발생과정과 기전을 추론할 수 있는 기초 자료를 제공하고, 實驗動物 肝癌 발생 연구 모델이 확립되면 인축의 肝癌 발생과정을 규명하고 發癌 抑制 및 誘發 藥劑 규명과 癌治療에 이용될 수 있는 모델 동물로 활용이 가능하다고 판단된다.

2. 간암 유발 모델

實驗動物에서의 肝癌 誘發 모델은 DEN¹⁻⁴⁾, acetylaminofluorene⁵⁾, phenobarbital⁶⁾ 등 여러 가지 化學的 發癌劑를 투여하는 방법에 따라 여러가지가 연구되어 왔다⁷⁾.

동물 중에서도 특히 쥐는 수명이 짧아 단기 간에 초기의 DNA 변화로부터 완전한 轉移癌까지 모든 단계별로 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 인위적으로 가변성이 있는 요소를 고정할 수 있어 肝癌 발생 과정을 연구하는데 매우 유용하여^{8,9,10)} 인간에서의 肝癌 발생 연구에서의 어려운 점 즉, 장기간 동안 多段階 과정을 거쳐 발생한다는 것과 癌이 발생된 후에는 發癌의

초기 과정은 알 수가 없을 뿐만 아니라 진행 과정에 수많은 요소가 관련될 수 있다는 점 등의 단점을 보완할 수 있는 이점을 갖고 있다¹¹⁾.

쥐에서 肝癌 발생 모델은 1932년에 化學的 發癌原因 o-aminoazotoluol을 사용하여 쥐에서 肝癌을 유발시키는데 처음 성공한 이후 benzopyrene이 사용되었고, 1990년에는 發癌性 色素인 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene(3'-Me-DAB)과 芳香族아민인 acetylaminofluorene(AAF)과 nitrosamine류가 사용되어 發癌성이 확인되었다¹²⁾.

또한 發癌物質에 의하여 유도된 變異細胞內 각 酵素活性值의 變化가 초래됨이 밝혀지면서 이들 세포의 크론성 增殖으로 나타나는 여러 종류의 酵素活性值를 測定함으로써 發癌 과정을 연구할 수 있는 단기 發癌性 실험 모델이 개발되었다^{13,14,15)}.

이에 본 실험에서는 8주령된 Sprague-Dawley계통의 흰쥐에 0.01%의 DEN을 함유한 음수를 계속해서 6주에서 14주동안 투여하여 發癌 모델 可能性을 확인코져 실시하였다.

3. 뇨중 biopterin 농도 측정

Neopterin (in human), biopterin (animal) 과 그 誘導體들은 GTP(guanosine triphosphate) cyclohydrolase I(GTP-CH)에 의하여 GTP로부터 *in vivo*에서 합성된다^{16,17)}. GTP-CH의 活性值는 interferons에 의하여 크게 증대된다. 7,8-hydroneopterin triphosphate (NH₂ TP)는 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin(BH₄)의 합성 경로 중간에 있는 물질이다. BH₄는 肝에서 phenylalanine에서 tyrosine과정과 catecholamines 혹은 serotonin을 합성하는 神經內分

泌 組織에서 tyrosine이 L-dopa와 tryptophan으로 결국에는 5-hydroxytryptophan이 되는 과정의 hydroxylation에서 電子 供與體(electron donor)로 되는 대표적인 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 상기 組織과 淋巴球에서 대부분의 NH₂TP는 BH₄로 대사된다^{18,19)}. 사람의 單核球와 大食細胞에서는 NH₂TP를 6-pyruvoyl tetrahydroxypterin으로 변환시키는 酵素 6-pyruvoyl tetrahydroxypterin synthetase가 없다. 결과적으로 사람의 monocytes와 macrophage에서는 BH₄의 합성 대신에 NH₂TP의 축적이 일어나는데, NH₂TP는 phosphatase에 의하여 가수분해된 후에 dihydropterin(NH₂) 혹은 biopterin으로 되어서 세포 밖으로 분비된다²⁰⁾. biopterin 생합성은 type I, type II interferon, endotoxin 같은 다양한 자극에 의하여 증가된다. 결과적으로 비특이적이거나 많은 癌患者에서 biopterin치의 지속적인 상승이 관찰되곤 한다.

결론적으로 biopterin 표지(marker)가 癌에서는 완전히 비특이적이고 세포기원(cellular derivation)은 잘 모르지만 어떤 진행성 癌疾患에서 단핵구와 대식세포 체계의 활성 양상이 나타나는 사실에 주목할 필요가 있다.

이에 본 실험에서 發癌物質인 DEN을 투여한 쥐에서 尿中 biopterin을 測定하여 DEN의 투여와 biopterin의 相關關係를 알아보는 것은 의미있는 실험이라 판단된다.

재료 및 방법

실험동물

生後 6주령된 SPF Sprague-Dawley 수컷 쥐를 아산생명과학연구소에서 분양받아 2주간 適正 飼育環境에 馴化시켰으며, 건강한 8주령의 체중 120~150g의 동물만을 시험에 사용하였다. 實驗動物의 환경조건은 온도 20±4 °C, 상대습도 45~60%, 환기횟수 10~12회/hr, 조명 시간(오전 9시~오후 11시), 조도 150~200Lux 상태로 경상대학교 수의과대학 사육실에서 실시하였다.

1일 음수량은 개체당 평균 15ml, 오줌배설량은 4ml 정도였다.

간암성 병소 유도방법

DEN단독 투여실험에 있어 투여후 11~13주에 걸쳐 發癌이 가장 왕성히 진행된다는 이전의 방법들과 비교하기 위해 생후 8주령의 70두의 쥐에 DEN을 음수에 녹여 14주간 다음과 같이 두수를 背離하여 투여하였다.

구 분	투 여 기 간 (주)									
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
DEN 투여군	5	5	5	5	5	12	15	12	6	
대 조 군										10

대조군은 10두를 12주 동안 發癌物質을 함유하지 않은 음수를 투여한 군으로 하여 총 80마리를 실험하였다. 發癌物質은 음수의 0.01% 농도로 diethylnitrosamine(DEN, 東京化成工業株式會社, 日本)를 經口投與하였으며 동일한 기간 동안 펠렛 사료를 자유 공급하였다.

혈액 sample의 채취

血清의 採取는 흰쥐를 ether로 흡입마취한 후 평균 5ml의 血液을 心臟 採血하여 1시간 室溫에 방치하여 응고시킨 후 2,000 rpm, 10분간 원심 분리하여 분리된 血清을 酵素測定 전까지 -28 °C에 보존하였고, 뇨중 biopterin농도 측정을 위해 오줌을 1 ml 방광 채취 후 빛을 차단하여 EDTA (25mg)와 섞어 -20°C 냉동보관 후 실험에 사용하였다.

체중 및 간중량의 변화

실험에 사용한 쥐들에서는 發癌 誘發의 확인을 위하여 DEN을 계속 투여한후 6주령군부터 14주령군까지 經口로 發癌劑를 투여하여 剖檢을 실시하였으며 각 주령별 發癌 誘發 정도를 비교하기 위하여 주령별로 剖檢을 하여 비교, 분석하였다.

剖檢 직전 體重을 測定하여 기록하였으며,

ether 마취 후 剖檢 실시 즉시 肝을 먼저 적출하여 肝重量을 測定하였다.

혈청 간효소 활성치의 측정

Asparate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT)의 活性值 측정은 Reitman-Frankle method²⁴⁾를 이용한 변법으로, γ -glutamyl transpeptidase(γ -GTP)는 5-aminosalicylic acid method²⁵⁾를 이용하였으며 測定은 아산제약주식회사의 kit로 분광광도계를 이용하여 실시하였다.

뇨중 biopterin 농도 측정

산화(oxidized) neopterin과 biopterin 등은 high performance liquid chromatography (HPLC)²⁶⁾로 혹은 放射免疫 檢査法으로 測定이 가능하다. 이 두 가지 방법은 상호 보완적이다^{27,28,29)}. Biopterin은 빛(light)에 민감하다. 그러므로 pterin을 포함하고 있는 시료에 대한 모든 조작은 반드시 어두운 시야나 암시야에서 시행해야 한다. 특히 직사 태양 광선은 반드시 피하여야 하며, biopterin은 -20°C에서 동결 보관하는 경우는 수 주 동안 안정하다. HPLC로 biopterin을 測定하는 방법은 다음과 같다^{30,31)}. 1 : 10으로 희석한 尿試料 10 μ l와 희석한 20 μ l을 injection하고, 4 \times 125 mm C₁₈ reversed-phase column으로 분리하였다. 분리한 후에 biopterin과 creatinine을 동시에 測定하였다. creatinine은 235nm의 UV 흡광도 하에서 測定하고, 353nm의 excitation wavelength와 438nm의 emission wavelength의 조건으로 형광검출기에 의하여 biopterin을 測定한다.

실험방법은 흰쥐 尿를 1ml를 採取하여 EDTA (25 mg)와 섞어서 -20°C에서 빛을 차단하여 냉동 보관한다. 이 尿 시료를 냉동 건조시켜 3% methanol 9cc에 희석시켜 10cc를 Sep-Pak C₁₈ cartridges(Waters Asso)에 통과시켜 여과시킨다. 이렇게 여과시킨 용액을 20 μ l 採取하여 HPLC에 주입하여 biopterin치를 測定하였다.

그리고 실험 전에는 항상 biopterin의 표준용액 (0.001mg/ml, 0.05mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml)을 HPLC에 주입하여 각각의 결과치를 測定하였다.

이렇게 測定한 biopterin의 면적치를 이용하여 일차 표준 곡선($y=ax+b$)을 그리고 상관계수 r을 구한다. 이 r값을 이용하여 각각의 biopterin 면적치에 대한 양을 산출한다. 산출된 biopterin량은 오줌에 혼합한 완충액의 희석 농도, 주입한 양, Sep-Pak C₁₈ cartridge의 회수율(65 %)을 교정하여 각 쥐들의 尿中 creatinine에 대한 biopterin 値를 산출하였다.

통계처리 방법

대조군과 각 주령별 결과치는 평균치와 표준오차로 표기(Mean \pm SEM)하고 통계 처리는 ANOVA(분산 분석)를 시행하였으며 대조군 및 각 주령별 사이에는 duncan's multiple range test를 사용하여 통계적 차이를 검증하였다.

결 과

임상증상

發癌劑인 DEN을 각 주령별 계속 투여한 뒤 7주령이 경과하면서 약간의 行動 鈍化와 脫毛 現狀이 일부 개체에서 나타나기 시작하였다. 1일 개체당 14~18ml 정도의 음수량도 DEN을 계속 투여후 8주령이 경과하면서 부터 조금씩 감소하기 시작하여 10주령 이후에서는 10ml 정도로 음수량이 감소하였음을 관찰할 수 있었다.

사료 섭취량도 DEN 투여후 7~9주령이 경과하면서 조금씩 감소하다가 DEN 투여후 12주령 이상에서 거의 반정도로 감소하였다. 1일 오줌 배설량은 DEN 투여 주령이 경과할수록 개체에 따라 조금씩 감소하였으나 전체적으로 큰 차이는 발견되지 않았다. 發癌劑를 투여하지 않고 같은 조건으로 12주간 사육한 대조군에서의 특이한 臨床症狀 및 生理學的 變化는 관찰되지 않았다.

체중 및 간중량의 변화

發癌劑 DEN을 계속 투여한 군의 각 주령별 體重 變化는 發癌劑를 투여하지 않은 대조군에 비해서 DEN 투여후 11주령군 이후부터는 유의하게 감소되었으며($p<0.05$), 肝重量 역시 대조

Table 1. Changes of bodyweights and liver weights in DEN administrated rats(Mean± SEM)

Duration of treatment (weeks)	No of rats used	BW (g)	LW (g)	LW/BW (%)
0*	10	359.32± 18.09	14.15± 2.31	3.94± 0.53
11	12	314.98± 31.26**	11.74± 3.09	3.72± 0.70
12	15	327.54± 34.12**	11.94± 2.55	3.64± 0.94
13	12	296.23± 58.72**	10.24± 2.58	3.45± 0.82

* Control : no treatment during 12 weeks. LW : liver weight, BW : body weight

** : Significantly(p<0.05) different within column.

군에 비해서 유의하게 감소되었으나 각 주령군 별로는 유의한 차이가 없었다. 體重에 대한 肝重量比率은 각 주령별로는 대조군의 3.94± 0.53%에 비해 發癌劑 투여후의 11주령군에서는 3.72± 0.70% 다소 감소하였고, 다른 주령의 DEN 투여군에서도 정도의 차이는 있으나 11주령군과 비슷한 양상을 나타내어 비율이 감소되었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 1).

혈청 간효소 활성치의 변화

Asparate aminotransferase(AST) 활성치
: DEN을 계속 투여한 군의 각 주령별 AST 酵素活性値는 發癌劑를 투여하지 않은 대조군의 45.96± 1.17(IU/ml)에 비해서 유의하게 증가되어 있고(p<0.05), DEN 투여 11주령군에서는 127.17± 56.30(IU/ml)으로 가장 높게 증가되었다. 11주령군 이후의 DEN 투여군은 다소 감소하였지만 각 주령별 사이의 變化는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Table 2).

Table 2. Changes of AST activity in DEN administrated rats

Duration of treatment (weeks)	No of rats used	Activity (IU/ml)
0	10	45.96± 1.17
11	12	127.17± 56.30*
12	15	105.88± 19.73*
13	12	107.80± 39.26*

* : Significantly(p<0.05) different within column.

Alanine aminotransferase(ALT) 활성치

DEN을 계속 투여한 11주령군에서 ALT 酵素活性値가 49.73± 2.53(IU/ml)으로 최고치로 증가되었고, 대조군의 25.40± 2.45(IU/ml)에 비해서 유의하게 증가되었으며(p<0.05), DEN 투여후 12주령군에는 33.99± 3.22(IU/ml)로 11주령군에 비해 유의하게 감소하였고, 13주령군에는 12주령군과 비슷한 活性値를 보였다(Table 3).

Table 3. Changes of ALT activity in DEN administrated rats

Duration of treatment (weeks)	No of rats used	Activity (IU/ml)
0	10	25.40± 2.45
11	12	49.73± 2.53*
12	15	33.99± 3.22*
13	12	34.67± 2.48*

* : Significantly(p<0.05) different within column.

γ-glutamyl transpeptidase(γ-GTP) 활성치

γ-GTP 酵素活性値는 대조군의 37.24± 19.22(IU/ml)에 비해서 發癌劑 투여군의 11주령군에서부터 71.67± 21.51(IU/ml)로 나타나 각 주령별 活性値는 유의하게 증가되었으나(p<0.05), 각 주령군별 간의 뚜렷한 차이 없이 일정한 수준으로 활성치가 유지되었다(Table 4).

Table 4. Changes of γ -GTP activity in DEN administrated rats

Duration of treatment (weeks)	No of rats used	Activity (IU/ml)
0	10	37.24 ± 19.22
11	12	71.67 ± 21.51*
12	15	67.78 ± 28.52*
13	12	71.99 ± 36.94*

* : Significantly ($p < 0.05$) different within column.

뇨중 biopterin 농도 변화

Urine biopterin 농도는 대조군의 정상치인 $20.10 \pm 0.08 \mu\text{mol/mg creatinine}$ 에 비해 11주령에서 $1077.61 \pm 287.78 \mu\text{mol/mg creatinine}$ 으로 유의하게 증가되어 있었고 ($p < 0.05$), 주령이 경과함에 따라 계속 증가하였지만 13주령과 14주령에서의 변화 외에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (Table 5).

Table 5. Changes of urine biopterin concentration in DEN administrated rats

Duration of treatment (weeks)	No of rats used	Biopterin ($\mu\text{mol/mg creatinine}$)
0	10	20.10 ± 0.08
11	12	1077.61 ± 287.78*
12	15	1253.34 ± 217.91*
13	12	1407.85 ± 209.94*
14	6	1684.38 ± 127.76*

* : Significantly ($p < 0.05$) different within column.

고찰

癌發生機轉과 과정은 아직 완전히 규명되지 않고 있는 실정이며 여러 chemical substances, radiation 및 virus 등의 요인이 腫瘍 誘發에 크게 기인한다고 알려져 있고, 최근 급격한 산업화로 인한 많은 오염 물질이 생물체의 유전

자에 영향을 미쳐 돌연변이 및 癌을 誘發하여 이 문제가 심각하게 대두되고 있다.

이러한 發癌物質의 일종인 DEN은 aminoazo dyes를 투여하였을 때 나타나는 간에서의 변 화인 괴사 및 증식과 과호염기성 그리고 종양이 발생한다³²⁾. DEN은 cytochrome p450에서 生 活性化되어 smooth endoplasmic reticulum이 많은 中心靜脈주변에 壞死를 誘發시키고 脂肪 症을 誘發시킨다고 알려져 있다. 모든 惡性腫 瘍에서와 마찬가지로 肝癌에서의 體重 감소는 특이한 症狀 중의 하나이다. 본 실험에서는 대 조군에 비해서 發癌劑 DEN을 투여한 쥐에서 體重 감소 및 肝重量이 감소하여 유의한 차이가 있었고, 體重에 대한 肝重量 比는 다소 감소하 였지만 큰 차이는 없었다.

1993년 Rogers 등³³⁾은 惡性腫瘍이 생겼을 경우에 體重이 크게 감소한다고 했으며, 1987년 Matsufuji 등³⁴⁾도 N-amyl-N-methylnitrosamine으로 食道癌이 誘發된 쥐에서 미미한 體重 감소가 있었다고 보고하였다.

본 실험에서는 다른 보고에서와 같이 體重에 대한 肝의 무게 比率은 肝癌이 진행시 대조군에 비하여 전체적으로 증가하지 않았고 오히려 다소 감소하는 양상이었는데 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 한편 血清 酵素 活性值의 測定 에서는 대부분의 肝毒性 물질 또는 肝癌 誘發 物質에서처럼 모든 肝酵素 活性值에서 대조군에 비해 큰 증가를 나타내었다.

어떤 원인으로 간세포가 손상이 되면 肝機能 이상이 초래되고 간에 특이적인 효소들이 상 승하게 된다. 특히, 肝癌 발생시 이런 효소들이 血清內 활성치가 현저히 증가하게 된다.

1984년 Simonsen 등³⁵⁾은 肝移植術을 실시한 환자에서 AST, ALT, γ -GTP, ALP 등의 혈청내 효소치 측정으로 간기능 회복 정도의 지표로 삼았고, 또한 肝機能 이상시 이들의 효소가 높은 상승치를 나타낸다고 보고하였다. 1992년 및 1994년에 김 등^{36,37)}은 흰쥐에 사염화탄소를 투여하여 肝細胞 損傷을 誘發시켜 혈청내 AST, ALT, ALP 등의 간 효소 활성치가 큰 폭으로 증가한다고 보고하였다.

DEN은 원래 강력한 alkylating agent로서

發癌性 뿐만 아니라 강한 毒性을 나타낸다고 알려져 있는데, 이번 실험에도 肝細胞 變性 및 變異등으로 AST, ALT, γ -GTP 효소치가 모두 정상 대조군에 비해 상당히 증가된 결과를 나타내었고 또한 肝炎 등 다른 肝疾患과도 구별되게 상당히 높은 수치로 증가하는 것을 알 수 있었다.

Neopterin과 밀접하게 관련된 biopterin은 carbon 6번째에 3-carbon chain을 가지고 있는 pterin compound 군에 속한다. Pterin은 처음에 곤충과 하급 척추 동물에서의 색소 물질로서 기술되었다³⁸⁾. 과거 10년 동안에 체액에서의 neopterin의 증가가 hyperphenylalaninaemias, 惡性腫瘍³⁹⁾, 수종의 感染性 疾患狀態^{39,40)} 등에서 보고되었다. 그 후에도 보고들이 많이 되었는데, neopterin농도와 각종 疾患의 예후의 예측 능력과 相關關係가 있다는 보고가 있다. 이와 같은 소견으로 neopterin의 測定을 臨床醫學에서 넓게 사용하게 되었다. Biopterin(neopterin)은 癌의 침범 범위와 심화도와 관련이 깊다²³⁾. 최근 이런 현상들이 細胞性 抗癌 免疫反應의 결과라는 의견이 제시되고 있지만 아직 실험적인 증거가 뒷받침되지는 못하고 있다. 그렇지만 결론적으로 biopterin 표식자가 癌에서는 비특이적이지만 癌의 침범 범위와 심화도를 나타내는 지표가 된다는 보고가 있었고^{21,22)} 이에 본 실험은 肝癌 誘發物質인 DEN을 투여한 쥐의 尿에서 biopterin을 測定하여 그 相關關係를 보고자 하였다.

본 실험에서 urine biopterin level은 쥐의 정상치인 $20.10 \pm 0.08 \text{ mol/mg creatinine}$ 에 비해서 상당히 증가되었고, 癌 초기보다 기간이 경과될수록 더 증가하였는데, 이는 각종 癌性 疾患에 있어서 biopterin의 level이 증가한다는 많은 보고와 일치하는 소견으로서 아직 疾病에 대한 특이도와 민감도에 대해서 많은 연구가 이루어져 있지 않았고, biopterin level의 증가와 腫瘍과의 관계에 대한 기전은 확실히 밝혀지지 않았지만, 유주(leakage)에 의해 단핵구나 대식세포의 활성화에 의한 interferon-b의 상승과 T-cell의 자극으로 인한 interferon- γ 의 활성화로 인한 것으로 여겨진다. 이번 실험 결과를 볼

때 앞으로 biopterin의 중요성이 인식되었으므로 biopterin의 腫瘍에 대한 표지수(objective index)로서의 가치에 대한 연구가 활발해져야 할 것이다.

肉眼的 觀察을 통한 臨床症狀의 變化로는 9주령을 기점으로 하여 쥐의 體重 감소 및 음수·사료 섭취량이 감소하였으며, 쥐의 被毛가 거칠어지고 일부에서 脫毛 症狀이 나타나 癌 진행을 예측하였다.

결 론

쥐를 사용하여 발암제인 DEN을 경구(음수) 투여 하지않은 대조군과 DEN을 계속적으로 경구로 음수시켜 간증양을 유발시킨 실험군에서의 육안적인 관찰(임상증상), 체중 및 간증량 측정, 혈액화학치(AST, ALT, γ -GTP)와 urine biopterin 농도 측정을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DEN을 투여한 7주령 이후의 쥐에서는 약간의 행동둔화, 탈모, 음수량 감소, 사료 섭취량 감소 등의 소견들이 관찰되었으나, 다른 특이한 임상 증상은 없었다.
2. DEN 투여 11주후부터는 체중 및 간증량이 대조군에 비하여 유의적으로($p < 0.05$)감소하였다.
3. 체중에 대한 간증량의 비율은 DEN 투여 11주후부터 대조군에 비해 다소 감소하였지만 통계적으로 유의한 차이가 없었다.
4. 간특이효소인 AST, ALT, γ -GTP 활성치는 대조군에 비해서 DEN 투여군에서 증가하였고, AST 활성치가 다른 효소활성치에 비해 더 높은 수치를 나타내었다($p < 0.05$).
5. Urine biopterin 농도는 대조군에 비해서 DEN 투여군에서 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.05$).
6. Urine biopterin 농도는 DEN 투여군에서 주령이 경과될수록 증가하고 13, 14주령 사이에서 유의성있는 증가를 보였다($p < 0.05$).

이상의 결과로, DEN을 계속 투여한 모든 쥐에서 간의 손상 및 세포변성과 증양을 일으

켜 DEN은 강력한 간 발암물질임을 확인하였고, 체중 및 간중량 감소와 간특이효소 활성치의 증가 및 뇨중 bioplerin 농도 증가로 간종양의 임상진단 지표자료로 활용이 가능하며, 간의 형태학적 검사와 비교하여 간암의 정확한 소견을 관찰할 수 있을것으로 본다.

참고문헌

1. Daoust RF. 1973. Histochemical studies on nuclease activity and neoplastic transformation in rat liver during diethylnitrosamine carcinogenesis. *Cancer Res* 33 : 3108~3111.
2. Vesselinovitch SD, Mihailovich N. 1983. Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. *Cancer Res* 43 : 4253~4259.
3. Jang JJ, Lee SJ, Kim SH. 1989. Lack of modifying effect of germanium in rat hepatic foci initiated by diethylnitrosamine followed by D-galactosamine treatment. *J Dorean Cancer* 21 : 7~10.
4. Lagopoulos L, Sunahara GI, Stalder R. 1991. The effects of alternating dietary restriction and ad libitum feeding of mice on the development of diethylnitrosamine-induced liver tumours and its correlation to insulinaemia. *Carcinogenesis* 12 : 311~315.
5. Tessitore L, Pani P, Dianzani MU. 1992. Mechanisms of the enhanced liver carcinogenesis by choline in female rats : delay in liver growth after partial hepatectomy and stimulation of 2-AAF mitoinhibition. *Carcinogenesis* 13 : 1929~1932.
6. Carthew P, Martin EA, Smith LL. 1995. Tamoxifen induces shortterm cumulative DNA damage and liver tumors in rats : promotion by phenobarbital. *Cancer Res* 55 : 544~547.
7. Emmilot P, Scherer E. 1980. The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis. a quantitative approach. *Biochemica Biophysica Acta*. 605 : 247.
8. Piot HC, Sirica AE. 1980. The stage of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochemica Biophysica Acta* 605 : 191~215.
9. Odashima S. 1980. Overview : N-nitroso compounds as carcinogens for experimental animals and man. *Oncology* 37 : 282~286.
10. Lijinsky W. 1987. Structure-activity relations in carcinogenesis by N-nitrocompounds. *Cancer Metastasis Rev* 6 : 301~356.
11. Scherer E. 1984. Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis. *Biochemica Biophysica Acta*. 738 : 219~236.
12. Ito N, Imaida K, Hasegawa R. et al. 1989. Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. *CRC Crit Rev Toxicol* 19 : 385~415.
13. Farber E. 1987. Possible etiologic mechanisms in chemical carcinogenesis. *Exp Health Perspectives* 75 : 65~70.
14. Goldsworthy TL, Hanigan MH. 1986. Models of hepatocarcinogenesis in the rat : Contrasts and comparison. *CRC Crit Rev Toxicol* 17 : 61~89.
15. Sato K. 1985. Glutathione S-transferases and hepatocarcinogenesis. *Jap J Cancer Res* 79 : 556~576.
16. Kaufmann S. 1981. *Regulatory properties of pterin-dependent hydroxylases ; variations on a theme*. In : usdin E, Weiner N, Youdim MBH, eds. Function and regulation of monoamine enzymes. *New York : Macmillan* 165 : 173.
17. Nichol C A, Smith GK, Duch DS. 1985. Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and biopterin. *Annu Rev Biochem* 54 : 729~769.

18. Schoedon G. 1986. Interferon-gamma enhances biosynthesis of pterin in peripheral blood mononuclear cells by induction of GTP-cyclohydrolase I activity. *J Interferon* 6 : 697~703.
19. Schoedon G, Niederwieser A. 1987. Biosynthesis and metabolism of pterins in peripheral blood mononuclear cells of man and mouse. *Eur J Biochem* 166 : 303~309.
20. Blau N, Schoedon G, Curtius HC. 1989. Biosynthesis and significance of neopterin in the immune system. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25 : 603~605.
21. Hausen A. 1982. Urinary neopterin in the assessment of lymphoid and myeloid neoplasia, and neopterin levels in haemolytic anaemia and benign monoclonal gammopathy. *Clin Biochem* 15 : 34~37.
22. Aulitzky WM, Frick J. 1985. Significance of urinary neopterin in patients with malignant tumors of the genitourinary tract. *Cancer* 55 : 1052~1059.
23. Fuchs D.. 1988. Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity. *Immunol Today* 9 : 150~155.
24. Reitman S, Frankel S. 1963. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminas activity. *Am J Clin Pathol* 28 : 56~63.
25. Naftalin L, Sexton M, Tracey D. 1963. A routine procedure for estimating serum gamma-glutamyl transpeptidase activity. *Clin Chim Acta* 26 : 293~704.
26. Niederweiser A, Staudemann W, Wetzel E. 1984. High performance liquid chromatography with columnswitching for analysis of biogenic amine metabolites and pterins. *J Chromatography* 290 : 237~246.
27. Aulitzky W. 1988. Comparison of serum neopterin levels and urinary neopterin excretion in renal allograft recipients. *Clin Nephrol* 33 : 62~66.
28. Hey H, Rokos H. 1989. A new immunoassay for the determination of neopterin in body fluids. *Bio Chem Hoppeseyler* 370 : 385~386.
29. Rokos H.. 1985. *Determination of neopterin and reduced neopterins by radioimmunoassay*. In : Wachter H, Curtius C, Pfleiderer W. eds. Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines. *De Gruyter, Berlin-New York* 4 : 73~84.
30. Werner E. R., et al. 1987. Simultaneous determination of neopterin and creatinine in serum with solid-phase extraction and on-line elution liquid chromatography. *Clin Chem* 33 : 2028~2033.
31. Werner E R. 1987. Determination of neopterin in serum and urine. *Clin Chem* 33 : 62~66.
32. Sherer E. 1984. Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis. *Biochemica Biophysica Acta* 738 : 219~236.
33. Rogers AE, Zeisel SH, Groopman J. 1993. : Diet and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 14 : 2205~2217.
34. Matsufuji H, Ueo H, Mori M, et al. 1987. Enhancement of esophageal carcinogenesis induced in rats by N-amyln-meth-ylnitrosamine in the presence of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *JNCI* 79 : 1123~1129.
35. Simonsen R, Virji MA. 1984. Interpreting the profile of liver-function tests in pediatric liver transplants. *Clin Chem* 30 : 1607~1610.
36. 김길수, 박준형 1992. 사염화탄소에 의한 랫드의 간손상에 미치는 인진호 추출물의 영향. *대한수의학회지* 32(3) : 347~356.
37. 김길수, 박준형 1994. 사염화탄소에 의한 랫드의 간손상에 대한 인진호메타놀 추출물의 억제효과, *대한수의학회지* 34(3) : 619~629.

38. Schoepf C, Liebig S. 1941. *Ann Chem* 548 : 82.
39. Huber C. 1983. Pteridines as a new marker to detect human T-cells activated by allogenic or modifier self major histocompatibility complex(MHC)determinants. *J Immunol* 130 : 1047~1049.
40. Wachter HA, Hausen A, Grassmayr K. 1979. Increased urinary excretion of neopterin in patients with malignant tumors and virus disease. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* 360 : 1957~1960.