

발암제에 의해 간종양이 유발된 쥐에서 간기능과 형태학적  
변화에 관한 연구  
(II. 간의 형태학적 변화에 관하여)

김철호, 문평일, 강정부\*

경상남도 축산진흥연구소 북부지소, 경상대학교 수의과대학\*

Changes on function and morphology of liver  
in carcinogen-induced hepatoma rats  
(II. Changes on morphology 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 was concerned with assessment of diethylnitrosamine(DEN) induced liver cell carcinogenesis by measurement of changes preceding the development of neoplasms. The changes of hepatic morphology in rats(Sprague-Dawley) were detected by hematoxylin-eosin stain and immunohistochemistry(PCNA). 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. Variable size of liver tumor and hepatomegaly were observed in rats treated with DEN after 10 weeks.
3. Numerous vacuoles were showed on the midzonal and or peripheral areas of hepatic lobules. The large and polymorphological hepatocytes with eosinophilic cytoplasm or densely basophilic mitotic nucleoli were showed.
4. Several proliferative small round cells were shown on vacuolated and necrotic areas in peripheral hepatic lobules or portal areas.
5. PCNA-positive cells were showed on the vacuolated portal areas and peripheral areas of hepatic lobules. Maximal positivity was 23.6% in the areas of small round cells.

In conclusion, this result confirmed that the DEN was one of the potent hepatocarcinogens.

In histopathological analysis, the altered foci, hyperplastic nodules, neoplastic nodules, adenomas and carcinomas were observed in liver tumors induced by administration of DEN in rats.

Key words : Rat, Carcinogenesis, Morphology, Immunohistochemistry.

## 서 론

### 실험 목적

근래 肝癌에 대한 연구가 활발해져 이의 발생 기전과 원인에 관한 정확한 규명과 진단을 위한 노력이 심화되고 있으나, 아직까지 이의 발생 기전에 대한 기본적인 연구가 충분하지는 못한 실정이다. 肝癌을 주로 일으키는 원인 으로는 肝炎 바이러스, aflatoxin, radiation 및 여러 가지 化學的 發癌物質이 밝혀져 있으며, 이런 원인 들이 肝細胞의 突然變異原 또는 發癌原으로 작용하여 肝癌을 일으키는 것으로 알려져 있다.

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과 肝癌의 形態學的 觀察 결과를 비교함으로써 肝癌 발생과정과 기전을 추론할 수 있는 기초자료를 제공하고, 實驗動物 肝癌 발생 연구 모델이 확립되면 인축의 肝癌 발생 과정을 규명하고 發癌 抑制 및 誘發 藥劑 규명과 癌治療에 이용될 수 있는 모델 동물로 활용이 가능하다고 판단된다.

### 간암 유발 모델

實驗動物에서의 肝癌 誘發 모델은 DEN<sup>1-4)</sup>, acetylaminofluorene<sup>5)</sup>, phenobarbital<sup>6)</sup> 등 여러 가지 化學的 發癌劑를 투여하는 방법에 따라 여러가지가 연구되어 왔다<sup>7)</sup>.

쥐에서 肝癌 발생 모델은 1932년에 化學的 發癌原인 o-aminoazotoluol 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 發癌性이 확인되었다<sup>8)</sup>.

Nitrosamine 계통 중 특히 DEN은 단독 투여 뿐만 아니라 AAF<sup>5)</sup>, orotic acid<sup>9)</sup>, phenobarbital<sup>10,11)</sup>, benzopyrene<sup>12)</sup>, N-amyl-N-methylnitrosamine<sup>13)</sup>, CCl<sub>4</sub><sup>14)</sup> 등과도 함께 투여하여 많은 肝癌 誘發 연구에 활용되고 있으며, 단기간 투여 시에도 肝癌을 일으킬 뿐만 아니라 투여 방법도 다양하여 發癌 誘發 연구에 많이 사용되어 왔다. 특히 최근에는 쥐에서 DEN을 1회 투여하고 部分肝 切除術을 실시하여 肝癌을 誘發시키는 방법도 알려져 있다<sup>15)</sup>.

이에 본 실험에서는 8주령된 Sprague-Dawley계통의 쥐에 0.01%의 DEN을 함유한 음수를 계속해서 6주에서 14주동안 투여하여 發癌 모델 가능성을 형태학적으로 확인코져 실시하였다.

### PCNA 면역조직화학적 염색

增殖性 細胞核 抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)은 흥반성 낭창에 걸린 患者의 血清에서 최초로 발견된 36k dalton의 核蛋白質이다<sup>16)</sup>. PCNA는 cyclin이라고도 불리는 증식성 세포핵단백질로 세포주기와 관련되고 증식성인 세포의 후기 G1기와 S기에 축적되므로<sup>17)</sup> 여러 惡性疾患者에서 腫瘍 細胞의 增殖 활동은 轉移 가능성, 재발 및 전반적인 診斷에 사용되고<sup>18)</sup> 또한 정상 및 腫瘍組織의 生理學的 특성을 규명하는데 중요한 것으로 여겨진다.

PCNA 免疫反應은 단클론 抗體를 이용한 정상 formalin 액으로 고정된 조직의 증식 과정에서 발견되었다<sup>19)</sup>. 分裂細胞의 組織學的 규명은 細胞核內 복제되는 DNA와 關聯 3H-thymidine을 분열세포와 결합하게 하는 放射線 磁

氣法이나 細胞核의 nucleotides의 구성성분인 bromodeoxyuridine(BrdU)를 이용하거나 세포가 增殖하기 前 휴지기에 나타나는 DNA polymerase delta의 보조 蛋白質로서 세포 분열주기 조절 단백질인 PCNA가 형성되는데 이 PCNA에 대한 단크론 抗體로서 免疫組織化學的方法으로 分裂細胞(DNA合成 및 有絲分裂)를 검색하게 되며 이러한 방법을 이용하여 消化器管과 生殖器管 등의 상피재생에 관한 연구, 癌의 惡性, 陽性的 구별 및 豫候 推定, 傷處 치유 등에 관한 연구에 활용되어 왔다.

Brdur의 단크론 항체를 이용한 방법은 복제기에 있는 세포에만 검색되지만 PCNA는 복제 전기의 말기, 복제기, 복제 후기의 초기에 세포도 검색할 수 있어서 분열세포의 범위가 넓고 출현 세포가 많다고 한다. PCNA 염색은 핵에 한정되며 주로 선상형태이고 핵의 주변부나 핵주위 병변부에 주로 출현 한다.

PCNA를 이용한 免疫組織化學的方法에 의한 肝癌細胞에서의 PCNA 항체에 대한 양성반응세포의 비율(labeling index, LI)과 臨床病理學的의 연관성을 규명하고 惡性癌 疾患의 전구 단계로서 여겨지는 小細胞肝異形成 (small cell liver displasia)의 增殖性 활동과 이에대한 生理學的의 중요성을 규명하기 위해 실시되었다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

生後 6주령된 SPF Sprague-Dawley 수컷 흰 쥐를 아산생명과학연구소에서 분양받아 2주간 適正 飼育環境에 馴化시켰으며, 건강한 8주령의 체중 120~150gm의 동물만을 시험에 사용하였다. 實驗動物의 환경조건은 온도  $20 \pm 4$  °C, 상대습도 45~60%, 환기 회수 10~12회/hr, 조명 시간(오전 9시~오후 11시), 조도 150~200Lux 상태로 본대학 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 같은 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 기간동안 펠렛 사료를 자유 공급하였다.

### 형태학적 관찰

DEN을 장기간 투여한 군별 흰쥐를 ether로 마취하고 개복하여 肝과 다른 腹腔 臟器를 관찰한 후 4% neutral buffer paraformaldehyde로 관류 고정하고, 각 장기를 채취하여 10% 중성 formalin액에 재고정하여 통상적인 방법과 같이 paraffin 포매된 조직절편을 4~5μm 두께로 박절한 후 組織標本을 만들고 일부 조직은 hematoxylin-eosin 染色을 실시하여 광학현미경으로 관찰하고 일부 조직은 免疫化學的方法으로 PCNA 陽性反應細胞를 조사하기 위하여 PCNA antibody(Oncogene Science)를 1차 抗體로 사용하였고, 2차 抗體는 vetastain ABC kit (Vector Lab)를 사용한후, 發色劑 3,3'-diaminobenzidine tetra-hydrochloride(DAB)의 0.1 M Tris-HCl(PH 7.6)에 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가한 기질용액을 조직절편에 가해 發色시킨후 증류수로 세척하고 Harris hematoxylin으로 대조염색

을 하여 탈수과정을 거친후 glycerin jelly 또는 balsam으로 봉입하여 黃褐色으로 發色되는 PCNA 抗體의 양성반응세포의 분포를 광학현미경으로 고배율(400배) 하에서 다섯 視野를 관찰하여 양성세포의 비율(labeling index, LI)을 조사하였다<sup>20)</sup>.

## 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.

### 육안적 소견

臟器剖檢을 통한 肉眼的 肝의 소견으로는 發癌劑(DEN) 투여후 10주령이 경과된 흰쥐에서 肝에 직경 5mm 이하의 癌 초기 結節性 病巢, 腫瘍性 結節(增殖性 結節)이 다수 관찰되었으며, 주로 간주위 변연부에 腫瘍들이 많이 발생하였고 그에 동반된 肝腫瘍 초기 간비대 현상도 관찰할 수 있었다. DEN 투여후 11주령이 경과한 군에서는 심한경우 肝組織 전반에 직경 5mm 전후의 新生物性 結節, 肝細胞癌腫이 형성되었고 간표면의 硬化와 종대현상도 관찰할 수 있었다(Photo 1, 2).

12주령이후의 發癌劑 투여군에서는 肝腫瘍의

크기와 수가 증가하여 간조직 전반에 肝癌腫을 관찰할 수 있었으며 간이 경화되고 간 표면이 종대되었으나 주령이 경과될수록 점차 肝實質 組織의 萎縮 현상이 관찰되었다. 肝組織 이외의 장기에서는 이상 소견은 명확하지 않았으나 일부 개체에서는 腸組織의 심한 위축과 유착 현상이 관찰되기도 하였다. DEN을 전혀 투여하지 않고 12주 동안 사육한 대조군의 간조직은 정상적으로 특이한 변화는 없었다.

### 조직학적 소견

각 주령별 發癌劑 투여군의 肝組織을 hematoxylin-eosin 염색하여 광학현미경하의 組織學的 소견으로 DEN을 투여한 쥐의 전반적인 肝組織 소견으로 주위의 정상조직과 구분되게 肝小葉中心部 또는 周邊部の 靜脈과 洞樣血管의 확장, 그리고 대소부동의 다형태성 肝細胞内の 核은 호염성 核小體가 뚜렷하고 증대 및 농축과 有絲分裂像이고, 細胞質은 顆粒性 호산성으로 염색되고, 空胞變性이 주요 소견이었다. 肝組織의 變性和 壞死와 增殖이 진행되는 變性된 病巢(增殖性 結節) 부위에 肝腫瘍 病巢의 전구 단계인 小細胞肝異形成(增殖性 작은 圓形細胞集團)의 출현으로 肝腫瘍의 소견을 관찰할 수 있었다.

DEN을 투여한 각 주령별 肝組織 소견으로 洞樣血管의 확장은 투여후 10주째는 일부 소수의 간소엽 주변부에서 나타났으나, 11주령군에서는 더 진행되어 다수의 간소엽 주변부로 血管 확장이 나타났으며, 12주, 13주령 이상 투여군에서는 全 소엽으로 확대되어 관찰되었다(Photo 3, 4, 5, 9).

肝細胞 空胞變性は 10주째는 역시 일부 소수 간소엽에서 限局性으로 관찰되었으나 11주째 부터 대다수의 간소엽 중심대와 주변대 門脈 부위에 다형의 많은 수의 공포가 집단적으로 발생되었고, 시일이 경과될수록 전 간세포에 미만성으로 증가하였고 13주째에는 대부분의 간세포들은 세포질내에 大小不同의 다형태성 공포를 함유하고 있었다(Photo 3,4,5,9,10).

이들의 肝細胞 空胞가 점차 크기와 수가 증가하여 壞死가 이루어진 變性된 結節病巢 부위에서는 增殖性 작은 새로운 원형세포 집단이 11주째부터 출현하기 시작하였고, 다른 부위에서는 작은 空胞 등이 모여서 큰 小胞가 형성되고 그 주변부에서는 結合組織이 增殖되어 皮膜이 형성된 增殖性 結節이 나타났고, 여기에 肝癌細胞化 段階인 증식성 작은 원형세포가 출현하기 시작하였다(Photo 4, 7, 8).

肝細胞의 변화로는 DEN 투여후 10주째부터 일부 간소엽을 중심으로 空胞를 가진 肝細胞 變性化로 주위 정상 조직과 구별되게 나타나기 시작하였고, 11주령군에는 대다수의 간소엽 중심대와 주변부위에 공포변화에 의한 肝細胞變性이 뚜렷하게 나타났으며 12주령 및 13주령 이상의 투여군에서는 쏘 간소엽 및 門脈 부위에 미만성 간세포 공포변성 및 괴사 소견이 나타났다.

이들의 간세포는 다형태성으로 대소부동하게 크기의 차이가 많았으며, 空胞變性이 많이 일어나고 있는 부위와 그 주변부의 細胞들은 核과 細胞質은 증대되고 顆粒性으로 好鹽性 또는 好酸性化하였고, 대부분의 핵들은 호염성으로 핵인이 뚜렷하고 농축된 모양으로 치밀하게 보이며 유사분열상을 하고 있었다(Photo 5, 6, 8, 10).

DEN을 각 주령별로 쥐에 계속 투여한 결과 간세포 변성을 유도해 간조직에 괴사와 증식이 계속되며 미분화된 증식성 작은 원형세포가 증가된 癌段階의 變性된 病巢, 增殖性 結節, 新生物性 結節이 나타나 肝腫瘍 소견을 관찰할 수 있었고, 대조군의 간조직 소견은 정상적으로 특이한 병변을 관찰할 수 없었다.

#### PCNA 면역조직화학적 염색 소견

DEN을 계속 투여한 13주령군의 흰쥐의 肝組織을 파라핀포매된 조직절편을 4~5 $\mu$ 로 박절한 후 PCNA 免疫組織化學的 염색을 실시하여 PCNA 양성반응세포(간중양 세포)를 관찰한 결과로 PCNA 양성반응 세포의 출현은 肝小葉 周邊과 門脈部位에 주로 나타나며 간조직상 다형태성의 세포내에서 대소부동의 空胞가 증

가되어 壞死가 진행되는 變性된 病巢의 증식세포나 增殖性 結節 부위의 작은 원형의세포 집단들 중에서 양성반응 세포가 출현하였고, 또한 공포변성이 진행된 큰 小胞의 주위에 結合組織이 증식되어 피막이 형성된 부위에 작은 원형의 세포들 중에 양성반응 세포가 출현하였고(Photo 12,15), 전체 간세포에 대한 양성반응 세포의 비율은 간세포에는 거의 소수에서만 관찰되어 간세포 核의 有絲分裂像과는 반대로 거의 분열이 일어나지 않고 있었다(Photo 11, 12, 13).

다만 간소엽 주변의 일정 범위내의 세포들 중에 증식성 작은 원형세포 집단들에서는 23.6%까지 높은 PCNA 양성반응 세포가 관찰되어 세포 분열률이 높음을 알 수 있었다(Photo 13, 14,16). 이로 미루어 보아 DEN을 투여한 쥐 간의 면역조직화학적 염색 소견으로 肝細胞 變性 및 壞死와 增殖이(結節性 病巢) 진행되는 부위의 미분화된 작은 원형세포 집단에서 양성률 증가로 變性된 病巢 및 增殖性 結節과 新生物性 結節을 확인하여 肝癌 진행을 알 수 있었다.

## 고 찰

癌發生機轉과 過程은 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 유전자에 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 변화인 괴사 및 증식과 과호염기성 그리고 중양이 발생한다<sup>21)</sup>.

DEN은 cytochrome p450에서 생활성화되어 smooth endoplasmic reticulum이 많은 중심정맥주변에 壞死를 誘發시키고 脂肪症을 誘發시킨다고 알려져 있다.

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 진

행을 예측하였다.

부검시 변연부 간표면의 종대와 腫瘍 結節 組織의 형성이 10주령에서부터 뚜렷하게 관찰되었으며 11 주령부터 더 진행되어 12주령 이후에서는 직경 5mm 내외의 腫瘍組織이 전체적으로 분포되어 있으며 간조직도 硬化되고 結節性이 된 것을 관찰할 수 있어 肝癌이 진행되는 것을 알 수 있었다.

化學物質에 의한 간손상의 가장 흔한 組織學的 특성은 간세포의 종대와 지방변성인데 이런 손상은 사염화탄소(carbon tetrachloride)에서 잘 나타난다. 이런 다양한 간세포 손상 물질이 단기간 경하게 작용하면 저질로 회복할 수 있을 것이고, 장기간 지속하거나 심하면 간세포변성이 불가역적인 괴사를 일으키고 화학물질에 따라 담즙울체형 및 육아종형성이나 혈관계통의 손상을 유발하며 지속적인 자극의 원인으로 纖維化로 큰 자극에 의해 만성 간손상이 나타나며 암으로 진행될 수 있다. 만일 간손상의 구조를 조직학적으로 잘 분석하면 손상 물질에 따라 특별한 간손상이 나타나므로 원인 물질을 예측할 수 있다.

이런 관점에서 간소염의 限局性 病巢는 독성 손상을 의미하는 단서가 될 수 있다. 위에서 들은 예로 사염화 탄소에 의한 손상은 간소염의 중심부에 손상을 유발한다<sup>22,23</sup>. 이는 소염의 중심부 內形質細網에 mixed function oxidase(MFO)가 많이 분포하기 때문이다. 간소염의 바깥 부분에는 虛血性 損傷이 잘 일어난다. 1972년 Seawright와 Hrdlicka<sup>24</sup>의 보고는 MFO 효소를 유도하는 phenobarbital에 먼저 노출되면 hepatotoxin 및 phytotoxin은 간중심부 또는 간소염 중심부 손상을 유발한다고 한다.

毒物이 急性 혹은 慢性으로 노출되는지, 투여 경로에 따라서 손상의 형태가 달라진다. 보통 독물이 간소염주위 肝門脈部位의 간세포에 먼저 노출이 되지만, 간소염 중심부위의 肝細胞가 더 쉽게 損傷을 입는다. 이것은 血管 분포보다는 代謝가 활발하게 일어나는 부위가 더 많은 損傷을 입는다는 것을 의미한다.

본 실험에서도 DEN에 계속 노출된 간조직의 초기 변화에서 소염중심부의 간세포에서 변

성이 주로 많이 나타났다.

肝癌의 조직병리학적 소견으로 변성된 간세포의 癌形成은 肝癌發生 전에 전구암 상태로 존재한다. 이러한 전구암들은 1956년 Farber와 1967년 Inaoka은 증식성 난원형 세포 또는 증식성 원형세포라 하였고<sup>25</sup>, 쥐에 간 發癌劑를 투여한 후 수일내에 간에 작은 卵圓形 細胞가 관찰된다. 이 세포는 작고 원형 또는 난원형이므로 oval cell로 명명되었으며 세포질이 적고 핵이 창백하게 보인다. Rubin 등은 이들 작은 oval cell들이 간문맥주위에 집중되고 담도계통의 기원세포라 보고하였다<sup>25</sup>.

변성된 병소가 간암의 세포의 출현에 가장 빠르게 나타나는 병소이다. Bannasch 등은 병소라는 것은 소염보다 작고, 비정상적으로 염색되는 성질을 나타내며 다양하게 표현된다고 하였다<sup>25</sup>. 이 病巢 細胞는 實質로 둘러싸여서 나타나는 비정상적인 평판형태로 보인다. 또한 結節性 病巢들은 發癌 과정에서 病巢가 진행된 후에 增殖性의 結節, 新生物性 結節 혹은, 腺腫이 나타난다.

DEN을 투여한 동물의 간세포의 공포화에 관해서 1989년 Dunsford 등<sup>26</sup>은 5주째부터 공포성 간세포들의 병소가 출현하여 9주째는 증가되었다고 하였다. 본 연구에서 간세포의 공포화는 10주째는 소수의 간소염의 주변부에서 출현하였고, 11주째는 전소염에 발생하였으며 주로 주변대와 중심대에 집단적으로 발생하였고, 어떤 부위는 작은 소포가 형성되었고, 13주째는 거의 모든 간세포들에서 공포화가 발생되었고 또 더 진행되고 있었다.

간세포의 핵의 변화에 관해서는 1994년 Tamano 등<sup>27</sup>은 소염중심부 간세포의 핵과 세포질은 큰 다형세포들이 나타났다고 하였다. 본 실험에서는 發癌劑 투여후 10주째부터 核과 好酸性 細胞質은 증대되고 核은 好鹽性 核小體가 뚜렷하고 또한 농축되었으며 유사분열상을 하였으나 주령이 경과할수록 간세포변성과 괴사, 증식 소견이 뚜렷하였고 이런 病巢部位에 癌細胞가 발생되는 현상이 일어났다.

DEN 투여에 의한 肝癌 小節(결절성 병소)의 발생시기와 組織學的 소견에 관해서는 1989년

Dunsford 등<sup>26)</sup>은 다양한 腫瘍小節이 형성되고 이 小節은 卵圓形의 세포들의 增殖이 현저하였는데, 肝癌細胞의 전구세포라고 하였다. 이러한 소절들은 11주째에 인정되었고, 13주째에는 모든 쥐의 간조직에서 발생이 관찰되었다고 하였다. 1992년 이 등<sup>28)</sup>은 10주째에 지주조직이 형성되고 간세포의 크기가 다양하였고 발생되는 종양세포는 방추형의 긴핵을 가진 세포들이 도서상으로 모여 있었다고 하였다.

본 연구에서는 11주째에 空胞의 수와 크기가 증대되어 壞死가 이루어진 부위에서나 또는 큰 소포의 增殖性 結節 주변에 새로운 증식성 작은 원형의 세포 집단이 출현하기 시작하였고, 이러한 세포는 PCNA 양성반응세포의 비율이 높아 위의 보고와 같이 惡性癌의 전구세포로 간주되었다.

간에 발생하는 腫瘍細胞 중에 PCNA 양성세포의 비율에 관해서는 실험동물에서는 찾아볼 수 없었고, 사람에서는 1993년 Deugnier 등<sup>29)</sup>은  $24 \pm 21\%$ , 또 다른 연구자는  $33.3 \pm 26.3\%$  였다고 하였고, 1993년 Adachi 등<sup>30)</sup>은 肝癌 小節 내에서 癌의 진행 정도에 따라서 12.2%에서 최고 83.9%로 차이가 많았다고 하였다. 일반적으로 惡性腫瘍은 높고 陽性腫瘍은 낮다고 하나 정확한 한계는 제시된 바 없다.

본 연구에서는 23.6%로서 위의 보고들과 같이 높은 편으로 惡性腫瘍이 발생되고 있는 것으로 생각되었다.

## 결 론

쥐를 사용하여 발암제인 DEN을 경구(음수) 투여 하지않은 대조군과 DEN을 계속적으로 경구로 음수시켜 간종양을 유발시킨 실험군에서의 육안적인 관찰(임상증상)과 간종양의 형태학적 검사를 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DEN을 투여한 7주령 이후의 쥐에서는

약간의 행동둔화, 탈모, 음수량 감소, 사료 섭취량 감소 등의 소견들이 관찰되었으나, 다른 특이한 임상증상은 없었다.

2. DEN을 투여한 실험군에서 10주령 이후 간의 변연부에 주로 집중하여 간종대와 증식성 결절의 종양이 발생되었고, 간표면은 둔탁하고 경화되었으며 주령이 경과될수록 간 전반에 큰 종양을 관찰할 수 있었다.
3. 광학현미경 검사 소견에서는 간소엽 중심부와 주변부의 정맥과 동양혈관의 확장공포변성이 주요 소견이었고, 11주령부터 대부분의 간세포들은 대소부동한 다형태성으로 공포가 많이 나타났고, 간세포 핵은 증대되어 핵소체가 뚜렷하고 또한 호염성으로 농축되고 유사분열하고 있는 양상을 관찰할 수 있었다.
4. DEN을 투여한 11주령 이상에서부터 간소엽 주변부의 공포변성과 세포괴사가 진행되고 결합조직이 피막을 형성한 결절 부위에 미분화된 작은원형세포 집단이 관찰었다.
5. PCNA 면역조직화학적 염색 소견에서는 DEN 투여군에서는 간세포 공포변성과 괴사가 진행된 부위와 큰 소포에 결합조직이 증식된 부위에 PCNA 양성세포 출현율이 작은 원형세포 집단에서 23.6%까지 높게 관찰 되었다.

이상의 결과로, DEN을 계속 투여한 모든 쥐에서 간의 손상 및 세포변성과 종양을 일으켜 DEN은 강력한 간 발암물질임을 확인하였고, 간의 형태학적 검사에서 DEN의 계속적인 투여로 일정기간 경과후 간세포 변성 소견과 결절성 병소 주위에 증식성의 작은 원형세포 집단의 관찰로 암진행 단계인 변성된 병소, 증식성 결절, 신생물성 결절및 간암의 소견을 관찰할 수 있었다.

### Legends for Photos

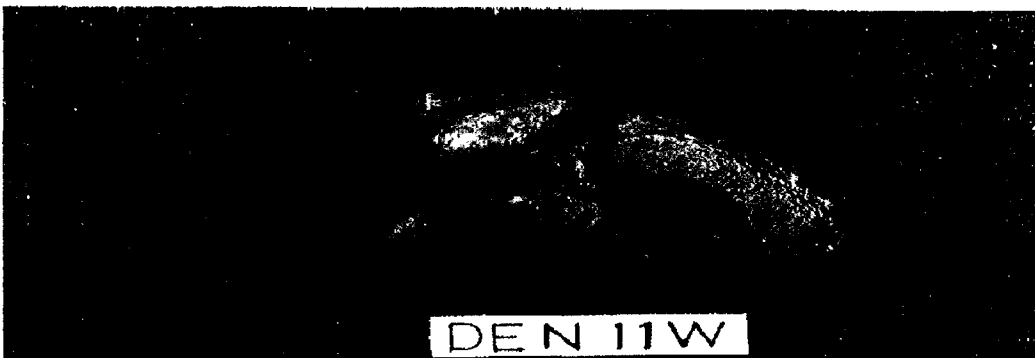
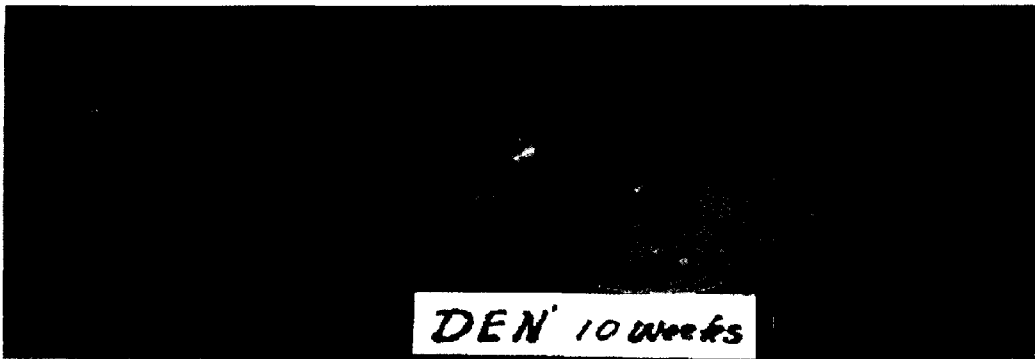
- Photo 1. The hepatomegaly and hepatic tumors on the peripheral areas in the rat treated with DEN for 10 weeks.
- Photo 2. Numerous hepatic tumors in the rat treated with DEN for 11 weeks.
- Photo 3. Numerous vacuoles are seen on the midzonal and peripheral areas of hepatic lobules. Small round cells are seen on the peripheral areas of the hepatic lobules in the rat liver treated with DEN for 11 weeks. H-E stain,  $\times 50$ .
- Photo 4. Magnification of Figure 3. Numerous vacuoles and small round cells arrows are seen on the midzonal and / or peripheral areas of hepatic lobules in the rat liver treated with DEN for 11 weeks. H-E stain,  $\times 100$ .
- Photo 5. Magnification of Figure 3. Numerous vacuoles arrows are seen on the midzonal areas of hepatic lobules, hepatocytes with eosinophilic cytoplasm and nuclei with prominent basophilic nucleoli or mitotic figure are seen. H-E stain,  $\times 200$ .
- Photo 6. The large and polymorphological hepatocytes with granular eosinophilic cytoplasm and densely basophilic mitotic nucleoli or proliferative small round cells are seen areas on the peripheral area in the rat liver treated with DEN for 11 weeks. H-E stain,  $\times 500$ .
- Photo 7. A large vesicle with the proliferative small round cells arrows on the periphery is seen in the rat liver treated with DEN for 11 weeks. H-E stain,  $\times 50$ .
- Photo 8. Several proliferative small round cells arrows on the vacuolated and necrotic areas and dense nuclei of hepatocytes with mitotic figures are seen in a hepatic lobule of the rat liver treated with DEN for 13 weeks. H-E stain,  $\times 200$ .
- Photo 9. Vacuolated small or large hepatocytes arrows are seen on the midzonal and portal peripheral areas of the hepatic lobules in the rat liver treated with DEN for 13 weeks. H-E stain,  $\times 100$ .
- Photo 10. Magnification of Figure 9. Vacuolated small or large polymorphological hepatocytes with eosinophilic cytoplasm and nuclei with prominent nucleoli or mitotic figure are seen in the rat liver treated with DEN for 13 weeks. H-E stain,  $\times 200$ .
- Photo 11. PCNA-positive cells of several small round cells arrows are seen on the vacuolated portal areas or peripheral areas of hepatic lobules in the rat liver treated with DEN for 13 weeks. Immunohistochemistry stain,  $\times 100$ .
- Photo 12. PCNA-positive of proliferative small round cells arrows are seen on the vacuolated portal areas and peripheral areas of hepatic lobules in the rat liver treated with DEN for 13 weeks. Immunohistochemistry stain,  $\times 100$ .
- Photo 13. PCNA-positive cells arrows are seen on the peripheral area of hepatic lobules in the rat liver treated with DEN for 13 weeks. Immunohistochemistry stain,  $\times 200$ .
- Photo 14. PCNA-positive cells are seen on the vacuolated portal areas and peripheral areas of hepatic lobules in the rat liver treated with DEN

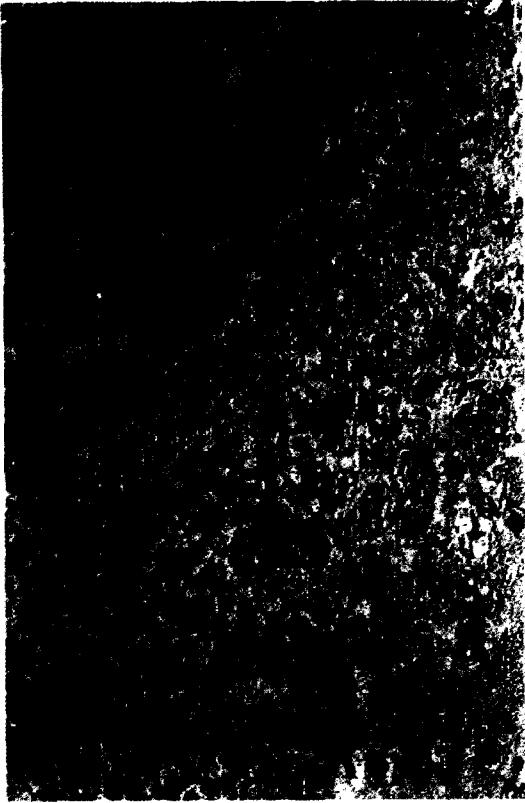


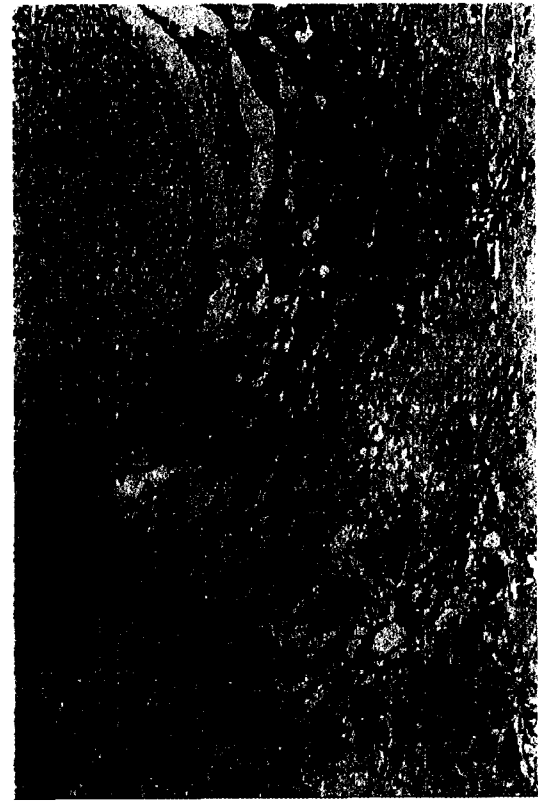
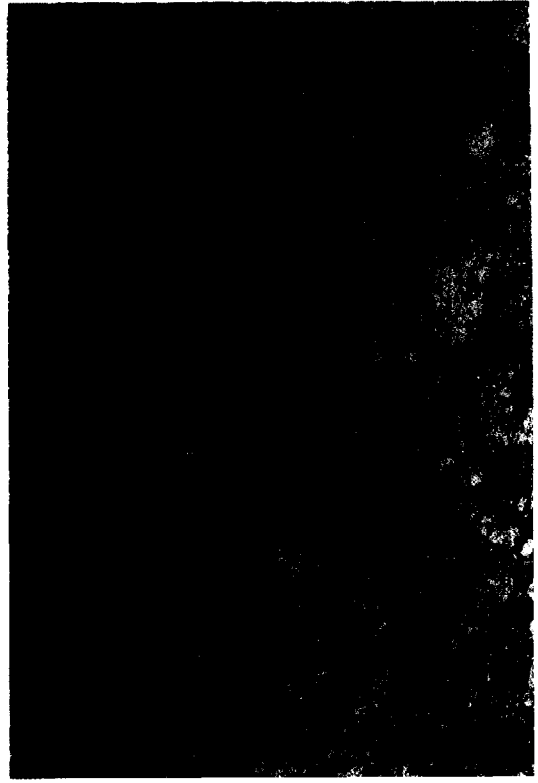
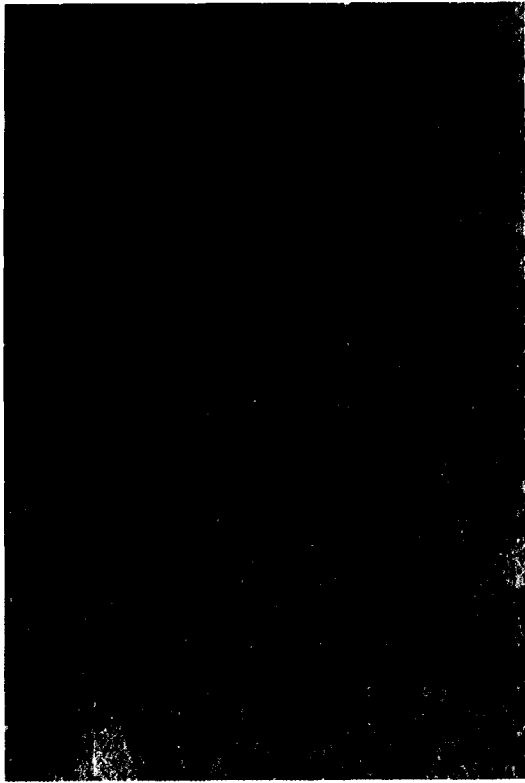
for 13 weeks Immunohistochemistry stain,  $\times 200$

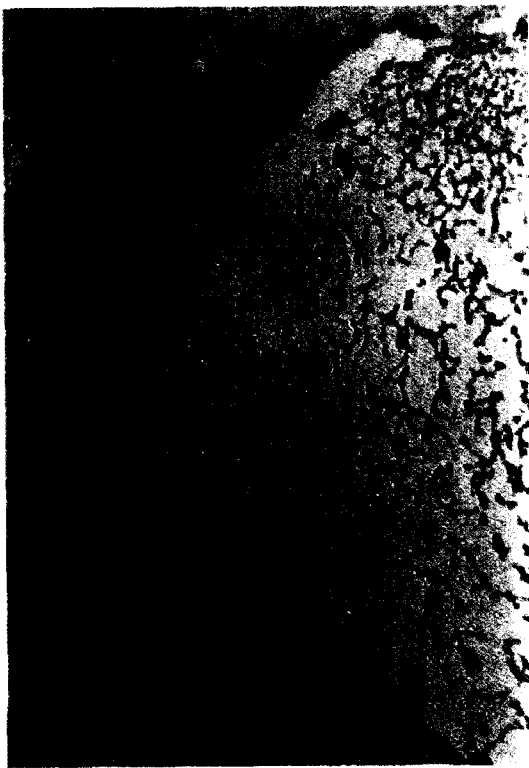
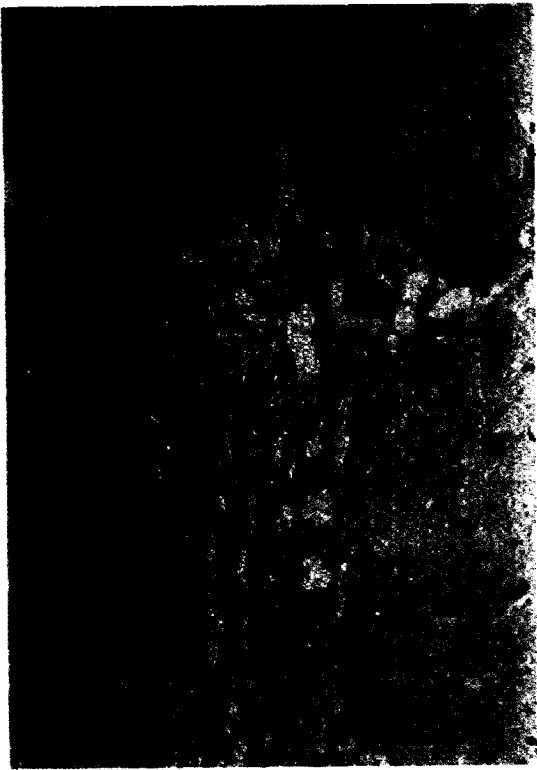
Photo 15. PCNA-positive cells arrows are seen in the lumen and on the capsule of a vesicle in the rat liver treated with DEN for 13 weeks. Immunohistochemistry stain,  $\times 200$ .

Photo 16. PCNA-positive cells arrows are seen in the proliferative connective tissue in necrotic area in the rat liver treated with DEN for 13 weeks. Immunohistochemistry stain,  $\times 500$ .









## 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. 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.
9. Laconi E, Denda A, Sarma DSR. 1993. Studies on liver tumor promotion in the rat by orotic acid : dose and minimum exposure time required for dietary orotic acid to promote hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 14 : 1771~1775.
10. Jack EM, Bentley P, Bieri F. et al. 1989. Increase in hepatocyte and nuclear volume and decrease in the population of binucleated cells in preneoplastic foci of rat liver : a stereological study using the nucleator method. *Swiss National Sci Foundation grant* 31 : 286~297.
11. Jack EM, Bentley P, Bieri F. et al. 1990. Ultrastructural change in chemically induced preneoplastic focal lesions in the rat liver : a stereological study. *Carcinogenesis* 11 : 1531~1538.
12. Peraino C, Staffeldt EF, Carnes BA. et al. 1984. Characterization of histochemically detectable altered hepatocyte foci and their relationship to hepatic tumorigenesis in rats treated once with diethylnitrosamine or benzo(a)pyrene within one day after birth. *Cancer Res* 44 : 3340~3347.
13. Matsufuji H, Ueo H, Mori M, et al. 1987. Enhancement of esophageal carcinogenesis induced in rats by N-amyl-N-met-hylnitrosamine in the presence of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *JNCI* 79 : 1123~1129.
14. Kovalszky I, Szeberenyi SZ, Zalatnai A, et al. 1992. Modification of DENA-induced hepatocarcinogenesis by CCl<sub>4</sub> cirrhosis. Comparison of the enzyme patterns. *Carcinogenesis* 13 : 773~778.
15. Solt DB, Farber E. 1976. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 263 : 702~703.
16. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. 1978. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121~2228.

17. Mathews B, Bernstein RM, Franza BR, et al. 1984. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309 : 374~376.
18. Hall PA, Levinson DA. 1990. Assessment of cell proliferation in histochemical material. Review. *J Clin Pathol* 43 : 184~192.
19. Waseem NH, Lane DP. 1990. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen(PCNA) structural conservation and the detection of a nuclear form. *J Cell Sci* 96 : 121~129.
20. Bravo R, Frand R, Blundell PA, et al. 1987. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA Polymerase- $\delta$ . *Nature* 326 : 515~517.
21. Sherer E. 1984. Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis. *Biochemica Biophysica Acta*. 738 : 219~236.
22. 김길수, 박준형. 1992. 사염화탄소에 의한 랫드의 간손상에 미치는 인진호 추출물의 영향. *대한수의학회지* 32(3) : 347~356
23. 김길수, 박준형. 1994. 사염화탄소에 의한 랫드의 간손상에 대한 인진호메타놀 추출물의 억제효과. *대한수의학회지* 34(3) : 619~629
24. Seawright AA, Hrdlicka J. 1972. The effect of prior dosing with phenobarbitone and diethylaminoethyl diphenylpropyl acetate (SKF 525-A) on the toxicity and liver lesion caused by nigaione in the mouse. *Br J Exp Pathol* 52 : 242~252.
25. Hirota N, Williams GM. 1991. *Hepatotoxicology* : Assesment of Hepatocarcinogenesis by early indicators. CRC Press Boca Raton Ann Arobor Boston London : 593~620.
26. Dunsford HA, Karnasuta C, Hynt JM, et al. 1989. Dirrerent lineage of chemically induced Hepatocellular carcinoma in rat defined by monoclonal antibodies. *Cancer Res* 4894~4900.
27. Tamono S, Merlino GT, Ward JM. 1994. Rapid development of hepatic tumors in transforming growth factor a transgenic mice associated with increased cell proliferation in precancerous hepatocellular lesions initiated by N-nitrosodiethylamine and promoted by phentobabital. *Carcinogenesis* 15 : 1791~1798.
28. 이혜영, 지관자. 1992. Diethynitrosamine에 의한 흰쥐 간세포의 형태학적 변화. *인하대기초과학연구소 논문집* 13(2) : 85~96.
29. Deugnier YM, Charalambous P. 1993. Pre-neoplastic significance of hepatic iron-free foci in genetic hemochromatosis a study of 185 patients. *Hepatology* 18 : 1363~1369.
30. Adachi E, Hashimoto H, Tsuneyoshi. 1993. Proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma and small cell liver dysplasia. *Cancer* 72 : 2902~2909.