

항암제 cyclophosphamide가 diethylnitrosamine에 의한 랫드 간암에 미치는 조직학적 영향

곽수동 · 강정부 · 고필옥 · 김종섭

경상대학교 수의과대학, 동물의학연구소

(1998년 12월 11일 접수)

Histological effect of cyclophosphamide on diethylnitrosamine-induced hepatic tumors in rats

Soo-dong Kwak, Chung-boo Kang, Phil-ok Koh, Chong-sup Kim

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

(Received Dec 11, 1998)

Abstract : This study was designed to evaluate the effect of cyclophosphamide(CY) on diethylnitrosamine(DEN)-induced hepatic tumors in rats.

Thirty five male or female Sprague Dawley rats were continuously given water containing 0.01% DEN for 10 weeks and then were given with CY 25mg/rat/day in water for 3, 5, 7 or 9 days.

The livers of rats were removed and fixed in 10% buffered neutral formalin.

The appearances of positive cells by immunohistochemical methods using proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibody, p53 antibody and apoptotic kit were investigated.

The livers of rats given with CY were grossly brilliant, red-brown color, flexible, and thin border, and stainability of the liver cells were restored microscopically, and the vacuolated and degenerated regions were differentiated from restored regions. These restored findings also were advanced in control group because of no DEN treatment but tended to be less advanced.

In immunohistochemistry, positive cells to PCNA antibody appeared more numerous in control groups than that of CY treated groups. Appearance of positive cells in CY-treated group for 7 days and for 9 days were more numerous than those of CY-treated groups for 3 days and for 5 days, respectively. So these findings suggested that CY suppressed cell proliferations and effects of these action were decreased with CY-treated days.

The numbers of positive cells to PCNA antibody were more prominent in hepatocellular carcinoma regions and cholangiocarcinoma regions, and then were ranked as order of large liver cell

이 연구는 1996년도 한국과학재단의 특정기초연구과제(96-04-02-11-01-3)에 의해 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Soo-dong Kwak, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Republic of Korea.

regions and normal liver cell regions.

Also the numbers of the positive cells by apoptotic kit tended to be higher in hepatocellular carcinoma regions and cholangiocarcinoma regions but not uniformly in order in all regions and were much less numbers than those of PCNA positive cells. So immunohistochemical methods using PCNA antibody together than using apoptotic kit alone when anti-carcinogen experiments.

Rats with positive cells by p53 antibody were 11 of 15 rats(73.4%) in control groups and 12 of 18 rats(66.7%) in CY treated group, respectively. These positive cells appeared focally in early vacuole-occurring regions and were very low in numbers.

Key words : hepatocellular carcinoma, PCNA, apoptosis, p53, cyclophosphamide, rat.

서 론

종양발생의 기원과 진행과정, 예방과 치료효과, 항암 효과 등의 연구에 중요한 자료를 얻기 위하여는 실험동물에 종양을 인위적으로 발생시켜야 한다. 그러나 실험동물에 발암물질(carcinogen)을 투여하면 암을 발생시키기 보다는 중독 등의 부작용으로 폐사되기 쉽고 암이 발생된다고 하더라도 특정 부위나 어떤 장기에만 한국적 또는 집중적으로 발생되고 대조군 보다 어떤 장기에 국한되고 또 빠르게 발생되었다고 평가되기는 쉽지 않다^{1,2}.

발암제인 diethylnitrosamine(DEN)은 유전자 독성발암물질(genotoxic carcinogen)으로 다른 장기에는 거의 영향이 없고 간장에만 종양을 발생시키므로 간암의 발생, 진행, 치료 및 약 효과 등의 실험에 많이 응용되고 있다³⁻⁶.

Cyclophosphamide(CAP)는 기형아 유발, 불임, 돌연변이, 여러장기의 염증, shock 등의 부작용도 많지만 신장과 골수이식 등의 장기이식에 거부반응에 대한 면역억제제로 많이 이용되면서 한편 종양의 치료 등의 항암제로 많이 응용되고 있다. CAP의 항암작용은 암세포에 대하여 apoptosis를 일으켜 암을 억제하는 것으로 알려져 있다⁹.

근래에 세포의 분열과 소멸과 관련된 유전자에 대한 연구가 많은데 p53 단백질과 Bcl-2 단백질은 apoptosis의 유전적 조절에 관련하는데 그 중에 p53 유전자는 정상세포가 손상돼 종양세포로 바뀌는 것을 막거나 세포에 내재된 자살 program을 가동시켜 세포가 자연적으로 소멸되도록 하여 조직의 새로운 세포의 신생에 의한 균형을

유지토록 함으로써 p53 유전자는 사람의 암조직에 대량 투입하면 암세포의 노화가 일어나고 암세포의 증식이 억제되는 현상이 일어나 암치료제의 가능성이 확인되었다¹⁰⁻²⁰. 그러나 p53 유전자가 돌연변이가 일어나 악성으로 바뀌면 종양억제 기능은 상실하게 되고 종양의 promoter로 작용하여 종양을 일으킨다고 한다. 이러한 기전은 담배연기중의 benzopyran, B형 간염 virus, aflatoxin 등처럼 유전자의 염기배열을 바꿔서 종양억제기능을 제거하였기 때문으로 밝혀졌다^{18,21,22}.

본 실험은 DEN을 랫드에 장기간 투여하여 간장에 암을 발생시켜 암치료제인 CAP의 투여가 간조직에 미치는 영향을 조직학적으로 조사하고 또 면역조직화학적 방법으로 간조직세포의 증식과 apoptosis, p53 항체의 양성반응세포 등의 출현에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

Sprague Dawley 랫드(70-90일령) 수컷 15수(195~250gm)와 암컷 20수(185~220gm)계 35수를 사육실내 적당한 조건이 구비된 사육환경에서 사육하면서 DEN 제제인 N-nitrosodiethylamine(Sigma, USA)을 음수에 0.01% 되게 하여 무제한 자유롭게 10주까지 공급하고 항암제로 많이 이용되고 있는 nitrosoamine 제제인 cytoxan(cyclophosphamide, 중의제약)을 1일 100mg/kg(1수당 25mg 정도)씩 Table 1과 같이 3일간, 5일간, 7일간 및 9일간씩 투여한 군과 각 군별로 대조군을 두었다.

Cytoxan의 투여방법은 투여기간동안에 매 오전동안 음수공급을 중단한 후 오후에 cytoxan 정제를 먼저 침지

Table 1. Appearances of positive cells by PCNA antibody in livers of DEN-treated rats

Groups	Cytosan-treated groups						Control groups					
	Periods	No. of rats	% of positive cells				Periods	No. of rats	% of positive cells			
			normal area	large cell area	small cell area	CC area*			normal area	large cell area	small cell area	CC area
10W**							0 day	3	6.3	10.4	13.9	18.1
10W-3D	3 days★	3	4.1	4.8	7.1	13.9	3 days☆	3	5.6	12.3	18.5	20.7
10W-5D	5 days	5	4.1	5.0	10.5	7.8	5 days	3	8.6	8.4	22.5	17.0
10W-7D	7 days	5	3.7	6.7	19.5	8.8	7 days	3	5.9	10.4	7.3	37.9
10W-9D	9 days	5	2.9	4.4	19.4	17.7	9 days	3	5.1	7.9	24.5	15.6
Mean			3.7	5.2	14.1	12.1		3	7.9	12.4	21.7	27.3

CC area* : cholangiocarcinoma area.

10W** : Treatment for 10 weeks with diethylnitrosamine(DEN).

3 days★ : Treatments for 3 days with cytosan after DEN-treatment as above.

3 days☆ : Non-treatment for 3 days with cytosan after DEN-treatment as above.

용해시킬 수 있는 작은 양의 polyethylenglycol과 ethanol에 차례로 넣은 후 마리당 1일 투여량 25mg의 cytosan이 10ml 정도의 수돗물에 함유되게 하여 당일에 전량 음수토록 하였다. 이후 ether로 마취하여 개복하여 4% NBP로 관류고정하고 간장을 채취하여 육안적으로 관찰하고 10% 중성 포르마린으로 재고정하였다. 이와 동시에 DEN을 10주까지 투여한 후 cytosan을 투여하지 않는 대조군은 계속 3일간, 5일간, 7일간 및 9일간씩 경과시킨 군으로 구분하여 3두씩 배치하여 위와 같은 방법으로 간장을 채취하여 고정하였다.

이들 간장은 paraffin 절편을 만들고 통상방법과 같이 hematoxylin-eosin 염색을 실시하여 발생된 암의 형태와 진행과정 등의 변화사항을 광학현미경적으로 관찰하였고 일부 두수의 paraffin 절편은 Table 1과 같이 면역염색에 이용하였다. 면역염색에서 1차 항체는 PCNA antibody (Oncogene Science, USA), p53 oncoprotein의 monoclonal antibody(Oncogene Science, USA)를 각각 100배로 희석하여 이용하였고 2차 항체부터는 Vetastein ABC kit(Vector Lab, USA)를 사용한 후 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)를 사용하여 발색토록 한 후 hematoxylin으로 대조염색을 하여 황갈색으로 발색되는 세포를 양성반응세포로 간주하고 microreticle이 장치된 광학현미경하에서 관찰하였다.

Apoptosis의 양성반응세포는 *In situ* apoptosis detection

kit(Oncor, USA)의 TUNEL 법의 제시에 따라 조직의 paraffin 절편을 proteinase K로 처리하고 Terminal deoxynucleic transferase (TdT)로 반응시킨 후 Anti-digoxigenin-peroxidase를 차례로 적용한 후 DAB로 발색하여 위의 방법과 같이 관찰하였다.

결 과

랫드에 DEN을 10주동안 투여한 군과 이후 다시 계속해서 cytosan을 3일간에서 9일간 투여한 군의 간장에 대하여 육안적, 병리조직학적 및 면역조직화학적으로 관찰하였다.

육안적으로는 DEN을 10주동안 투여한 군의 간장은 표면이 회황색이며 광택이 없고 많은 결절 또는 회백색 반점이나 혈종 등이 발생하였다. 계속해서 다시 cytosan을 투여한 군은 3일째부터 간장은 표면이 광택성 담적갈색으로 되며 탄력성이 있었고 주변부의 변연은 얇게 보였다(Fig 2).

현미경적으로는 DEN을 10주동안 투여한 군은 퇴행성 변화와 진행성 변화가 공존하고 있었다. 퇴행성 변화부위는 간세포의 광범한 종대, 변성 및 괴사가 있어 염색성의 감소 또는 소실되었고 진행성 변화부위는 간세포의 핵과 세포질의 대형화 또는 소형화한 세포로 집단화한 부위와 종양화 부위가 있었고 간소엽의 주변부에는

결합조직 등이 증식되었다.

DEN을 10주동안 투여후 cytoxin을 투여하지 않고 3일간에서 9일간 경과시킨 대조군(이하 대조군)에서는 시일이 경과할수록 진행성 변화부위는 간세포가 정상으로 회복되어 염색성이 회복되고 있었고 퇴행성 변화부위는 종대변성 공포화 피사가 더 진행되어 염색성이 소실하고 있어 두 소견부위 사이의 구분이 나타나고 있었다.

DEN을 10주동안 투여후 cytoxin을 3일간에서 9일간 투여군에서는 동일 소엽내에서는 전체가 피사하거나 또는 반대로 회복되는 소견을 나타내어 피사 또는 회복이 진행되는 부위가 더 구분되는 경향이였다(Fig 3). 회복되는 소엽 또는 부위는 세포질의 염색성이 호산성화, 세포와 핵의 크기와 형태의 균일화하여 치유소견이 나타난 반면에 피사부위는 협소화 하고 정상부위와 더 구별화되었다. 그러나 소엽주변부는 담소관의 확장과 담소관 상피세포의 위축, 담소관 외측에 결합조직의 증식 등 간경화 소견이 더 진행되는 부위가 많았다(Fig 3). 또 종양화한 부위에서도 세포질의 염색성이 더 짙게 나타났다. 이러한 변화는 DEN 투여중단에 의한 대조군 보다 더욱 신속하고 명확하게 나타나 cytoxin 투여는 정상세포와 종양세포가 더 활성화됨을 알 수 있었다(Fig 4).

면역조직화학적 방법에 의해 PCNA 항체의 양성반응세포의 조사는 간조직에서 변화가 가장 적어 정상형으로 인정되는 정상 간세포 부위, 대형화한 간세포 부위, 소형화한 간세포 부위, 담관암 부위 등으로 같은 유형세포가 많이 모인 부위별로 구분하고 그 부위내에 있는 간세포 등의 모든 종의 세포를 포함하여 PCNA 양성반응세포의 출현율을 조사한 바 Table 1과 같이 전체적으로는 대조군이 cytoxin 투여군 보다 높았고 cytoxin 투여군 중에서도 투여초기 3일째와 5일째는 낮은 편이나 7일째와 9일째는 보다 높은 편으로 cytoxin은 세포의 분열을 억제하나 투여기간이 증가할수록 억제작용이 적어졌다. 대조군에서는 시일이 경과할 수록 더 높은 편이였다(Fig 5). 부위별로는 소형화한 간세포 부위, 담관암 부위에서 그 비율이 높았고 그의 대형화한 간세포 부위, 정상부위 순이였다.

Apoptosis 양성반응세포는 PCNA 양성반응세포의 비율이 높은 소형화한 간세포 부위와 담관암 부위에서 높은 경향이였으나 반드시 일치하지는 않았고 전체적으로 PCNA 양성반응세포 보다 그 비율이 훨씬 낮고 항암제 효과측정에는 부족한 소견이였다. 그래서 PCNA 양

성반응세포 조사의 병용이 요구되였다(Fig 6).

p53 양성반응세포가 나타난 두수를 조사한 바 대조군 15수중에 양성반응 두수는 11수(73.4%)였고 반응이 나타나지 않는 두수는 4수(26.6%) 였다. Cytoxin 투여군은 18수중에 양성반응두수는 12수(66.7%) 였고 나타나지 않는 두수는 6수(33.3%)로 전체적으로 두수에 대한 출현은 높은 편이였다. 그러나 p53 항체에 대한 양성반응세포의 출현은 공포화 변성이 초기 시작되는 극히 일부에서 한국성으로 극소수의 양성반응 세포가 관찰되었고 공포화가 집단화로 더 진행된 부위나 종양이 진행된 부위에서는 관찰되지 않았었다(Fig 7). 이로 보아 p53 양성반응세포는 DEN에 의한 간암에서 출현율이 낮았고 cytoxin에 의한 영향은 앞으로 더 많은 조사가 요구되였다.

고 찰

Cytoxin에 의한 육안적 조직학적 항암효과에 대하여는 보고된 바를 찾아볼 수 없었으나 본 조사에서는 간의 색깔은 광택성 담적갈색으로 탄력성이 있었고 변연은 얇게 보였으며 조직학적으로는 세포질의 염색성이 균일하게 산성 염색성이 되었고 핵형태와 세포와 핵의 크기가 다양화에서 균일화 하였고 변성부위는 협소화 하고 정상부위와 구별화되며 소엽별로 변화의 차이가 더욱 명확히 구별되는 경향이였다. 그러나 담소관의 확장과 담소관 상피세포의 위축, 담소관외측에 결합조직의 증식 등 작은 변화는 더 진행되였다.

간에서 PCNA 양성반응세포의 출현에 관하여는 정상 간에서 Ng *et al*²³는 사람에서 2.22±4.95%, Tamano *et al*²⁴는 마우스에서 1.44±0.44%, James와 Muskhelishvili²⁵는 마우스에서 0.021~0.039% 였다고 하여 그 비율이 낮았다.

이상이 있는 간에서는 Adachi *et al*²⁶은 사람간암의 소절에서 12.2~83.9% 였고, Deugnier *et al*²⁷은 사람의 간의 preneoplastic foci에서 75% 였고 이중 간세포만을 대상으로 하였을 때는 24±21% 였다고 하였고, Ng *et al*²³는 carcinoma에서 1~89.4%로 범위가 넓고 평균은 33.3±26.3%로 예후추정에 가치가 있다고 하였고 DEN 투여예에서는 Tamano *et al*²⁴는 투여 23주째 preneoplastic foci는 24.4±5.2%, adenoma는 37.6±3.6%, carcinoma는 44.7±5.7% 였다고 하여 정상적인 간에서 보다 종양에서 양성반응세포의 비율은 훨씬 높음을 알 수 있다.

본 조사에서는 정상 간세포 부위에서 cytoxin 투여전

세포들은 평균 3.7%, 대조군은 7.9%로 위의 정상간에서 보고된 비율보다 월등히 높아 cytoxan 투여군에서도 정상간세포 부위가 증식이 높음을 알 수 있었고 cytoxan 투여군에서도 소형화한 간세포 부위 14.1%, 담관암 부위 12.1%로 Tamano *et al*²⁴의 보고와 같이 높은 편이다.

Cytoxan에 의한 효과에 대하여서는 보고된 바 없으나 본 조사에서는 전체적으로 대조군 보다 낮아 종양세포의 증식이 억제되고 있음을 알 수 있었고 또 조직학적 소견에서 투여군 간세포 염색성의 원상회복, 증식세포의 감소 등의 소견으로 보아 cytoxan 투여군은 세포증식이 감소됨을 인정할 수 있었다.

Apoptosis의 양성반응세포는 개체의 발생, 생체의 균형유지, 성장조절 등의 조직의 재변화(remodeling)하는 과정에서 일어나는 세포의 생리적 현상으로 apoptosis가 유사분열세포와 균형을 이루거나 더 높다면 종양치료에 좋은 결과가 될 것이다. 실제로 항암제는 apoptosis를 유발한다. 그러나 정상조직에서도 apoptosis가 일어나므로 얼마나 많은 종양세포에 선택적으로 일으키느냐가 중요하다. 그러므로 만약 apoptosis를 유발할 수 있는 유전자 조작의 길이 열리면 종양치료에 획기적 발전이 될 것이라고 하였다¹⁷.

종양치료에 apoptosis를 유도한 예는 cyclophosphamide, 방사선, alcohol 등을 이용하여 조사한 바 있다. 그 예로 Mills *et al*⁵는 DEN 투여 랫드에서 perillyl alcohol을 투여한 바 apoptosis가 증가하여 간의 중량이 감소하였다고 하였고 Stephens *et al*²⁸은 마우스 간세포암에서 apoptosis가 일어나는 간세포 비율은 0.6% 였으나 방사선(radiation) 치료량이 2.5Gy 이후는 20%, 25Gy 이후는 약 30%로 증가하였다고 하였고 apoptosis 양성반응세포의 최고치는 Meyn *et al*²⁹은 radiation의 10Gy에 노출된 후에 4~6 시간째 였고 24시간째는 원래 수준이 였다고 하였다. Auletta *et al*³⁰는 면양에 PGF 2a를 투여한 바 2%에서 6%로 증가하였다고 하였다.

Meyn *et al*²⁹은 apoptosis는 유방과 난소의 선암(adenocarcinoma)에서 체중에 대한 cyclophosphamide 200mg/Kg를 투여후 10~18시간 사이에 가장 높았고 그후 낮아지며 3~5일 후까지 지속되었고 25mg/Kg 투여시에도 apoptosis가 유의하게 높았고 100mg/Kg 투여시는 보다 더 높았다고 하여 이와같이 투여조건이나 경과시간에 따라 차이가 많았다.

Negoescu *et al*³¹은 조직학적으로 확인된 apoptosis cells

중에서 acetone 고정조직은 55% 만이 그의 고정액 5가지는 20% 이하가 TUNEL법으로 표지되었다고 하여 면역염색에서 표지되는 비율이 실제수 보다 훨씬 낮음을 알 수 있다.

TUNEL법에 의한 보고를 보면 Mustonen *et al*³²은 유방의 유도관의 증생(hyperplasias)과 sclerosing adenoses에서 각각 0.15%와 0.07%, 침투성 carcinoma는 0.76%, Stephens *et al*²⁸은 25Gy로 처치한 후 24시간째의 마우스 난소에서 5%, 간암에서 0.6% 였다고 하였고, Soini *et al*³³은 사람의 다형세포형 adenoma에서는 0.01%(0.00~0.07%), 악성 타액선 종양에서는 0.42%(0.00~1.75%)였다고 하여 아주 낮음을 알 수 있고, Auletta *et al*³⁰는 PGF 2a를 투여한 면양의 난소에 형성된 황체에서 6% 였다고 하였다. 그러나 방사선 처치나 그의 일부 예에서는 2~5%에서 20~30%까지 높았음을 보고한 바 있다^{28-30,34}.

본 조사에서는 TUNEL 법의 양성반응세포의 분포는 낮고 불균일하여 차이를 제시하기는 곤란하였으나 PCNA 양성반응세포가 많은 부위인 소형화한 간세포 부위와 담관암 부위에서 높은 경향이었다.

p53은 염색체 17의 short arm에 위치하는 유전자로 G1 checkpoint를 조정하여 비정상적인 세포가 S기로 들어가 증식하는 것을 억제하는 종양억제 유전자이다. 그러나 p53의 돌연변이형은 세포성장의 promoter가 되어 종양을 유발할 수 있고 정상세포에서는 양이 너무 적어 관찰할 수 없으나 조직배양세포나 종양세포에서 관찰된다고 하였다^{11,13,15-20,33}.

p53의 양성반응은 인체 종양의 50~60%^{19,20}, 사람의 폐암예의 47.5%²¹, 사람의 유방암예의 49%²², 모든 종양의 57.5%¹¹, 사람의 폐암 40건중에 28건¹³에서 발현되었다고 하였다. Mosnier *et al*³⁵은 결장과 직장의 선종예에서는 33예중에서 한 예에서만 관찰되고 암종(carcinoma)예에서는 70.4% 예에서 관찰되었다고 하였고, Colechia *et al*³⁶은 사람의 모든 선암 예에서 나타나지 않았다고 하여 관찰되는 예의 범위차이가 많았다.

본 DEN을 투여한 rat의 예에서는 cytoxan 투여군에서는 18수중 12수(66.7%), 대조군에서는 15수중에 11수(73.4%)로 높았다.

p53의 양성반응을 나타내는 종양의 예 중에서 p53 양성반응세포가 나타나는 비율에 관하여는 Yang *et al*¹⁶은 사람의 종양에서 0.1~93.2%(평균 42.7±29.4%), Gabbert *et al*¹¹은 사람의 위암에서 1~5% 였다고 하여 그 비율이

낮았음을 보고한 바 있고 Barbareschi *et al*³⁷은 사람의 중추신경계 종양에서 p53의 비율은 PCNA 양성반응세포의 비율과는 관계가 없다고 하였다.

본 조사에서는 공포화 변성이 시작되는 초기의 세포에서의 극히 일부의 간세포에서만 소엽별로 나타나는 경향이었고 다른 중앙형성 부위나 대형화 또는 소형화로 변형된 간세포들의 부위에서는 나타나지 않았다.

결 론

성숙단계에 있는 랫드에 DEN을 0.01% 되게 음수에 가하여 10주까지 투여하여 간암이 발생토록 하고 항암제인 cyclophosphamide의 제제인 cytoxan을 투여하여 간조직의 대한 변화를 조직학적으로 관찰하고 또 면역염색으로 증식세포와 apoptosis가 일어나는 세포와 p53 항체의 양성반응세포의 출현을 조사하였다.

육안적으로는 대조군과 cytoxan 투여군을 3일째 부터는 간의 색깔은 광택성 담적갈색을 보였고 탄력성이 있었고 변연은 얇게 보였다. 조직학적으로는 간세포는 정상간세포 처럼 염색성이 회복되는 소견이 나타났고 간세포의 종대 변성공포화 피사가 일어나는 부위와는 더 구별화되기 시작하였고 특히 소엽별로 변화의 차이가

더욱 명확히 구별되는 경향이였다. 이러한 소견은 대조군 보다 cytoxan 투여군에서는 더욱 명확하였다.

면역조직화학적 방법에서 PCNA 양성반응세포의 출현율은 대조군이 cytoxan 투여군 보다 높았고 cytoxan 투여군은 투여초기 3일째와 5일째는 낮은 편이나 7일째와 9일째는 보다 높은 편으로 cytoxan은 세포의 분열을 억제하나 투여회수가 증가할수록 억제작용이 적었다. 반대로 대조군에서는 시일이 경과할수록 높은 편이였다.

부위별로는 소형화한 간세포 부위, 담관암 부위에서 그 비율이 높았고 그의 대형화한 간세포 부위, 정상부위 순이였다.

Apoptosis 양성반응세포는 PCNA 양성반응세포의 비율이 높은 소형화한 간세포 부위와 담관암 부위에서 높은 경향이였으나 그 비율이 월등히 낮아 항암제의 효과 측정에는 PCNA 양성반응세포의 조사와의 동시용용이 요구되였다.

p53 양성반응세포가 나타난 대조군은 15수중에 11수(73.4%) 였고 cytoxan 투여군은 18수중에 12수(66.7%)로 전체적으로 두수에 대한 출현은 높은 편이나 양성반응세포는 공포화 변성이 초기 시작되는 일부에서 한국성으로 극소수의 세포에서 관찰되였다.

Legends for figures

- Fig 1. A few of greyish-white foci or nodules of tumors and blunter border are seen at livers of rats treated with diethylnitrosamine (DEN) for 10 weeks(control group).
- Fig 2. Less number of greyish-white foci or nodules of tumors and sharper border than those of control group are seen at livers of rats treated with cyclophosphamide(CY) for 9 days after DEN-treatment for 10 weeks.
- Fig 3. Proliferated interlobular connective tissue and cholangiocarcinoma are seen at a liver of a rat treated with CY for 6 days after DEN-treatment for 10 weeks. H-E stain. Bar = 165 μ m.
- Fig 4. Higher magnification of Fig 3. Cholangiocarcinoma are seen. Some hepatocytes are larger or smaller than normal hepatocytes in size. H-E. Bar = 42 μ m.
- Fig 5. Numerous PCNA positive cells(proliferative cells) in area of small-sized hepatocytes are seen at a liver of a rat treated with CY for 6 days after DEN-treatment for 10 weeks. Immunostain. Bar = 84 μ m.
- Fig 6. Many apoptotic positive cells from proliferated connective tissue cells, interlobular ductual epithelial cells and hepatocytes are seen at a liver of a rat treated with CY for 6 days after DEN-treatment for 10 weeks. TUNEL methods. Bar = 84 μ m.
- Fig 7. Some apoptotic hepatocytes are seen at the liver of a rat treated with CY for 3 days after DEN-treatment for 10 weeks. TUNEL method. Bar = 42 μ m.
- Fig 8. p53 positive cells are seen focally at the peripheral area of a hepatic lobule of a rat treated with DEN for 10 weeks. Immunostatin. Bar = 145 μ m.

참고 문헌

1. 김대중, 금정전, 이동신. 환경발암물질과 그 위험성 평가에 대하여. 한국실험동물학회지, 9:7-15, 1993.
2. 김신일. 인삼의 함유성분에 관한 연구. 충남대 약학과 박사학위논문. 1988.
3. Lagopoulos L, Sunahara GI, Wurzner 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.
4. Lagopoulos L, Stalder R. The influence of food intake on the development of diethylnitrosamine-induced liver tumours in mice. *Carcinogenesis*, 8:33-37, 1987.
5. Mills JJ, Chari RS, Boyer LJ, *et al.* Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Research*, 55:979-983, 1995.
6. 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.
7. 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.
8. 이해영. Diethylnitrosamine에 의한 흰쥐 간세포의 유전적 변화에 관한 연구. 인하대학교 대학원 박사학위논문, 1991.
9. Shao Y, Pardini L, Pardini RS. Intervention of transplantable human mammary carcinoma MX-1 chemotherapy with dietary menhaden oil in athymic mice: Increased therapeutic effects and decreased toxicity of cyclophosphamide. *Nutrition and Cancer*, 23(1):63-75, 1997.
10. Chernova OB, Chernov MV, Agarwal ML, *et al.* The role of p53 in regulating genomic stability when DNA and RNA synthesis are inhibited. *TIBS*, 20:431-434, 1995.
11. Gabbert HE, Muller W, Schneiders A, *et al.* The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. *Cancer*, 76:720-726, 1995.
12. Gijssels HE, Maassen CBM, Mulder GJ, MeermanJHN. p53 protein expression by hepatocarcinogens in the rat liver and its potential role in mitoinhibition of normal hepatocytes as a mechanism of hepatic tumour promotion. *Carcinogenesis*, 18(5):1027-1033, 1997.
13. Iggo R, Gatter K, Bartek J, *et al.* Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet*, 335:675-679, 1990.
14. Tilly KI, Banerjee S, Banerjee PP, *et al.* Expression of the p53 and Wilm's tumor suppressor genes in the rat ovary: Gonadotropin repression *in vivo* and immunohistochemical localization of nuclear p53 protein to apoptotic granulosa cells of atretic follicles. *Endocrinology*, 136:1394-1402, 1995.
15. Villuendas R, Piris MA, Orradre JL, *et al.* p53 protein expression in lymphomas and reactive lymphoid tissue. *J Pathol*, 166:235-241, 1992.
16. Yang P, Hirose T, Hasegawa T, *et al.* Prognostic implication of the p53 protein and Ki-67 antigen. Immunohistochemistry in malignant fibrous histiocytoma. *Cancer*, 76:618-625, 1995.
17. 김승철. Cell cycle and apoptosis. 대한부인종양·콜포스코피학회 춘계심포지엄지. p.23-42, 1998.
18. 송재진, 정숙정, 김주향. p53 유전자. overview. 대한기초의학지, 심포지움 초록: p.90. SY 7-1, 1997.
19. 신득용. 암 억제유전자: 암연구의 새로운 패러다임의 형성과 그 이후. 대한생화학분자생물학회지. 3(6): 11-15, 1996.
20. 이선경. The role of oncogenes and tumor suppressor genes. 대한부인종양·콜포스코피학회 춘계심포지엄지. p.11-21, 1998.
21. 이상용, 정진숙, 홍숙희. 원발성 폐암에서 p53 암억제유전자 단백질의 발현양상. 대한병리학회지, 30(3):218-227, 1996.
22. 정순희, 조미연, 김순용. 유방의 친화성 관암종에서 p53 단백질발현에 대한 연구. 대한병리학회지, 30(1):

- 7-14, 1996.
23. Ng IOL, Lai ECS, Fan ST, *et al.* Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 73:2268-74, 1994.
 24. 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(9):1791-8, 1994.
 25. James SJ, Muskhelishvili L. Rates of apoptosis and proliferation vary with caloric intake and may influence incidence of spontaneous hepatoma in C57BL/6x C3HF1 mie. *Cancer Reserach*, 54:5508- 5510, 1994.
 26. Adachi E, Hashimoto H, Tsuneyoshi M. Proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma and small cell liver dysplasia. *Cancer*, 72:2902-2909, 1993.
 27. Deugnier YM, Charalambous P, *et al.* Preneoplastic significance of hepatic iron-free foci in genetic hemochromatosis: a study of 185 patients. *Hepatology*, 18: 1363-1369, 1993.
 28. Stephens LC, Hunter NR, Ang KK, *et al.* Development of apoptosis in irradiated murine tumors as a function of time and dose. *Radiation Reserach*, 135: 75-80, 1993.
 29. Meyn RE, Stephens LC, Hunter NR, *et al.* Induction of apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide. *Cancer Cemother Pharmacol*, 33:410-414, 1994.
 30. Auletta FJ, Williams RE, Keim LB, *et al.* *In Situ* detection of apoptotic cells in the regressing sheep corpus luteum. *Bibliography Reprod*, p.30, 1994.
 31. Negoescu A, Lorimier P, *et al.* Tunel: Improvement and evaluation of the method for *In Situ* apoptotic cell identification. *Biochemica*, 2:12-17, 1997.
 32. Mustonen M, Raunio H, Paakko P, *et al.* The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in premalignant and malignant breast lesions. *Histopathology*, 31:347-354, 1997.
 33. Soini Y, Tormanen U, Paakoo P. Apoptosis is inversely related to bcl-2 but not bax expression in salivary gland tumours. *Histopathology*, 32:28-34, 1988.
 34. 광수동, 강정부, 고필옥. Diethylnitrosamine을 투여한 rat 간장의 tumorigenesis에 관하여. 2. 종양세포의 apoptosis와 증식에 관한 조직학적 소견. *대한수의학 회지*, 38(2):386-393, 1998.
 35. Mosnier J-F, Perret AG, Vindimian M, *et al.* An immunohistochemical study of the simultaneous expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in epithelial tumors of the colon and rectum. *Arch Pathol ab Med*, 120:654-659, 1996.
 36. Colecchia M, Frigo B, Del Boca, *et al.* Detection of apoptosis by the tunel technique in clinically localised prostatic cancer before and after combined endocrine therapy. *J Clin Pathol*, 50(50):384-388, 1997.
 37. Barbareschi M, Iuzzolino P, Pennella A, *et al.* p53 Protein expression in central nervous system neoplasms. *J Clin Pathol*, 45:583-586, 1992.