

## 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene 및 N-methyl-N-nitrosourea를 투여한 랫드 유선 조직 배양에 대한 형태학적 변화

문지영 · 정자영<sup>1</sup> · 김옥희<sup>1</sup> · 이형환  
건국대학교 생명과학과, <sup>1</sup>식품의약품안전청

### Morphological Changes in the Mammary Organ Culture of the Rat Treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and N-methyl-N-nitrosourea

Ji Young Moon, Ja Young Jeong<sup>1</sup>, Ok Hee Kim<sup>1</sup> and Hyung Hoan Lee

Department of Biological Science, Konkuk University  
<sup>1</sup>Korea Food and Drug Administration  
(Received November 16, 2000)  
(Accepted December 20, 2000)

**ABSTRACT** : The organ culture model of the whole mammary gland has many advantages for the study of branching morphogenesis and biological characteristics, including tumorigenesis. Prior to whole gland organ culture, rats were treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) or N-methyl-N-nitrosourea (MNU) for one week. The transforming effect and the morphological changes were assessed by the whole mount preparations and histopathological examination in terminal end buds (TEB), terminal ducts (TD), alveolar buds (AB), alveolar lobules (AL) and hyperplastic alveolar nodules (HAN) of the mammary gland. Gross findings of the mammary glands at dissection were higher branching morphogenesis and larger volume in carcinogen-treated groups than in carcinogen-non-treated groups. Results of the whole mount method were coincided with those of the histopathological observations. Circular TEB, normally maintained AB, AL, and high cellular density were more frequently observed in carcinogen-treated groups than in carcinogen-non-treated groups. Histopathologically, as a preneoplastic marker, HAN was maintained only in mammary organ culture of the carcinogen-treated groups. These findings suggest that *in vivo* transformation effects by carcinogens persisted during the mammary organ culture. These results were more characteristic in DMBA than in MNU-treated group. Ducts and terminal ducts appeared to have lost morphology during their growths in case of without diethylstilbestrol (DES). The fact that *in vitro* organ culture without DES was resulted in abnormal ductular morphogenesis confirms that DES is a physiological regulator of ductular epithelial cell growth.

**Key Words** : Mammary organ culture, Whole mount method, Hyperplastic alveolar nodules, Mammary gland carcinogenesis, DMBA, MNU, DES

#### I. 서 론

유방암은 유럽이나 미국의 여성에서는 가장 흔히 일어나는 자연발생 종양으로서 암으로 인한 사망 중 폐암에 이어 두 번째로 높게 나타나며 점차 증가하는 추세이다. 우리나라 통계청 발표(2000년)에 의하면, 여성의 사망률 중

자궁암이 차지하는 비율은 1990년 7.8%에서 1999년 5.6%로 감소하는 경향이거나, 유방암은 1990년 3.5%에서 1999년 4.8%로, 10년간 37.1%나 크게 증가하는 추세에 있어 유방암에 대한 관심이 높아지고 있다.

유방암 연구에 오랫동안 이용되고 있는 질환모델은 랫드 및 마우스의 유선암 모델이다. 실험동물에서 유선암을 유발시키는 방법으로는 방사선을 조사하는 방법(Medina 등, 1998), 화학발암물질을 투여하는 방법(King, 1996) 및

\*To whom correspondence should be addressed

mouse mammary tumor virus(MMTV)를 이용하는 방법(Bocchinfuso 등, 1999)이 보고되고 있다. 유방암을 연구하는데 가장 보편적으로 이용되는 동물모델은 유선에 발암성이 있는 발암물질을 투여하는 화학발암이다. 그러나 마우스의 경우에는 MMTV의 영향을 고려해야 되므로, MMTV 부재동물을 사용해야 한다는 까다로운 조건이 있어, 현실적으로 랫드가 더 많이 연구에 이용되고 있다. 또한 랫드에 인위적으로 발생시킨 암은 육안적 관찰 및 촉진 가능 등의 장점이 있다. 실험동물에 유선암을 유발시키는 대표적인 발암물질로는 유전독성 발암 물질인 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene(DMBA)과 *N*-methyl-*N*-nitrosourea(MNU)가 많이 이용된다. DMBA와 MNU는 유선상피세포의 DNA에 직접적으로 작용하는 점은 두 물질이 유사하지만, MNU는 Ha-ras 유전자의 12번 코드의 변이를, DMBA는 Ha-ras의 61번 코드의 변이를 유발한다고 보고되어 있다(Lu 등, 1997).

실험동물의 유선은 피하에 존재하여 처치가 용이하다는 장점이 있기 때문에 분자생물학적 연구에도 다양한 방법으로 이용되고 있다. 즉 유선을 포함하고 있는 지방조직(fat pad) 또는 유선상피세포를 동종이나 이종의 다른 개체에 이식하는 방법(Hwang 등, 1996), 유선의 조직을 적출하여 *in vitro*상에서 배양하는 조직 배양법(Banerjee 등, 1973; Rivera 등, 1981; Barlow, 1997) 등이 있다. 이러한 방법들은 유선의 발생과 성장에 있어 호르몬의 작용기전 및 유선의 분자생물학적 특성을 밝혀내는데 매우 유용하게 이용되고 있다. 특히 유선 조직 배양법은 호르몬의 작용기전뿐만 아니라 화학적 유선암 유발물질의 작용 및 유선암 바이러스 등이 미치는 분자 생물학적 기전을 연구하는데 매우 유용하게 이용되고 있다(Prop, 1959; Banerjee 등, 1973). 또한 유선의 전형태관찰법(whole mount method, Strum, 1979; Ball, 1998)은 유선의 이차원적인 구조와 비정상 상태에서 나타나는 형태학적 변화 및 다양한 호르몬과 발암물질에 대한 반응을 알아보는데 유용하게 이용되고 있다. 이 방법에 의하여 만든 시료는 육안적으로 관찰하거나 사진에서 보이는 특정 부위를 선별하여 전자현미경으로 그 부위만을 조사할 수 있으며(Strum, 1979), 영상 분석기를 이용하여 객관적인 병리적 자료를 얻을 수 있다는 장점이 있다(Ball, 1998; Jeong 등, 1998).

따라서 본 연구는 3주령 랫드의 체내에 유선암 유발물질로 알려져 있는 DMBA 또는 MNU를 투여한 후 유선을 적출하여 조직 배양하면서 나타나는 변화를 전형태관찰법 및 병리조직학적 방법으로 조사하였다. 이와 같은 연구결과는 유선의 생물학적 특성과 유선암 유발 또는 억제에 관한 각종 연구를 위한 실험모델의 확립에 중요한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 발암물질 투여

국립독성연구소에서 생산한 3주령의 암컷 S.D. 랫드 80수를 분양 받아 사용하였다. 사육조건은 온도  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 습도는  $55\pm 5\%$ 로 명주기 12시간과 암주기 12시간을 유지시켰다. 사료(퓨리나 코리아)와 음수는 자유로이 급식시켰고 polycarbonate 케이지에 여섯 마리씩 넣어 관리하였다. 발암물질 투여로서, DMBA는 corn oil 5 mg/ml의 농도로 하여 체중 100 g당 1 ml씩 경구투여 하였고, MNU는 멸균 생리식염수에 5 mg/ml의 농도로 하여 체중 100 g당 1 ml씩 좌심실로 투여하였다.

### 2. 유선의 적출

발암물질인 DMBA 및 MNU 투여 1주 후 인 4주령 랫드와 발암물질 무처리 4주령의 랫드에서 각각 유선을 적출하였다. 각각의 동물은 이산화탄소로 안락사 시켰으며, 70% ethanol로 외피를 철저히 소독한 후에 흉부의 정중선을 세로로 절개하고 좌·우측의 1번과 2번 유선을 각각 적출하여 Waymouth's MB 752/1 배지가 들어 있는 12 well plate에 넣었다.

### 3. 유선의 조직 배양

적출한 유선을 Waymouth's MB 752/1 배지로 2회 세척한 후 penicillin-streptomycin(100 U/ml penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin), insulin(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), luteotropic hormone(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), d-aldosterone(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), hydrocortisone(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), epidermal growth factor(60 ng/ml), 20 mM HEPES가 첨가된 Waymouth's MB 752/1 배지에 diethylstilbestrol(DES)을 각각 1, 10, 100 M로 배지에 첨가하여 9일간 배양하고 11일간 퇴화(regression) 시켰다. MNU 투여군과 DMBA 투여군, 무처리 대조군을 각각 I, II, III군으로 설정하였으며 각각은 다시 DES의 농도에 따라 네 그룹으로 나누었다(Table 1). 적출한 유선을 넣은 12 well plate를 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  배양기에서 2일마다 배지를 바꾸어주며 9일간 배양하였다. 조직 배양을 시작한 후 10일째 되는 날 insulin만을 첨가한 배지로 바꾸어 11일간 퇴화시켰다.

### 4. 유선의 형태학적 변화 관찰

조직 배양한 유선을 10% 중성 포르말린으로 고정한 뒤 hematoxylin으로 염색하여 전형태관찰법(whole mount

**Table 1.** Experimental design for the mammary organ culture after *in vivo* transformation by carcinogens

Group	No. of Ani.	No. of Examined MG	Treatment	
			Carcinogens	Organ culture <sup>a)</sup>
I-1	7	28		IPAHE + DES 1 $\mu$ M
I-2	7	28	MNU, 50 mg/kg,	IPAHE + DES 10 $\mu$ M
I-3	7	28	i.v., single injection	IPAHE + DES 100 $\mu$ M
I-4	5	20		IPAHE
II-1	8	32		IPAHE + DES 1 $\mu$ M
II-2	8	32	DMBA, 50 mg/kg	IPAHE + DES 10 $\mu$ M
II-3	8	32	i.g., single injection	IPAHE + DES 100 $\mu$ M
II-4	5	20		IPAHE
III-1	5	20		IPAHE + DES 1 $\mu$ M
III-2	5	20		IPAHE + DES 10 $\mu$ M
III-3	5	20	Control	IPAHE + DES 100 $\mu$ M
III-4	5	20		IPAHE

<sup>a)</sup>Mammary organ culture was lasted for 20 days including 11 days regression in Waymouth's MS 752/1 medium containing insulin alone.

MNU; *N*-nitroso-*N*-methylurea, DMBA; 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene, I; insulin (5  $\mu$ g/ml), P; luteotropic hormone (prolactin, 5  $\mu$ g/ml), A; d-aldosterone (1  $\mu$ g/ml), H; hydrocortisone (1  $\mu$ g/ml), E; epidermal growth factor (EGF, 60 ng/ml), DES; diethylstilbestrol, MG; mammary gland, d; days.

method)을 이용하여 슬라이드를 만든 후 광학 현미경하에서 terminal end buds(TEB)와 alveolar buds(AB), terminal duct(TD), alveolar lobules 및 hyperplastic alveolar nodule(HAN) 등을 관찰하였다. 전형태관찰법은 유선을 적출하여 고정된 유선의 조직을 조직 절편용 칼로 얇게 잘라서, toluene과 xylene으로 지방을 제거한 후 슬라이드글라스에 올려서 관찰하였다. 병리조직학적 검사를 위해서는 10% 중성 포르말린에 고정된 조직을 일반적인 조직처리법으로 처리하여 4  $\mu$ m로 박절하여 조직절편을 hematoxylin과 eosin(H&E)으로 염색하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

### III. 결 과

#### 1. 유선의 조직배양시 육안조건

대조군의 소견에 비하여 발암물질 DMBA 및 MNU를 투여한 개체에서는 유선의 분지 정도가 더 발달되었으며, 유선의 전체적인 부피도 증가하였으나, 발암물질 DMBA 및 MNU 간의 육안적 차이는 발견되지 않았다. 조직 배양시 유선의 생사 여부를 알 수 있는 근거는 배지 색의 변화, 유선의 탄력성 및 적출당시 유선의 색 유지 그리고 오 염여부 등을 통해서 판단할 수 있었다. 배양시 죽은 것으로 판단되는 유선은 색이 약간 검은 색조로 변화되었으며, 배양 2일 후 배지의 색이 연한 적색에서 진한 황색으로 변하게 되는데 이러한 현상이 관찰되지 않았고, 유선의 탄력

성 소실 등이 관찰되었다.

#### 2. 전형태관찰법(whole mount method)에 의한 유선의 형태학적 변화

전형태관찰법으로 관찰한 조직배양된 유선의 형태학적 변화는 terminal end buds(TEB), terminal ducts(TD), alveolar buds(AB), alveolar lobules(AL) 및 hyperplastic alveolar nodules(HAN)의 출현 등에서 나타났다. 발암물질 투여후 조직 배양한 군이 대조군에서 배양한 군보다 형태적 변화가 뚜렷하게 나타났지만, DMBA와 MNU 투여에 대한 차이는 없었다. 또한 대조군의 유선조직 배양시 투여한 DES에 의한 형태적 변화는 관찰되지 않았으나, DMBA와 MNU를 투여한 후 조직 배양한 군에 추가적으로 투여된 DES는 duct의 구조 유지 및 발달에 영향을 주는 것으로 관찰되었다. 이와 같은 관찰 결과는 Table 2에 정리하였다.

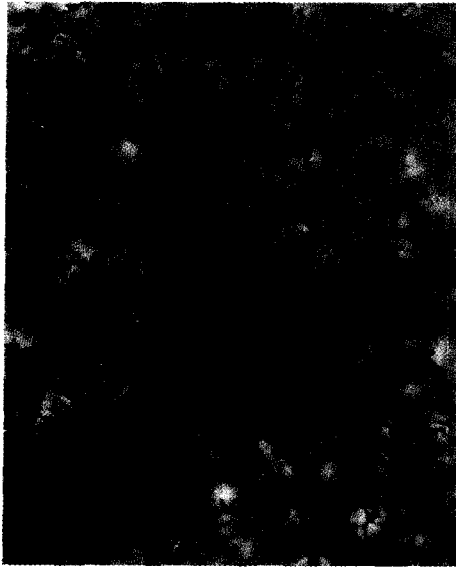
##### 1) Terminal end buds(TEB)의 형태학적 변화

본 실험에서 형태학적 변화가 가장 뚜렷하게 관찰된 구조는 TEB였다. TEB는 곤봉모양과 원형의 두 가지 형태가 관찰되었으며, 분지 정도 역시 각 군간에 큰 차이가 나타났다(Figs. 1 및 2). 40배의 현미경 배율하에서 곤봉모양의 TEB 수가 증가되고, 하나의 terminal duct(TD)에서 2개로 분지되는 소견이 관찰 되었을 때 '+'로 판정하였다. 곤봉모양 및 원형의 TEB가 존재하며, 하나의 TD에서 3~4개의 분지가 관찰될 때를 '+'로 판정하였으며, '++'은 5개 이상의 분지가 관찰될 때를 의미한다(Table 2). 대조군에서 관찰된 TEB는 곤봉모양이었으나, DMBA 및 MNU 투여 1주 후 적출한 유선을 조직 배양한 군에서는 크기가 비교적 다양한 원형의 TEB가 관찰되었고, 한 개의 TD에서

**Table 2.** Morphological changes of the mammary gland organ culture after *in vivo* transformation by carcinogens

Group	Treatments	TEB	TD	AB	AL	HAN
I-1	MNU + DES 1 $\mu$ M	+	-	+	+	+
I-2	MNU + DES 10 $\mu$ M	+++	-	+	++	-
I-3	MNU + DES 100 $\mu$ M	+	++	++	+	-
I-4	MNU	+++	+	++	++	+
II-1	DMBA + DES 1 $\mu$ M	+	-	+	+	-
II-2	DMBA + DES 10 $\mu$ M	+++	++	++	++	+
II-3	DMBA + DES 100 $\mu$ M	++	+	+	+	-
II-4	DMBA	+++	-	++	++	+
III-1	Non-treatment + DES 1 $\mu$ M	+	-	-	-	-
III-2	Non-treatment + DES 10 $\mu$ M	-	+	-	-	-
III-3	Non-treatment + DES 100 $\mu$ M	+	-	+	-	-
III-4	Non-treatment	-	-	-	-	-

TEB; terminal end buds, TD; terminal ducts, AB; alveolar buds, AL; alveolar lobules, HAN; hyperplastic alveolar nodules.



**Fig. 1.** Terminal end bud (TEB) in whole mount preparation of the carcinogen non-treated group. The TEB shows club-shaped appearance. Hematoxylin (× 125).



**Fig. 3.** Whole mount of mammary gland showing duct and terminal duct. Hematoxylin (× 125).



**Fig. 2.** Terminal end bud (TEB) in whole mount preparation of DMBA and DES 1 μM treated group. The TEB shows circle-shaped appearance. Hematoxylin (× 125).

2~4개의 TEB가 분지되어 관찰되었다. 또한 대조군에서의 TEB는 관찰 빈도가 적었으며, 그 구조가 잘 유지되었다 하더라도 그 내부가 축소되어 전체적인 크기가 위축되어 관찰되었다. 반면에 DMBA나 MNU를 투여한 후 조직 배양한 I군과 II군에서는 곤봉 모양 또는 원형의 TEB의 관찰빈도가 빈번하였고, 그 형태의 유지정도가 양호하였으며 전체적인 크기와 내부의 세포밀도가 증가되어 관찰되었다. 이러한 변화는 DES 처치 및 DES 투여 농도와는 무관한

것으로 관찰되었다.

2) Duct 및 terminal ducts(TD)의 형태학적 변화

말단부위의 duct만 잘 유지되었을 때는 ‘+’, 말단부위를 포함하여 유두에서 1차부터 3차까지 분지되는 duct의 구조가 비교적 잘 유지되었을 때는 ‘++’로 판정하였다 (Table 2, Fig. 3). Duct 및 TD는 전반적으로 모든 실험군에서 그 형태가 잘 유지되지 않은 것으로 관찰되었다. Duct의 구조 중 기저막 일부가 상실되어 있는 것을 흔하게 관찰할 수 있었다. 일부는 duct 내의 유선 상피세포가 기질로 빠져 나와 있기도 하였다. 그러나 발암물질을 투여한 후 적출한 유선에 DES를 중간 및 고농도(10 μM 및 100 μM)로 처리한 그룹에서는 duct 및 terminal duct의 구조가 잘 유지된 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 발암물질이 투여된 I군 및 II군의 유선에서 대조군인 III군의 유선 보다 더 확실하게 나타났다.

3) Alveolar buds(AB)의 형태학적 변화

2차 및 3차 분지의 duct 근처에 형태가 잘 유지되지 않은 위축된 선포(alveoli)가 3~4개로 구성된 AB를 ‘+’로, 형태가 잘 유지되면서, 세포 밀도도 비교적 높고, 6~8개의 선포로 구성된 AB를 ‘++’로 판정하였다(Table 2, Fig. 4). AB의 형태적 변화 역시 TEB에서 관찰된 경향과 유사하게 나타났다. 즉 제 III군에서는 DES의 투여와 관계없이 AB의 형태가 잘 유지되지 않았고, 3~4개의 위축된 선포로 구성되어 있었으며, 관찰빈도 역시 적었다. 그러나 발암물질을 투여한 I군 및 II군에서는 AB의 형태가 비교적 잘 보존되어 있었고, 6~8개의 선포로 구성되어 있었으며, AB의

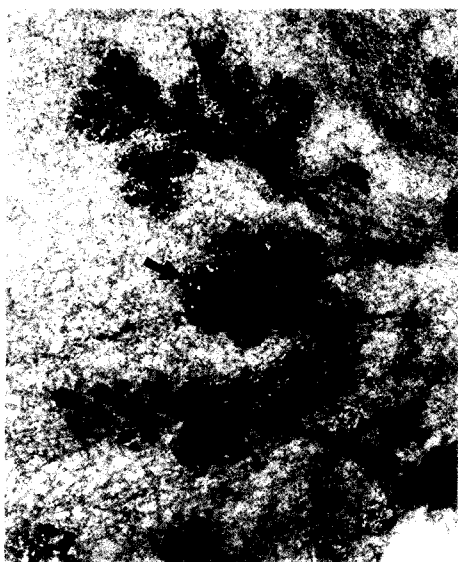


**Fig. 4.** Alveolar buds (AB) (arrow) and alveolar lobules (AL) of mammary gland treated with DMBA and DES 10  $\mu$ M in whole mount preparation. Hematoxylin ( $\times 80$ ).

구조 역시 잘 유지되어 관찰되었다. 선포의 내부를 구성하는 유선 상피세포의 밀도도 높게 관찰되었으며, AB 내부는 선포간 공통된 공간을 가지고 있는 것으로 관찰되었다.

#### 4) Alveolar lobules(AL)의 형태학적 변화 및 Hyperplastic alveolar nodules(HAN)의 관찰

AB가 적게는 2~3(+)에서 많게는 5~6(+++)개씩 모여 있는 것을 AL로 간주하여 평가하였다. 이들의 관찰 경향 역

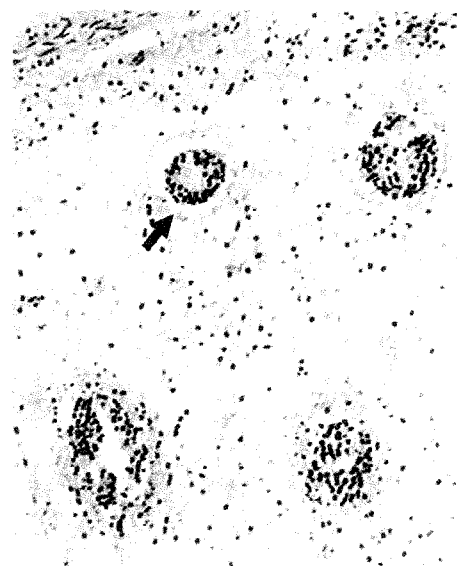


**Fig. 5.** Hyperplastic alveolar nodule (HAN) (arrow) of mammary gland treated with DMBA and DES 10  $\mu$ M in whole mount preparation. Hematoxylin ( $\times 80$ ).

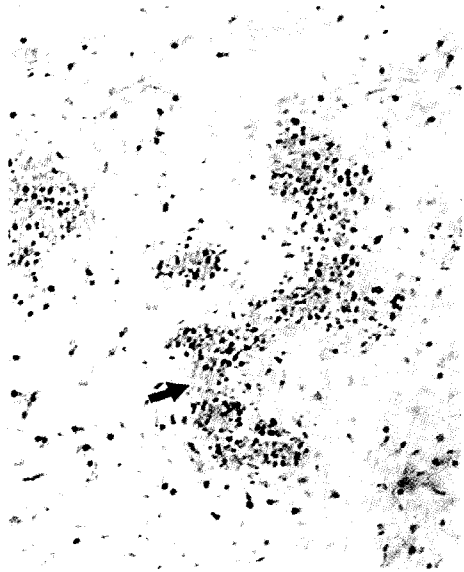
시 AB와 일치하였으나, 이들의 관찰 빈도는 AB 보다는 매우 드물게 나타났으며, III군에서는 전혀 관찰되지 않았다. AL이 2~5개 모여있는 것을 HAN으로 평가하였으며, HAN이 출현하여 관찰되면 '+'로 판정하였다(Table 2). 발암물질이 투여되지 않은 III군에서는 AL과 마찬가지로 HAN이 관찰되지 않았으나 발암물질 투여 후 적출한 유선을 조직 배양한 I군 및 II군에서는 HAN이 관찰되었다 (Fig. 5). HAN은 염색정도가 진하여 하나의 덩어리를 형성하고 있으며, 세포밀도 또한 증가되어 관찰되었다. HAN은 조직 배양하기 전에 투여한 발암물질에 의하여 생성된 특별한 구조로 여겨지며, DES의 투여에 따른 차이는 발견할 수 없었다.

### 3. 조직 배양한 유선의 병리조직학적 관찰

병리조직학적 관찰에서도 전형태관찰법에 의한 형태적 조사와 마찬가지로 TEB, TD, AB, AL 및 HAN 등에서 많은 변화가 나타났으며, 이들의 대체적인 변화가 전형태 관찰법에서 나타난 결과와 일치하였다. 특히 TEB, TD, AB 및 AL 등에 대한 각각의 구조에서 크기, 관찰빈도, 세포밀도, 괴사정도, 세포의 성장 및 분화정도 등을 중심으로 관찰하였다. 발암물질을 투여한 군에서 적출한 유선의 조직배양 예에서 대조군에 비하여 이들 각각의 구조가 빈번하게 관찰되었고, 크기가 컸으며, 세포밀도는 높았고, 괴사정도도 낮게 나타났다. 각각의 구조에 대한 괴사정도는 다양하게 관찰되었는데, 특히 각 구조의 일부분이 괴사된 것과 전체적으로 괴사가 된 것으로 관찰되었다. 발암물질



**Fig. 6.** Histological cross section of terminal end bud treated with DMBA and DES 100  $\mu$ M. Note the necrosis (arrow). H&E ( $\times 125$ ).



**Fig. 7.** Histological longitudinal section of terminal end bud and duct treated with DES 100  $\mu$ M. Note the necrosis (arrow). H&E ( $\times$  125).

을 투여 후 적출한 I군 및 II군의 시료에서는 비교적 일부 분 피사가 관찰되었으며(Fig. 6), 관찰빈도도 낮았으나, 대조군의 시료에서는 전체적 피사가 흔한 빈도로 관찰되어(Fig. 7) 뚜렷한 차이가 나타났다. 세포의 밀도 역시 발암물질을 투여한 군에서 투여하지 않은 군보다 매우 높게 관찰되었다. 특히 발암물질별 비교에서는 DMBA를 투여한 군에서 MNU를 처치한 군보다 세포의 피사부위가 적었으며, 세포의 증식 및 분화정도 역시 DMBA 투여군에서 더 확실하게 관찰되었다.

유선의 각 구조를 구성하는 세포의 조직학적 소견으로서, 유선상피세포(mammary gland epithelial cell)는 모두 정상으로 관찰되었으며, duct의 기저막(basal membrane)을 구성하는 근상피세포(myoepithelial cell)는 처치 방법에 따라 약간의 차이가 나타났다. 즉 DES 투여군에서는 정상의 근상피세포가 DES를 투여하지 않은 군에 비하여 많이 관찰되었으며, 기저막의 유지에도 뚜렷한 차이를 보였다. 특히 발암물질과 DES를 투여한 군에서 근상피세포가 정상적인 형태로 다수 존재하여 duct의 기저막이 유지되는 소견을 관찰할 수 있었다. 그러나 DES 100  $\mu$ M을 투여한 모든 군에서는 세포독성으로 인정되는 피사소견을 또한 관찰할 수 있었다. 한편 유선조직 이외의 간질조직을 구성하는 결합조직과 지방세포들은 피사 또는 용해과정에 있는 것으로 보아 유선조직만이 생존 및 성장되었음을 알 수 있었다.

#### 1) Terminal end buds(TEB)의 병리조직학적 변화

대조군 III군의 TEB는 대부분의 형태가 곤봉 모양을 하고 있고, 1~3층의 유선 상피세포로 구성되어 있으며, 원형



**Fig. 8.** Histologic section of the terminal end bud shown in Fig. 2. H&E ( $\times$  125).

의 TEB도 관찰되나, 그 크기가 작으며 관찰 빈도가 드물게 나타났다. TEB의 내부는 세포 밀도가 느슨하게 관찰되었으며, 중심에는 피사상태의 세포들이 존재하였다. 그러나 발암물질을 투여한 I군 및 II군에서는 III군에서 발견된 것보다 여러 배 큰 곤봉모양의 TEB와 원형의 TEB가 관찰되었다. 이들 TEB는 출현 빈도와 세포밀도 측면에서 뚜렷하게 III군에 비하여 높게 나타났으며, 특히 원형의 TEB는 7~10층의 세포층으로 구성되며(Fig. 8), 내강의 세포들도 비교적 피사되지 않고 정상적인 세포형태를 갖는 것으로 관찰되었다. TEB를 구성하는 세포의 피사정도는 III군에서 현저하게 관찰되었으며, 발암물질 투여군 중 특히 DMBA 투여군의 TEB에서 약간의 부분 피사만 관찰될 뿐 정상적인 TEB의 구조를 유지하는 것으로 관찰되었다. 한편 DES의 투여는 TEB의 병리조직학적 소견에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 조사되었다.

#### 2) Duct 및 terminal ducts(TD)의 병리조직학적 변화

Duct를 구성하는 세포는 외층과 내층의 세포로 구분되어 지며, 내층의 세포는 입방형에서 원주형으로 되어 있고, 외층에 존재하는 세포들은 세포질이 결여된 타원형의 근상피 세포층으로 둘러싸여 있다. Duct의 내부를 구성하는 세포는 TEB의 내부에 존재하는 세포보다 더 민감하게 피사되어 관찰되었으며, 이러한 현상은 모든 군에서 흔하게 관찰되었다. 그러나 duct의 외층을 구성하는 근 상피 세포는 발암물질과 DES의 투여에 의하여 형태가 유지되고 생존해 있음을 I군과 II군의 결과에서 알 수 있었다(Fig. 9). 기타 DES가 투여되지 않은 III-4군의 duct 소견에서는 duct의 기저막 중 일부가 상실되어 있는 것을 흔하게 관찰

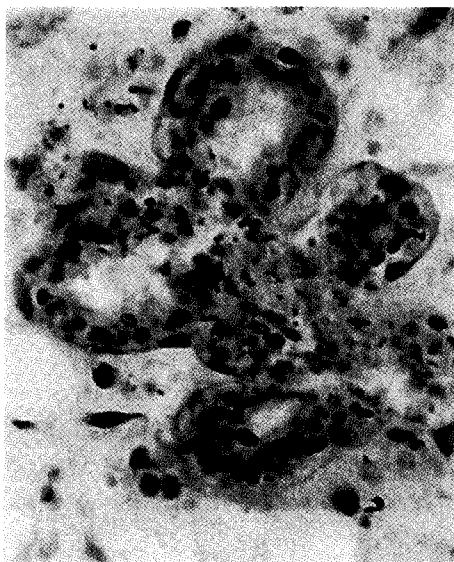


**Fig. 9.** Histologic section of duct treated with DMBA and DES 1 μM. Note the myoepithelial cells (arrow). H&E (× 400).

할 수 있었다.

3) Alveolar buds(AB) 및 alveolar lobules(AL)의 병리조직학적 변화

발암물질을 투여한 I군 및 II군에서 AB 및 AL의 형태는 비교적 잘 유지되어 있었으며(Fig. 10), 특히 이들을 구성하는 선포(alveoli)의 구조가 전형적인 것으로 관찰되었다(Fig. 11). 즉 유즙을 분비하여 내강에 유즙이 차 있는 선포가 흔하게 관찰되며, 선포를 구성하는 유선상피세포



**Fig. 10.** Histologic section of alveolar bud treated with DMBA and DES 1 μM. H&E (× 400).



**Fig. 11.** Histologic section of alveoli containing milk (arrow) and fat droplet (arrow head) with DES 10 μM alone. H&E (× 400).

또한 지방소적(fat droplet)을 함유한 경우도 흔하게 관찰되었다. AB 및 AL을 구성하는 선포의 크기 및 분화 정도는 DMBA를 투여한 유선에서 MNU를 투여한 경우보다 더 전형적으로 관찰되었으며, 대조군인 III군에서 AB 및 AL을 구성하는 선포는 위축되었거나, 전형적인 선 구조를 유지하지 못하고 있는 것으로 관찰되었고 크기도 현저하게 작았다.

4) Hyperplastic alveolar nodules(HAN)의 관찰  
발암물질을 투여한 I군과 II군에서 HAN 구조가 관찰되



**Fig. 12.** Hyperplastic alveolar nodule (HAN) (arrow) in histologic section treated with DMBA. H&E (× 125).

었다(Fig. 12). 병리조직학적으로 이미 유선암의 전암병변 지표로 알려져 있는 HAN이 유선의 조직 배양에서도 나타났다. HAN은 AL이 2개에서 많게는 4개까지 모여 있으며, 세포의 밀도가 매우 높고, 공통된 내강을 공유하는 소견으로 관찰되었다. HAN의 출현은 발암물질을 투여한 I군 및 II군의 특징적 소견으로서만 관찰되었으며, 대조군인 III군에서는 관찰되지 않았다.

#### IV. 고 찰

유선암 유발 물질인 DMBA와 MNU를 투여한 후 적출한 유선의 조직 배양 후 나타나는 형태적 변화를 전형태 관찰법과 일반적인 병리조직학적 관찰을 통해 평가하였다. 일반적으로 유선은 출생 이후에도 지속적인 발생이 일어나는 관상포상선(tubuloalveolar gland, Banerjee 등, 1973)으로 에스트로젠, 프로게스테론을 비롯한 여러 호르몬의 작용에 의존하여 형태적, 기능적 변화가 다양하게 나타난다. 유선은 기능적 및 구조적 발생 단계에 따라 embryonic, postnatal, juvenile, puberty, pregnancy, lactation 및 involution의 7단계로 나눌 수 있으며(Russo와 Russo, 1996), 그 조직학적 성상은 선의 위치, 개체의 나이, 에스트로젠 주기 및 임신 유무에 따라 매우 다양하다. 유선은 발암물질에 의해 단기간에 종양이 형성된다는 장점 때문에 지금까지 암 예방효과 또는 억제제를 위한 연구 등에 많이 이용되어 왔다. 또한 호르몬 의존적인 특성 때문에 여러 호르몬이 유선에 미치는 영향에 대한 생리적 및 분자 생물학적 기전이 많은 연구를 통하여 밝혀졌으며, 이러한 특성 때문에 최근에는 내분비장애물질(endocrine disruptors)의 검색을 위한 표적장기로서도 주목을 받고 있다(Andersen 등, 1999).

유선암 유발물질로 알려져 있는 DMBA의 특성은 일반적으로 경구 투여할 경우 유선암을 유발시키지만, 피하 투여할 경우 폐암을 유발시키고(Yamamoto 등, 1995), 체장에 주입하면 체장암을 유발시킨 사례도 보고되어 있다(Jimenez 등, 1999). 또한 MNU는 정맥 투여할 경우 유선암을 유발시키지만 직장내로 투여할 경우 대장암을 유발시키고(Narisawa 등, 1999) 음수로 투여할 경우 위암을 유발시킨다는 연구가 보고되어 있다(Kobayashi 등, 1999; Choe 등, 1999).

따라서 유선암의 발암화 연구를 위해서는 유선암을 유발할 수 있는 경로로 발암물질을 투여한 후, 조직배양을 통하여 유선상피의 발암화 과정을 연구하는 것이, 유선 상피세포의 배양시 투여한 경우보다는 *in vivo* 상황에 더 근접한 연구결과를 얻을 수 있을 것이다.

합성 에스트로젠의 일종인 DES는 비유전 독성발암물질이며(Robertson 등, 1996) 일본 후생성에서는 내분비장애 물질로 분류하고 있다. DES는 혈중 성호르몬인 progester-

one의 농도를 변화시키는 것으로 알려져 있고(Zeng 등, 1997), 방사선에 의해 유발된 유선의 암화를 촉진한다고 보고되어 있다(Inano 등, 1997, 1999). 또한 랫드에서 출생 전 DES에 노출시키고, 이어서 생후 50일령에 DMBA를 투여하면, 유선암의 감수성이 증가된다는 연구도 있는 반면에, 신생동물에서 DES의 처치로 자연적으로 발생하거나, 화학적으로 유발되는 유선암의 발생이 억제된다는 보고가 있으며 분만 후 처음 1주일 동안 에스트로겐 작용이 있는 화학물질을 짧은 기간 투여하면, 화학적 발암물질로 유발되는 유선암 예방효과가 있다는 연구도 보고되어 있다(Lamartiniere 등, 1995). 또한 종과 계통에 따른 차이는 있으나 랫드에서 DES는 DMBA와 상호 발암 효과가 보고된 바 있다(Russo 등, 1990).

본 실험에서는 DMBA와 MNU를 3주령 랫드의 체내 투여 1주 후에 유선 조직을 적출하여 조직 배양을 하였다. 그 결과 투여 물질의 영향이 11일간의 퇴화 기간을 포함한 20일 간의 배양 기간동안 유지된다는 사실을 전형태 관찰법이나 병리조직학적 방법으로 확인할 수 있었다. 유선을 형성하는 TEB, TD, AB, AL 및 HAN의 크기, 세포 밀도와 관찰 빈도 등은 각 군마다 많은 차이가 있었으며 이들의 변화는 전형태관찰법과 병리조직학적 소견에서 대체로 일치하는 경향을 보여 주었다. 4주령 랫드의 유선은 아직 미성숙 단계로 발생 단계에 있는 것이므로 발암물질을 투여하지 않은 유선에서도 성장에 필요한 호르몬이 존재하는 배지에서 조직배양을 하면 지속적인 성장과 분화가 일어난다. 따라서 이들의 정상적인 성장 및 분화 과정에서 나타나는 소견과 발암물질에 의한 변이(transformation)에 의한 병변의 구별을 위하여 퇴화 과정을 거쳤다. 발암 물질에 의해 변이된 병변들은 퇴화 기간 중에도 TEB, TD, AB, AL 및 HAN의 구조가 유지되거나 성장 및 분화된 것으로 사료된다.

발암물질의 투여에 의한 종양의 발생률 및 잠복기 등은 종과 계통에 따른 차이는 있으나, 본 실험에서는 DMBA가 MNU보다 세포의 증식 및 분화정도 등의 병리조직학적 소견이 더 뚜렷이 나타났다. 이와 같은 결과로써 조직 배양을 통한 실험법에서는 DMBA를 사용하는 것을 추천할 수 있을 것으로 생각된다. 본 실험에서 조직 배양 전에 발암물질을 투여한 그룹이나 대조군에서 모두 조직 배양 시 DES를 추가로 투여하였을 경우 유선의 근상피세포(myoepithelial cell)를 유지시켜 주는 것으로 관찰되었다. DES의 고농도 군에서 나타난 세포의 괴사는 DES의 세포 독성 때문으로 생각되며 최근의 연구에서도 DU145, LNCaP와 같은 prostate cancer cell line에서 20~22  $\mu$ M의 농도에서 50%의 치사율을 갖는 것으로 보고되어 있다 (Robertson 등, 1996).

위의 결과들로 생체내 투여한 유전 독성 발암물질의 변



이 효과(transformation effect)는 조직배양에도 지속적으로 유지되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 DMBA를 투여한 군에서 더 뚜렷한 결과를 관찰할 수 있었다. 유선의 조직 배양에서도 정상적인 성장 및 분화가 일어난다는 점과 특히 *in vivo* 실험에서 병리조직학적 전암병변으로 나타나는 HAN이 조직 배양에서도 유지되었다는 것은 생체내 실험의 일부분을 대체할 수 있는 시험법으로 이용될 수 있는 가능성을 제시해 준다. 따라서 본 연구방법은 유선암의 유발 및 억제에 관한 연구분야에서 생체 실험의 일부분을 대체할 수 있을 것이며, 새로운 발암물질, 또는 내분비계 장애물질이 유선에 미치는 영향 연구에 이용될 수 있을 것이라 생각된다. 또한 유선에 영향을 미치는 호르몬의 작용 기전 연구 및 분자 생물학적 연구에 보다 폭넓게 이용될 수 있는 실험모델의 확립에 기초적 자료가 될 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- Andersen, H.R., Andersson, A.M., Arnold, S.F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N.A., Bjerregaard, P., Christiansen, L.B., Gissel, B., Hummel, R., Jorgensen, E.B., Korsgaard, B., Le Guevel, R., Leffers, H., McLachlan, J., Moller, A., Nielsen, J.B., Olea, N., Oleskarasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K.L., Perez, P., Skakkeboek, N.E., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Sumpter, J.P., Thorpe, S.M. and Grandjean, P. (1999): Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals, *Environ. Health Perspect.*, **107**, 89-108.
- Ball, S.M. (1998): The development of the terminal end bud in the prepubertal-pubertal mouse mammary gland, *Anat. Rec.*, **250**, 459-464.
- Banerjee, M.R., Wood, B.G. and Kinder, D.L. (1973): Whole mammary gland organ culture: Selection of appropriate gland, *In Vitro*, **9**, 129-133.
- Barlow, J., Casey, T., Chiu, J.F. and Plaut, K. (1997): Estrogen affects development of alveolar structures in whole-organ culture of mouse mammary glands, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **232**, 340-344.
- Bocchinfuso, W.P., Hively, W.P., Couse, J.F., Varmus, H.E. and Korach, K.S. (1999): A mouse mammary tumor virus-Wnt-1 transgene induces mammary gland hyperplasia and tumorigenesis in mice lacking estrogen receptor-alpha, *Cancer Res.*, **59**, 1869-1876.
- Choe, G., Lee, Y., Hong, W., Lee, M. and Jang, J. (1999): Changes of host natural killer cell activity in F344 rats during gastric carcinogenesis induced by *N*-methyl-nitrosourea, *Oncol. Rep.*, **6**, 777-780.
- Hwang, S.I., Guzman, R.C., Swanson, S.M. and Nandi, S. (1996): Hormone dependent and independent mammary tumor development from *N*-methyl-*N*-nitrosourea-treated rat mammary epithelial cell xenografts in the nude mouse: multiple pathways and H-ras activation, *Cancer Lett.*, **101**, 123-134.
- Inano, H., Suzuki, K., Onoda, M., Kobayashi, H. and Wakabayashi, K. (1999): Comparative effect of chlor-madinone acetate and diethylstilbestrol as promoters in mammary tumorigenesis of rats irradiated with gamma-rays during lactation, *Breast Cancer Res. Treat.*, **53**, 153-160.
- Inano, H., Suzuki, K., Onoda, M. and Wakabayashi, K. (1997): Anti-carcinogenic activity of simvastatin during the promotion phase of radiation-induced mammary tumorigenesis of rats, *Carcinogenesis*, **18**, 1723-1727.
- Jeong, J.Y., Kim, O.H. and Lee, Y.S. (1998): Effects of the ex-vivo immunotherapy on the mammary gland tumorigenesis induced by 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA) in rats, *J. Toxicol. Pub. Health*, **14**, 465-474.
- Jimenez, R.E., Z'graggen, K., Hartwig, W., Graeme-Cook, F., Warshaw, A.L. and Fernandez-del Castillo, C. (1999): Immunohistochemical characterization of pancreatic tumors induced by dimethylbenzanthracene in rats, *Am. J. Pathol.*, **154**, 1223-1229.
- King, R.J.B. (1996): Chemical and radiation carcinogenesis. In *Cancer biology*. Addison Wesley Longman. England. First edn. pp. 81-103.
- Kobayashi, K., Inada, K., Furihata, C., Tsukamoto, T., Ikehara, Y., Yamamoto, M. and Tatematsu, M. (1999): Effects of low dose catechol on glandular stomach carcinogenesis in BALB/c mice initiated with *N*-methyl-*N*-nitrosourea, *Cancer Lett.*, **139**, 167-172.
- Lamartiniere, C.A., Moore, J.B., Brown, N.M., Thompson, R., Hardin, M.J. and Barnes, S. (1995): Genistein suppresses mammary cancer in rats, *Carcinogenesis*, **16**, 2833-2840.
- Lu, J., Pei, H., Kaeck, M. and Thompson, H. (1997): Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis, *Mol. Carcinogenesis*, **20**, 204-221.
- Medina, D., Stephens, L.C., Bonilla, P.J., Hollmann, C.A., Schwahn, D., Kuperwasser, C., Jerry, D.J., Butel, J.S. and Meyn, R.E. (1998): Radiation-induced tumorigenesis in preneoplastic mouse mammary glands *in vivo*: significance of p53 status and apoptosis, *Mol. Carcinogenesis*, **22**, 199-207.
- Narisawa, T., Fukaura, Y., Terada, K. and Sekiguchi, H. (1999): Inhibitory effects of ursodeoxycholic acid on *N*-methyl-nitrosourea-induced colon carcinogenesis and colonic mucosal telomerase activity in F344 rats, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **18**, 259-266.
- Prop, F.J.A. (1959): Organ cultures of total mammary glands of the mouse, *Nature*, **184**, 379-380.

- Rivera, E.M., Hill, S.D. and Taylor, M. (1981): Organ culture passage enhances the oncogenicity of carcinogen-induced hyperplastic mammary nodules, *In Vitro*, **17**, 159-166.
- Robertson, C.N., Roberson, K.M., Padilla, G.M., O'Brien, E.T., Cook, J.M., Kim, C.S. and Fine, R.L. (1996): Induction of apoptosis by diethylstilbestrol in hormone-insensitive prostate cancer cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, 908-917.
- Russo, I.H. and Russo, J. (1996): Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies, *Environ. Health. Perspect.*, **104**, 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**, 244-78.
- Strum, J.M. (1979): A mammary gland whole mount technique that preserves cell fine structure for electron microscopy, *J. Histochem. Cytochem.*, **27**, 1271-1274.
- Yamamoto, H., Fujii, K. and Hayakawa, T. (1995): Inhibitory effect of cold stress on lung tumours induced by 7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene in mice, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **121**, 393-396.
- Zeng, X. and Yao, Z. (1997): Experimental study on relationship between exogenous estrogen and breast cancer risk, *Chin. Med. J. (Engl.)*, **110**, 388-391.