

Diethylnitrosamine을 투여한 rat 간장의 tumorigenesis에 관하여

2. 종양세포의 apoptosis와 증식에 관한 조직학적 소견

곽수동 · 강정부 · 고필옥

경상대학교 수의과대학 동물의학연구소
(1998년 1월 15일 접수)

Diethylnitrosamine-induced hepatic tumorigenesis in rats

2. Histological findings about apoptosis and proliferation of tumor cells

Soo-dong Kwak, Chung-boo Kang, Phil-ok Koh

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

(Received Jan 15, 1998)

Abstract : The study was performed to investigate the histological findings and the appearances of positive cells by immunohistochemical methods using proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibody and apoptotic kit in diethylnitrosamine (DEN) -induced rat liver cancer model. Forty four male rats (Sprague Dawley), initially 5 to 6 weeks of age and 120 to 150gm in body weight were continuously were given with 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 interlobular connective tissues in the rat livers were proliferated at early 8 weeks. The vacuolated or fatty degenerated liver cells were focally distributed and then widely distributed with the passage of weeks and the liver cells with large vacuoles tended to be crowded in focal areas, and the liver cells in some lobules were transformed into small or eosinophilic polyhedral large cells.

The hepatocellular carcinoma and the cholangiocarcinoma were simultaneously developed in same liver and tended to be markedly developed after 12 weeks but the development of carcinoma in some livers at same week were less or more advanced as 3~5 week intervals.

The regions with more number of positive cells by PCNA antibody or apoptotic kits in livers were ranked as following order ; small hepatocellular carcinoma regions, cholangiocarcinoma regions, trabecular or acinar type carcinoma regions, and large liver cell regions.

The numbers of the positive cells by PCNA antibody were more numerous than those by

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.

apoptotic kit. So these findings suggested that the volumes and weights of the livers were increasing by more many proliferating of carcinoma cells on the above ordered regions.

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

서 론

동물이 성장 비대할 때나 또는 정상상태에서도 항상 새로운 세포로 대체하기 위하여 세포의 분열증식이 일어난다. 분열세포의 조직학적 규명은 핵내 복제되는 DNA 성분인 thymine에 동위원소를 결합시킨 ^3H -thymidine (^3H -TdR)^{1,2}을 미리 생체에 주입하여 분열세포와 결합하게 하여 방사선 자기법으로서 검색하거나 또는 증식세포 핵의 nucleotides의 구성성분인 bromodeoxyuridine(BrdU)를 미리 투여하여 면역조직화학적 방법으로 BrdU의 단크론 항체를 이용하여 분열세포를 검색하는 방법이 개발되어 소화기관과 생식기관 등에 상피의 재생에 관한 연구, 암의 악성·양성의 구별 및 예후추정, 상처치유 등에 관한 연구 등에 활용하여 왔다³⁻⁵.

근래에는 생체에 사전에 어떤 물질을 주입하지 않고 세포가 증식하기 전의 휴지기에 형성되어서 세포분열 주기를 조절하는 DNA polymerase δ 의 보조단백질인 PCNA(proliferating cell nuclear antigen)에 대한 단크론 항체로서 분열세포를 규명하는 방법이 개발되었는데 BrdU의 단크론 항체의 이용은 복제기에 있는 세포에만 검색되지만 PCNA 항체는 복제전기의 말기, 복제기, 복제후기의 초기에 세포도 검색할 수 있어 분열세포의 검색범위가 넓어 출현세포수가 많다고 한다³⁻⁸.

Apoptosis는 세포가 정상적 생리적으로 소실되는 것을 말하며 조직내 증식세포에 대한 수적 균형유지에 중요하며 세포가 개별적으로 일어나고 세포의 수축, 용해소체의 손상이 없고, 핵 chromatin의 균일한 농축, apoptotic bodies 출현 등의 소견이 있다⁹⁻¹³. 한편 세포의 괴사(necrosis)는 외부의 자극에 의한 손상으로 집단적으로 일어나며 백혈구의 침윤 등의 염증반응이 있어 apoptosis와는 상이하다.

종양에서는 세포증식이 많은 반면 apoptosis가 많고^{11,12},

Sakaguchi *et al*¹²는 종양에 치료제 투여시에 apoptosis가 많이 일어나고 과량투여시는 괴사가 일어난다고 하여 종양의 연구에 apoptosis 중요성을 제시한 바 있다. 이와 같이 증식세포 및 apoptosis가 일어나는 세포는 종래의 조직염색방법으로는 검색하기가 불명확하거나 불가능하였다. 근래에는 diethylnitrosamine(DEN)을 이용한 간암의 발생, 진행, 치료 등의 실험에 면역조직화학적 방법으로 증식이 일어나는 세포와 apoptosis가 일어나는 세포의 검색에 많이 응용되고 있다¹⁴⁻¹⁸. 그러나 DEN에 의한 간암에 대한 조직학적 소견은 단편적이고 또 시간경과에 따른 진행에 대한 조사가 없고 또 종양세포의 증식과 apoptosis에 대한 비교검토는 없었다.

본 연구는 화학적 물질인 DEN을 랫드에 투여하여 인위적으로 간암을 발생시켜 경과된 주에 따른 조직학적 형태, 암세포의 간소엽내 발생분포를 조사하고 PCNA 항체와 apoptotic kit를 이용하여 면역조직화학적 방법으로 암세포의 증식양상, 암세포의 apoptosis 등을 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

성숙한 Sprague Dawley(SD) rat 수컷 50수를 사육실내 온도 $20\pm 5^\circ\text{C}$ 에서 상대습도, 환기, 조명 등의 조건이 구비된 사육환경에서 사육하면서 체중 120~150gm(5~6주령)정도 되었을 때 DEN 제제(N-nitrosodiethylamine, Sigma, USA)을 음수에 0.01% 되게 하여 무제한 자유롭게 13주까지 공급하였고 부검은 8주째 부터 17주째까지 매주별로 폐사된 두수를 포함하여 2~4두씩 임의로 선택하여 ether로 마취하고 개복하고 부검한후 간장과 다른 장기에서 발생한 종양의 발생수와 형태 등을 육안적으로 관찰하였고 간장을 채취하여 10% 중성 formalin으로 고정하고 paraffin 절편을 만들고 통상방법과 같이 H&E 염색과 PAS 염색을 실시하여 발생된 암의 형태와 진행과

정 등을 광학현미경적으로 관찰하였고, 간조직에서 PCNA 항체의 양성반응세포는 면역조직화학적 방법으로 paraffin 절편으로 1차 항체는 PCNA antibody(Oncogene Science, USA)를, 2차 항체 부터는 Vetastein ABC kit(Vector Lab, USA)를 사용한 후, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)를 사용하여 발색토록 한후 hematoxylin으로 대조염색을 하여 황갈색으로 발색되는 세포를 광학현미경으로 조사하였다.

종양세포의 apoptosis의 조사는 *In situ* apoptosis detection kit(Oncor Co. USA)의 TUNEL법의 제시에 따라 간조직의 paraffin 절편을 proteinase K, 2% H₂O₂, working strength TdT enzyme, Anti-Digoxigenin-peroxidase를 차례로 적용한 후, DAB로 발색하여 위의 방법과 같이 조사하였다.

결 과

간장의 육안적 변화(Fig 1)에 대하여 조직학적으로 조사한 바 간은 소엽간 결합조직이 증식되어 8주째부터 소엽의 경계가 명확하게 구별되었고 간세포는 호eosin성으로 핵과 세포질이 대형화 또는 소형화하여 같은 크기의 간세포가 군집을 형성하거나 간소엽별로 같은 크기형의 간세포로 구성되거나 소엽 주변부에 대형화한 간세포가 군집하는 경향이었고, 16~17주경에는 대형화한 간세포는 수가 적어지고 소형화한 간세포는 증가되었다. PAS 염색에서 glycogen의 축적조건은 8~10주째에 대형화한 간세포의 집단에 많이 나타났고 주별이 경과할수록 점차 감소하여 13~15주경 부터는 거의 소실하였다(Fig 2).

세포질의 공포변성 또는 지방변성은 8~9주째부터 있었고 소엽에 따라 소엽 전체적 또는 국소적으로 미세하게 형성되는 경향이었고 13~15주째는 공포변성이 범발성화하였고 주별이 경과할수록 경계명확하며 대형화 하였다. 한국적으로 공포가 형성된 간세포의 집단의 일부는 10~12주째는 한국적 변성을 거쳐 12주째 이후 일부는 간세포성 carcinoma화 하기 시작하였다. 그래서 carcinoma는 어떤 소엽내 일부에서나 또는 어떤 소엽의 전체에서 시작하여 발생하였다. 이와같은 종양화한 부위의 어떤 간암세포는 염색성이 강하였다. 암세포의 배열형태는 trabecular형 또는 acinar형 또는 불규칙형으로 형성되었고(Fig 3), 초기의 공포화와 괴사로 진행된 부위의 간세포들은 소형화한 감암세포 부위로 변화하였다(Fig 5).

간표면에 용기된 결절부위를 관찰한 바, 큰 carcinoma 또는 증식 비대된 대형 또는 소형화한 간세포 집단으로

된 소엽이 증대되거나 이들 수개의 소엽이 결합하여 팽출된 소견이었다.

문맥과 다른 혈관은 10~12주까지는 점차 확장되었고 실질내 형성된 대수포는 10~12주 이후에도 주령이 경과할수록 증대되었다.

담관은 8주째부터 확장되며 담관의 증식이 진행되었고 9~10주째 이후는 담관상피는 핵이 불규칙하고 소포상의 염색질을 하며, 종양세포화 하며, 증식하여, 담관암(cholangiocarcinoma)화 하는 경향이었고(Fig 4, 5), 이는 소엽의 주변부에 발생이 시작되어 12주째 부터는 현저히 증식되었다. 이와같이 간세포의 대형화, 공포변성, 당원의 축적, 암종형성 등은 소엽별로 형성되는 경향이 많았고 담관암은 여러 소엽의 주변부에서 형성하였다.

혈중(Fig 1)은 8주째에도 대형화한 것도 있었고, 중심부는 변성된 적혈구로 구성되고 주변부에 압편된 결합조직이나 간세포로된 경계가 형성되어 이전부터 경과되었음을 보였다.

이상에서 DEN에 의한 장기의 변화는 주로 간장에 있었고 다양한 형태의 병변과 종양이 모든 개체에서 발생되었고 개체에 따라 2~3주의 진행 정도의 차이가 있었다. 기타 폐에서는 농양소견이 소수에서 관찰되어 본 관련이 없는 것으로 규정하였다. 소화기관과 비장에는 특이소견이 없었다.

면역조직화학적 염색에서 증식이 일어나는 PCNA 양성반응세포와 세포자살사가 일어나는 apoptosis 양성반응세포를 조사한 바 양성반응세포의 분포는 부위에 따라 불규칙적이고 차이가 많아 병변의 유형별로 다소 많이 출현하는 부위를 대상으로 하여 조사한 바, PCNA 양성반응세포(Fig 6, 7)는 정상형태의 부위에는 2~5% 정도였으나 대형화한 간세포집단 부위에서는 3~8% 정도로 정상상태의 부위보다 증식이 다소 높게 진행되고 있었고 trabecular형 또는 acinar형의 간암세포집단은 15~22%, 담관암의 담관상피는 20~25%, Fig 5에서와 같은 소형화한 간암세포 간암세포 집단에서는 20~58% 정도의 순으로 증식세포의 비율이 높아 종양부위의 증식이 높은 비율로 진행되고 있었다.

Apoptosis 양성반응세포(Fig 8)는 정상상태의 간세포 부위와 대형화 소형화한 부위는 2~5% 정도, trabecular형 또는 acinar형의 간암세포 집단은 10% 정도, 담관암의 담관상피는 15% 정도, 소형화한 간암세포 집단에서는 20~30% 정도로 PCNA 양성반응세포가 높은 병변형태의 부

위일수록 높은 편이었으나 PCNA 양성반응세포의 비율 보다는 낮았다. 이들 두종의 양성반응세포는 공포화 집단이 있는 부위와 피사가 진행된 부위는 관찰되지 않았다.

고 찰

간세포의 공포화와 간조직의 cyst형성에 관하여서는 Dunsford *et al*¹⁹은 5주째 호산성 공포성 간세포의 병소가 출현하여 9주째는 더 증가되었다고 하였고, Tritscher *et al*¹⁷은 32주간 투여한 바, 여러부위에 한국성 세포질에 공포화, 다양한 수와 크기의 cyst, 호산성 염기성 또는 clear cells의 반점이 형성, 지방변성, Kupffer cells에 색소침착 등의 소견이 있었다고 하였다.

본 연구에서는 간세포의 공포화는 8~9주째 지방변성 또는 미세한 공포화가 산발성 또는 한국성으로 형성하였고 소엽내 다양한 크기의 cyst가 형성되었고 13~15주째는 공포화는 범발성화 하였고, cyst들은 더 증대되었고 경계가 명확하였다. 그러나 Kupffer cells의 색소침착 소견은 거의 관찰되지 않았다.

간암세포는 glycogen과 지방의 축적이 있다^{20,21}. 본 조사에서 이러한 소견들은 투여초기인 8~10주째 주로 관찰되었고 그후는 거의 소실되었다.

간세포의 형태의 변화에 관하여는 이¹⁸는 8주째 간세포 핵과 세포질이 크지거나 작아지는 대소부동형태(anisocytosis)를 하였다고 하였고 세포질내 큰 과립이 형성되고, 10주째는 핵이 작고 세포질이 풍부하고 염색질이 밝아진 세포도 관찰되었고, 지주조직 부위에는 불규칙하고 치밀하였다고 하였고, Dunsford *et al*¹⁹은 난원형 세포(oval cells)의 증식이 현저하였다고 하였고, Tamano *et al*¹⁶은 핵과 세포질이 큰 다형세포들이 특히 소엽중심부에 있었고 증식소견은 없었다고 하였다.

본 연구에서는 8~9주째 일부 간세포는 핵과 호eosin성의 세포질이 대형화 또는 소형화하여 대소부동하였고 이들 세포들은 같은 엽내서는 같은 크기의 세포들로 구성 또는 집단을 이루거나 소엽 주변부에 대형화한 간세포가 군집하는 경향이었고 13~15주째는 대형화한 간세포들은 더 큰 집단을 이루었고 16~17주째는 대형화한 간세포들은 점차 감소하였다.

DEN에 의해 발생된 간의 종양세포의 형태와 간암의 종류에 대하여는 Dunsford *et al*¹⁹은 랫드에서 oval cell의 증식이 현저하고 다양한 종양성 소절(nodules)이 형성되

었으며, 이 oval cells는 간세포 또는 간암세포의 전구세포였다고 하였고, 이들 간세포외에 별도의 간 종양에 대하여는 이¹⁸는 종양조직은 경계가 불명확하고 세포질이 거의 없이 방추형의 긴 핵으로 구성되고, 도서상으로 모여있고, 주변세포는 크고 세포질이 밝으며, 이 주변은 작은 세포로 구성된다고 하였다. Goven *et al*²⁰은 간암은 고립성 대형, 소절형, 산재형의 3형이 있고 간경화가 있고 column형 또는 acinar형 이라고 하였다.

종양의 종류에 관하여는 세포의 형태에 대하여 구체적인 언급이 없이 mouse에서 Lagopoulos *et al*¹⁴은 DEN 투여후 24주째에서 48주째 까지 63~80%에서 간세포성 선종(hepatocellular adenomas)이, 6~28%에서 간세포성 암종(hepatocellular carcinoma)이, Pedrick *et al*²²은 신생 마우스에서 암종이, Tamano *et al*¹⁶은 40~100%가 간세포성 암종이, Tritscher *et al*¹⁷은 마우스에서 71%가 tumor가 발생하였는데 그 종류는 담관종(cholangiomas), 담관암(cholangiocarcinoma), 혈관육종(hemangiosarcoma), 간세포성의 선종이었다고 하여 개체별로 규정하였고 동일개체내 동시에 여러 형의 종양에 대하여는 언급이 없었고 다만 Zavanella *et al*²²은 마우스에 DEN을 투여한 바 간에 trabecular carcinoma와 glandular pattern의 carcinoma가 발달하였다고 하였다.

본 조사에서는 종양의 형태는 주로 acinar 또는 trabecular pattern의 간세포성 암종과 담관암이 주였고 거의 모든 개체에서 여러가지 형이 발달의 정도는 차이가 있었으나 함께 발생되었다. 이러한 것은 간세포와 담관상피가 기원이기 때문으로 생각된다.

PCNA 양성반응세포의 비율에 관하여는 정상간에서는 Ng *et al*⁷은 사람에서는 평균 $2.22 \pm 4.95\%$ 였다고 하였고, Tamano *et al*¹⁶은 마우스에서 $1.44 \pm 0.44\%$, James와 Muskhelishvili¹⁰는 마우스에서 0.021~0.039%였다고 하였다. 또 Knol *et al*⁵은 사람의 간에서 Brdru 양성반응세포는 $1.1\% \pm 0.2\%$ 라고 하여 간세포의 증식 또는 재생율은 낮음을 알 수 있다. 본 조사에서는 정상형태의 부위는 2~5% 정도로 사람에서와는 유사한 비율이었으나 mice 보다는 높아 간조직의 변화가 일어나고 있음을 알 수 있었다.

Tamano *et al*¹⁶은 마우스에서 대형화한 간세포는 소엽중심부에 있었고 증식소견은 없다고 하였으나 본 조사에서는 대형화한 간세포가 소엽 주변부에 많이 발달된 경향이었고 양성반응세포의 분포가 많은 부위가 3~8%

정도로 정상부위 보다도 더 높았다.

간암에서 PCNA 양성반응세포의 출현비율에 관하여는 Terada와 Nakanuma²⁴는 간의 adenomatous hyperplasia는 재생되는 부위와 악성부위가 높다고 하였다. 사람에게서 Adachi *et al*⁶은 사람의 간암의 소절(nodule)에서 12.2%에서 83.9%로 진행정도에 따라 차이가 있었다고 하였고 Deugnier *et al*²⁵은 preneoplastic foci에서 75%였고 foci내 간세포만의 대상으로는 24±21%라고 하였다. 또 Ng *et al*⁸은 간의 carcinoma에서는 PCNA 양성은 1~89.4%까지의 범위가 넓고, 평균은 33.3±26.3%로 양성반응세포의 비율은 예후추정 요인이 된다고 하였다. 이와같이 보고자에 따라 부위에 따라 비율의 차이가 많다. 본 조사에서도 양성반응세포의 분포는 비율이 부위에 따라 불규칙하고 차이가 많아 유형별로 다소 많이 출현하는 부위를 대상으로 하였다.

DEN에 의해 발생된 종양부위의 PCNA 양성반응세포 출현에 관하여는 Tamano *et al*¹⁶은 DEN 투여한 preneoplastic foci는 24.4±5.2%, adenomas는 37.6±3.6%, carcinomas는 44.7±5.7% 라고 하여 본 조사에서는 trabecular형 또는 acinar형의 carcinoma 세포집단은 15~22%, 담관암의 담관상피는 20~25%, carcinoma 형의 소형화한 간암세포 집단에서는 20~58% 정도의 순으로 종양의 형태에 따라 위 보고와 비율의 차이가 있었으나 다같이 양성비율이 높은 조건은 예후불량한 악성종양임을 나타내고 있었다.

간암에서 apoptosis에 대하여는 Mills *et al*¹¹은 DEN을 투여한 마우스에서 알콜을 투여한 바 apoptosis가 증가하여 간의 무게가 감소하였다고 하였다. James와 Muskhelishvili¹⁰는 마우스의 정상 간세포의 apoptotic body의 출현율은 0.008~0.023%였다고 하였고, Stephens *et al*¹³은 마

우스의 난소암에서 5%, 간암에서 0.6%가 apoptosis 양성반응세포라고 한 바 있으나 그의 종양조직세포의 apoptosis 조사는 거의 없다. 본 조사에서는 대형화 소형화한 부위는 최소 2~5%에서 최고 암종형의 소형화한 간암간세포 집단에서 20~30%로 PCNA 양성반응세포보다 월등히 낮아 종양이 증대되고 있음을 알 수 있었다.

결론

성숙한 랫드(SD)에 diethylnitrosamine(DEN)을 0.01% 되게 음수에 가하여 13주까지 자유롭게 공급하며 8~17주까지 매주 3~5두씩 부검하여 조직학적으로 관찰한 바 간장에 초기에는 소엽간 결합조직의 증식에 의해 소엽이 구분화되었고 간세포는 공포변성, 지방변성된 간세포의 광범한 분포 또는 큰 공포화를 가진 간세포가 한국성 집단의 형성이 있었고, 일부의 간세포는 호eosin성의 다면체형으로 소형화 또는 대형화 등으로 대소부동하였으며, 소엽별로 형성되는 경향이 많았고 간세포성 암과 담관암이 같은 개체에서 동시에 형성되어 12주째 이후에 현저히 발달하였고 개체에 따라 3~5주간의 진행의 차이가 있었다.

면역조직화학적 염색에서 PCNA 양성반응세포와 apoptotic kit 양성반응세포의 비율이 높은 순서는 다같이 소형화한 간암세포 집단부위, 담관암 부위, trabecular형 또는 acinar형의 간암세포 부위, 대형화한 간세포집단 부위, 정상형태의 부위순이었고, PCNA 양성반응세포는 apoptotic kit의 양성반응세포 보다는 비율이 높아 증식세포가 apoptosis가 일어나는 세포보다 많아 간전체가 증대되고 있음을 알 수 있었다.

Legend for figures

Fig 1. Numerous greyish-white foci or tumor nodules and a large hematoma are seen on the rat liver surface at 13 weeks after first initiation of diethylnitrosamine treatment.

Fig 2. Stored glycogen are seen in several hepatic lobules at 8 weeks after initiation. PAS reaction. × 10.

Fig 3. Trabecular or acinar forms of hepatocellular carcinoma in the liver at 14 weeks are seen. H-E. × 25.

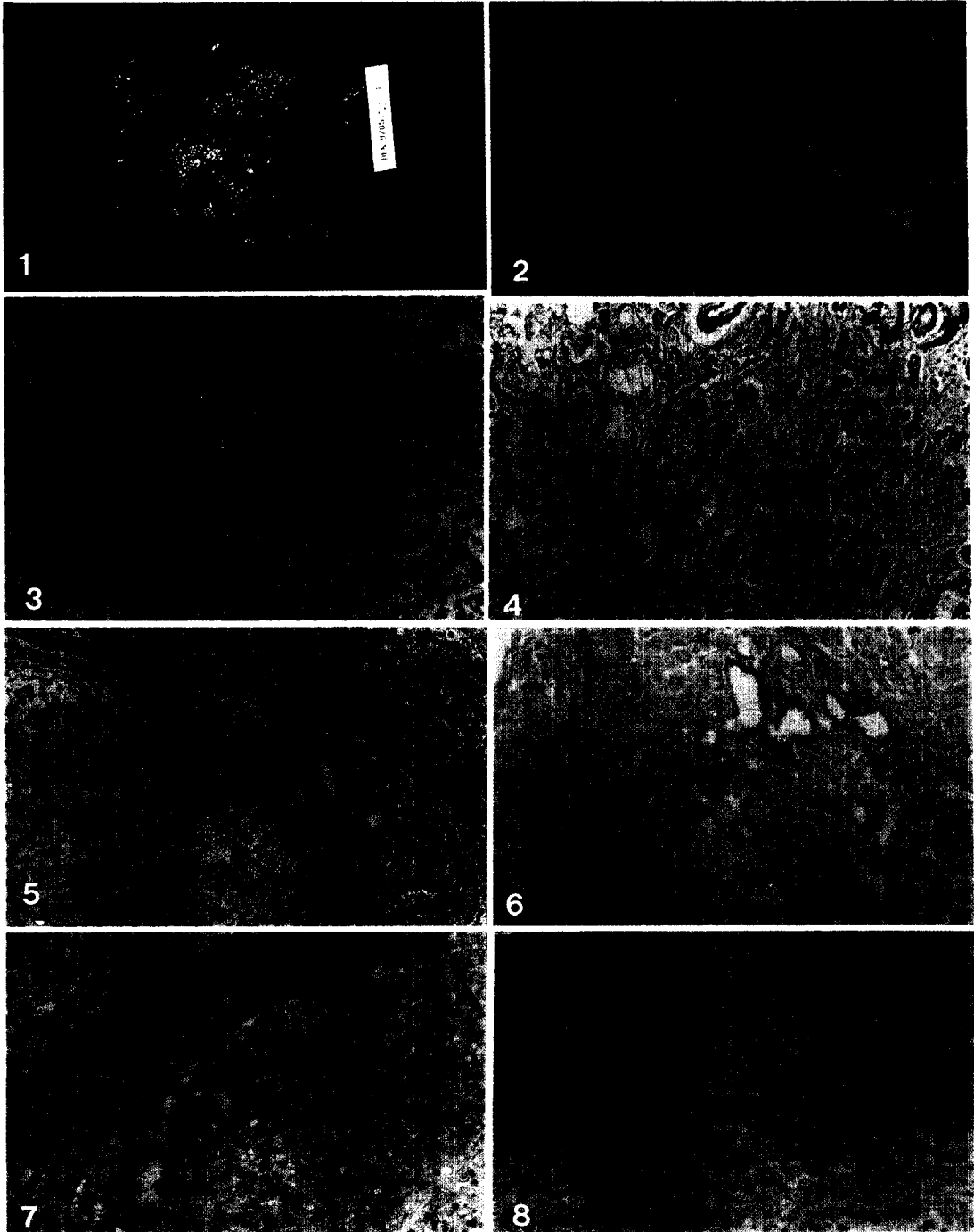
Fig 4. Cholangiocarcinoma on the peripheral area and hepatic large cells on the central area of a hepatic lobule in the liver at 10 weeks are seen. H-E. × 50.

Fig 5. Small hepatocellular carcinoma(left) and cholangiocarcinoma(right) in the liver at 14 weeks are seen. H-E. × 50.

Fig 6. Many PCNA positive cells in the cholangiocarcinoma in the liver at 8 weeks are seen. Immunostain. × 50.

Fig 7. Numerous PCNA positive cells in small hepatocellular carcinoma area at 13 weeks are seen. Immunostain. × 50.

Fig 8. Many apoptotic positive cells in small hepatocellular carcinoma at 13 weeks are seen. TUNEL methods. × 50.



참 고 문 헌

1. 광수동. 家畜 및 실험동물 소화관 腺의 構造에 관한 연구. II. 哺乳 mouse 장점막의 細胞 再生週期에 대하여. 대한수의학회지, 32:1-6, 1992.
2. 광수동. 뇌신경교세포 집단의 발생과 이동에 대한 放射線 自記法的 관찰. II. 뇌 외배엽성 신경교세포의 분열과 이동에 대하여. 대한수의학회지, 32:489-496, 1992.
3. 광수동, 박성식, 강원화. Anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody를 이용한 랫드 위와 腸의 분열 상피 세포의 분포에 관하여. 대한수의학회지, 33:597-603, 1993.
4. 광수동, 김종섭, 강정부. 닭의 대퇴부 골단조직의 세포종식에 대한 면역조직화학적 관찰. 대한수의학회지, 34:237-242, 1994.
5. Knol JA, Walker SC, Robertson JM, et al. Incorporation of 5-bromo-2'deoxyuridine into colorectal liver metastases and liver in patients receiving a 7-day hepatic arterial infusion. *Cancer Research*, 55:3687-3691, 1995.
6. Adachi E, Hashimoto H, Tsuneyoshi M. Proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma and small cell liver dysplasia. *Cancer*, 72:2902-2909, 1993.
7. Ng IOL, Lai ECS, Fan ST, et al. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 73:2268-2274, 1994.
8. 고희욱, 광수동. 성 hormone이 rat 자궁발달에 미치는 영향에 대한 proliferating cell nuclear antigen 항체의 면역조직학적 연구. 대한수의학회지, 37:281-289, 1997.
9. Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, et al. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Human Reprod Update*, 2:103-117, 1996.
10. 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.
11. Mills JJ, Chari RS, Boyer JJ, et al. Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Research*, 55:979-983, 1995.
12. Sakaguchi Y, Clifton Stephen L, Makino M, et al. Apoptosis in tumors and normal tissues induced whole body hyperthermia. *Cancer Research*, 55:5459-5464, 1995.
13. 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.
14. 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.
15. Lapis K, Bocsi J, Timar F, et al. Studies on the proliferative activity of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinomas in monkeys. *J Pathol*, 181:439-443, 1997.
16. Tamano S, Merlino GT, Ward JM. 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 phenobarbital. *Carcinogenesis*, 15:1791-8, 1994.
17. 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.
18. 이혜영. Diethylnitrosamine에 의한 흰쥐 간세포의 유전적 변화에 관한 연구. 인하대학교 대학원 박사학위논문, 1991.
19. Dunsford HA, Karnasuta C, Hunt JM, et al. Different lineage of chemically induced hepatocellular carcinoma in rats defined by monoclonal antibodies. *Cancer Research*, 49:4894-4900, 1989.
20. Goven ADT, Macfarlane PS, Callander R. Primary carcinoma of liver In "Pathology illustrated" 4th ed, Churchill Livingstone, New York, 463-466, 1995.
21. Ponomarkov V, Mackey LJ. 8. Tumours of the liver

- and biliary system in " Bulletin of the world health organization. *Geneve* , 53:188-194, 1976.
22. Pedrick MS, Rumsby PC, Wright V, *et al.* Growth characteristics and Ha-ras mutation of cell cultures isolated from chemically induced mouse liver tumours. *Carcinogenesis* , 15:1847-1852, 1994.
23. Zavanella T, Radaelli G, Girotti P, *et al.* Evaluation of the tumor-promoting activity of two-adrenoreceptor blocking agents, propranolol and atenolol, in liver of Fischer 344 rats. *Carcinogenesis* , 15:2531-2539, 1994.
24. Terada T, Nakanuma Y. Cell proliferative activity in adenomatous hyperplasia of the liver and small hepatocellular carcinoma. *Cancer* , 70:591-598, 1992.
25. 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.
-