

All-*trans* retinoic acid 투여가 간흡충 감염 햄스터의 담관암 발생에 미치는 영향

김 학 업 · 서 일 복*

C&C 신약연구소
세명대학교 한의학과*
(1995년 9월 5일 접수)

Effects of All-*trans* retinoic acid on the cholangiocarcinogenesis in Hamsters
infected with *Clonorchis sinensis*

Hak-yeop Kim, Il-bok Seo*

C&C Research Laboratories
Department of Oriental Medicine, Semyung University

(Received Sep 5, 1995)

Abstract : This study was carried out to evaluate the effects of all-*trans* retinoic acid(RA) on the development of cholangiocarcinoma in hamsters.

Eighty six female Syrian golden hamsters were divided into four groups. Group I was for the induction of the cholangiocarcinoma, which was infected orally with *C. sinensis* and given dimethylnitrosamine(DMN, 15ppm) in drinking water for 4 weeks. Group II was for evaluating the effect of all-*trans* RA treatment on the cholangiocarcinogenesis, which was treated the same as group I and orally given RA(1mg/kg, 5 times per week) for 15 weeks. Group III was given only RA for 15 weeks. Control group IV was given only soybean oil which was solvent for RA treatment. More than 5 heads of hamsters in each group were sacrificed at 4, 7, 11 and 15 weeks after the beginning of the experiment. The livers were examined grossly, histopathologically, and immunohistochemically.

The results obtained were as follows :

1. Death of animals started from the 11 weeks after the beginning of the experiment. One of the total 22 animals(5%) and 7 of the total 24 animals(29%) died in group I and group II, respectively.
2. Proliferation of oval cell was peaked at 11 weeks in group I and at 7 weeks in group II, and decreased gradually after those periods of the time.
3. Cholangiocarcinomas were found in 1 of 6 animals(17%) at 11 weeks and in 4 of 6 animals(67%) at 15 weeks in group I, respectively. But in group II, the cholangiocarcinomas occurred in 1 of 5 animals(20%) at 7 weeks, in 7 of 12 animals(58%) at 11 weeks and in 2 of the rest animals(100%) at 15 weeks, respectively.
4. Expression of α -fetoprotein(AFP) of the oval cells in the group II showed the same degree of positive reaction at that of group I at 4 weeks. But AFP positive oval cells decreased gradually and AFP negative oval cells(ductlike oval cells) increased gradually.
5. Expression of cytokeratin of the oval cells in group II was shown slightly at 4 weeks and the degree of expression increased moderately from the 7 weeks. But the expression of the oval cells in group I was shown slightly after the 7 weeks.

These results suggested that all-trans RA promoted the occurrence and the rate of cholangiocarcinoma by inducing differentiation of small cells and oval cells in the liver of hamsters infected with *C sinensis* and treated with DMN.

Key words: *Clonorchis sinensis*, DMN, All-trans retinoic acid, cholangiocarcinogenesis, hamster.

서 론

비타민 A와 그 유도체들(retinoids)은 생체내에서 태아의 발생, 정상 상피세포의 분화 및 증식에 중요한 역할을 한다.¹ 비타민 A가 화학적으로 유도된 암을 억제할 수 있다는 것이 Saffiotti 등²에 의해 기관지암 실험모델에서 보고되었다. Sporn 등³은 비타민 합성 동족체들이 화학적 발암과정에서 암을 예방할 수 있음을 주장하고 병리조직학적 연구로 전암병변과 암병변의 발생이 저지된다고 하였다. Retinoids는 실험적으로 유도된 유방암^{12,11}, 췌장암¹⁷, 위암과 자궁경관암¹⁸, 전립선암¹⁹ 및 간암²⁴ 등의 다양한 암발생에도 억제효과가 있음이 보고되었다. All-trans retinoic acid는 급성 전골수 백혈병 환자에 투여시 악성종양의 분화를 유도함으로써 치료효과를 나타냄이 밝혀져 최초로 암치료의 분화유도요법 예로 제시되었다. 근래에 많은 연구자들에 의해 세포분화요법에 의한 retinoids의 암예방과 치료가능성에 대해 고찰되었으나^{15,20}, retinoids가 담관암에 미치는 영향에 관한 연구결과는 찾아볼 수 없는 실정이다.

Retinoids의 암예방효과와 치료효과가 *in vivo*와 *in vitro*에서 보고되고 부분적으로 임상적인 효과가 입증되었으나 강력한 항암효과를 보이기 위해서는 독성을 나타내는 양이 투여되어야 하고 고유의 특성인 세포증식과 분화능력은 어떠한 조건하에서는 암을 촉진할 수 있음이 보고되었다. 예를 들면 human epidermis에서는 retinoids가 양성과 악성종양의 성장을 억제하였으나⁴ 배양된 정상 epidermal cell과 orthoproliferative epidermis에서는 증식을 촉진하였다. 정상 조직의 세포, 암 또는 암세포주의 heterogenicity는 retinoids에 의해 발생학적 기원에 따라 다양한 분화반응을 나타낼 수 있다고 보고되었다^{21,22}. 햄스터 볼주머니에 비타민 A를 도포하면 dimethylbenzanthracene의 발암효과가 촉진되는 것으로 보고되었으¹³, retinyl acetate를 경구투여한 경우에는 benzo(a)pyrene으로 유발시킨 호흡기계 종양의 발생이 촉진된다고 보고되었다²⁵. 복강에 투여된 retinyl palmitate도 N-methyl-N nitrosoguanidine으로 유발된 랫드 위암종을 촉진시킨다고 보고되었다²¹. Longnecker 등¹⁶은 retinoids가 azaserine유발 췌장암을 억제하였으나 동시에 간세포 암종의 발생은 증가시켰다

고 하였다.

이와같이 retinoids는 여러 종류의 암에서 각각 다른 촉진 또는 억제효과를 나타내고 있다. 따라서 간흡충에 의한 담관암 발생과정에서 retinoids와 같은 세포분화 유도물질의 영향을 평가함은 담관암 발생과정을 이해하는데 도움이 되고 이의 예방과 치료에 기여될 것이라 생각되어 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물: 실험동물은 고려대학교 동물사육장에서 번식시킨 5~6주령 Syrian golden hamster로 체중이 60~70g인 암컷 86마리를 사용하였다. 랫드용 polycarbonate cage에 5마리씩 합사하여 실험실 환경에 1주간 적응시킨 후 실험에 공시하였다. 실험기간 동안 사료는 실험동물용 펠릿사료(삼양사료)를, 식수는 수도물을 자유롭게 공급하였으며, 자연채광하에서 사육온도가 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도가 $60 \pm 10\%$ 로 유지된 사육실에서 사육하였다.

간흡충 감염: 간흡충(*Clonorchis sinensis*)의 피낭유충은 낙동강의 한 하구에서 잡은 참붕어에서 얻었다. 참붕어의 근육을 모아서 인공위액으로 37°C 에서 30분간 소화시킨 후 소화된 내용을 지름이 0.147mm인 채로 여과하고 0.85% NaCl용액에 여러번 세척하였다. 간흡충피낭유충을 입체현미경 하에서 10개씩 모아서 실험개시일에 1회 경구적으로 투여하여 감염시켰다.

Dimethylnitrosamine의 투여: Dimethylnitrosamine(Sigma Co., USA)을 최종농도가 미발암성 용량인 15ppm이 되도록 수돗물에 희석하여 음수로 공급하였다.

Retinoic acid의 투여: All-trans retinoic acid(Sigma Co., USA)는 체중 kg당 1mg이 되게 soybean oil(Sigma Co., USA)에 녹여 주 5회 gastric tube로 경구투여 하였으며 투여된 volume은 체중 kg당 2ml로 하였다.

실험군의 설정: 총 86마리의 햄스터를 I, II, III 및 IV군으로 나누어 각각 22, 24, 20 및 20마리를 배정하였다. 1군은 *Clonorchis(C) sinensis* 감염후 dimethylnitrosamine(DMN)을 4주까지 음수의 형태로 연속

투여하여 담관암 모델군으로 설정하였다. II 군은 all-trans retinoic acid(RA)의 투여가 담관암 발생기전에 미치는 영향을 평가하기 위해서 I 군에서와 같은 처치와 더불어 실험개시일 부터 실험종료일까지 주 5회 RA를 경구투여하였다. III 군은 RA의 독성여부를 확인하기 위해서 실험개시일 부터 실험종료일까지 주 5회 RA만을 투여하였다. IV 군은 soybean oil 을 실험개시일 부터 실험종료일까지 주 5회 체중 kg 당 2ml를 gastric tube로 경구투여하여 대조군으로 설정하였다.

각 군에서 실험개시후 4, 7, 11 및 15주에 각각 5 마리 이상을 희생시켜 부검을 실시하였으며 실험종료일 이전에 폐사되는 개체는 폐사 당일 부검을 하여 각 군의 부검주령에 가까운 주로 편입시켜 검사하였다.

임상증상 관찰 : 모든 실험군에 대해서 매일 약물 투여전에 식욕부진, 신경증상, 행동장애, 복부팽만 등 임상증상을 관찰하였다.

체중, 간장중량 및 체중에 대한 상대간장중량의 측정 : 실험개시일부터 실험종료일까지 각 군에 대해서 매주 같은 시각에 체중을 측정하였다. 간장의 중량은 매 부검시마다 측정하였으며, 체중에 대한 간장중량의 비율을 계산하여 각 군마다 그 변화를 비교하였다.

간장의 결절성 병변의 면적측정 : 부검시마다 간장의 표면에서 관찰되는 결절성 병변의 크기를 침침대에서 2mm, 2mm 이상에서 6mm, 6mm 이상에서 10mm 그리고 10mm 이상으로 구분하여 크기에 따른 수를 셈하였다. 결절성 병변의 면적은 다음과 같은 공식을 적용하여 산출하였다.

$$\text{면적}(\text{area}) = \sum n_i \cdot \Pi r_i^2$$

k는 1에서 4까지이며 r_1, r_2, r_3, r_4 는 각각 크기별 평균반지름인 1, 2, 4, 6mm로 하였고 n_1, n_2, n_3, n_4 는 각 크기별 결절의 수이다.

광학현미경적 관찰 : 실험후 4, 7, 11, 15주에 각 군마다 5마리 이상을 ether로 마취시킨 후 부검하거나 또는 폐사된 개체를 부검하여 간장을 적출하여 10% 중성포르말린에 고정하였다. 고정된 간장의 좌엽, 중간엽, 우엽 및 미상엽의 동일한 부위를 절편하여 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀으로 포매하였다. 파라핀에 포매된 조직을 $4\mu\text{m}$ 의 두께로 절편한 후 hematoxylin and eosin 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

면역조직화학적 관찰 : 간문맥부주위에 증식된 세포들에서의 cytokeratin, α -fetoprotein의 발현정도를 경시적으로 관찰 비교하기 위해서 1차 항체로는

mouse anti-human α -fetoprotein(Zymed Labs. INC, USA)과 rabbit anti-cytokeratin(Zymed Labs. INC, USA)을 사용하였고, Biotin의 부착된 2차 항체 및 avidin complex는 Elite ABC Kit(Vector Co., USA)를 사용하여 Hsu 등의 방법을 변형시켜 면역염색을 실시하였다.

결 과

체중, 간장 중량 및 체중에 대한 상대간장중량 : 각 군에 있어서 체중의 변화는 Fig 1에서와 같다. RA만을 투여한 III 군과 soybean oil만을 투여한 IV 군은 처음부터 지속적인 체중의 증가를 나타냈으며 8주부터는 III 군이 IV 군에 비해서 다소 증체가 낮은 경향을 나타냈으나 전반적으로는 III 군과 IV 군 사이에는 유의성 있는 증체의 차이는 없었다. 간흡충 감염과 DMN을 투여한 I 군과 II 군의 처치와 더불어 RA를 동시에 투여한 III 군에서는 7주부터 III 군 또는 IV 군에 비해서 체중의 증가가 현저하게 감소되었으나 I 군과 II 군 사이에는 증체의 차이는 거의 없었다.

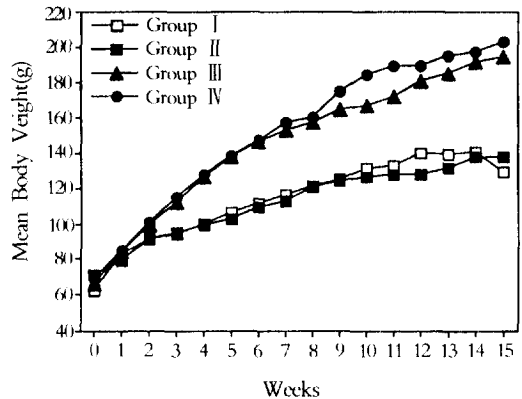


Fig 1. Change of body weight in the hamsters treated with *C. sinensis* infection and DMN administration (□), *C. sinensis* infection, DMN and retinoic acid administration(■), retinoic acid administration(▲), soybean oil administration(●).

각 군의 간장의 무게는 Fig 2에서와 같은 변화를 보였다. I 군에서는 4주에서 7주까지 약간 증가하였으며 7주 후부터 급격히 증가하다가 11주부터는 약간 감소하는 경향을 보였다. II 군에서는 4주에서 7주까지는 다소 감소하다가 7주부터 15주까지 급격히 증가하는 경향을 나타냈다. 시간이 경과할수록 I 군의 간장 무게가 II 군보다는 뚜렷하게 증가되었다.

Ⅲ군과 Ⅳ군에서는 4주부터 15주까지 완만한 증가추세를 보였다.

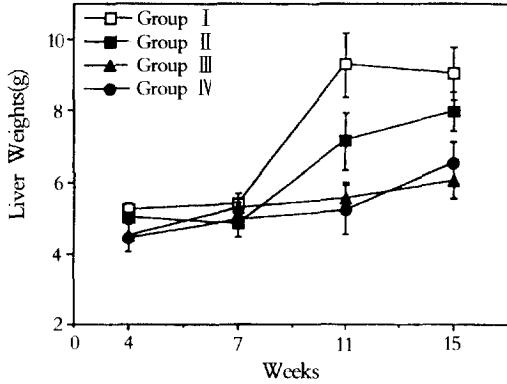


Fig 2. Change of liver weight in the hamsters treated with *C sinensis* infection and DMN administration (□), *C sinensis* infection, DMN and retinoic acid administration (■), retinoic acid administration (▲), soybean oil administration (●).

체중에 대한 간장중량의 변화는 Fig 3에서와 같이 관찰되었다. Ⅲ군과 Ⅳ군에서는 4주부터 15주에 이르기까지 체중대비 간장 중량은 점차 완만하게 감소되었다. Ⅰ군과 Ⅱ군에서는 4주부터 7주까지는 점차 감소되었으나 7주 후부터 11주까지 급격히 증가하였으며 그 후부터는 완만히 증가되었다.

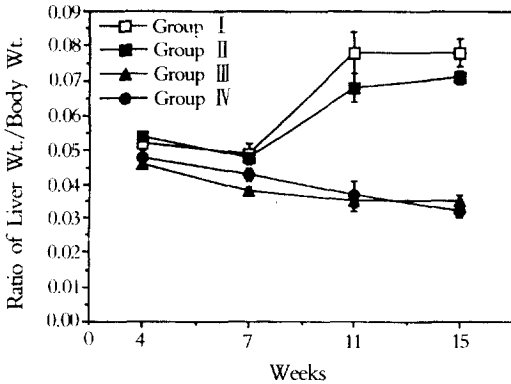


Fig 3. Change of relative liver weight in the hamsters treated with *C sinensis* infection and DMN administration (□), *C sinensis* infection, DMN and retinoic acid administration (■), retinoic acid administration (▲), soybean oil administration (●).

간장의 결절성 병변의 면적: 간장의 결절성 병변의 면적은 Fig 4에서와 같이 측정되었다. Ⅰ군과 Ⅱ군에서는 실험 7주까지 결절성 병변이 형성되지 않았으나 실험 7주부터 결절성 병변이 관찰되었다. 실험 7주에서는 Ⅰ군이 Ⅱ군보다 그 범위가 다소 넓었으나 유의성은 없었으며 11주에는 Ⅱ군이 Ⅰ군에 비해서 현저히 증가되어 있었다($p < 0.05$). 실험 15주에서는 여전히 Ⅱ군이 Ⅰ군에 비해서 높게 관찰되었으나 유의성은 없었다. Ⅲ군과 Ⅳ군에서는 실험기간동안 간장의 결절은 형성되지 않았다.

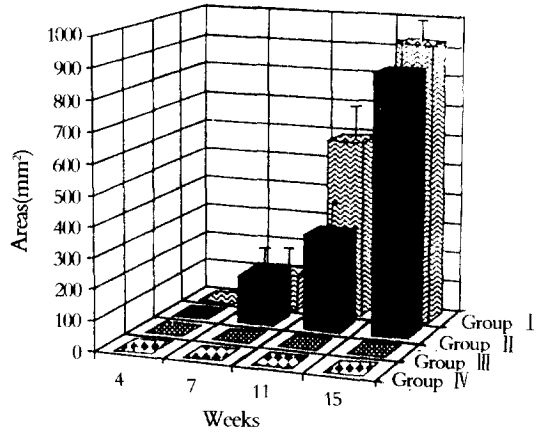


Fig 4. Areas of the surface nodular lesions observed in livers of hamsters treated with *C sinensis* infection and DMN administration (■), *C sinensis* infection, DMN and retinoic acid administration (□), retinoic acid administration (▲), and soybean oil administration (●).

임상증상: Ⅰ군과 Ⅱ군에서는 7주부터 식욕부진, 활동성 저하가 관찰되기 시작하였으며, Ⅱ군에서는 9주부터 복부팽만이 나타나기 시작하여 10주에서는 현저하게 관찰되었다. 11주에 Ⅱ군에서는 2예가 폐사되었으며 연속해서 폐사가 출현하여 12주에 4예, 13주에는 총 폐사된 개체가 7예에 달하였고, 15주까지 생존한 개체는 단 1예 뿐이었다. Ⅰ군에서는 실험 11주에 1예가 현저한 복부팽만의 소견을 보이며 폐사되었으나 15주까지 더 이상의 폐사는 없었다. Ⅲ군과 Ⅳ군에서는 실험기간동안 인지할만한 임상증상은 관찰되지 않았다.

병리조직학적 소견: Ⅰ군과 Ⅱ군의 경시적인 병리조직학적 변화는 군간에 유사한 형태를 나타내었으나 Ⅱ군에서의 병변이 Ⅰ군보다 빠르게 진행되었다. Ⅲ군과 Ⅳ군에서는 실험기간동안 대부분의 장기에서 정상범위의 소견만이 관찰되었다. Ⅰ군과 Ⅱ군

Table 1. Severity and incidence of histopathological changes in each group in duration of experiment in hepatic parenchyma and mucous metaplasia of bile duct

Group	Weeks	No. of animal	Focal necrosis	Megalocytosis	Clear cell foci	Granulomatous nodule	Mucous metaplasia of bile duct epithelia
I	4	5	(0)	+++ (5)	-(0)	-(0)	-(0)
	7	5	-(0)	+++ (4)	-(0)	+(1)	+(4)
	11	6	+(2)	+(1)	+(2)	++ (2)	++ (5)
	15	6	+(2)	+(1)	+++ (3)	++ (2)	+++ (6)
II	4	5	-(0)	+++ (5)	-(0)	-(0)	-(0)
	7	5	++ (3)	++ (3)	+(1)	++ (3)	+(1)
	11	12	+++ (8)	+(3)	+++ (8)	+++ (7)	+(1)
	15	2	+++ (2)	-(0)	+++ (2)	+(1)	+(1)

- : absent, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe.
 Parenthesis indicates the number of animals observed pathological changes.
 Group I was treated with *C. sinensis* and DMN.
 Group II was treated with *C. sinensis*, DMN, and retinoic acid.

Table 2. Severity and incidence of histopathological changes in each group in duration of experiment in portal triad

Group	Weeks	No. of animal	Small cell	Oval cell	Cholangio fibrosis	Cholangioma	Cholangio carcinoma
I	4	5	+(5)	+(5)	ND	ND	ND
	7	5	++ (5)	++ (5)	+(3)	+(1)	ND
	11	6	++ (6)	+++ (6)	++ (6)	++ (3)	++ (1)
	15	6	+(6)	++ (6)	++ (6)	++ (5)	++ (4)
II	4	5	++ (5)	++ (5)	ND	ND	ND
	7	5	++ (5)	+++ (5)	++ (5)	++ (3)	+(1)
	11	12	+(12)	+(12)	++ (12)	++ (9)	+(7)
	15	2	+(2)	+(2)	++ (2)	++ (2)	++ (2)

+ : mild, ++ : moderate, +++ : severe, ND : no detectable.
 Parenthesis indicates the number of animals observed each lesion.
 Group I was treated with *C. sinensis* and DMN.
 Group II was treated with *C. sinensis*, DMN and retinoic acid.

에서 관찰되었던 간실질의 변화 및 담관주위에서의 변화를 Table 1과 2에 요약하였다.

I 군에 비해서 II 군이 보다 빠르고 현저한 한국성 괴사소 및 clear cell foci가 관찰되었으나 담관상피세포의 점액화생은 I 군에서 더욱 현저하였다. Small cell은 I 군에서는 4주부터 증가되기 시작하여 11주 후에는 점차 감소되었으나 II 군에서는 7주 후부터 감소되었다. Oval cell은 I 군에서는 4주부터 증가되어 11주에 최고에 달한 후 다소 감소되었으나 II 군에서는 7주에 최고에 달한 후 급격히 감소되었다. Cholangiocarcinoma는 I 군에서는 11주에 6예 중 1예, 15주에는 6예 중 4예에서 발생되었으나, II 군에서는 7주에 5예 중 1예, 11주에 12예 중 7예, 15주에 2예 중 2예 모두에서 발생되어 II 군에서 I 군보다 빠른 시기에 높은 암발생율을 나타냈다.

면역조직화학적 소견 : I 군과 II 군에서 실험초기

부터 실험종료시까지 관찰되었던 small cell 및 oval cell과 그리고 cholangiofibrosis, 담관종, 담관암이 형성된 예의 상피세포에서 경시적인 α -fetoprotein과 cytokeratin의 발현정도를 Table 3 및 4에 요약하였다.

α -fetoprotein은 small cell과 oval cell 모두에서 발현되었으며 small cell의 경우 I 군과 II 군 모두에서 경시적인 차이는 관찰되지 않았으나, oval cell의 경우 I 군에서는 11주 후부터 그 발현이 감소된 반면 II 군에서는 4주 후부터 그 발현이 감소되었다.

Cytokeratin은 I 군 및 II 군 모두의 small cell에서는 발현되지 않았으며 oval cell의 경우 I 군에서는 7주 후부터 미약한 발현이 지속적으로 관찰되었으나 II 군에서는 4주부터 미약하게 발현되다가 7주부터는 중정도로 지속적으로 발현되었다. Cholangioma 및 cholangiocarcinoma에서의 군간에 따른 경시적인

Table 3. Expression of α -fetoprotein in small cell, oval cell, and epithelia of cholangiofibrosis, cholangioma and cholangiocarcinoma

Group	Weeks	No. of animal	Small cell	Oval cell	Cholangio fibrosis	Cholangioma	Cholangio carcinoma
I	4	5	++	++	NO	NO	NO
	7	5	++	++	-	-	NO
	11	6	++	++	-	-	-
	15	6	++	+	-	-	-
II	4	5	++	++	NO	NO	NO
	7	5	++	+	-	-	NO
	11	12	++	+	-	-	-
	15	2	++	+	-	-	-

- : absent, + : weak, ++ : strong, NO : not occurred.

Group I was treated with *C sinensis* and DMN.

Group II was treated with *C sinensis*, DMN, and retinoic acid.

Table 4. Expression of cytokeratin in small cells, oval cells, and epithelia of cholangiofibrosis, cholangioma and cholangiocarcinoma

Group	Weeks	No. of animal	Small cell	Oval cell	Cholangio fibrosis	Cholangioma	Cholangio carcinoma
I	4	5	-	-	NO	NO	NO
	7	5	-	+	+++	+++	NO
	11	6	-	+	+++	+++	++
	15	6	-	+	+++	+++	++
II	4	5	-	+	NO	NO	NO
	7	5	-	++	+++	+++	NO
	11	12	-	++	+++	+++	++
	15	2	-	++	+++	+++	++

- : absent, + : weak, ++ : moderate, +++ : strong, NL : not occurred.

Group I II was treated with *C sinensis* and DMN.

Group II was treated with *C sinensis*, DMN, and retinoic acid.

변화는 관찰되지 않았다.

고 찰

Retinoic acid는 간흡충에 감염된 햄스터에서 oval cell의 증식에 의해서 발생하는 담관암의 발생을 촉진시킨 것으로 사료되었다. 육안적 관찰시 간장의 표면에 나타난 결절성 병변은 I군 및 II군에서 실험 7주부터 관찰되기 시작하였으나 실험 11주부터 retinoic acid 투여군에서 담관암 모델군에 비해서 현저하게 많이 증가하여 발생하기 시작하였다. 광학현미경을 통한 관찰에서도 간흡충과 DMN만 투여한 경우에는 담관암 발생이 실험 11주에 17%였고, 15주에는 67%였으나 retinoic acid를 동시 투여한 경우에는 실험 7주부터 담관암이 발생하기 시작하여 실험 7, 11, 15주에 각각 20%, 58%, 100%의 높은 발생

율을 보였다.

본 실험에서 small cell은 I군과 II군 모두에서 실험종료시까지 지속적으로 나타났으나 oval cell의 경우는 담관암 모델군에서는 실험 11주까지 지속적으로 증가한 반면에 retinoic acid 투여시에는 실험 7주까지 증가하다가 그 후부터 현저히 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 담관암의 발생시기와 관련지어 볼 때 oval cell이 담관암 발생의 기원임이 더욱 입증된 것이라 할 수 있다. 즉, oval cell이 집단을 이루어 불분명한 내강을 형성하는 경우를 경시적으로 관찰할 때에 retinoic acid 투여시에 실험 4주부터 관찰되기 시작하여 계속 증가한 것으로 보아 retinoic acid가 oval cell 집단의 분화증식을 촉진한 것으로 판단되었다.

Retinoic acid가 oval cell 집단의 분화를 촉진하였을 것이라는 증거는 α -fetoprotein과 cytokeratin의 면역조직화학적 관찰을 통하여 더욱 확실시되었다. 담관

암 모델군에서 α -fetoprotein에 반응을 보이는 oval cell은 실험 11주까지 지속된 후 감소하였으며, cytoke-
 ratin에 반응을 보이는 oval cell은 실험 7주부터
 관찰되기 시작하였다. 반면에 retinoic acid 투여시는
 실험 4주에 α -fetoprotein에 반응하는 oval cell가 가
 장 많이 관찰된 후 7주 부터는 감소하였고, cytoke-
 ratin에 반응하는 oval cell은 이와는 반대로 증가하는
 현상을 보였다.

광학현미경의 관찰시에 담관암 모델군에서는 실험
 7주부터, retinoic acid 동시투여군에서는 실험 4주부
 터 oval cell들이 몇개씩 모여 군집을 이루고 있거나
 불분명한 내강을 형성하고 있는 형태가 관찰되었는데
 면역조직화학적 관찰결과 이들 세포들은 α -fetopro-
 tein에는 반응하지 않고 cytoke-
 ratin에만 양성반응을 나
 타내고 있었다. 이러한 현상은 DMN 투여시 초기화
 된 oval cell들이 retinoic acid에 의해 담세관을 형성하
 는 oval cell(ductlike cell)로의 분화가 촉진된 것으로 믿
 어지며 또한 본 실험에서 retinoic acid 투여시 담관암
 발생이 빠르게 진행된 것은 retinoic acid의 세포분화증
 식에 기인된 것으로 사료된다.

Vitamin A와 그 동족체인 retinoids는 실험적으로 유
 도된 여러 종류의 암발생에 억제 또는 예방효과가 있
 음이 알려져 있으나^{5,12,13,17,20,24} 어떤 연구자들은 retinoic
 acid가 오히려 암의 발생을 촉진할 수 있다고 보고하
 였다.^{13,16,21,25}

Retinoids의 암 예방효과의 기전은 아직도 명확하지
 않으나 C-myc와 N-myc 등의 발암유전자의 수식효
 과와 더불어 미분화된 암의 분화를 촉진하는 작용과
^{21,22} ornithine decarboxylase 생산과 peptide growth factor
 등의 생산을 억제하여 나타내는 항촉진작용^{16,23} 등에
 기인되는 것으로 평가되고 있다.

Retinoids의 암 촉진기전은 그것이 세포막에 미치는
 독성작용이 가능한 기전이라 설명되고 있다.¹⁶ Re-
 tinoic acid의 세포막에 대한 독성작용 기전은 아직도
 명확하게 밝혀지지 않았으나 동물체에 과용량의 re-
 tinoic acid를 반복해서 투여할 경우 혈장의 수송능력
 은 초과되어 부하를 받게 되고 retinoic acid는 binding
 protein과 결합되지 않은 다른 형태로 세포막에 존재
 하게 되며²⁷ 이러한 비결합성 retinoid는 surface active한
 성질의 결과로써 세포막에서 독성이 발휘되는 것으
 로 판단되고 있다.

암발생의 또다른 촉진가능성으로는 retinoic acid의
 세포증식과 분열의 촉진작용으로,¹ 이러한 mitogenic
 aciton은 세포핵의 대사와 초기화에 관여되는 DNase
 와 같은 lysosomal enzyme의 방출과 관련된 것으로
 알려져 있다.¹ Gall은 vitamin의 adjuvant와 같은 작용

은 임파구 세포막에 손상을 주며 면역반응의 활성화
 를 야기하고 면역세포에서 세포분열을 유도하게 된
 다고 하였다. Levij와 Polliack¹¹은 햄스터 협낭에 re-
 tinoic acid를 경피적용시켰을 때 화학적으로 유도된
 암이 촉진된 이유를 세포의 증식과 분열의 증가로 인
 해 발암물질이 DNA를 손상시킬 기회가 증가한 때문
 인 것으로 설명하였다.

Retinoic acid의 다른 발암촉진 가능성으로는 화학
 적 발암모델에서 발암촉진인자들과의 상호작용을
 생각해 볼 수 있다. Wilson과 Reich¹²은 chick embr-
 yo fibroblast 배양실험에서 retinoic acid는 plasmino-
 gen activator의 생산을 촉진하며 강력한 tumor
 promotor인 phorbol myristate acetate나 sarcoma virus
 와 상호작용하여 암의 발생을 상승시킨다고 하였다.
 Levine과 Ohuch¹³도 MDCK 세포배양실험에서 pros-
 taglandin 생성과 세포지질의 deacylation을 증가시켜
 세포의 분화와 발암과정을 촉진시킴을 보고하였다.
 In vitro에서 retinoic acid가 promotor로서 작용할 수
 있거나 다른 promotor들과 상승작용을 나타낼 수 있
 는 것은 화학적 발암모델실험시 동물의 종류, 조직
 의 종류와 사용된 retinoic acid의 종류에 따라서 다른
 결과를 나타낼 수 있음을 시사하고 있다. 실제로
 Longnecker 등¹⁶은 azaserine으로 처리한 랫드 발암모
 델에서 체장암은 억제되었으나 간암의 발생은 촉진
 된 결과를 보고하였다.

이상과 같은 retinoic acid의 발암촉진 가능성을 고
 찰하여 볼 때 본 실험에서 담관암 발생이 촉진된 원
 인으로 2가지를 들 수 있다. 첫째 DMN 처리기간에
 retinoic acid에 의해 stem cell 또는 oval cell이 보다
 더 빠른 분화 및 증식이 유도되고 한편으로 DMN
 또는 간흡충과 상호작용하여 세포막의 독성이 증가
 되어 암세포로 전환될 가능성이 있는 세포가 증가한
 것으로 생각된다. 둘째로는 DMN을 제거한 후에
 retinoic acid는 oval cell의 분화와 증식을 빠르게 유
 도하여 담관암의 발생시기를 촉진한 것으로 사료된다.
 그러나 담관암 발생에 대한 retinoic acid의 촉진효과
 는 앞으로 더욱 연구되어야 할 것으로 보인다.

결 론

All-trans retinoic acid 투여가 햄스터에 간흡충(*Clon-
 orchis sinensis*)를 감염시킨 다음, DMN을 음수로 투
 여하여 유발되는 담관암 발생과정에 미치는 영향을
 평가하기 위하여 병리학적 및 면역조직화학적 방법
 으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 실험기간중 폐사예는 I군(담관암 모델군)과 II군(RA 투여 평가군)에서 실험개시 11주부터 나타났으며, I군에서는 총 22예중 1예(5%), II군에서는 총 24예중 7예(29%)가 폐사하였다.

2. Oval cell이 I군에서는 실험 11주에, II군에서는 7주에 가장 많이 증식하였으나 그 후부터는 점차 감소하였다.

3. 담관암의 발생은 I군에서는 실험 11주에 6예중 1예(17%)와 15주에 6예중 4예(67%)가 발생한 반면, II군에서는 실험 7주부터 발생되기 시작하여 5예중 1예(20%), 11주에 12예중 7예(58%), 15주에는 2예 모두에서 발생되었다(100%).

4. α -fetoprotein은 oval cell의 경우 II군에서는 실험 4주에 I군과 같이 강하게 발현되었으나 그 후부터 양성반응을 보이는 oval cell은 점차 감소하고 반응을 보이지 않는 oval cell(ductlike oval cell)은 증가하였다.

5. Cytokeratin은 oval cell의 경우 I군에서는 7주부터 미약하게 발현되었으나 II군에서는 4주부터 미약하게 발현되기 시작하여 11주 부터는 중정도로 발현되었다.

이상을 종합하여 볼 때 all-trans retinoic acid는 간흡충 감염과 DMN이 투여된 햄스터 간장에서 small cell과 oval cell의 분화를 유도하여 담관암 발생을 촉진한 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

1. Allison A. Lysosomes in relation to cancer induction and treatment. *Europ J Cancer* 1968; 3: 481~490.
2. Beere HM, Hickman JA. Differentiation: a suitable strategy for cancer chemotherapy?. *Anti-Cancer Drug Design* 1993; 8: 299~322.
3. Brockes J. Reading the retinoid signals. *Nature* 1990; 234: 766~768.
4. Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, Ballerini P, Berger R, Fenaux P, Degos L. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. . Clinical results. *Blood* 1990; 76: 1704~1709.
5. Chu EW, Malmgren RA. An inhibitory effect of vitamin A on the induction of tumors of forestomach and cervix in the syrian hamster by carcinogenic polycyclic hydrocarbons. *Cancer Res* 1965; 25: 884~895.

6. Dierlich E, Orfanos CE, Pullmann H, Steigleder GK. Beneficial effect of oral retinoid in psoriatic hyperproliferation : Autoradiographic studies on involved and non involved skin. *Arch Demato Res*, 1979; 264: 169~177.
7. Gall D. The adjuvant activity of aliphatic nitrogenous bases. *Immunol*, 1966; 11: 369~374.
8. Gillenberg A, Immel C, Orfanos CE. Retinoid-einfluss aus die zelkinetik gesunder menschlicher epidermis. *Arch Dermatol Res* 1980; 269: 331~335.
9. Hiragun A, Sato M, Mitsui H. Stimulation of cell proliferation by vitamin A derivatives on murine sarcoma virus-transformed mouse cells in serum-free culture. *Expl Cell Res* 1983; 145: 71~78.
10. Hoal E, Wilson EL, Dowdle EB. Variable effects of retinoids on two pigmenting human melanoma cell lines. *Cancer Res*, 1982; 42: 5191~5195.
11. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of Avidin-biotin peroxidase complex(ACB) in immunoperoxidase techniques : A cpmparison between ACB and unlabeled antibody(AAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577~580.
12. Lacroix A, Doskas C, Bhat PV. Inhibition of growth of established N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary cancer in rats by retinoic acid and ovariectomy. *Cancer Res* 1990; 50: 5731~5734.
13. Levij IS, Polliack A. Potentiating effect of vitamin A on 9, 10-dimethyl-1,2-benzanthracens carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *Cancer*, 1968; 22: 300~306.
14. Levine L, Ohuchi K. Retinoids as well as tumor promoter enhance deacylation of cellular lipids and prostaglandin production in MDCK cells. *Nature* 1978; 276: 274~275.
15. Lippman SM, Kessler JF, Meyskens FL. Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agents(Part), *Cancer Treat Rep* 1987; 71: 391~405.
16. Longnecker DS, Kuhlmann ET, Curphey TJ. Divergent effects of retinoids on pancreatic and liver carcinogenesis in azaserine treated rats. *Cancer Res* 1983a; 43: 3219~3225.
17. Longnecker DS, Kuhlmann ET, Curphey TJ. Effects of four retinoids in N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-treated hamster. *Cancer Res* 1983b; 43: 3226~3230.
18. Maxwell SA, Sacks PG, Gutterman JU, Gallick GE.

- Epidermal growth factor receptor prot-ein-tyrosine kinase activity in human cell lines established from squamous carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1989; 49: 1130~1137.
19. Meeks RG, Zaharevitz D, Chen RF. Membrane effects of retinoids : Possible correlation with toxicity. *Arch Biochem Biophys* 1981; 207: 141~147.
 20. Plents KJ, Nguyen NM, Lehr JE. Treatment of prostate cancer in the rat with the synthetic retinoid fenretinide. *Cancer Res* 1993; 53: 224~266.
 21. Reimann B, Mitschke H, Schreiber HW. Influence of vitamin A on MNNG-induced carcinogenesis in the glandular stomach of the rat. *Langenbecks. Arch Chir* 1983; 359: 65~73.
 22. Saffiotti U, Montesano R, Sellakumar AR, Borg SA. Experiment cancer of the lung : Inhibitory effects by vitamin A of the duration of tracheobronchial squamous metaplasia and squamous cell tumors. *Cancer* 1967; 20: 857~864.
 23. Scott RJ, Chakraborty S, Sell S, Hunt JM, Dunsford HA. Change in the ploidy state of rat liver cells during chemical hepatocarcinogenesis and its relationship to the increased expression of α -fetoprotein. *Cancer Res* 1989; 49: 6085~6090.
 24. Shima H, Kuniyasu T, Sugie S, Tanaka T, Mori H, Takahashi M, Muto Y. Inhibitory effects of polyphenolic acid(E-5166) on N-2-fluorenylacetamide-initiated hepatocarcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res(Gann)*, 1986; 77: 351~355.
 25. Smith DM, Rogers AE, Herndon BJ, Newberne PM. Vitamin A(retinyl acetate) and benzo(a)pyrene-induced respiratory tract carcinogenesis in hamsters fed a commercial diet. *Cancer Res* 1975; 35: 11~16.
 26. Smith ER, Goodman DS. Vitamin A transport in human vitamin A toxicity. *N Engl J Med* 1976; 294: 805~808.
 27. Smith JE, Goodman DS. Retinol-binding protein and the regulation of vitamin A transport. *Fed Proc* 1979; 38: 2504~2509.
 28. Sporn MB, Roberts AB. Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer Res* 1983; 43: 3034~3040.
 29. Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs(retinoids). *Fed Proc* 1976; 35: 1332~1338.
 30. Sporn MB, Roberts AB, Roche NS, Kagechika H, Shudo K. Mechanism of action of retinoids. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15: 756~764.
 31. Teelmann K, Tsukaguchi T, Klaus M, Eliason JF. Comparison of the therapeutic effects of a new aratinoid, Ro40-8157, and all-trans-and 13-cis-retinoic acids on rat breast cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 2319~2325.
 32. Thiele CJ, Reynolds CP, Israel MA. Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* 1985; 313: 404~406.
 33. Wilson EI, Reich E. Plasminogen activator in chick fibroblasts induction of synthesis by retinoic acid: synergism with viral transformation and phorbol ester. *Cell* 1978; 15: 385~392.
 34. Yuspa SH, Ben T, Henning H, Licht U. Divergent responses in epidermal basal cells exposed to the promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res*, 1982; 42: 2344~2349.