

실험동물에서 Apoptosis의 모델개발과 생체면역반응 및 형태학적 특징

I. Apoptosis 및 Hepatic Tumorigenesis의 유도 및 관련지표의 검색

강정부¹ · 하우송* · 김지경

경상대학교 수의과대학(동물의학연구소), *경상대학교 의과대학(암 연구소)

Development of Apoptosis Model and Bioimmune Responses in Experimental Animal

I. Induction and Indicator of Apoptosis and Hepatic Tumorigenesis

Chung-boo Kang¹, Woo-song Ha* and Chi-kyeong Kim

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

*College of Medicine, Gyeongsang National University

Abstract : Apoptosis is now widely recognized as a common form of cell death and represents mechanism of cell clearance in many physiological situations where deletion of cells is required. In vivo administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS) to Balb/c mice induced DNA fragmentation in the thymus. DNA fragmentation in the thymus was roughly dependent on the dose of LPS injected and reached the peak 18 hours after injection. This apoptosis in the thymus might be mediated due to LPS stimulant. DEN (diethylnitrosamine) has been shown to cause liver cancer in experimental animals and humans. The hepatic tumorigenesis was induced by ad libitum feeding of DEN only. It was suggested that DEN induced hepatic tumorigenesis in rat is a good reproducible model for studying biochemical and pathophysiological changes associated with the development of hepatic tumorigenesis and apoptosis.

Key words : DNA fragment, apoptosis, diethylnitrosamine, hepatic tumorigenesis, mouse and rat

서 론

Apoptosis는 기본적으로는 핵을 중심으로 해서 일어나는 생명유지의 일차원적인 방어기전의 한 형태로 자체 특히 핵의 형태학적인 변화는 물론 분자생물학적으로는 genome DNA의 ladder 현상이 특징으로 일반 감염증 등에서 볼 수 있는 necrosis(괴사)와는 형태학적으로도, DNA상 특징에서도 전혀 다름이 밝혀져 여기에 대한 연구는 매우 의미가 큰 것으로 인식되어 연구에 대한 관심도 높아지고 있다¹⁻³.

Apoptosis는 한 개체, 집단의 일생중의 단계, 단계에서 생명유지 기구에 깊이 관여하고 있음이 밝혀져

가고 있으나 보다 근원적인 연구를 위해서는 tumorigenesis에 대한 연구가 동시에 수반되어야 함을 절실히 느낄 수 있다^{8,20-21}.

Tumorigenesis와 apoptosis의 근원적인 mechanism 규명을 위하여 tumorigenesis의 발현확립을 위한 방편으로 실험동물(Sprague-Dawley strain rat)에서의 특징적인 hepatoma발현과 apoptosis 유도²⁷에 주력함과 동시에 관련 지표에 대한 검색을 위해 최근 생명과학의 발전과 더불어 종양의 발생기전, 예방, 치료에 대한 항암제 및 항암제의 약효 평가에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으나 이들에 대한 체계적이고도 지속적인 연구를 위하여 실험 모델의 개발이 무엇보다도 시급하다. 이들 연구의 대부분은 동물에서의 독성 실험, 그리고 cell line을 이용하거나 인체암 환자에서의 제 2상 및 제 3상 임상실험을 하여 연구하는 방법 외에는 흡족한 방법이 없는 실정

본 연구는 1996년도 한국과학재단 특장기초 연구과제(과제번호 96-0402-11-01-3)지원에 의하여 수행되었음.

¹Corresponding author.

에 있다.

임상 활용을 목적으로 하고 있는 암의 치유기전에 관한 연구만 하더라도 종양억제제, 면역증강제, 항암제 등으로 사용하고 있는 약물(물질)이 유전자 발현을 어떻게 조절하여 항암작용을 하는지에 초점이 모아지고 있다.

동물에서의 肝癌 발생 실험에는 여러 제제가 사용되어 왔으나^{4,7} 최근에는 DEN투여에 의한 방법이 주로 활용되고 있다^{6,28}.

실험동물중에서 특히 mouse 및 rat은 수명이 짧아 단기간에 초기의 DNA 변화로부터 완전한 轉移癌까지 모든 단계별로 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 인위적으로 가변성이 있는 요소를 고정할 수 있어 肝癌 발생과정을 연구하는데 필수적인 요건으로 인정되고 있다. 인간에서의 肝癌 발생연구에서의 어려운 점 즉, 장기간동안 단단계 과정을 거쳐 발생한다는 점, 암이 발생된 후에는 發癌의 초기과정을 알 수가 없을 뿐만 아니라 진행과정에 수많은 요소가 관련될 수 있다는 점 등의 단점을 보완할 수 없는 결점을 갖고 있기 때문이다.

DEN은 단독투여^{6,28}뿐만 아니라 acetylaminofluorene (AAF), ortic acid, phenobarbital, benzopyrene, N-amyl-N-methylnitrosamine, CCl₄ 등과 함께 투여하여 많은 肝癌 誘發연구에 활용되고 있으며 단기간 투여시에도 肝癌을 일으킬 뿐만 아니라 투여방법도 다양하여 發癌 誘發연구에 많이 사용되고 있다^{6,11-13,15,22,28}. 특히 최근에는 DEN을 1회 투여하고 부분 肝 절제술을 실시하여 肝癌을 誘發 시키는 방법도 알려져 있고 또한 발암 물질에 의하여 유도된 변이세포내 각 酵素 活性度の 변화가 초래됨이 밝혀지면서 이들 세포내 크론성 증식으로 나타나는 여러 종류의 酵素 活性度の 정량적 분석 역시 매우 의의가 큰 것으로 받아들여지고 있다¹⁰.

DEN은 생체내에서 吸收된 후 肝에서 akylyhydroxylation되어 肝 세포내의 RNA에 변화를 일으킴으로써 肝癌을 誘發하는 것으로 생각⁹되고 있으며 진정한 腫瘍 細胞의 形成은 이런 遺傳因자의 損傷이 細胞分裂이나 遺傳子 表現(gene expression)을 할 때 細胞 機能이 복합적인 변화를 초래하여 생기는 결과로 인정되기에 일련의 과정에 대한 체계적인 검색이 필요함을 절감하지 않을 수 없다¹⁸.

본 연구에서는 이미 실시되고 있는 부분적 肝절제라든지, 또는 發癌 촉진제를 따로 투여하지 않고 자연상태의 조건에 가장 알맞는 발암 모델을 개발코져 8주령된 Sprague-Dawley strain rat를 이용, 0.01%

농도의 DEN만을 함유한 음수를 6주에서 14주 동안 투여하여 發癌모델과 동시에 apoptosis 발현 여부도 동시에 검색코져 한다.

발암모델이 setup되면 간암의 발생기전 연구와 동시에 간암발생을 억제하는 약제, 간암발생을 조장하는 물질 등을 조사연구하는 모델로 활용함에는 물론 apoptosis의 관련 발현인자의 검색으로 기존 사용되고 있는 항암제의 효과를 검정하거나 신개발 될 수 있는 항암제의 항암효과를 평가하는 모델로도 이용코져 하는데 있다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육조건

Balb/c mouse는 생후 3주령에서 15주령 까지로 하였으며 hepatic tumorigenesis 발현실험을 위한 rat (Sprague-Dawley strain)는 생후 6주령된 SPF Sprague-Dawley 수컷 쥐를 전문 사육업체에서 분양받아 2주간 適正 飼育環境에 馴化시켰으며, 건강한 8주령의 체중 120~150 gm의 동물만을 시험에 사용하였다. 實驗動物의 환경조건은 온도 20±4°C, 상대습도 45~60%, 환기 회수 10~12회/hr, 조명시간 오전 9시~오후 11시, 조도 150~200 Lux 상태로 본 대학 사육실에서 사육, 실험하여 이후에 사용하였다.

Balb/c 마우스에서의 apoptosis의 유도조건 검토/조건 설정

Apoptosis의 유도 장기로 잘 알려져 있는 thymus를 1차 대상으로 하여 유도시의 제반 조건 검토를 실시하였다. 실험동물로는 순종의 Balb/c mouse를 대상으로 하였다.

주령별로는 3주령에서 부터 10주령, 나아가 15주령까지의 범위로 하였다. 유도제로는 lipopolysaccharide (LPS) from Escherichia coli serotype O26:B6, O55:B5를 사용하였고 투여량은 1 µg의 LPS의 소량 (1 µg, 5 µg, 10 µg)에서 부터 100 µg까지로 하였고 투여방법은 복강내 및 tail vein 투여로 실시하였다.

유도의 검색은 투여 후 2시간 간격으로 하여 실시 투여 후 72시간까지로 하였다. 대조군에서는 실험군과는 무처치의 그룹으로 하여 시간경과별, 투여용량별에 대한 검색을 실시하였다.

마우스 흉선세포에서의 genomic DNA fragment (ladder DNA)의 분리

Thymus에 대한 Balb/c mouse에서의 apoptosis 유

도에서 주령별, 투여후의 시간별, 투여량 및 성별에 대한 최적조건을 검토하기 위한 각종 예비 실험을 실시하였다.

Apoptosis의 분자생물학적 판정법으로 활용하기 위하여 DNA의 nucleosome 단위에서의 단편화를 검출하기 위하여 흥선세포로부터 DNA검출을 실시하였다. 조직량 보다는 세포수준에서의 숫자를 결정하기 위한 예비실험을 수 차례 수행, 세포수준은 2×10^6 수준이 적당하여 이를 시료로 하여 0.05 M Tris-HCl(pH 7.5) 2 ml에서 재부유시켜 농도는 100 $\mu\text{g/ml}$ 이 되게 proteinase K를 첨가하여 각 단계별 처리과정을 거쳐 DNA pellet를 순수분리, 수거하여 agarose gel electrophoresis로 확인하였다.

Rat에서의 hepatic tumorigenesis의 유도 및 apoptosis의 유도

예비실험은 hepatoma의 특이 유도제로 알려져 있는 diethylnitrosamine(DEN)을 사용, 투여량, 투여방법 및 처리과정 여부에 대한 각종 예비실험을 실시하였다. 기본적으로는 경구투여 방법이 가장 확실하면서도 안정되어 이를 활용토록 하였는데 기본적으로는 아래와 같다. DEN단독 투여실험에 있어서 투여후 11~13주에 걸쳐 發癩이 가장 왕성히 진행된다는 이전의 방법들과 비교하기 위해 생후 8주령의 70두의 쥐에 DEN을 음수에 녹여 14주간 다음과 같이 하여 격리시켜 투여하여 과정별, 단계별 분석을 실시한 결과를 이용 본 실험에 사용하였다.

본 실험은 diethylnitrosamine(DEN) 단독 투여 실험에 있어 11~13주에 걸쳐 發癩이 가장 왕성히 진행된다는 이전의 방법들과 비교하기 위해 11주에서 13주령 DEN투여군은 각각 12~15마리를 실험하였고, 나머지 6주령에서 10주령, 그리고 14주령에서는 5마리에서 6마리를 실험하여 각 주령간의 發癩 과정을 관찰하였고 대조군은 총 10마리를 12주 동안 發癩 물질을 함유하지 않은 음수만을 투여한 군으로 하여 총 80마리를 실험하였다. 發癩물질은 음수의 0.01% 농도로 diethylnitrosamine(DEN, 東京化成工業株式會社)를 경구투여 하였으며 실험기간 중에서는 고체 사료는 자유 공급하였다.

Rat에서의 apoptosis 유도는 기본적으로는 Balb/c mouse에서의 유도조건과 같이 하여 실시하였으나 투여용량은 마우스의 3~5배까지 증량시켜 실시하였다.

體重/肝重量 및 체중에 대한 肝重量 비율 측정 Hepatic tumorigenesis 발현에 대한 방법의 하나로

체중측정 및 肝重量 변화에 대한 검색을 실시하였다. 실험에 사용한 쥐들에서는 發癩 誘發의 확인을 위하여 DEN을 계속 투여한 후 6주령군부터 14주령군까지 경구로 發癩劑를 투여하여 剖檢을 실시하였으며 각 주령별 發癩誘發 정도를 비교하기 위하여 주령별로 剖檢을 하여 검색, 형태학적 변화를 추구토록 하였다.

剖檢 직적 體重을 測定하여 기록하였으며, ether 마취 후 剖檢 실시 즉시 肝을 먼저 적출하여 肝重量을 測定하였다.

혈액샘플의 채취(마우스, 랫트)

血清의 採取는 mouse 및 rat를 흡입마취한 후 평균 5 ml의 血液을 심장 採血하여 1시간 室溫에 방치하여 凝固시킨 후 2000 rpm, 10분간 원심분리하여 분리된 血清은 酸素測定 전까지 -28°C 에 보존하여 사용하였다.

혈청중의 총 단백질 및 albumin 농도 측정

총 단백질 함량은 Bradford 方法(Coomassie blue dye binding method)에 따라 200배 희석한 血清 100 μl 에 基質液[0.01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4.7% ethanol, 8.5% phosphoric acid] 5 ml를 가하여 실온에서 반응후 1시간 내에 분광광도계 595 nm에서 測定하여 bovine serum albumin(Sigma Co.)을 사용한 표준 곡선에 의해 測定하였다.

Albumin 함량은 BCG법을 技法으로 한 변법으로 검체와 정색 시약[albumin(ALB) 시약(Asan Co)]을 잘 혼합, 실온에 10분간 방치한 후, 30분 이내에 시약 blank를 대조로 파장 630 nm에서 흡광도를 測定하여 검량선에서 알부민량을 구한 후 A/G비를 환산하였다.

간의 육안적 관찰

대조군 및 DEN 투여 rat 그룹별에 대해 매주 3~5두씩 부검하여 특히 간 중량 변화, 발생된 종양에 대한 육안적 소견을 실시하였다.

결 과

임상증상

發癩劑인 DEN을 각 주령별 계속 투여한 후 7주령이 경과하면서 약간의 行動 鈍化와 脫毛 현상이 일부 개체에서 나타나기 시작하였다. 1일 개체당 14~18 ml 정도의 음수량도 DEN을 계속 투여후 8주령

이 경과하면서 부터 조금씩 감소하기 시작하여 10주령 이후에서는 10 ml 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 12주이상 사육한 대조군에서는 특이한 臨床症狀 및 다른 生理學的 變化는 관찰되지 않았다.

Balb/c mouse 및 rat에서의 apoptosis의 발현

마우스의 흉선세포에서는 3~4주령에서도 가능하였으나 5~6주령에서 DNA fragment의 발현율이 가장 높았으며 13주령에서부터는 매우 낮게, 15주령에서는 검출이 되지 않아 주령별에 따른 명확한 차이가 있었고, 성별에 대한 검색에서는 유의성 있는 차이가 인정되지 않았다.

시간별에서는 DNA수준에서의 발현율은 투여후 18~20시간 내외에서 가장 높았으나 2일(48시간) 이후까지도 지속되어 세포수준에서의 검색의 가능성을 나타내어 주었다.

투여량은 lipopolysaccharide(LPS)의 경우 개체당

40~100 µg 전후에서 DNA 수준에서의 발현율이 높았고 소량(5 µg이하)인 경우와 다량 투여에서는 발현율이 매우 낮게 나타났다(Fig 1. 참조).

SD rat에서의 유도조건은 mouse와 같이 하여 투여용량은 3~5배까지로 증량시켜 실시하였으나 mouse와 같은 조건인 LPS 단독투여만으로는 DNA fragmentation은 볼수 없었다.

體重 및 肝重量의 변화

發癌劑 DEN을 계속 투여한 군의 각 주령별 體重 變化는 發癌劑를 투여하지 않은 대조군에 비해서 DEN 투여후 11주령군 이후부터는 유의하게 감소(p<0.05), 肝重量 역시 대조군에 비해서 유의하게 감소되었으나 각 주령군 간의 유의성은 인정되지 않았다.

體重에 대한 肝重量 比率은 각 주령별로는 대조군의 3.94±0.53%에 비해 發癌劑 투여후의 11주령군에서는 3.72±0.70% 다소 감소하였고, 다른 주령의 DEN 투여군에서도 정도의 차이는 있으나 11주령군과 비슷한 양상을 나타내어 감소되었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 1 참조).

血清 총蛋白質 및 albumin 농도, albumin/globulin의 比率 變化

Total protein 농도의 변화: Total protein 농도는 대조군에 비해서 6주령에서부터 유의적인 감소(p<0.05)를 나타내어, 주령이 증가할수록 total protein의 농도는 더욱 감소(p<0.05)하는 경향을 나타내었으나, 8, 9주령과 13주령에서는 증가는 하였으나 이들 간의 유의성은 인정되지 않았다(Fig 2 참조).

Albumin 濃度の 變化: Albumin 농도는 대조군이 나 6,7주령에 비해서 8주령에 유의한 감소(p<0.05)가 있었고, 9,10주령에는 오히려 대조군보다 유의한 증가(p<0.05)를, 다시 11주령에서는 10주령보다 유의한 감소가 있었지만 대조군과의 차이는 없었다. 12주령 이후부터 14주령 사이에서는 albumin 농도는 점진적인 감소를 나타내었다(Fig 3 참조).

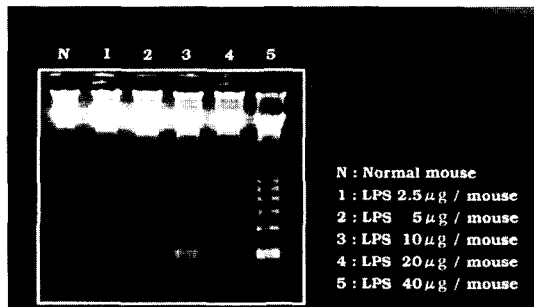


Fig 1. LPS-induced DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis in mice thymocytes

Table 1. Changes of body weights and liver weights in diethylnitrosamine treated rats

Duration of treatment (weeks)	No. of rats used	B W (g)	L W (g)	LW/BW (%)
0*	10	359.32±18.09	14.15±2.31	3.94±0.53
11	12	314.98±31.26**	11.74±3.09	3.72±0.70
12	15	327.54±34.12**	11.94±2.55	3.64±0.94
13	12	296.23±58.72**	10.24±2.58	3.45±0.82

*Control: no treatment during 12 weeks. LW : liver weight, BW: body weight.

** : Significantly (p<0.05) different within column.

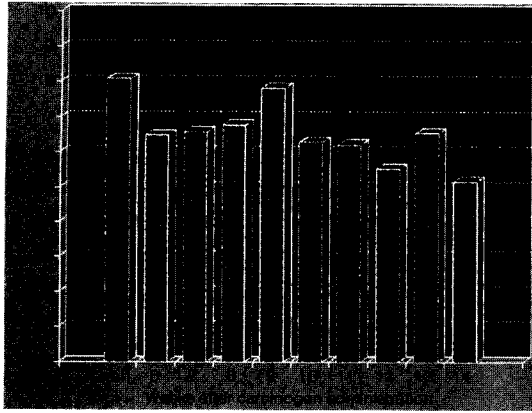


Fig 2. Total protein concentration.

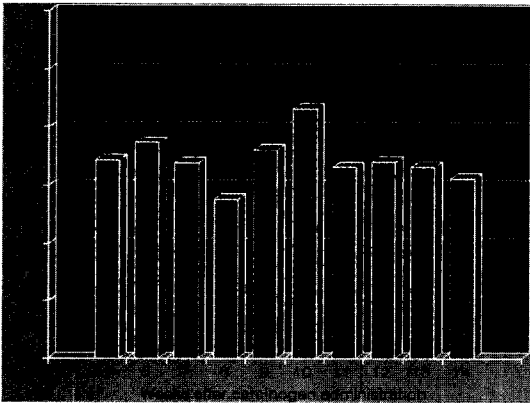


Fig 3. Albumin concentration.

A/G ratio의 변동: Albumin/globulin ratio는 6주령에 대조군에 비해서 유의한 증가($p < 0.05$)가 있었고, 이후 계속 감소되다가 10주령에 최고치로 되어 2.24 ± 0.18 을 나타내었다.

A/G 比率의 증가는 albumin 감소가 대조군에 비해 약간 감소하거나 감소를 보이지 않는 반면 total protein의 감소는 대조군에 비해 감소를 보임으로써 albumin 대 globulin 比率은 대조군에 비해 훨씬 큰 증가 양상을 나타내었다(Table 2 참조).

形態學的 觀察

臟器剖檢을 통한 肝의 肉眼的 소견으로는 發癌劑(DEN) 투여후 10주령이 경과된 흰쥐에서 肝에 直徑 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

Table 2. Albumin/Globulin ratio

Weeks	No.	ratio
control	10	0.76 ± 0.07
6	6	1.35 ± 0.12
7	5	1.08 ± 0.09
8	5	0.71 ± 0.08
9	5	0.83 ± 0.06
10	5	2.24 ± 0.18
11	12	1.12 ± 0.15
12	15	1.58 ± 0.21
13	12	1.40 ± 0.12
14	5	1.49 ± 0.16

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, 肝細胞腫瘍이 형성되었고 간표면의 硬化와 종대현상도 관찰할 수 있었다(Fig 4, 5).

12주령 이후의 發癌劑 투여군에서는 肝腫瘍의 크기와 수가 증가하여 간조직 전반에 肝腫瘍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 유착현상이 관찰되기도 하였다. DEN을 전혀

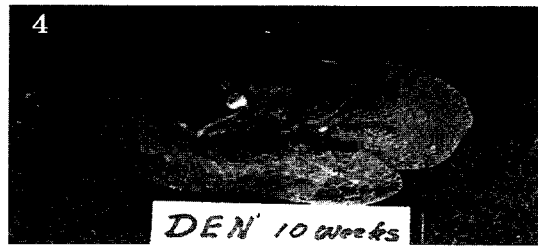


Fig 4. The hepatomegaly and hepatic tumors on the peripheral areas in the rat treated with DEN on 10 weeks.



Fig 5. Numerous hepatic tumors in the rat treated with DEN on 11 weeks.

투여하지 않고 12주 동안 사육한 대조군의 간조직은 정상적으로 전혀 변화는 없었다.

고 찰

癌發生機轉과 過程은 아직 완전히 규명되지 않고 있는 실정이며 더욱이 여기에는 여러 chemical substances, radiation 및 virus 등의 요인이 腫瘍 誘發에 크게 기인한다고 알려져 있다^{3,4,21-22}, 최근 급격한 산업화로 인한 많은 오염 물질이 생물체의 유전자에 영향을 미쳐 돌연변이 및 각종 암을 誘發하여 이 문제가 심각하게 대두되고 있다.

發癌物質의 일종인 DEN은 aminoazo dyes를 투여하였을 때 나타나는 간에서의 변화인 괴사(necrosis) 및 증식(hyperplasia)과 과호염기성(hyper basophilia), 그리고 종양(tumor)의 발생이 알려져 있다^{9,12}. DEN은 cytochrome p450에서 生活性化(bioactivation)되어 smooth endoplasmic reticulum이 많은 中心靜脈주변에 壞死를 誘發시키고 脂肪症(steatosis)을 誘發, 또한 DEN은 모든 惡性腫瘍에서와 마찬가지로 肝癌에서의 體重 감소는 특이한 症狀 중의 하나로 알려져 있다⁹. 본 실험에서는 대조군에 비해서 發癌劑 DEN을 투여한 쥐에서 體重 감소 및 肝重量이 감소하여 유의한 차이가 있었고, 體重에 대한 肝重量 比는 다소 감소하였지만 큰 차이는 없었다.

LPS 처리 apoptosis 유도 rat에서는 대조군과 전혀 차이가 없어 간 기능과는 크게 관계가 없음을 알 수 있었다.

1993년 Rogers et al.¹⁹은 惡性腫瘍이 생겼을 경우에 體重에 크게 감소한다고 했으며, 1987년 Matsufuji et al.¹⁶도 N-amyl-N-methylnitrosamine으로 食道癌(esophageal carcinoma)이 誘發된 쥐에서 미미한 體重 감소가 있었다고 보고하였다.

이 외 DEN을 투여하여 肝癌을 誘發하여 體重의 變化를 연구한 것으로는 1991년 Lagopoulos et al.¹⁴은 마우스를 이용하여 DEN으로 肝癌을 誘發시킨 후 50주령까지 관찰하여 體重에 크게 감소한다는 것을 보고한 바 있다. 1994년 이 등²⁸이 흰쥐에서 Folpet을 투여한 후 DEN으로 肝癌을 유도했을 때 體重에 대한 肝의 比率 變化는 정상군에 비해 아주 미미한 증가가 있었음을, 1993년 Laconi et al.¹⁵은 DEN과 orotic acid를 함께 투여했을 때와 각 약물을 단독으로 투여했을 때의 體重에 대한 肝의 무게 比率를 測定하였는데 전체적으로는 아주 미미한 증가가 있었으며 이 중 DEN단독으로 투여했을 때가 가장 변

화가 컸다고 보고하였다.

본 실험에서는 다른 보고에서와 같이 體重에 대한 肝의 무게 比率는 肝癌이 진행시 대조군에 비하여 전체적으로 증가하지 않았고 오히려 다소 감소하는 양상이었는데 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

본 실험에서는 發癌물질인 DEN 투여 군에서의 血清 albumin 농도는 12주 동안 음수만을 투여한 대조군에 비교해 큰 차이는 없었으나 감소하였고 더욱이 12주령 이후 부터는 점진적인 감소를 나타내었으나 이러한 결과는 Walford 등²³이 肝炎을 비롯한 肝 질환시 albumin 농도의 감소가 수반되었다는 보고와 완전 일치하지는 않아 여기에는 조직소전이 동시에 검토되어야 할 것으로 판단된다.

血清에서의 total protein의 농도는 대조군에 비해서 DEN을 투여한 군에서 그리고 주수가 증가할수록 뚜렷이 감소하였다.

Albumin/globulin의 比率도 DEN의 음수가간이 증가할수록 뚜렷이 증가하였다. 이는 albumin 감소가 약간 감소하거나 감소를 보이지 않는 반면 total protein의 감소는 높은 감소를 보임으로 해서 globulin치도 상대적으로 그 감소치가 증가함으로 albumin 대 globulin 比率는 대조군에 비해 DEN 투여한 군이 큰 증가 양상을 나타내었고 주수가 증가될수록 뚜렷이 증가한 것으로 판단된다.

肉眼的 관찰을 통한 臨床症狀의 변화는 9주령을 기점으로 하여 쥐의 體重 감소 및 음수·사료 섭취량이 감소, 쥐의 被毛가 거칠어지고 일부에서 脫毛 현상이 나타났고 더욱이 부검시 변연부 간표면의 종대와 腫瘍 結節組織의 형성이 10주령에서 부터 뚜렷하게 관찰, 11주령부터 더 진행되어 12주령 이후에서는 직경 5 mm 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 종대(cytoplasmic swelling)와 脂肪變性(steatosis)^{18,21}으로 이런 손상은 사염화탄소(carbon tetrachloride)에서 잘 나타나는 것으로 알려져 있다¹⁸. 이런 다양한 간세포 손상 물질이 단기간 약하게 작용하면 저절로 회복할 수 있을 것이고, 장기간 지속하거나 심한 경우 간세포변성이 불가역적인 괴사를 일으켜 化學물질에 따라 膽汁鬱滯形(cholestasis) 및 肉芽腫(granuloma) 형성이나 혈관계통의 손상을 유발하며 지속적인 자극의 원인으로 纖維化(fibrosis)로 큰 자극에 의해 만성 간손상이 나타나며 암으로 진행될 수 있는 것으로 알려져 있다^{4,13,15,18}. 만일 간손

상의 구조를 조직학적으로 잘 분석하면 손상 물질에 따라 특별한 간손상이 나타나므로 원인 물질을 예측할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 11주째에 空胞의 수와 크기가 증대되어 壞死가 이루어진 부위 또는 큰 소포의 增殖性 結節 주변에 새로운 증식성 작은 원형의 세포 집단이 출현하기 시작하였는데 이는 惡性癌의 전구세포로 간주되어 발암과 apoptosis 연구에도 크게 기여할 것으로 판단된다. 실험동물에서의 apoptosis 유도는 rat에서는 흉선세포의 *in vitro* 실험에서만, mouse에서는 비장세포를 이용한 실험이 거의 전부²⁵⁻²⁹로 일반적으로 주령에 따라서, 자극제의 용량에 대한 의존성이 있음이 밝혀져 있는데 본 실험에서도 같은 결과를 얻게 되어 mouse 비장세포의 *in vivo* 유도에서 rat에서의 hepatic tumor 발현은 확립된 것으로 판단된다.

결 론

Balb/c 마우스의 흉선세포에 대한 apoptosis 발현은 5-6주령에서 가장 높고 13주령이후에서는 발현율이 매우 낮았다. 성별에 대한 차이는 인정되지 않았으나 apoptosis 유도제로 사용한 lipopolysaccharide(LPS)의 투여량에 대한 의존성이 있음을 알 수 있었다.

다단계 간암발생(hepatic tumorigenesis)과정 및 기전연구를 위해 diethylnitrosamine(DEN) 투여만의 SD rat에서의 종양화 과정에서 투여후 10주령 이후에서부터는 임상증상, 간 기능관련지표 및 부검시의 간의 육안적 관찰에서도 종양화로의 진행을 알 수 있어 hepatic tumorigenesis 관련 연구에는 물론 apoptosis의 발현연구에도 크게 기여될 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- Cohen JJ, Duke RC. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 1987; 132: 38-42.
- Cohen JJ, Duke RC. Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol* 1991; 50: 55-85.
- Doherty GM, Lange JR, Langstein HN, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA. Evidence for IFN- γ as a mediator of the lethality of endotoxin and tumor necrosis factor- α . *J Immunol* 1992; 149: 1666-1670.
- Dunsford HA, Kamasuta C, Hynt JM, et al. Different lineage of chemically induced hepatocellular carcinoma in rat defined by monoclonal antibodies. *Cancer Research* 1989; 4894-4900.
- Facchinetti A, Tessarollo L, Mazzocchi M, Kingston R, Collavo D, Biasi G. An improved method for the detection of DNA fragmentation. *J Immunol Methods* 1991; 136: 125-131.
- Fontaniere, Daoust R. Histochemical studies on nuclease activity and neoplastic transformation in rat liver during diethylnitrosamine carcinogenesis. *Cancer Res* 1973; 33: 3108-3111.
- Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 939-943.
- Goldstein P, Ojeius DM, Young JDE. Cell death mechanisms and the immune response. *Immunol Rev* 1991; 121: 29-65.
- Hall PA, Imaida K, Hasegawa R, et al. Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. *CRC Crit Rev Toxicol* 1989; 19: 385-415.
- Hirota N, Williams GM. Hepatotoxicology : Assessment of hepatocarcinogenesis by early indicators. CRC Press Boca Raton Ann Arbor Boston London. 1991; 593-620.
- Jack EM, Bentley P, Bieri F, et al. 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 1989; 31: 286-297.
- Kovalszky I, Szeberenyi SZ, Zalatnai A, et al. Modification of DENA-induced hepatocarcinogenesis by CCl₄ cirrhosis. Comparison of the enzyme patterns. *Carcinogenesis* 1992; 13: 773-778.
- Laconi E, Denda A, Sarma DSR. 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* 1993; 14: 1771-1775.
- Lagopoulos L, Sunahara GI, Stalder R. The effects of alternating dietary restriction and ad libitum feeding of mice on the development of diethylnitrosamine-induced liver tumors and its correlation to insulinaemia. *Carcinogenesis* 1991; 12: 311-315.
- Luciana T, Paolo P, Mario UD. 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* 1992; 13: 1929-1932.
- Matsufugi H, Ueo H, Mori M et al. Enhancement of esophageal carcinogenesis induced in rats by N-amyl-N-methylnitrosamine in the presence of 12-O-

- tetradecanoylphorbo 1-13-acetate. JCN 1987; 79: 1123-1129.
17. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flowcytometry. J Immunol Methods 1991; 139: 271-279.
 18. Piot HC, Sirica AE. The stage of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. Biochem Biophys Acta 1980; 605: 191-215.
 19. Rogers AE, Zeisel SH, Groopman J. Diet and carcinogenesis. Carcinogenesis 1993; 14: 2205-2217.
 20. Scherer E. Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis. Biochimica Biophys Acta 1984; 738: 219-236.
 21. Solt DB, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. Nature 1976; 263: 702-703.
 22. Tamono 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, 1994; 15: 1791-1798.
 23. Walford ST et al. Reference range database for serum chemistry in serum with solid-phase extraction and on-line elution liquid chromatography. Clin Chem 1987; 33: 2028-2033.
 24. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides-extraction with phenol water and further application of the procedure. Methods Carbohydrate Chem 5: 83-91.
 25. Wyllies AH, Ker JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 1980; 68: 251-306.
 26. Zhang XM, Morikawa A, Takahashi K, Jiang GZ, Kato Y, Sugiyama T, Kawai M, Fukada M, Yokochi T. Localization of apoptosis (programmed cell death) in mice by administration of lipopolysaccharide. Microbiol Immunol 1994; 38: 669-671.
 27. Zhang YH., Takahashi K, Jiang GZ, Kawai M, Fukada M, Yokochi T. In vivo induction of apoptosis (programmed cell death) in mouse thymus by administration of lipopolysaccharide. Infect Immun 1993; 61: 5044-5048.
 28. 이해영, 지관자. Diethylnitrosamine에 의한 흰쥐 간 세포의 형학적 변화. 인하대기초과학연구소 논문집 1992; 13(2): 85-96.