

실험동물에서 apoptosis의 모델개발과 생체면역반응 및 형태학적 특징 II. Apoptosis 및 hepatic tumorigenesis 과정에서의 혈청 간 효소활성치 및 조직소견

강정부¹ · 하우송* ·곽수동 · 김지경
경상대학교 수의과대학 (동물의학연구소)
*경상대학교 의과대학

Development of Apoptosis Model and Bioimmune Responses and Morphological Characterization in Experimental Animal II. Activities of Serum Hepatic Enzyme and Histological Findings between Apoptosis and Hepatic Tumorigenesis

Chung-boo Kang¹, Woo-song Ha*, Soo-dong Kwak and Chi-kyeong Kim
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University (Institute of Animal Medicine)
*College of Medicine, Gyeongsang National University

ABSTRACT : Hepatic tumorigenesis was induced by ad libitum feeding of diethylnitrosamine (DEN) only. We could also observe hepatic tumor induction in 100% of DEN treated rats without any other cocarcinogen. The liver specific enzyme activities (AST, ALT, ALP, γ -GTP) were significantly increased ($P < 0.05$) in all treated groups compared to control and induced apoptosis groups. In histopathological analysis, the altered foci, hyperplastic nodules, neoplastic nodules, adenomas and carcinomas were observed in liver tumors induced by administration of DEN in rats. Lipopolysaccharide-induced apoptosis in D-galactosamine sensitized mice was investigated in hepatocytes in vivo. Typical morphological changes of apoptosis were detectable in liver 12 hr and 24 hr after the injection of Lipopolysaccharide (5 μ g) and D-galactosamine (20 mg) to mice. It was suggested that organ specific enzyme activities and morphological findings might be very useful for understanding the role of hepatic tumorigenesis including the apoptotic cell death.

Key words : D-galactosamine, Lipopolysaccharide, apoptosis, diethylnitrosamine, hepatic tumorigenesis, serum enzyme activities, 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 ladder현상이 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 있다^{2,4}.

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

¹Corresponding author.

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^{9,21-22}.

Tumorigenesis와 apoptosis의 근원적인 mechanism 규명을 위하여 tumorigenesis의 발현확립을 위한 방편으로 실험동물(Sprague-Dawley strain rat)에서의 특징적인 hepatoma발현^{8,15,23-24}과 apoptosis 유도에 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 이들에 대한 체계적이고도 지속적인 연구를 위하여 실험 모델의 개발이 무

엇보다도 시급하나 이들 연구의 대부분은 동물에서의 독성 실험, 그리고 cell line을 이용하거나 인체암 환자에서의 제2상 및 제3상 임상실험을 하여 연구하는 방법 외에는 흡족한 방법이 없는 실정에 있어 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^{4-5,9,15-16,18-19,24,29} 최근에는 DEN투여에 의한 방법이 주로 활용되고 있음은 이미 밝힌 바 있다^{8,38}.

실험동물중에서 특히 mouse 및 rat은 수명이 짧아 단기간에 초기의 DNA變化로 부터 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.

DEN은 단독투여^{8,40}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^{8,11,15-16,18-19}. 특히 최근에는 DEN을 1회 투여하고 부분 肝 절제술을 실시하여 肝癌을 誘發 시키는 방법도, 또한 발암물질에 의하여 유도된 변이세포내의 각 酵素 活性度の變化가 초래됨이 밝혀지면서 이들 세포내 크론성 증식으로 나타나는 여러종류의 酵素 活性度の 정량적 분석 역시 매우 의의가 큰 것으로 받아들여지고 있다¹³.

DEN은 생체내에서 吸收된후 肝에서 alkyhydroxylation 되어 肝세포내의 RNA에變化를 일으킴으로써 肝癌을 誘發하는 것으로 생각¹²되고 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變化를 초래하여 생기는 결과로 인정되기에 일련의 과정에 대한 체계적인 검색이 필요함을 절감하지 않을 수 없다²¹.

본 연구에서는 이미 실시하고 있는 부분적 肝절제, 또는 發癌촉진제를 따로 투여하지 않고 자연상태의 조건에 가장 알맞는 모델을 개발코져 8주령된 sprague-Dawley strain을 이용 0.01%농도의 DEN을 함유한 음수를 6주에서 14주 동안 투여한 發癌모델과 apoptosis유도³⁷에 이어 apoptosis의 관련 발현인자의

검색, 나아가서는 항암제의 효과를 검정하거나 신개발 될 수 있는 항암제의 항암효과를 평가하는 모델로도 이용코져 특히 혈청간효소 활성치의 검색과 동시에 발암과정에서의 형태학적 변화와 동시에 유도된 apoptosis에 대한 형태학적 특징에 대한 검색을 동시에 실시토록 하였다.

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 전문사육업체에서 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, 예비실험 후 사용하였다.

Balb/c mouse에서의 Apoptosis의 유도

Balb/c mouse의 *in vivo* 상태에서의 간세포에서의 apoptosis 유도조건에 대한 예비실험결과 LPS와 D-galactosamine의 동시투여에 의한 apoptosis발현을 입증하여 LPS와D-galactosamine 투여에 의한 유도를 실시하였다. 실험동물로는 순종의 Balb/c mouse를 대상으로 하였다.

실험에 사용한 D-galactosamine(Sigma)의 투여용량은 개체당 20 mg이었으며 투여방법은 복강내 투여를 실시하였다. 이렇게 D-galactosamine에 감작시킨 마우스의 복강에 LPS 5 µg을 투여하였다. 이때의 LPS (Sigma)는 Escherichia coli serotype O111:B4를 사용하였다.

주령별로는 6주령에서 부터 8주령을 사용하였으며 LPS와 D-galactosamine 투여후 6, 7, 12, 24시간에 부검을 실시하여 간조직을 채취함으로써 시간경과별에 대한 검색을 실시하였다. 대조군은 saline을 투여하여 실험군과 비교하였다.

Rat에서의 hepatic tumorigenesis 및 apoptosis의 유도

본 실험은 예비실험결과에 근거하여 diethylnitrosamine (DEN) 단독 투여 실험에 있어 11-13주에 걸쳐 發癌이 가장 왕성히 진행된다는 이전의 방법들과 비교하

기 위해 11주에서 13주령 DEN투여군은 각각 12~15마리를 실험하였고, 나머지 6주령에서 10주령, 그리고 14주령에서는 5마리에서 6마리를 실험하여 각 주령간의 發癌 과정을 관찰, 구체적인 사항은 강 등의 방법과 같이 하여 실시하였다³⁸.

혈액샘플의 채취(mouse, 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°C에 보존하여 사용하였다.

실험군 설정 및 시료 채취

본 연구진이 이미 밝힌 결과³⁸에 근거하여 DEN 단독 투여에 의한 간암의 다단계 발생과정 실험군은 DEN 투여 11주~13주까지는 12~15마리를, 6주에서 10주까지는 5마리를, 14주까지의 투여군은 5~6마리를 사용하여, 대조군은 10마리를 사용, 순수 음수만으로 공급하여 각 주령별 발암진행과정 및 형태학적 관찰을 실시하였다. DEN의 음수 농도는 0.01%로 하였다. 채혈은 가벼운 ether마취 하에 안와정맥을 heparinized capillary tube로 채혈한 다음 즉시 원심분리하여 분석을 실시하도록 하였다. 즉시 분석 못한 경우의 샘플은 분석 전까지 -28°C에 냉동 보관하였다.

임상증상 및 혈청효소 활성치

임상증상에 있어서는 전반적인 외관, 행동, 식욕, 음수량 및 배뇨량에 초점을 두어 매시 관찰하였다.

혈청 효소 활성치 측정은 예비실험 결과에 근거하여 aspartate aminotransferase(AST)와 alanine aminotransferase(ALT)는 Reitman-Frankel변법으로, alkaline phosphate(ALP)는 Kind-King변법으로, γ -glutamyl transpeptidase(γ -GTP)는 Orłowski변법으로 각각 측정하였다.

형태학적 관찰

DEN을 장기간 투여한 그룹별 rat를 ether로 마취하고 개복하여 4% neutral buffer paraformaldehyde로 관류 고정하고, 肝과 다른 복강 장기를 관찰한 후 각 장기를 채취하여 10% 중성 formalin액에 재고정하여 통상적인 방법과 같이 paraffin 포매된 조직절편을 4-5 μ m 두께로 박절한 후 組織標本을, 일부 조직은 hematoxylin-eosin 染色을 실시, 광학현미경으로 관찰, 검색하였다.

LPS와 D-galactosamine 동시투여 후 마우스 간조직에 대한 apoptosis 발현검색을 위한 조직표본 작성은 기본적으로는 rat에서와 같은 방법으로 처리하여 형태학적 특징에 대한 검증을 실시하였다.

통계 처리 방법

대조군과 각 시간별에 따라 나는 군들 사이의 결과치는 평균치와 표준 오차로 표기(mean \pm SE)하고 이들의 차이에 대한 통계 처리는 Duncan의 다중 범위 검정(Duncan's multiple range test)을 이용한 분산 분석(ANOVA)을 시행하여 통계적 차이를 검증하였다.

결 과

임상증상

發癌劑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 8주령이 경과하면서 부터 조금씩 감소하기 시작하여 10주령 이후에서는 10 ml 정도로 음수량의 감소가 있었다.

사료 섭취량도 DEN 투여후 7~9주령이 경과하면서 조금씩 감소하다가 DEN 투여후 12주령 이상에서 거의 절반 정도로 감소, 1일 오줌 배설량은 DEN 투여 주령이 경과할수록 개체에 따라 감소는 있었으나 큰 차이는 발견되지 않았다. 發癌劑를 투여하지 않고 같은 조건으로 사육한 대조군에서는 다른 증상은 인정되지 않았다.

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 자체별로는 유의한 차이가 없었다.

Apoptosis 유도군에서의 체중 및 간 중량의 변화는 인정되지 않았다.

血清 肝酵素 活性値의 변화

Aspartate aminotransferase(AST) 活性値: DEN을 계속 투여한 군의 각 주령별 AST 酵素活性値는 투여하지 않은 대조군의 45.96 \pm 1.17(IU/ml)에 비해서

Table 1. Changes of AST activity in DEN administrated rats and induced apoptosis mice

Duration of treatment (weeks)	No. of used	Activity (IU/ml)
0*	10	45.96± 1.17
11	12	127.17±56.30**
12	15	105.88±19.73**
13	12	107.80±39.26**

*Apoptosis group

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

유의하게 증가되어 있고(p<0.05), DEN 투여 11주령군에서는 127.17±56.30(IU/ml)으로 가장 높게 증가되었다. 11주령군 이후의 DEN 투여군은 다소 감소하였지만 각 주령별 사이에서의 변화에서 유의한 차이는 인정되지 않았다(Table 1).

Apoptosis 유도군에서의 변화는 대조군과 같았다.

Alanine aminotransferase(ALT) 活性值: DEN을 계속 투여한 11주령군에서 ALT 酵素活性值가 49.73±2.53(IU/ml)으로 최고치로 증가되었고, 대조군의 25.40±2.45(IU/ml)에 비해서 유의하게 증가(p<0.05), DEN 투여후 12주령군에는 33.99±3.22(IU/ml)로 11주령군에 비해 유의하게 감소하였고, 13주령군에는 12주령군과 비슷한 活性值를 보였다(Table 2).

Apoptosis 유도군에서의 변화는 대조군과 같았다.

γ-glutamyl transpeptidase(γ-GTP) 活性值: γ-GTP 酵素活性值는 대조군의 37.24±19.22(IU/ml)에 비해서 투여군의 11주령군에서 부터 71.67±21.51(IU/ml)로 나타나 각 주령별 活性值는 유의하게 증가되으나(p<0.05), 각 주령군별 간의 뚜렷한 차이 없이 일정한 수준으로 활성치가 유지되었으나 apoptosis 유도군에서의 변화는 볼 수 없었다.

組織學的 所見

각 주령별 DEN투여군 肝組織의 광학현미경하의

Table 2. Changes of ALT activity in DEN administrated rats and induced apoptosis mice

Duration of treatment (weeks)	No. of used	Activity (IU/ml)
0*	10	25.40±2.45
11	12	49.73±2.53**
12	15	33.99±3.22**
13	12	34.67±2.48**

*Apoptosis group

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

Table 3. Changes of γ-GTP acitivity in DEN administrated rats and induced apoptosis mic

Duration (weeks)	No. of used	Activity (IU/ml)
0*	10	37.24±19.22
11	12	71.67±21.51**
12	15	67.78±28.52**
13	12	71.99±36.94**

*Apoptosis group

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

組織學的 소견은 肝小葉中心部 또는 周邊部の 靜脈과 洞樣血管의 확장, 그리고 大小不同의 多 형태성 肝細胞內의 核은 好염성 核小體의 증대 및 농축과 有絲分裂像, 細胞質의 顆粒性 호산성 염색, 空胞變性이 주요 소견이었다. 肝組織의 變性和 壞死와 增殖이 진행되는 變性된 病巢(增殖性 結節) 부위에는 肝腫瘍 病巢의 전구 단계인 增殖性的 작은 圓形細胞 集團의 출현으로 肝腫瘍의 소견을 관찰할 수 있었다.

DEN을 투여한 각 주령별 肝組織 소견에서는 洞樣血管의 확장은 투여후 10주째는 일부 소수의 간소엽 주변부에서, 11주령군에서는 더 진행되어 다수의 간소엽 주변부로 血管 확장이 나타났으며, 12주, 13주령 이상 투여군에서는 全 小葉으로 확대되어 관찰되었다(Fig 1, 4).

肝細胞의 空胞變性은 10주째는 일부 소수 간소엽에서 限局性으로 관찰되었으나 11주째부터 대다수의 간소엽 중심대와 주변대 門脈부위에 다형의 많은 수의 공포가 집단적으로 관찰되었고, 시일이 경과될수록 전 간세포에 미만성으로 증가하였고 13주째에는 대부분의 간세포들은 세포질내에 大小不同의 多 형태

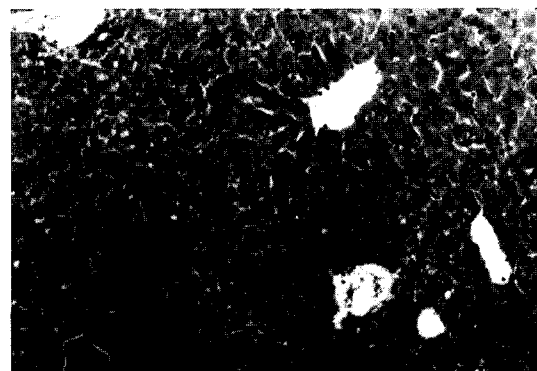


Fig 1. Numerous apoptotic hepatocytes with condensed apoptotic bodies are seen in the liver at 24 hrs after D-galactosamine treatment in mouse. H-E. ×50.

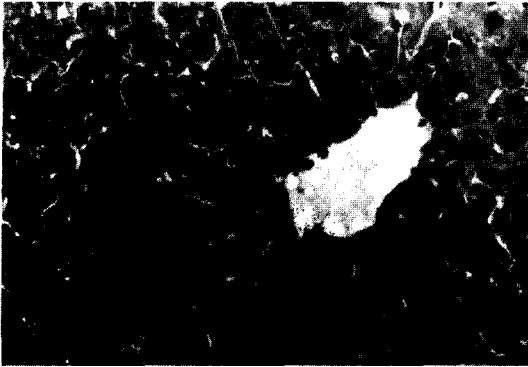


Fig 2. Magnification of central vein area (Fig 1.) Numerous apoptotic hepatocytes with apoptotic bodies or condensed nucleus(arrows) are seen. H-E. $\times 50$.

성 공포를 함유하고 있었다(Fig 1-4).

肝細胞 空胞의 크기와 수가 증가하여 壞死가 이루어진 變性된 結節病巢 부위에서는 增殖性的 작은 새로운 원형세포 집단이 11주째부터 출현하기 시작하였고, 다른 부위에서는 작은 空胞 등이 모여 큰 小胞를 형성, 그 주변부에서는 結合組織이 增殖되어 皮膚이 형성된 增殖性 結節과 肝癌細胞化 段階인 증식

성 작은 원형세포가 출현하기 시작하였다(Fig 2-3).

肝細胞의 변화로는 DEN 투여후 10주째 부터 일부 간소엽을 중심으로 空胞를 가진 肝細胞 變性化로 주위 정상 조직과는 차이가 있었으며 11주령군에는 대다수의 간소엽 중심대와 주변부위에 공포변화에 의한 肝細胞變性이, 12주령 및 13주령 이상의 투여군에서는 全 肝小葉 및 門脈 부위에 미만성 간세포 공포변성 및 괴사 소견이 나타났다.

이상의 간세포는 다형태성으로 대소부동하게 크기의 차이가 많았으며, 空胞變性이 많이 일어나고 있는 부위와 그 주변부의 細胞들은 核과 細胞質은 증대되고 顆粒性으로 好鹽性 또는 好酸性化하였고, 대부분의 핵들은 호염성으로 핵인이 뚜렷하고 농축된 모양으로 치밀하게 보이며 유사분열상을 하고 있었다(Fig 1-4).

DEN을 각 주령별로 쥐에 계속 투여한 결과 간세포 변성을 유도해 간조직에 괴사와 증식이 계속되며 미분화된 증식성 작은 원형세포가 증가된 癌段階의 變性된 病巢, 增殖性 結節, 新生物性 結節이 나타나 肝腫瘍 소견을 관찰할 수 있었고, 대조군의 간조직 소견은 정상적으로 특이한 병변을 관찰할 수 없었다.



Fig 3. Numerous vacuoles (arrows) are seen on the mid-zonal area of hepatic lobules. Hepatocytes with eosinophilic cytoplasm and nucleus with prominent basophilic nucleoli are seen in rat liver treated with DEN for 11 weeks. H-E stain, $\times 200$.

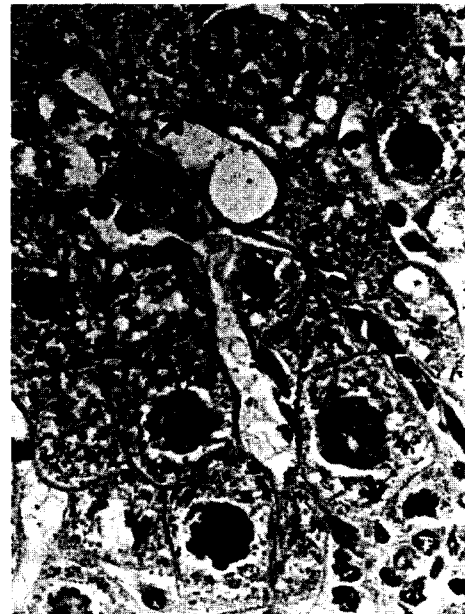


Fig 4. Large and polymorphological hepatocytes with eosinophilic cytoplasm and densely basophilic mitotic nucleus or proliferative small round cells (arrows) are seen at areas on the peripheral area in a lobules of rat liver treated with DEN for 11 weeks. H-E stain, $\times 500$.

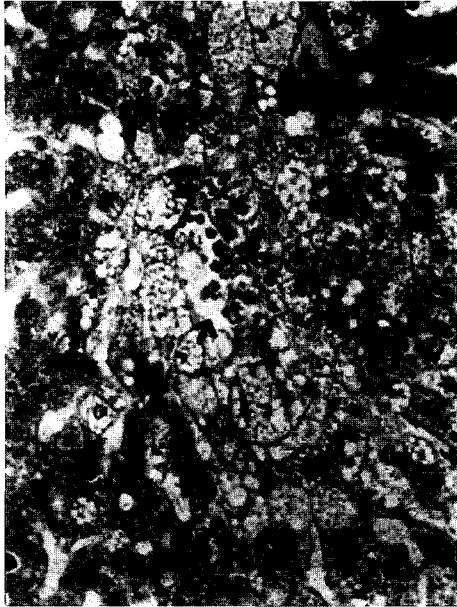


Fig 5. Several proliferative small round cells (arrows) on the vacuolated and necrotic areas are seen in a hepatic lobule of the rat liver treated with DEN for 13 weeks. H-E stain, $\times 200$.

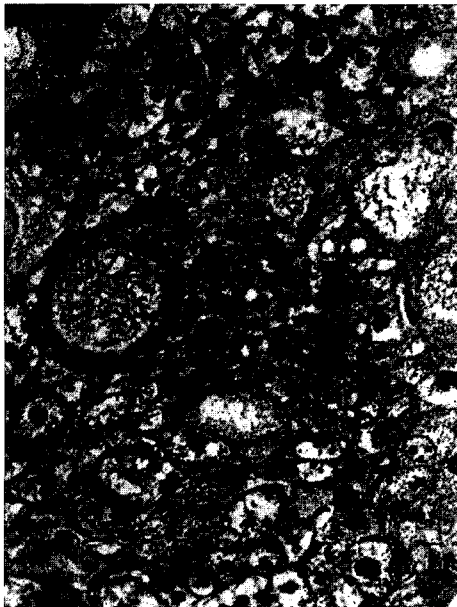


Fig 6. Vacuolated small or large polymorphological hepatocytes with eosinophilic cytoplasm and nucleus with prominent nucleus or mitotic figures are seen in a hepatic lobule of the rat liver treated with DEN for 13 weeks. H-E stain, $\times 200$.

BALB/c mouse의 간조직에서의 apoptosis 발현

LPS와 D-galactosamine을 투여한 마우스의 간조직의 투여시간에 따른 apoptosis 발현은 투여후 6시간과 7시간에는 간세포의 변화의 소견이 거의 없어 정상 간세포와 같았으나 12시간에는 일부개체에서 간세포의 세포질의 호산성 농축소견과 kupffer cells의 핵농축소견이 나타났다. 24시간에는 대부분의 개체에서 핵 chromatin의 농축치밀, 핵분절(nuclear fragmentation), 세포질의 농축, 핵주변에 bleb형성과 돌출, apoptotic bodies 등과 같은 apoptosis의 전형적인 형태학적 소견들을 볼 수 있었다(Fig 5, 6).

고 찰

發癌物質의 일종인 DEN을 투여하였을 때 나타나는 간에서의 특징적 소견에 해당되는 괴사(necrosis) 및 증식(hyperplasia)과 과호염기성(hyper basophilia), 그리고 종양(tumor)은 cytochrome p450에서 生活化(bioactivation)되어 smooth endoplasmic reticulum이 많은 中心靜脈주변에 괴사를, 나아가 脂肪症(steatosis)을 誘發시킴이 알려져 있으나^{12,15} 종양세포 형성의 초기 진행과정은 매우 빨라서 배양세포에서는 DEN 투여후 24시간 이내에 일어나 검증에는 어려움이 많고 더욱이 생체내 실험에서의 초기과정에 대한 검증은 거의 없는 실정에 있다.

血清 肝 酵素 活性値는 대부분의 肝毒性 물질 또는 肝癌 誘發物質 투여에서 처럼 모든 肝酵素 活性値는 대조군에 비해 큰 증가를 나타내었다.

1984년 Simonsen *et al.*²⁵은 肝移植術을 실시한 환자에서 AST, ALT, γ -GTP, ALP 등의 혈청내 효소치 측정으로 간기능 회복 정도의 지표로 하여 肝機能 이상시 이들의 효소가 높은 상승치를 나타낸다고 보고하였다. 1992년 및 1994년에 김 등³⁸⁻³⁹ 및 강 등³⁵ 흰쥐에 사염화탄소를 투여하여 肝細胞 損傷을 誘發시켜 혈청내 AST, ALT, ALP 등의 간 효소 활성치가 크게 증가함을 밝힌 바 있다.

DEN은 원래 강력한 alkylating agent로서 발암성(carcinogenicity)뿐만 아니라 강한 독성을 나타낸다고 알려져 있는데 본 실험에서도 肝細胞 變性 및 變異 등으로 AST, ALT, γ -GTP 효소치가 모두 정상 대조군에 비해 상당히 증가된 결과를 나타내었고 또한 肝炎 등 다른 肝疾患과도 구별되게 상당히 높은 수치로 증가하는 것을 알 수 있었다.

혈중 AST와 ALT의 활성치는 간 손상을 나타내는 지표로서 가장 널리 활용되고 있는데 설치류에서도

이와 같은 경향은 뚜렷하였다. ALT활성치는 간 특이성이 높지만 AST는 간에는 물론 심장, 골격근, 신장 및 뇌에도 분포하고 있어 특이성에서는 고려해 볼 필요가 있었으나 이들의 동시 분석은 의미가 큰 것으로 생각된다. ALT활성치는 AAPH 투여³⁴에서만 이 아니고 chloroform, acetaminophen을 포함한 다른 화학제에 의한 간세포의 괴사에서도 상승하는 것으로 알려져 있어 진단지표상 신중을 요하나 AST활성치는 투여후 2시간 이후부터, ALT활성치 역시 투여후 2시간 이후부터 지속적인 증가를, 48시간째에는 검출한계에 이르러 여기에 대한 보다 더 정확한 검증을 위해서는 병리조직학적인 검색이 수행되어야 할 것으로 판단된다^{13-14,30}.

ALP활성치는 골질환, 간 및 담도질환 중 특히 폐쇄성 황달 즉 담즙정체를 알려주는 민감한 검사법으로 본 실험에서도 투여후 4시간까지에서는 큰 변화를 나타내지 않아 담즙정체와는 무관한 것으로 생각된다. 투여후 8시간 이후부터는 지속적인 증가를 나타내어 간세포의 이물 처리능력이 크게 저해되고 있음을 알 수 있었다³⁸⁻³⁹.

ALP 역시 isozyme에 따라 임상적 의의가 달라 肝外性 폐쇄성 황달 등의 중요한 지표로 나타내어 ALP1 isozyme을 포함한 분석이 있어야 될 것으로 생각된다³⁵⁻³⁶.

γ -GTP활성치는 보고자에 따라 차이가 있으나 ALP활성치와 마찬가지로 급성간염에서는 물론 만성 간염에서의 진단가치도 높은 것으로 생각되며 본 연구 결과에서도 지속적인 상승을 나타내어 진단적 가치가 매우 높은 것으로 판단되어 앞으로는 free radical의 정량과 동시에 이들에 대한 체계적인 분석으로 생체에 미치는 영향을 구체적으로 규명해야 될 것으로 판단된다³⁵⁻³⁶.

肉眼的 觀察을 통한 臨床症狀의 變化로는 9주령을 기점으로 하여 쥐의 體重 및 간 중량의 감소, 음수·사료 섭취량이 감소하였으며, 쥐의 被毛가 거칠어지고 일부에서 脫毛 症狀이, 부검시 변연부 간표면의 종대와 腫瘍 結節組織의 형성이 10주령에서부터 뚜렷하게 관찰되었으며 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.

LPS와 D-galactosamine 투여전의 정상 상태의 마우스와 LPS와 D-galactosamine 투여 후 apoptosis가 유도된 그룹간에서의 임상증상의 차이, 간 특이효소

활성치의 변화는 볼 수 없어 DEN 투여에 의한 hepatic tumorigenesis와는 전혀 다른 기전에 의함을 알 수 있었다.

또한 1964년 Golblatt¹⁰는 aflatoxin B₁은 쥐에서는 간문맥주위에 壞死를 일으키고, mouse에서는 percentral necrosis를 유발한다고 하였다.

본 실험에서도 DEN에 계속 노출된 간조직의 초기 변화에서 소엽중심부의 간세포에서 변성이 주로 많이 나타났다.

肝癌의 組織病理學的 소견으로 변성된 간세포의 癌形成은 肝癌發生 전에 전구암(precursors)상태로 존재한다. 이러한 전구암들은 Farber 등은 變性된 病巢, 增殖性 結節, 新生物性 結節이라 하였다⁷.

DEN을 투여한 동물의 간세포의 공포화에 관해서 1989년 Dunsford *et al.*⁵는 5주째부터 공포성 간세포들의 병소가 출현하여 9주째는 증가되었다고 하였다. 본 연구에서 간세포의 공포화는 10주째는 소수의 간소엽의 주변부에서 출현, 11주째는 전소엽에 발생하였으며 주로 주변대와 중심대에 집단적으로 발생하였고, 어떤 부위는 작은 소포가 형성되었고, 13주째는 거의 모든 간세포들에서 공포화가 발생되었고 또 더 진행되고 있었다.

간세포의 핵의 변화에 관해서는 1994년 Tamono *et al.*²⁹은 소엽중심부 간세포의 핵과 세포질은 큰 다형세포들이 나타났다고 하였다. 본 실험에서는 發癌劑 투여후 10주째 부터 核과 好酸性 細胞質은 증대되고 核은 好鹽性 核小體가 뚜렷하고, 또한 농축되었으며 유사분열상을 나타내었으나 주령이 경과할수록 간세포 변성과 괴사, 증식 소견이 뚜렷하였고 이런 病巢部位에 癌細胞가 발생하는 현상이 일어났다.

DEN 투여에 의한 肝癌 小結節(결절성 병소)의 발생시기와 組織學的 소견에 관해서는 Dunsford *et al.*⁵은 다양한 腫瘍小節이 형성되고 이 小結節은 卵圓形의 세포들의 增殖이 현저하였는데, 이를 肝癌細胞의 전구세포라고 하였다. 이러한 소절들은 11주째에 인정되었고, 13주째에는 모든 쥐의 간조직에서 발생이 관찰되었다고 하였다. 1992년 이 등⁴⁰은 10주째에 지주조직이 형성되고 간세포의 크기가 다양하였고 발생하는 종양세포는 방추형의 긴핵을 가진 세포들이 도서상으로 존재함을 밝힌 바 있다.

본 연구에서는 11주째에 空胞의 수와 크기가 증대되어 壞死가 이루어진 부위에서나 또는 큰 소포의 增殖性 結節 주변에 새로운 증식성 작은 원형의 세포 집단이 출현하기 시작하여 앞서 언급한 소견과 같은 이유에 근거하여 惡性癌의 전구세포로 간주하

였다.

실험동물에서의 apoptosis 유도제로는 D-galactosamine, Lipopolysaccharide, Lipopolysaccharide와 D-galactosamine의 동시투여 및 TGF- β , TNF- α , Fas antigen 등이 알려져 있다²⁵. 1997년 Shigeki Tsutsui *et al.* 등²⁵은 mice에 D-galactosamine 1.5 g/kg을 복강내 투여시 48시간 후에 apoptosis의 증거인 acidophilic bodies와 TUNEL positive cell들이 현저하게 나타났으며 3 g/kg 투여시는 24시간째에 acidophilic bodies와 TUNEL positive cell들이 뚜렷이 관찰되었다고 하였다. 또한 1997년 Shigeki Tsutsui, Kensuke Hirasawa *et al.* 등²⁶은 *in vitro*상의 hepatocyte에 D-galactosamine을 투여하였을 때 10 mM의 D-galactosamine에 24시간, 20 mM D-galactosamine에 12시간에서 cytoplasmic condensation, bleb형성을 보고한 바 있다.

1996년 Akiko Morikawa *et al.* 등¹은 5 μ g의 LPS와 20 mg의 D-galactosamine을 동시에 투여한 후 7시간이 경과가 되면 liver에서 apoptosis가 일어난다고 보고하였다. 본 실험에서는 5 μ g의 LPS와 20 mg의 D-galactosamine을 동시에 투여하였을 때 7시간에서는 apoptosis의 소견이 거의 없이 정상과 같이 나타났고 12시간과 24시간에서 apoptosis의 전형적인 형태학적인 소견인 핵분절(nuclear fragmentation), 세포질의 농축, 핵 주변에 bleb 형성과 돌출 및 이로 인한 apoptic bodies 형성들이 많이 관찰되었다.

이로서 DEN 투여에 의한 hepatic tumorigenesis과정에 대한 생체반응과 D-galactosamine에 의한 마우스 간세포의 apoptosis 발현과는 관련이 없음을 알 수 있었으나 D-galactosamine으로 유도된 간조직의 hepatotoxicity에 대한 체계적인 검색으로 D-galactosamine에 의한 hepatotoxicity와 apoptosis 사이의 관계에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

결 론

BALB/c mouse의 *in vivo* 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 있음이 밝혀졌다.

Sprague Dawley strain rat를 사용하여 발암제인 DEN을 경구투여 하지않은 대조군과 DEN을 계속적으로 경구로 음수시켜 간종양을 유발시킨 실험군에서의 육안적인 관찰(임상증상), 체중 및 간중량 측정

에서 DEN을 투여한 7주령 이후의 쥐에서는 약간의 행동둔화, 탈모, 음수량 감소, 사료 섭취량 감소, 체중 및 간중량 감소등의 소견들이 관찰되었으나, 이외의 다른 특이한 임상증상은 나타나지 않았다.

간특이효소인 AST, ALT, ALP, γ -GTP 활성치는 대조군에 비해서 DEN 투여군에서 증가하였고, AST 활성치가 다른 효소활성치에 비해 더 높은 수치를 나타내었다($p < 0.05$).

LPS와 D-galactosamine 투여에 의한 apoptosis유도군에서는 각종 임상증상, 간 특이효소 활성치는 대조군과 차이가 없었다.

DEN을 투여한 실험군에서 10주령 이후 간의 변연부에 주로 집중하여 간종대와 증식성 결절의 종양이 발생되었고, 간표면은 둔탁하고 경화되었으며 주령이 경과될수록 간 전반에 큰 종양을 관찰할 수 있었다.

광학현미경 검사 소견에서는 간소엽 중심부와 주변부의 정맥과 동양혈관의 확장과 공포변성이 주요 소견이었고, 11주령부터 대부분의 간세포들은 대소부동한 다형태성으로 공포가 많이 나타났고, 간세포핵은 증대되어 핵소체가 뚜렷하고 또한 호염성으로 농축되고 유사분열하고 있는 양상을 관찰할 수 있었다.

DEN을 투여한 11주령 이상에서부터 간소엽 주변부의 공포변성과 세포괴사가 진행되고 결합조직이 피막을 형성한 결절 부위에 미분화된 작은 원형세포 집단이 관찰되어 DEN은 강력한 간 발암물질임이 확인되었다. 동시에 체중 및 간중량 감소와 간특이효소 활성치의 증가는 간종양의 임상진단 지표자료로 활용이 가능하며, 간조직검사에서 DEN의 계속적인 투여로 일정기간 경과후 간세포 변성 소견과 결절성 병소 주위에 증식성의 작은 원형세포 집단의 관찰로 암진행 단계인 변성된 병소, 증식성 결절, 신생물성 결절 및 간암의 소견이 관찰되었고 LPS와 D-galactosamine 동시투여에 의한 apoptosis 유도군은 대조군과 비교하여 임상증상이나 간표면의 변화는 물론 성별에 따른 차이 또한 인정되지 않았다. 주령은 6에서 8주령에서 발현이 잘 되었으며 LPS와 D-galactosamine의 동시투여에 의한 마우스 간세포에서의 apoptosis 발현을 볼 수 있어서 투여후 12시간, 24시간에서 뚜렷한 핵 chromatin의 농축, 핵분절, 세포질의 농축, apoptotic bodies의 전형적인 소견이 입증되어 여기에 대한 연구는 hepatic tumorigenesis 관련 연구에는 물론 apoptosis의 발현기전 연구에도 크게 기여될 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Akiko Morikawa, Tsuyoshi Sugiyama, Yutaka Kato, Naoki Koide, Guo-Zhi Jiang, Kazuko Takahashi, Yasuhiko Tamada, Takashi Yokochi. Apoptotic cell death in the Response of D-Galactosamine-Sensitized Mice to Lipopolysaccharide as and Experimental Endotoxic Shock Model. *Infection and Immunity*. Mar. 1996; 734-738.
2. Cohen JJ, Duke RC. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 1987; 132: 38-42.
3. Cohen JJ, Duke RC. Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol* 1991; 50: 55-85.
4. 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.
5. Dunsford HA, Karnasuta C, Hynt JM, *et al.* Different lineage of chemically induced hepatocellular carcinoma in rat defined by monoclonal antibodies. *Cancer Research* 1989; 4894-4900.
6. 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.
7. Farber E. Possible etiologic mechanisms in chemical carcinogenesis. *Exp Health Perspectives* 1987; 75: 65-70.
8. Fontaniere, Daoust R. Histochemical studies on nuclease activity and neoplastic transformation in rat liver during diethylnitrosamine carcinogenesis. *Cancer Res* 1973; 33: 3108-3111.
9. Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad sci USA* 1979; 76: 939-943.
10. Goldbalatt LA. Aflatoxin : Scientific Background. Control and Implications. New York. Academic Press. 1964.
11. Goldstein P, Ojeius DM, Young JDE. Cell death mechanisms and the immune response. *Immunol Rev* 1991; 121: 29-65.
12. 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.
13. Hirota N, Williams GM. Hepatotoxicology : Assesment of hepatocarcinogenesis by early indicators. CRC Press Boca Raton Ann Arobor Boston London. 1991; 593-620.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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. *JCNI* 1987; 79: 1123-1129.
20. 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.
21. Piot HC, sirica AE. The stage of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Bio chem Biophy Acta* 1980; 605: 191-215
22. Rogers AE, Zeisel SH, Groopman J. Diet and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1993; 14: 2205-2217.
23. Scherer E. Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis. *Biochemica Biophysica Acta* 1984; 738: 219-236.
24. Seawright AA, Hrdlicka J. The effect of prior dosing with phenobarbitone and diethylaminoethyl diphenylpropyl acetate (SKF 525-A) on the toxicity and liver lesion caused by ngaione in the mouse. *Br J Exp Pathol*. 1972; 52: 242-252.
25. Shigeki Tsutsui, Kensuke Hirasawa, Makio Takeda, Shin-ichi Itagaki *et al.* Apoptosis of Murine Hepatocytes Induced by High Doses of Galactosamine. *J. Vet. Med. Sci.* 1997; 59(9): 785-790.
26. Shigeki Tsutsui, Kensuke Hirasawa, Makio Takeda, Shin-ichi Itagaki *et al.* Galactosamine-induced apoptosis in the primary mouse hepatocyte cultures.

- Exp Toxic Pathol. 1997; 49: 301-306.
27. Simonsen R, Virji MA. Interpreting the profile of liver-function tests in pediatric liver transplants. *Clinical Chemistry* 1984; 30: 1607-1610.
 28. Solt DB, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 1976; 263: 702-703.
 29. 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 phentobital. *Carcinogenesis*, 1994; 15: 1791-1798.
 30. 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.
 31. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides-extraction with phenol water and further application of the procedure. *Methods Carbohydrate Chem* 5: 83-91.
 32. Wyllies AH, Ker JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
 33. 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.
 34. 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.
 35. 강정부, 이은석, 허주형. 사염화탄소(CCl₄)의 투여가 쥐의 간 기능에 미치는 영향. 2. 혈청 효소 활성치. *한국임상수의학회지*. 1997;14(2):273-278.
 36. 강정부, 김철호, 손호상. 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)의 투여가 쥐의 간 기능에 미치는 영향. 2. 혈청효소활성치. *한국임상수의학회지* 1998; 15(1): 79-82.
 37. 강정부, 하우송, 곽수동, 김지경. 실험동물에서 apoptosis의 모델개발과 생체면역반응 I. Apoptosis 및 hepatic tumorigenesis의 유도 및 관련지표의 검색. *한국임상수의학회지* 1999; 16(1): 100-107.
 38. 김길수, 박준형. 사염화탄소에 의한 랫드의 간손상에 미치는 인진호추출물의 영향. *대한수의학회지*. 1992; 32(3): 347-356.
 39. 김길수, 박준형. 사염화탄소에 의한 랫드의 간손상에 대한 인진호메타놀 추출물의 억제효과. *대한수의학회지*. 1994; 34(3): 619-629.
 40. 이해영, 지관자. Diethylnitrosamine에 의한 흰쥐 간 세포의 형학적 변화. *인하대기초과학연구소 논문집* 1992; 13(2): 85-96.