

랫드 전암 간세포의 증식성과 *c-myc*, *ras*의 발현에 관한 연구

조 호 성 · 박 남 용

진남대학교 수의과대학
(1999년 8월 20일 접수)

Studies on the proliferative activity and the expression of *c-myc* and *ras* of preneoplastic hepatocytes in rats

Ho-seong Cho, Nam-yong Park

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

(Received Aug 20, 1999)

Abstract : This study was carried out to examine proliferative activity and expression of *c-myc* oncoprotein and p21ras in normal and preneoplastic rat livers induced by an *in vivo* mid-term chemical carcinogenesis assay.

Sixty, six-week-old male specific pathogen free Sprague-Dawley male rats were randomly divided into five groups. Group 1 was received a single intraperitoneal(IP) dose(200mg/kg) of diethylnitrosamine(DEN). Group 2(10 rats) was operated partial hepatectomy(PH) and Group 3 was received IP(200mg/kg) DEN, fed two weeks later with 500ppm of phenobarbital(PB). Group 4 was received IP(200mg/kg) DEN, fed two weeks later 500ppm(PB) and PH at week 3 after the onset of experiment. While group 5(20 rats) was not treated and used as a control group. All the rats were sacrificed at age 14 weeks except 10 rats from group 5 were sacrificed at the onset of experiment. Livers of all rats were examined for 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU) incorporation, proliferating cell nuclear antigen(PCNA), silver-binding nucleolar organizer regions(AgNORs) counts per nucleus and expression of *c-myc* oncoprotein and p21ras.

Both the number and area of the preneoplastic lesions were significantly($p < 0.01$) compared to other groups. A significant($p < 0.01$) increase in immunoreactive cells were detected in preneoplastic hepatocytes in Groups 3 and 4 by PCNA and BrdU immunohistochemical stain. The number of the positive cells were significantly($p < 0.05$) lower in normal 14-week-old rats than those of 6-week-old rats. The results showed that proliferative activity of the hepatocytes was increased by treatment with DEN, PH and PB. Meanwhile, AgNORs counts per nucleus were significantly($p < 0.05$) increased in the preneoplastic hepatocytes of rats in both groups 3 and 4.

The expression of *c-myc* oncoprotein and p21ras were more readily localized within the

hepatic preneoplastic lesions such as hyperplastic nodules. Especially, group 4 showed significantly ($p < 0.05$) overexpressed levels compared to groups 1 and 3.

These findings suggest that PCNA, BrdU and AgNORs are significantly increased and *c-myc* oncoprotein and p21ras are significantly overexpressed in hepatic preneoplastic lesions induced by mid-term carcinogenesis. So these parameters can be an effective markers for hepatic preneoplastic lesions.

Key words : chemical hepatocarcinogenesis, BrdU, PCNA, AgNORs, *c-myc*, p21ras.

서 론

인간은 매일 수많은 화학물질에 노출되고 있으며 이들 가운데는 발암물질이 포함되어 있을 가능성이 높다. 특히 간은 다양한 외인성 화학물질을 대사시키는 효소의 활성이 높아서 화학물질에 의한 영향을 가장 크게 받는 장기로 알려져 있다^{1,2}. 실험동물에서 발암성이 확인된 65종의 물질을 분류해본 결과 간을 표적장기로 하는 경우가 52%로 가장 많았고 전위 23%, 유선 및 폐 각각 22%, 비강 14% 그리고 방광이 12% 였다고 보고한 바 있다³. 이러한 이유로 간을 대상장기로 암발생억제 또는 촉진물질의 검색연구^{3,4} 및 이의 실험법 확립에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다⁵.

특히 국제적으로 화학물질에 대한 간 발암성 평가는 랫드의 전암병변 평가법이 이용되고 있는데 전암병변으로 알려져 있는 증식소 및 결절만을 특이적으로 인지하는 효소인 glutathione S-transferase placental form(GST-p)을 면역조직화학 염색한 다음 화상분석기로 질량 및 통계 분석하는 방법이다⁶. 간에 대한 전암병소 및 결절을 유발하기 위하여 간암 유발물질로 diethylnitrosamine(DEN)을, 유발된 전암세포의 촉진과정을 위하여 phenobarbital(PB)의 사료내 투여 그리고 간 부분절제술(partial hepatectomy; PH)을 각각 처리해주는 Ito *et al*⁶의 모델이 많이 이용된다. 이와같은 방법은 많은 시험물질의 간 발암성을 단기간에 검색할 수 있어서 2-3년씩 걸리는 장기 발암성 시험의 시간적, 경제적 단점을 보완하고 다량의 시험물질에 대한 효과 및 정보를 단기간에 평가할 수 있는 장점을 가지고 있다.

발암기전중 잘 알려진 다단계작용 가설에 기초를 둔

실험적 랫드 간암의 발생기전은 대체로 3단계로 구분되고 있다. 즉, 표적세포가 유전독성 발암물질에 의해 비가역적 DNA 변화와 Phase I 효소의 억제 및 Phase II 효소의 증가 등 유전적 변이를 획득하여 암 유발세포로 변하는 유발단계와 다양한 발암촉진제에 의해 유발된 암세포의 선택적 증식이 일어나 암 전단계인 결절로 증식하는 촉진단계 그리고 간 결절이 간암으로 발전되기 위한 적당한 시간이 필요한 진행단계이다^{7,8}.

또한 세포의 증식에 관한 검색 특히 DNA 합성기(S phase) 세포의 동정 및 그 동태(kinetics) 해석은 암의 기전연구, 치료 및 예후판단에 중요한 단서가 되고 있다. 세포의 증식정도를 직접 또는 간접적으로 알아보기 위해 현재 사용되는 방법들은 광학현미경하에서 유사분열의 수를 세는 방법⁹, thymidine labeling index¹¹, bromodeoxyuridine incorporation¹², Ki-67 항체를 이용한 면역효소 염색법^{13,14}, proliferating cell nuclear antigen(PCNA) 발현정도¹⁵, nucleolar organizer regions의 측정¹⁶ 그리고 DNA flow cytometry 등¹⁷이 있다. 이들 항체를 특히 BrdU, PCNA 그리고 핵단 AgNORs의 수 평가 등은 증식단계에 있는 세포의 검출률이 높고 결과의 재현성이 좋으며 간단한 염색방법에 의하여 확인이 가능한 것으로 알려져 있어, 본 연구에서 간세포 증식성 평가를 위하여 이용하였다.

발암 유전자들은 세포의 분열과 분화과정을 조절하며 다양한 세포와 조직에서 종양과 관련된 것은 물론이고 정상조직에서도 발현되는 것으로 알려져 왔다^{18,19}. 본 실험에서 이러한 특성을 가지고 있는 대표적 유전자 *c-myc* 과 *ras* family가 정상 간 혹은 전암병변에서의 발현의 변화를 조사하기 위해 *c-myc* oncoprotein에 대한 단클론항체와 pan *ras* 다클론항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 실시하였다.

따라서 본 연구에서는 생체내 증기 간암 유발모델에서 생성되는 전암병변 및 정상 간세포를 대상으로 증식성 지표인자의 증감과 발암 유전자 *c-myc*, *ras*의 발현에 대해 조사하여 이들 항목들이 생체내 간 발암성 평가를 위한 특이 지표인자로서의 활용 가능성을 알아 보고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 5주령, Sprague-Dawley계 수컷 랫드 60마리를 식품의약품안전청 독성연구소 실험동물실에서 분양받아 polycarbonate 케이지에 3~4마리씩 넣어 1주간 사육실내에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험기간동안의 사육조건은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$ 그리고 명암교대 12시간을 각각 유지하였고 사료(진흙사료, 서술)와 음수는 자유로이 급여하였다.

실험설계 및 약물투여 : 실험동물은 Text-Fig 1에서와 같이 총 5개 군으로 나누었다. 제1군은 실험개시일에 간암 유발물질인 DEN(Sigma Chemical Co., USA)을 생리식염수에 녹여 체중 kg당 200mg씩 1회 복강내로 투여하였고 제2군은 DEN 투여없이 3주에 간의 부분절제술(좌우 중심엽 및 좌측외엽)을 실시하였다. 제3군은 실험개시일에 DEN 투여후 3주에 간 부분절제술을 실시하였다. 또한 제4군은 제3군의 처치 이외에 실험 2주부터 8주까지 간암 촉진물질인 PB를 500ppm 농도로 사료와 함께 투여하였으며 제5군은 무처리 대조군으로 사용하였으며 실험개시일인 6주령과 실험종료시인 14주령에 각각 부검

을 실시하였다.

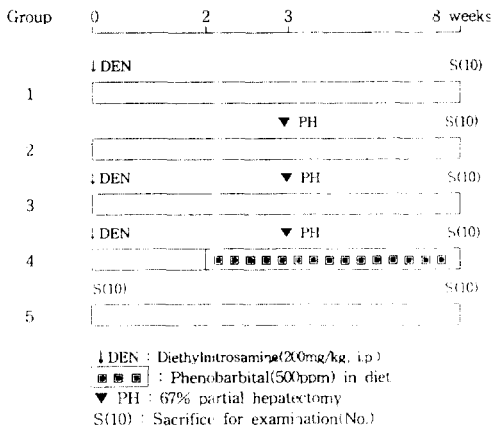
부검 및 병리조직학적 검사 : 검사대상 동물은 24시간 동안 절식시킨 다음 ether 마취후 희생시켜 부검을 실시하였다. BrdU의 간세포내 표지를 위하여 부검 1시간전에 BrdU를 체중 kg당 100mg씩 복강내에 1회 투여한 후 부검을 실시하였다. 부검시 적출된 간은 좌엽, 미상엽 및 중간엽에서 각각 한개씩 trimming하여 10% 중성 완충 포르말린에 24시간과 냉 아세톤에 1주일동안 각각 고정하였다. 통상적인 방법으로 파라핀 포매하고 약 4 μm 두께로 박절하여 H&E 염색을 실시한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 포르말린 고정후 얻은 조직슬라이드는 PCNA, AgNORs, *c-myc* 및 *ras* 염색에 사용하였고 아세톤 고정후 제작한 조직 슬라이드는 GST-p와 BrdU의 염색에 사용하였다.

전암병변의 평가방법 : 전암병변의 평가는 전암병변의 특이 지표 효소인 GST-p의 함체는 나고야시립대학 의학부의 Sato 교수로부터 공급받았으며 면역조직화학 염색후 화상분석기(Color Video Analyzer: OPTOMAX V, Germany)로 직경 0.2mm 이상의 GST-p 양성병소 수와 면적을 분석하였다. GST-p의 양성병소를 확인하기 위하여 avidin-biotin peroxidase complex(ABC) 법을 이용하여 염색²⁰한 다음 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 0.2M PBS, pH 7.4)로 발색시킨 후 hematoxylin으로 대조염색하였다. 염색된 모든 슬라이드는 간의 단위면적당 양성병소의 수와 면적을 화상분석기로 분석하였다.

전암 및 정상 간세포의 증식성 검사 : BrdU, PCNA 그리고 AgNORs를 이용하여 증식성을 평가하였으며 전암병변 부위와 정상부위로 각각 나누어 분석하였다. 전암병변 부위와 정상부위의 구분은 간의 전암병변 특이 지표 효소인 GST-p의 면역조직화학 염색을 통하여 현미경 하에서 평가하였다.

BrdU와 PCNA의 염색은 단클론성 항체(Oncogene Science Co., USA)를 각각 100배 희석하여 ABC 방법에 의해 염색하였고 병변부위와 정상부위로 각각 나누어 200배 현미경 배율하에서 BrdU와 PCNA에 염색된 양성 세포수를 세어서 평가하였다²¹. AgNORs 염색은 포르말린 고정후 준비된 슬라이드를 가지고 one-step silver colloid 방법²²을 변형하여 염색하였다. 핵당 갯수의 평가는 병변부위와 정상부위로 나누어 현미경 1,000배의 배율하에서 각각 200개의 간세포를 대상으로 평가하였다²¹.

발암 유전자 *c-myc*, *ras*의 발현에 대한 조사 : 발암



Text-Fig 1. Design of experiment.

유전자 *c-myc*의 염색은 *c-myc* oncoprotein 단클론 항체 (Cambridge Research Biochemicals, USA)를 100배 희석하고 *ras*의 염색은 *ras* oncoprotein(p21ras)의 다클론 항체 (Cambridge Research Biochemicals, USA)를 1000배 희석하여 ABC 방법으로 수행하였다²⁰. 염색결과는 전암병변중에 각각 *c-myc*, *ras* 양성병소 및 음성병소로 나누어 평가하였는데 즉, 전암병변중 양성세포가 차지하는 비율이 30% 이상일 경우에만 양성병소로 간주하여 발현률을 평가하였다^{23,24}.

자료의 통계처리 : 자료의 통계처리는 Statistical Analysis System(SAS) program을 이용하였다. 각 군간의 자료에 대하여는 ANOVA test를 실시하여 유의성 있는 f 값이 관찰되었을 때 Tukey's Studentized Range(HSD) test를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다.

결 과

육안 및 병리조직학적 관찰 : 부검시 육안적 소견으로 제3군, 4군중 일부의 간표면에서 침점대의 백색반점이 관찰되었고 제2군, 3군, 4군에서 간변연이 둔탁하고 종창되어 있는 소견을 보였다. 병리조직학적 소견으로 제5군을 제외한 모든 군에서 지방변성과 주위의 실질조직을 압박하지 않는 크기가 작은 증식소, 정상 간세포와 뚜렷한 경계를 가지며 주위의 실질조직을 압박하는 증식성 결절이 간 문맥부 주위에서 관찰되었다(Fig 1). 증식소 가운데 clear cell foci는 세포질이 크고 투명하며 핵들이 종대되어 있고 eosinophilic foci는 큰 호산성의 세포질을 갖고 있었다(Fig 2).

전암병변의 평가 : 각 실험군의 간조직 1cm²당 전암병변의 수와 면적은 Table 1과 같다. 간 단위면적 1cm²당 GST-p 양성병소의 수는 제4군(4.03개)이 발암물질만을 투여한 제1군(1.98개)과 간 부분절제술만을 실시한 제2군(0.18개)에 비해 유의성 있는 증가를 보였다(p<0.01).

그러나 제1군의 처치와 제2군의 처치를 병행한 제3군(3.74개)은 제4군에 비해 숫적인 감소는 보였으나 유의성은 없었다. 간 단위면적당 GST-p 양성병소의 면적은 제4군(0.55mm²)이 제1군(0.06mm²), 제2군(0.003mm²)에 비해 유의성 있는 증가를 나타냈다(p<0.01). 또한 숫적인 유의성이 나타나지 않았던 제3군(0.29mm²)은 제4군과 비교할 때 유의성 있게 감소하였다(p<0.05). 한편 GST-p 면역염색에 대한 광학현미경 소견으로 양성병소는 원형이며 주위 실질을 정도로 압박하는 한계 분명한 병소로 관찰되었다(Fig 3).

전암 및 정상 간세포의 증식성 :

BrdU 면역조직화학 염색에 의한 증식성 : 2장의 연속 절편 슬라이드에 GST-p와 BrdU 면역염색을 각각 수행하였다. GST-p 면역염색 결과로부터 전암병소와 비병소로 구분하였고 이를 근거로 현미경 200배의 배율하에서 BrdU 염색 양성 세포수를 조사한 결과는 Table 2에서와 같다. BrdU의 염색소견은 핵에 한정되지 뚜렷한 흑갈색의 전한 반점으로 나타났고 전암병변내에는 BrdU 염색 양성 세포가 밀도 높게 분포하였다(Fig 4). 전체군의 전암병변내 및 병변주위 정상 간세포에 대한 BrdU 면역염색 양성세포수를 비교할 때 제3군과 4군의 경우 전암병변에서 유의성 있게 증가하였다(p<0.01). BrdU 양성 세포의 수는 정상동물이 6주령(11.5개)에서 14주령(4.5개)

Table 1. Mean number and area of glutathione S-transferase placental form positive foci and nodules in rats

Group	Treatment	No. of animals	No. of lesion/liver(cm ²)	Area of lesion(mm ²)/liver(cm ²)
1	DEN	10	1.98 ± 1.13**	0.06 ± 0.04**
2	PH	10	0.18 ± 0.17**	0.003 ± 0.003**
3	DEN+PH	10	3.74 ± 2.13	0.29 ± 0.19*
4	DEN+PH+PB	10	4.03 ± 0.83	0.56 ± 0.19
5	None	20	ND	ND

All values are the mean ± standard deviation.

* : Significantly different from the Group 4 at p<0.05.

** : Significantly different from the Group 4 at p<0.01

DEN: diethylnitrosamine, PH: 67% partial hepatectomy, PB: phenobarbital, ND: not detected.
Lesion: preneoplastic lesions.

Table 2. Analysis of the 5-Bromo-2'-Deoxyuridine immunohistochemical stain of the liver

Group	Treatment	No. of animals	Sacrificed at weeks	Bkg	Lesions
1	DEN	10	14	6.1±1.0	7.9±0.9 ^{a)}
2	PH	10	14	5.9±1.2	ND
3	DEN+PH	10	14	6.5±1.3	10.0±1.6 ^{**}
4	DEN+PH+PB	10	14	6.7±1.0	10.3±1.4 ^{**}
5	None	10	14	4.5±0.9 [*]	ND
		10	6	11.5±2.0	ND

^{*}: Significantly different from other groups of background tissue at p<0.05.

^{a)}: Significantly different from the Group 3 and 4 at p<0.05.

^{**}: Significantly different from background tissue of same group at p<0.01.

Table 3. Analysis of the proliferating cell nuclear antigen immunohistochemical stain of the liver

Group	Treatment	No. of animals	Sacrificed at weeks	Bkg	Lesions
1	DEN	10	14	5.9±1.3	9.0±1.1 ^{a)}
2	PH	10	14	10.2±1.9	ND
3	DEN+PH	10	14	10.9±1.9	14.7±1.6 ^{**b)}
4	DEN+PH+PB	10	14	11.1±2.9	20.0±4.5 ^{**c)}
5	None	10	14	4.8±1.0 ^{**}	ND
		10	6	24.8±4.8	ND

^{**}: Significantly different from other Groups 2, 3, 4 and 5 at p<0.05.

^{a)}: Significantly different from the Group 3 and 4 at p<0.01. ^{b)}: Significantly different from the Group 1 and 4 at p<0.01.

^{c)}: Significantly different from background tissue of Group 4 at p<0.01.

에 이르면서 유의성 있게 감소하였다(p<0.01). 또한 정상 간조직에서도 제5군의 6주령과 비교할 때 제1, 2, 3, 4군에서 유의성 있는 증가를 보였다(p<0.05). 그러나 전암 병변내의 양성 세포수를 조사한 결과 제3군(10.0개)과 제4군(10.3개)이 6주령의 정상동물(11.5개)과는 유의성을 보이지 않았다.

PCNA의 면역조직화학 염색에 의한 증식성 : 두장의 연속적편 슬라이드로 전암병변 확인을 위하여 H&E 염색후 광학현미경으로 관찰하였고, 이어 PCNA 면역염색 결과를 분석하였다. 결과의 정리는 BrdU와 같은 방법으로 하였으며 결과는 Table 3에서와 같다. PCNA의 면역조직화학 염색조건은 담갈색으로 핵에 국한되어 나타났으며 염색 양성 세포수의 빈도에 있어서는 BrdU의 염색 빈도 보다 전반적으로 높게 나타났다(Fig 5). 전암병변내

및 병변주위 정상 간세포에 대한 PCNA 면역염색 양성 세포수를 비교할 때 제4군에서만 병변주위 정상 간세포에 비해 전암병변에서 유의성 있는 증가를 보였다(p<0.01). PCNA의 면역염색 양성세포의 수는 정상동물 6주령(24.8개)에서 14주령(4.8개)이 되면서 유의성 있게 감소하였다(p<0.01). 정상 간세포에 있어서도 DEN만을 투여한 제1군을 제외한 제2, 3, 4군에서 14주령의 정상동물에 비해 유의성 있는 증가조건을 보였다(p<0.01). 한편, 전암병변내 양성세포수의 조사에서는 제1군(9.0개), 제3군(14.7개), 제4군(20개)이 각각 유의성 있는 차이를 나타내었다(p<0.01).

AgNORs의 핵당 갯수에 의한 증식성 : 핵당 AgNORs의 수는 1,000배의 현미경 배율하에서 병변부와 정상부위의 200개의 간세포를 대상으로 각각 세어서 다음과 같

Table 4. Mean number of silver binding nucleolar organizer regions per nucleus of the liver

Group	Treatment	No. of animals	Sacrificed at weeks	Bkg	Lesions
1	DEN	10	14	1.9±0.21	2.8±0.1**
2	PH	10	14	2.0±0.3	ND
3	DEN+PH	10	14	2.0±0.2	2.9±9.2**
4	DEN+PH+PB	10	14	2.1±0.3	3.3±0.4**
5	None	10	14	1.7±0.2*	ND
		10	6	1.9±0.1	ND

* : Significantly different from the Groups 2, 3 and 4 at p<0.05.

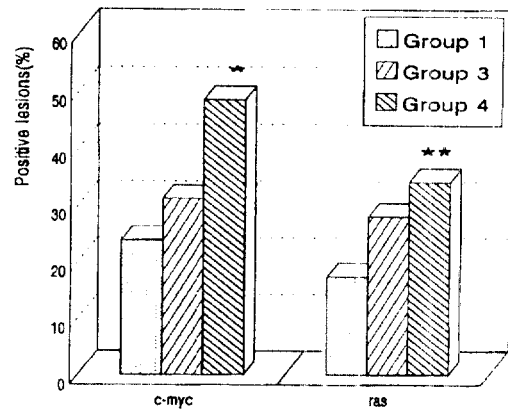
** : Significantly different from background tissue of same groups at p<0.01, respectively.

은 결과를 얻었다(Table 4).

AgNORs의 염색조건은 전암병변내 및 정상 간세포에서 크기가 다양한 검은 반점(black spot)이 핵내에 산재되어 관찰되었다(Fig 6). 전암병변내의 간세포 핵내에는 AgNORs 수가 대부분 2~5개 정도로 관찰되었으며 병변주위의 정상 간세포에서는 1~3개 정도로 병변부외 정상부위간 차이를 보였다.

각 군의 전암병변과 정상 간세포에서의 해당 AgNORs의 갯수는 1군이 1.9개와 2.8개, 3군이 2.0개와 2.9개, 4군이 2.1개와 3.2개로 유의성 있게 각각 증가하였다(p<0.01). 해당 AgNORs의 수는 정상동물 6주령(1.9)에서 14주령(1.7개)이 되면서 감소하나 유의성은 없었다. 병변주위 간세포에서는 제2군, 3군, 4군이 정상동물 14주령에 비해 유의성 있게 증가하였다(p<0.05). 한편 전암병변에서의 결과는 제1군(2.8개)과 제4군(3.3개)이 유의성 있는 차이를 보였다(p<0.01).

발암 유전자 *c-myc* 과 *ras* 발현에 대한 평가: 전암병변의 확인은 GST-p 면역염색을 실시한 후 현미경 관찰로 평가하였고 이의 연속절편 슬라이드로 *c-myc* 과 *ras*의 면역염색을 수행하여 Text-Fig 2와 같은 결과를 얻었다. *c-myc*의 면역조직화학 염색조건은 정상 간세포에서 핵에 주로 염색되는 경우가 많았다. 그러나 전암병변에서의 염색조건은 핵과 함께 세포질에 염색되는 소견이 주로 관찰되었는데 이들을 *c-myc* 면역염색 양성세포로 간주하여 결과를 분석하였다(Fig 7). 양성병소의 발현률은 양성내조군인 제4군(48.5%)이 DEN만을 투여한 제1군(23.7%)과 (p<0.01). DEN의 투여와 간 부분절제술을 실시한 제3군(31.1%)에 비해 유의성 있게 증가하였다(p<0.05). *ras*의 염색조건은 병변주위 조직에서 전반적으



Text-Fig 2. Percent *c-myc* and *ras* positive lesions of preneoplastic lesions.

* : Significantly different from Group 1(p<0.01) and Group 3(p<0.05).

** : Significantly different(p<0.05) from Group 1.

로 세포질에 약한 양성반응을 보였으나 전암병소에서의 염색조건은 세포질에 강한 양성반응을 나타내었다(Fig 8).

양성병소의 발현률은 제1군이 17.3%, 제3군이 27.8% 그리고 제4군에서 34.1%를 나타내어 제4군이 제1군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다(p<0.01). 그러나 제4군과 제3군의 유의성은 나타나지 않았다.

고 찰

간암을 포함하여 사람에게 발생하는 약의 75~85%의 원인은 환경요인에 의한 것으로 추정되며 이 가운데 90%가 화학발암물질에 의한 후천적 원인으로 알려져 있다²⁵.

또한 간은 체내로 들어온 화학물질을 일차적으로 대사하는 대표적 장기로서 대상 화학물질의 발암성을 초기에 확인하기에 적합한 장기로 많이 이용되고 있다.

GST-p 면역염색에 의한 전암병소의 평가에서는 무치치군인 제5군을 제외한 모든 군에서 양성병소가 관찰되었다. DEN을 투여한 제1군에서 무치치 대조군인 제5군에 비해 증식소의 수가 유의성 있게 증가하였고 DEN 투여후 간 부분절제술을 실시한 제3군에서는 수와 면적에서 제1군 보다 증가된 소견을 보였으며 여기에 촉진물질인 PB를 투여한 제4군에서 제3군 보다 면적이 유의성 있게 증가하는 결과를 관찰할 수 있었다. 또한 발암물질을 투여하지 않고 간 부분절제술만을 실시한 제2군에서도 매우 적은 수의 증식소가 관찰되었다. 이상의 GST-p에 의한 전암병변의 염색소견은 정²¹의 2-acetylaminofluorene(AAF)을 촉진물질로 사용한 결과에 비해 수와 면적에 있어 낮은 결과를 보였으나 경향은 일치하였다.

세포의 증식능을 평가하기 위한 보다 객관적이고 재현성 있는 다양한 방법들이 소개되고 있는데 그 가운데 tritiated thymidine을 이용한 radiolabeling은 신선했던 조직을 사용해야 될 뿐 아니라 방사능 물질을 취급해야 하는 단점이 있다. Flow cytometry를 이용한 DNA 분석법은 파라핀 포매조직을 이용할 수 있다는 점에서 thymidine 이용법 보다는 장점이 있으나 조직을 분쇄해야 측정 가능성이므로 조직학적 관찰을 동시에 할 수 없는 단점이 있다. 또한 BrdU가 Ki-67 항체를 이용한 면역조직화학 염색방법은 세포 상호간의 관계와 조직의 형태를 유지할 수 있는 장점을 갖는 반면, 역시 신선했던 조직을 사용해야 한다는 단점을 갖고 있다. 그러나 PCNA는 포르말린 고정에 저항성이 있어 오래된 파라핀 조직을 사용할 수 있는 장점이 있고 NORs 역시 든을 이용한 간단한 염색방법으로 복잡한 면역염색과정을 거치지 않음으로 많이 이용되는 실정이다.

PCNA는 세포증식과 관계가 있는 36kd의 nonhistone 핵단백으로 Miyachi *et al*²⁶에 의해 처음 소개된 후 Bravo *et al*²⁷과 Methews *et al*²⁸에 의해 cyclin이라는 세포의 핵산 합성에 관여하는 단백질과 같은 것임이 밝혀졌다. 본 실험에서 PCNA 염색결과는 제5군의 정상동물 6주령과 14주령에서 양성 세포수가 24.8개에서 4.8개로 유의성 있게 감소되었다. 특히 6주령의 정상동물에서 나타난 간세포의 증식성 수준은 유발, 촉진 및 진행단계 모두 일으킨 암 유발 양성대조군인 제4군의 전암병변내의 간

세포 증식성 결과와 비슷하게 나타났다. 이는 연령이 증가할수록 간세포의 증식성은 자연적으로 소실되는 것으로 해석할 수 있다. 또한 발암물질의 투여에 의한 간 발암화과정이 진행되는 동안 연령의존적으로 소실되는 간세포의 증식성이 다시 높아지는 것으로 나타났다. 즉, 간암을 유발하기 위한 모든 치치가 간세포의 증식성을 높게 유지시켜 주는 것으로 사료된다. 또한 병변주위 정상 간세포와 전암병변의 양성세포수의 측정에서 DEN을 투여한 군, PH를 실시한 군 그리고 PB를 투여한 군에서 유의성 있게 증가하는 결과를 관찰할 수 있어 PCNA가 유발단계, 촉진단계 및 진행단계를 민감하게 반영하는 지표임을 확인하였다.

BrdU의 염색결과는 정상동물이 6주령에서 14주령에 이르면서 11.5개에서 4.5개로 양성세포수의 감소가 일어나는 것으로 나타났다. 이것을 PCNA의 결과와 비교할 때 DEN의 유발효과, PH를 통한 진행효과는 유의성 있게 나타났으나 PB에 의한 촉진효과가 나타나지 않았다.

세포 유전자학자들은 은을 이용한 NORs의 빠르고 간편할 뿐 아니라 더욱 선명하게 특이적인 염색되는 1단계 염색법을 개발하여 병리조직에서도 NORs의 측정을 가능하게 하였다²². NORs의 은 염색에서는 사실상 RNA-binding protein 및 small ribonucleoprotein particles가 염색되는 것인데 실제 NORs의 수는 정상 이배체(diploid) 세포에서 20개 이지만 은염색을 하면 핵소체에 모여서 나타나 1~2개 정도로 관찰된다. 그러나 세포증식이 활발해져서 핵소체가 분산되거나 세포의 ploidy가 증가되어 염색체의 수가 증가될 때 또는 전사능이 증가될 경우 NORs의 핵당 수가 많아지게 된다^{29,30}. 관암³¹ 뿐만 아니라 위암³², 대장암³³, 유방암³⁴에서도 정상세포에 비해 핵당 AgNORs의 결과가 유의성 있는 것으로 나타나서 진단과 예후를 판단하는 자료로 활용되고 있다. 또한 증식세포에 대한 AgNORs의 결과는 BrdU의 결과와 비교할 때 좋은 상관성이 있음이 증명되었기 때문에³⁵ 염색의 간편성을 고려한다면 AgNORs에 의한 증식성 평가는 좋은 지표라고 하겠다. 본 실험에서 나타난 AgNORs의 핵당 갯수는 정상동물 6주령에서 1.9개, 14주령에서 1.7개로 유의차가 없는 것으로 나타났으며 이러한 결과는 정상동물의 6주령과 14주령에서 각각 PCNA, BrdU의 결과가 유의성이 있는 것으로 인정된 것과 비교될 수 있다. 그러나 전암 병변부위와 정상부위에서의 유발 및 진행효과를 반영하는 결과는 PCNA와 BrdU의 결과와 일치되

어 나타났다.

발암유전자 *c-myc*은 avian myelocytomatosis virus MC 29의 바이러스성 발암유전자 *v-myc*과 유사한 구조가 정상 닭의 DNA에서 발견됨으로써 소개되었고, 그 역할은 세포의 증식, 분화 및 성숙에 관여한다고 하였다³⁶. 또한 다양한 세포, 조직, 종양과 관련되는 것은 물론이고 정상 조직에서도 발현되는 발암유전자로 알려져 있다^{34,35,37}. *c-myc*에 의해 생성되는 단백질은 숙주세포의 핵에 위치하며 DNA와 결합하는 능력을 갖고 있다⁵³. 정상 간세포에서 *c-myc* oncoprotein은 핵 뿐만 아니라 perivenule zone의 간세포 세포질에도 반응을 보이며 전암병변에서도 같은 염색소견을 보이는 것으로 보고되었다^{41,49}. 본 실험의 경우에서도 *c-myc*의 면역조직화학 염색소견이 선택적으로 핵에만 염색되는 소견과, 핵과 더불어 세포질에 염색되는 소견의 두가지 유형으로 관찰되었는데 전암병변의 경우에는 주로 핵과 세포질이 함께 염색되는 경우가 많았다. 본 실험에서 발암 유전자 *c-myc* 양성세포 발현률은 유발단계와 촉진단계 및 진행단계가 포함된 제4군에서 48.5%의 발현률을 나타냈으며 이는 유발단계와 진행단계를 거친 군에서 각각 유의성 있는 차이가 인정되어 *c-myc* oncoprotein의 면역염색을 통한 양성 증식소의 결과 또한 발암성의 지표 뿐 아니라 *c-myc*가 화학적 간 발암화 과정에 관여하는 것으로 사료된다.

또한 발암 유전자 *ras* family는 성장인자에 대한 전달체로서 세포증식과정의 조절인자로 작용하며 21kd의 단백질(p21ras)을 생산한다^{40,41}. *ras*는 codon 12, 13, 61에서의 점 돌연변이에 의한 구조적 변화로 인해 transforming 활성을 획득하게 된다⁴². p21ras의 면역염색 소견으로 Embleton *et al*⁴³은 정상 간세포에서 sinusoids에 인접한 세포의 세포막에 염색되며 증식성 결절에서는 정상 간세포에서 보다 균일한 세포질내 염색소견을 보인다고 하여, 본 실험의 결과와 일치하였다. 발암 유전자 *ras*의 양성발현률은 제4군에서 34.1%의 발현률을 보였으며 이는 유발단계만을 거친 제1군과의 비교에서만 유의성 있는 차이가 인정되었고 PB의 투여에 의한 *ras* 발현률의 차이는 나타나지 않았다. 이는 *c-myc*의 결과와 비교할 때 전체적인 양성세포 발현률이 전반적으로 낮은 수준인 것과 함께 차이점으로 인정할 수 있었다.

이상의 실험결과를 통해 랫드의 화학적 간 발암화 과정에서 나타나는 전암 간세포의 증식성을 평가하는데 BrdU, PCNA, 및 AgNORs는 유용한 지표이며 특히 BrdU

와 PCNA는 간암유발을 위한 각각의 처치단계를 민감하게 반영하는 것으로 나타났다. 또한 전암단계 병변에서 발암유전자 *c-myc*과 *ras*의 발현이 증가가 확인됨으로써 이들이 화학적 간 발암화 과정에 관여하는 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 랫드를 이용한 화학적 간 발암화 과정에서 나타나는 전암 및 정상 간세포를 대상으로 증식인자로 알려진 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU), proliferating cell nuclear antigen(PCNA) 및 silver-binding nucleolar organizer regions(AgNORs)의 측정을 통한 증식성 평가와 발암유전자 *c-myc*과 *ras*의 발현여부를 조사한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. BrdU 면역염색 양성세포수는 제3군과 4군의 경우 전암병변에서 병변주위 정상 조직보다 유의성 있게 증가하였고 정상동물의 6주령(11.5개)에서 14주령(4.5개)이 되면서 유의성 있게 감소하였다($p<0.01$). 전암병변내의 양성세포수는 제3군(10.0개), 제4군(10.3개)이 6주령의 정상조직과 유의성을 보이지 않아 발암화 과정을 위한 각각의 처치가 연령의존적으로 감소되는 간세포의 증식성을 높여주는 것을 알 수 있었다. 또한 제1군에보다 제3군이 더 증가함으로 전암병변 내에서의 BrdU 결과가 간 부분절체 효과를 반영해주는 유용한 지표임을 확인하였다.
2. PCNA 면역염색 양성세포수는 정상동물의 6주령(24.8개)이 14주령(4.8개)에 이르러서 유의성 있게 감소하였다($p<0.01$). PCNA의 면역염색 양성세포의 수는 병변주위 정상조직에 있어서 제1군을 제외한 제2, 3, 4군에서 정상동물에 비해 증가하여 PCNA가 간 부분절체 효과와 진행효과를 민감하게 반영함을 확인하였다. 전암병변내 양성세포수의 조사에서 제1군, 3군, 4군이 유의성 있는 차이를 보이고 있어서($p<0.01$) 이를 통해 PB 및 PII에 의한 촉진효과를 반영하는 것임을 확인하였다.
3. 전암병변과 정상 간세포에서의 핵당 AgNORs의 갯수는 전암병변이 확인된 모든 군에서 차이를 보였다. 핵당 AgNORs의 수는 정상동물 6주령(1.9개)이 14주령(1.7개)에 이르러서 감소하나 유의성은 없었다. 병변주위 간세포에서는 제2군, 3군, 4군의 결과가 정상동물에 비해 증가하여 간 부분절체 효과가 핵당 AgNORs의 갯수의 증가에 영향을 준다는 사실을 확인하였다.

4. 발암 유전자 *c-myc* 의 양성병소 발현률은 DEN과 PB의 투여와 함께 간 부분절제술을 실시한 제4군(48.5%)이 DEN만을 투여한 제1군(23.7%)과 DEN의 투여와 간 부분절제술을 실시한 제3군(31.1%)에 비해 증가하였다.

5. 발암 유전자 *ras* 양성병소의 발현률은 제4군(34.1%)이 제1군(17.3%)에 비해 증가를 보였으나 제4군에 대한 제3군(27.8%)의 유의차는 나타나지 않았다.

이상의 실험결과를 통해 생체내 중기 간 발암성 검색

모델에서 전암 간세포의 증식성을 평가하는데 BrdU, PCNA, AgNORs이 유용한 지표이며 특히 BrdU와 PCNA 평가는 간암 유발을 위한 각각의 처치단계를 민감하게 반영하는 것으로 나타났다. 또한 전암단계 병변에서 발암유전자 *c-myc* 과 *ras* 의 발현이 증가됨이 확인됨으로써 이들이 화학적 간 발암화 과정에 관여하는 것으로 사료된다.

Legends for figures

Fig 1. Liver of the rat treated with diethylnitrosamine, phenobarbital and partial hepatectomy. The hyperplastic foci, nodules and diffuse fatty droplets deposition were observed. H&E stain. $\times 100$.

Fig 2. Eosinophilic hyperplastic foci in the rat liver treated with diethylnitrosamine, phenobarbital and partial hepatectomy. The nodule shows well demarcation and contains cells with a homogeneous eosinophilic cytoplasm and large or small cytoplasmic vacuoles. H&E stain. $\times 125$.

Fig 3. The rat liver treated with diethylnitrosamine, phenobarbital and partial hepatectomy. Glutathione S-transferase placental form positive nodule is round and clearly discerned from surrounding tissue. ABC method. $\times 100$.

Fig 4. Bromodeoxyuridine positive cells(black dots) are distributed in hyperplastic nodule in the rat liver treated with diethylnitrosamine, phenobarbital and partial hepatectomy. ABC method. $\times 100$.

Fig 5. Proliferating cell nuclear antigen positive cells were observed as a light brown dots in the hepatocytes treated with diethylnitrosamine, phenobarbital, and partial hepatectomy. ABC method. $\times 200$.

Fig 6. Silver-binding nucleolar organizer regions of the preneoplastic hepatocytes. Many black dots are present in each nucleus. AgNOR stain. $\times 320$

Fig 7. *c-myc* positive foci in the rat liver treated with diethylnitrosamine, phenobarbital and partial hepatectomy. ABC method. $\times 125$.

Fig 8. p21ras positive foci in the rat liver treated with diethylnitrosamine, phenobarbital and partial hepatectomy. p21ras positive cells are observed as a uniform cytoplasmic stain rather than plasma membrane localization. ABC method. $\times 125$.

참 고 문 헌

1. Miller EC, Miller JA. Mechanisms of chemical carcinogenesis: Nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. *Pharmacol Rev*, 18: 805-838, 1966.
2. Miller EC. Some current perspectives on chemical carcinogenesis in human and experimental animals: Presidential address. *Cancer Res*, 38:1479-1496, 1978.
3. Ito N, Inoue T, Tagawa Y, *et al.* Development of new rapid bioassay for carcinogens to predict the results of long term carcinogenicity test. *Toxicol Forum*, 9:601-611, 1986.
4. 조재천, 장동덕, 정자영 등. 단기발암성 시험모델에 관한 연구 - 광범위 발암물질에 의한 다상기 발암모델의 개발(II). 국립보건안전연구원보, 3:111-131, 1990.
5. Goldsworthy TL, Hanigan MH. Models of hepatocarcinogenesis in the rat: Contrasts and comparision. *CRC Crit Rev Toxicol*, 17:61-89, 1986.
6. Ito N, Tsuda H, Tatematsu M, *et al.* Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S transferase placental form positive foci in rats-an approach for new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis*, 9:387-394, 1988.
7. Scherer E. Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 738: 219-236, 1984.
8. Pitot HC, Beer D, Hendrich S. Multistage carcinogenesis: the phenomenon underlying the theories, in: O.H. Iversen(Ed.), *Theories of Carcinogenesis, Hemisphere, Washington*, 159-177, 1988.
9. Sato K. Glutathione S-transferases an chemical carcinogenesis: GST-p as a preneoplastic marker. *J Kor Toxicol*, 4:73-88, 1988.
10. Baak JPA. Mitosis counting in tumors. *Human Pathol*, 21:683-685, 1990.
11. Steel GG. Growth kinetics of tumors. Oxford Clarendon Press, 1977.
12. Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iodo deoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218:474-475, 1982.
13. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, *et al.* Production of a monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31:13-17, 1983.
14. Gerdes J, Lemke H, Baisch H. *et al.* Cell cycle analysis of a cell proliferation associated nuclear antigen Ki-67. *J Immunol*, 133:1710-1715, 1984.
15. Hall PA, Levison DA, Woods AL. *et al.* Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol*, 162:285-294, 1990.
16. Crocker J, Paramjit N. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol*, 151:111-118, 1987.
17. Barlogie B, Raber MN, Schumann J, *et al.* Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res*, 43: 3982-3997, 1983.
18. Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science*, 235:305-311, 1987.
19. Cooper GM. Cellular transforming genes. *Science*, 217:801-806, 1982.
20. Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 29:1349-1353, 1981.
21. 정자영. Retinoic acid가 랫드 전암 간세포의 증식과 Natural Killer 세포의 활성화에 미치는 효과. 서울대학교 박사학위논문, 1994.
22. Carll G, Stephen EB. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma(Berl.)*, 53:37-50, 1975.
23. Raymond ER, Michael AP, Julia HC, *et al.* Quantitative and qualitative immunohistochemical detection of *myc* and *src* oncogene proteins in normal, nodule, and neoplastic rat liver. *J Histochem Cytochem*, 36(2): 179-184, 1988.
24. Peter N, Ritva PE, Elizabeth M, *et al.* Cellular distribution of *c-myc* transcripts during chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Res*, 48:5522-5527, 1988.
25. Epstein SS. Environmental determinants of human

- cancer. *Cancer Res* , 34:2425-2435, 1974.
26. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* , 121: 2228-2234, 1978.
 27. Bravo R, Fey SJ, Bellatin J, *et al* . Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportion are sensitive to changes in the rate of proliferation. *Exp Cell Res* , 136:311-319, 1981.
 28. Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR. *et al* . Identity of the proliferating nuclear antigen and cyclin. *Nature* , 309:374-376, 1984.
 29. Underwood JCE, Giri DD. Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. *J Pathol* , 155:95-96, 1988.
 30. Walker RA. The histopathologic evaluation of nucleolar organizer region proteins(Commentary). *Histopathology* , 12:221-223, 1988.
 31. Crocker J, Julie EG. Nucleolar organizer regions in normal, cirrhotic, and carcinomatous livers. *J Clin Pathol* , 41:1044-1048, 1988.
 32. Rosa J, Mehta A, Filipe MI. Nucleolar organizer regions in gastric carcinoma and its precursor stages. *Histopathology* , 16:265-269, 1990.
 33. Ruschoff J, Bittinger A, Neumann K, *et al* . Prognostic significance of nucleolar organizing regions (NORs) in carcinomas of the sigmoid colon and rectum. *Path Res Pract* , 186:85-91, 1990.
 34. Giri DD, Nottingham JF, Lawry J, *et al* . Silver-binding nucleolar organizer regions (Ag-NORs) in benign and malignant breast lesions : Correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. *J Pathol* , 157:307-313, 1989.
 35. Tanaka T, Takeuchi T, Nishikawa A, *et al* . Nucleolar organizer regions in hepatocarcinogenesis induces by N-2-fluorenylacetamide in rats ; Comparison with bromodeoxyuridine immunocytochemistry. *Jpn J Cancer Res* , 80:1047-1051, 1989.
 36. Ralph A, Steve P. Oncogenes and growth factors. Elsevier 11-16, 24-32 and 74-83, 1987.
 37. Chandar N, Lombardi B, Locker J. *C-myc* amplification during hepatocarcinogenesis by a choline-devoid diet. *Proc Natl Acad Sci USA* , 86:2703-2706, 1989.
 38. Donner P, Greiser-Wilke I, Moelling K. Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene product of avian myelocytomatosis virus. *Nature* , 296: 262-266, 1982.
 39. Loke SL, Neckers LM, Schwab G, *et al* . *C-myc* proteins in normal tissue : Effects of fixation on its apparent subcellular distribution. *Am J Pathol* , 131(1): 29-37, 1988.
 40. Ush L, Shih TY. Metabolic turnover of human c-h-ras p21 protein of EJ bladder carcinoma and its normal cellular and viral homologs. *Mol Cell Biol* , 4:1647-1655, 1984.
 41. Willingham MC, Pastan I, Shih TY, *et al* . Localization of the src gene product of the Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. *Cell* , 19: 1005-1014, 1980.
 42. Varmus HE. The molecular genetics of cellular oncogenes. *Ann Rev Genet* , 18:553-612, 1984.
 43. Embleton MJ, Butler PC. Reactivity of monoclonal antibodies to oncoproteins with normal rat liver, carcinogen-induced tumours, and pre-malignant liver lesions. *Br J Cancer* , 57:48-53, 1988.