

간암의 다단계 발생기전에 관한 연구: 종양형성 과정에서의 생체지표

강정부* · 김지경 · 송승희 · 하우송¹
경상대학교 수의과 대학(동물의학 연구소)
¹경상대학교 의과대학
(2001년 10월 10일 게재승인)

Study on mechanism of multistep hepatotumorigenesis in rat : Bio-indices on hepatic tumorigenesis

Chung-boo Kang*, Chi-kyeong Kim, Seung-hee Song and Woo-song Ha¹

Department of Internal Medicine, College of Veterinary Medicine(Institute of Animal Medicine)
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

¹Department of Surgery, College of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
(Accepted October 10, 2001)

Abstract : To establish bio-indices for detection of the development of multistep hepatotumorigenesis, rats were fed water containing 0.01% diethylnitrosamine (DEN) ad libitum for 13-14 weeks. Hepatocellular carcinoma was developed by treatment with DEN. DEN only was able to induce hepatic tumors in rats without any other cocarcinogen. Compared to control group, liver cytosol protein concentration in all treated groups was significantly decreased ($p < 0.05$). From week to week, 20α -hydroxysteroid dehydrogenase (20α -HSD) activity was increased and the highest activity was observed on the 12th week ($p < 0.05$). In addition, the urine biopterin concentration was also significantly increased compared to control groups ($p < 0.05$) in a time course manner.

These results indicated that 20α -HSD activity, urine biopterin and liver cytosol protein concentration might be very useful maker to hepatic tumorigenesis.

Key words : diethylnitrosamine, tumorigenesis, liver cytosol protein, 20α -HSD activity, biopterin, rat.

서 론

동물에서의 간암 발생 실험에는 여러 제제가 사용되어 왔으나¹⁻⁹ 근년에는 diethylnitrosamine (DEN)투여에 의한 방법이 주로 활용되고 있다¹⁰⁻¹³.

실험동물 중에서도 특히 mouse 및 rat는 수명이 짧아 단기간에 초기의 DNA변화로 부터 완전한 전이암 까지의 모든 단계별 진행과정을 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 인위적으로 가변성이 있는 요소를 고정할 수 있는 잇점이 있어 사람에서의 간암 발생과정을 연구하는데에도 가장 적합한 모델로 인정되고 있다¹⁰.

사람의 간암 발생에서는 장기간 동안 다단계 과정을 거

쳐 발생함은 물론이고 발생된 후에는 발암의 초기과정에 대해서는 알 수 없을 뿐더러 진행과정에서도 많은 요인이 관련되는 복합성을 갖고 있으나 실험동물에서는 이를 보완할 수 있는 잇점을 갖고 있기 때문이다.

DEN은 단독투여 뿐만 아니라 acetylaminofluorene (AAF), ortic acid, phenobarbital, benzopyrene, N-amyln-methylnitrosamine, Carbon tetrachloride (CCl₄)등과 함께 투여하여 많은 간암 유발연구에 활용되고 있으며 단기간 투여시에도 간암을 일으킬 뿐만 아니라 투여방법도 다양하여 발암 유발 연구에 활용되고 있다^{3,5,7,9}. DEN을 1회 투여하고 부분 간 절제술을 실시하여 간암을 유발 시키는 방법과 발암 물질에 의하여 유도된 변이세포내의 각 효소 활성도의

본 연구는 한국 학술진흥재단 유전공학 연구(과제번호 : 1998-019-G00033)지원으로 수행되었다.

*Corresponding author : Dr Chung-boo Kang, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

변화가 초래됨이 밝혀지면서 이들 세포내 크론성 증식으로 나타나는 여러종류의 효소 활성도의 정량적 분석 역시 매우 의의가 큰 것으로 받아들여지고 있다.^{4,10-11}

DEN은 생체내에서 흡수된 후 간에서 alkylhydroxylation되어 간세포내의 RNA에 변화를 일으킴으로써 간암을 유발하는 것으로 생각되고 있으며 진정한 종양 세포의 형성은 이런 遺傳因자의 손상이 細胞分裂이나 遺傳子 表現(gene expression)을 할 때 세포 기능의 복합적인 변화를 초래하여 생기는 결과로 인정되기에 일련의 과정에 대한 체계적인 검색이 필요하다.

본 연구에서는 이미 실시하고 있는 부분적 간 절제, 또는 발암촉진제의 투여와 달리 자연상태의 조건에 가장 알맞는 모델을 개발코져 8주령된 rat를 이용, 0.01%농도의 DEN을 함유한 음수를 11주에서 14주 동안 투여, 간암 모델 확립에¹¹ 이어 관련 발현인자의 검색, 나아가서는 항암제의 효과를 검정하거나 신개발 될 수 있는 항암제의 항암효과를 평가하는 모델로도 이용코져 발암과정에서의 형태학적 변화와 liver cytosol의 단백질, 20 α -HSD 활성치 및 뇨중에서의 biopterin농도에 대한 분석을 실시하였다.

20 α -HSD는 원래는 설치류에서 황체의 낭종과 관련되어 Progesterone의 20 α -hydroxypregn-4-en-3-one (20 α -dihydroprogesterone, 20 α -OHP)로의 대사에 직접적인 관계가 있는 것으로 밝혀졌으나¹⁴⁻¹⁶ Shiota등은 개와 고양이의 hemangiopericytoma등과 같은 양성종양과 fibrosarcoma등과 같은 악성종양에서 정상에 비해 그 활성치가 매우 높음이 알려져 있어 새로운 종양진단의 자료로서의 가능성을 제시해 주고 있다¹⁷.

Biopterin(사람에서는 neopterin)은 guanosine 5'-triphosphate (GTP)로 부터 GTPcyclohydroase(GTP-CH) I 에 의해 in vivo에서 합성¹⁸⁻¹⁹되며 GTP-CH의 활성도는 interferon에 의해 크게 증강되는 것으로 알려져 있다²⁰. Neopterin은 악성 혈액암²¹, 각종 비뇨기계통 종양, 소아 환자의 대부분의 종양에서 높을 뿐더러 진행 정도와도 관련이 같은 것으로 알려져 있으나²²⁻²⁵ 동물 실험에서는 응용되지 못한 아쉬운 상태에 있고 더욱이 간암과의 관련성에 대해서는 연구된 바 없어 본 연구진은 부분적 간 절제후 투여 또는 다른 발암촉진제의 병용등에 의존하지 않고 자연상태의 조건에 가장 알맞는 모델에서 8주령의 rat를 이용, 0.01%농도의 DEN을 함유한 음수를 13-14주 동안 투여, 관련 발현 인자의 검색, 발현기전, 나아가서 항암제의 효과검정 및 안정성 검토, 새로운 항암제개발의 항암모델의 효과를 평가하는 자료로 활용코져 본 연구에서는 liver cytosol의 단백질 정량에 이어 liver cytosol의 20 α -HSD activity, biopterin분석을 통하여 종양형성 과정에서의 검색과 동시에 새로운 종양 지표를 획득코자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육조건

Hepatic tumorigenesis 발현실험을 위한 rat (Sprague-Dawley strain)는 생후 6주령된 SPF Sprague-Dawley 수컷 rat를 아산 생명과학연구소에서 분양받아 2주간 적정 사육환경에서 순화시켰으며, 순화된 건강한 8주령의 체중 120~150gm의 rat만을 실험에 사용하였다. 실험동물은 온도 20 \pm 4 $^{\circ}$ C, 상대습도 45~60%, 환기횟수 10-12회/hr, 조명시간 오전9시-오후 11시로 이들의 환경조건은 Ha등의 보고와 같이 실시하였다¹¹.

Rat에서의 hepatic tumorigenesis

본 실험은 예비실험결과와 DEN 투여 후 11-13주에 걸쳐 발암이 가장 왕성히 진행되는 예비실험 결과에 근거하여 11주-13주령 DEN 투여군을 각각 10-15마리, 14주령의 경우는 5마리를 실험에 이용했으며 대조군은 10마리를 사용하였다.

실험군과 대조군 모두 사료는 자유공급했으며, 대조군은 순수 음수만을 공급했고, 실험군은 DEN 제제인 diethylnitrosamine(Sigma, USA)을 음수에 0.01% 농도로 맞추어 자유공급하여 각 주령별 종양 형성 과정에 대한 검색을 실시하였다.

간 cytosol의 채취

간 cytosol의 채취를 위해 rat는 채혈 후에 관류고정법으로 방혈시킨 후 즉시 간을 절제하여 -30 $^{\circ}$ C에 급속 냉동하였다. 동결된 간의 무게를 측정하여 Bradford의 방법²⁶에 의해 20배 용량의 buffer A용액 [5 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10% glycerol에 사용 직전 200 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Sigma Chem. Co. USA), 10 μ g/ml leupeptin, 1 mM dithiothreitol(DTT)를 첨가를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 glass homogenizer로 균질화 시켰다. 이 균질액을 Quick-seal (Beckman Co. USA) 원심분리관에 옮겨 초원심분리기 (Beckman L-80, USA)를 사용하여 4 $^{\circ}$ C, 105,000 \times g에서 90분간 원심분리하여 분리된 상층액을 20 α -HSD의 활성도 측정시까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

간 cytosol의 단백질 농도 측정

간 cytosol의 단백질 량은 Bradford 방법²⁶ (Coomassie blue dye binding method)에 따라 50배 희석한 간 cytosol 100 μ l에 기질액 [0.01% Coomassie brilliant blue G-250, 4.7% ethanol, 8.5% phosphoric acid] 5ml를 가하여 실온에서 반응 후 1시간 내에 분광 광도계 595 nm에서 측정하여 bovine

serum albumin을 사용한 표준 곡선에 의해 측정하였다.

20 α -HSD 활성도의 측정

20 α -HSD 활성도는 불활성 steroid인 20 α -dihydroprogesterone(20 α -OHP)가 20 α -HSD에 의해 progesterone으로 대사됨에 따라 이에 상응하여 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADP)가 환원되어 생성되는 reduced form of NADP(NADPH)의 양으로 나타내었으며 이는 Noda²⁷의 방법에 의하여 측정하였다.

20 α -OHP 기질 용액 [60 μ M 20 α -OHP (Sigma Chem. Co. USA), 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 6% ethanol, 1 mM EDTA에 사용직전 300 μ M β -NADP (Sigma Chem. Co. USA), 5 mM dithiothreitol(DTT)를 첨가] 500 μ l를 석영 micro-cuvette에 넣어 37 $^{\circ}$ C 항온조에 3분간 incubation 후에 냉동된 상태의 간 cytosol을 25ml첨가하여 즉시 혼합해서 분광광도계(Shimadzu UV-2201, Tokyo, Japan)를 사용, 340nm에서 흡광도 변화는 흡광도의 변화개시후 35초간의 흡광도의 증가속도를 효소반응의 처음속도로 하여 3분간 경시적으로 기록하였다. 간 cytosol중에는 NADP⁺를 환원시켜 NADPH를 생성할 수 있는 약간의 활성이 존재하므로 20 α -OHP를 포함하지 않은 기질용액을 사용, 앞서와 같이 처음속도를 구한 후 20 α -OHP를 포함한 기질용액을 사용했을 때의 처음(시작)속도에서 뺀 차이를 20 α -HSD에 대한 특이 처음속도로 하여 20 α -HSD활성을 구하였다. 1mol NADPH 농도 계산에 사용한 흡광도는 340 nm에서 4,436이었다. 20 α -HSD 활성도 1 unit는 37 $^{\circ}$ C에서 NADPH가 1 μ mol/min/ml 생성되는 것으로, 즉 activity 1 unit는 NADPH/ μ mol/min/ml로 나타내었다.

尿中 Biopterin의 측정

Biopterin은 빛(light)에 민감하므로 pterin을 포함하고 있는 시료에 대한 모든 조작은 반드시 어두운 시야나 암시야에서, 특히 직사 태양 광선은 반드시 차단시켜 실시하였다. Biopterin은 -20 $^{\circ}$ C에서 동결 보관한 경우는 수주 동안 안정하므로 동결하여 보관후 사용하기도 하였다.

HPLC로 biopterin을 측정하는 방법은 다음과 같았다^{28,30}. 1 : 10 으로 희석한 소변 시료 10 μ l와 희석한 20 μ l을 주입하고, 4 \times 125 mm C18 reversed-phase column으로 분리하였다. 분리한 후에 biopterin과 creatinine을 동시에 측정하였다. Creatinine은 235 nm의 UV 흡광도 하에서 측정하고, 353 nm의 excitation wave length와 438 nm의 emission wave length의 fluorescence에 의하여 rat의 소변을 1 ml를 채취하여 EDTA (25 mg)와 섞어서 -20 $^{\circ}$ C에서 빛을 차단하여 냉동 보관하였다. 이 尿 시료를 냉동건조 시킨 후 3% methanol 9 ml에 희석시켜 10 ml를 Sep-Pak C18 Cartridges(Waters Asso.

USA)에 통과시켜 여과시킨 용액을 20 μ l 채취하여 HPLC에 주입하여 biopterin치를 측정하였다.

실험 전에는 항상 biopterin의 standard solution (0.001 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml)을 HPLC에 주입하여 각각의 결과치를 측정하였다. 이렇게 측정한 biopterin의 면적치를 이용하여 일차 표준 곡선($y=ax+b$)을 그리고 상관계수 r을 구하여 이 r 값을 이용하여 각각의 biopterin 면적치에 대한 양을 산출하였다. 산출된 biopterin 양을 소변에 혼합한 완충액의 희석 농도, 주입한 양, Sep-Pak C18 cartridge (Waters Asso. USA)의 회수율(65%)로 교정하여 개체별로 소변 creatinine에 대한 biopterin치를 산출하였다.

통계 처리 방법

대조군과 각 주령별 결과치는 평균치와 표준 오차로 표기(mean \pm SE)하고 통계 처리는 ANOVA(분산 분석)를 시행하였으며 대조군 및 각 주령별 사이에는 Duncan's Multiple Range Test를 사용하여 통계적인 차이를 검증하였다.

결 과

간 cytosol의 단백질 농도의 변화

Cytosol protein은 대조군에 비하여 모든 주령에서 유의한 감소가 있었으나($p<0.05$), 주령별 변화는 주령이 증가할수록 다소 감소하였지만 유의성은 인정되지 않았다(Table 1).

Table 1. liver cytosol protein concentration in DEN treated rats

Duration (Week)	No. of rats	Protein Con.(g/dl)
0*	4	5.94 \pm 1.45
11	10	3.83 \pm 0.92 **
12	10	3.08 \pm 0.68 **
13	10	3.67 \pm 0.60 **
14	5	3.15 \pm 0.97 **

* : Control group

** : Significantly different from non-treated control group($p<0.05$)

간 cytosol의 20 α -HSD 활성도의 변화

20 α -HSD의 활성도는 대조군에 비해서 11주령과 12주령에서 뚜렷이 증가되었으나($p<0.05$), 13주령에는 다시 감소하는 양상을 보였다(Table 2).

尿中 Biopterin 농도의 변화

Urine biopterin 농도는 normal rat의 정상치²⁹인 20.1 nmol/mg creatinine에 비하여 훨씬 증가되었다($p<0.05$), 주령 수가

증가함에 따라 계속 증가하지만 13주령과 14주령에서의 변화에서도 지속적인 증가를 볼 수 있었다(Table 3).

Table 2. Activities of 20 α -HSD in DEN treated rats

Duration (Week)	No. of rats	Activity(1U/ml)
0*	10	1.5 \pm 0.14
11	12	5.1 \pm 0.63 **
12	15	11.2 \pm 1.01 **
13	12	5.6 \pm 0.75 **

* : Control group

** : Significantly different from non-treated control group

Table 3. Concentration of urine bioppterin in DEN treated rat

Duration (Week)	No. of rats	Bioppterin (μ mol/mg creatinine)
0*	7	20.1 \pm 6.89
11	7	1077.6 \pm 287.78**
12	15	1253.4 \pm 217.9**
13	12	1407.9 \pm 209.9**
14	5	1684.4 \pm 127.8**

* : Control group

** : Significantly different from non-treated control group(p<0.05)

Urine bioppterin은 대조군의 정상치(20.1 nmol/mg creatinine)보다 월등히 증가되어 있었고, 13주령과 14주령에는 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 이외 11주령과 12주령, 12주령과 13주령 사이에는 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

고 찰

發癌發生機轉과 過程에 대해서는 많은 연구가 계속되고 있으나 아직 완전히 규명되지 않고 있는 실정이며 더욱이 여기에는 여러 화학적 물질, 방사선 및 virus 등의 요인이 종양 유발에 크게 기인한다고 알려져 있다. 최근에는 급격한 산업화로 인한 많은 오염 물질이 생물체의 유전자에 영향을 미쳐 돌연변이 및 각종 암을 유발시킴으로 인해 이 문제 역시 심각하게 대두되고 있다.

발암물질의 일종인 DEN은 aminoazo dyes를 투여하였을 때 나타나는 간에서의 변화인 괴사(necrosis) 및 증식(hyperplasia)과 과호염기성(hyper basophilia), 그리고 종양(tumor)의 발생을 일으키는 것으로 알려져 있다³⁰. DEN은 cytochrome p450에서 生活性化(bioactivation)되어 smooth endoplasmic reticulum이 많은 中心靜脈 주변에 괴사를 誘發시키고 脂肪症(steatosis)을 유발한다. 간 cytosol 내의 단백질 농도는 대조군보다 각 주령별 DEN 투여 군 모두에서 감소

하였지만 뚜렷한 주령별 변화에 대한 유의성은 인정되지 않아 진행상태와는 크게 관여하지 않음을 알 수 있었다.

Shiota등¹⁷은 개와 고양이에서 4개의 양성종양(hyperplasia, hemangiopericytoma, leiomyoma, mammary hyperplasia)과 7개의 악성종양(mammary adnecarcinoma, fibrosarcoma, kupffer cell carcinoma, astrocytoma, rhabdomyosarcoma)등 11개의 종양조직에서의 cytosol enzyme activity를 측정하였는데 2개의 양성종양에서 뚜렷한 상승을 보였고(leiomyoma : 10 NADPH nmol/min \cdot ml) 6개의 악성종양에서 significant activity를 보여서(mammary adenoca. : 8 NADPH nmol/min \cdot ml, fibrosarcoma : 15 NADPH nmol/min \cdot ml, kupffer cell carcinoma : 18 NADPH nmol/min \cdot ml, rhabdomyosarcoma : 8 NADPH nmol/min \cdot ml, astrocytoma : 15 NADPH nmol/min \cdot ml) 87%의 악성종양과 50%의 양성종양에서 20 α -HSD의 활성도를 나타낸다고 보고하였다.

종양에서의 20 α -HSD의 생리학적 및 병리학적 역할은 현재까지 구체적으로 밝혀지지 않았지만, 한가지 가능한 추측은 20 α -HSD가 progesterone을 불활성 steroid인 20 α -dehydroprogesterone으로 대사시켜 progesterone의 세포 독성 작용으로 부터 보호함으로써 20 α -HSD가 종양 세포에서의 생존 인자로서 역할을 한다는 것이다. Progesterone은 T세포 등을 포함한 일부 세포에서의 세포 독성 작용 역시 밝혀져 있다¹⁷.

20 α -HSD는 1985년 Crum 등³²은 현저한 反血管生成(antiangiogenic) 작용을 하는 17 α -hydroxyprogesterone을 대사시킨다고, 신생 혈관 생성(neovascularization)은 고형 종양의 성장, 염증, 상처 치유 및 면역 반응에서의 여러 병리학적 과정의 특징으로 보고 한 바 있다.

20 α -HSD의 활성도는 대조군에 비해 크게 증가하였고 11주령에 뚜렷한 증가가 있었으며 12주령에 최고치를 나타내다가 13주령 부터는 다시 감소하는 양상을 보였고 그 증가율은 작게는 3배에서 12주령에서는 거의 8배까지 증가하는 양상을 나타내었다. 이는 발암물질 투여 rat에서의 단백질 농도를 통한 발암 有無의 진단 방법 및 다른 혈액학적 분석 방법 등과 비교하였을 때 정확한 종양진단 방법의 하나로 부각되었다.

과거 10년 동안 체액에서의 neopterin 증가는 hyperphenylalaninaemias, 악성종양, 수종의 감염성 질환 상태에서 보고되었다³³⁻³⁵.

그 후에도 많은 보고가 있었으나, 그 중에는 neopterin 농도와 각종 질환 예후의 예측 능력과 相關關係가 있다는 보고도 많다²¹⁻²⁴. 이와 같은 보고로 인해 neopterin의 측정은 임상의학에서는 폭넓게 사용되고 있다.

본 실험에서 urine bioppterin level은 Duch 등¹⁸ 의한 normal rat의 정상치인 20.1 nmol/mg creatinine에 비해서 상

당히 증가되었는데, 이는 각종 암성 질환에 있어서 biopterin의 level이 증가한다는 많은 보고와 일치하는 소견으로서 아직 질병에 대한 특이도와 민감도에 대해서 많은 연구가 이루어져 있지 않고 있다.

Biopterin level의 증가와 neoplasm과의 관계에 대한 기전은 확실히 밝혀져 있지는 않았지만 이번 실험 결과를 볼 때 앞으로 biopterin의 neoplasm에 대한 objective index로서의 가치에 대한 연구가 활발해 졌으면 한다.

조직과 尿에서의 neopterin농도는 종에 따라 뚜렷한 차이가 있다. 인체 조직에서는 Neopterin과 biopterin 모두가 검출되었고, 반면에 rat에서는 biopterin만 검출되었고 neopterin은 검출되지 않았으며 사람과 원숭이의 조직과 체액에서는 다른 포유동물에 비교해서 많은 양이 있다고 알려져 있다³⁶. Neopterin은 dihydroneopterin triphosphate에서 만들어진 것으로 GTP-CH의 산물인데, urinary neopterin의 tissue source는 알려져 있지 않다. 이러한 사실은 unconjugated pteridines의 대사는 종에 따라서 다르다는 것을 의미하고, 다른 종에서 발견되는 urinary pteridines에 대해 더 연구할 필요가 있다고 생각된다^{33,36}.

사람에서 neopterin은 악성 血液癌, 泌尿器系癌, 小兒 환자에서의 암의 대부분에서 상승이 관찰된다. Biopterin(neopterin)은 암의 침범 범위와 심화도와 관련이 깊다²¹. 최근 이런 현상들이 세포성 항암 반응의 결과라는 의견이 제시되고 있지만 아직 실험적인 증거가 뒷받침되지는 못하고 있다. 그렇지만 결론적으로 biopterin(neopterin in human) 표식자가 암에서는 비 특이적이지만 암의 침범 범위와 심화도를 나타내는 지표가 된다는 보고에 근거, 본 연구를 수행한 결과 실험동물에서도 적용이 가능함을 알 수 있었다.

결 론

Rat에서 12주 동안 일반 음수만 투여한 대조군과 각 주령별로 DEN을 음수 투여한 본 실험에서 얻은 결과는 다음과 같다.

1. Liver cytosol protein은 대조군에 비해서 각 주령별 측정치는 유의하게 감소하였고($p < 0.05$), 주령별 변화는 주수가 경과할수록 감소했지만 통계적으로 유의하지는 않았다.
2. 20α -HSD의 활성도는 대조군에 비해서 주수가 경과할수록 뚜렷이 증가되어 있었다($p < 0.05$).
3. Urine biopterin level은 정상 값에 비해서 각 주령별의 level은 상당히 높은 수준으로 증가되어 있었고($p < 0.05$), 주령별로 주수가 경과할수록, 13주령과 14주령 사이에는 뚜렷

이 증가되어 있었다($p < 0.05$).

이상의 결과에서 DEN을 투여한 rat의 간암 유발 모델에서 20α -HSD 활성도와 尿中 biopterin치 측정은 간암 유발에 대한 유용한 진단 방법으로 충분히 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

1. Ahn B., Han B. S., Kim D. J., Ohshima H. Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase and 3-nitrotyrosine in preneoplastic and neoplastic rat livers induced by continuous infusion of N-nitrodiethylamine with osmotic mini-pumps. *Carcinogenesis*. 1999, 20, 1137-1344.
2. Dunsford HA., Karnasuta C., Hunt J. M., Sell S. Different lineages of chemically induced hepatocellular carcinoma in rat defined by monoclonal antibodies. *Cancer Research*, 1989, 49, 4894-4900.
3. Kim D. J., Lee K.K., Han B. S., Ahn B., Bae J. H. Biphasic modifying effect of indole-3-carbinol on diethylnitrosamine-induced preneoplastic glutathione-S-transferase placental form-positive liver cell foci in Sprague-Dawley rats. *Jpn J Cancer Res*. 1994, 5, 378-583.
4. Kovalszky I., Szeberenyi S. Z., Zalatai A. Modification of DENA-induced hepatocarcinogenesis by CCl₄ cirrhosis. Comparison of the enzyme patterns. *Carcinogenesis*, 1992, 13(4), 773-778.
5. Laconi E., Denda A., Sarma D. S. R. 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(8), 1771-1775.
6. Luciana T., Paolo P., Mario U. D. 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(10), 1929-1932.
7. Matsufuji H., Ueo H., Mori M. Enhancement of esophageal carcinogenesis induced in rats by N-amyl-N-methylnitrosamine in the presence of 12-O-tetradecanoylphorbol 1-13-acetate. *JCNI*. 1987, 79, 1123-1129.
8. Shirai T., Hirose M., Ito N. Medium-term bioassay in rats for rapid detection of the carcinogenic potential of chemicals. In: The use of short- and medium-term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation. D.B. McGregor, J. M. Rice, and S. Venitt. eds. IARC Scientific Publ. No. 146, IARC. Lyon. France. 1999, 251-271.

9. Tamano S., Merlino G. T., Ward J. M. 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(9), 1791-1798.
10. Kang C. B., Ha W. S., Kwak S. D., Kim C. K. Development of apoptosis model and bioimmunity responses in experimental animal I. Induction and indicator of apoptosis and hepatic tumorigenesis. *Korean J Vet Clin Med*. 1999, 16(1), 100-107.
11. Ha, W.S., Kim, C.K., Song, S.H. and Kang, C.B. Study on mechanism of multistep hepatotumorigenesis in rat : Development of hepatotumorigenesis. *J Vet Sci* 2001. 2(1), 53-58.
12. Lee H. Y., Chi G. Z. Morphological changes of liver induced diethylnitrosamine in the rat. Institute of basic science of Inhwa University. 1992, 13(2), 85-96.
13. Scherer E. Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis. *Biochemica Biophysica Acta*. 1984, 738, 219-236.
14. Wiest WG. Conversion of progesterone to 4-progmen-20 α -OL-3-one by rat ovarian tissue in vitro. *J Biol Chem* 1959, 234, 3115-312.
15. Wiest WG, Vilcox WR. Purification and properties of rat ovarian 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* 1961, 236, 2425-2428.
16. Wiest WG, Kidwell WR, Balogh K. Progesterone catabolism in the rat ovary : A regulatory mechanism for progestational potency during pregnancy, *Endocrin*. 1968, 82, 844-859.
17. Shiota. K. Sasaki N. Hattori N. Miura R. Hasefawa T. Jin XG. Noda K. Takahashi M. Cytosolic 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity in spontaneous neoplasia in the dog and cat. *J Vet Med Sci* 1991, 53(4), 549-552.
18. Duchs, D. S., Bowers, S. W., Woolf, J. H. and Nichol, C. A. Biopterin cofactor biosynthesis : GTP cyclohydrolase, neopterin and biopterin in tissue and body fluids of mammalian species. *Life Sci*. 1984, 35(18), 1895-1901.
19. Troppmair, J. Nachbaur, K., Herold, M., Aulitzky, W., Tilg, H., Bieling, P., Kotlan, B., Flener, R., Mull, B. et al. In vitro and in vivo studies on the induction of neopterin biosynthesis by cytokines, alloantigens and lipopolysaccharide(LPS). *Clin Exp Immunol*. 1988, 74(3), 392-397.
20. Huber, C., Batchelor, J. R., Fuchs, D., Hausen, A., Lang, A., Reibnegger, G., Swetly, P., Troppmair, J. and Wachter, H. Immune-response associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J Exp Med*. 1984, 160(1), 310-316.
21. Hausen, A., Fuchs, D., Guber, H. et al. Urinary neopterin in the assessment of lymphoid and myeloid neoplasia, and neopterin levels in haemolytic anaemia and benign monoclonal gammopathy. *Clin Biochem* 1982, 15(1), 34-37.
22. Reibnegger, G. J. Bichler, A. H., Dapunt, O., Fuchs, D. N., Hetzel, H. M., Lutz, H., Werner, E. R. and Wachter, H. Neopterin as a prognostic indicator in patients with carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res*. 1986, 46(2), 950-955.
23. Aulitzky, W. E., Tilg, H., Niederwieser, D., Riccabona, G., Margreiter, R, Pfaller, W. and Huber, C. Comparison of serum neopterin levels and urinary neopterin excretion in renal allograft recipients. *Clin Nephrol*. 1988, 29(5), 248-252.
24. Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Werner, E. R. and Dierich, M. Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity application in HIV infection. *Immunol Today*. 1988, 9(5), 150-155.
25. Niederwieser, D. et al. Neopterin as a new biochemical marker in the clinical monitoring of bone marrow transplant recipients. *Transplantation*. 1984, 38, 497-500.
26. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976, 72, 248-254.
27. Noda, K., Shiota, K. and Takahashi, M. Purification and characterization of rat ovarian 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1990, 1079, 112-118.
28. Niederwieser, A., Staudenmann, W. and Wetzel, E. High performance liquid chromatography with column switching for the analysis of biogenic amine metabolites and pterins. *J Chromatogr*. 1984, 290, 237-246.
29. Werner, E. R., Fuchs, D., Hausen, A., and Reibnegger, G. Simultaneous determination of neopterin and creatinine in serum with solid-phase extraction and on-line elution liquid chromatography. *Clin Chem*. 1987, 33(11), 2028-2033.
30. Werner, E. R., Bichler, A., Daxenbichler, G., Fuchs, D., Fuith, L. C. Hetzel, H., Reibnegger, G. and Wachter, H. Determination of neopterin in serum and urine. *Clin Chem*. 1987, 33(1), 62-66
31. Farber E. Possible etiologic mechanisms in chemical carcinogenesis. *Exp Health Perspectives*. 1987, 75, 65-70.
32. Crum, R., Szabo, S. and Forkman, J. A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or

- a heparin-fragment. *Science*. 1985, 230, 1375-1378.
33. Hey, H. and Rokos, H. A new immunoassay for the determination of neopterin in body fluids. *Bio Chem Hoppe-Seyler*. 1989, 370, 385-386.
34. Rokos, H. et al. Determination of neopterin and reduced neopterins by radioimmunoassay. In : Wachter H, Curtius C., Pfeleiderer W. eds. *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*. De Gruyter, Berlin-New York. 1985, 4, 73-84.
35. Wachter, H. A., Hausen, A. and Grassmayr, K. Increased urinary excretion of neopterin in patients with malignant tumors and virus disease. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem*. 1979, 360(12), 1957-1960.
36. Fukushima, T. and Nixon, J. C. Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. *Anal Biochem*. 1980, 102(1), 176-188.