

9, 10-Dimethyl-1, 2-Benzanthracene에 의해 유발된 슬관절 종양에 관한 실험적 연구

전북대학교 의과대학 병리학교실

강명재 · 이동근 · 최삼임 · 김상호

서 론

9, 10-Dimethyl-1, 2-Benzanthracene (이하 DMBA라 약함)은 방향성 탄수화물의 일종으로 강력한 발암작용을 가지는 물질로 알려져 있다¹⁾. 즉, Hamster계 백서의 피부도포로서 흑색종이 유발되고²⁾, 혀에 도포함으로써 편평상피암이 유발되며³⁾, 백서에 경구투여시 유방암이⁴⁾, 정맥내 투여시 백혈병이 유발된다고⁵⁾ 하였다.

근래에는 DMBA를 관절내에 주입하여 여러가지 종양을 유발시킨 실험보고를 접할 수 있는데 Ghadially와 Roy⁶⁾는 Albino계 백서의 슬관절에 DMBA를 반복주입하여 활막육종 및 섬유육종의 발생을 보고하였고, Santis등⁷⁾은 상기한 바와 유사한 실험을 통하여 활막육종, 섬유육종, 거대세포육종 및 악성섬유조직구종의 발생을 보고하였다. 그러나, Homma등⁸⁾은 Albino계 백서를 이용한 실험에서, 그리고, Sakamoto등⁹⁾은 Wistar계 백서를 이용한 실험에서 DMBA의 관절내 주입에 의하여 오직 악성섬유조직구종만이 발생된다고 보고하였다. 이상과 같이 관절내 DMBA 주입에 의한 종양의 유발은 저자에 따라 그리고 이용된 실험동물의 종류에 따라 그 성적이 일치하지 않으며 또한 Sprague-Dawley계 백서를 이용한 연구보고는 찾아보기 어렵다.

따라서, 저자는 Sprague-Dawley계 백서의 슬관절내에 DMBA를 반복 주입하여 기간별 종양발생의 빈도 및 유발 종양의 형태학적 분석을 목적으로 일련의 실험을 계획하였으며, 그 실험의 일환으로 조기에 유발된 종양 조직의 형태학적 분석을 추구코저 본 실험을 시도하였다.

재료 및 방법

실험동물은 일정기간 동일조건하에서 사육한 생후 10-12주된 체중 200 g 내외의 Sprague-Dawley계 백서를 암수 구별없이 사용하였으며 다음과 같은 실험군으로 구분하였다.

대조군

액체파라핀만을 투여한 군(10수)

실험군

DMBA (Sigma社製) 투여군(30수)

대조군은 액체파라핀 0.1 ml을 26G 주사침을 사용하여 좌측 슬관절내에 4주간격으로 3회 주입하였고, 실험군은 액체파라핀을 용매로 하여 제조한 2% DMBA용액 0.1 ml을 대조군과 동일한 방법으로 백서의 좌측 슬관절내에 주입하였다.

처음 주입 4주 후부터 주입한 슬관절부위를 축지하여 종양발생여부를 확인하였고, 축지되는 종양에 대하여는 1주 간격으로 장축 및 단축을 측정하여 종양의 크기를 측정하였으며, 12주 후에 대조군 및 종양이 축지된 실험군의 백서를 희생시켜 육안적 관찰 후 종양을 포함한 주위 근육 및 골격을 위하여 조직학적 및 효소조직화학적 검색을 시행하였다. 조직학적 및 조직화학적 검색을 위한 조직은 10% 중성원충포르말린 용액에 24시간 고정시킨 후 골격조직의 탈회를 위하여 5% 질산용액에 넣어 36시간 부치하였다. 10% 중성원충포르말린 용액에 고정시킨 조직과 탈회시킨 조직은 통상의 파라핀 포매 후 3~5 μ m의 박편을 만들어 Hematoxylin-Eosin (H&E), periodic acid Schiff (PAS), alcian blue, Van-Gieson,

*본 논문의 요지는 1987년 10월 23일 대한병리학회 제39차 추계학술대회에서 발표되었음.

prussian blue, 망상조직을 보기 위한 도은 염색 및 phosphotungstic acid hematoxylin (PTAH) 염색을 시행하였다. 효소조직화학적 검색에 사용한 조직은 효소의 활성도를 유지시키고 조직의 변형을 막기 위하여 액체질소에 넣어 급속냉각시켜 고정한 후 8~10 μ m의 동결박편을 만들어 acid phosphatase, alkaline phosphatase 및 α -naphthyl acetate esterase 등의 염색을 시행하여 광학현미경하에서 검경하였다.

실험 성적

발생빈도

액체파라핀을 용매로 하여 제조한 2% DMBA용액을 실험군의 백서 좌측 슬관절내에 첫 주입후 4주 경과시 부터 종양의 발생여부를 확인하기 위하여 좌측 슬관절

부위를 1주간격으로 검사하였는데 촉진되는 단단한 종괴의 단경이 1.0 cm이상인 것을 종양발생으로 인정하였다. 첫 주입후 8주까지는 실험군 30마리에서 한 마리도 종양을 관찰할 수 없었고, 9주째에는 1마리, 10주째에 1마리, 11주째에 2마리, 희생시키기 전인 12주째에 2마리 등 모두 6마리에서 종양이 촉진되어 전체 30마리의 실험군에서 20%의 종양발생빈도를 보였다(Table 1).

육안적 소견 (Fig. 1 & 2)

DMBA 투여군 30마리중 6마리에서는 대조군에 비해 좌측 슬관절 부위의 종양성 증대와 정도의 증가를 볼 수 있었으며, 절개면에서는 여러 색상의 변화를 볼 수 있었으나, 피하조직과 유착이나 종양의 괴사등은 관찰할 수 없었다.

종양의 크기는 dial caliper (Mitutoyo 社製, M.N.

Table 1. The time and frequency of tumor development

Elapsed time after first injection of DMBA (week)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Number of tumor developed animal (% of tumor development)*	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (33)	1 (6.6)	2 (13.3)	2 (20)

* The total experimental animals injected with 2% DMBA solution was thirty.

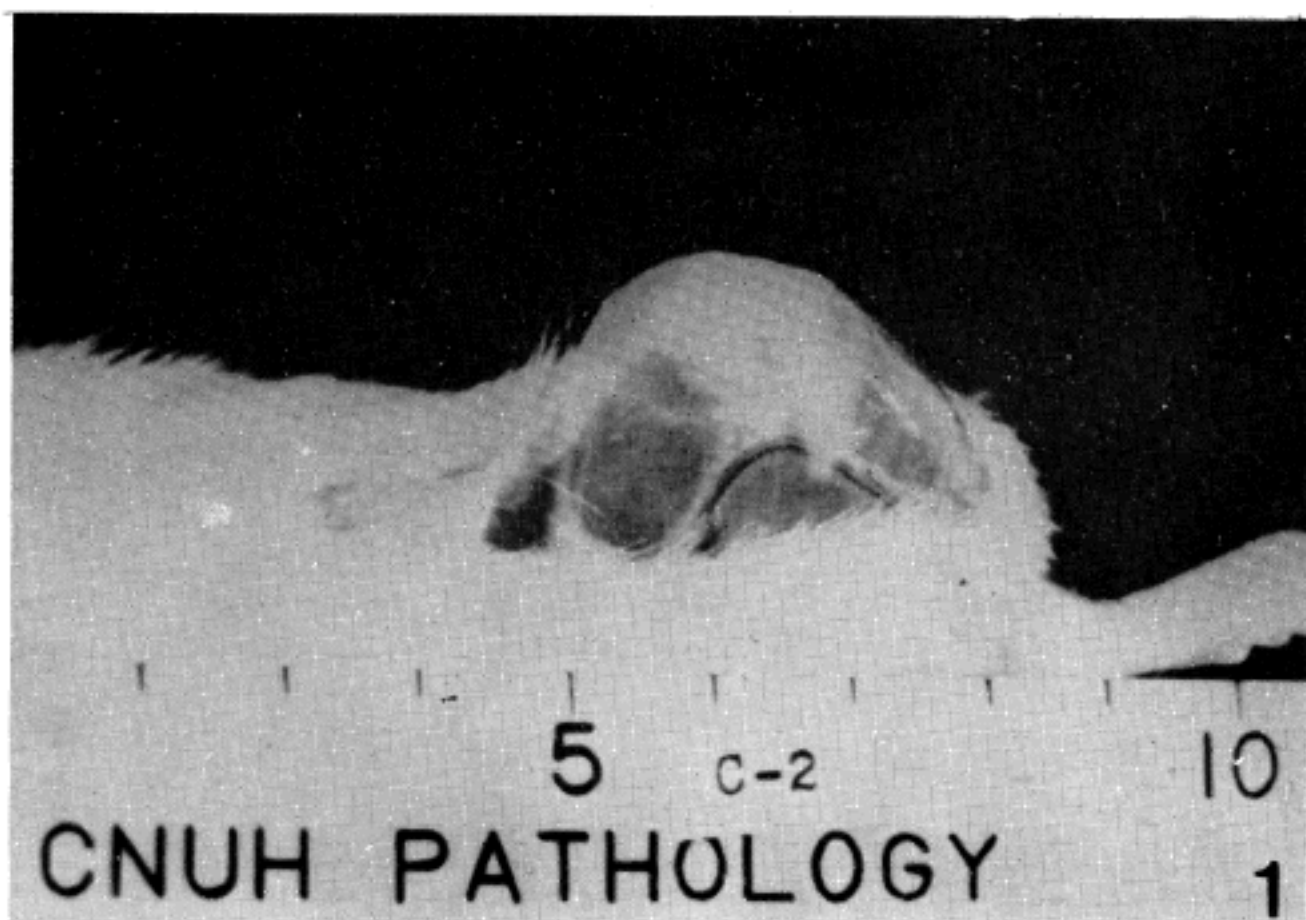


Fig. 1. Gross finding of paraffin injected control group showing paraffin granuloma with no tumor mass.

84)를 사용하여 피부 및 그의 부속기를 포함한 장축 및 단축을 측정하였다. 종양의 계측치를 보면, 9주째에 발생한 한 마리는 최초 측지당시 1.4×1.2 cm, 1주후에 1.5×1.2 cm, 2주후에 1.6×1.3 cm, 3주후에는 1.7×1.5 cm이었고, 10주째에 발생한 한 마리는 염증이 동반된 것으로 최초의 계측결과는 1.2×1.0 cm, 1주후에 1.3×1.0 cm, 2주후에 1.4×1.2 cm이었다. 11주째에 발생한 두 마리는 최초 측지당시 1.3×1.2 cm, 1주일후에 1.4×1.2 cm이었고, 12주째에 발생한 두 마리는 1.4×1.0 cm의

평균치를 각각 보여 주었는데, 시간이 지남에 따라 약간의 크기의 증가는 있었지만, 악성이라고 생각할 만한 급속한 크기의 증가는 인정할 수 없었다(Table 2).

조직학적 소견 및 조직화학적 소견

파라핀 포매조직의 H&E, PAS, alcian blue, Van-Gieson, prussian blue, 도은염색 및 PTAH 염색 후 광학현미경하에서 검경한 소견은 다음과 같다.

대조군은 전에서 파라핀주입에 의한 육아종 및 염증

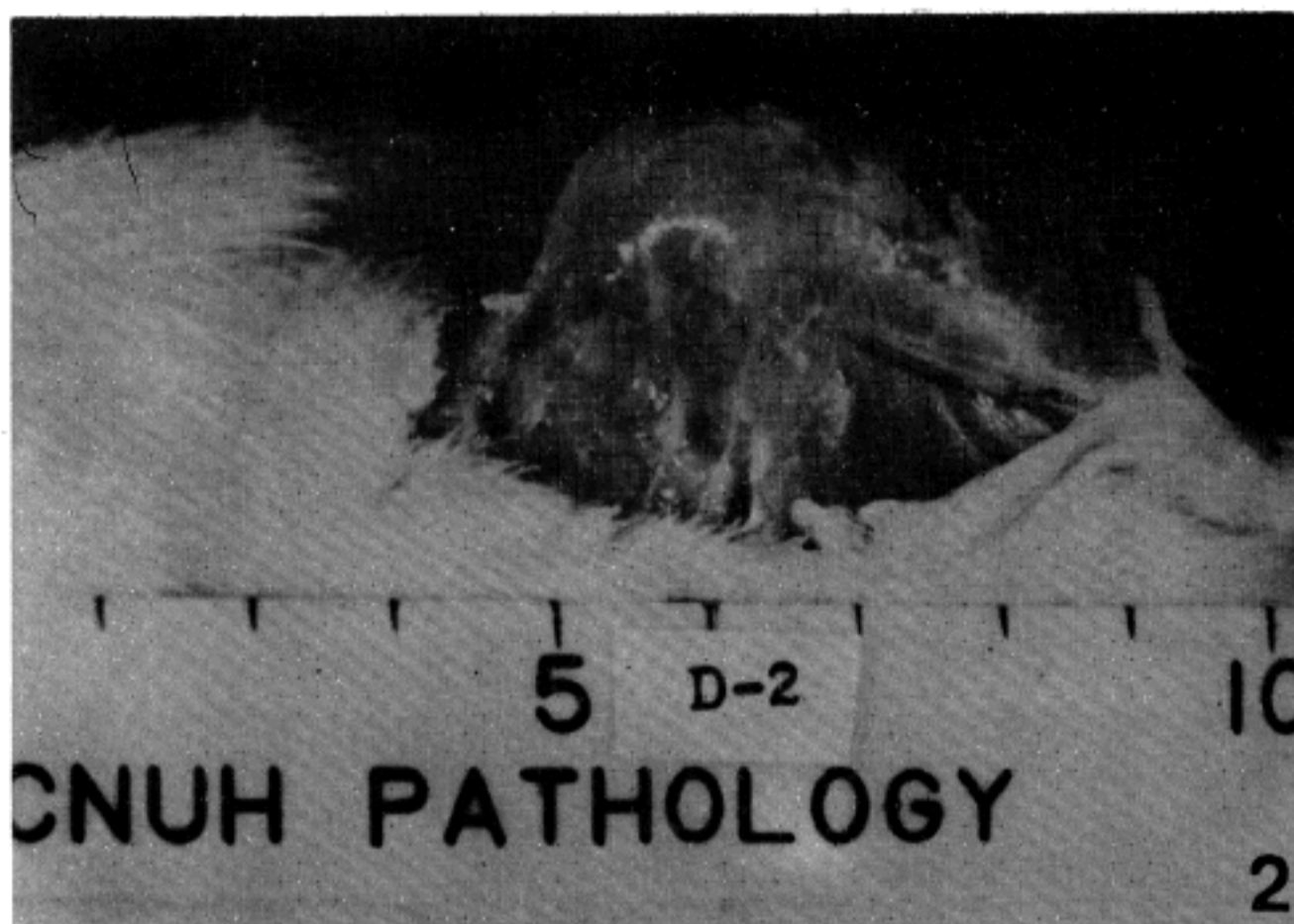


Fig. 2. Gross finding of DMBA injected group showing well developed tumor mass around the knee joint.

Table 2. The sizes of the DMBA-induced tumor masses

Elapsed time after first injection of DMBA (week) Tumor developed animal	9	10	11	12
1	1.4cm x 1.2cm	1.5cm x 1.2cm	1.6cm x 1.3cm	1.7cm x 1.5cm
2		1.2cm x 1.0cm	1.3cm x 1.0cm	1.4cm x 1.2cm
3				
4			1.3cm x 1.2cm*	1.4cm x 1.2cm*
5				
6				1.4cm x 1.0cm**

The measurements of these tumors are represented by multiplying long axis by short axis.

* Mean size of two tumor masses, 3 and 4

** Mean size of two tumor masses, 5 and 6

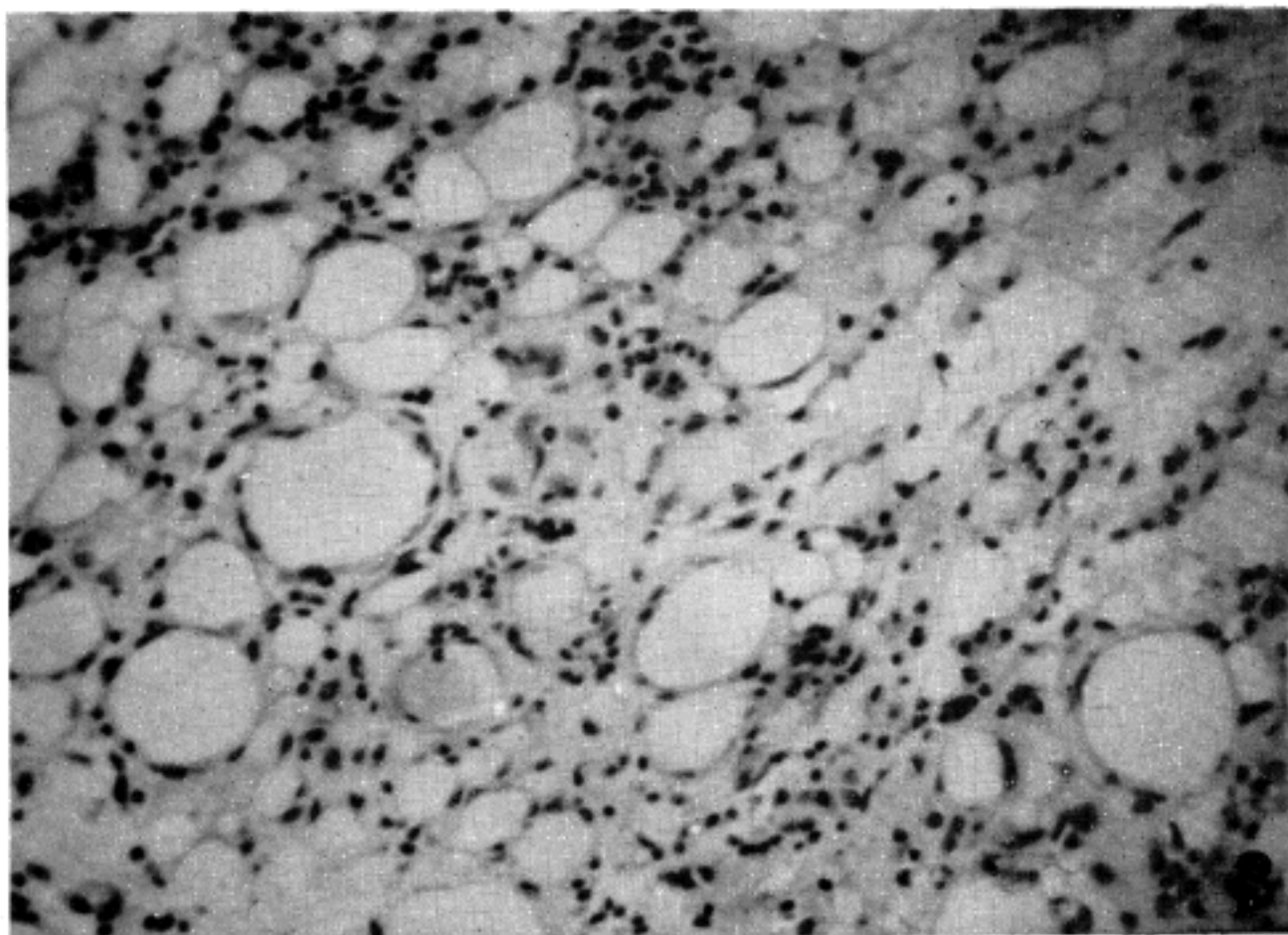


Fig. 3. Paraffin granuloma in control group. Characteristic epithelioid cells and paraffin vacuoles are seen. Lymphocytic infiltrations are also present. (H-E, x100).

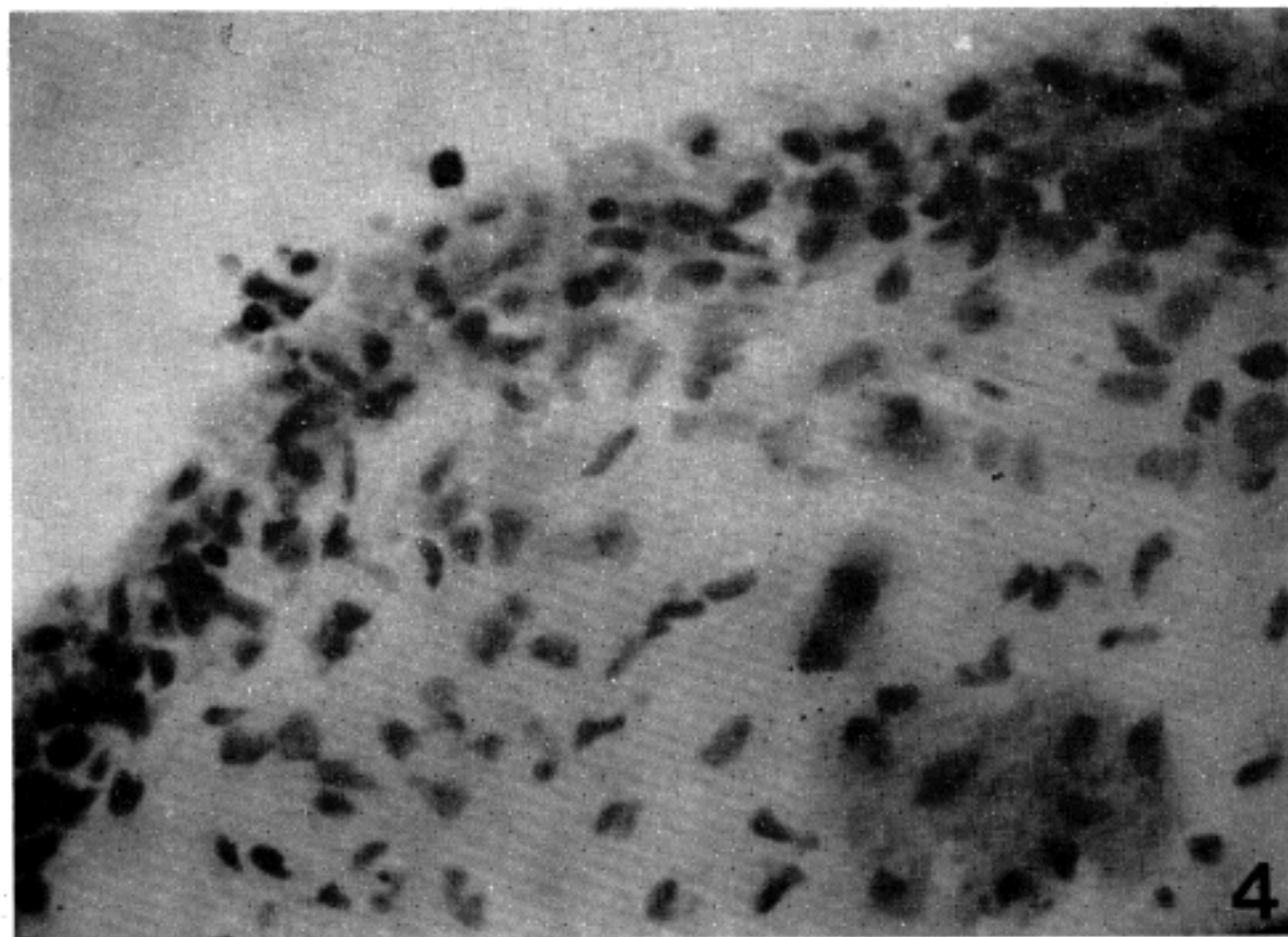


Fig. 4. Marked synovial proliferation without dysplasia in DMBA injected group. (H-E, x400).

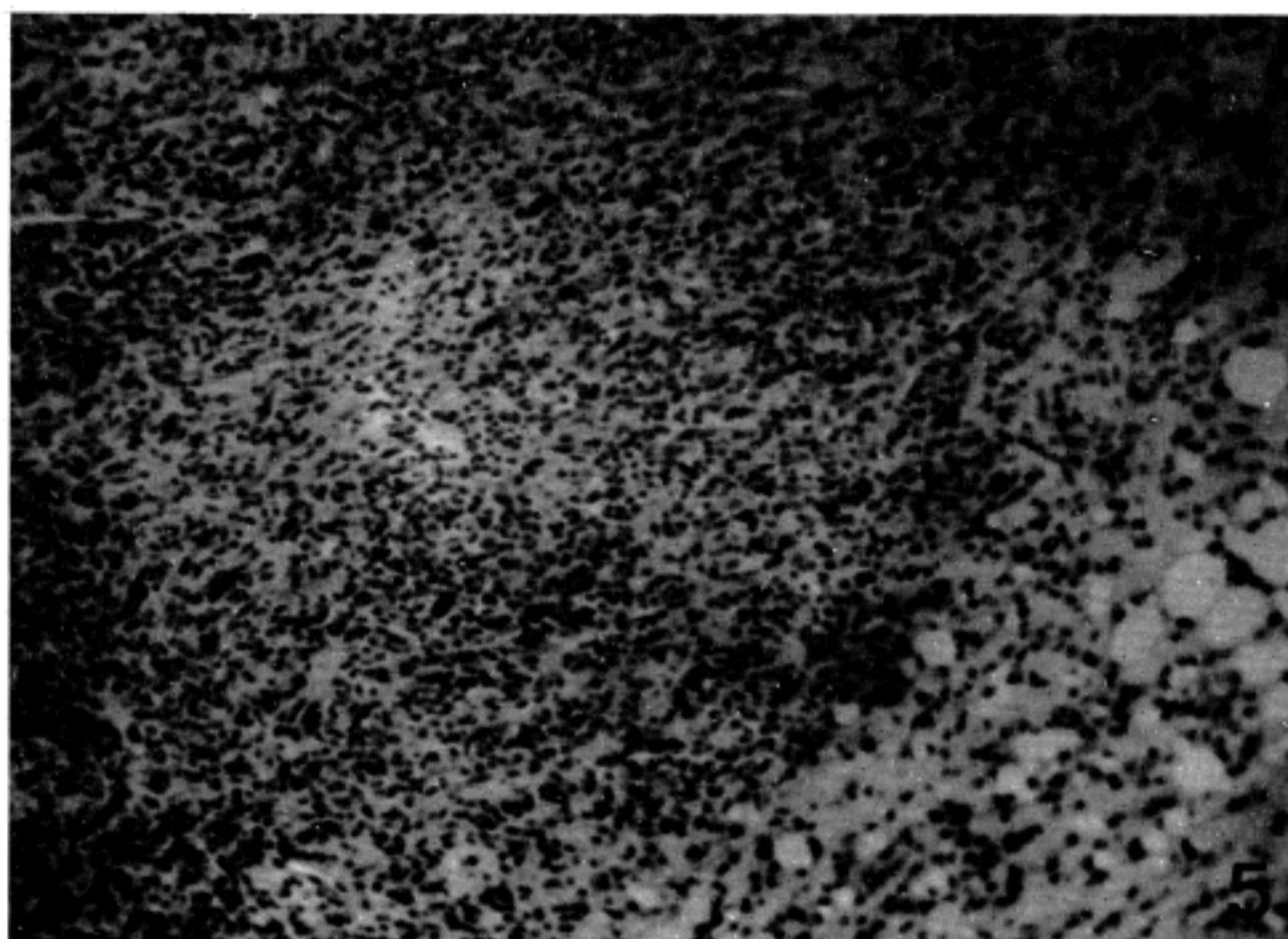


Fig. 5. Features of fibrous histiocytoma with focal dysplasia in DMBA injected group. (H-E, x400).

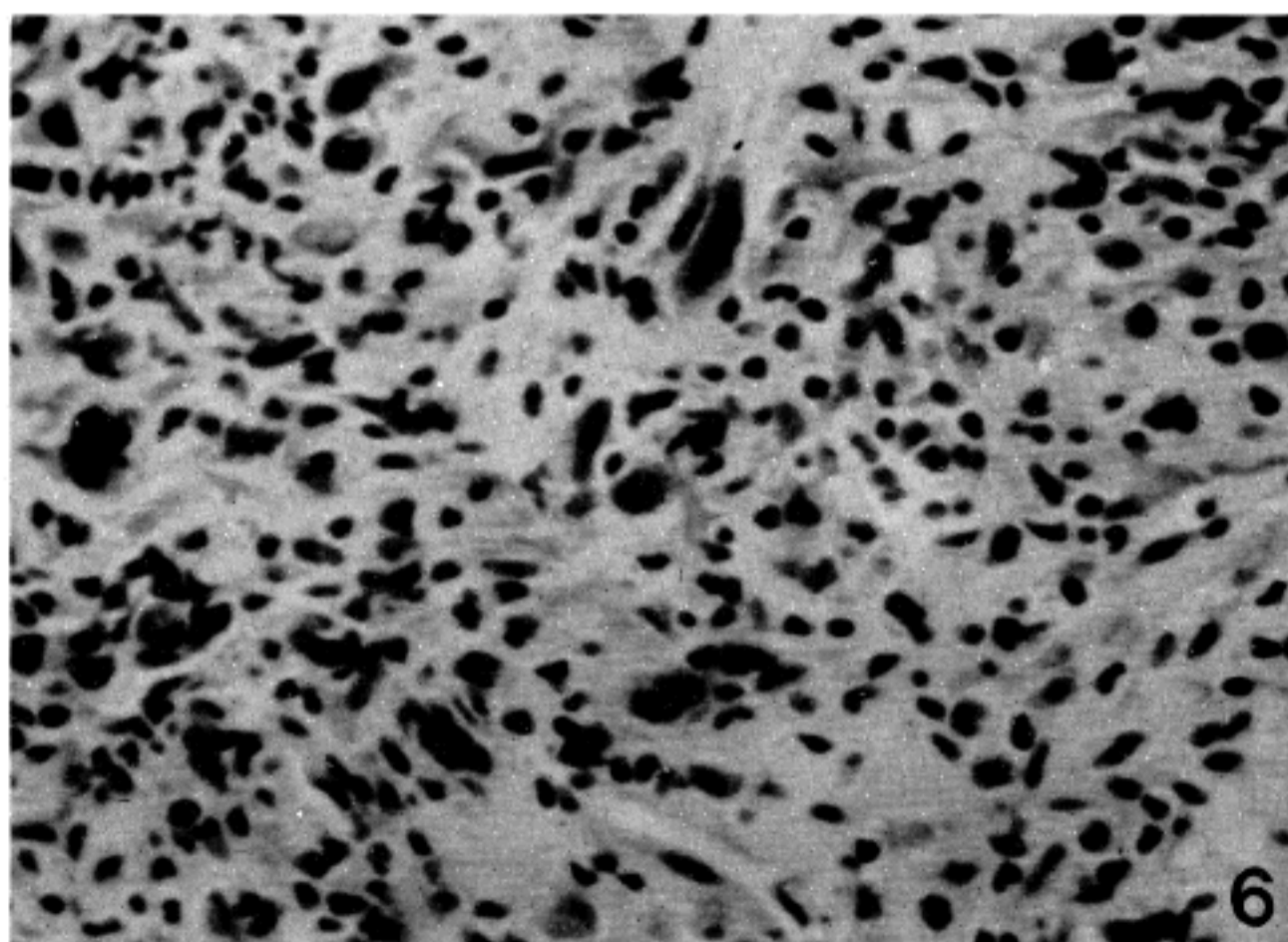


Fig. 6. Higher magnification of Fig. 5. Pleomorphic bizarre dysplastic cells are shown. (H-E, x400).

세포의 침윤외에 특기할 만한 조직학적 소견은 볼 수 없
었다(Fig. 3). 종양이 발생한 6마리의 백서에서는 다양
한 조직학적 소견을 보였는데, 대부분의 종양에서 섬유
아세포의 증식, 교원섬유의 형성, 다수의 다핵거대세포

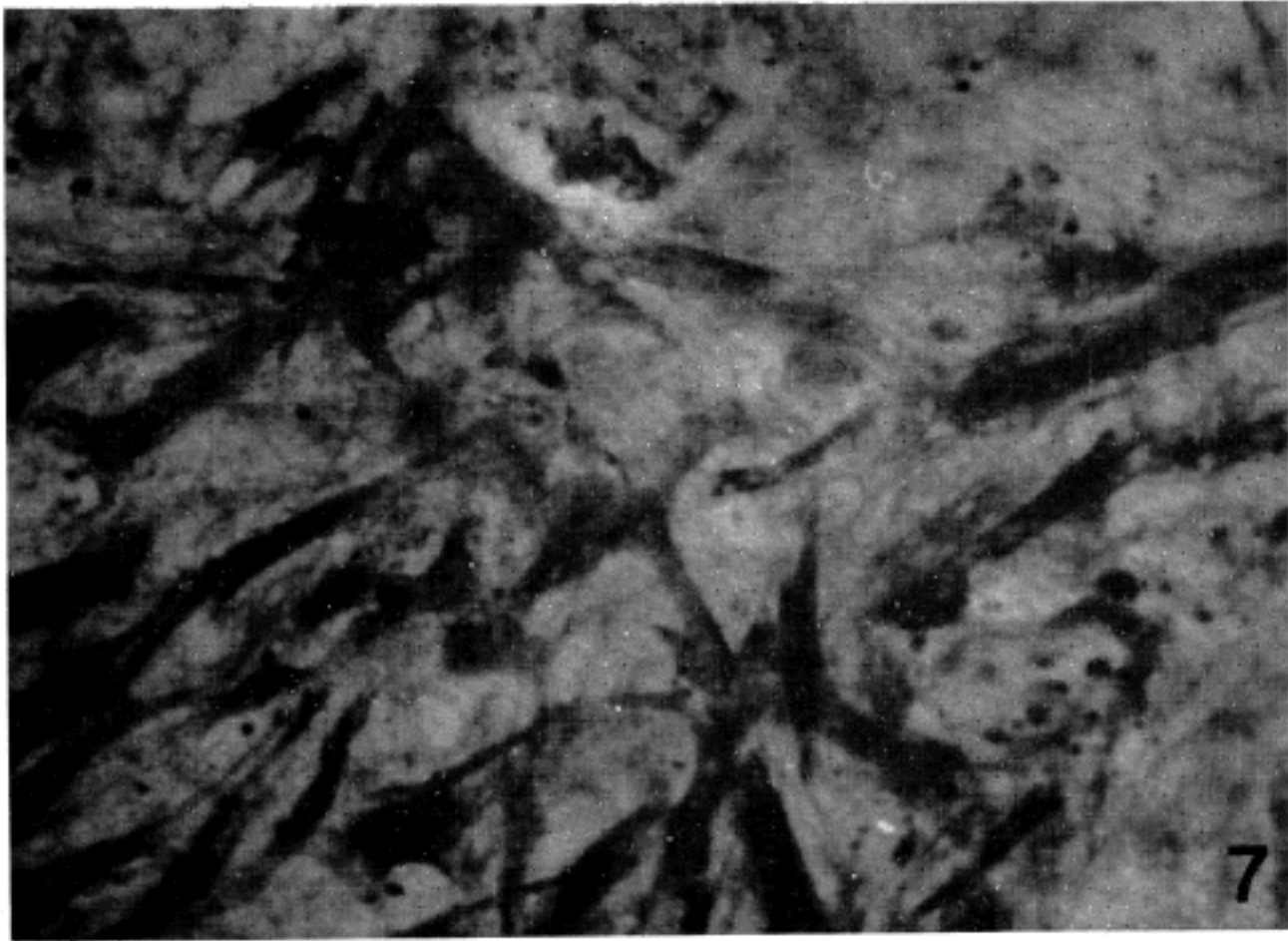


Fig. 7. PAS positive tumor cells are shown in DMBA injected group. (H-E, x400)

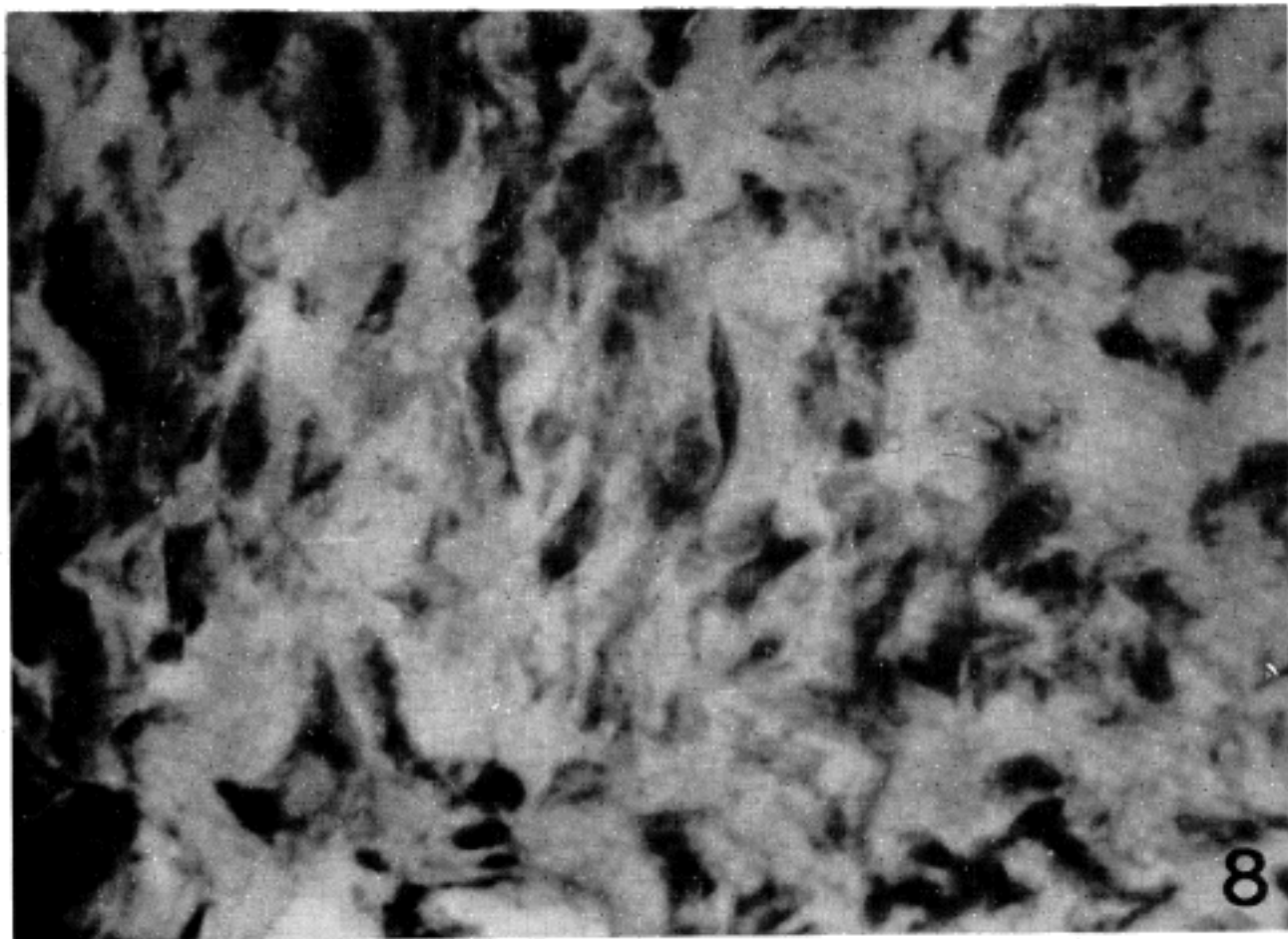


Fig. 8. In DMBA treated group, tumor cells exhibiting acid phosphatase reaction which is characteristic feature of fibrous histiocytoma. (Acid phosphatase, x400)

출현, 주로 림프구로 구성된 염증세포의 침윤, 다수의 핵분열 소견 및 조직구증식을 관찰할 수 있었으며, 이들

조직구는 세포의 크기가 같고, 수포성이며, 다염색체성인 핵과 분명한 핵소체를 보였으나 세포질의 양은 아주

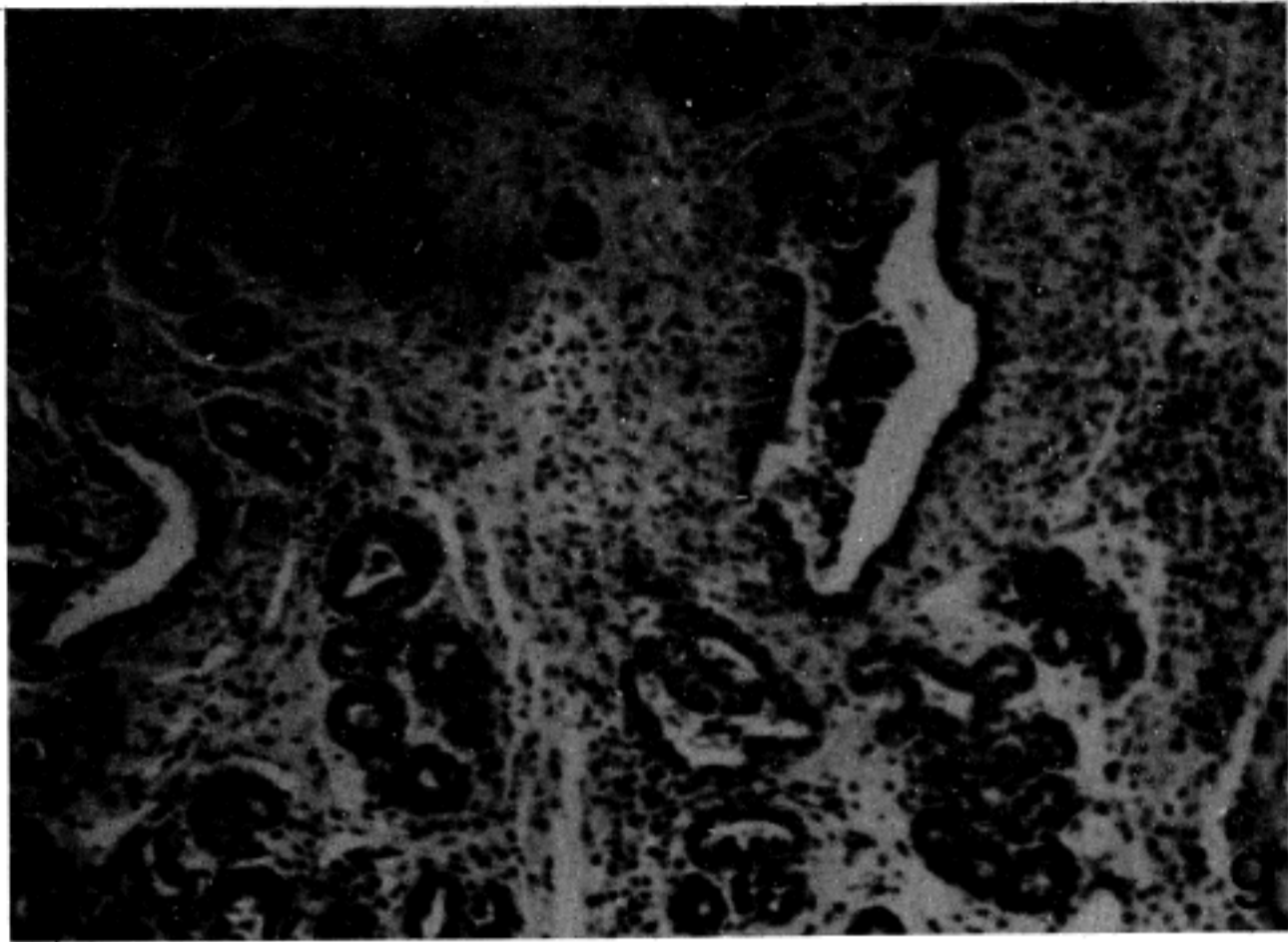


Fig. 9. Adenomatous component of DMBA induced tumor. Relatively monotonous glandular and duct-like structures are shown. (H-E, x100)

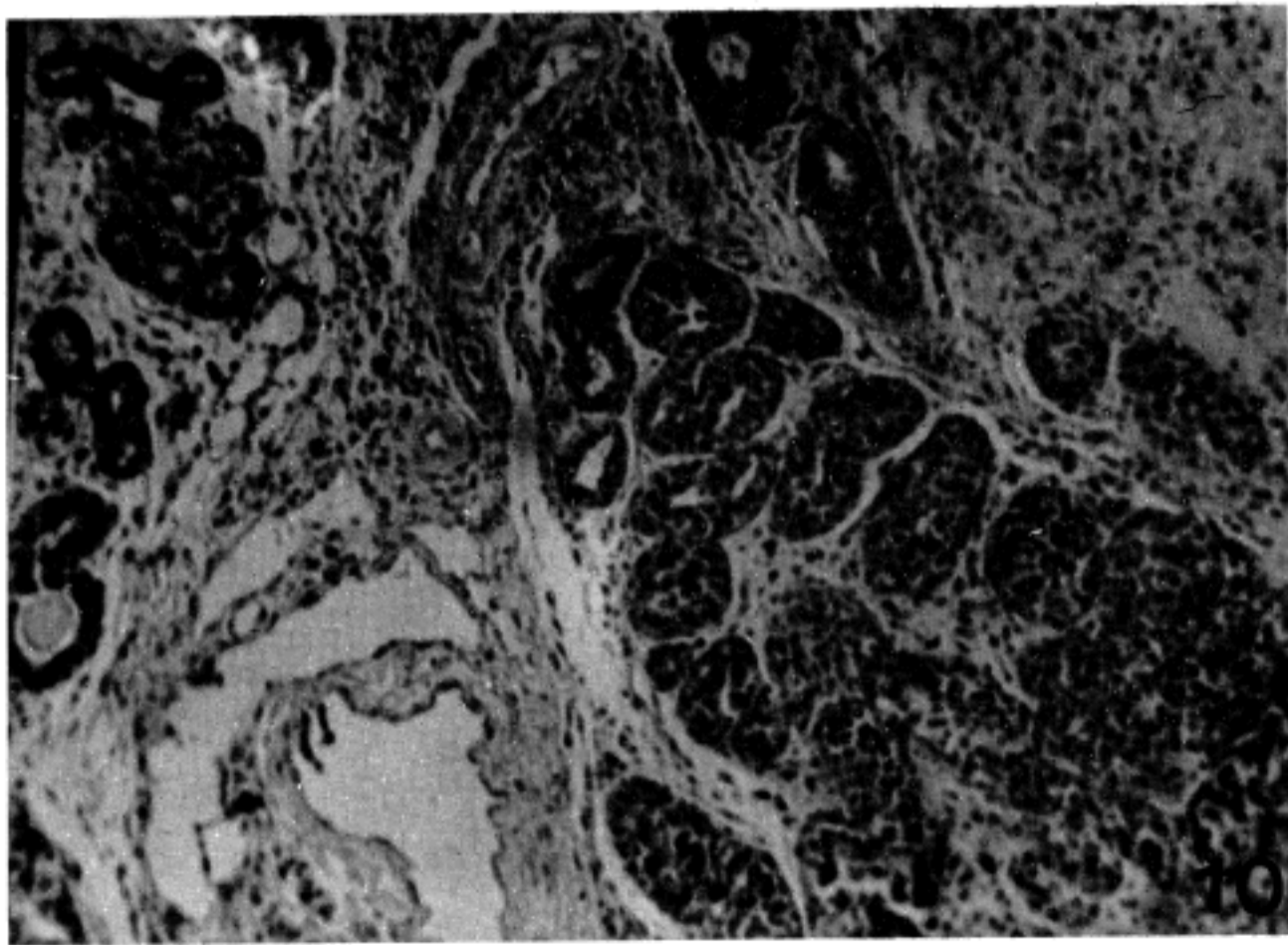


Fig. 10. In DMBA treated group, dysplastic epithelial cells are present largely in solid nests. (H-E, x100)

적었다(Fig. 5 & 6). 주위 활막세포들은 국소적인 증식 성도 볼 수 있었다. 그러나, 이와같은 섬유아세포 및 조 소견만을 나타내었고, 일부 종양의 국소에서는 점액변 직구의 증식은 조직학적으로 양성 종양성 증식소견이었

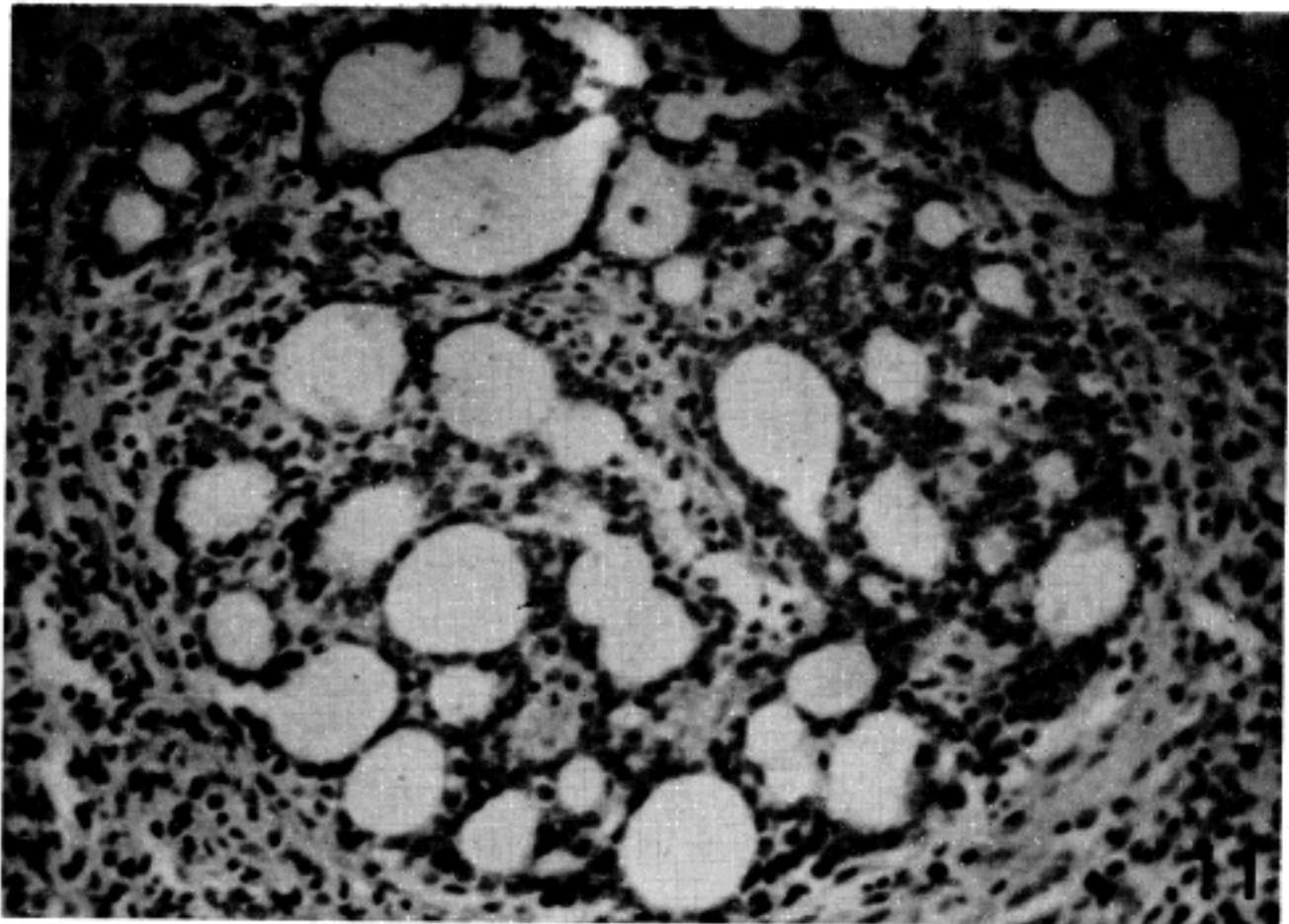


Fig. 11. In DMBA treated group, features of adenocarcinoma showing typical cribriform pattern. (H-E, x200)

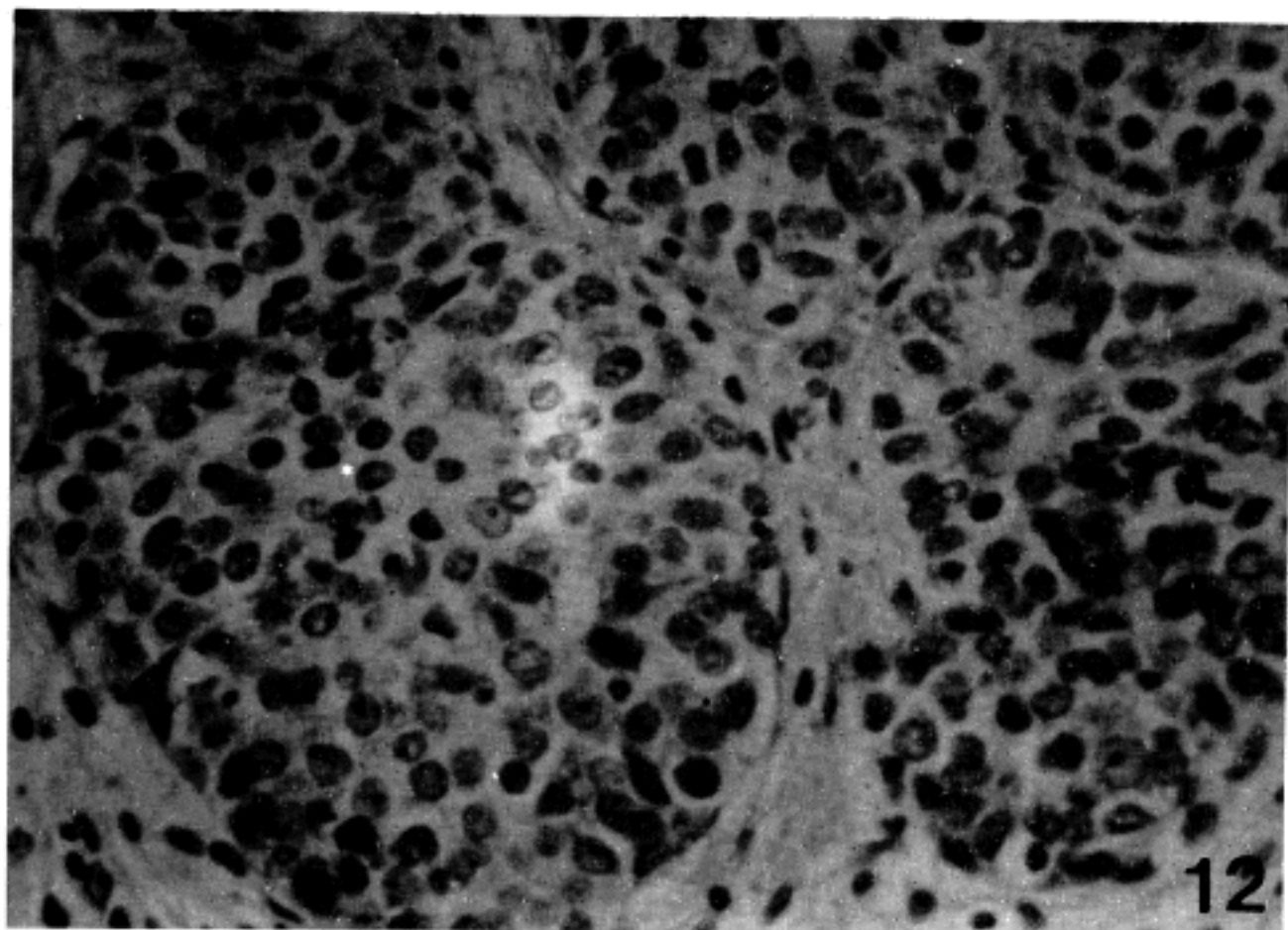


Fig. 12. In DMBA treated group, features of frank adenocarcinoma showing anaplastic features including hyperchromatism, pleomorphism, and mitoses. (H-E, x100)

으며, 국소적인 이형성(Fig. 5 & 6) 이외에 악성종양조직의 소견은 관찰할 수 없었고, 이들 세포의 증식과 활

막과의 연관성도 인정할 수 없었다.

또한 상기한 간엽유래세포의 증식과 더불어 한선 상피

Table 3. Enzyme histochemical studies of the fibrous histiocytoma

Tumor component cells Enzyme histochemical stain	Histiocyte	Fibroblast
Acid phosphatase	+	+
Alpha naphthyl acetate esterase	+	+
Alkaline phosphatase	-	-

+ ; Postiive reaction
- ; Negative resction

세포의 증식과 선종의 소견 및 이형성소견을 볼 수 있었으며, 국소적으로는 분명한 anaplastic한 세포학적 특성을 지닌 상피세포의 선상 및 사상(cribriform) 형태의 배열과 이들 세포로 이루어진 응집괴가 다발성으로 주위 조직에 침윤되어 있는 선암종의 조직학적 소견도 관찰할 수 있었다(Fig. 9~12).

효소조직화학적 소견

섬유아세포, 조직구의 증식 및 다핵거대세포의 출현이 빈번한 부위의 종양조직은 acid phosphatase와 α -naphthyl acetate esterase 염색에 양성반응을 보이고 alkaline phosphatase 염색에서는 음성반응을 보여 섬유조직구종의 구성세포와 유사한 효소조직화학적 특성을 나타내었다(Fig. 8, Table 3).

고 찰

방향성 탄수화물의 일종인 DMBA는 강력한 발암물질로서 백서의 피부도포로서 흑색종이 유발되고²⁾, 혀에도포함으로서 편평상피암이 유발되며³⁾, 백서에 경구 투여시 백혈병이 유발된다고 한다⁵⁾.

근래에는 DMBA를 관절내에 주입하여 여러가지 종양을 유발시킨 실험보고를 접할 수 있는데^{1,6,8)} 이들의 결과는 저자에 따라 그리고 이용된 실험동물의 종류에 따라 그 성적이 다양하였다.

저자는 Sprague-Dawley계 백서의 슬관절내에 DMBA를 반복 주입하여 기간별 종양발생의 빈도 및 유발종양의 형태학적 분석을 목적으로 일련의 실험을 계획하였으며, 그 실험의 일환으로 조기에 유발된 종양조직의 형태학적 분석을 추구코저 본 실험을 시행하였는데 그 결

과를 요약하면 다음과 같다.

DMBA 첫 주입 후 12주까지 종양발생 유무를 관찰할 결과 20%의 발생율을 보였으며, 종괴크기의 급속한 증가는 인정할 수 없었고, 구성요소로는 간엽유래세포의 양성증식과 이형성을 보였으며, 한선 상피세포의 증식, 이형성 및 국소적인 선암종의 소견을 관찰할 수 있었다.

DMBA의 발암기전에 대한 연구보고를 살펴보면 Mohammad⁹⁾는 dinitrochlorobenzene (DNCB)으로 전감작(prior sensitization)시킨 백서에 DMBA를 투여한 경우 DMBA만을 투여한 대조군에 비해 종양발생이 지연되고 종양의 크기가 감소되었으며, DMBA를 투여한 후 DNCB로 감작시킨 군에서는 종양성장의 일시적인 감소가 있음을 관찰하고 접촉과감작(contact hypersensitivity)을 통한 세포매개성 면역의 비특이적 자극은 DMBA의 종양유발(DMBA carcinogenesis)을 억제시킨다고 보고하였다. Milner등¹⁰⁾은 천연적으로 토양중에 존재하는 발암억제물질인 selenium은 DMBA가 세포내 DNA와 결합하는 것을 선택적으로 억제하는 작용을 통하여 DMBA에 의한 종양유발을 감소시킨다고 하였다. 이상과 같은 연구보고를 통하여 DMBA가 세포내 DNA와 결합함으로써 세포의 변이를 일으켜 암을 유발함을 추정할 수 있으리라 사료된다.

DMBA의 관절내 주입에 의한 종양유발 실험보고를 살펴보면 Ghadially와 Roy⁶⁾의 경우 Albino계 백서에 DMBA를 주입한 실험에서 단회 주입군에 비해 다회 주입군에서 종양의 발생시기가 훨씬 빨랐고 그 크기도 급속히 증가하였다고 한다. DMBA의 관절내 주입 후 발생한 초기의 변화로서는 육안적으로 활막이 비후되고, 현미경하에서는 활막과 활막하조직에서 만성염증세포침윤, 국소적인 조직의 괴사, 반흔 및 초자양 변화등을 관찰했고, 슬관절 주위에서 발생한 조양의 조직학적 검색 결과 대부분이 섬유육종이었는데 이들은 특징적인 방추세포의 외관상배열, 섬유생성, 불규칙하게 배열된 큰 다형태성 세포, 다수의 거대세포 및 핵분열 소견과 편평한 세포들로 둘러 싸인 열(cleft)을 볼 수 있었다.

또한 소수의 활막육종도 보고하였는데 이들 활막육종의 기원은 활막자체 뿐만 아니라 활막구조로 분화할 수 있는 다잠능의 간엽세포에서도 기원할 수 있다고 주장하였다. 또한 Santis등⁷⁾은 상기의 Ghadially와 Roy의 실험모델과 유사한 실험을 통하여 실험동물의 50%에서 활막육종, 25%에서 섬유육종, 15%에서 거대세포육종 및

10%에서 악성섬유조직구종이 발생한다고 보고한 바 있다. 그러나 Homma⁸⁾은 토끼를 이용한 실험에서 DMBA의 관절내 주입에 의하여 오직 악성섬유조직구종만이 유발되었다고 보고하였다. Sakamoto¹⁾의 경우 Wistar계 백서를 이용하고 DMBA의 주입 횟수를 달리 한 실험모델을 통하여 단회 주입군은 최초의 종양출시기가 16~38주, 다회 주입군은 첫 주입후 13~36주로서 양군 사이에 큰 차이가 없고, 유발빈도 역시 양군 모두 100%로서 차이를 인정할 수 없다고 보고하였으며, 유발된 종양은 육안적으로 얇은 섬유막으로 덮여있고 내부는 다발성 구조를 가지며 대부분 골의 파괴, 괴사 또는 출혈소견을 보였다고 한다. 조직학적으로는 섬유아세포 및 그와 유사한 세포의 증식, 교원섬유생성, 환형조직구의 증식이 특징적으로 나타났으며, 그외에 기이한 종양 거대세포, 다핵거대세포, 다수의 전형적 및 비전형적 핵분열세포, 주로 림프구로 구성된 염증세포침윤 및 점액변성등의 소견을 보여 악성섬유조직구종의 조직학적 소견과 일치한다고 보고하였다.

또한 Sakamoto는 일부 종양이 관절과 전혀 연관되지 않은 조직에서 발생하는 것으로 보아 DMBA의 관절내 주입에 의해 유발되는 종양의 기원이 반드시 활막인 것은 아니라고 주장하였고, 전자현미경적 검색에서 종양 조직내에 미분화간엽세포와 그 중간세포들을 확인하여 DMBA가 슬관절 주위에 있는 다잠능미분화간엽세포 (multipotential undifferentiated mesenchymal cell) 를 자극하여 악성섬유조직구종이 발생한다고 주장하였다.

본 실험조직의 조직학적 소견을 살펴보면 대부분의 종양에서 섬유아세포의 증식, 교원섬유생성, 조직구 증식, 림프구를 비롯한 염증세포의 침윤, 소수의 핵분열세포, 다핵거대세포출현 및 국소적인 점액변성과 괴사소견을 보여, 종양 구성세포의 anaplasia와 세포의 특징적인 배열형태 소견이 결여된 점을 제외하고는 섬유조직구종의 소견과 유사한 점이 많음을 알 수 있다.

한편, 본 실험에서 한선 상피세포의 증식, 선종 및 선암종의 소견을 종괴가 발생한 일부 실험동물에서 발견할 수 있음은 특이한 소견으로 이들의 발생기원을 정확히 설명할 수는 없지만, DMBA가 주입된 관절로부터 누출되었거나, 또는 주입하는 과정에서 강력한 발암물질인 DMBA가 주위 피부부속기관인 한선에 노출되어 발생하였으리라고 사료된다.

결 론

DMBA에 의하여 유발된 종양의 형태학적 분석을 목적으로 Sprague-Dawley계 백서의 슬관절내에 액체파라핀을 용매로한 2% DMBA용액 0.1 ml을 4주간격으로 3회 주입한 후 12주까지 관찰하고 유발된 종양조직을 채취한 다음 조직학적 및 조직화학적 검색(H & E, PAS, alcian blue, Van-Gieson, prussian blue, reticulin, PTAH)과 효소조직화학적 검색(acid phosphatase, alkaline phosphatase, alpha-naphthyl acetate esterase)을 실시한 결과는 다음과 같다.

- 1) DMBA 최초 주입후 12주까지의 종양발생율은 20%이었다.
- 2) 조직학적 및 조직화학적 검색상 대부분은 간엽세포 기원인 섬유조직구 종양이었고 소수의 예에서는 상피세포 기원인 한선의 선종 및 선암종의 소견을 보였다.
- 3) 효소조직화학적 검색상 대부분의 간엽세포 기원인 종양세포는 acid phosphatase와 alpha-naphthyl acetate esterase 염색에서 양성반응을 보여 섬유조직구종의 구성세포와 유사한 반응을 보였다.

참 고 문 헌

- 1) Kenshi Sakamoto: Malignant fibrous histiocytoma induced by intra-articular injection of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene in the rat: Pathological and enzyme histochemical studies. *Cancer* 57:2313, 1986
- 2) Shubik P, Pietra G, Porta GD: Studies of skin carcinogenesis the syrian golden hamster. *Cancer Res* 20:100, 1960
- 3) Maeda H, Kameyama Y: Effect of excisional wounding on DMBA-induced hamster tongue carcinogenesis. *J Oral Pathol* 15:21, 1986
- 4) Huggins C, Grand LC, Billantes FP: Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons, and its suppression. *Nature* 189:204, 1961
- 5) Huggins CB, Sugiyama T: Induction of leukemia in rat by pulse doses of 7,12-dimethylbenzanthracene. *Proc Natl Acad Sci USA* 55:74, 1966
- 6) Ghadially FN, Roy S: Experimentally produced syndovial sarcomas. *Cancer* 19:1901, 1966

- 7) **De Santis E, Rosa MA, Oransky M, Sanguinetti C:** *Experimentally induced synovial sarcoma. Int Orthop* 5:37, 1981
- 8) **Homma W, Wunsch PH:** *Experimental-induced sarcoma after intra-articular injection of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. ARCH Orthop Trauma Surg* 102:111, 1983
- 9) **Mohammad AR, Sastry KARH, Ruprecht A:** *Immunologic manipulation of DMBA carcinogenesis by DNCB contact hypersensitivity. J Oral Med* 41:1, 1986
- 10) **Milner JA, Pigott MA, Dipple A:** *Selective effects of selenium selenite on 7, 12-dimethylbenzanthracene-DNA binding in fetal mouse cell cultures. Cancer Res* 45:6347, 1985

— Abstract —

**An Experimental Study of DMBA
(9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracene) Induced
Knee Joint Tumors in the Rats**

**Myung Jae Kang, M.D., Dong Geun Lee, M.D.
Sam Im Choi, M.D. and Sang Ho Kim, M.D.**

*Department of Pathology,
Chunbuk National University Medical School*

For the morphological analysis of DMBA (9,10-

dimethyl-1,2-benzanthracene) induced tumor, thirty Sprague-Dawley rats were received 0.1 ml of a 2% paraffin solution of DMBA into the knee joint cavity, which was repeated three times at an interval of 4 weeks.

The induced tumor masses were removed at the 12th week after the first injection. Histological and histochemical examinations (H & E, PAS, alcian blue, Van Gieson, prussian blue, reticulin, PTAH stain) and enzyme histochemical examinations (acid phosphatase, alkaline phosphatase, alpha-naphthyl acetate esterase) were performed.

The results were as follows:

1) By the 12th week after the first injection of DMBA, the tumor incidence rate was 20 percent.

2) On histological and histochemical examination, most of the induced tumor disclosed the features of the fibrous histiocytoma originating from mesenchymal cells, and the remains sweat gland adenoma and adenocarcinoma originating from epithelial cells.

3) On enzyme histochemical examination, most of the mesenchymal cell-derived tumor cells showed positive reactions for acid phosphatase and alpha-naphthyl acetate esterase, which were similar characteristic features of enzyme stains as shown in the component cells of fibrous histiocytoma.

Key Words: DMBA, Knee joint tumors, Rat