

Ethanol이 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene에 의해 유발되는 백서 간암발생에 미치는 영향*

연세대학교 의과대학 병리학교실

박찬일 · 김호근 · 진소영 · 양우익 · 이유복

서 론

실험적 간암발생과정에서는 전암단계로 여겨지는 다양한 병변들이 관찰되는데 이들의 발생 정도와 발견시기는 발암제의 종류에 따라 차이가 있으며, 발암제의 투여 용량과 병용투여 제제에 의해서도 영향을 받는다¹⁻⁵⁾. 현재까지 시도된 발암제와의 병용투여 제제에 관한 연구는 대개 phenobarbital과 같이 간세포의 대사에 영향을 주는 약물에 관한 것이며, 보고자에 따라 다소의 차이가 있기는 하나 대부분의 병용투여 제제는 그 투여시기에 따라 암형성 과정을 다양하게 변화시키는 것으로 알려져 왔다^{1,6-7)}. Ethanol은 간세포에서 대사되는 대표적인 약물로서 투여시기와 기간에 따라 간세포에 미치는 영향이 다르며, 기존의 실험적 연구결과들에 있어서 ethanol이 화학발암제에 의한 발암과정에 미치는 효과가 일정치 않은 것⁸⁻¹²⁾도 이 때문으로 추측된다¹³⁾.

화학발암제 중 azo 염료의 일종인 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene (3'-Me-DAB)의 투여시 나타나는 주요 변화에는 oval cell의 증식과 간세포의 과증식 결절(hyperplastic nodule) 형성 및 cholangiofibrosis 등이 있다. 그 중 과증식결절은 간세포암종의 전암병변으로 해석되고 있으며, oval cell증식과 cholangiofibrosis는 담관상피세포암종의 전암병변으로 추정되고 있다^{5,14,15)}. 그러나 이러한 학설들은 대개 조직학적 양상에 근거를 둔 것이어서 전암병변으로 추정되는 변화들의

본질과 최종적으로 발생하는 암종과의 관계가 아직 분명하지 않다^{16,17)}.

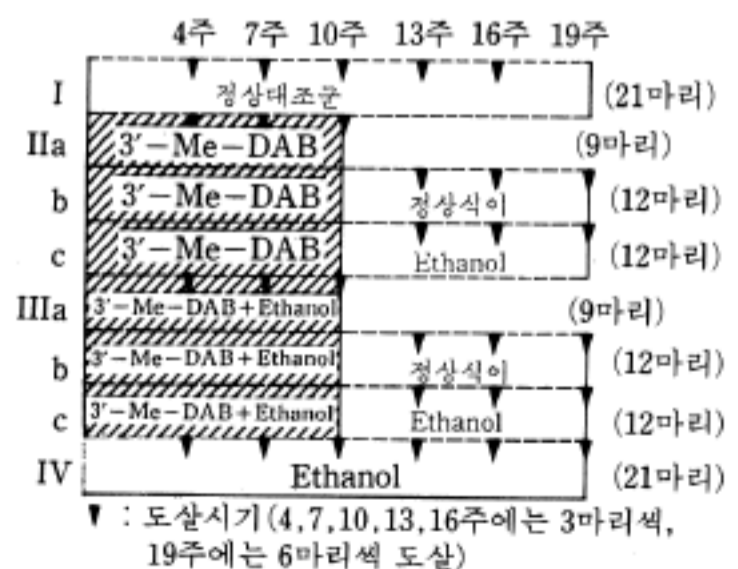
그러므로 본 연구는 흰쥐에 강력한 화학발암제인 3'-Me-DAB을 단독 또는 ethanol과 함께 투여할 때 발생하는 일련의 병변들에 bromodeoxyuridine (BrdU)을 이용한 면역조직화학적 방법을 적용한 세포역동학적 검사를 시행함으로써 3'-Me-DAB에 의한 간암종 발생 단계에서 나타나는 변화들의 본질을 구명하고, 아울러 그에 미치는 ethanol의 영향을 알아보려고 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물 : 실험동물로는 체중 180 g 내외의 Sprague-Dawley 웅성백서 108마리를 사용하였으며, 이들을 시판 혼합사료로 10일간 예비사육한 후에 본 실험에 임하였다.

2) 실험군 : 실험동물을 다음과 같은 실험군으로 나누어 실험을 실시하였다.



접수 : 1990년 7월 25일, 게재승인 : 1990년 11월 21일
 주소 : 서울·서대문구 신촌동 134, 우편번호 120-752
 연세대학교 의과대학 병리학교실, 박 찬 일
 *본 연구의 연구비는 1988년도 학술진흥재단 연구비로 이루어 졌음.

2. 실험 방법

1) 약물투여 방법 : 화학 발암제로는 동경 화성주식회사 제제인 3'-Me-DAB을 사용하였으며, 이를 시판 식용유에 5g%로 녹인 후에 실험동물 체중 1kg당 50mg을 nasogastric tube를 통하여 1일 1회씩 II 및 III군 실험동물에 4주, 7주 또는 10주간 투여하였다. Ethanol 투여군에는 absolute ethanol을 체중 1kg당 2g씩 nasogastric tube를 통하여 1일 1회씩 투여하였으며, IIc군에는 3'-Me-DAB투여가 끝난 직후부터, IIIa 및 IIIb군에는 3'-Me-DAB 투여와 동시에, 그리고 IIIc군에는 3'-Me-DAB 투여기간 및 투여후 전기간 동안 투여하였다. 제 IV군에는 전실험기간에 걸쳐 ethanol만을 투여하였고, 제 I군은 무처리 대조군으로 하였다.

2) 간의 일반적인 조직학적 검색 : Ether 마취하에 실험동물을 개복한 후 간을 적출하기 30~40분전에 동물 체표면적 m²당 200mg의 BrdU를 5% 포도당 용액 500ml에 희석하여 복부대동맥에 주입하였다. 적출된 간조직을 통상의 방법대로 포르말린고정, 수세, 파라핀포매 과정을 거쳐서 3~4 μm의 연속절편을 만든 후 60°C에서 12시간 보관하였다가 xylene으로 파라핀을 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 수세하였다. 연속절편의 일부는 일반적인 조직학적 변화를 보기위한 hematoxylin-eosin (H-E)염색, 당원 및 점액성분을 보기 위한 periodic acid Schiff 염색과 섬유화 정도를 보기 위한 Masson's trichrome 염색을 시행하였다.

3) BrdU 표지세포 검색 및 표지지수 (labelling index) 산정 : 연속절편의 일부는 1N HCl로 37°C에서 20분간 가수분해 시키고 0.05% proteinase type VII (Sigma)과 20분간, 그리고 periodic acid와 15분간 반응시킨 다음 증류수로 수세하고 정상 염소혈청에 30분간 방치하였다. 그후 실온에서 50배로 희석된 항 BrdU (Dako)와 16시간, biotinylated goat antimouse IgG와 1시간, avidin-biotin peroxidase complex (ABC)에 2시간 동안 차례로 반응시키고 PBS로 세척한 다음 0.03% 3,3'-diaminobenzidine과 H₂O₂로 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경하에서 검색하였다.

조직학적으로 관찰된 각 병변들에 대하여 병변을 구성하는 세포 300개 중 핵이 BrdU에 표지된 세포들을 세어 그 백분율을 BrdU 표지지수로 정하였으며, 이러한 표지

지수변동의 통계학적 의의는 X²-test로 검정하였다.

결 과

1. 간의 일반적인 조직학적 소견

정상대조군(I)에서는 전기간을 통하여 간세포들이 규칙적인 배열을 하고 있었으며, 세포질도 균일하고 괴사나 공포성 변성도 없었다(사진 1a). Ethanol 단독투여군(IV)에서는 실험기간이 진행됨에 따라 간세포의 국소괴사와 말단간세포정맥(THV)주변의 섬유화가 관찰되었으나 간세포 또는 담관세포의 증식성 변화는 없었다. 3'-Me-DAB 단독투여군과 ethanol 병용투여군(II 및 III)에서는 정도의 차이는 있으나 투여 초기부터 간세포의 괴사와 재생이 관찰되었으며, 4주투여 후 부터는 oval cell의 증식(사진 2a), 과증식결절(사진 3a), 소담관의 증식과 cholangiofibrosis (사진 4a)의 소견이 일부 실험동물에서 관찰되었다(Table 1).

Oval cell의 증식과 과증식결절은 주로 실험 7주부터 관찰되었으며, IIa(3'-Me-DAB단독투여 중 도살), IIb(3'-Me-DAB 단독투여 후 도살) 및 IIIa(3'-Me-DAB 및 ethanol 동시투여 중 도살)군에서 비교적 높은 빈도를 보인 반면 비교적 단기간 ethanol을 투여 받은 IIc(3'-Me-DAB 투여 후 ethanol 투여) 및 IIIb(3'-Me-DAB 및 ethanol 동시 투여 후 도살)군에서는 비교적 적었다.

이들은 3'-Me-DAB 투여기간이 길수록 더욱 현저해졌으나 투여중단 후에는 oval cell 증식은 일부 동물에서만 관찰되었고 과증식결절은 결절의 수가 감소하면서 크기가 증가하는 경향을 보였다. Cholangiofibrosis는 3'-Me-DAB 투여를 중단한 후에 도살한 IIb군과 3'-Me-DAB 및 ethanol을 10주간 투여하고 그 이후에도 ethanol을 계속 투여하였던 IIIc군에서 비교적 많았으며, 특히 최종적으로 암종이 발생한 동물에서 자주 동반되었다.

3'-Me-DAB을 단독으로 또는 ethanol과 동시에 투여하는 기간 중 도살한 실험 동물들(IIa 및 IIIa)에서는 인지할 만한 간암병변이 없었다. IIb군과 IIIc군에서는 제 13, 16 및 19주에 도살한 동물들 중 각 1마리에서 간암병변이 관찰되었으며, 이들은 모두 담관상피세포암종이었다(사진 5a). 3'-Me-DAB투여후 ethanol을 투여한 IIc군에서는 암발생이 없었으며, 3'-Me-DAB과 etha-

anol을 10주간 동시에 투여한 후에 도살한 동물(IIIb) 중에서는 19주에 1마리에서만 간암이 발생하였다(Table 1). 비교적 단기간 ethanol을 투여한 경우에는 간암발생이 억제되나 ethanol을 발암제 투여기간 뿐 아니라 그 후에도 장기적으로 투여한 경우에는 전암병변 및 암의 발생에 영향을 미치지 않았다.

2. BrdU 표지세포에 관한 면역조직화학적 소견

면역조직화학적 염색상 BrdU 표지세포는 핵이 갈색의 과립상을 보였으며, 이러한 표지세포들의 수는 실험기간과 병변의 종류에 따라 많은 차이를 보였다.

1) 간세포 : 정상대조군(I) 간세포의 BrdU 표지지수

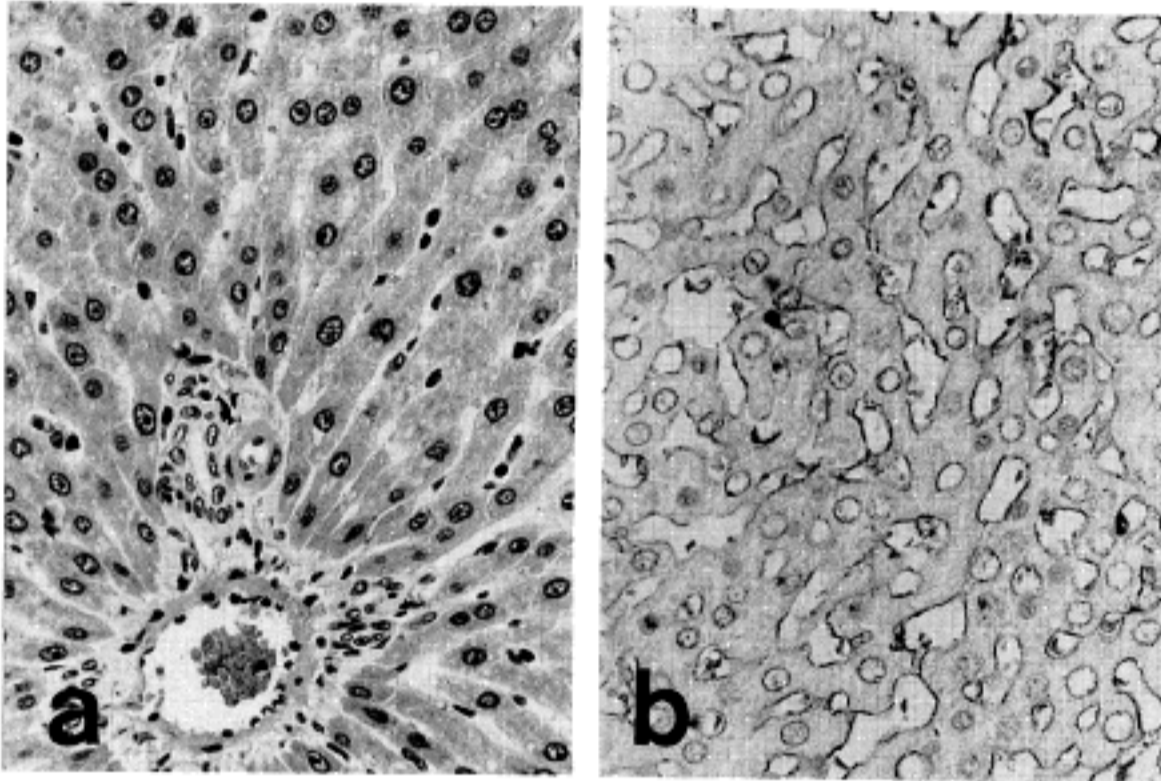


사진 1. 정상 간조직의 H-E 염색 (a) 및 BrdU에 대한 면역조직화학적 염색소견 (b). BrdU가 표지된 간세포를 거의 볼 수 없음.

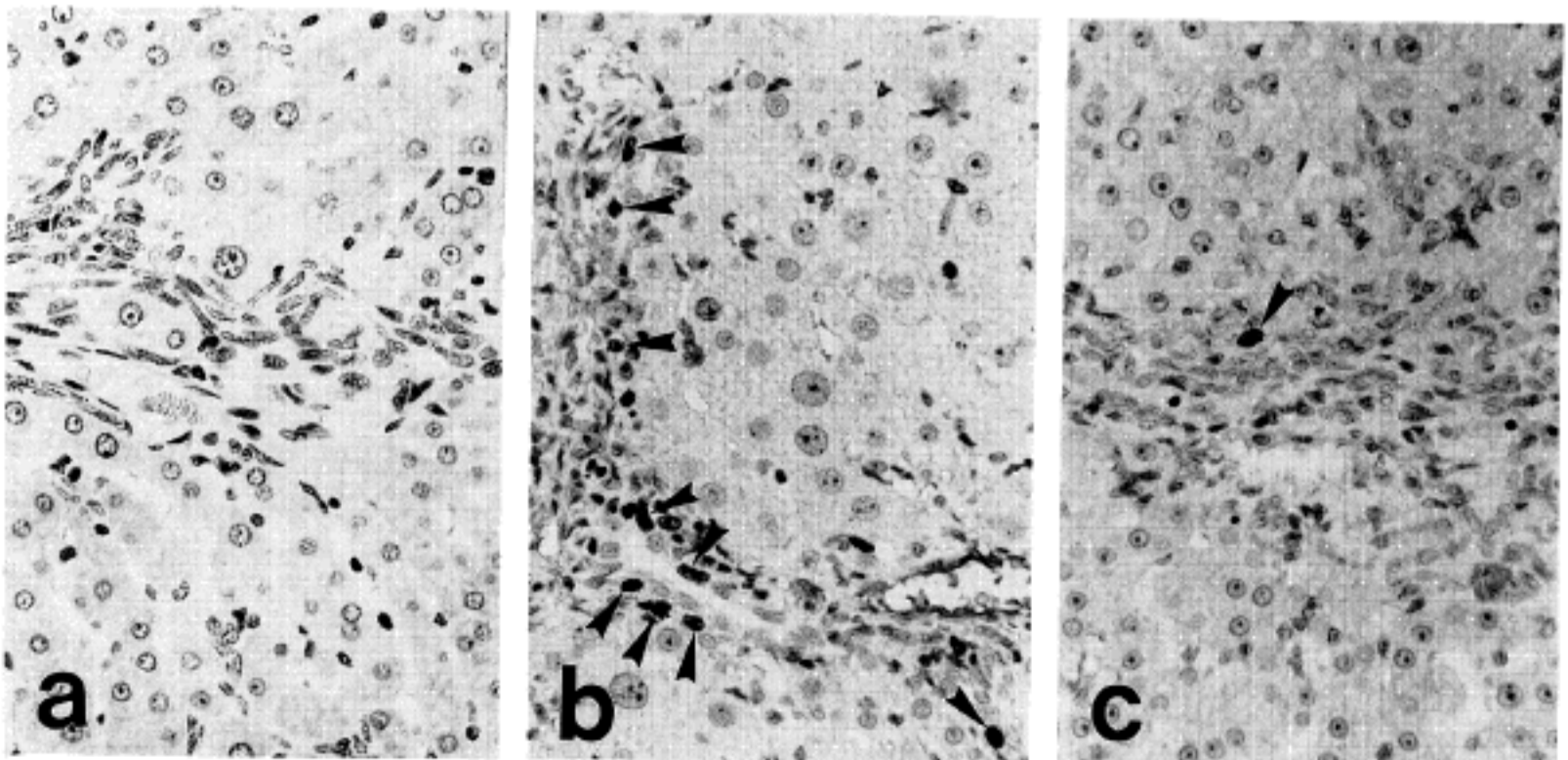


사진 2. Oval cell 증식의 H-E 염색소견 (a) 과 IIa군(3'-Me-DAB 투여기간중 도살) 및 IIb군(10주간 3'-Me-DAB 투여가 끝난 후 도살)의 BrdU에 대한 면역 조직화학적 염색소견 (b 및 c). IIb군의 oval cell들은 IIa군에 비하여 훨씬 적은 수의 BrdU 표지세포를 보임.

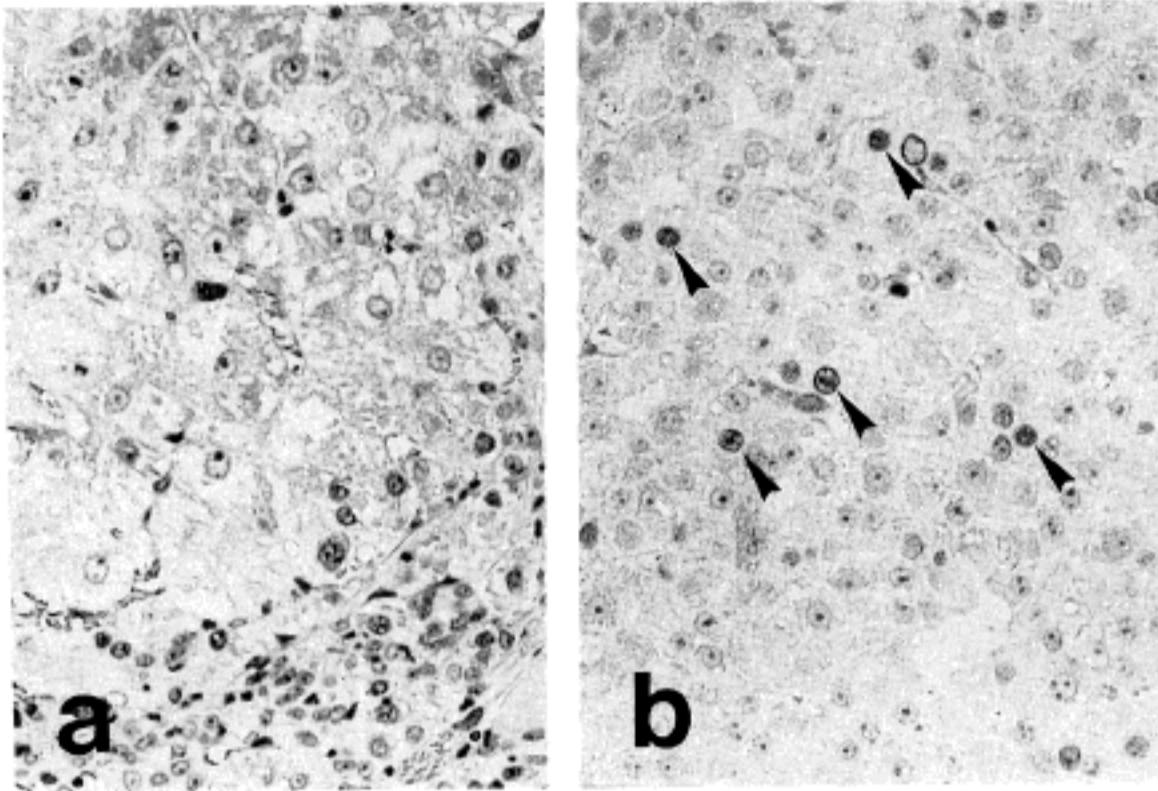


사진 3. 간세포 과증식결절의 H-E 염색(a) 및 BrdU에 대한 면역조직화학적 염색소견(b). 과증식결절내에서 다수의 BrdU가 표지된 간세포(화살표)를 볼 수 있음.

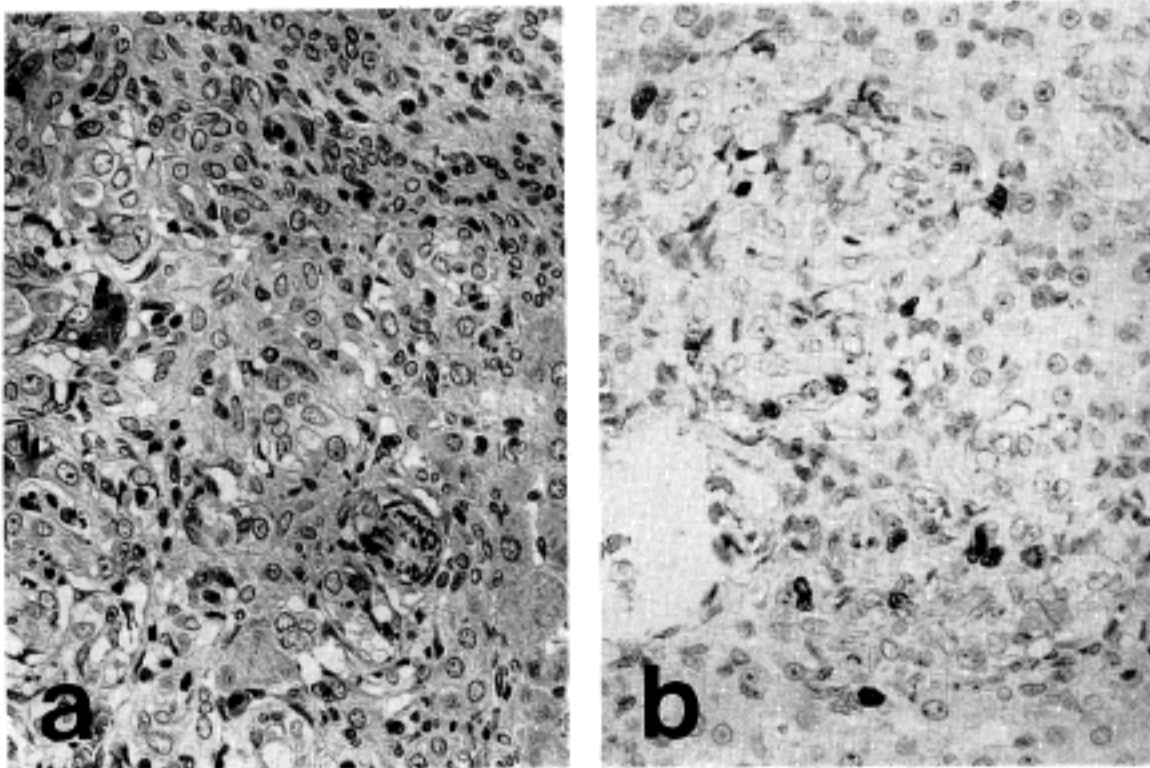


사진 4. Cholangiofibrosis의 H-E 염색(a) 및 BrdU에 대한 면역조직화학적 염색소견(b). Cholangiofibrosis의 구성세포들 중에 다수가 BrdU에 표지된 것을 보임.

Table 1. Incidence of development of proliferative hepatic lesions

	IIa	IIb	IIc	IIIa	IIIb	IIIc
Total number of rats	9	12	12	9	12	12
Oval cell proliferation	6 (66.7)	8 (66.7)	4 (33.3)	7 (77.8)	3 (25.0)	5 (41.6)
Hyperplastic nodule	4 (44.4)	5 (41.6)	2 (16.7)	3 (33.3)	2 (16.7)	3 (25.0)
Cholangiofibrosis	2 (22.2)	4 (33.3)	1 (8.3)	1 (11.1)	2 (16.7)	3 (25.0)
Hepatic carcinoma	0	3 (25.0)	0	0	1 (8.3)	3 (25.0)

() : percent of total number of rats

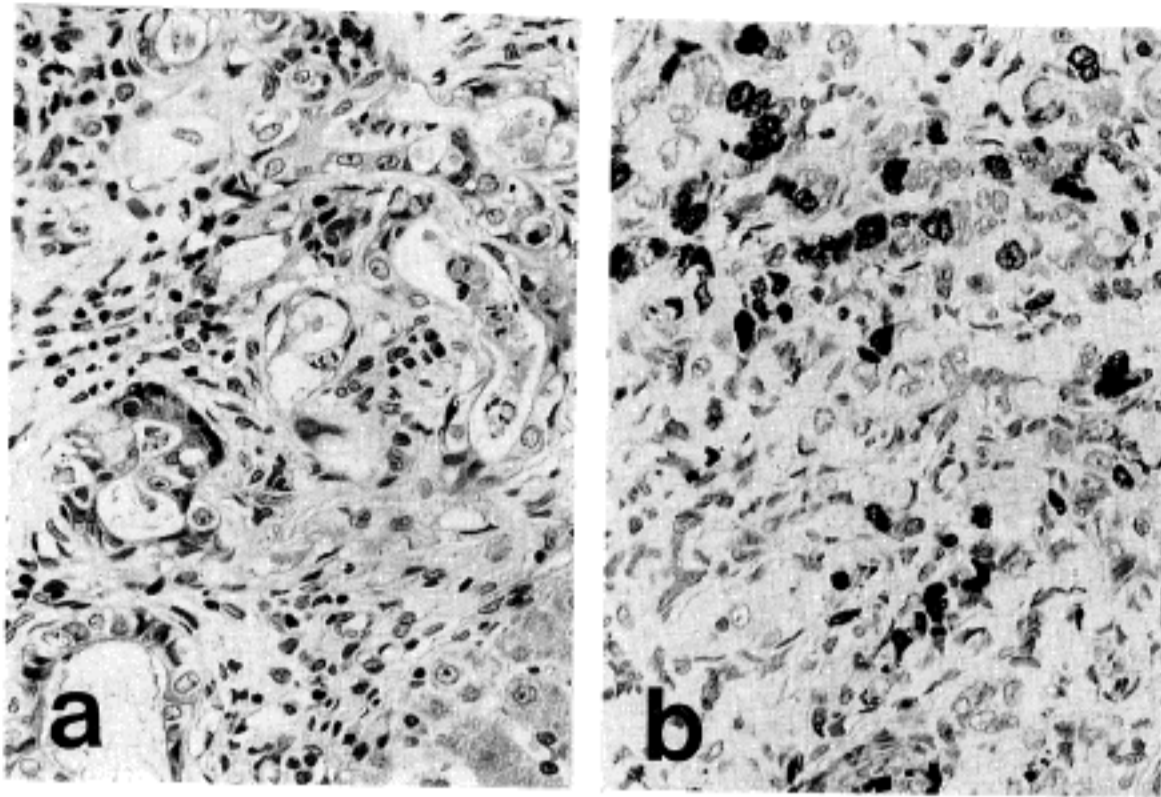


사진 5. 담관상피세포암종의 H-E 염색(a) 및 BrdU에 대한 면역조직화학적 염색소견(b). 암세포들 중에는 BrdU 표지세포가 월등히 많은 것을 보임.

는 0.40 ± 0.28 이었다(사진 1b). 3'-Me-DAB투여기간 중에 도살한 IIa군에서는 4주에 0.57, 7주에 2.43, 10주에 4.73으로 점차 증가(평균 2.58 ± 1.87) 하였으나, 약물투여 중단 후인 13주, 16주 및 19주에 도살한 IIb군에서는 평균 0.61 ± 0.30 으로 감소하였다($p < 0.05$). 3'-Me-DAB과 ethanol을 병용투여한 경우에도 투여기간 중 도살한 IIIa 군에서는 3.57 ± 1.38 로 증가하였다가 투여 후에 도살한 IIIb군에서는 0.68 ± 0.36 으로 떨어졌다($p < 0.05$) (Table 2).

2) **Oval cell** : Oval cell의 BrdU 표지지수는 3'-Me-DAB 단독 투여기간 중(IIa) 평균 11.41 ± 3.29 로 증가하였다가 약물투여중단 후(IIb)에는 4.48 ± 3.77 로 감소하였으며($p < 0.05$) (사진 2b 및 2c), ethanol을 병용투여한 IIc, IIIa, IIIb 및 IIIc군에서는 $3.79 \pm 2.33 \sim 5.93 \pm 3.56$ 으로 IIb군과 비슷하였다(Table 2).

3) **간세포 과증식결절** : 결절내 간세포의 BrdU 표지지수는 3'-Me-DAB 단독투여의 경우 투여기간 중(IIa)에 4.37 ± 1.09 이던 것이 투여 후(IIb)에도 5.17 ± 0.91 이었으며 (사진 3b), 3'-Me-DAB과 ethanol 동시투여의 경우에도 투여기간 중(IIIa)에 7.13 ± 0.94 였고 투여 후(IIIb)에는 오히려 12.36 ± 2.54 로 증가하여($p < 0.05$) 간세포의 과증식결절은 세포역동학적으로 비가역적인 병변임을 알 수 있었다.

4) **Cholangiofibrosis 및 담관상피세포암종** : Cholangiofibrosis를 구성하는 세포의 BrdU 표지지수는

3'-Me-DAB 단독투여기간 중(IIa) 8.25 ± 0.19 로서 발생 초기부터 상당한 증식을 갖는 병변임을 알 수 있었으며 (사진 4b), 투약 후 (IIb)에는 11.29 ± 1.44 로 의의있게 증가하여 비가역적인 전암병변으로 나타났다. Ethanol에 의한 cholangiofibrosis 구성세포의 증식속도 변화는 볼 수 없었다. 담관상피세포암종의 구성세포는 실험군에 상관없이 평균 17.2~27(평균 21.7)의 BrdU 표지지수를 보였다(사진 5b).

고 찰

화학발암제의 작용기전은 그 화학적 특성에 따라 다양하다¹⁸⁾. 본 실험에서 사용한 3'-Me-DAB의 경우에는 간세포에서 대사되는 과정에 생긴 중간대사산물에 의해 암이 유발된다고 알려져 있다. 이러한 대사는 다른 간독성 물질들과 마찬가지로 SER내의 효소에 의하여 이루어지며, 형태학적으로도 3'-Me-DAB투여시에 SER의 증식이 관찰된다^{5,19)}. 발암제를 대사시키는 효소활성에 변화를 주어 암형성을 억제시키려는 연구는 주로 발암제와 phenobarbital의 병용투여로 행하여져 왔는데, 일반적으로 phenobarbital을 초기에 투여하면 암형성이 억제되고 후기에 투여하면 암형성이 증가된다고 하나 발암제의 종류나 보고자에 따라 결과가 일정하지 않다^{1,5,7)}.

본 실험에서는 중요한 간독성 물질인 ethanol을 기간을 달리 투여하여 발암제가 대사되는 과정을 변화시킬

Table 2. Labelling index of bromodeoxyuridine labelled cells

	I	Ila	Iib	Iic	Iiia	Iiib	Iiic	IV
Hepatocytes	0.40±0.28	2.58±1.87 ⁽¹⁾	0.61±0.30 ⁽²⁾	1.77±0.57	3.57±1.38 ⁽³⁾	0.68±0.36 ⁽⁴⁾	1.69±0.98	1.11±0.48
Oval cells	NSL	11.41±3.29	4.48±3.77 ⁽⁵⁾	3.79±2.33	5.93±3.56	4.02±2.50	4.24±2.40	NSL
Hyperplastic nodules	NSL	4.37±1.09	5.17±0.91	5.97±0.29	7.13±0.94	12.36±2.54 ⁽⁶⁾	6.90±2.31	NSL
Cholangiofibrosis	NSL	8.25±0.19 ⁽⁷⁾	11.29±1.44	13.04*	7.55*	10.42±0.15	13.44±2.16	NSL
Hepatic carcinoma	NSL	NSL	21.38±2.30	NSL	NSL	27.01*	20.28±4.04	NSL

Values are mean (%) ± S.D. NSL : No such lesion. * : Only single lesion is present.

- (1) : Different by $p < 0.05$ from group I.
- (2) : Different by $p < 0.05$ from group Ila.
- (3) : Different by $p < 0.05$ from group I.
- (4) : Different by $p < 0.05$ from group Iiia.
- (5) : Different by $p < 0.05$ from group Ila.
- (6) : Different by $p < 0.05$ from the other groups.
- (7) : Different by $p < 0.05$ from groups Iib and Iic.

때 암형성과정이 어떻게 변하는지를 알아보려고 하였는데, 발암제 투여기간 중 또는 투여중단 후에만 ethanol을 투여한 IIIa, IIIb 및 Iic군의 경우 간세포 과증식결절, cholangiofibrosis 및 암종형성이 다소 억제되었으나 발암제 투여기간과 투여 후 모두 ethanol을 투여한 IIIc군에서는 그러한 효과가 없었다. Ethanol이 간손상을 일으키는 기전에 관한 연구들을 보면 단기간 투여시와 장기간 투여시 서로 다른 것으로 알려져 있다^{20,21}. 즉 실험적으로 ethanol과 phenobarbital을 단기간 동시 투여하면 ethanol이 경쟁적으로 phenobarbital의 대사를 억제하고 또 ethanol의 급성투여가 간세포내 cytochrome P reductase의 활성을 감소시키기 때문에 phenobarbital의 소실이 지연되고 이와는 반대로 ethanol을 장기간 투여하면 약물대사 효소의 합성이 촉진되어 동시투여한 phenobarbital의 소실이 빨라진다고 한다. 이러한 연구결과들을 본 실험결과와 비교해 보면, ethanol을 발암제투여와 동시에 또는 후에만 투여한 경우 ethanol이 발암제의 대사를 지연시켜 궁극적 발암작용을 가진 중간대사산물의 형성을 억제함으로써 전암병변과 암형성이 억제되고, ethanol을 장기간 투여한 경우에는 ethanol이 약물대사 효소의 합성을 촉진시켜 궁극적 발암제의 형성이 촉진되는 것으로 여겨진다.

실험적 간암의 전암병변으로 여겨지는 병변들로는 간세포의 이형성변화, oval cell증식, 간세포의 과증식결절, cholangiofibrosis등이 기술되어 있다^{2,3,5}. 이들 중 발암제투여 초기부터 출현하는 간세포 이형성변화는 발암제에 의해 초래되는 병변이지만 가역성인 변화인지 또는 발암제 투여를 중단한 후에도 비가역성으로 진행되는 변화인지는 밝혀진 바 없으며, oval cell의 증식에 있어서도 그 기원, 간암발생과의 관계등에 대한 논란이 많다^{5,17,22-24}. 과증식결절과 cholangiofibrosis에 관하여도 과증식결절은 간세포암종과 관계있고^{25,26} cholangiofibrosis는 담관상피세포암종과 관계있는 병변으로 생각되고 있으나^{5,14} 이들과 oval cell과의 관계는 아직 분명하지 않다^{16,24}.

본 실험에서는 전암병변으로 생각되는 병변들의 악성 전환 여부를 규명하기 위하여 각 병변을 구성하는 세포들의 증식능을 검색하여 최종적으로 발생하는 간암과의 관계를 살펴보았다. 본 연구에 사용된 BrdU 표지세포 검색법²⁷은 생체내에 BrdU를 투여한 후 그에 대한 단클론 항체를 이용하여 면역조직화학적으로 BrdU 표지세

포를 검색하는 방법이다. 동물실험에서는 생체내에 BrdU를 투여해도 무방할 뿐 아니라 BrdU 표지세포 검색법은 장비 및 시간소요가 적고 기술적으로 간편하며 파라핀 절편을 사용할 수 있기 때문에 autoradiography, flow cytometry 및 Ki 67항체 이용법의 단점을 극복할 수 있다고 생각되었다.

발암제를 단독 또는 ethanol과 동시에 투여한 경우 투여기간 중에는 간세포들의 BrdU 표지지수가 점차 증가하다가 투여중지 후에는 급격히 감소하여 정상대조군의 간세포와 비슷한 표지지수를 보였는데, 이것은 특별한 병변을 형성하지 않은 간세포의 이형성변화가 세포역동학적으로 가역적인 변화라는 증거하고 사료된다. Oval cell의 경우에도 발암제 투여기간 중에는 표지지수가 11.41이다가 투여 중지후에는 감소하는 소견이었으나 아직도 4정도의 수치를 보여서 oval cell의 증식은 약물 투여의 영향을 받는 병변이고 어느정도의 자가증식능력을 가진 병변으로 생각되었다. 간세포의 과증식결절은 세포의 표지지수가 발암제 투여기간보다 투여중지 후에 더욱 증가하는 소견을 보여서 과증식결절은 일단 형성되면 비가역적인 자가증식성을 갖는 병변으로 간주되고 따라서 간암과 밀접한 관계가 있을 것으로 사료되었다.

그러나 본 실험에서는 최종적으로 발생한 암 중에 간세포암종이 없었기 때문에 과증식결절과 간세포암종의 관계에 대한 명확한 결론을 내릴 수는 없었다. Cholangiofibrosis를 구성하는 세포들의 표지지수는 형성초기부터 매우 높았을 뿐 아니라 실험기간에 따라 증가하는 경향을 보여 세포역동학적으로 자가증식능이 있는 병변으로 판단되었으며 특히 이 병변은 최종적으로 담관상피세포암종이 발생한 동물에서 자주 관찰되어 두 병변사이에 밀접한 관계가 있는 것으로 사료되었다.

결 론

화학발암제에 의한 암발생과정에서 초래되는 전암병변들의 생물학적 성상과 이러한 병변들의 발생에 미치는 ethanol의 영향을 구명하기 위하여 Sprague-Dawley계 웅성백서에 3'-Me-DAB과 ethanol을 투여시기를 달리 투여한 다음 H-E 염색과 BrdU에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 검색한 바 다음과 같은 결과를 얻었다. 3'-Me-DAB투여는 백서의 간에 oval cell 증식, 간세포 과증식결절, cholangiofibrosis, 담관상피세포암종등

일련의 병변을 유발하였으며, ethanol은 단기간 투여시 이러한 병변들의 발생빈도를 감소시켰다. 정상 간세포의 BrdU 표지지수는 0.40이었으며, 3'-Me-DAB투여시 특별한 병변을 형성하지 않은 간세포의 표지지수는 투약기간 중 2.58로 증가하였다가 투약을 중지한 후 0.61로 떨어졌다. 3'-Me-DAB투여로 초래된 oval cell들의 BrdU 표지지수는 투약기간중 11.41 이었다가 투약을 중지한 후 4.48로 감소하였으나, 간세포 과증식결절과 cholangiofibrosis를 구성하는 세포들의 표지지수는 투약기간 중 4.37 및 8.25이었다가 투약을 중지한 후에는 각각 5.17 및 11.29로 오히려 더 증가하였다. 각 병변의 BrdU 표지지수에 있어서 ethanol 투여 여부에 따른 차이는 뚜렷하지 않았다. 이상의 결과로 보아 간세포의 과증식결절과 cholangiofibrosis, 특히 cholangiofibrosis는 자가증식능을 획득한 진정한 전암병변이며, ethanol은 일단 발생한 병변들의 성장속도를 감소시키지는 못한다고 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Peraino C, Fry RJM, Staffeldt E, Christopher JP: Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantoin and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat. *Cancer Res* 35:2884-2890, 1975
- 2) Farber E: Chemicals, evolution and cancer development. *Am J Pathol* 108:270-275, 1982
- 3) Scherer E: Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Acta* 738:219-236, 1984
- 4) Driver HE, McLean AEM: Dose-response relationships for initiation of rat liver tumors by diethylnitrosamine and promotion by phenobarbitone or alcohol. *Food Chem Toxicol* 24:241-245, 1986
- 5) 김호근, 이유복 : 발암제 (3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene)로 유도된 간암 발생과정에 관한 연구. 연세의대 논문집 20:285-298, 1987
- 6) Peraino C, Fry RJM, Staffeldt E: Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene. *Cancer Res* 31:1506-1512, 1971
- 7) Peraino C, Fry RJM, Staffeldt E, Kisielecki WE: Effects of varying exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced he-

- patic tumorigenesis in the rat. Cancer Res* 33:2701-2705, 1973
- 8) Schwarz M, Buchmann A, Wiesbeck G, Kunz W: *Effect of ethanol on early stages in nitrosamine carcinogenesis in rat liver. Cancer Lett* 20:305-312, 1983
 - 9) Teschke R, Minzlaff M, Oldiges H, Frenzel H: *Effect of chronic alcohol consumption in tumor incidence due to dimethylnitrosamine administration. J Cancer Res Clin Oncol* 106:58-64, 1983
 - 10) Porta EA, Markell N, Dorado RD: *Chronic alcoholism enhances hepatocarcinogenicity of diethylnitrosamine in rat fed a marginally methyl-deficient diet. Hepatology* 5:1120-1125, 1985
 - 11) Takada A, Nei J, Takase S, Matsuda Y: *Effect of ethanol on experimental hepatocarcinogenesis. Hepatology* 6:65-72, 1986
 - 12) Yanagi S, Yamashita M, Hiasa Y, Kamiya T: *Effect of ethanol on hepatocarcinogenesis initiated in rats with 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene in the absence of liver injuries. Int J Cancer* 44:681-684, 1989
 - 13) Seitz HK, Simanowski UA: *Alcohol and carcinogenesis. Ann Res Nutr* 8:99-119, 1988
 - 14) Goldfarb S: *A morphological and histochemical study of carcinogenesis of the liver in rats fed 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. Cancer Res* 33:1119-1128, 1973
 - 15) Tsao M, Grisham JW: *Hepatocarcinomas, cholangiocarcinomas and hepatoblastomas produced by chemically transformed cultured rat liver epithelial cells. Am J Pathol* 127:168-181, 1987
 - 16) Dempo K, Chisaka N, Yoshida Y, Kaneko A, Onoe T: *Immunofluorescent study on α -fetoprotein-producing cells in the early stage of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene carcinogenesis. Cancer Res* 35:1282-1287, 1975
 - 17) Sell S, Leffert HL: *An evaluation of cellular lineage in the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma. Hepatology* 2:77-86, 1982
 - 18) Klassen CD, Amdur MO, Doull J: *Casarett and Doull's toxicology. In Williams GM, Weisburger JH, eds. Chemical carcinogenesis. 3rd ed. New York, MacMullan Publishing Co, 1986, pp 99-173*
 - 19) Svoboda D, Higginson J: *A comparison of ultrastructural changes in rat liver due to chemical carcinogens. Cancer Res* 28:1703-1733, 1968
 - 20) Rubin E, Hutterer F, Lieber CS: *Ethanol increases hepatic smooth endoplasmic reticulum and drug metabolizing enzymes. Science* 159:1469-1470, 1968
 - 21) Rubin E, Gang H, Misra PS, Lieber CS: *Inhibition of drug metabolism by acute ethanol intoxication. Am J Med* 49:801-806, 1970
 - 22) Inaoka Y: *Significance of the so called oval cell proliferation during azo dye hepatocarcinogenesis. Gann* 58:355-366, 1967
 - 23) Tatematsu M, Ho RH, Kaku T, Ekem JK, Farber E: *Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy. Am J Pathol* 114:418-430, 1984
 - 24) Fausto N, Thompson NL, Braun L: *Purification and culture of oval cells from the rat liver. In Cell Separation. vol 4, edited by TG Pretlow, TG Pretlow. Orlando, Academic Press, 1986, pp 45-77*
 - 25) Farber E: *The sequential analysis of liver cancer induction. Biochem Biophys Acta* 605:149-166, 1980
 - 26) Onoe T, Kaneko A, Dempo K, Ogawa K, Minase T: *α -fetoprotein and early histological changes of hepatic tissue in DAB hepatocarcinogenesis. Ann NY Acad Sci* 259:168-180, 1975
 - 27) Morstyn G, Hsu SM, Kinsella T, Gratzner HG, Russo A, Mitchell JB: *Bromodeoxyuridine and chromosomes detected with a monoclonal antibody. J Clin Invest* 72:1844-1850, 1983

— Abstract —

The Effect of Ethanol on 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene Induced Carcinogenesis in Rat Liver

Chanil Park, M.D., Hogueun Kim, M.D.,
So Young Jin, M.D., Woo Ick Yang, M.D.
and Yoo Bock Lee, M.D.

Department of Pathology,
Yonsei University College of Medicine

This study is aimed to elucidate the biological nature of the precancerous lesions and to evaluate whether the ethanol alters 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB) induced experimental hepatocarcinogenesis. A total of 108 Sprague-Dawley male rats were used for the experiment and divided into 6 groups

according to 3'-Me-DAB and ethanol administration. Administration of the drugs were carried out daily by nasogastric tube insertion and the animals were sacrificed at different interval. A part of right lateral lobe was prepared for the histological examination. Cell kinetics of the precancerous lesions was studied by applying the immunohistochemical method for bromodeoxyuridine (BrdU).

The administration of 3'-Me-DAB induced oval cell proliferation, hyperplastic nodule, cholangiofibrosis and carcinoma in the liver. The mean labelling indices, the percentages of BrdU labelled cells, of hepatocytes were increased by administration of 3'-Me-DAB, only to reverse after cessation of the drug (2.58 vs 0.61). The labelling indices of the oval cells were also affected by

the administration and cessation of 3'-Me-DAB (11.41 vs 4.48). In contrast, the cholangiofibrosis did not decrease but were still increasing following cessation of 3'-Me-DAB administration (4.37 vs 5.17 and 8.25 vs 11.29). These findings that the hyperplastic nodule and particularly the cholangiofibrosis have an autonomous proliferative potential and are definite precancerous lesions in the experimental hepatocarcinogenesis. Short term administration of ethanol decreased the incidence of development of the precancerous lesions, but did not affect the labelling indices in all the pathologic lesions of hepatocarcinogenesis.

Key Words: Hepatocarcinogenesis, 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene, Ethanol, Oval cell, Cholangiofibrosis