

Diethylnitrosamine 과 부분 간절제술로 유발된 백서 간장의 증식성 병변에서의 DNA 측정과 합성기 세포의 분획

원광대학교 의과대학 병리학 교실, 면역학 교실*, 전남대학교 의과대학 병리학교실**

최 찬 · 조성희 · 문형배 · 윤기중 · 정현택* · 정상우**

= Abstract =

DNA Ploidy and S-Phase Fraction in Proliferative Hepatic Lesions of Rat Liver Induced by Diethylnitrosamine and Partial Hepatectomy

Chan Choi, M.D., Sung Hee Cho, M.D., Hyung Bae Moon, M.D., Ki Jung Yun, M.D.,
Hun Taeg Chung* M.D., and Sang Woo Juhng** M.D.

Department of Pathology and Department of Immunology*, Wonkwang University Medical School, Iri, 570-749

Department of Pathology, Chonnam University Medical** School, Kwangju 501-190.

We have investigated the changes of DNA ploidy and S-phase fraction in proliferative lesions of rat liver. Proliferative lesions were induced by diethylnitrosamine and partial hepatectomy. DNA ploidy was measured by flow cytometer, and S-phase fraction was measured by in situ bromodeoxyuridine(BRdU)-anti BRdU monoclonal antibody techniques.

Normal liver and initiated lesion revealed DNA diploidy or DNA tetraploidy. Hepatocyte nodule (NODULE) and hepatocellular carcinoma (HCC) revealed DNA diploidy, tetraploidy or aneuploidy. S-phase fraction was 1.0 ± 0.9 , 1.0 ± 0.9 , 3.7 ± 2.3 , 5.5 ± 4.9 , and 13.8 ± 11.6 in normal liver, initiated lesion, NODULE not associated with HCC, NODULE associated with HCC, and HCC, respectively. In NODULE associated with HCC, it was widely distributed, ranging from 0.8 to 15.5%. In conclusion, S-phase fraction appeared to be increased as the hepatocarcinogenesis proceeded, but DNA ploidy did not. There was a heterogeneity of DNA ploidy and S-phase fraction in the proliferative hepatic lesions.

Key Words: DNA ploidy, S-phase fraction, Hepatocellular carcinoma, Flow cytometry, Bromodeoxyuridine

서 론

John Hill 은 일찌기 코담배의 과용이 비강의 폴립

접수 : 1991년 4월 8일 게재승인 : 1991년 4월 13일
주소 : 전북 이리시 신용동 344-2번지, 우편번호 570-749,
원광대학교 의과대학 병리학교실, 최 찬

발생과 관련됨을 시사하였으나, 화학물질에 의한 발암을 처음으로 일깨워 준 사람은 Percival Pott 경이다. 그는 약 200년 전에 굴뚝 청소부에서 흔히 발생하는 음낭 암이 연돌 매연 때문이라고 보고 하였다¹⁾. 1915년에 일본의 연구자들이 코올타르를 이용하여 토끼의 피부암을 유발시킨 이후 여러 종류의 화학적 발암 물질들이 보고되었다. 화학적 발암 물질을 투여하여 암

을 일으키려면 여러 차례 투여해야 한다. 최초로 발암 물질을 투여한 후 암이 발생하기까지는 상당한 기간이 걸리며 그 기간은 발암 물질의 양에 따라 다르다.

암은 불연속적인 여러 단계를 거쳐 발생한다²³⁾. 첫 단계는 개시(initiation)이며, 발암 물질이 DNA에 돌연변이를 일으켜 초래된다. 이때 간세포의 크기와 배열이 불규칙하게 되며, 간세포에서는 glucose-6-phosphatase 와 ATPase 가 감소하며⁴⁾, γ -glutamyltransferase⁵⁾, NA(D)H dehydrogenase^{6,7)}, epoxide hydrolase^{6,7)}, 와 glutathione S-transferase⁸⁾ 등이 증가한다. 두번째는 촉진(promotion)의 단계이다. 이는 개시된 조직이 국소적으로 증식되는 과정으로서, 미소결절(microscopic nodule) 이나, 직경이 0.5~1 mm 이상이면서 주위 간조직과 구별되는 간세포결절(hepatocyte nodule) 이 만들어진다. 이들의 대부분은 분화하여 정상외 간세포로 되고, 일부만 자발적인 증식을 계속하여 암세포의 전구 세포가 된다. 간세포결절에서는 cytochrome P-450, cyochrome b5 와 mixed function oxygenase 가 감소하며, UDP-glucuronyl transferase I, glutathione, glutathione S-transferase, γ -glutamyl transferase, epoxide hydrolase, DT-diaphorase 와 분자량이 2100 kd 인 폴리펩티드가 증가하며 sulfotransferase 가 감소하게 된다. 세번째는 진행(progression)의 과정으로서 간세포결절에서 국소적인 증식이 계속되어 결국 간세포암종이 발생한다(Fig. 1). Diethylnitrosamine (DEN) 은 주로 간세포 암종을 일으키는 물질로 알려져 있지만 신장과 호흡기계에도 종양을 일으킨다⁹⁾.

발암 과정중 효소의 성상 뿐 만 아니라 DNA ploidy¹⁰⁻¹²⁾ 와 세포 동력학(cytokinetics)적 성상도 변화한다^{13,14)}. 발암 방법이 다르더라도 조직학적 소견은 일정하지만, DNA ploidy는 실험 방법에 따라 그리고 같은 방법의 실험에서도 유발된 개체에 따라 다르게 보고되었다.

본 연구는 발암 과정의 증식성 병변에서 DNA ploidy 와 세포 증식능의 지표인 합성기 세포의 분획이 어떻게 변화할 것 인가를 알아보기 위하여 시도되었다.

재료 및 방법

1. 실험 동물과 암 유발

생후 7~8 주 된 체중 150~200 g 의 성숙한 암컷 Sprague-Dawley 종 백서에 단백질이 22.5% 이상 포함된 쥐 및 햄스터용 반합성 사료를 주었으며 물과 사료는 마음대로 먹게하였다. 체중 1 kg 당 DEN (Sigma 제) 을 생리식염수 1 ml에 녹여 매 주 한 차례씩 우측 배부에 피하 주사하였다. 부분 간절제술은 에테르로 마취한 상태에서 하였으며 간의 $\frac{2}{3}$ 를 절제하였다. 실험군은 DEN의 투여 기간과 부분 간절제술의 시기에 따라 여섯 군으로 나누었다(Fig. 2).

2. 조직 채취

마지막 주사 후 1 주일 되는 날의 오후 2시부터 4시 사이에 동물을 도살하였으며, 도살하기 1시간 전에 체중 1 kg 당 16.5 mg 의 bromodeoxyuridine(BRdU, Sigma 제) 을 식염수 1 ml에 희석하여 복강에 주사하였다. 간 조직을 절취하여 10% 중성 포르말린에 고정 한 후 파라핀과 아랄다이트 혼합물 (Araldite mixture) 에 각각 포매하였다.

3. Flow cytometry 의 시료준비

파라핀으로 포매된 조직을 50 μ m 두께¹⁵⁾ 로 박절하여 xylene 으로 파라핀을 제거한 후 100%, 95%, 70%, 50% 알콜을 거쳐 증류수로 흡수시켰다¹⁶⁾. 조직을 37°C 에서 0.5% pepsin 에 1시간 동안 부치시킨 다음, 23 게이지 주사기로 흡입과 분출을 반복하여 세포들이 잘 분리되도록 하였다. 냉장고 안에서 세포들을 0.01% ribonuclease 와 0.0005% propidium iodide 의 혼합물에 2시간 동안 반응 시킨 다음 나일론 필터 (30 μ m)로 여과시켜 부유 세포를 얻었다¹⁶⁾.

4. Flow cytometry 를 이용한 분석

Ribonuclease 와 propidium iodide 혼합물로 반응시킨 세포는 flow cytometry(Facstar, Beckton Dickson 제)를 이용하여 488 nm의 아르곤 레이저로 여기시켰다. 초 당 100~500 개의 세포가 측정되도록 유속을 조정하여 10,000 개의 세포를 측정하였다. DNA diploidy의 peak 에서 변이 계수를 구하였으며,

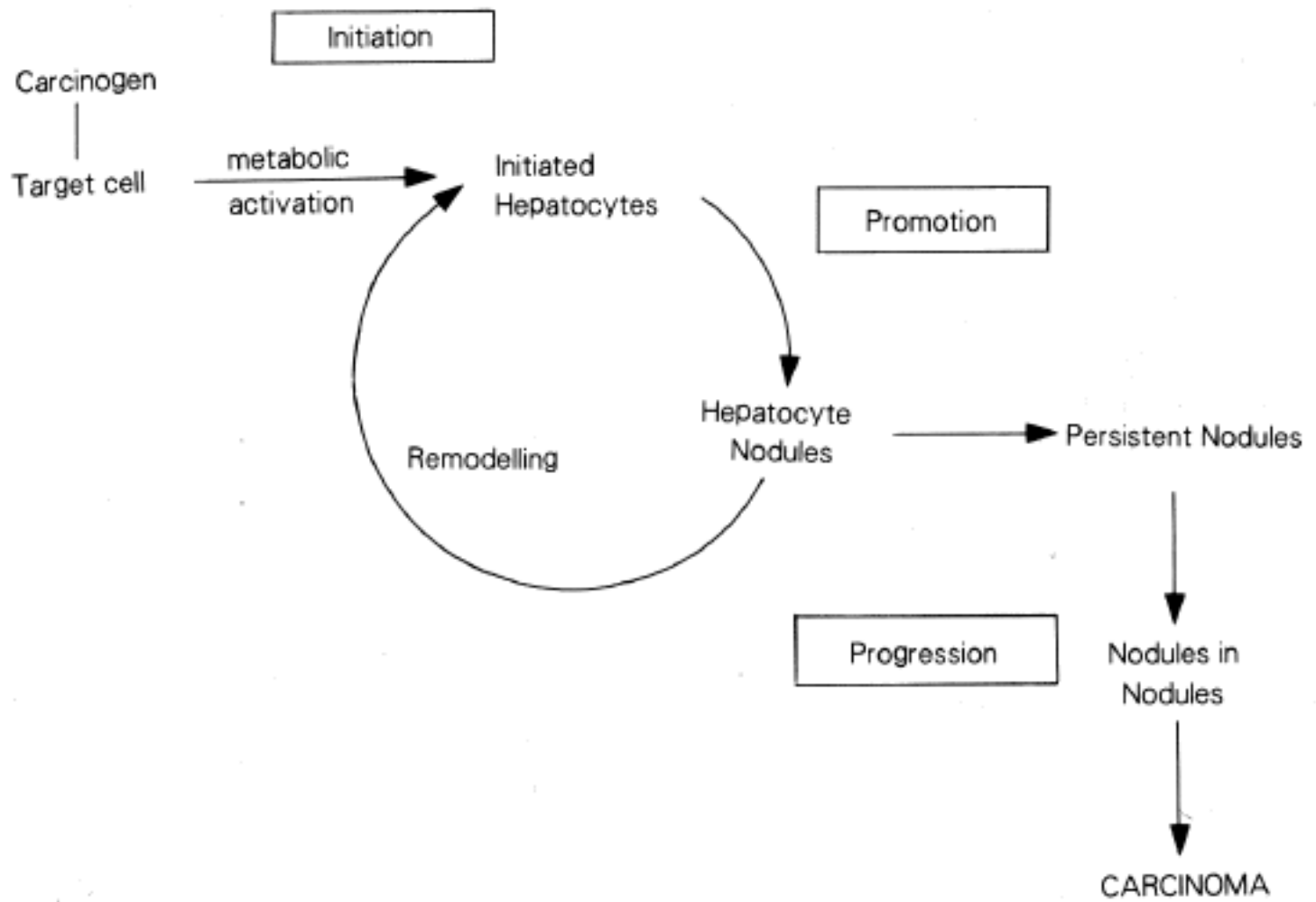


Fig. 1. Schematic representation of step-by-step sequence in hepatocarcinogenesis. Modified from Farber³⁾

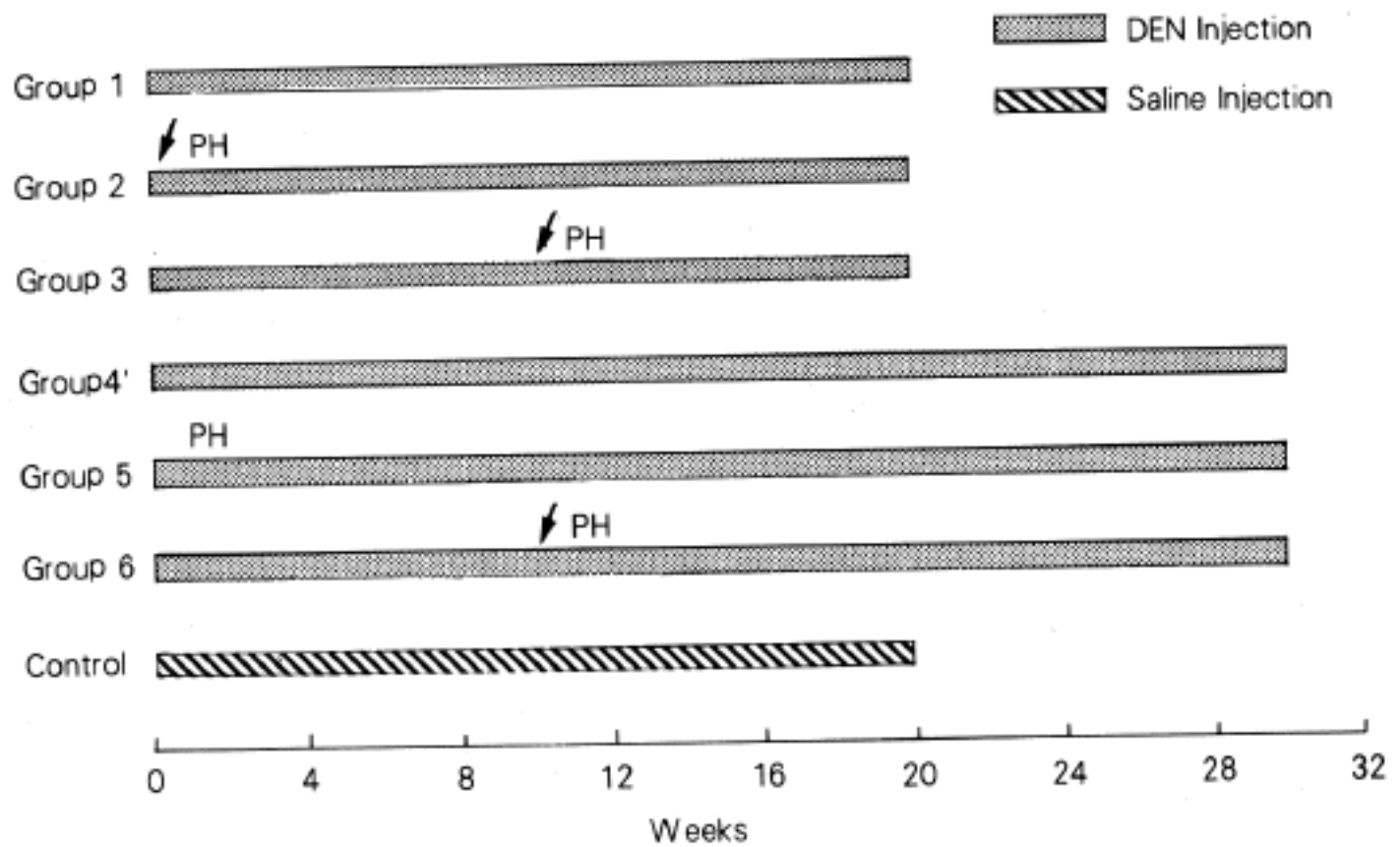


Fig. 2. Experimental protocols used for the induction of proliferative lesions in rat liver. PH: two-thirds partial hepatectomy
 [Dotted pattern]; subcutaneous injection of diethylnitrosamine (DEN; 16.5 mg/kg), weekly
 [Hatched pattern]; subcutaneous injection of saline (1 ml), weekly

그 값이 6 이상인 경우는 다시 검색하였다. DNA index는 diploidy가 아닌 G₁ peak의 DNA 양의 중앙값을 diploid G₁ peak의 DNA 양의 중앙값으로 나누어 구하였다¹⁸⁾.

5. 면역 조직학적 염색

BRdU의 단클론 항체를 이용한 면역 조직화학적 염색을 하기 위하여 아탈다이트 혼합물에 포매된 조직을 1/4mm 두께로 자른 다음 sodium ethoxide로 아탈다이트 혼합물을 세기하였다. 이들을 37°C에서 1N

HCl 용액에 20분 간 처리한 후 37°C에서 0.05% proteinase (Sigma 제, type XXIV)에 20분 간 부치하였다. 1% periodic acid로 15분 동안 처리하여 비재성 peroxide를 억제시켰으며 phosphate buffered saline(PBS, 10 mM, pH 7.6)으로 수세하였다. 일차 및 이차 항체의 비특이적 결합을 억제하기 위하여 조직을 말 린 후에 15분 동안 작용시킨 후 생쥐의 BRdU 단클론 항체 (DAKO제, 1:200 희석액)로 16시간 도포하였고 PBS로 수세하였다. 말의 biotinylated antimouse Ig G에 1시간 동안 부치시킨 후

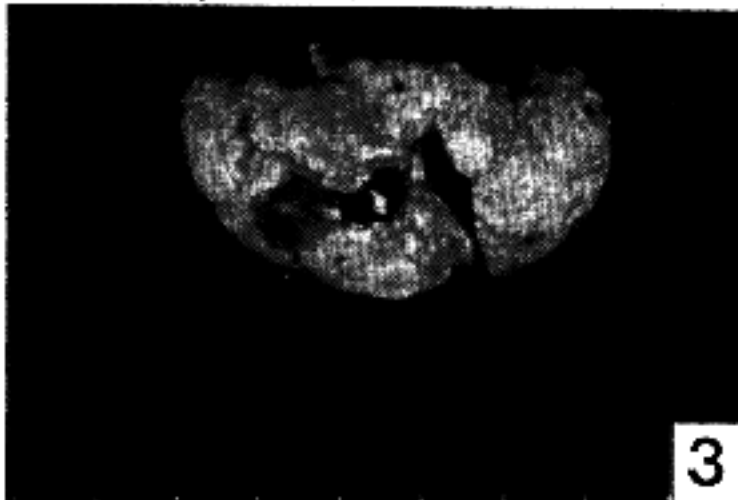


Fig. 3. Hepatocyte nodule(NODULE). A few white-gray nodules are noted in normal appearing liver.



Fig. 4. Hepatocellular carcinoma(HCC). Many nodules are noted on the surface, they are yellow-brown. The liver is replaced by nodules, some of them reveal hemorrhagic necrosis.

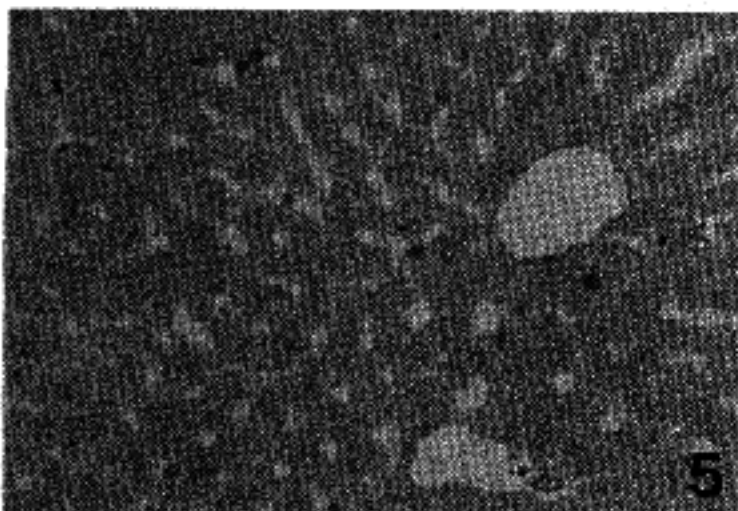


Fig. 5. Normal liver(NOR). Hepatocytes are regularly arranged in trabecular pattern. A few Kupffer cells are positively stained. BRdU immunohistochemical staining.

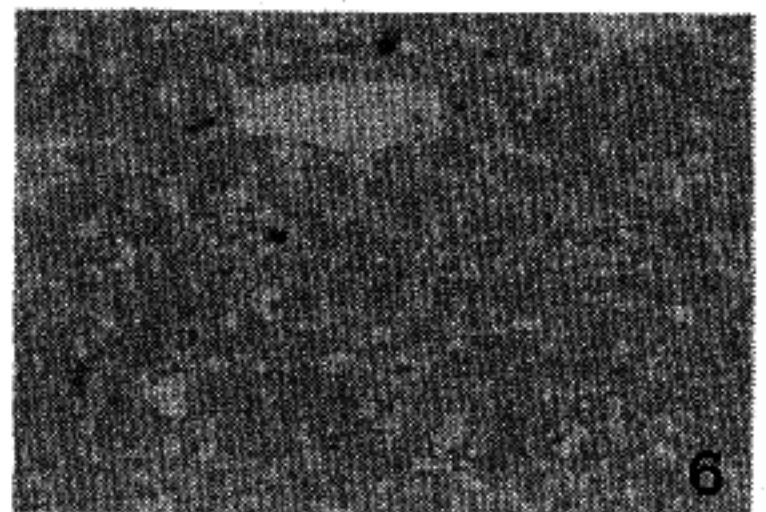


Fig. 6. Initiated lesion(INI). Hepatocytes are irregularly distributed, and some show fatty change. A few Kupffer cells are positively stained. BRdU immunohistochemical staining.

avidin DH-biotinylated horseradish peroxidase H complex (Vectastain ABC kit, PK 4002)를 작용시켰다. 1% 3,3'-diaminobenzidine 을 포함한 PBS 에 서 발색시킨 후 hematoxylin 으로 대조 염색하여 관찰하였다. 염색때마다 일차 항체 대신 PBS만을 도포 시킨 표본과 BRdU를 주사하지 않았던 조직을 대조군 으로 하였다. 염색된 세포에서는 핵이 갈색의 과립상 으로 관찰되었다.

6. 합성기 세포의 분획

BRdU 의 단클론 항체를 이용한 면역 조직화학적 염색을 한 간조직에서 계시병변(형태학적으로는 특이 한 변화가 없으나 효소학적인 변화가 생긴 부위로서 Schever 와 Emmelot¹⁹⁾ 은 백서에서 부분 간절제술 후 DEN을 체중 1 kg 당 10 mg 을 한번 투여하더라도 6주 이후에는 효소학적 성상이 변화된 부위가 간 조직 1 cm³당 1500 곳 이상이 관찰된다고 하였고, Pitot²⁰⁾

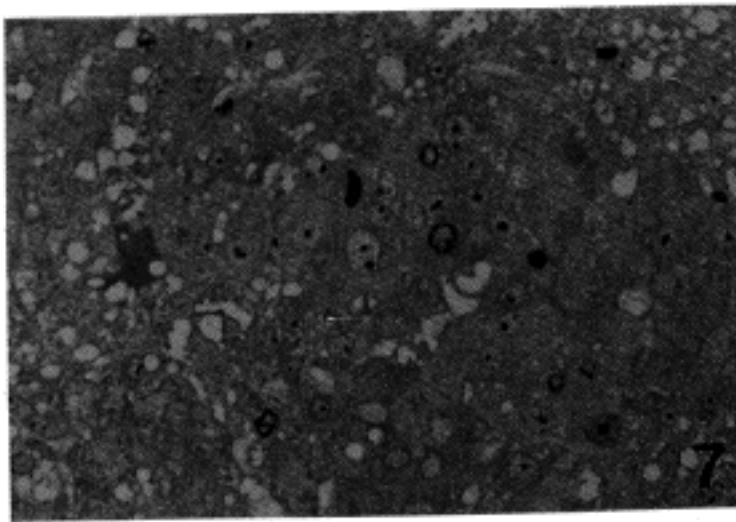


Fig. 7. Hepatocyte nodule(NODULE). Pleomorphic hepatocytes are aggregated, which compress surrounding hepatocytes. Some hepatocytes are positively stained. BRdU immunohistochemical staining.

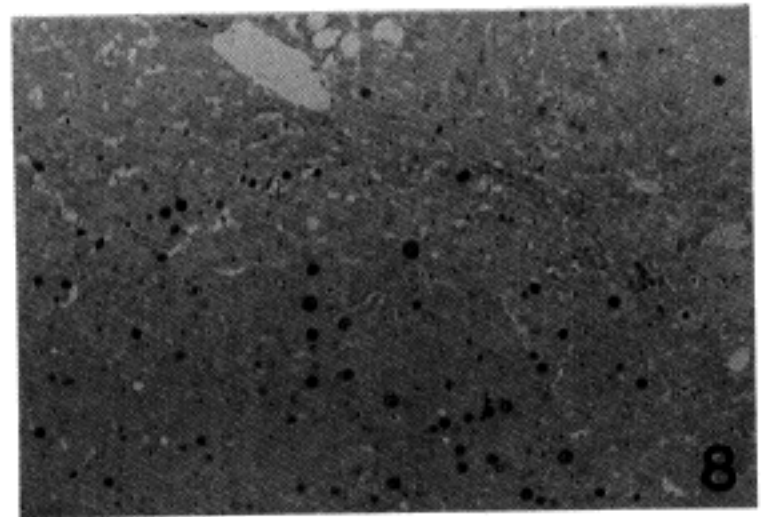


Fig. 8. Hepatocyte nodule associated with hepatocellular carcinoma. The cells of hepatocyte nodule compress surrounding hepatocytes. Some of the hepatocytes are positively stained. BRdU immunohistochemical staining.

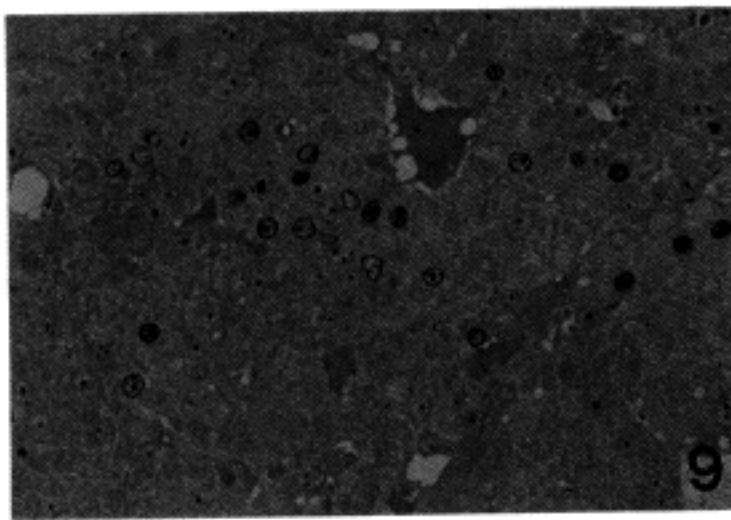


Fig. 9. Well differentiated hepatocellular carcinoma. Three or four layers of hepatocytes are arranged in trabecular pattern. Some of them are positively stained. BRdU immunohistochemical staining.

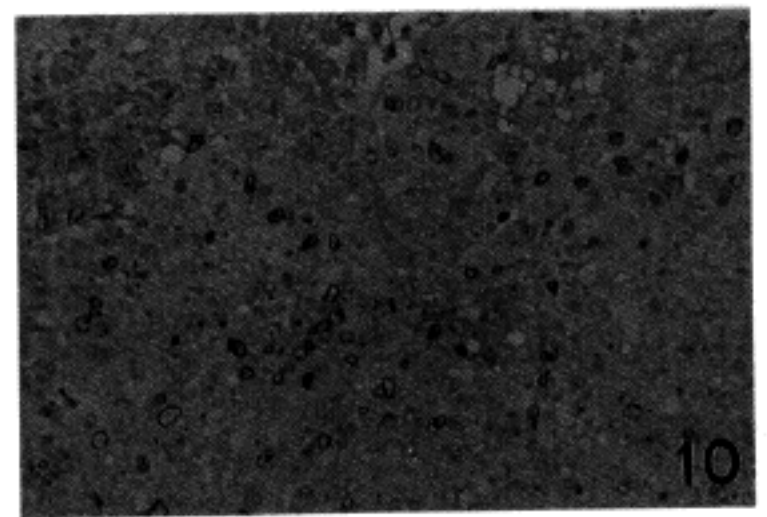


Fig. 10. Moderately differentiated hepatocellular carcinoma. Pleomorphic hepatocytes are irregularly arranged. Many hepatocytes are positively stained. BRdU immunohistochemical staining.

은 Schever 와 Emmelot²⁰⁾과 같은 방법으로 투여하면 8개월 이후에는 1 cm³ 당 33구 곳이 생긴다고 하였다. 따라서 본 연구에서는 효소조직화학적 염색을 하지는 않았지만, DEN을 20 주 이상 투여한 군의 간 조직에서 간 세포의 크기와 배열이 불규칙하며, 국소적인 간 세포의 증식이 관찰되지 않은 곳을 개시 병변으로 하였다. 간세포결절 및 간세포암종의 부위를 선택하여 250~300개의 간 세포를 선택 후, 그 중에서 양성으로 염색된 세포의 수를 백분율로 표시하였다.

7. DNA ploidy

DNA index 가 0.95 에서 1.05 사이면 DNA diploidy 로, 1.90 에서 2.10 사이면서 S와 G₂/M tetraploid stemline 이 관찰되거나 DNA diploidy 의 분포 양상이면서 G₂/M의 영역에 속하는 세포의 수가 전체의 10% 이상이면 DNA tetraploidy로 하였다²¹⁾. DNA index 가 그 외의 곳에서 관찰되는 경우는 DNA aneuploidy 로 하였다. 둘 이상의 DNA stemline 이 있는 경우는 가장 비정상적인 DNA index 에서 ploidy 를 결정하였다²²⁾.

8. 육안 및 조직학적 검색

육안 소견상 간세포결절은 직경이 2~3 mm정도 되는 담회색 결절로서 간의 표면과 실질에서 관찰되었으며, 괴사나 출혈은 없었다(Fig. 3). 한편 간세포암종의 조직은 황갈색이었으며 크고 작은 결절들이 많이 관찰되었고 군데 군데에 출혈 또는 괴사된 곳이 있었다(Fig. 4). 간의 조직학적 소견을 정상(Fig. 5), 개시 병변(Fig. 6), 간세포결절(Fig. 9,10) 및 간세포암종(Fig. 9, 10)으로 나누었다.

결 과

1. 육안 및 조직학적 소견

DEN을 20 주 동안 피하 주사한 제 1 군에서, 14 마리 중 10 마리에서 간세포결절이 관찰되었고 4마리에서 개시병변이 있었다. 제 2 군에서는 16마리 중 2 마리에서 간세포암종이 생겼고, 13마리에는 간세포결절이 그리고 1마리에서는 개시병변만 있었다. 제3군 16마리 중 3마리에서 간세포암종이 11마리에서 간세포

Table 1. Hepatic lesions induced by DEN and PH. Number in parentheses represents percentage of induced lesions in each group

Lesion Group	NOR	INI	Nodule	HCC	Total number
Group 1		4(28.6)	10(71.4)		14
Group 2		1(6.3)	13(81.3)	2(12.5)	16
Group 3		2(12.5)	11(68.8)	3(18.8)	16
Group 4			1(25.0)	3(75.0)	4
Group 5				3(100)	3
Group 6				4(100)	4
Control	7(100)				7

결절이 그리고 2마리에서 개시병변이 있었고, 제4군 4 마리중 2 마리에서 간세포암종이, 1마리에서 간세포암종과 담관세포암종이 그리고 1마리에서는 간세포결절이 생겼다. 제5군은 3마리였으며 2마리에서는 간세포암종이 1마리에서는 간세포암종과 담관세포암종이 생겼다. 제 6군은 4마리였으며 3마리에서는 간세포암종이 1마리에서는 간세포암종과 담관세포암종이 생겼다. 간세포결절은 직경이 0.6 mm 정도 부터 5 mm이상 까지 다양하였다. 간세포 암종은 대부분 대상 구조(trabecular pattern)를 보이는 분화 암종이었으나 중앙부가 괴사된 중등도 분화 암종도 있었다. 그렇지만 주위 조직으로 침윤하거나 다른 장기로 전이한 예는 없었다. 대조군 7마리의 간 조직은 모두 정상 소견이었다 (Table 1).

2. DNA 측정

간 병변 부위와 주위의 정상 간 조직의 일부를 동시에 검색하였으며, 간세포암종과 담관세포암종이 동시에 발생한 경우에는 간세포암종의 조직만을 대상으로 하였다. 변이 계수의 평균값은 4.7 이었다. 정상 간 조직 12예 중 8예에서 DNA diploidy (Fig. 11-A)였으며, 4예에서 DNA tetraploidy 였다. 6예의 개시병변 중 2 예에서 DNA diploidy 였고, 4예에서 DNA tetraploidy 였다. 6예의 개시병변중 2예에서 DNA diploidy 였고, 4예에서 DNA tetraploidy(Fig. 11-B) 였다. 13예의 간세포결절중 3예에서 DNA diploidy 였고 6예에서 DNA tetraploidy, 그리고 4예에서

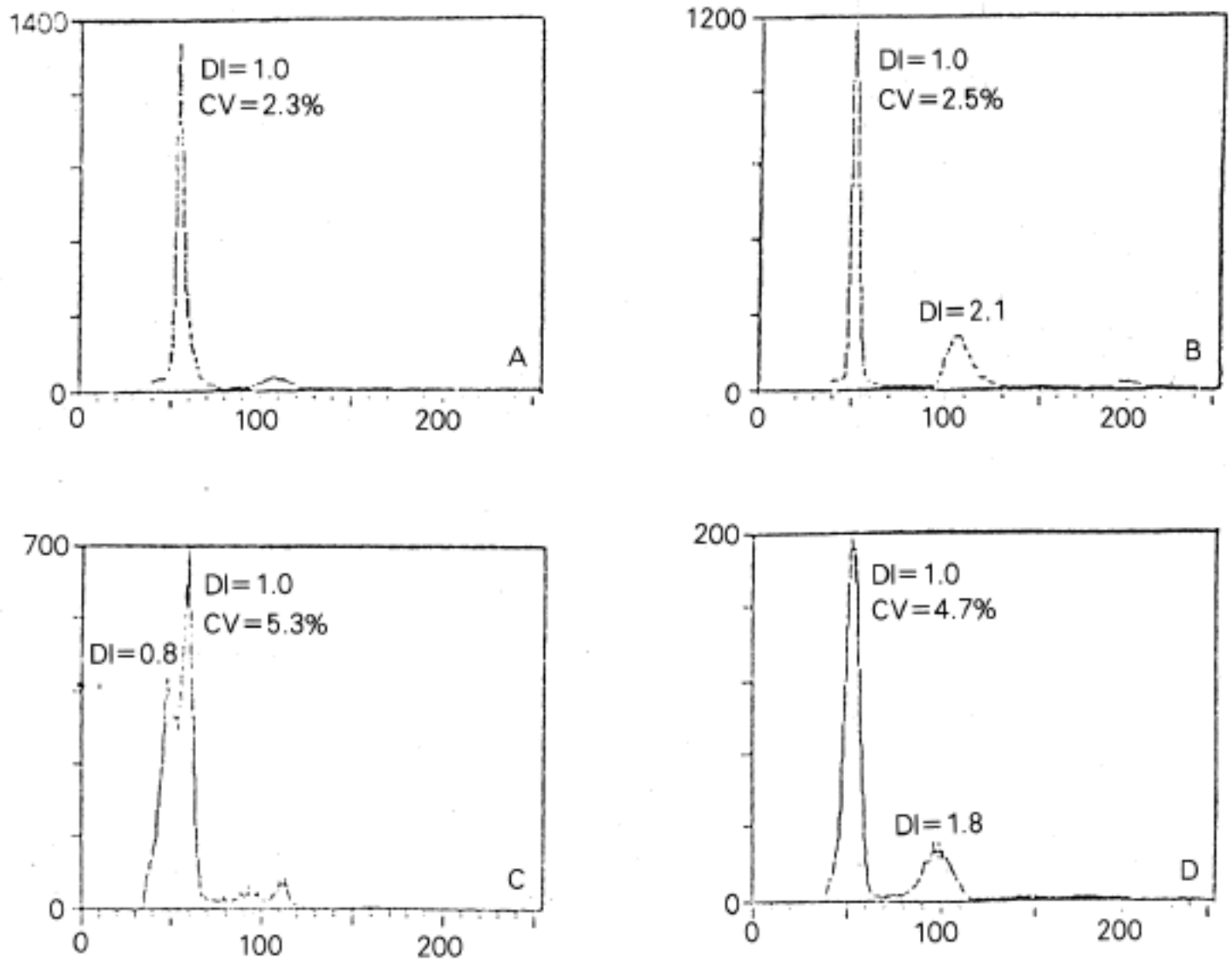


Fig. 11. DNA diploidy in normal liver (A). DNA tetraploidy in initiated lesion (B). DNA aneuploidy in hepatocyte nodule (C) and hepatocellular carcinoma (D). DI: DNA index CV: Coefficient of variation

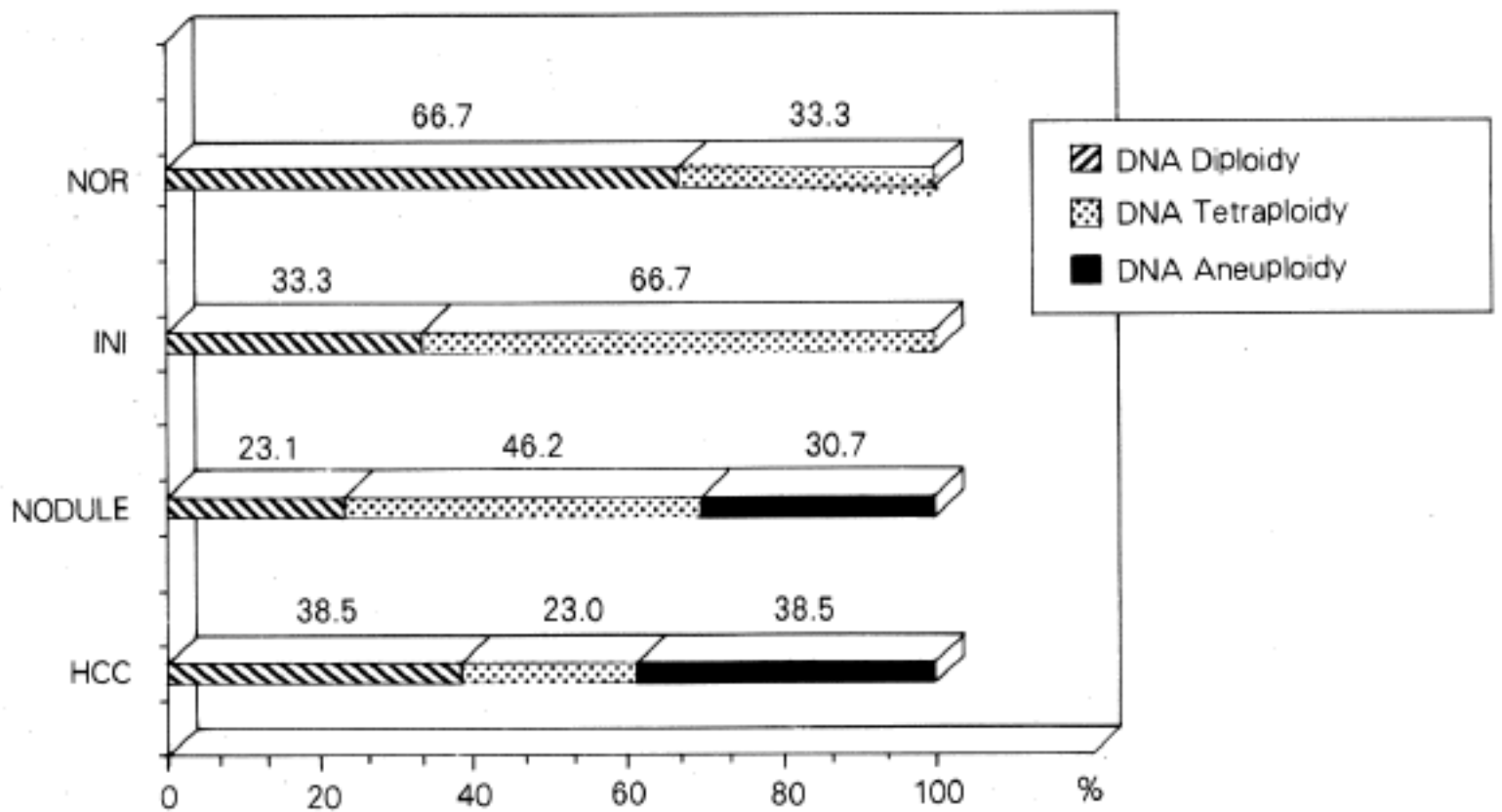


Fig. 12. Percentage of DNA ploidy in various proliferative lesions of rat liver induced by DEN and PH.

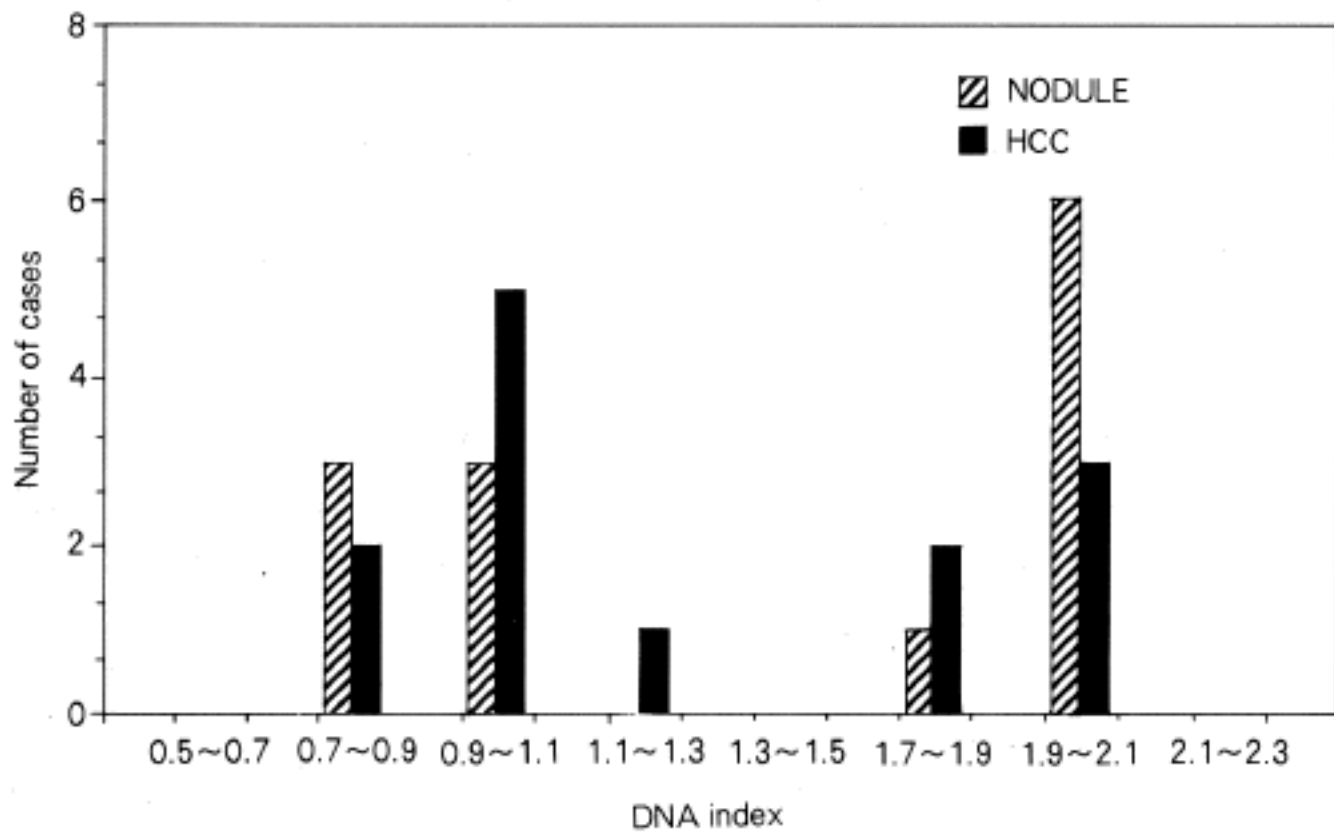


Fig. 13. Frequency of DNA index of 13 hepatocyte nodules and 13 hepatocellular carcinomas.

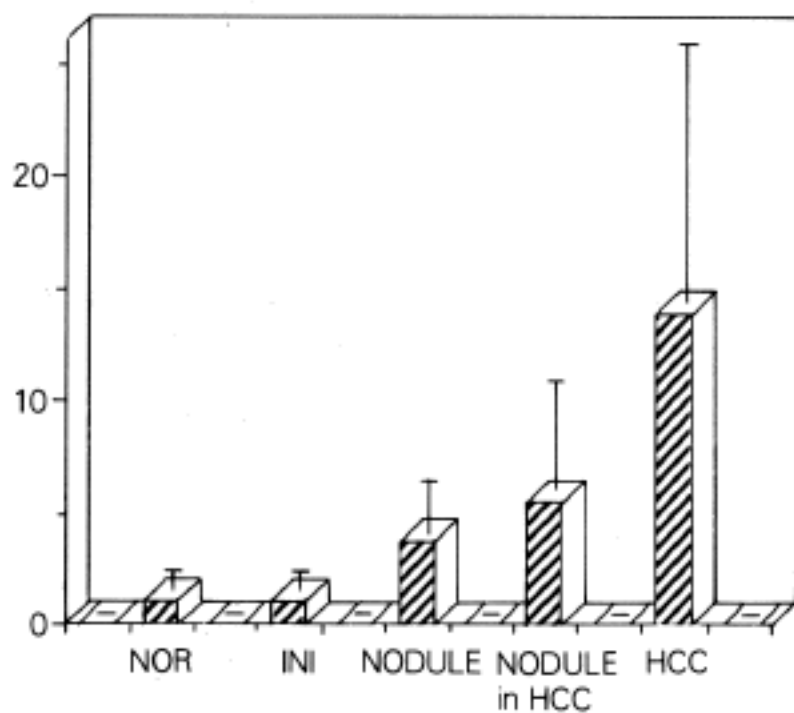


Fig. 14. Mean and standard deviation (bar) of S-phase fraction in hepatic lesions induced by DEN and PH. NODULE in HCC: hepatocyte nodule associated with hepatocellular carcinoma.

DNA aneuploidy(Fig. 11-C) 였다. 간세포암종 13예 중 5예는 DNA diploidy 였으며 3예는 DNA tetraploidy 그리고 5예는 DNA aneuploidy (Fig. 11-D) 였다. 병변에 따른 DNA ploidy 분포 양상은 Fig. 12와

같다.

간세포결절에서 4예의 DNA aneuploidy 중 3예는 DNA index 가 0.7과 0.9 사이에, 1예는 1.7과 1.9 사이에 있었다. 간세포 암종에서 DNA aneuploidy 를 보인 5예중 2예는 DNA index 가 0.7 과 0.9 사이에, 1예는 1.1 과 1.3 사이에 그리고 나머지는 2예는 1.7 과 1.9사이에 있었다(Fig. 13).

3. 합성기 세포의 분획

정상 간조직 및 개시병변에서는 1.0 ± 0.9 (평균 \pm 표준 편차) 였으며, 간세포결절에서는 3.7 ± 2.3 이었다. 간세포암종과 간세포결절이 동시에 발생한 병변의 간세포결절에서는 5.5 ± 4.9 였고 간세포암종에서는 13.8 ± 11.6 였다(Fig. 14). 정상 및 개시병변에서의 값은 다른 병변에서 보다 낮았고($P < 0.05$). 간세포암종의 값은 다른 병변 보다 높았다($P < 0.05$). 간세포결절에서 합성기 세포 분획의 표준 편차는 2.3 으로 그리 크지 않았지만, 간세포암종과 간세포결절이 동시에 발생한 병변의 간세포결절에서는 4.9 였고, 간세포암종에서는 11.6으로 증가 되었다(Fig. 15).

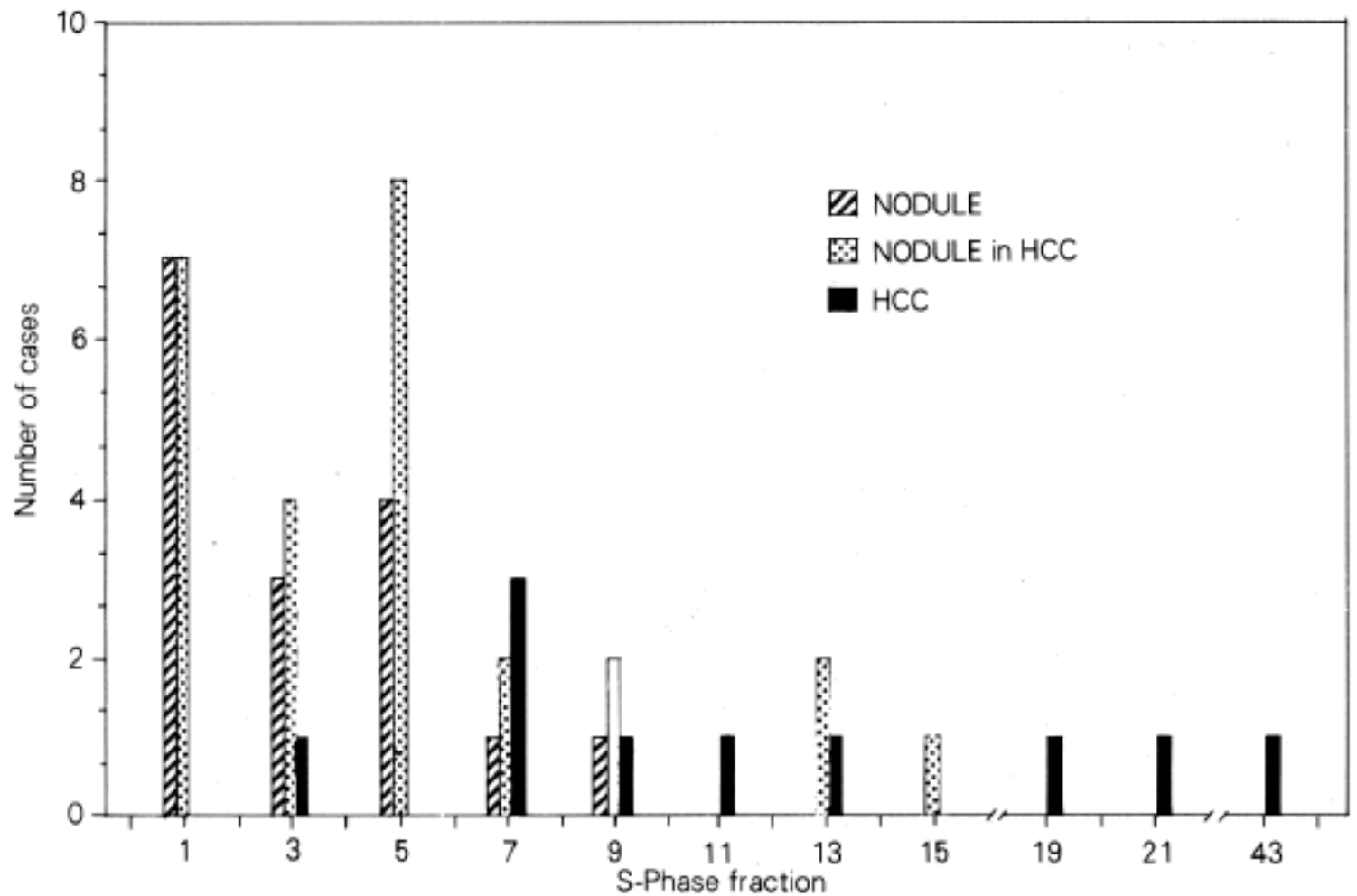


Fig. 15. Distribution of S-phase fractions in HCC, NODULE in HCC, and NODULE not associated with HCC.

고찰

DEN을 20 주 동안 투여한 제 1군, 제 2군, 제 3군 중 부분 간절제술을 시행한 제 2군과, 제 3군에서 간세포암종과 간세포결절이 더 잘생겼다. 이러한 차이는 부분 간절제술이 분열원질성 자극(mitogenic stimulus)²³⁾ 이므로 간세포의 증식능을 향진시키기 때문인 것 같다. 그렇지만 부분 간절제술을 시행한 시기에 따른 차이는 없었다. DEN을 30주 동안 주사한 경우에도 부분 간절제술을 하지 않은 군에서는 간세포 암종의 발생 빈도가 상대적으로 낮았다.

정상 간조직과 개시병변에서는 DNA diploidy 및 DNA tetraploidy의 양상이 관찰되었으며, 개시병변에서 DNA tetraploidy가 더 많았다. 이는 개시병변의 세포들이 정상 세포보다 더 불안정하기 때문인 것 같다. 간세포결절과 간세포암종에서는 DNA diploidy와 DNA tetraploidy 및 DNA aneuploidy가 모두 관찰되었다. 이와 비슷한 소견은 DEN으로 유발된 신생 백서의 간 병변²⁴⁾ 및 생쥐의 간 병변²⁵⁾, 자연히 발생한 생쥐의 간세포암종²⁶⁾에서 뿐만 아니라 사람의 간 병변²⁷⁻²⁹⁾에서도 보고된 바 있다.

본 연구에서 간세포결절과 간세포암종에서는 정상 간조직이나 개시병변과 달리 DNA aneuploidy가 관찰되었다. 이러한 소견으로부터 두 가지 가능성을 생각할 수 있다. 첫째 DNA aneuploidy가 관찰되는 병변의 간세포는 증식능이 왕성한 세포로서 간세포결절에서 DNA aneuploidy를 보인 세포들만 자동적으로 성장하여 간세포암종으로 진행할 가능성이 있다. 둘째 발암 과정 도중 세포가 증식하면서 염색체가 불안정하게 되어 쉽게 탈락하므로 DNA aneuploidy로 변하며, 이러한 소견이 조직 자체의 악성도와는 무관할 가능성이 있다. 간세포암종에서도 DNA diploidy와 DNA tetraploidy 양상이 관찰되므로²⁴⁻²⁹⁾, 후자의 설명이 더 타당한 것 같다.

Danielson 등²²⁾은 DEN으로 유발된 생쥐의 간 병변에서 DNA ploidy가 정상 간조직에서와 큰 차이가 없으며 DNA aneuploidy는 관찰되지 않는다고 하였고, 생쥐¹⁰⁾ 및 백서¹¹⁾ 뿐 만 아니라 사람의 간세포암종에서도 비슷한 결과가 보고되었다³⁰⁾. 이렇게 연구자에 따라 DNA ploidy의 양상이 다른 원인은 분명하지 않지만 DNA 염색 방법의 차이, 측정 방법의 차이³¹⁾, 종의 차이 및 발암 방법의 차이 등 때문인 것 같

다.

개시병변은 발암 물질에 의해 촉진 되지 않는 한, 자동적인 성장을 하지 않기 때문에³⁰, 합성기 세포 분획이 정상 간조직에서와 비슷한 것 같다. 합성기 세포의 분획은 정상 간조직과 개시병변, 간세포결절 그리고 간세포암종의 순서로 증가하였다. 간세포암종에서 합성기 세포 분획은 다른 병변에서보다 높았지만, 각각의 암종 조직에서 합성기 세포 분획은 3.1부터 43.2% 까지 넓은 범위에 분포하였다. 이는 간세포암종 조직의 이질성 때문에 비롯된 것으로 생각된다³². 간세포암종과 간세포결절이 동시에 발생한 병변의 간세포결절에서도 합성기 세포 분획 역시 0.8 부터 15.5%까지의 넓은 범위에 퍼져 있었다. 간세포결절도 세포동력학적으로 이질적이며^{13,20}, 대부분의 간세포결절은 다시 정상 간세포로 분화하지만, 일부만 분화하지 않고 계속 증식하여 간세포암종으로 진행한다^{14,33} 는 보고와 부합되는 소견이다.

결 론

DEN 투여와 부분 간절제술로 유발된 증식성 간 병변에서 DNA ploidy 및 합성기 세포 분획의 변화를 관찰하여 다음의 결과를 얻었다.

1) 정상의 간조직과 개시병변에서는 DNA diploidy 와 DNA tetraploidy 만 관찰되었으며, 정상 간조직에서는 DNA diploidy 가 많이 관찰되었으나 개시병변에서는 DNA tetraploidy 가 더 흔하게 관찰되었다. 간세포결절과 간세포암종에서는 DNA diploidy, DNA tetraploidy 및 DNA aneuploidy 가 관찰되었으나, 이들 병변에서의 차이는 그리 크지 않았다.

2) 합성기 세포의 분획은 정상 간조직과 개시병변에서는 $1.0 \pm 0.9\%$ 로 같았으며, 간세포암종이 동반되지 않은 간세포결절에서는 $3.7 \pm 2.3\%$, 간세포암종과 동반된 간세포결절에서는 $5.5 \pm 4.9\%$ 였고, 간세포암종에서는 $13.8 \pm 11.6\%$ 이었다. 간세포암종이 동반된 간세포결절에서는 $5.5 \pm 4.9\%$ 였고, 간세포암종에서는 $13.8 \pm 11.6\%$ 이었다. 간세포암종이 동반된 간세포결절에서의 합성기 세포 분획은 넓은 범위에 퍼져 있었다.

결론적으로, 합성기 세포의 분획은 간세포암종이 발생하는 과정에서 점차 증가하는 경향을 보였지만, DNA ploidy 는 그렇지 않았다. 그리고 조직학적으로

동일한 병변에서도 DNA ploidy와 합성기 세포의 분획은 다양하였다.

참 고 문 헌

- 1) 대한 병리학회: 병리학. 고문사, 1990, pp 239-256
- 2) Farber E: Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: G.H.A. Clowes memorial Lecture. *Cancer Res* 44: 5463-5474, 1984
- 3) Farber E, Sarma DSR: Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. *Lab Invest* 56: 1-22, 1987
- 4) Scherer E, Hoffmann M, Emmelot P, Friedrich-Freksa H: Quantitative study on foci of altered liver cells induced in the rat by a single dose of diethylnitrosamine and partial hepatectomy. *J Natl Cancer Inst* 49: 93-106, 1972
- 5) Kalengayi MMR, Ronchi G, Desmet VJ: Histochemistry of γ -glutamyl transpeptidase in rat liver during aflatoxin B1-induced carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 55: 579-588, 1975
- 6) Novikoff AD, Novikoff PM, Stockert R.J, et al.: Immunocytochemical localization of epoxide hydrolase in hyperplastic nodules induced in rat liver by 2-acetylaminofluorene. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5207-5211, 1979
- 7) Enomoto K, Ying TS, Griffin MJ, Farber E: Immunohistochemical study of epoxide hydrolase during experimental liver carcinogenesis. *Cancer Res* 41: 3281-3287, 1981
- 8) Tatematsu M, Mera Y, Ito N, Satoh K, Sato K: Relative merits of immunohistochemical demonstrations of placental A, B and C forms of glutathione S transferase and histochemical demonstration of γ -glutamyl transferase as markers of altered foci during liver carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 6: 1621-1625, 1985
- 9) Ernst H, Emura M, Bellmann B, Seinsch D, Mohr R: Failure to transmit diethylnitrosamine tumorigenicity from transplacentally exposed F₁ generation Syrian hamsters to the respiratory tract of F₂ and F₃ generations. *Cancer Res* 47: 5112-5115, 1987
- 10) Digernes V, Elgjo K: Dimethyl nitrosamine-induced proliferative and neoplastic lesions in the mouse liver characterized by histopathology and flow cytometric DNA measurements. *Acta path*

- microbiol immunol scan Sect A* 92 : 45-53, 1984
- 11) Digernes V, Inversen OH : *Flow cytometry of nuclear DNA content in liver cirrhosis and liver tumors in rats exposed to acetylaminofluorene. Virchows Arch (Cell Path)* 47 : 139-146, 1984
 - 12) Danielsen HE, Steen HB, Lindmo T, Reith A : *Ploidy distribution in experimental liver carcinogenesis in mice. Carcinogenesis* 9 : 59-63, 1988
 - 13) Rabes HM, Scholze P, Jantsch B : *Growth kinetics of diethylnitrosamine-induced, enzyme-deficient "preneoplastic" liver cell populations in vivo and in vitro. Cancer Res* 32 : 2577-2586, 1972
 - 14) Enomoto K, Farber E : *Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. Cancer Res* 42 : 2330-2335, 1982
 - 15) Stephenson RA, Gay H, Fair WR, Melamed MR : *Effect of section thickness on quality of flow cytometric DNA content determinations in paraffin-embedded tissues. Cytometry* 7 : 41-44, 1986
 - 16) McIntire TL, Goldey SH, Benson NA, Braylan RC : *Flow cytometric analysis of DNA in cells obtained from deparaffinized formalin-fixed lymphoid tissues. Cytometry* 8 : 474-478, 1987
 - 17) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA : *Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem* 31 : 1333-1335, 1983
 - 18) Hiddemann W, Schumann J, Andreeff M, et al. : *Convention on nomenclature for DNA cytometry. Cytometry* 5 : 445-446, 1984
 - 19) Scherev E, Emmelot P : *Kinetics of induction and growth of enzyme-deficient islands involved in hepatocarcinogenesis. Cancer Res* 36 : 2544-, 1976
 - 20) Ritot HC, Barsness L, Goldsworthy T, Kitagawa T : *Histochemical characterization of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. Nature* 271 : 456-457, 1978
 - 21) Seckinger D, Sugarbaker E, Frankfurt O : *DNA content in human cancer. Application in pathology and clinical medicine. Arch Pathol Lab Med* 113 : 619-626, 1989
 - 22) Fallenius AG, Askensten UG, Skoog LK, Auer GU : *The reliability of microspectrophotometric and flow cytometric nuclear DNA measurements in adenocarcinoma of the breast. Cytometry* 8 : 260-266, 1987
 - 23) Schulte-Hermann R, Ohde G, Schuppler J, Trimmermann-Trosiener I : *Enhanced proliferative preneoplastic cells in rat liver following treatment with the tumor promoters phenobarbital, hexachlorocyclohexane, steroid compounds, and nafenopin. Cancer Res* 41 : 2556-2562, 1981
 - 24) Wiest L : *The effect of diethylnitrosamine on the distribution of cell classes in the parenchyma of the liver of newborn rats. Eur J Cancer* 8 : 121-125, 1972
 - 25) Inui N, Takayama S, Kuwabara N : *DNA Measurement on cell nucleus of normal liver, adenoma, and hepatoma in mice: Histologic features. J Natl Cancer Inst* 47:47-58, 1971
 - 26) Medvedez ZA, Medvedeva MN : *Malignant polyploidization as a growth factor in the age-related spontaneous mouse hepatocarcinomas. IRCS Med Sci* 13 : 699-700, 1985
 - 27) Ezaki T, Kanematsu T, Okamura T, Sonoda T, Sugimachi K : *DNA analysis of hepatocellular carcinoma and clinicopathologic implications. Cancer* 61 : 106-109, 1988
 - 28) Henmi A, Uchida T, Shikata T : *Karyometric analysis of liver cell dysplasia and hepatocellular carcinoma. Cancer* 55 : 2594-2599, 1985
 - 29) Koike Y, Suzuki Y, Nagata A, Furuta S, Nagata T : *Studies on DNA content of hepatocytes in cirrhosis and hepatoma by means of microspectrophotometry and radioautography. Histochemistry* 73 : 549-562, 1982
 - 30) Sarafoff M, Rabes HM, Dormer P : *Correlations between ploidy and initiation probability determined by DNA cytophotometry in individual altered hepatic foci. Carcinogenesis* 7 : 1191-1196, 1986
 - 31) Yoshida Y, Okamura T, Kanematsu T, Kakizoe S, Sugimachi K : *Comparison between microspectrophotometry and cytofluorometry in measurements of nuclear DNA in human hepatocellular carcinomas. Cancer* 62 : 755-759, 1988
 - 32) Heppner G H : *Tumor heterogeneity. Cancer Res* 44 : 2259-2265, 1984
 - 33) Rotstein J, Sarma DSR, Farber E : *Sequential alterations in growth control and cell dynamics of rat hepatocytes in early precancerous steps in hepatocarcinogenesis. Cancer Res* 46 : 2377-2385, 1986