

# 황산구리 투여가 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene에 의한 간암 발생과정에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 병리학교실

문 정 숙 · 박 영 년 · 박 찬 일

## The Effect of Copper on 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene Induced hepatic Carcinogenesis

Jung Sook Moon, M.D., Young Nyun Park, M.D. and Chanil Park, M.D.

Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine

To elucidate the effect of copper on the 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene(3'-MeDAB) induced hepatic carcinogenesis, Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups according to 3'-MeDAB and copper administration: I. normal control, II. copper only, III. 3'-MeDAB only, IV. 3'-MeDAB plus copper. The animals of groups III and IV were fed experimental diet containing 0.06 % 3'-MeDAB. Copper was administered intraperitoneally in a dose of 0.5 mg, twice a week. Animals were sacrificed at different intervals. Liver weight, hepatic copper content and gross and microscopical changes of the liver were examined and the cell kinetics of various lesions in the hepatic carcinogenesis was studied by applying the immunohistochemical method for bromodeoxyuridine(BrdU).

The hepatic copper content was significantly increased in animals given copper but returned to the normal value after cessation of administration. 3'-MeDAB administration caused oval cell proliferation and produced hyperplastic nodules, cholangiofibrosis and carcinoma of the liver. Simultaneous administration of copper did not alter the incidence of 3'-MeDAB induced lesions, except for carcinoma. The liver weight and the size of hepatic nodules and masses were smaller in group IV than in group III. The liver weight as well as the nodularity and the mass formation continued to increase after cessation of 3'-MeDAB administration. Copper did not affect the BrdU labelling indices of the hepatic lesions induced by 3'-MeDAB. The oval cell proliferation and the BrdU labelling indices of the oval cell and the hyperplastic nodule were decreased, but the incidence of cholangiofibrosis and its BrdU labelling index were still elevated after cessation of 3'-MeDAB administration.

These findings indicate that copper could delay the development of 3'-MeDAB induced hepatic lesions, but not suppress, since copper does not stay long enough to accumulate in the rat liver, and that copper could not affect the proliferation of 3'-MeDAB induced hepatic lesions once developed. **(Korean J Pathol 1992; 26 : 360~371)**

**Key Words:** Hepatic carcinogenesis, 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene, Copper, Carcinogenesis.

접 수: 1992년 2월 26일, 게재승인: 1992년 5월 9일  
주 소: 서울시 서대문구 신촌동 134번지, 우편번호 120-752  
연세대학교 의과대학 병리학교실, 박찬일

서 론

구리는 생체에 필수적인 중금속의 하나로 철과 함께

호기성 대사에서 전자의 전달에 중요한 역할을 하고 결체조직생성에도 관여하며<sup>1)</sup>, 또한 구리함유효소인 superoxide dismutase나 세룰로플라스민은 중요한 항산화제의 역할을 한다. 그러나 인체의 정상적 생리 조절을 위하여 필요한 구리의 양은 극히 미량이며, 조직내에 과다하게 축적되면 심한 독성을 나타낸다<sup>2,3)</sup>. 과다한 구리축적에 의한 간손상은 메탈로치오네인과 결합된 상태로 저장된 구리로부터 자유기가 생성되기 때문이라고 추측되나 아직 확실치 않다.

인체에서 간에 구리가 축적되는 대표적인 질환으로는 유전적 구리대사 장애로 인하여 간, 뇌 및 각막 가장자리에 구리가 축적되어 조직손상을 초래하는 Wilson병이 있으며, 원발성 담즙성 간경변증을 비롯한 만성 담도폐쇄성 질환 및 만성 담즙정체성 질환에서도 담관을 통한 구리배설의 장애 때문에 이차적으로 간세포에 구리가 축적될 수 있다. Wilson병과 원발성 담즙성 간경변증에서 구리가 축적되는 기전은 서로 다르지만 두 질환 모두 조기에 간경변증으로 진행함에도 불구하고 혈색소증, B형 바이러스성 간질환 등의 다른 원인에 의한 간경변증에 비하여 간암종의 발생이 극히 드물다<sup>4-6)</sup>. Wilson병의 경우 적절한 치료들 하면 중년이상이 되도록 생존할 수 있을 뿐 아니라 원발성 담즙성 간경변증도 혈색소증보다 빨리 간경변증으로 진행함에도 불구하고 간암종이 거의 발생하지 않은 점은 구리에 항암효과가 있을 가능성을 시사한다<sup>7)</sup>. 구리와 간암의 관계에 대한 것으로서 간세포암종 중 예후가 좋은 것으로 알려진 fibrolamellar 형에서는 암세포내에 구리 및 구리결합단백이 축적된다는 보고가 있고<sup>8)</sup>, 간암종 환자에서 혈청구리가 적을 때 예후가 더 좋다는 보고가 있다<sup>9)</sup>. 이와 같이 간암종에 대한 구리의 영향에 관한 간접적 증거들이 제시되어 있음에도 불구하고 간암종 발생에 미치는 구리의 효과를 밝히기 위한 연구로는 구리가 간암종의 발생을 억제한다는 몇몇 긍정적인 연구결과가 있을 뿐이다<sup>10-12)</sup>.

실험적으로 간암종을 유발하기 위하여 수많은 종류의 화학발암물질들이 소개되어 왔으나 현재 가장 보편적으로 사용되고 있는 것은 azo 염료계의 화학물질들이다. Azo 염료에 의한 간암종발생은 azo 염료의 직접적인 작용에 의한 것이 아니라 azo 염료가 간세포의 cytochrome P<sub>450</sub> oxygenase system에 의해 최종 발암물질인 중간 대사산물로 변화되기 때문이라고 알려져 있다<sup>13,14)</sup>. 따라서 화학발암제에 의한 간암종의 발생은 발암제의 용량과 기간 뿐만 아니라 실험동물의 대사과정에 의해서도 크게 영향을 받는다<sup>15-19)</sup>. 화학발암제를 투여하면 최종적인 간암종이 발생하기 이전에 전암단계라고 할 수 있는 형태학적 변화들이 초래된다<sup>19-22)</sup>. 이러한 전암병변으로는 난원형세포(oval cell)의 증식, 간세포의 과증식결절(hyperplastic nodule), 그리고 섬유성 담관증식(cholangiofibrosis)이 있으며, 세포역동학적으로 볼 때 이들 병변들은 다소

의 차이는 있지만 자가증식능력을 갖고 있다<sup>23)</sup>.

그러므로 본 연구에서는 azo 염료계 화학발암제인 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene(이하 3'-MeDAB으로 약함)과 구리를 단독 또는 병합으로 기간을 달리 투여하여 간에 발생하는 암종 및 전암병변들의 출현빈도에 어떠한 차이가 있는지를 검토하고, 각 실험군의 간에 발생한 병변들의 세포증식능력을 면역조직화학적으로 검색하여 비교함으로써 발암과정에 나타나는 병변들의 자가 증식능에 대한 구리의 효과를 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

실험동물로는 체중 100g내외의 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 2주간 동일조건에서 시판 혼합사료로 예비사육한 후에 다음과 같은 실험군으로 나누었다.

I군	정상대조군
II군	구리단독투여군
III-A군	3'-MeDAB 단독투여군
III-B군	3'-MeDAB 단독투여군
IV-A군	구리와 3'-MeDAB 병합투여군
IV-B군	구리와 3'-MeDAB 병합투여군

I, II, III-A 및 IV-A군에서는 구리와 3'-MeDAB(동경 화성공업주식회사, 동경, 일본)을 단독 또는 병합투여한 기간에 따라 4주, 8주, 13주 및 16주의 소군으로 나누고 약물투여가 끝난 다음부터 정상사료로 사육한 후 실험시작 20주째에 일률적으로 도살하였다. III-B 및 IV-B군에서는 4주, 8주 및 13주간 약물을 투여하고 약물투여가 끝난 3일후에 도살하였다. 각 소군에 4마리씩의 동물을 배정하였으며, 실험기간 중 사망한 경우에 추가한 것을 포함하여 총 136마리가 소요되었다.

### 2. 방 법

**1) 약물투여:** 구리를 투여할 실험동물에는 증류수에 녹여 만든 0.1% 황산구리 용액을 1회 0.5 cc씩 일주일에 2회 복강내로 주사하였다. 3'-MeDAB을 투여할 실험동물은 3'-MeDAB이 약 0.06% 함유된 실험사료로 사육하였으며, 이 실험자료는 corn oil에 녹인 3'-MeDAB을 Miller등(1948)의 No. 3사료에 첨가하여 조제하였다(Table 1).

**2) 실험동물 관찰 및 도살:** 매주 1회씩 각 동물의 체중을 측정하고 실험기간 중 동물이 사망한 경우 곧 추가실험을 실시하였다.

계획된 시기에 동물 체표면적 m<sup>2</sup>당 200 mg의 5-bromodeoxyuridine(이하 BrdU로 약함)(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)을 5% 포도당 용액 250 cc에 녹여 꼬리동맥에 주사한 후, 30~40분

후에 ether로 마취하여 개복하고 간을 적출하였다. 간의 육안적 변화를 관찰하고 무게를 측정한다. 다음 간조직내의 구리함량 측정을 위한 조직과 각종 조직학적 및 면역 조직화학적 염색을 위한 조직절편을 채취하였다.

**3) 간조직내 구리농도 측정:** 간 적출시 1.5~3.0 g의 간조직을 절취하여 회화로에 넣고 백색가루가 될 때까지 충분히 태운 다음 5% HCl 5 ml를 첨가하여 유리막대로 혼합한 후 여과하였다. 이러한 과정을 수차례 반복하여 25 ml를 만들어서 원자흡수 분광광도계(Shimadazu AA-650)로 측정하였다.

**4) 간의 일반적인 조직학적 검색:** 채취한 간조직을 10%중성 포르말린에 8시간 이상 고정한다. 다음 일부를 절취하여 파라핀에 포매하고 5~6 μm 두께의 연속절편을 만들어 전반적인 조직학적 변화를 보기 위한 hematoxylin-eosin(H-E)염색, 교원섬유화의 정도를

보기 위한 Masson trichrome염색, 간조직내의 구리 축적을 보기 위한 rhodanine-light green 염색을 시행하였다.

**5) BrdU 표지세포 검색 및 표지지수 산정:** 파라핀에 포매한 조직으로 부터 만든 연속절편의 일부를 1 N HCL로 37°C에서 20분간 가수 분해시키고 0.05 % proteinase type VII(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)에 20분간, 그리고 periodic acid에 15분간 반응시킨 다음 증류수로 수세하고 정상 염소혈청에 30분간 방치하였다. 그후 실온에서 50배로 희석된 항-BrdU마우스 항체(Dako Co., Santa Barbara, Ca, USA)와 16시간, biotinylated goat antimouse IgG와 1시간, avidin-biotin peroxidase complex에 2시간 동안 차례로 반응시키고 인산 완충액으로 세척한 다음 0.03%의 3,3'-diaminobenzidine으로 발색시키고 hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경하에서 검색하였다. 조직학적으로 관찰된 각 병변들에 대하여 병변을 구성하는 세포 300개중 핵이 항-BrdU에 염색된 세포들을 세어 BrdU 표지지수로 정하였으며, 실험군 별 BrdU표지 지수의 차이에 관한 통계학적 의의는 Mann-Whitney test와 X<sup>2</sup>-test로 검증하였다.

**Table 1.** The composition of diets (per kg)

Constituent	Diet group	
	control	3'-MeDAB
Casein(g)	180	180
Corn oil(g)	50	50
Glucose monohydrate(g)	770	770
Salt mixture <sup>#</sup> (g)	40	40
Riboflavin(g)	0.001	0.001
Vitamin mixture <sup>*</sup> (mg)	5	5
3'-MeDAB(g)	-	0.6

# Contains cupric sulfate 3 mg

\* Contains vitamin A 20,000 units, vitamin D 2,000 units, choline chloride 1.5 g, pteroyl glutamic acid 0.6 mg, biotin 1.5 mg, thiamine-HCl 20 mg, pyridoxine-HCl 20 mg, menadione 50 mg, nicotinamide 50 mg, potassium parabenzoic acid 50 mg, calcium pantothenate 60 mg, inositol 100 mg, and cyanocobalamin 40 μg.

**결 과**

**1. 실험동물의 관찰**

**1) 사망율:** 실험기간 중 동물이 사망하여 추가로 사용한 동물 수는 모두 63마리였다. 동물사망은 3'-MeDAB을 투여받은 III군과 IV군에 많았으며, 사망의 대부분은 약물투여를 시작한 후 비교적 초기인 4주 이내에 발생하였다(Table 2).

**2) 간의 무게:** 간의 무게를 동물의 체중 100 g당으로 환산하여 표시한 결과는 table 3과 같다. 정상대조군에서는 3.20 g인 반면 구리만 투여한 II군에서는 2.53~3.08 g으로 약간 감소하였다. 그러나 3'-MeDAB을 일정기간 투여하고 20주까지 정상사료로 사육한 후 도살한 III-A군에서는 투여기간이 길수록 간

**Table 2.** Death rate of animals in each group

Experimental group	No of animals used	No. of animals died	No. of animals survived	Death rate(%)
I	4	0	4	0
II	22	5	17	22.7
III-A	36	21	15	58.3
III-B	18	7	11	38.9
IV-A	38	23	15	60.5
IV-B	18	7	11	38.9
Total	136	63	73	46.3

의 무게가 점차 증가하여 16주간 투여한 경우 18.34 g이나 되었다. 구리와 3'-MeDAB을 함께 투여하고 20주까지 정상사료로 사육한 후 도살한 IV-A군에서도 투여기간이 길수록 간의 무게가 점차 증가하였으나 전반적으로 III-A군에 비하여 적었다( $p=0.08$ ). 일정기간 동안 약물투여가 끝난 후 3일째 도살한 III-B군의 간무게는 차이가 없었으며, 전 실험기간 동안 정상 대조군과 거의 같았다.

## 2. 간조직내 구리함량의 변동

간조직내 구리함량을 간조직 g당으로 표시한 바 정상대조군에서는  $6.56 \mu\text{g}$ 이었다. 3'-MeDAB 단독투여군인 III군은 정상 대조군과 비슷하였으며, 구리 단독투여군인 II군에서도 조직내 구리함량의 증가가 없었다. 구리와 3'-MeDAB을 함께 투여하고 3일후 도살하였던 IV-B군에서는 모든 동물에서 구리함량이 정상보다 유의있게 증가하였으나 투여기간에 따른 차이는 없었으며, 약물 투여후 20주까지 정상사료로 사육한

IV-A군 중에서는 16주까지 약물을 투여받은 경우(약물투여후 도살시기까지의 기간이 가장 짧았던 경우)에만  $27.22 \mu\text{g}$ 으로 증가하였다.

## 3. 간의 육안 소견

II군의 간은 정상과 같이 연한 갈색을 띠며 표면은 평활하고 절단면에는 과립이나 결절이 전혀 없었다.

III-A군의 4주에는 간표면이 미세한 과립상을 띠기 시작하였으며 8주에는 간표면이 3~5 mm가량의 작은 결절상을 보이고 직경 6~9 mm 이상되는 뚜렷한 결절이 형성된 것도 있었으며, 5마리중 1마리에서는 절단면에서 장경 4 cm의 큰 종괴가 관찰되었다. 13주에는 결절의 크기가 좀더 커지는 경향이었으며 3마리에서는 간표면의 대부분이 직경 1 cm내외의 큰 결절들로 대체되고 절단면에서 직경 4~6 cm 정도의 큰 종괴가 발견되었다. 16주에는 4마리 모두에서 직경 5 cm 전후의 커다란 종괴가 발생하였다.

IV-A군의 경우 4주에는 III-A군과 비슷하였으며,

**Table 3.** Changes in liver weight(g/100 g body weight) of rats according to experimental groups

Experimental group	Duration of copper and/or 3'-MeDAB administration			
	4 wks	8 wks	13 wks	16 wks
I	3.20±0.05(4)			
II	2.53±0.06(4)	3.08±0.07(4)	2.78±0.21(5)	2.73±0.12(4)
III-A	4.66±0.08(2)	9.09±2.91(5)	13.91±6.71(4)	18.34±4.65(4)
III-B	3.23±0.59(3)	3.38±0.24(3)	3.68±0.25(5)	-
IV-A*	3.77±0.14(6)	6.26±0.71(2)	7.45±1.56(3)	15.90±5.01(4)
IV-B	2.45±0.05(4)	3.02±0.50(3)	3.70±0.22(4)	-

Values are mean ± standard error.

( ): No. of animals in each group

\* Statistically significant difference compared to III-A( $p=0.08$ )

**Table 4.** Hepatic copper content( $\mu\text{g/g}$  wet liver weight) of experimental animals

Experimental group	Duration of copper and/or 3'-MeDAB administration			
	4 wks	8 wks	13 wks	16 wks
I	6.56±0.78(4)			
II	6.05±1.57(4)	4.88±0.51(4)	10.28±1.73(5)	7.14±1.52(4)
III-A	4.03 (1)	7.82±1.67(5)	3.48±0.44(4)	5.66±0.37(4)
III-B	4.84±1.01(3)	4.30±0.22(3)	4.68±0.42(5)	-
IV-A	5.46±1.64(6)	6.86±2.57(2)	4.75±0.66(3)	27.22±3.67(4)
IV-B*	15.93±3.69(4)	10.75±2.32(3)	14.72±3.96(4)	-

Values are mean ± standard error.

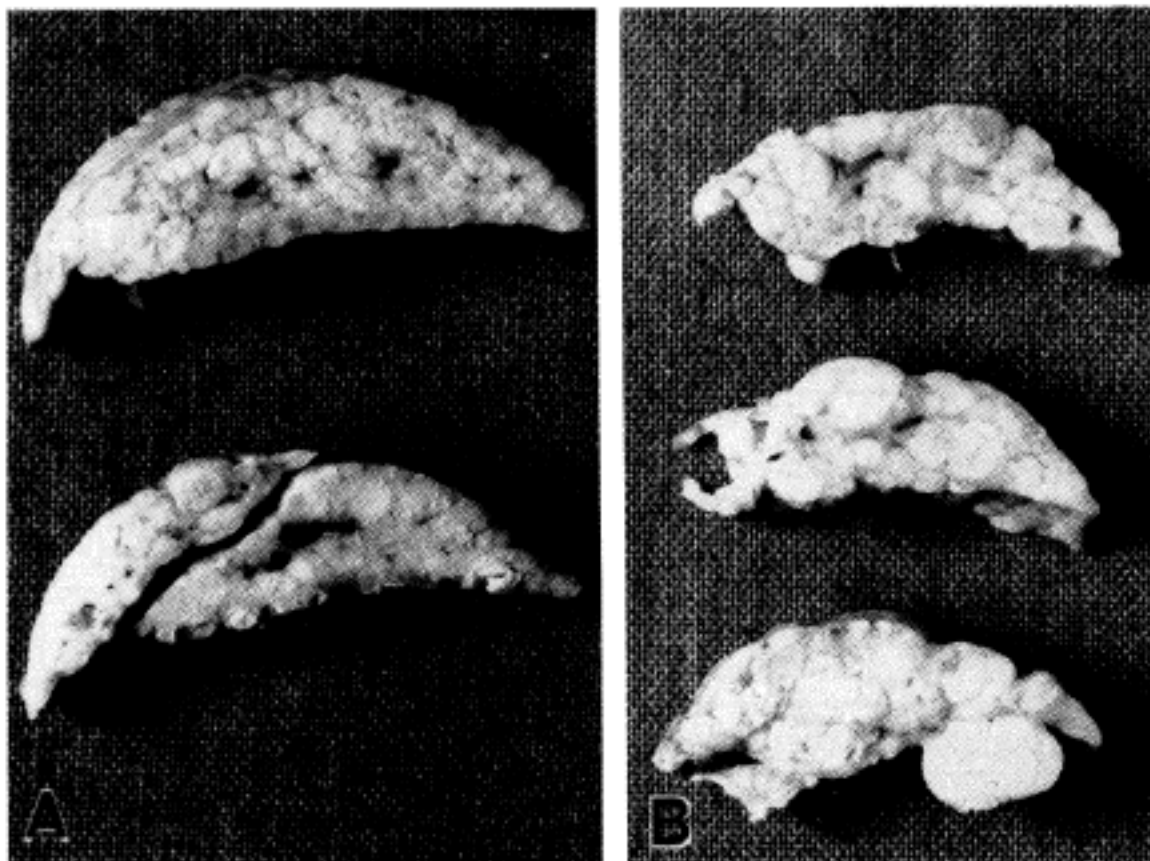
( ): No. of animals in each group

\* Statistically significant difference compared to control( $p<0.05$ )

**Table 5.** Gross morphology of rat liver in each experimental group

Experimental group	No. of animals	Granules or nodules on liver surface*				Mass in liver*
		≤2 mm	3~5 mm	6~9 mm	≥1 cm	≥3 cm
III-A 4	2	1	1	-	-	-
8	5	1	2	1	1	1
13	4	-	-	1	3	2
16	4	-	-	-	4	4
III-B 4	3	3	-	-	-	-
8	3	1	2	-	-	-
13	5	-	3	2	-	-
IV-A 4	6	5	1	-	-	-
8	2	-	1	-	1	-
13	3	1	-	1	1	-
16	4	-	-	-	4	4
IV-B 4	4	4	-	-	-	-
8	3	1	2	-	-	-
13	4	2	2	-	-	-

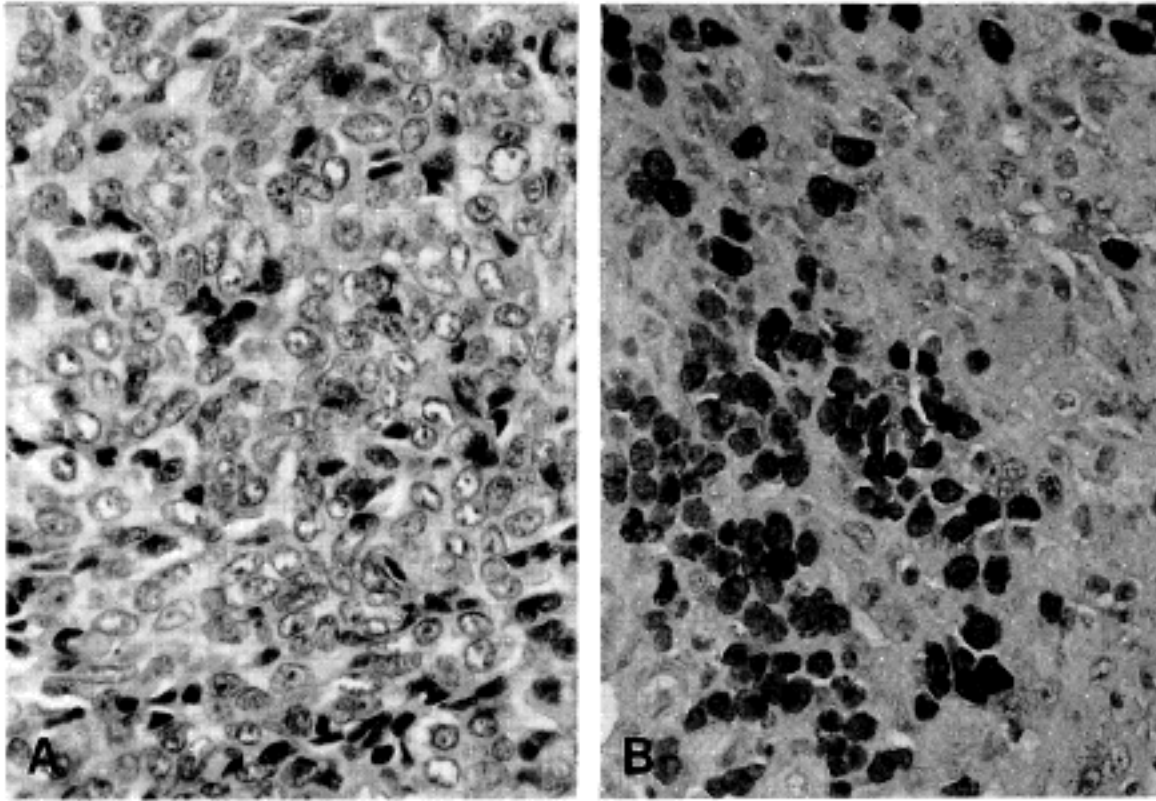
\* No. of animals showing varying sizes of granules or nodules on liver surface, and showing masses of 3 cm or more in diameter.



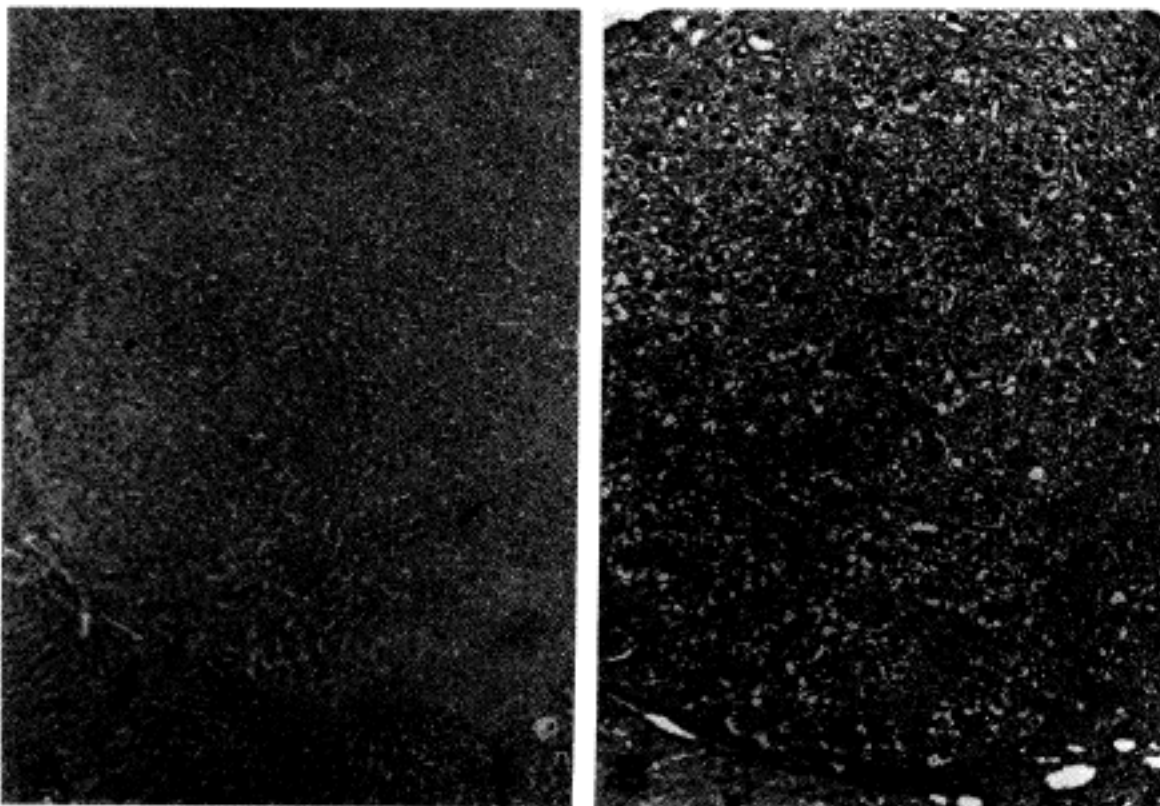
**Fig. 1.** Macroscopic features of the liver following administration of (A) 3'-MeDAB plus copper and (B) 3'-MeDAB only, for 13 weeks. Note the nodules seen on the cut surface that are smaller in A than B.

8주에도 표면의 과립상은 비슷하였으나 절단면에서 3cm 이상의 종괴가 발견된 예는 없었다. 13주에도 3마리 중 1마리에서만 간표면이 1cm 정도의 결절들로 대치되었고 3cm 이상되는 종괴는 없었으나 16주에는 4마리 모두 III-A군 16주와 같이 약 5cm의 큰 종괴가 발생하였다(Table 5).

약물투여가 끝난 3일후 도살한 III-B 및 IV-B군의 육안소견을 보면 다음과 같다. III-B군의 4주에는 간표면이 평활하거나 아주 미세한 과립상을 띠었다. 제 8주에는 직경 3~5mm의 뚜렷한 결절들로 덮여 있었으며, 13주에는 결절이 좀 더 커져서 6~9mm의 결절이 출현하기도 하였으나 1cm 이상의



**Fig. 2.** Microscopic feature of the proliferated oval cells(A). B: Immunohistochemical staining for BrdU showing numerous positive cells on the 3rd day following 3'-MeDAB administration(Avidin-biotin peroxidase complex).



**Fig. 3.** Hyperplastic nodule compressing the adjacent liver tissue (arrows)(A). B: Many BrdU positive cells are seen on the 3rd day following 3'-MeDAB administration(Avidin-biotin peroxidase complex).

결절이나 종괴가 형성된 예는 없었다(Fig. 1B).

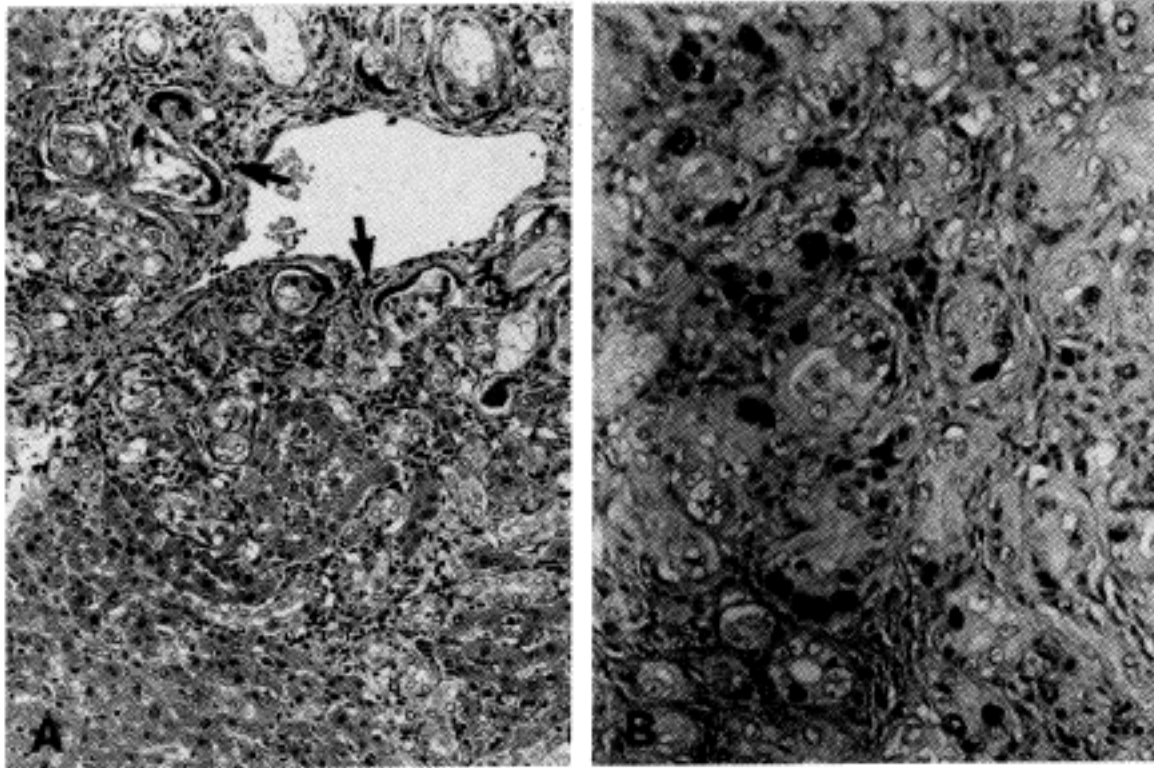
IV-B군의 경우에도 4주, 8주, 및 13주 모두 III-B군과 비슷한 간표면상을 보였으나 III-B군에 비해 다소 미약하였다(Fig. 1A).

#### 4. 간의 광학현미경 소견

구리만 투여한 II군의 간에서는 일부 간세포의 경한 혼탁증상과 간피막이 다소 두꺼워진 소견외에는 정상 대조군과의 차이를 볼 수 없었고 담관 및 담소관의 변

화도 없었으며, 구리투여 기간에 따른 차이도 없었다.

3'-MeDAB을 단독 또는 구리와 병합 투여한 III군과 IV군에서는 난원형세포의 증식, 과증식결절의 형성, 섬유성 담관증식 등의 병변들과 암종의 발생이 관찰되었는데 실험군에 따라서 그 발생정도는 다소의 차이를 보였다. 난원형세포의 증식은 투약 4주부터 문맥역에서 관찰되기 시작하였으며 투약기간의 증가에 따라 소엽내로 파급하였다. 이러한 난원형세포의 증식(Fig. 2A)은 약물투여 후 정상사료로 사육한 III-A



**Fig. 4.** Microscopic feature of cholangiofibrosis with some atypical changes(arrow)(A). B: BrdU positive cells are still numerous long after the cessation of 3'-MeDAB administration (Avidin-biotin peroxidase complex).

및 IV-A보다 약물투여 3일후 도살한 III-B 및 IV-B 군에서 현저하였고, 구리병합투여 여부에 따른 차이는 없었다.

과증식결절은 주변 간세포들에 비해 세포질이 좀더 창백한 세포들로 구성되어있으며 주변 간조직을 압박하는 모습이었다(Fig. 3A). III-A와 IV-A군의 경우에는 약물투여기간에 관계없이 모든실험동물에서 과증식결절이 발생하였으나 구리 병합투여 여부에 따른 차이는 일정치 않았다. 약물투여 3일후 도살한 경우(III-B 및 IV-B) 4주에는 과증식결절이 발생되지 않았으나 8주 및 13주에는 과증식결절의 형성이 매우 현저하여 대부분의 간실질을 침범하였다. 특히 III-B 및 IV-B 군에서는 과증식결절을 구성하는 세포들에서 비정형 변화가 관찰되었는데 이러한 변화는 구리 병합투여 여부에 관계없이 투약기간이 길수록 심하였다.

섬유성 담관증식은 구리 병합투여 여부와 관계없이, 그리고 투약완료 후의 정상사료 사육여부와 관계없이 발생하였으나 투약기간이 길어짐에 따라 더 현저해져서 문맥역 사이가 섬유성 담관증식에 의해 연결되었다. 섬유성 담관증식을 구성하는 상피세포들은 흔히 비정형 변화를 보였는데 이러한 비정형 변화는 투약완료 후 정상사료로 사육한 경우(III-A 및 IV-A)에 더 심한 경향을 보였다(Fig. 4A).

각 병변들의 정도를 다음과 같이 경도, 중등도 및 고도로 나누어 실험군 사이의 차이를 비교하였다. 즉 난원형세포의 증식정도는 간조직의 절반 미만을 차지하는 경우를 경도, 절반 이상인 경우를 중등도, 증식이 왕성하여 관상 배열을 이루는 경우를 고도로 나누었으며, 과증식결절의 형성정도는 40배 10시야에서 5개 미만으로 관찰되는 경우를 경도, 간실질 전체가 과증식결절로 대체된 경우를 고도, 그 중간 형태를 중등도

로 하였다. 섬유성 담관증식의 정도는 문맥역에 국한된 경우를 경도, 문맥역 사이가 섬유성 담관증식으로 연결된 경우를 중등도, 관상배열을 이루는 경우를 고도로 나누었으며, 실험군별 각 병변의 발생 정도는 table 6과 같다.

암종의 발생은 투약완료 후 정상사료 사육여부에 관계없이 III군과 IV군 모두에서 8주간 약물투여 후부터 관찰되었으며, 거의 대부분 간세포암종과 담관상피암종으로의 이중분화를 보였다. 조직내의 구리축적을 보기 위한 rhodanine염색상 광학현미경적으로 발견할 수 있을 정도로 구리가 축적된 실험군은 하나도 없었다.

### 5. BrdU 표지세포에 관한 면역조직화학적 염색 소견

면역조직화학적 염색에서 BrdU 표지세포의 핵은 갈색의 과립상을 보였으며, BrdU 표지지수는 약물투여기간, 약물투여 후 정상사료 사육여부 및 병변의 종류에 따라 서로 달랐다(Table 7).

1) 간세포: 구리단독투여군(II군) 간세포의 BrdU 표지지수는  $0.83 \pm 0.69 \sim 1.10 \pm 0.70$ 으로서 투여기간에 상관없이 모두 정상대조군(I군)의  $1.25 \pm 0.43$ 과 같았다. 3'-MeDAB 단독 또는 구리 병합투여후 20주까지 정상사료로 사육한 III-A 및 IV-B군에서도 간세포의 BrdU 표지지수는 약물투여기간에 관계없이 정상대조군과 비슷하였다. 약물투여 3일후 도살한 III-B 및 IV-B군 간세포의 BrdU 표지지수는 III-A 및 IV-A군보다 현저하게 높았다( $p < 0.05$ ).

2) 난원형세포: 난원형세포의 BrdU 표지지수는 투약기간에 관계없이 III-A군의 경우 평균  $3.88 \pm 1.31$ , IV-A군의 경우 평균  $2.25 \pm 0.31$ 로 유의 있는 차이가

**Table 6.** Histologic changes of the liver

Group	Week*	No. of animals	Oval cell proliferation	HN(atypia)	CF(atypia)	Occurrence of carcinoma
I		4	-	-	-	-
II	4-16	17	-	-	-	-
III-A	4	2	+	++(-)	+(+)	-
	8	5	++	++(-)	++(+++)	2/5
	13	4	++	+(+)	+++(+++)	4/4
	16	4	+++	++(+)	+++(+++)	4/4
III-B	4	3	+++	-(-)	+(-)	-
	8	3	+++	+++(+++)	+++(+++)	1/3
	13	5	+++	+++(+++)	++(+++)	5/5
IV-A	4	6	++	+(-)	++(+++)	-
	8	2	++	++(-)	++(+++)	1/2
	13	3	++	+++(+)	++(+++)	2/3
	16	4	+++	+(+)	+++(+++)	4/4
IV-B	4	4	+	-(-)	+(-)	-
	8	3	+++	+++(+++)	++(+)	1/3
	13	4	+++	+++(+++)	++(+++)	3/4

\*: Duration of drug administration, HN: Hyperplastic nodule, CF: Cholangiofibrosis  
 +: Mild, ++: Moderate, +++: Severe

**Table 7.** BrdU labelling indices of various hepatic lesions developed following copper and/or 3'-MeDAB administration

Group	Week†	No.	Hepatocyte	Oval cell	HN	CF	Carcinoma
I		4	1.25±0.43	-	-	-	-
II	4	4	0.88±0.33	-	-	-	-
	8	4	1.00±0.50	-	-	-	-
	13	5	1.10±0.70	-	-	-	-
	16	4	0.83±0.69	-	-	-	-
III-A	4	1	1.50±0.50	2.00±0.71	1.75±0.43	8.95± 3.44	-
	8	5	3.40±3.38	2.75±1.09	4.75±4.20	21.25± 4.38	46.25±15.75
	13	4	1.83±1.95	3.25±1.29	4.75±1.92	30.88± 5.71	74.86± 5.91
	16	4	1.50±0.76	5.50±3.50	4.60±2.06	34.50±11.40	64.78±16.78
III-B	4	3	11.71±3.44*	8.83± 3.02*	-	12.50± 2.50	-
	8	3	-	7.17± 3.24*	13.13± 8.61*	34.50±13.50	69.50±13.50
	13	5	-	30.80±31.35*	29.60±18.29*	53.71±15.45	100.20±17.81
IV-A	4	6	1.25±0.43	2.00±0.71	1.60±1.35	24.10±13.58	-
	8	2	2.56±0.45	2.00±0.83	5.86±3.45	20.98± 5.43	47.54± 9.64
	13	3	3.40±1.85	2.25±0.43	5.75±2.77	29.50± 8.56	65.40± 7.84
	16	4	3.20±1.94	2.75±0.43	6.43±1.50	33.50±17.03	82.08±17.34
IV-B	4	4	7.00±3.70*	17.38±12.10*	-	10.33± 4.49	-
	8	3	-	9.33± 5.59*	13.18±10.32*	17.00± 6.20	129.00±25.30
	13	4	-	36.00±22.11*	26.50±17.68*	53.33± 7.39	92.75± 8.90

†: Duration of drug administration, No.: Number of animals

HN: Hyperplastic nodule CF: Cholangiofibrosis

Values are mean±standard error.

\*: Statistically significant difference compared to respective lesions of III-A and IV-A



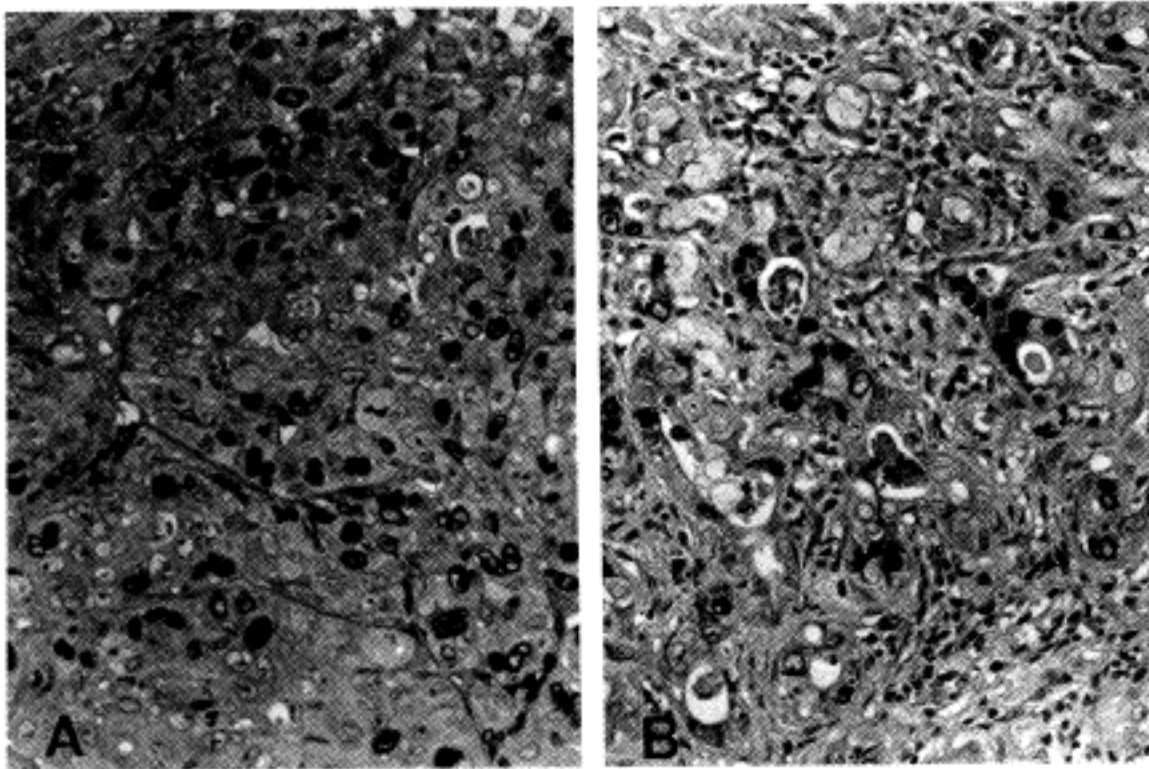


Fig. 5. Areas of hepatocellular carcinoma(A) and cholangiocarcinoma(B) showing high BrdU indices(Avidin-biotin peroxidase complex).

없었다. III-B군 및 IV-B군의 BrdU 표지지수(Fig. 2B)는 III-A군 및 IV-A군 보다 전반적으로 높아서 투약후 정상사료로 사육하는 동안에 난원형세포의 BrdU 표지지수가 현저히 감소함을 알 수 있었다( $p < 0.05$ ). 그러나 III-B군과 IV-B군 사이의 차이는 뚜렷하지 않았다.

**3) 과증식결절:** 과증식결절을 구성하는 간세포들의 BrdU 표지지수는 III-A 및 IV-A군의 경우 8주간 투약한 후부터 정상 간세포보다 높아지기 시작하여 약물투여기간에 관계없이 비슷한 정도로 유지되었으며, 구리 병합투여 여부에 따른 차이는 없었다. III-B 및 IV-B군의 BrdU 표지지수(Fig. 3B)는 III-A 및 IV-A군에 비해 훨씬 높았으며( $p < 0.05$ ), 투약기간에 따라서도 증가하는 경향이었으나 구리 병합투여에 의한 변화는 없었다.

**4) 섬유성 담관증식:** 섬유성 담관증식을 구성하는 상피세포의 BrdU 표지지수는 투약기간이 길어짐에 따라 점차 증가하는 경향을 보였으나 구리 병합투여 여부에 따른 차이는 없었으며, 투약후 정상사료로 사육한 III-A 및 IV-A군에서도 BrdU 표지지수의 감소가 없었다(Fig. 4B).

**5) 암종:** 암종의 BrdU 표지지수는  $46.25 \pm 17.75 \sim 129.00 \pm 25.30$ 에 이르렀으며(Fig. 5), 구리 병합투여 여부(III군 vs IV군)에 따른 차이는 없었다. 그러나 투약 후 곧 도살한 III-B 및 IV-B군에서 BrdU 표지지수가 III-A 및 IV-A군보다 높은 경향을 보였는데 이러한 경향은 특히 담관상피암종보다 간세포암종 부위에서 뚜렷하였다.

## 고 찰

화학 발암물질은 그 특성에 따라 작용기전이 다양하며, 본 실험에서 사용한 3'-MeDAB은 azo염기계 화합물질로서 간세포 cytochrome의 P<sub>450</sub> oxygenase system에 의해 대사된 중간산물이 발암물질로 작용한다<sup>13,14</sup>. 대사과정에 관계하는 인자들 중 3'-MeDAB의 azo결합을 끊는 효소인 azoreductase가 중요하며 이 효소의 활성화에는 riboflavin이 조효소로 작용하기 때문에 본 실험과 같이 riboflavin이 적게 함유된 사료로 사육하면 3'-MeDAB에 의한 암형성이 증가한다<sup>24,25</sup>. DL-ethionine 또는 dimethylnitrosamine을 투여한 기존의 실험보고들에서는 발암물질을 25주 이상 단독투여할 때 75% 정도의 간암발생율을 보인 반면<sup>10-12</sup>, 본 실험에서는 3'-MeDAB을 13주만 단독투여한 군에서도 100%의 간암발생을 보여 riboflavin 결핍이 실험적 간암발생의 중요한 요소임을 확인할 수 있었다. 또한 본 실험에서는 3'-MeDAB 투여군에서 약 40~60% 정도로 사망율이 높았는데 이는 체중 100g 내외의 비교적 어린 흰쥐를 사용하였기 때문일 가능성이 많다.

본 실험에서 사용한 정상사료에는 1kg당 3mg의 황산구리가 함유되어 있으며, 구리투여군에는 1주에 황산구리 1.0mg씩을 복강내 주사하였는데 이 용량은 예비실험 결과 주당 5mg을 투여할 때 동물의 사망율이 높아서 구리를 사용한 기존의 실험적 연구를 참고하여 조정된 용량이며<sup>10,12</sup>, 구리만 투여한 군의 조직검사상 일부 간세포의 경한 혼탁종창만 관찰되었을 뿐 구리에 의한 간세포의 손상은 거의 없었다.

본 연구에서 구리들(단독 또는 3'-MeDAB과 함께)

투여한 실험군 중 투여후 3일째에 도살한 IV-B군에서는 조직내 구리의 함량이 증가하였으나 도살까지의 기간이 4주이상인 경우에는 조직내 구리의 증가가 없었다. 이러한 결과는 구리를 투여한 후 3일이 지나면 간조직내 구리가 정상치로 회복된다는 Evans등<sup>26)</sup>의 보고와 같으며, 구리의 대사 및 배설에 약 3일이 소요됨을 의미한다. 또한 일정기간 구리와 3'-MeDAB을 투여한 후 20주까지 정상사료로 사육한 IV-A군 중 16주동안 약물투여를 하여 정상사료로 사육한 기간이 가장 짧았던 경우에는 조직내 구리함량의 급격한 증가가 관찰되었다. 이러한 결과는 구리와 ethionine을 장기간 투여할 때 도살시까지의 기간이 짧은 경우에만 조직내 구리가 증가하였던 Kamamoto등<sup>11)</sup>의 결과와 같으며, 또한 구리투여후 4주가 지났더라도 병행투여한 3'-MeDAB이나 ethionine에 의하여 정상적인 구리대사 및 배설이 이루어지지 않을 정도의 간암종 또는 간손상이 초래되면 구리가 축적될 수 있음을 암시한다. 이와 관련하여 Berg 및 Hamer<sup>27)</sup>는 쥐의 간세포암종을 배양하여 배지내의 구리농도와 암세포의 구리흡수가 비례함을 관찰한 바 있다. 그러나 생체내 실험에서 일어나는 간암종의 구리축적이 암세포에서 종양태아단백의 일종으로 여겨지는 구리결합단백의 생성 때문인지 암세포에 흡수된 구리가 담즙을 통하여 배설되지 못하기 때문인지는 아직 분명하지 않다<sup>28,29)</sup>. 본 연구에서는 간조직내의 구리함량이 증가한 경우에도 rhodanine 염색상 구리입자가 관찰되지 않았다. 그러므로 축적된 구리는 비입자형의 자유구리이거나 염색될 만큼 충분치 않았을 가능성<sup>30)</sup>이 있으며, 간세포로부터의 배설장애에 의한 구리축적은 리소솜내에 축적되어 rhodanine염색상 입자로 관찰되는 점을 고려하면 간암종내 구리축적은 배설장애와는 무관할 것으로 생각된다.

3'-MeDAB과 구리를 병합투여하고 20주까지 정상사료로 사육한 후 도살한 경우 3'-MeDAB을 단독투여한 경우에 비하여 간의 무게가 적고, 과립, 결절 및 종괴의 형성도 더 적었던 본 연구결과는 3'-MeDAB 또는 DL-ethionine에 의한 간암 발생과정이 구리에 의해 억제된다는 Pedrero 및 Kozelka<sup>10)</sup>와 Kamamoto등<sup>11)</sup>의 실험결과와 같다. 그러나 3'-MeDAB을 투여한 3일째에 도살한 경우에는 구리 병합투여의 여부와 관계없이 간의 무게가 정상대조군과 같고 결절 및 종괴의 형성도 20주까지 정상사료로 사육한 후에 도살한 경우보다 적었다. 이러한 결과로 미루어 보아 3'-MeDAB에 의한 간암종의 발생에 어느 정도의 잠복기간이 필요하다는 것을 알 수 있다. 또한 흰쥐에서 구리 대사에 필요한 기간을 3일정도라고 할 때<sup>26)</sup> 화학발암제 투여기간과 잠복기간 전반에 걸쳐 적어도 3일에 한번씩 구리를 투여함으로써 간조직의 구리함량을 높게 유지하면 화학발암제의 의한 간암의 발생을 더욱 효과적으로 억제시킬 수 있을 것으로 기대된다.

3'-MeDAB을 이용한 실험적 간암 발생과정에서 나타나는 변화로는 난원형세포의 증식, 간세포의 과증식 결절 및 섬유성 담관증식이 있다. 저자들은 BrdU-함 BrdU를 이용한 면역조직화학적 염색으로 이러한 병변들에 정도의 차이는 있지만 다소의 자가증식능이 있다는 증거를 관찰한 바 있다<sup>23)</sup>. 본 연구에서는 구리가 이들 병변들의 증식능에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하였다. BrdU는 생체내 투여후 곧 thymidine과 치환되기 때문에 이에 대한 단클론항체를 일차항체로 항면역조직화학적 염색을 하여 BrdU 표지세포를 검색함으로써 병변들의 증식능을 비교할 수 있다. 간세포, 난원형세포 및 과증식결절의 BrdU 표지지수는 3'-MeDAB투여를 중단한 후 감소하는 반면 섬유성 담관증식의 BrdU 표지지수는 투여 중단후에도 높은 수치로 유지되고, 난원형세포의 증식정도과 과증식 결절의 비정형 변화도 투약 중단후 감소한 반면 섬유성 담관증식의 발생빈도 및 비정형 변화는 투약 중단후에도 지속되는 것으로 보아 섬유성 담관증식은 상당한 자가증식능을 갖는 진정한 전암병변임이 확실하다. 한편 난원형세포, 과증식결절, 섬유성 담관증식 및 암종에서 BrdU 표지지수는 구리 병합투여 여부에 따른 차이를 보이지 않았는데 이는 구리가 3'-MeDAB에 의한 발암과정에서 일단 발생한 병변들의 증식능에 영향을 미치지 못함을 의미한다고 볼 수 있다.

구리가 간암 발생과정을 억제하는 기전에 대하여는 아직 잘 알려져 있지 않으나 dimethylnitrosamine 과 같이 methylation을 조장하는 발암물질에 의한 실험적 발암과정에서 구리를 병합투여하면 DNA의 methylation이 억제되어 발암과정의 초기단계(initiation)가 성취되지 못할 것이라는 견해가 주목을 끈다<sup>12)</sup>. 본 연구에서 구리가 일단 발생한 병변들의 증식능에 영향을 미치지 못한 것은 이러한 가설을 지지하는 결과라고 생각한다.

## 결 론

구리가 화학발암제에 의한 간암발생과정에 미치는 영향을 알아보기 위하여 3'-MeDAB을 단독 또는 황산구리와 함께 기간을 달리 투여한 후 도살하여 간의 무게, 구리함량 및 조직학적 변화를 조사하고 간에 발생한 병변들의 BrdU 표지지수를 산출하여 실험군 사이의 차이를 비교하였다.

간의 구리함량은, 구리를 병합투여하고 3일째에 도살한 경우에 의의있게 높았으나 투여기간에 따른 차이는 없었으며, 투약중단 후에는 정상 범위로 감소하였다. 3'-MeDAB은 난원형세포의 증식, 간세포의 과증식결절, 섬유성 담관증식 및 암종을 유발하였다. 그 중 암종의 병변들의 발생빈도는 구리 병합투여 여부에 따른 차이를 보이지 않았으나 육안적인 결절 및 종괴 형성의 정도와 간의 무게증가는 구리 병합투여시 뚜렷하

게 적었다. 3'-MeDAB 단독 또는 구리 병합투여시의 간의 무게증가와 결절 및 종괴형성은 투약을 중단한 후에도 더욱 증가하였다. 난원형세포, 과중식결절, 섬유성 담관증식 및 암종의 BrdU 표지지수는 구리 병합투여 여부에 따른 차이를 보이지 않았다. 섬유성 담관증식의 발생빈도와 BrdU 표지지수는 투약 중단후에도 높게 유지되었으나 난원형세포와 과중식결절의 BrdU 표지지수는 투약 중단후 감소하였다.

이상의 결과를 종합하면 흰쥐에서는 구리가 빨리 대사되어 소실되기 때문에 3'-MeDAB에 의한 발암과정을 완전히 억제하지 못하지만 전암단계 병변들의 발생을 지연시키며, 일단 발생한 병변들의 성장속도에는 구리의 효과가 미치지 못한다고 생각한다.

### 참 고 문 헌

- 1) Epstein O. *Liver copper in health and disease. Postg Med J* 1983; 59(suppl 4): 88-94.
- 2) Barka T, Scheuer PJ, Schaffner F, Popper H. *Structural changes of liver cell in copper intoxication. Arch Pathol* 1964; 78:331-49.
- 3) Popper H, Godfischer S, Sternlieb I, Nayak NC, Mcdhavan TV. *Cytoplasmic copper and its toxic effects. Studies in Indian childhood cirrhosis. Lancet* 1979; 9: 1205-8.
- 4) Krasner N, Johnson PJ, Portmann B, Watkinson G, Macsween RNM, Williams R. *Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis; report of four cases. Gut* 1979; 20: 255-8.
- 5) Kapelaman B, Schaffner F. *The natural history of primary biliary cirrhosis. Semin Liver Dis* 1980; 1: 273-81.
- 6) Wilkinson ML, Portmann B, Williams R. *Wilson's disease and hepatocellular carcinoma; possible protective role of copper. Gut* 1983; 24: 767-71.
- 7) Sternlieb I. *Copper and the liver. Gastroenterology* 1980; 78: 1615-28.
- 8) Lefkowitz JH, Muschel R, Price JB, Marboe C, Braunhut S. *Copper and copper-binding protein in fibrolamellar liver cell carcinoma. Cancer* 1983; 51:97-100.
- 9) Miatto O, Casaril M, Gabrielli GB, Nicoli N, Bellisola G, Corrocher R. *Diagnostic and prognostic value of serum copper and plasma fibrinogen in hepatic carcinoma. Cancer* 1985; 55: 774-8.
- 10) Pedrero E, Kozelka FL. *Effect of copper on hepatic tumors produced by 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. AMA Arch Pathol* 1951; 52: 455-7.
- 11) Kamamoto Y, Makiura S, Sugihara S, Hiasa Y, Arai M, Ito N. *The inhibitory effect of copper on DL-ethionine carcinogenesis in rats. Cancer Res* 1973; 33: 1129-35.
- 12) Yamane Y, Sakai K, Umeda T, et al. *Suppressive effect of cupric acetate on DNA alkylation, DNA synthesis and tumorigenesis in the liver of dimethylnitrosamine treated rats. Gann* 1984; 75: 1062-9.
- 13) White RE, Coon MJ. *Oxygen activation by cytochrome P-450. Ann Rev Biochem* 1980; 4: 315-56.
- 14) Miller EC, Miller JA. *Mechanism of chemical carcinogenesis. Cancer* 1981; 47: 1055-64.
- 15) Peraino C, Fry RJM, Staffeldt E. *Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene. Cancer Res* 1971; 31: 1506-12.
- 16) Farber E. *Chemicals, evolution, and cancer development. Am J Pathol* 1982; 108: 270-5.
- 17) Scherer E. *Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis. Biochem Biophys Acta* 1984; 783: 219-36.
- 18) Driver HE, McLean AEM. *Dose-response relationships for infiltration of rat liver tumors by dimethylnitrosamine and promotion by phenobarbitone or alcohol. Food Chem Toxicol* 1986; 24: 241-5.
- 19) 김호근, 이유복. 발암제(3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene)로 유도된 간암발생 과정에 관한 연구. 연세의대논문집 1987; 20: 285-98.
- 20) Sell S, Leffert HL. *An evaluation of cellular lineage in the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma. Hepatology* 1982; 2: 77-86.
- 21) Taso M, Grisham JW. *Hepatocarcinoma, cholangiocarcinoma, and hepatoblastomas produced by chemically transformed cultured rat liver epithelial cells. Am J Pathol* 1987; 127: 167-81.
- 22) Sell S, Dunsford HA. *Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. Am J Pathol* 1989; 134: 1347-63.
- 23) 박찬일, 김호근, 진소영, 양우익, 이유복. Ethanol이 3-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene에 의해 유발되는 백서 간암발생에 미치는 영향. 대한병리학회지 1991; 25: 21-9.
- 24) Miller EC, Miller JA, Kline BE, Rusch HP. *Correlation of the level of hepatic riboflavin with the appearance of liver tumors in rat fed aminoazo dyes. J Exp Med* 1948; 88: 89-98.
- 25) Conney AH. *Induction of microsomal enzymes by foreign chemical and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbon. Cancer Res* 1982; 42: 4875-917.
- 26) Evans GW, Myron DR, Cornatzer NF, Cornatzer

- WE. *Age dependent alteration in hepatic subcellular copper distribution and plasma ceruloplasmin. Am J Physiol* 1970; 218: 298-302.
- 27) Berg GJ, Hamer CJA. *Trace metal uptake in liver cells; influence of albumin in the medium on the uptake of copper by hepatoma cells. J Inorg Biochem* 1984; 22: 73-84.
- 28) Haratake J, Horie A, Takeda S. *Histochemical and ultrastructural study of copper-binding protein in hepatocellular carcinoma. Cancer* 1987; 60: 1267-74.
- 29) Guigui B, Mavrier P, Lescs MC, Pinaudeau Y, Dhumeaux D, Zafrani ES. *Copper and copper binding protein in liver tumors. Cancer* 1988; 61: 1155-8.
- 30) 감경숙, 박찬일, 조장환, 최인준, 이유복. 총수담관 결찰이 간의 형태 및 구리대사에 미치는 영향. *대한병리학회지* 1990; 24: 402-11.
-