

# Diethylnitrosamine으로 유발된 백서의 간세포 결절 및 간세포 암종의 DNA Ploidy 양상과 핵의 형태 계측학적 분석

원광대학교 의과대학 병리학교실, 일반외과학교실\* 및 치과대학 구강병리학교실\*\*

최 찬 · 김영관\* · 채권묵\* · 김은철\*\* · 문형배

## Analysis of DNA Ploidy Patterns and Nuclear Morphometry in Diethylnitrosamine Induced Hepatocyte Nodules and Hepatocellular Carcinoma of Rats

Chan Choi, M.D., Myung Kwan Kim, M.D.\*, Kwon Mook Chae, M.D.\*  
Eun Cheol Kim, M.D.\*\* and Hyung Bae Moon, M.D.

*Department of Pathology and General Surgery\*, Medical School  
Department of Oral Pathology\*\* Dental college, Wonkwang University*

This study was designed to answer the question; (1) How does the DNA ploidy pattern change in hepatocarcinogenesis? (2) How does the nuclear morphology change in hepatocarcinogenesis?

Diethylnitrosamine(DEN) (16.5 mg per kg) was subcutaneously injected to female Sprague-Dawley rats(150~200 g) by weekly interval for 30 weeks. DNA ploidy and parameters of nuclear morphology were measured by image analyser(IBAS 2000, Kontron, FRG). The DNA ploidy pattern was divided into three basic patterns(diploid, polyploid, and aneuploid modes).

In 8 cases of saline-injected control rats, the DNA histograms showed all polyploid pattern. In hepatocyte nodules(hyperplastic nodules), DNA diploidy was the most frequent pattern, being followed by polyploid and aneuploid DNA patterns, contrast to hepatocellular carcinomas in which polyploid DNA pattern was most frequently noted being followed by diploid and aneuploid DNA pattern.

Although the nuclei of hepatocytes in hepatocyte nodules and hepatocellular carcinomas were larger and more pleomorphic than those of normal hepatocytes, they were as same as those of normal hepatocytes in regard to nuclear hyperchromasia. DNA content, which was increased in hepatocarcinogenesis, was significantly related to the nuclear area. (**Korean J Pathol 1993; 27: 226~234**)

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma, Hepatocyte nodule, DNA ploidy, Morphometry, Image analysis

### 서 론

접 수: 1991년 12월 10일, 게재승인: 1993년 3월 27일  
주 소: 전북 이리시 신용동 344-2번지, 우편번호 570-749  
원광대학교 의과대학 병리학교실, 최 찬

\*이 논문은 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 지방대학 육성 학술 연구조성비에 의하여 연구되었음.

Diethylnitrosamine(DEN)을 오랫동안 설치류에 투여하면 화학적으로 변화된 부위(chemically altered foci), 미소 결절(microscopic nodule), 간세포 결절(hepatocyte nodule)의 과정을 거쳐 간세포

암종이 생기게 된다<sup>1)</sup>. 간세포 결절은 간세포가 국소적으로 증식하여 주변의 간조직을 압박하므로 주변부와는 구별되고, 결절의 크기는 직경 0.5~1 mm 이상이다. 간세포 결절의 대부분(95~98%)은 분화하여 다시 정상 간조직으로 되돌아 가지만<sup>2)</sup>, 일부(2~3%)는 그대로 남아 저절로 증식되어(autonomous proliferation) 암종으로 진행하게 된다. 이 때는 간세포 결절이 만들어진 기간이 길어짐에 따라 성장 분획(growth fraction)과 세포 소실도(cell loss)가 점차 증가하는 불안정한 시기이다<sup>3-6)</sup>.

발암 물질을 투여하여 암이 발생하려면 세포 분열이 일어나야 하므로, 유전적 또는 세포 동력학적 변화와 더불어 핵의 형태와 DNA 함량의 분포(DNA ploidy)도 변하게 된다. 이제까지 간세포 암이나 전암성 병변의 DNA ploidy는 연구자에 따라 서로 다르게 보고되었다. 최등<sup>7)</sup>은 백서에서 정상 및 화학적으로 변화된 부위(chemically altered foci)의 간조직은 DNA diploidy 및 DNA tetraploidy 양상을 보이지만, 간세포 결절과 간세포암에서는 diploidy와 tetraploidy뿐만 아니라 DNA aneuploidy 양상도 나타난다고 하였으며, 그외 다른 연구자들<sup>8-12)</sup>도 실험적으로 유발시킨 간의 종양에서 polyploid 또는 aneuploid 세포 핵이 관찰된다고 하였다. 또 사람의 간세포 암에서는 DNA aneuploidy가 39%에서 60%까지 관찰된다고 보고되었다<sup>13-16)</sup>. 그러나 Danielson 등<sup>17)</sup>, Digernes 등<sup>18)</sup> 및 Saeter 등<sup>19)</sup>은 정상 간조직에서는 DAN tetraploidy의 양상이지만, 쥐에서 실험적으로 일으킨 간세포 결절 및 간세포 암에서는 DNA diploidy 또는 DNA tetraploidy 양상이라 하였다.

이제까지 종양의 DNA ploidy는 현미경 분광측정법(microspectrophotometry)이나 유식세포 분석법(flow cytometry)에 의하여 측정되었다. 최근의 전산학의 발달로 가능하게 된 화상 분석법을 이용하면 조작자와 컴퓨터 시스템과의 교호적 진행에 의하여 세포의 DNA ploidy를 측정할 뿐만 아니라 각 세포의 형태 계측학적 변량을 동시에 측정할 수 있다.

본 연구는 간세포 암의 발암 과정에서 DNA ploidy와 세포핵의 형태학적 특성의 변화를 연관지어 알아보기 위하여 시도 되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물과 암 유발

생후 10~12주된 체중 150~200 g의 성숙한 암컷 Sprague-Dawley 백서에 단백질이 22.5% 이상 포함된 쥐 및 햄스터용 반합성 사료를 주었으며, 물과 사료는 마음대로 먹게 하였다. 실험군은 7마리였으며, 체중 1 kg당 16.5 mg의 DEN(Sigma 제)을 생리 식염수 1 ml에 녹여 매주 한 차례씩 30주 동안 피하 주사하였다. 대조군은 8마리였으며 DEN 대신 생리 식

염수 1 ml씩을 30주 동안 매주 한 차례씩 피하 주사하였으며, 실험을 시작한 30주 후에 모든 실험 동물을 도살하여 관찰하였다. 실험군에서는 모두 간에 결절이 생겼으며 대조군의 간 조직에는 변화가 없었다. 간 결절중 직경이 최소 2 mm 이상 되는 것만을 선택하여 7마리에서 모두 159개의 결절을 얻었다. 대조군에서는 한 마리에서 한 조각씩 조직을 취하여 모두 8개의 간 조직을 얻었다.

### 2. 조직 표본 제작

간 조직에서는 각각의 결절을 도려낸 다음 절반으로 나누어, 절단면의 면적을 재고, 10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매하여 hematoxylin-eosin 염색하여 관찰하였다.

### 3. 표본 제작 방법

Hedley 등<sup>20,21)</sup>과 Jacobsen 등<sup>22)</sup>의 방법을 변형시켜 파라핀 조직괴로부터 세포 부유액을 만들었다. 파라핀 조직괴에서 얻은 70  $\mu$ m 두께의 절편을 xylene으로 2회 처리하여 파라핀을 제거하였고 무수 및 단계적 저농도 알콜(96%, 64%, 32%, 16%)과 증류수를 거쳐 함수시킨 후 phosphate buffered saline(PBS) 완충액(pH 7.4, 0.1M)으로 세척하였다. 절편을 0.1% protease(Sigma 제) 용액에 60분간 37°C에서 부치시켰으며, 부치중 5분, 10분, 20분, 30분 및 60분에 파스퇴르 피펫으로 흡입과 분출을 반복하여 개개의 세포가 잘 떨어지도록 하였으며, 부치후 4°C의 PBS로 세척하였다. 세포 부유액을 45  $\mu$ m 구경의 나일론 망을 통해 여과 시켰고, 여과액 속의 세포 수가  $2 \times 10^4$ /ml가 되도록 조정하여 최종 세포 부유액을 만들었다. 세포 부유액 1 ml를 poly-L-lysine이 도포된 유리 슬라이드에 놓고 원심 분리시켜 도말 세포 표본을 만들었다. 표본을 실온에서 5N HCl에 75분간 작용시켜 핵산을 가수 분해시킨 다음, Schiff반응으로 Feulgen 염색을 시켰다<sup>23-25)</sup>.

### 4. 화상 분석에 의한 광계측학적 변량 측정

염색 표본의 현미경 화상을 화상 분석 장치(IBAS 2000, Kontron, FRG)의 TV 카메라와 analog-digital 변환기를 통하여 256개의 휘도(grey level)로 표현되는 grey image로 변환시켰다. 본 연구에서 하나의 화소 단위가 표현할 수 있는 화상 단위는  $0.40 \times 0.40 \mu$ m(분해능  $0.40 \mu$ m)였다. Grey image를 대조 강화시킨 후 분할(segmentation)에 의하여 세포핵안의 이치 화상(binary image)인 기준 화상(template image)을 구하였다. 기준 화상으로 부터 핵의 면적을 측정하였고, 기준 화상을 바탕으로 하여 원래의 grey image로부터 평균 배경 휘도(mean background grey value)와 세포 핵의 평균 휘도(mean

nuclear grey value) 등 광계측학적 변량을 측정하였다. 핵의 상대적인 DNA 함량은 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$\text{DNA 함량} = [\text{흡광도(Optical density)}] \times [\text{핵의 면적}]$$

$$\text{흡광도} = -\log_{10} \frac{(\text{평균 세포핵 휘도})}{(\text{평균 배경 휘도})}$$

각 예당 30개 정도의 염증성 임파구와 200개 이상의 간세포를 무작위로 선택하여 측정하였다. 간세포의 DNA 함량 분포는 DNA histogram 상 최빈 값이 계급 구간 11 또는 12에 위치하는 정규성 피크와 그보다 큰 계급 구간에 속하는 정규성 또는 비 정규성 피



Fig. 1. The liver is totally replaced by multiple nodules, which turns out to be either hepatocellular carcinomas or hepatocyte nodules, microscopically.

크를 보였다. 염증성 림프구의 DNA 피크와 간세포의 첫째 피크와의 비는 1:1.2미만이었으며, 간세포의 첫 번째 피크를 DNA 배수성은 2C 피크라고 정의하였으며, 2C 피크의 계급 구간 11 또는 12의 2배수에 위치하는 계급 구간을 4C라고 정의하였고, 4배수에 위치하는 계급 구간을 8C라고 정의하였다.

이상의 정의에 의하여 전체의 DNA histogram을 DNA 함량의 분포양상에 따라 다음과 같이 셋으로 나누었다. 제 1형(DNA diploidy); DNA 함량의 최빈 값이 2C에 분포하고, 전체의 20% 미만이 2C에서 4C의 범위에 분포하며 4C 이상의 세포는 거의 없는 경우(Fig. 5A). 제 2형(DNA polyploidy); DNA 함량의 최빈 값이 2C 또는 4C, 8C 영역에 있으면서 4C 영역의 세포가 전체 간세포의 15% 이상을 차지하는 경우(Fig. 5B). 제 3형(DNA aneuploidy); 서로 다른 큰 피크가 2개 이상 나타나는데, 하나는 최빈 값이 2C에 다른 하나는 2C의 2배수가 아닌 곳(qC)에서 나타나며, 이들 피크의 2배수 되는 곳인 4C 및 2×qC에도 핵이 분포하는 경우(Fig. 5C).

### 5) 통계적 유의성 검정

정상 대조군과 실험군에서의 측정값을 비모수 검정인 Kruskal-Wallis I 요인 분산 분석과 Mann-Whitney U검정으로 양군 사이의 차이를 유의 수준 0.05에서 검정하였다<sup>26)</sup>.

## 성 적

### 1. 육안 및 조직학적 소견

실험군에서 간은 황갈색이었으며, 간 표면은 크고

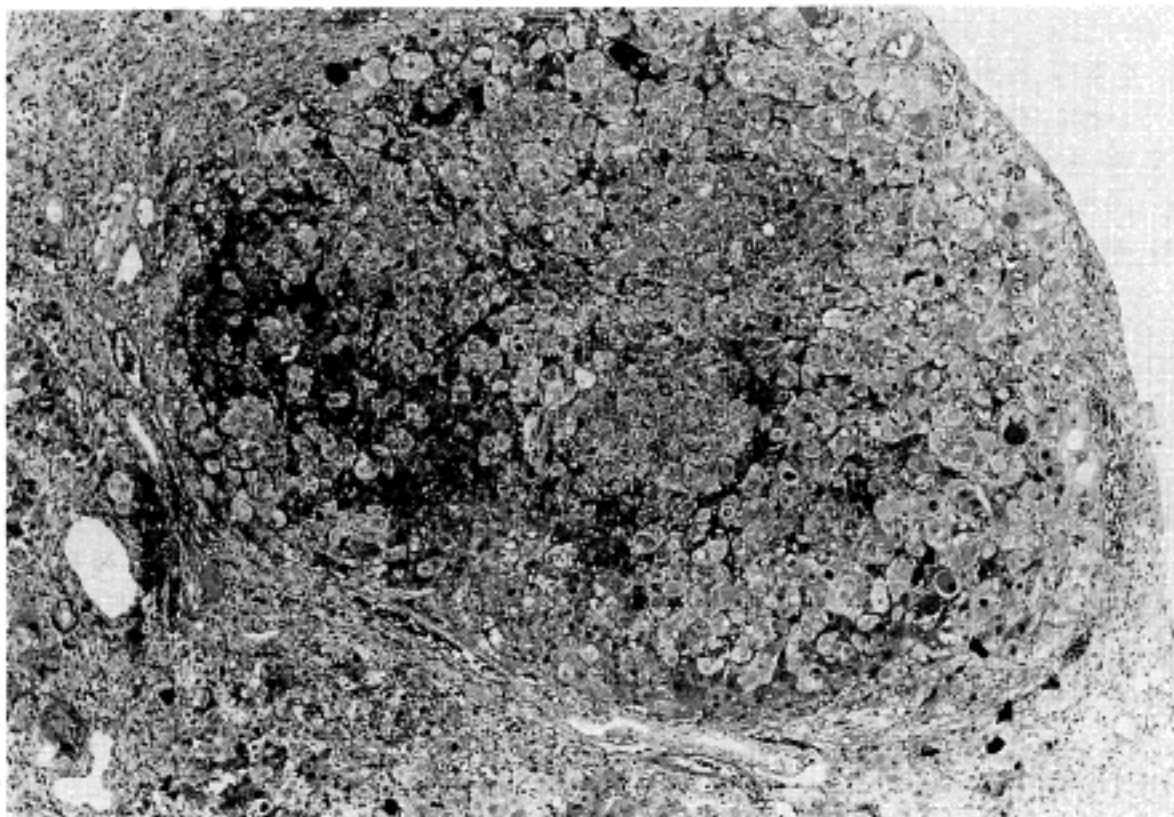
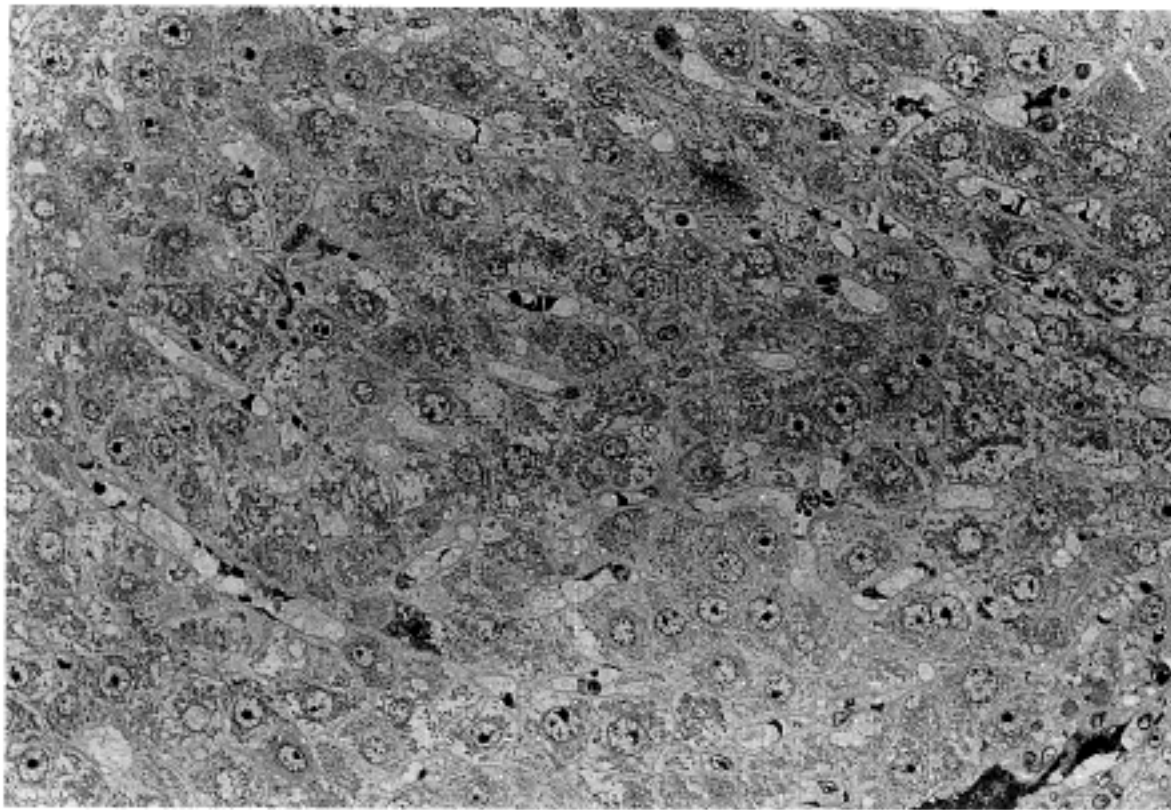


Fig. 2. The low power view of hepatocyte nodule which is surrounded by fibrous tissue, compressing the adjacent hepatocytes.

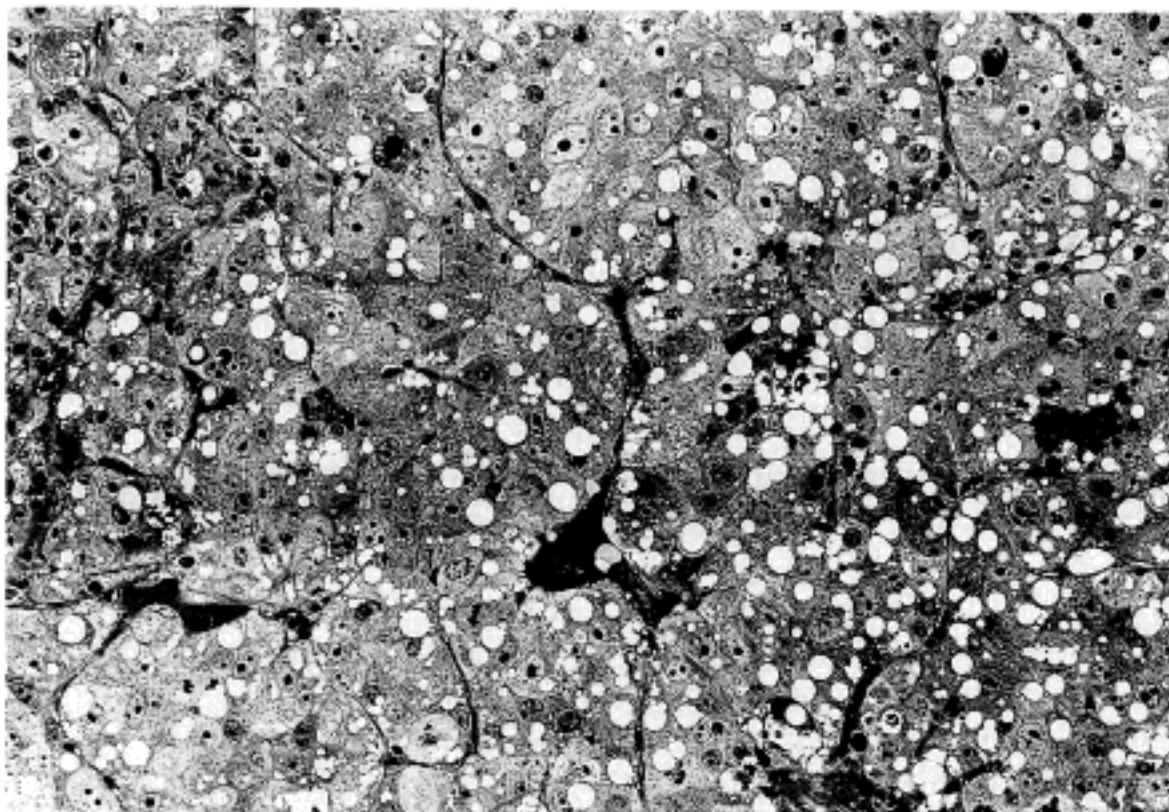


작은 결절로 덮여 있었다(Fig. 1). 정상 대조군 쥐의 간은 적갈색이었고, 표면은 평탄하였으며 결절성 병변은 없었다. 현미경 관찰에서도 간세포가 규칙적으로 배열되고, 핵의 크기는 균일하였다. 관찰된 결절의 조직학적 양상에 따라 간세포 결절과 간세포 암종으로 구별하였다. 간세포 결절의 단면적은 평균  $17.0 \text{ mm}^2$  (표준편차  $9.3 \text{ mm}^2$ )였으며, 최소값은  $4.2 \text{ mm}^2$ , 최대값은  $54.4 \text{ mm}^2$ 였다. 세포의 핵은 정상 간세포 보다 커졌으나, 크기는 균일하지 않았다(Fig. 2, 3). 다른 장

기에 전이하거나 침윤성 증식을 앓더라도 핵이 커지고 크기가 불규칙하며, 간세포가 두층 이상으로 되거나(Fig. 4), 괴사 된 곳이 나타나면 간세포 암종으로 분류하였다<sup>10)</sup>. 종괴의 단면적은 평균  $44.6 \text{ mm}^2$  (표준편차  $51.6 \text{ mm}^2$ )였으며, 최소값은  $8.3 \text{ mm}^2$  최대값은  $283.3 \text{ mm}^2$ 였다. 7마리의 실험군에서 얻은 결절 159개중 간세포 결절은 124개(78.0%)였으며 간세포 암종은 35개(22.0%)였다. 7마리중 6마리에서는 하나 이상의 결절에서 간세포 암종이 관찰 되었으나, 1마리에



**Fig. 3.** The central portion of hepatocyte nodule. Although the nuclei are slightly large and pleomorphic, the liver cell plates are one-cell thick.



**Fig. 4.** The hepatocellular carcinoma. The nuclei are pleomorphic and large. The hepatocytes are arranged in multiple cell thickness.

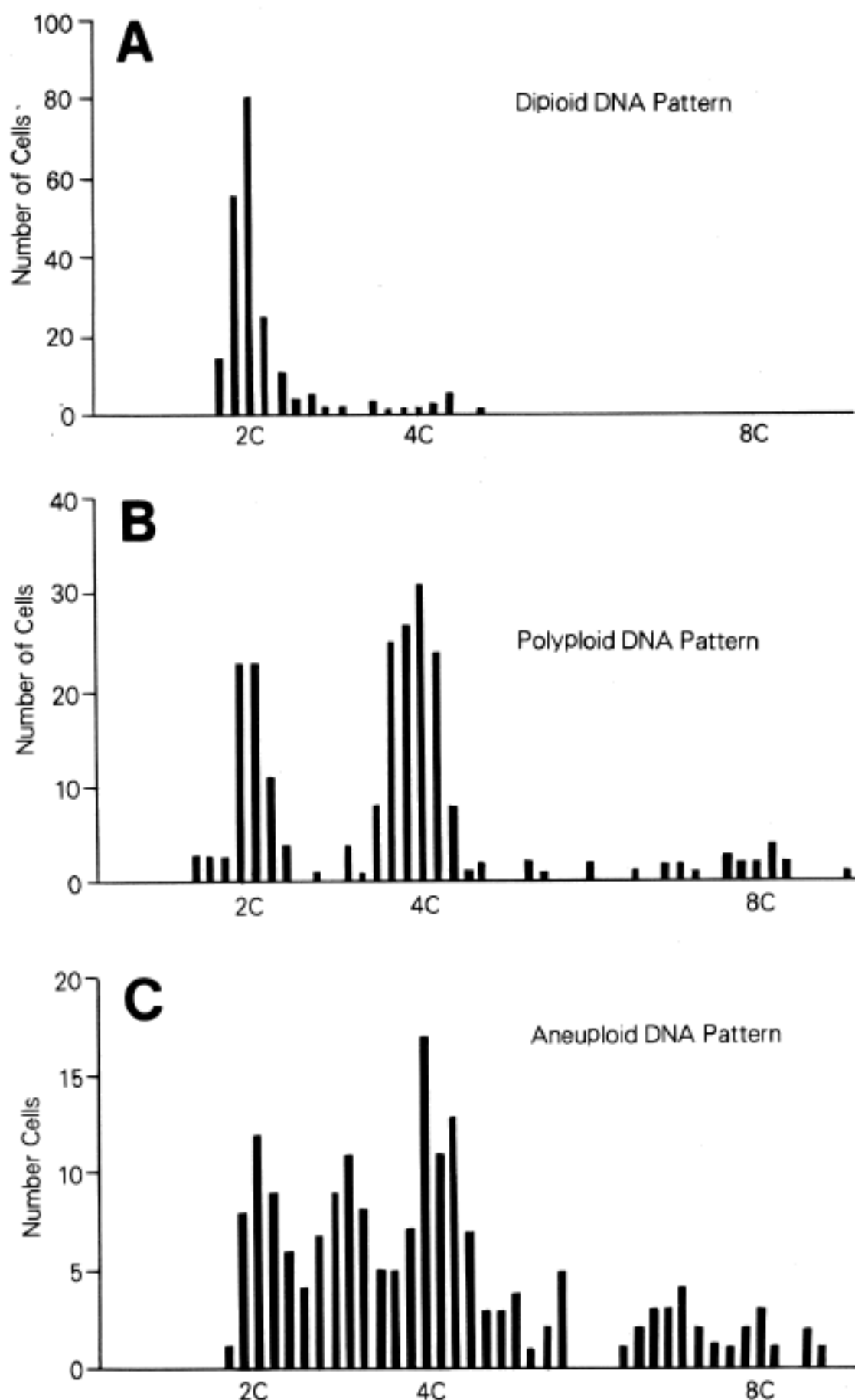


Fig. 5. Ploidy patterns of hepatic lesions A: DNA diploidy, B: DNA polyploidy, C: DNA aneuploidy.

서는 간세포 결절만 있었다(Table 1).

## 2. DNA ploidy양상

모든 예에서 내부 표준인 염증성 림프구는 DNA 함량의 최빈값이 제곱 구간 10 또는 11에 위치하는 정

규 분포였다.

정상 대조군은 8예 모두에서 polyploid가 관찰되었으며, 실험군에서는 diploidy 71예, polyploid 80예, 및 aneuploidy 8예가 관찰되었다(Table 2). 상기한 DNA ploidy 양상을 간세포 결절 및 간세포 암종으

**Table 1.** Number of hepatic lesions in each rats of experimental groups(EXP) and control ones (CON)

|         | Normal | H Nodule | HCC | Total |
|---------|--------|----------|-----|-------|
| I. EXP  |        |          |     |       |
| 1       | 0      | 38       | 0   | 38    |
| 2       | 0      | 18       | 3   | 21    |
| 3       | 0      | 20       | 3   | 23    |
| 4       | 0      | 27       | 9   | 36    |
| 5       | 0      | 7        | 2   | 9     |
| 6       | 0      | 11       | 2   | 12    |
| 7       |        | 3        | 17  | 20    |
| Total   | 0      | 124      | 35  | 161   |
| II. CON |        |          |     |       |
|         | 8      | 0        | 0   | 8     |

**Table 2.** DNA ploidy patterns of hepatic lesion in each rats of experimental groups(EXP) and control ones(CON)

|         | DNA ploidy pattern |           |            | Total |
|---------|--------------------|-----------|------------|-------|
|         | Diploidy           | Polyploid | Aneuploidy |       |
| I. EXP  |                    |           |            |       |
| 1       | 18                 | 19        | 1          | 38    |
| 2       | 12                 | 8         | 1          | 21    |
| 3       | 9                  | 13        | 1          | 23    |
| 4       | 16                 | 18        | 2          | 36    |
| 5       | 4                  | 5         | 0          | 9     |
| 6       | 6                  | 6         | 0          | 12    |
| 7       | 6                  | 11        | 3          | 20    |
| Total   | 71                 | 80        | 8          | 161   |
| II. CON |                    |           |            |       |
|         | 0                  | 8         | 0          | 8     |

로 구분하여 살펴보면 간세포 결절에서는 diploidy 51.6%, polyploid 45.2%, aneuploidy 3.2%가 관찰되었으며, 간세포 암종에서는 diploidy 20%, polyploid 68.6%, aneuploidy 11.4%의 분포양상을 보였다(Table 3).

### 3. 광계측학적 변량과 절단면의 면적

핵의 흡광도는 정상 간세포에서는  $0.11 \pm 0.03$ (평균  $\pm$  표준편차), 간세포 결절에서는  $0.09 \pm 0.02$ , 간세포 암종에서는  $0.10 \pm 0.02$ 였다. DNA 함량은 정상 간조직에서는  $43.5 \pm 18.2$ , 간세포 결절에서는  $73.5 \pm 20.5$ ,

**Table 3.** DNA ploidy patterns in normal liver, hepatocyte nodule(H Nodule) and hepatocellular carcinoma(HCC)

|          | DNA ploidy pattern |           |            | Total |
|----------|--------------------|-----------|------------|-------|
|          | Diploidy           | Polyploid | Aneuploidy |       |
| Normal   | 0                  | 8(100)    | 0          | 8     |
| H Nodule | 64(51.6)           | 56(45.2)  | 4(3.2)     | 124   |
| HCC      | 7(29.0)            | 24(68.6)  | 4(11.4)    | 35    |

( ): Percentage

**Table 4.** Parameters of nuclear morphology in normal liver, hepatocyte nodule(H Nodule) and hepatocellular carcinoma(HCC)

|                                  | Normal          | H Nodule          | HCC                  |
|----------------------------------|-----------------|-------------------|----------------------|
| Optical Density                  | $0.11 \pm 0.03$ | $0.09 \pm 0.02$   | $0.10 \pm 0.02$      |
| DNA Content                      | $43.5 \pm 18.2$ | $73.5 \pm 20.5$   | $77.1 \pm 29.3$      |
| CV of DNA(%)                     | 35              | 50                | 68                   |
| Nuclear Area ( $\mu\text{m}^2$ ) | $30.5 \pm 4.2$  | $56.8 \pm 15.1^*$ | $58.7 \pm 24.4^*$    |
| CV of Nuclear Area(%)            | 27              | 47                | 55                   |
| Area of Nodule ( $\text{mm}^2$ ) |                 | $17.0 \pm 9.3$    | $44.6 \pm 51.6^{**}$ |

\* : Statistically significant compared to normal( $p < 0.05$ )

\*\* : Statistically significant compared to H nodule( $p < 0.05$ )

간세포 암에서는  $77.1 \pm 29.3$ 으로, 간세포 암종으로 진행될 수록 높았으며 DNA 함량의 변이 계수는 정상 간세포에서는 35%, 간세포 결절에서는 50%, 간세포 암종에서는 68%였다. 핵의 면적은 Feulgen 염색을 할때 5N HCl에 75분 동안 작용시켰기 때문에, 실제 보다는 작게 측정되었다. 정상에서는  $30.5 \pm 4.2 \mu\text{m}^2$ , 간세포 결절에서는  $56.8 \pm 15.1 \mu\text{m}^2$ , 간세포 암에서는  $58.7 \pm 24.4 \mu\text{m}^2$ 로 간세포결절 및 간세포암에서 측정된 핵 면적은 정상 간세포의 핵면적보다 통계학적으로 유의있는 증가를 보였다( $p < 0.05$ ). 핵 면적의 변이 계수는 정상 간 조직에서 27%, 간 세포 결절에서 47% 그리고 간세포 암종에서 55%였다. 결절 개개의 단면적은 간세포 결절에서  $17.0 \pm 9.3 \text{mm}^2$ 였고, 간세포 암종에서  $44.6 \pm 5.16 \text{mm}^2$ 로서, 간세포 암종의 결절 크기가 간세포 결절에서의 크기보다 통계학적으로 유의있는 증가를 보였다( $p < 0.05$ )(Table 4).

위에서 기술한 핵의 면적, DNA 함량, DNA 함량

**Table 5.** Correlation coefficients between parameters of nuclear morphology

|                 |                        |       |
|-----------------|------------------------|-------|
| DNA content     | vs. Nuclear area       | 0.74  |
| CV of content   | vs. Nuclear area       | 0.47  |
| DNA content     |                        |       |
| Optical density | vs. Nuclear area       | -0.46 |
| Nuclear area    | vs. CV of Nuclear area | 0.32  |
| Optical density | vs. DNA content        | 0.21  |

의 변이계수, 핵의 흡광도 사이의 상관관계를 살펴본 바, 핵의 면적과 DNA 함량사이의 상관계수만 0.74%로서 서로 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었고, 다른 변량간에는 밀접한 연관이 없었다(Table 5).

## 고 찰

간세포 결절은 초기 단계에서 대부분이 분화하여 정상 간조직으로 되고 일부만이 남아 스스로 증식하는 (autonomous proliferation) 병변이다<sup>1,3~6</sup>). 본 연구에서는 DEN을 30주 동안 계속 투여해온 쥐에서 생긴 결절중 단면적이 최소 4 mm<sup>2</sup> 이상인 것을 취하였으며 이들의 대부분은 스스로 증식하는 세포로 이루어진 간세포 결절일 것이다.

간세포 핵의 DNA 양과 그의 형태학적 특징들을 화학 분석에 의하여 측정하고, 그 측정치를 분석함으로써 세포가 갖는 여러가지 특성을 계량적으로 비교할 수 있다. 현미경 분광측정법이나 유식세포 분석법으로도 세포핵의 DNA 양을 측정하여 DNA ploidy를 관찰할 수 있지만, 화학 분석법은 세포 핵의 DNA 양을 측정하여 측정치로 부터 DNA histogram을 만들어 DNA 함량 분포를 유형별로 구분 할 수 있을 뿐만 아니라, 세포핵의 특징들을 동시에 측정할 수 있는 장점이 있다. 화학 분석에 의한 DNA ploidy 조사가 이루어진 바 있으나<sup>24,27</sup>) 본 연구에서처럼 여러 특징을 동시에 관찰하는 것은 현재 시도되고 있는 단계이다<sup>25</sup>).

DNA ploidy의 유형별 분류는 stem line의 위치와 이곳의 세포 비율에 따른 것이다. 제 1형은 DNA diploidy이며 제 2형은 DNA polyploidy이고, 제 3형은 DNA aneuploidy이다. 제 1형 및 제 2형은 비정상 stem line이 없고 세포 분열이 활발하지 않은 조직에서 관찰될 것으로 기대되고, 제 3형은 비정상 stem line이 나타나고 세포 분열이 활발한 조직에서 관찰될 것으로 생각된다. DNA ploidy의 유형별 분류는 위 선암종<sup>28</sup>)과 유방암종<sup>29</sup>) 및 간세포암종<sup>13,30</sup>)에서 시도되고 있는 것으로서, 예후 및 조직학적 분화 정도가 달라지면 DNA의 유형도 바뀐다고 한다. 본 실험에서 정상 대조군의 간 조직에서는 모두 DNA poly-

ploidy 양상으로 출현하였다. 최등<sup>7</sup>)은 백서의 정상 간 조직에서 DNA diploidy가 66.6%, DNA tetraploidy가 33.3% 나타난다고 하였으며, Saeter등<sup>15,19</sup>), Deleener등<sup>31</sup>) 및 Danielson등<sup>17</sup>)은 polyploid DNA stem line이 주로 출현 한다고 하였다. 이렇게 정상 간세포에서 DNA ploidy가 서로 다른 이유는 측정 방법의 차이<sup>32,33</sup>) 및 DNA 염색 방법의 차이<sup>34</sup>)때문일 것이다.

간세포 결절 124예중 DNA polyploidy는 45.2%인 56예에서 관찰 되었으며, DNA diploidy는 51.6%에서 그리고 aneuploid stem line은 3.2%에서 관찰되었다. 간세포 암종에서는 DNA polyploidy양상이 68.6%, DNA diploidy 양상이 20.0%였고, DNA aneuploidy는 간세포 결절에서 보다 증가하여 11.4%에서 관찰되었다. 이러한 소견은 간세포 결절과 간세포 암종에서 DNA diploidy 및 DNA aneuploidy 양상이 모두 관찰된다는 보고<sup>7</sup>) 뿐만 아니라, 실험적으로 유발시킨 간세포 결절이나 간세포 암종에서 polyploid 또는 aneuploidy 핵을 관찰한 Inui등<sup>8</sup>), Koulis등<sup>9</sup>), Mori등<sup>10</sup>), Sarafoff등<sup>11</sup>), Simard등<sup>12</sup>)의 보고와도 부합되는 소견이다. 사람의 간세포 암에서는 DNA aneuploidy가 전체의 39%에서 62%까지 관찰되며<sup>13,14,16</sup>), DNA aneuploidy의 빈도는 분화도가 낮을수록 그리고 종괴가 커질수록 증가한다<sup>13</sup>). 그러나 본 실험에서 유발한 쥐의 간세포 암종에서 DNA aneuploidy의 빈도가 사람의 간세포암종의 경우 보다 낮은 이유는 연구 대상이 영장류(사람)와 설치류(쥐)라는 종의 차이 때문인지, 아니면 쥐에 생긴 종괴가 사람의 경우 보다 작은 때문인지는 확실하지 않다.

그러나 Saeter등<sup>15</sup>)과 Danielsen등<sup>17</sup>)은 간세포 암에서도 DNA aneuploidy는 나타나지 않고 DNA diploidy와 DNA polyploidy만 나타나며 이때 2C 영역의 세포 분획은 증가하는 반면 4C 영역의 세포 분획은 감소 한다고 하였다. 간세포 결절과 간세포 암에서 정상 간조직에서는 관찰되지 않았던 DNA diploidy가 관찰되는 것은, 간세포암종의 발암과정에서 기존의 polyploidy가 대부분인 증식형태에서 DNA diploidy가 대부분인 세포 증식양상으로 변환된다는 주장<sup>15,19</sup>)과 부합되는 소견이다. 그렇지만 DNA aneuploidy가 나타나는 점과 DNA diploidy 양상이 간세포 결절에서 보다 간세포 암에서 현저하게 감소되는 것은 Saeter등<sup>19</sup>)의 주장과 다르다.

핵을 형태 계측학적으로 관찰한 결과, 정상 간조직이 간세포 결절과 간세포 암으로 진행함에 따라, 핵이 커지고, 핵의 크기가 불규칙하게 되었으며, DNA 양이 증가하고, DNA의 양이 불규칙하게 되지만, 핵의 염색성은 정상 간 조직보다 오히려 감소하게 되었다. 따라서 일반적으로 암 세포 핵의 특징으로 알려져 있는 큰핵(large nucleus), 다양한 핵(pleomorphic nucleus), 진하게 염색되는 핵(hyperchromatic nu-



cleus) 중 진하게 염색되는 핵은 간세포 암종과 간세포 결절에서는 적용되지 않았으며 DNA의 함량이 증가 되었을 뿐이다.

### 결 론

저자는 DNA ploidy 양상이 간세포 암종이 생겨나는 동안 어떻게 나타나는지, 그리고 핵의 크기와 염색도 및 종괴의 크기는 어떻게 변하는지를 알아보기 위하여 이 실험을 시도 하였다.

간세포 결절과 간세포 암종은 암컷 Sprague-Dawley종 백서(체중 150~200 g)에 체중 1 kg 당 DEN 16.5 mg을 생리 식염수 1 ml에 녹여 주 1회씩 30주 동안 피하 주사하여 유발시켰다. 간 병변의 paraffin 조직괴로 부터 얻은 단일 세포 도말 표본을 Feulgen 염색한 다음 화상 분석에 의해 핵은 면적, 흡광도, DNA 함량을 측정하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1) DNA ploidy를 제 1형(DNA diploidy), 제 2형(DNA ploidy) 및 제 3형(DNA aneuploidy)으로 구별하였다. 정상 간조직에서는 모두 DNA diploidy인 제 2형 이었으며, 간세포결절에서는 제 1형(51.6%), 제 2형(45.2%), 제 3형(3.2%)의 빈도로 나타났고, 간세포암종에서는 제 2형(68.6%), 제 1형(20.0%)과 제 3형(11.4%)의 빈도로 출현하였다.

2) 흡광도는 정상 간조직, 간세포암종, 간세포결절의 순서로 높았으며, DNA 함량과 DNA 함량의 변이 계수는 간세포암종, 간세포결절, 정상 간조직의 순서로 많았다. 핵 면적과 핵 변이의 변이 계수 역시 간세포암종, 간세포결절, 정상 간조직의 순으로 높은 값이었고, 결절의 면적은 간세포 암종에서 간세포 결절 보다 넓었다.

결론적으로 정상 간조직은 DNA polyploidy 양상이었으나 간세포결절과 간세포암종에서는 DNA diploidy 및 DNA polyploidy와 DNA aneuploidy등 다양한 양상을 보였고, 간세포암종에서는 간세포결절에 비하여 DNA aneuploidy의 빈도가 증가하였다. 정상 간조직이 간세포결절 및 간세포암종으로 진행함에 따라 결절의 크기가 커졌으며, 핵이 커져서 DNA 함량이 많아지고 핵의 크기가 불규칙해졌으나 핵의 염색도는 정상 간세포에서와 비슷하였다.

### 참 고 문 헌

- 1) Farber E, Sarma DSR. *Hepatocarcinogenesis: A dynamic cellular perspective. Lab Invest* 1987; 56: 1-22.
- 2) Tatematsu M, Nagamine Y, Farber E. *Redifferentiation as basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. Cancer Res* 1983; 43: 504-58.

- 3) Enomoto K, Farber E. *Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. Cancer Res* 42: 2330, 1982; 42: 2330-5.
- 4) Ogawa K, Medline A, Farber E. *Sequential analysis of hepatic carcinogenesis; the comparative architecture of preneoplastic, malignant, prenatal, postnatal and regenerating liver. Br J Cancer* 1979; 40: 782-90.
- 5) Rotstein J, Macdonald PDM, Rabes HM, Farber E. *Cell cycle kinetics of rat hepatocytes in early putative preneoplastic lesions in hepatocarcinogenesis. Cancer Res* 1984; 44: 2913-7.
- 6) 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* 1986; 46: 2377-85.
- 7) 최 찬, 조성희, 문형배, 윤기중, 정현택, 정상우. *Diethylnitrosamine* 및 부분 간 절제술로 유발된 백서 간장의 증식성 병변에서의 DNA 측정과 합성기 세포의 분획. *대한병리학회지* 1991; 25: 346-56.
- 8) Inui N, Takayama S, Kuwabara N. *DNA measurement of cell nucleus of normal liver, adenoma and hepatoma in mice: histologic features. J Natl Cancer Inst* 1971; 47: 47-58.
- 9) Koulisch S, Lessler MA. *Cytological aspects of normal and tumorous liver. Cancer Res* 1962; 22: 1188-96.
- 10) Mori H, Tanaka T, Sugie S, Takahoshi M, Williams GM. *DNA content of liver cell nuclei of N-2-fluorenylacetamide-induced altered foci and neoplasms in rats and human hyperplastic foci. J Natl Cancer Inst* 1992; 69: 1277-82.
- 11) Sarafoff M, Rabes HM, Dormer P. *Correlations between ploidy and initiation probability determined by DNA cytophotometry in individual altered hepatic foci. Carcinogenesis*. 1986; 7: 1191-6.
- 12) Simard A, Cousineau G, Daoust R. *Variations in cell cycle during azo dye hepatocarcinogenesis. J Natl Cancer Inst* 1968; 41: 1257-63.
- 13) Ezaki T, Kanematsu T, Okamura T, Sonoda T, Sugimachi K. *DNA analysis of hepatocellular carcinoma and clinicopathologic implications. Cancer* 1988; 61: 106-9.
- 14) Omagari K, Imanishi T, Morikawa S, et al. *Prognostic implications of the ploidy pattern of the nuclear DNA in hepatocellular carcinomas(English Abstract). Gan No Rinsho* 1990; 36: 121-8.
- 15) Saeter G, Lee CZ, Schwarze PE, et al. *Changes in ploidy distributions in human liver carcinomas. J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 1480-5.
- 16) Yumori Y, Ochi J, Miura K, et al. *Flow cytometric*



- analysis of nuclear DNA content in human hepatocellular carcinoma(English Abstract). Aippon Shokakibyō Gakkai Zasshi 1990; 87: 83-91.*
- 17) Danielsen HE, Steen HB, Lindmo T, Reith A. *Ploidy distribution in experimental liver carcinogenesis in mice. Carcinogenesis 1988; 9: 59-63.*
  - 18) Digernes V, Elgjo K. *Dimethylnitrosamine-induced proliferative and neoplastic lesions in the mouse liver characterized by histopathology and flow cytometric DNA measurements. Acta path microbiol immunol Scand Sect A 1984; 92: 45-53.*
  - 19) Saeter G, Schwarze PE, Nesland JM, Juul N, Pettersen EO, Seglen PO. *The polyploidizing growth pattern of normal rat liver replaced by divisional, diploid growth in hepatocellular nodules and carcinomas. Carcinogenesis 1988; 9: 939-45.*
  - 20) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW. *Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem 1983; 31: 1333-5.*
  - 21) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. *Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. Cytometry 1985; 6: 327-33.*
  - 22) Jacobsen AB, Thourd E, Fossa SD, et al. *DNA flow cytometry in metastases and a recurrency of malignant melanomas. A comparison of results from fresh and paraffin embedded material. Virchows Archiv B Cell Pathol 1988; 54: 273-7.*
  - 23) Gaub J, Auer G, Zetterberg A. *Quantitative cytochemical aspects of a combined Feulgen napathol S staining procedure for the simultaneous determination of nuclear and cytoplasmic protein and DNA in mammalian cells. Exp Cell Res 1975; 92: 323-32.*
  - 24) Kaern J, Danielsen He, Farrants G, et al. *Comparison between determination of nuclear size and DNA content by single cell cytometry(SA) and DNA content by flow cytometry(FCM). Proceedings of first conference of the European society for Analytical Cellular Pathology. Schloss Elmau, FRG, 1989; 41.*
  - 25) 김수성, 이재혁, 정상우, 유주용. 기관지 암 세포의 DNA 배수성에 관한 화상 분석학적 연구. 대한병리학회지 1991; 25: 238-44.
  - 26) Norusis MJ. *Statistical package for social sciences. SPSS Inc, Chicago, 1988; B176-B195.*
  - 27) Auffermann W, Regges R, Bo'cking A. *Rapid diagnostic DNA cytometry with an automatic microscope and a TV image-analysis system. Anal Quant Cytol 1984; 6: 179-88.*
  - 28) Hattori T, Hosokawa Y, Fukuda M, et al. *Analysis of DNA ploidy patterns of gastric carcinomas of Japanese. Cancer 1984; 54: 1591-7.*
  - 29) Fallenius AG, Askensten UG, Skoog Auer GU. *The reliability of microspectrophotometric and flow cytometric nuclear DNA measurements in adenocarcinomas of the breast. Cytometry 1987; 8: 260-6.*
  - 30) Jung-Rou T. *Biological activity of hepatocellular carcinoma by analysing nuclear DNA ploidy patterns and using anti Brdu monoclonal antibody (English abstract). Nippon Geak Gakkai Zasshi 1989; 90: 168-73.*
  - 31) Deleener A, Castelain Ph, Preat V, de Gerlache J, Alexandre H, Kirsch-Volders M. *Changes in nucleolar transcriptional activity and nuclear DNA content during the first steps of rat hepatocarcinogenesis. Carcinogenesis 1987; 8: 195-201.*
  - 32) 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 1988; 62: 755-759.*
  - 33) Askensten U, Fallenius A, Auer G. *Static and flow cytometric DNA measurements in breast cancer. In: Burger G, Pleom JS, Goerttler K, eds. Clinical cytometry and histometry. Academic Press, 1987; 435-7.*
  - 34) Hiddemann W, Schumann J, Andreeff M, et al. *Convention on nomenclature for DNA cytometry. Cytometry 1984; 5: 445-446.*