

## 단기간 철 과다투여가 실험적으로 유발된 간세포 증식성 병변에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 병리학교실

박영년 · 정우희 · 정순희 · 박찬일

### Short-term Effect of Iron on the Hyperplastic Lesions of Chemical Hepatocarcinogenesis

Young Nyun Park, M.D., Woo Hee Jung, M.D. Soon Hee Jung, M.D. and Chanil Park, M.D.

Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine

This study was undertaken to elucidate the short-term effect of iron on the hyperplastic lesions of experimental hepatocarcinogenesis. The Solt-Farber's resistant hepatocyte model was chosen for the experiment, and Sprague-Dawley rats were divided into six groups: normal control, iron-rich diet administration with or without hydroxyquinoline, carcinogen administration, carcinogen plus iron-rich diet administration with or without hydroxyquinoline. The iron content, microscopic changes, bromodeoxyuridine(BrdU) labelling index and the DNA ploidy were studied. In the carcinogen administered group, oval cell proliferation and consecutive hyperplastic lesions of hepatocyte developed regardless of iron administration. The hepatic iron content was increased remarkably by iron administration, but gradually decreased as the hyperplastic lesions developed in carcinogen administered groups. Although the administration of iron without carcinogen induced hepatic accumulation of stainable iron, the hyperplastic lesions appeared to be lack of it. BrdU labelling indices of the oval cells and the hyperplastic lesions of hepatocyte were very high and were not significantly altered by iron administration. Most liver cells had diploid or tetraploid DNA content, but there was an increase of diploidy as the development of hyperplastic lesions regardless of iron administration. The results indicate that the chemical carcinogen-induced hyperplastic lesions of hepatocyte do not accumulate iron, and that short-term iron administration does not affect the development of hyperplastic lesions and their proliferative activity and DNA ploidy. (**Korean J Pathol 1994; 28: 569~583**)

**Key Words:** Hepatic carcinogenesis, Hyperplastic lesions, Iron, DNA ploidy, Bromodeoxyuridine

### 서론

실험동물에 화학 발암제를 투여하면 간암종이 발생

접 수: 1994년 3월 22일, 게재승인: 1994 6월 17일  
주 소: 서울시 서대문구 신촌동 134, 우편번호 120-752  
연세대학교 의과대학 병리학교실, 박찬일

\*본 논문은 1992년도 연세대학교 의과대학 정책과제 지원 연구비로 이루어졌음.

하기 이전의 형태학적 변화로서 난원형세포(oval cell)의 증식, 간세포 증식병소(hyperplastic foci) 및 간세포 증식결절(hyperplastic nodule), 그리고 담관상피 증식성 병변인 섬유성 담관증식(cholangiofibrosis)등이 발생한다.

실험적으로 간암종을 유발하기 위한 수 많은 종류의 화학 발암물질들이 소개되어 왔는데, 그 중 방향성 amine인 N-acetyl-2-aminofluorene(AAF) 및 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene(3'-Me-DAB) 과 diethylnitrosamine(DEN)이 잘 알려진 개시단

계(initiation) 유발물질이다<sup>1)</sup>. 또한 촉진단계(promotion)를 유발하는 것으로는 phenobarbital, CCl<sub>4</sub>, 부분간절제술 등이 알려져 있다<sup>2)</sup>. 저항성 간세포 모형(resistant hepatocyte model)인 Solt-Farber방법은 DEN투여 후 부분간절제술을 시행하고, 동시에 AAF를 투여하여 정상 간세포의 성장을 억제하고 DEN에 의해 변형된 간세포의 성장을 촉진시키는 방법으로서 특히 간세포 증식병변을 빠른 기간 내에 일으킬 수 있는 실험모델이다<sup>3)</sup>.

인체내 철의 대부분은 단백질과 결합하여 독성이 없는 형태로 존재하며, 혈중 운반시에는 transferrin상태로, 그리고 조직내 저장시에는 ferritin상태로 존재한다. 간은 철 저장의 주된 장기이며, 저장 기전에는 여러가지가 있으나 간세포의 철 운반체에 의해 transferrin의 철 부분만 내부로 이동되는 기전이 가장 중요하다. 간은 인체 저장철의 1/3 정도를 저장하며 transferrin과 ferritin을 합성하여 분비하므로 철의 과다축적시 손상받기 쉬운 장기이다. 간에 역시 이상의 철 축적이 일어나면 자유기형성과 지방과산화 유발되어 간세포 손상이 초래되며, 결과적으로 간조직의 섬유화, 간경변증 및 간세포암종이 발생할 수 있다<sup>4)</sup>. 또한 철은 모든 세포의 성장에 필수적인 금속의 하나이기 때문에 실험적으로 철이 풍부한 식이로 사육한 흰쥐에서는 철이 부족한 식이로 사육한 흰쥐에서보다 종양의 성장이 더 왕성하다는 보고가 있다<sup>5)</sup>. 한편 대부분의 실험동물은 다량의 철 투여에 잘 적응하여 간세포내에 철 축적이 잘 일어나지 않는다<sup>6)</sup>. 이러한 경우 금속이온 킬레이트로 작용하는 8-hydroxyquinoline(HQ)을 철과 함께 투여함으로써 간과 비장 등에 급속히 철의 축적을 유발 할 수 있다<sup>7)</sup>.

포유류의 정상 간세포는 다배수성이며, 그 분포는 종 및 연령에 따라 다르다. 쥐에서는 생후 3주까지 간세포의 대다수가 2배수성이나 연령이 증가함에 따라 다배수성 세포들이 증가하여 성숙한 쥐에서는 4배수성 세포가 70~80%를 차지한다<sup>8)</sup>. 간암 발생과정 중의 전암단계 병변들도 정상과 다른 DNA 배수성을 나타낼 것으로 추정되나 이에 대한 지금까지의 보고들을 보면 연구자들간에 차이가 많다. 즉 간암 발생과정의 전암병변 및 간세포암종에서 2배수성 세포의 비율이 증가하며 2배수성 세포군이 증가할수록 세포증식능도 증가한다는 보고<sup>9,10)</sup>가 있는 반면 간암 발생과정에서는 주로 다배수성이 발생한다는 보고도 있다<sup>11)</sup>. 또한 간의 전암병변 및 간세포암종에서는 이수배수성(aneuploidy)이 나타나지 않는다는 보고<sup>8)</sup>와 암종의 분화가 나빠질수록 이수배수성이 증가된다는 상반된 보고가 있다<sup>12)</sup>. 한편 간세포 증식성 병변을 구성하는 간세포는 다양한 표현형의 변화를 보이는데 adenosine triphosphatase 및 glucose-6-phosphatase(G6Pase)는 감소하고, gamma-glutamyl transferase, NADH dehydrogenase, epoxide hydrolase, glu-

tathione S-transferase, DT-diaphorase 등의 효소들은 증가하며 당원의 축적이 관찰된다<sup>13,14)</sup>.

이와 같은 기존의 연구결과들을 토대로 본 연구에서는 Solt-Farber방법으로 흰쥐에 간세포 증식성 병변을 일으키고 증식성 병변들의 철 함량, 세포증식능, DNA 배수성 및 효소조직화학적 G6Pase변화를 철 병합투여군과 비교함으로써 철이 간암 발생과정에 미치는 영향을 알아보려고 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 실험군

실험동물로는 체중 약 100~150 gm의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였고, 1주간 동일조건에서 일반사료(철 65 mg/kg 함유)로 예비사육한 후 다음과 같이 대조군과 화학발암제 투여군으로 나누었다.

#### I군: 대조군

I-A군: 정상 대조군

I-B군: ferrous sulfate 단독투여군

I-C군: ferrous sulfate와 HQ 병합투여군

#### II군: 화학발암제 투여군

II-A군: 화학발암제 단독투여군

II-B군: 화학발암제와 ferrous sulfate 병합투여군

II-C군: 화학발암제와 ferrous sulfate 및 HQ 병합투여군

### 2. 실험 방법

1) 약물투여: 대조군인 I군에서는 다음과 같은 방법으로 약물을 투여하였다. 정상 대조군인 I-A군은 일반사료(철 65 mg/kg 사료)로 사육하였다. 대조군 중 I-B군은 2.5% ferrous sulfate(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 함유한 식이로 사육하였으며, I-C군은 2.5% ferrous sulfate와 HQ(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)을 함유한 식이로 사육하여, 16주, 18주 및 23주 후 5마리씩 도살하였다.

화학발암제 투여군인 II군은 다음과 같이 Solt-Farber방법으로 처치하였다. 즉, DEN(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)을 동물 체중 kg당 200 mg씩 생리식염수에 녹여 복강내로 투여하고 DEN투여 2주 후부터 AAF(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)가 0.02% 혼합된 사료로 2주간 사육하였다. AAF투여 시작후 7일째에 부분 간절제술을 시행하여 이를 제 0일로 하고 3일, 1주, 2주, 3주, 4주 및 8주에 각각 5마리씩 도살하였다. 부분 간절제술은 ether 마취하에 시행하였으며, 중앙엽과 좌엽을 절제하였다. 화학발암제 단독투여군인 II-A군은 일반사료로 사육하였다. II-B군은 Solt-Farber방법을 시작

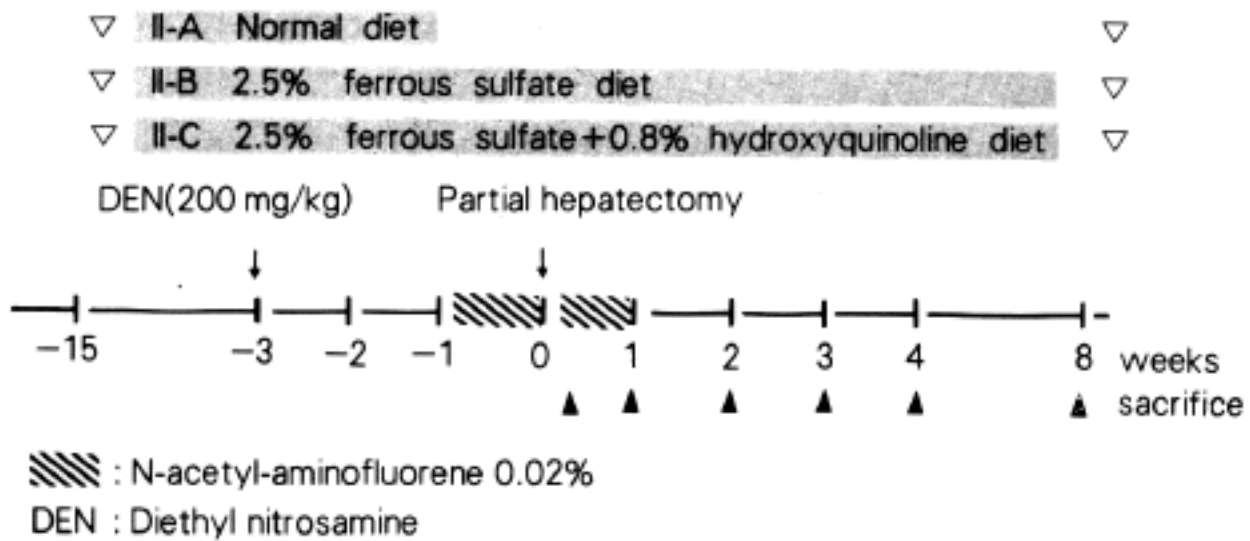


Fig. 1. Schedule for drug administration in carcinogen administered groups.

하기 12주 전부터 도살시까지 2.5% ferrous sulfate가 함유된 식이로 사육하였으며, II-C군은 2.5% ferrous sulfate에 0.8% HQ이 첨가된 식이로 사육하였다(Fig. 1).

**2) 실험동물의 관찰 및 도살:** 실험기간 중 동물이 사망한 경우 곧 추가 실험을 하였으며, DNA 합성기세포를 표지하기 위하여 실험동물을 도살하기 2시간 전에 동물 체표면적  $m^2$ 당 200 mg의 bromodeoxyuridine(BrdU)(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA)을 5% 포도당 용액 250cc에 녹여 꼬리동맥에 주입하였다. 간을 적출하여 육안적인 변화를 관찰하였다.

**3) 간조직내 철 함량 측정:** 신선한 간조직 1g을 도가니에 넣고 가열기에서 도가니 안의 시료를 건조시킨 후 도가니를 회화로에 옮겨 400°C에서 회화시켰다. 회화된 시료를 실온에서 식힌후 C-HNO<sub>3</sub> 2ml을 넣어 다시 가열기에서 완전히 건조시키고 400°C에서 회화시켰다. 시료가 백색으로 완전히 회화되면 실온에서 식힌 후 5% HCl 15 ml를 첨가하여 여과(Filter paper No. 42)하고 25 ml volumetric flask에 넣은 후 다시 5% HCl을 첨가하여 25 ml로 부피를 맞추었다. 원자흡수 분광광도계(Shimadzu AA-650, Tokyo, Japan)로 철 표준용액(5, 10, 20ppm)의 원자흡광도를 측정하여 검량선을 작성하고 이 검량선에 의거하여 시료 용액의 철 농도를 측정하였다.

**4) 간의 일반적인 조직학적 검색:** 간 조직의 일부를 10% 중성 formalin용액에 고정하고 파라핀에 포매하여 5~6  $\mu m$  두께의 연속 절편을 만든 다음 전반적인 조직학적 변화를 보기위한 hematoxylin-eosin(H-E)염색과 철 축적을 보기위한 Perl's Prussian-blue 염색을 시행하였다. 당원의 축적을 보기 위한 periodic acid-Schiff(PAS)염색은 액체질소를 이용하여 영하 180°C에서 초저온 동결시킨 후 4  $\mu m$ 의 두께로 박절한 동결절편을 이용하였다.

### 5) Glucose-6-phosphatase에 관한 효소조직 화학적 검색:

절제한 간조직의 일부를 즉시 액체질소를 이용하여 영하 180°C에서 초저온 동결시킨 후 15~20  $\mu m$ 의 두께로 박절하여 슬라이드에 부착한 다음 곧 modified Wachstein Meisel medium [0.25M Tris-Maleic acid buffer(PH 7.2), 5.0mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 5.0mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.8mM glucose-6-phosphate 혼합액]에 넣고 36°C에서 20분간 반응시켰다. 10% 중성 formalin에 잠시 고정한 다음 수세하고, 0.5~1.0% ammonium sulfide 수용액으로 처리 후 수세 탈수하여 balsam으로 봉입하였다.

**6) BrdU표지세포 검색:** 파라핀에 포매된 조직절편을 이용하여 면역조직화학염색의 통상적인 전처치를 한 후 avidin-biotin complex(ABC) kit(Vector laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)를 사용하여 염색하였다. 항 BrdU마우스 항체(Dako, Santa Barbara, CA, USA)를 일차항체로 하였고 aminoethylcarbazole로 발색하였으며 hematoxylin으로 대조염색하였다. 미세계측자를 부착한 광학현미경하에서 각 병변을 구성하는 세포 500개를 세어 그 중 핵이 항 BrdU항체에 염색된 세포의 백분율을 구하여 BrdU표지지수로 하였다.

**7) 유세포측정(flow cytometry):** 신선한 조직 일부를 10 ml의 RPMI배지가 들어있는 페트리접시 위에 놓고 개개의 세포가 유리되도록 No. 20 칼로 계속 긁어서 세포부유액을 만들었다. Pepsin 및 RNAase (2.5 mg/ml)(Worthington Biochemical, Freehold, NJ, USA)와 차례로 반응시키고 세포 1~3  $\times 10^6$ 개/ml를 propidium iodide(1:200 희석액)와 반응시킨 다음 laser based FACScan(Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 세포 20,000개 이상의 DNA량을 측정하여 DNA histogram을 구하였다. 첫번째 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> peak가 여럿인 경우 각 peak가 위치한 통로 수치를 2배수성 peak의

통로 수치로 나누어 DNA지수들 구하였다. 전체 세포 수의 10% 이상이 2배수성의 2배 되는 수치의 통로에 peak가 있고 이에 대응하는 SGM 부위가 존재하는 것을 4배수성으로 간주하였으며, 2배수성 세포의 수에 대한 4배수성 세포 수의 비율을 구하였다.

8) 통계적 유의성 검정: Mann-Whitney검정, 분산분석 및 X<sup>2</sup> 검정(SPSS 프로그램)을 이용하여 실험군 측정치의 통계적인 의의를 검정하였다.

## 결 과

### 1. 육안소견

대조군 중 철을 투여한 I-B군과 I-C군의 간은 적갈색으로 정상 대조군에 비해 다소 어두운 색을 보였으나 표면이 평활하고 절단면상 과립이나 섬유화는 없었다.

화학발암제를 투여한 군에서는 공통적으로 부분 간절제 후 3일경부터 간표면이 미세한 과립상을 보이기 시작하여, 부분 간절제 후 시간이 경과함에 따라 과립이 커지고 현저해졌으나, 부분 간절제 후 4주까지는 육안으로 식별할 수 있는 크기의 결절은 관찰되지 않았다. 부분 간절제 후 8주에는 1~2 mm크기의 백황색 결절들이 II-A군과 II-B군의 각 1에서 발견되었다(Fig. 2).

### 2. 간조직내 철 함량의 변동

정상 대조군의 간조직내 철 함량은 간조직 g당 평균 73.3  $\mu$ g이었으며, 각군의 철 함량은 Table 1 및 2와 같다. 대조군 중 철을 투여한 경우 정상 대조군보다 조직내 철 함량이 높았으며, 특히 철만 투여한 I-B군보다 HQ를 함께 투여한 I-C군에서 유의있게 높았다 ( $P < 0.05$ ). 화학발암제를 단독투여한 II-A군에서는 부분 간절제 후 3일 및 1주에 정상 대조군에 비해 철 함량이 높았으나( $P < 0.05$ ), 2주 이후에는 정상 대조군과 비슷하였다. II-B군의 철 함량은 대조군인 I-B군과 비슷하거나 다소 낮았으며, II-C군에서는 전 실험기간 동안 I-C군에 비해 낮았다( $p < 0.05$ ). II-A군과 II-B

군에서는 대체적으로 간세포 증식성 병변의 발생이 증가할수록 간조직내 철 함량이 감소되는 경향을 보였다.

### 3. 병리조직학적 소견

대조군 중 철을 투여한 I-B군과 I-C군에서는 철로 생각되는 갈색의 과립성 색소가 간세포, Kupffer세포 및 문맥역에 침착한 것을 관찰할 수 있었다. 갈색 색

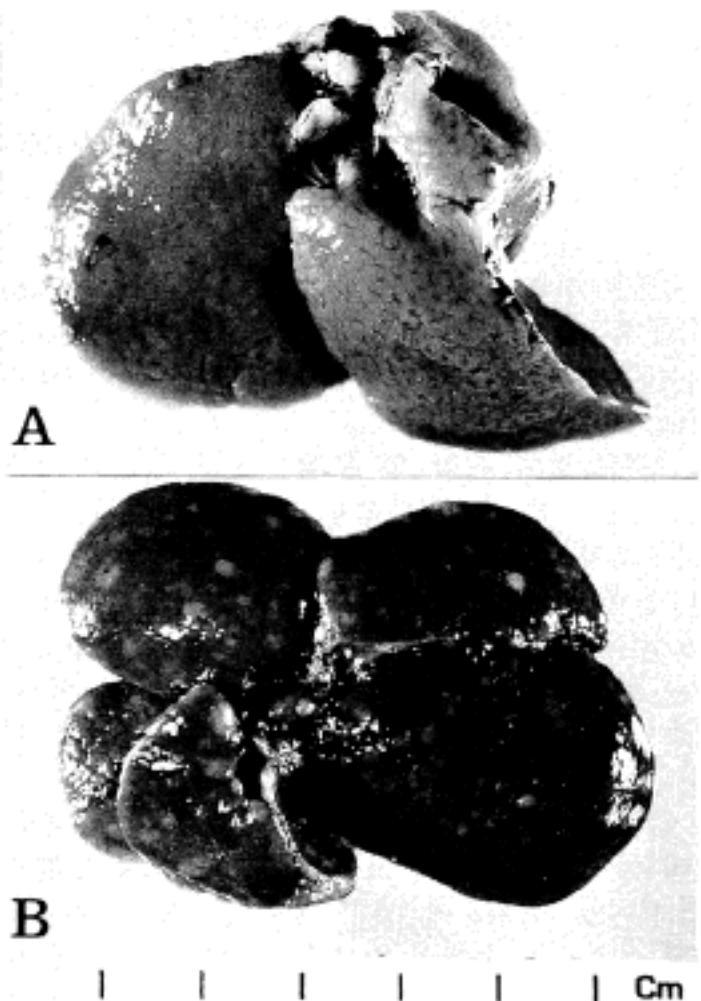


Fig. 2. Surface features of the liver in carcinogen administered groups. A: Granular surface of the liver(4-week after partial hepatectomy). B: Numerous small yellow-white nodules(8-week after partial hepatectomy).

Table 1. Hepatic iron content( $\mu$ g/g wet liver weight) of the control groups

Group	Weeks of iron administration			
	0	16	18	23
I-A	73.3 $\pm$ 8.40(7)			
I-B		251.3 $\pm$ 9.93*(5)	228.8 $\pm$ 16.64*(5)	217.0 $\pm$ 59.92*(6)
I-C		546.4 $\pm$ 30.47(4)	571.6 $\pm$ 26.32(4)	439.4 $\pm$ 27.55(4)

( ): Number of animals

Values are mean  $\pm$  standard deviation.

\*Significant difference when compared with the respective values of I-C( $P < 0.05$ , Mann-Whitney test)

소의 침착은 I-B군보다 철분과 HQ을 병합 투여한 I-C군에서 많았고 철 투여기간이 길수록 더 현저하였다. 철분 침착이 많은 간세포는 간혹 경한 종창소견을 보였으나 간세포의 배열 및 담관은 정상이었고 섬유화도 없었다.

화학발암제 투여군에서는 난원형세포의 증식과 간세포 증식성 병변이 발생하였으며, 부분 간절제 후 시간

경과에 따른 증식성 병변의 발생과정은 철 병합투여에 관계없이 공통적이었다. 부분 간절제 3일 후부터 문맥역에 난원형세포가 증식하기 시작하여, 1주 및 2주에는 문맥역 주위에 판상으로 배열하거나 간소엽내로 증식하였으며(Fig. 3A), 문맥역 주변에서는 난원형세포들이 모여 내강을 형성하는 것도 관찰하였다. 부분 간절제 후 3주에는 간엽 전체에서 난원형세포의 국소적인

**Table 2.** Hepatic iron content ( $\mu\text{g/g}$  wet liver weight) in the carcinogen administered groups

Group	Time after partial hepatectomy					
	3 days	1 wk	2 wks	3 wks	4wks	8wks
II-A	162.8 $\pm$ 24.62 <sup>1)</sup> (6)	104.6 $\pm$ 6.37 <sup>1)</sup> (5)	68.3 $\pm$ 7.19(5)	71.5 $\pm$ 3.91(7)	75.9 $\pm$ 5.40(9)	68.8 $\pm$ 8.08(8)
II-B <sup>2)</sup>	244.5 $\pm$ 70.04(5)	292.5 $\pm$ 35.77(5)	171.6 $\pm$ 35.92(5)	81.1 $\pm$ 5.87(5)	76.1 $\pm$ 2.60(5)	110.2 $\pm$ 12.29(5)
II-C <sup>3)</sup>	373.9 $\pm$ 111.47(7)	178.0 $\pm$ 18.39(4)	185.3 $\pm$ 24.66(5)	243.0 $\pm$ 33.95(5)	341.4 $\pm$ 45.99(5)	247.9 $\pm$ 32.20(7)

( ): Number of animals

Values are mean  $\pm$  standard deviation.

1) Significantly different from I-A

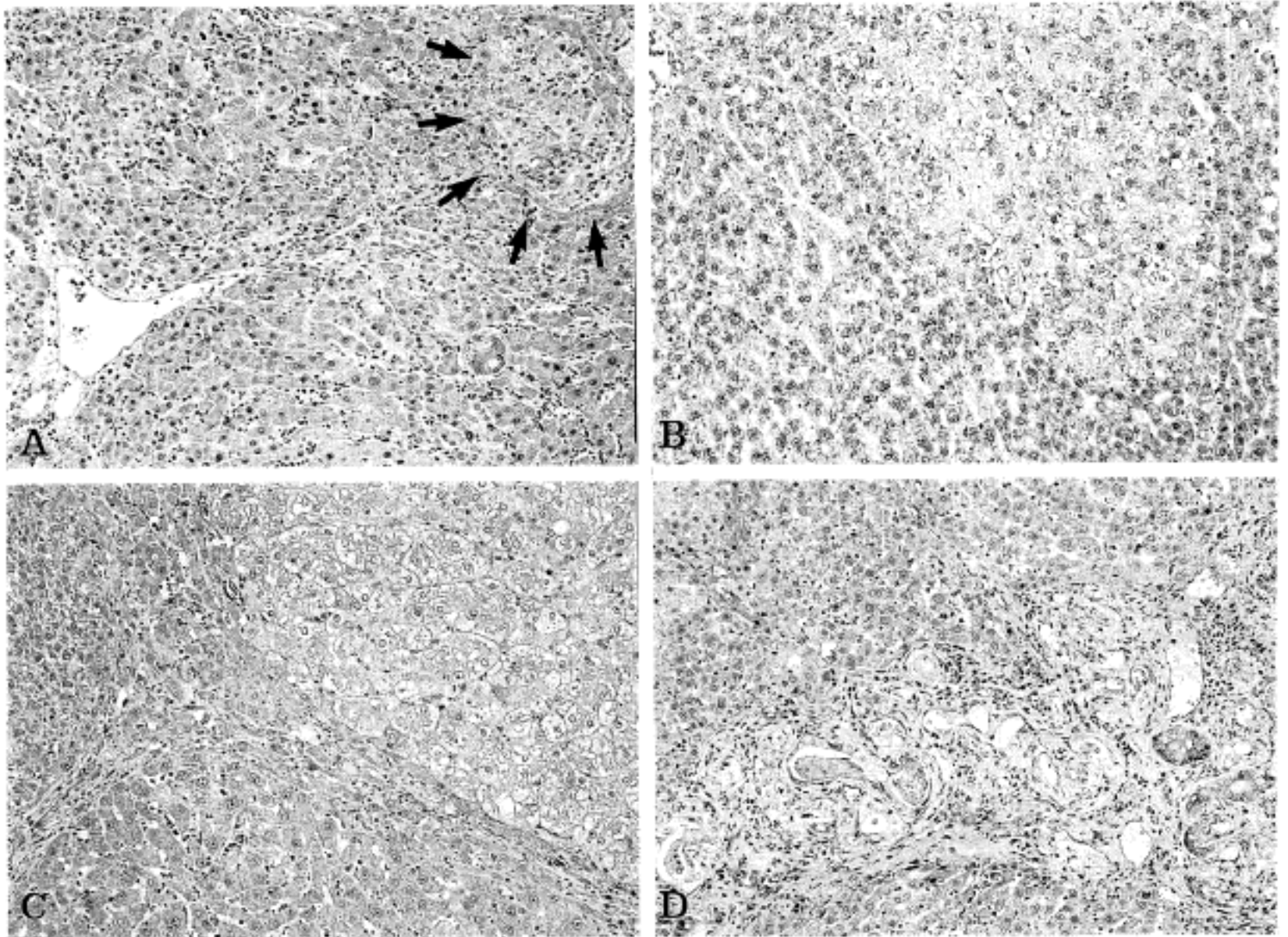
2) Values of 3 to 8 weeks after partial hepatectomy are significantly lower than the respective values of I-B (16 to 23 weeks)( $p < 0.05$ , Mann-Whitney test).

3) Significantly different from the respective values of I-C( $p < 0.05$ , Mann-Whitney test)

**Table 3.** Degree of oval cell proliferation and hyperplastic lesions of hepatocyte in the carcinogen administered groups

Time after PH	Group	No. of animals	Oval cell prolif					HL of hepatocyte				
			1+	2+	3+	4+	5+	1+	2+	3+	4+	5+
3days	II-A	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	II-B	5	3	1	1	0	0	5	0	0	0	0
	II-C	7	7	0	0	0	0	6	1	0	0	0
1wk	II-A	5	2	0	3	0	0	3	1	1	0	0
	II-B	5	3	1	1	0	0	3	2	0	0	0
	II-C	4	2	2	0	0	0	3	1	0	0	0
2wks	II-A	5	0	2	1	2	0	0	2	3	0	0
	II-B	5	0	0	4	1	0	0	5	0	0	0
	II-C	5	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0
3wks	II-A	7	0	7	0	0	0	0	6	1	0	0
	II-B	5	0	3	0	2	0	0	5	0	0	0
	II-C	5	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0
4wks	II-A	9	0	8	0	1	0	0	6	3	0	0
	II-B	5	0	3	0	2	0	0	2	3	0	0
	II-C	5	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0
8wks	II-A	8	0	6	0	1	1	0	4	3	0	1
	II-B	5	0	3	0	1	1	0	3	1	0	1
	II-C	7	0	3	0	4	0	0	1	5	1	0

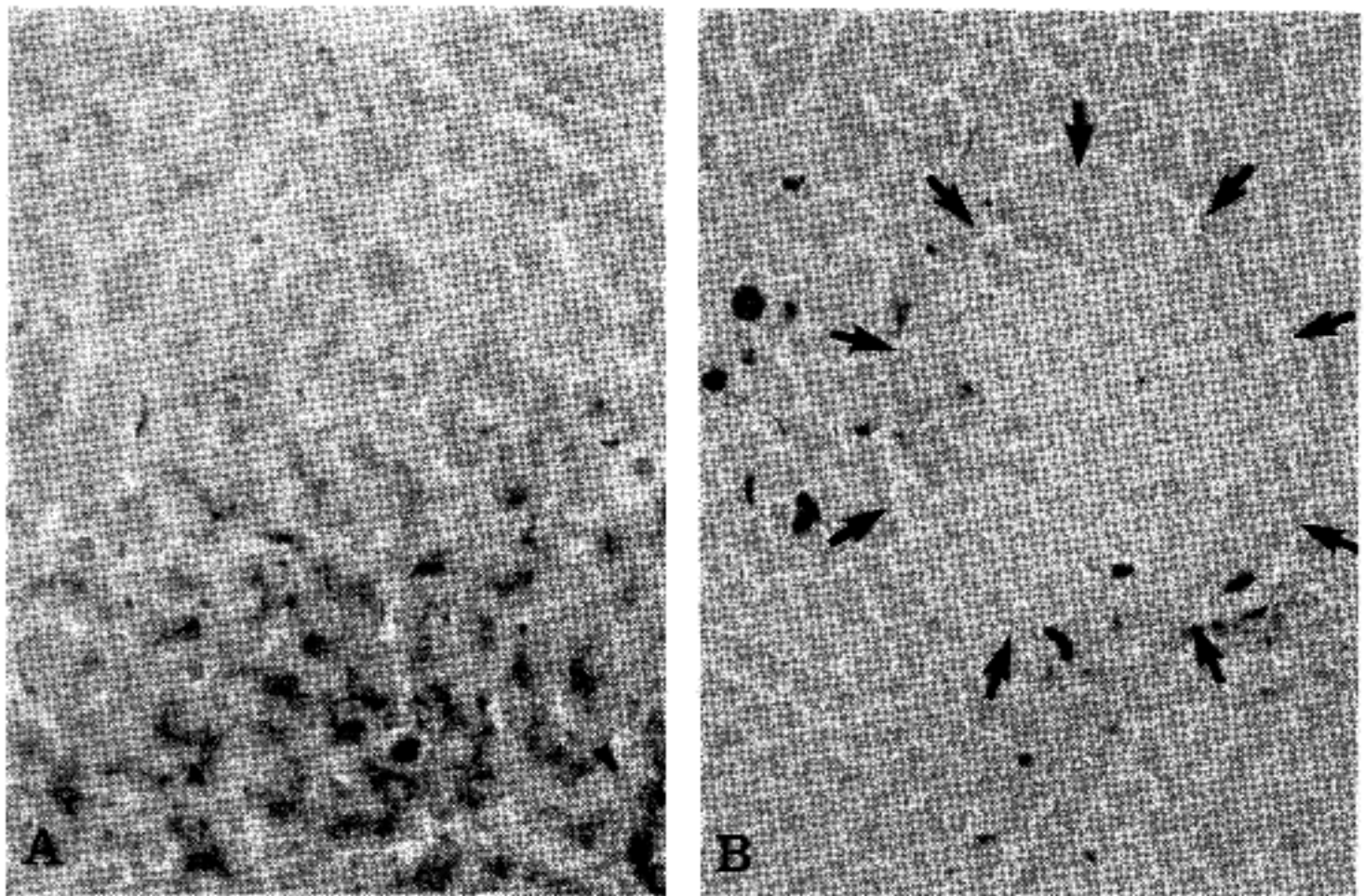
Prolif: proliferation, HL: hyperplastic lesion, PH: partial hepatectomy



**Fig. 3.** Proliferative lesions developed in carcinogen administered groups. A: Oval cell proliferation with insinuation into the hepatic lobule and a basophilic hyperplastic focus(arrow) showing close relation to the oval cells(1-week after partial hepatectomy). B: An eosinophilic hyperplastic focus with abundant clear and eosinophilic cytoplasm(4-week after partial hepatectomy). C: Hyperplastic nodule surrounded by proliferating oval cells and fibrosis(8-week after partial hepatectomy). D: Cholangiofibrosis found in the group with administration of carcinogen and ferrous sulfate with or without 8-hydroxyquinoline(8-week after partial hepatectomy).

증식이 관찰되었으며 4주부터는 증식된 난원형세포 주위로 얇은 섬유화가 발생하여, 간세포 증식성병변 주위를 둘러싸기 시작하였고, 8주에는 간세포 증식성 병변의 주위를 완전히 둘러싸고 있었다. 난원형세포의 증식정도를 다음과 같은 기준으로 나누어 각 군간의 차이를 살펴보았다. 난원형세포가 문맥역주위에 국소적으로 증식하는 경우는 1+, 소엽내에서 국소적인 증식하는 경우를 2+, 문맥역주위에 판상배열을 하는 경우는 3+, 간세포 증식결절을 둘러싸는 것이 일부에서 관찰되는 경우 및 여러 곳에서 관찰되는 경우를 각각 4+와 5+로 하였다. 난원형세포의 증식정도는 철 합투여 여부에 관계없이 II-A군, II-B군 및 II-C군에서 비슷하였다(Table 3).

간세포 증식성 병변으로는 호염기성 세포 증식병소-호산성 세포 증식병소-증식결절이 차례로 발생하였다. 부분 간절제 후 3일에는 호염기성 간세포로 이루어진 작은 세포증식 병소가 무수히 발생하였으며, 1주와 2주에는 호염기성 세포 증식병소가 더 커지고 그 경계가 뚜렷해지면서 난원형세포들로 둘러싸여 있었다(Fig. 3A). 호염기성 세포 증식병소의 발생초기에는 세포들이 난원형세포와 간세포의 중간형태를 보였으나 병소의 크기가 증가함에 따라 정상 간세포의 형태학적 특성을 획득하였다. 부분 간절제 후 3주와 4주에는 매우 풍부한 호산성 또는 투명한 세포질을 갖는 세포들로 구성된 호산성 세포 증식병소가 발생하였다(Fig. 3B). 시간이 경과함에 따라 이러한 병소의 수가 점차



**Fig. 4.** Distribution of iron accumulation in iron and hydroxyquinoline administered groups(Prussian blue stain).  
 A: In the control group, the iron accumulates predominantly in acinar zone 1. B: In the carcinogen administered groups, the hyperplastic lesion(arrow)contains no stainable iron in contrast to the surrounding liver.

감소되었으나, 일부 증식병소는 지속적으로 성장하여 부분 간절제 후 8주에는 직경 1 mm이상의 증식결절이 발생하였다. 증식결절들은 대개 얇은 섬유조직과 난원형세포로 둘러싸여 있었으며, 세포들은 대개 풍부한 호산성 세포질과 비교적 큰 핵을 갖고 있었다(Fig. 3C). 증식결절 내부에는 문맥역구조가 없으며 2~3층의 간세포들이 모여 불규칙한 배열을 이루고 있었다. 간세포 증식성 병변의 장경이 250  $\mu\text{m}$ ~500  $\mu\text{m}$  미만인 경우를 1+, 250  $\mu\text{m}$  미만 2+, 500  $\mu\text{m}$ ~1 mm 미만 3+, 1 mm~2 mm 미만 4+, 2 mm 이상인 경우를 5+로 나누어 각 군간의 정도차이를 비교한 결과 II-A군에서 부분 간절제 후 2주에 간세포 증식병소의 형성이 다소 많은 것 이외에는 II-A군, II-B군 및 II-C군 사이에 큰 차이가 없었다(Table 3).

철과 화학발암제를 병합투여한 II-B군과 II-C군에서는 부분 간절제 후 8주에 각각 7마리중 4마리(57%), 5마리 중 2마리(40%)에서 섬유성 담관증식이 발생하였으나 화학발암제 단독투여군에서는 전 실험기간 동안 이러한 변화가 없었다. 섬유성 담관증식은 세포의 중첩 배열 및 핵의 비정형성을 보였다(Fig. 3D).

#### 4. Prussian blue 염색소견

1) 대조군의 Prussian blue 염색소견: 정상 대조군에서는 Prussian blue 염색상 양성이었으나 철을 투여한 I-B군과 I-C군에서는 간세포, Kupffer세포 및 문맥역에서 과립상의 철 축적을 볼 수 있었다. 철을 투여한 I-B군 중 16주간 투여한 경우에는 문맥역, 간포 1대의 간세포 및 Kupffer세포에서 철 축적이 미약하게 관찰되었고 18주간 투여시에는 간세포의 철 축적이 뚜렷한 과립상으로 나타났으며 23주간 투여시에는 간포 1대 간세포의 철 축적이 더욱 증가되었을 뿐 아니라 2에에서는 Kupffer세포의 철 축적이 감소된 전체에서 관찰되었다. 철과 HQ을 병합 투여한 I-C군 중 16주간 투여한 경우에는 철이 주로 간포 1대의 간세포에서 많은 과립상으로 축적되었으며, 철 투여기간의 증가에 따라 간포 2대와 3대의 간세포에서도 관찰되었고 Kupffer세포의 철 침착 정도 및 분포도 증가되었다(Fig. 4A). Kupffer세포에 철 침착이 많을수록 간포 1대의 간세포내 철 침착은 적었다. 대조군의 철 축적 정도를 Sciot<sup>20)</sup>의 기준(Table 4)에 따라 비교한 결과는 Table 5와 같다. Ferrous sulfate와 HQ을 병합투여한 I-C군에서 ferrous sulfate만 투여

**Table 4.** Iron storage scoring system by Sciot et al<sup>15)</sup>

Hepatocytes		Kupffer cells(KCs)		Portal tracts/Septa	
0: no iron		0: no iron		0: no iron	
1: fine hemosiderin granules focal distribution		1: occasional fine hemosiderin granules in some KCs		1: trace of fine hemosiderin granules	
2: fine hemosiderin granules (at least) zonal distribution		2: fine hemosiderin granules in most of the KCs		2: scattered fine hemosiderin granules	
3: coarse hemosiderin granules zonal distribution		3: coarse hemosiderin granules in hypertrophic KCs		3: coarse clumping of hemosiderin granules	
4: diffuse coarse granules		4: coarse hemosiderin granules in all KCs		4: massive deposition of hemosiderin granules	
Score A	0~4		0~4		0~4
Coefficient	3		1		1
Score B <sup>1)</sup>	0~12		0~4		0~4
Total score	0	1~5	6~10	11~15	16~20
Final grade	0	I	II	III	IV

1) Score B is obtained by multiplying the elementary score A by a coefficient 3 for the hepatocytes and by a coefficient 1 for the Kupffer cells and portal tracts/septa. The total, scored on a scale of 0-20, is then divided into 5 grades(0-IV).

**Table 5.** Grading of iron storage in the control groups

Group	Weeks of iron adm.	No. of animals	Grade of iron storage*				
			0	I	II	III	IV
I-A	0	7	7	0	0	0	0
I-B	16	5	0	5	0	0	0
I-B	18	5	0	0	2	3	0
I-B	23	6	0	0	0	6	0
I-C	16	4	0	0	0	4	0
I-C	18	4	0	0	0	3	1
I-C	23	4	0	0	0	1	3

adm: administration

\* Statistical significance was determined when comparing I-B with I-C of the same duration of iron administration by the  $\chi^2$  test ( $p < 0.05$ ).

한 I-B군보다 철 축적이 더 많았으며 특히 16주 및 23주 투여한 군에서 유의있는 차이를 보였다( $p < 0.05$ ).

**2) 화학발암제 투여군의 Prussian blue 염색소견:** 화학발암제를 단독투여한 II-A군에서는 철 축적이 관찰되지 않았다.

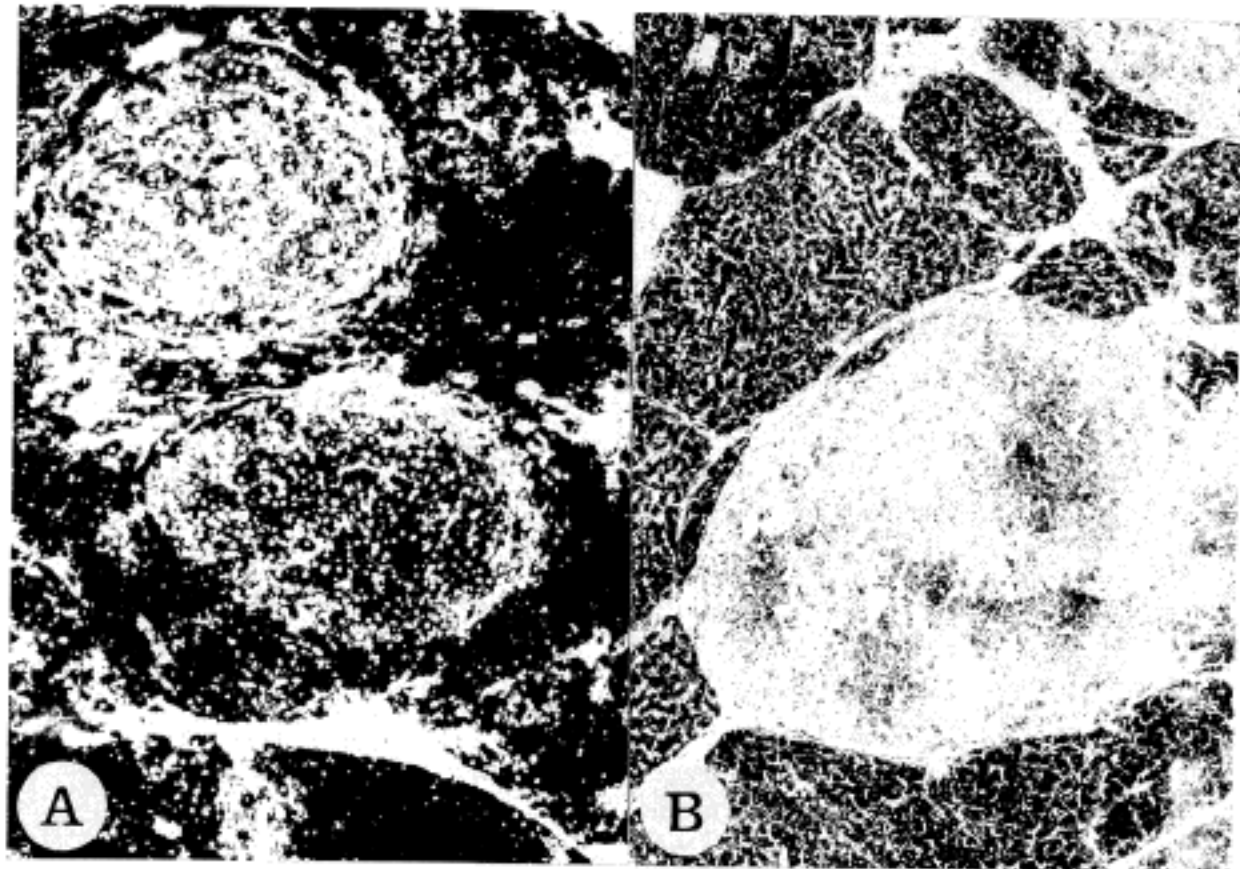
철과 화학발암제를 병합투여한 II-B군과 II-C군의 경우 Prussian blue염색상 간세포 증식성 병변 주위의 정상 간세포와 Kupffer세포에 철이 축적되고 병변내에는 철 축적이 없었다(Fig. 4B). II-C군에서는

병변주위의 정상 간세포에 철 축적이 더욱 많아서 병변이 뚜렷하게 구별되었다. 철을 계속하여 투여하여도 간세포 증식성 병변은 Prussian blue염색에 음성반응을 보였으며, 부분 간절제 후 8주에는 증식결절, 그리고 증식성 병변 중 난원형세포와 섬유성 담관증식병소도 Prussian blue염색에 음성반응을 보였다.

### 5. Glucose-6-phosphatase 활성의 변화

대조군의 경우 G6Pase활성은 간소엽 전역에 걸쳐 검은색의 미세과립상으로 나타났으나 간포 1대(aci-





**Fig. 5.** Distribution of the G6Pase activity in carcinogen administered groups (Enzyme histochemical stain for G6Pase). A: The basophilic hyperplastic foci showing much less G6Pase activity in contrast to the strong activity of the surrounding liver. B: A hyperplastic nodule showing persistent lack of G6Pase activity, whereas most of the nodules restoring the enzyme activity.

**Table 6.** BrdU labelling indices of hepatocyte in the control groups

Group	Duration of iron administration(weeks)			
	0	16	18	23
I-A	0.3±0.08 (7)			
I-B		0.2±0.05 (5)	0.3±0.08 (5)	0.5±0.20 (6)
I-C		0.4±0.14 (4)	1.5±0.91* (4)	1.7±0.46* (4)

Values are mean ± standard deviation.

( ): Number of animals

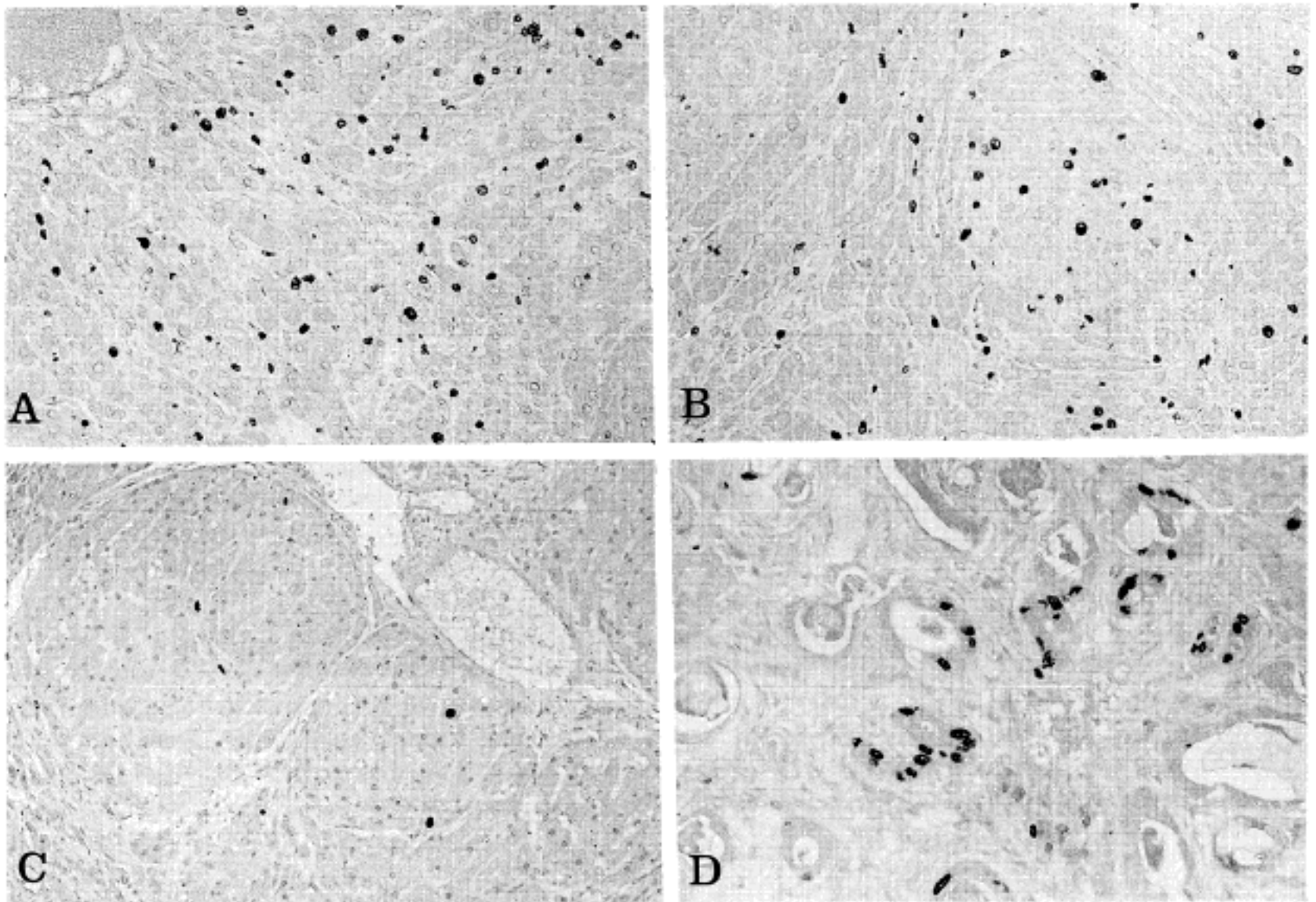
\* Significant difference when compared with I-A and the respective values of I-B ( $P < 0.05$ , Mann-Whitney test)

nar zone 1)에서 더 강하였으며, 화학발암제 투여군의 간세포 증식성 병변에서는 G6Pase활성이 소실되었다. 부분 간절제 후 초기에는 호염기성 간세포 증식병소가 많이 발생하여 G6Pase활성이 소실된 부위가 많았으나 점차 다시 회복되어 일부 호산성 세포 증식병소를 형성한 부위만 효소염색에 음성반응을 보였다. 증식결절들에서도 G6Pase활성은 계속 회복되어 소수의 결절들만 지속적인 음성반응을 보였다(Fig. 5). G6Pase활성이 소실된 병변은 PAS염색에서 작은 과립상으로 진하게 염색되었으며, 그 주변의 간세포는 음성 반응을 보이거나 미약하게 염색되었다.

## 6. BrdU표지지수

BrdU 표지세포는 면역조직화학적 염색상 핵이 갈색의 과립상을 보였다. 정상 대조군인 I-A군 간세포의 BrdU 표지지수는 평균 0.3이었으며, 철만 투여한 I-B군의 BrdU표지지수는 I-A군과 비슷하였다. 철분과 HQ을 병합 투여한 I-C군에서는 투여기간에 따라 BrdU표지지수가 증가하여 18주와 23주 투여시 I-A군 및 I-B군에 비해 유의있게 높았다( $p < 0.05$ )(Table 6).

화학발암제 투여군에서 발생한 증식병변의 BrdU표



**Fig. 6.** BrdU labelling cells of the proliferative lesions developed in carcinogen administered groups (Immunohistochemical stain, ABC method). A: Most of the labelled cells are oval cells. B: Labelled cells are more numerous in the basophilic hyperplastic focus than the surrounding liver. C: Only a few labelled cells are seen in the hyperplastic nodules. D: Cholangiofibrosis shows a very high labelling index.

**Table 7.** BrdU labelling indices of oval cell in the carcinogen administered groups

Group	Time after partial hepatectomy					
	3 days	1 wk	2 wks	3 wks	4 wks	8 wks
II-A	7.0±1.25(6)	11.5±2.69(5)	8.7±2.55(5)	2.9±0.48(7)	4.4±2.00(9)	4.0±1.78(8)
II-B	15.7±3.52*(5)	10.2±1.89*(5)	6.2±2.03(5)	6.2±1.56(5)	5.0±1.32(5)	4.8±1.27(5)
II-C	7.4±5.13(7)	5.1±0.81(4)	5.4±2.09(5)	3.3±0.41(5)	3.3±0.57(5)	4.8±1.85(7)

Values are mean ± standard deviation.

( ): Number of animals

\* Significant difference when compared with the respective values of II-A and II-C (P<0.05, anova)

지지수는 주위의 간세포에 비하여 높았으며 각 병변의 BrdU표지지수는 다음과 같다.

난원형세포의 BrdU표지지수는 난원형세포 증식이 왕성한 부분 간절제 후 3일과 1주에 높았으며 그 후

점차 감소하였다. II-A, II-B 및 II-C군간에는 큰 차이가 없었으나 부분 간절제 후 3일과 1주의 BrdU표지지수가 II-C군에서 더욱 높았다(p<0.05)(Table 7). 증식성 병변을 구성하는 간세포의 BrdU표지지수는

**Table 8.** BrdU labelling indices of the hepatocyte of hyperplastic lesions in the carcinogen administered groups

Group	Time after partial hepatectomy					
	3 days	1 wk	2 wks	3 wks	4 wks	8 wks
II-a	4.9±0.90(6)	4.8±1.88(5)	5.5±0.71*(5)	2.5±0.44(7)	2.2±1.33(9)	1.2±0.53(8)
II-B	3.4±1.31(5)	4.5±1.64(5)	3.5±1.33(5)	4.9±1.13(5)	2.1±0.60(5)	1.9±0.51(5)
II-C	6.7±4.85(7)	5.7±1.07(4)	2.0±0.36(5)	1.8±0.22(5)	2.5±0.67(5)	2.2±1.09(7)

Values are mean ± standard deviation.

( ): Number of animals

\* Significant difference when compared with the respective values of II-B and II-C (p<0.05, anova)

**Table 9.** Ratio of DNA tetraploidy/diploidy in the carcinogen administered groups

Group	Time after partial hepatectomy					
	3 days	1 wk	2 wks	3 wks	4 wks	8 wks
II-A	0.2 0.5	0.2 0.3	0.0 0.3	0.4 0.6 <sup>1)</sup>	0.2 0.8 <sup>1)</sup>	0.2 0.2
(Mean ± SD)	0.35±0.212	0.25±0.070	0.15±0.212	0.50±0.141	0.50±0.424	0.20±0.000
II-B	0.1 0.6	0.1 0.6	0.6 0.6	0.2 0.5	0.2 0.4	0.0 0.4
(Mean ± SD)	0.35±0.353	0.35±0.353	0.60±0.000	0.35±0.212	0.30±0.141	0.20±0.282
II-C	0.2 0.5	0.4 0.8	0.2 0.4	0.2 0.4	0.1 0.3	0.2 0.1
(Mean ± SD)	0.35±0.212	0.60±0.283	0.30±0.141	0.30±0.141	0.20±0.141	0.15±0.071

1) aneuploidy is developed in one of each group.

정상 대조군의 간세포에 비해 높았으나 난원형세포의 BrdU표지지수보다는 낮았다(Fig. 6A)(Table 8). 간세포 증식성 병변의 BrdU표지지수는 난원형세포와 마찬가지로 부분 간절제 후 3일과 1주에 증가되었다가 점차 감소되었으며, 호염기성 세포 증식병소에서 가장 높았다. BrdU는 주로 호염기성 세포 증식병소를 구성하는 세포들 중에서 세포질의 양이 적고 난원형세포와 간세포의 중간형태를 보이는 세포들에서 표지되었다(Fig. 6B). 호산성 세포 증식병소 및 증식결절이 발생함에 따라 BrdU표지지수는 점차 감소하였으며(Fig. 6C), 부분 간절제 후 8주의 II-B군은 동일기간 철만 투여한 I-B군보다 높은 BrdU표지지수를 보였으나(p<0.05) II-C군의 BrdU표지지수는 동일기간 철과 HQ를 병합투여한 I-C군과 비슷하였다. 간세포 증식성 병변의 BrdU표지지수는 대체로 철 병합투여에 따른 유의있는 차이를 보이지 않았으나 부분 간절제 후 2주의 II-A군이 II-B군 및 I-C군에 비해 높은 BrdU표지지수를 보였다(p<0.05).

섭유성 담관 증식병변의 BrdU표지지수는 부분 간절제 후 8주의 II-B군과 II-C군에서 각각 12.06 ±

1.940과 13.87±1.119로 동일한 군에서 발생한 난원형세포 및 간세포 증식성 병변에 비하여 높았다(Fig. 6D)(p<0.05).

## 7. 유세포 측정기로 검색한 DNA 배수성의 변화

정상 대조군 4예와 화학발암제 투여군의 각 소군에서 증식성 병변이 왕성하게 일어난 개체를 2예씩 선택하여 유세포측정기로 분석하였다. DNA배수체의 유형은 모든 군에서 주로 2배수성과 4배수성을 갖는 다배수성의 양상을 보였으며, 각군의 4배수성/2배수성 세포의 비는 Table 9와 같다. 정상 대조군의 4배수성/2배수성의 비는 1.13±0.596이었으며, 화학발암제 투여군에서는 증식성 병변이 발생함에 따라 4배수성 세포군은 감소하고 2배수성 세포군이 증가하였으나, 철 병합투여에 따른 차이는 없었다. 같은 소군 내에서도 간세포 증식성 병변이 더 많이 발생한 개체에서 2배수성 세포군의 비율이 더 높았다.

화학발암제 단독투여군인 II-A군에서 호산성 세포 증식병소가 발생한 부분 간절제 후 3주와 4주에 이수

배수성이 1에씩 관찰되었으나 증식결절의 발생이 왕성한 부분 간절제 후 8주에는 이수배수성이 관찰되지 않았다. 이수배수성이 발생한 2예의 4배수성/2배수성의 비는 각각 0.6과 0.8이었고, 이 때에도 가장 많은 DNA 배수성은 2배수성이었다. 화학발암제와 철을 병합투여한 II-B군 및 II-C군에서는 이수배수성이 관찰되지 않았다.

### 고 찰

화학 발암제에 의한 실험적 간암 발생과정 중에 나타나는 변화로는 난원형세포의 증식, 간세포 증식성 병변 및 섬유성 담관증식이 있다. 난원형세포들은 서로 모여서 불완전한 내강을 가진 담소관과 비슷한 형태를 취하며, 화학발암제를 장기간 투여할 때 주로 섬유성 담관증식과 담관상피암종이 발생하는 것으로 미루어 난원형세포가 담관상피의 모세포일 가능성이 많다<sup>16-19</sup>). 그러나 간세포 증식성 병변의 세포학적 기원에 대하여는 아직 정설이 없다.

Solt-Farber법을 이용하면 난원형세포의 증식과 간세포 증식성 병변이 발생하는 반면 섬유성 담관증식이 거의 발생하지 않기 때문에<sup>3,20,21</sup>) 간세포 증식성 병변의 형태발생기전을 연구하기에 적합하다. 본 연구에서도 Solt-Farber법을 이용한 결과 H-E염색상 난원형세포의 증식과 연결하여 간세포 증식성 병변이 발생하였고, 초기 간세포 증식성 병변인 호염기성 증식병소를 구성하는 세포들이 난원형세포와 성숙 간세포의 중간형태를 보였다. 이러한 소견은 간세포 증식성 병변이 난원형세포에서 유래한다는 학설<sup>22-24</sup>)을 지지하는 하나의 간접적인 증거라고 생각하며, 따라서 난원형세포는 간세포와 담관상피세포로 분화하는 능력을 가진 원시 간모세포일 것으로 보인다<sup>25,26</sup>). 인체에서도 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC) 종괴의 주변 간조직, 특히 재생성 간세포결절의 가장자리에서 가끔 난원형세포를 닮은 세포들이 출현하는 것을 볼 수 있는데 이 세포들은 cytokeratin 19와  $\alpha$ -fetoprotein을 발현할 뿐 아니라 쥐의 난원형세포에 대한 항체와 반응한다<sup>27</sup>). 그러므로 인체의 HCC도 간세포와 담관상피세포로 분화하는 능력을 가진 난원형세포에서 기원한 암종으로서 주로 간세포로 분화한 것이라고 생각한다.

간세포 증식성 병변 중 초기형태인 증식병소들은 시간이 경과함에 따라 점차 커진 반면에 그 수는 오히려 감소하였다. 이러한 현상은 증식병소들 중 생존력이 강한 새로운 클론을 형성한 것만 증식하고 나머지 병소들은 소실되었다는 간접적 증거라 할 수 있다. 그러나 간세포 증식성 병변의 크기가 증가하더라도 BrdU 표지지수는 오히려 감소한 것으로 보아 강한 생존력을 가진 클론이라도 증식력이 반드시 강한 것은 아님을 알 수 있다.

포유류 간세포의 DNA 배수성은 종과 연령에 따라 다르며, 쥐의 경우 생후 3주까지는 간세포의 대부분이 2배수성이지만 연령이 증가함에 따라 다배수성 세포가 점차 증가한다<sup>8</sup>). 본 연구에서도 정상 대조군의 간세포는 거의 2배수성과 4배수성이었으며 4배수성/2배수성의 비는 평균 1.13이었으나 발암제를 투여한 경우에는 2배수성 세포의 수가 증가하고 4배수성 세포수가 감소하였으며, 간세포 증식성 병변의 발생이 많은 개체일수록 4배수성/2배수성의 비가 낮았다. 이러한 결과는 2배수성 간세포수의 증가가 간암발생에 중요하다는 견해<sup>8,9</sup>)와 일치하나 이수배수성의 발생이 중요하다는 견해<sup>11,12,28</sup>)와는 대조적이다. 이수배수성을 강조한 기존의 연구들은 8~20  $\mu$ m 두께의 비교적 두꺼운 조직절편을 Feulgen염색하여 현미분광측광법(microspectrophotometry)으로 검색한 것으로서 핵들이 중첩되어 DNA 측정의 오류가 생겼을 가능성이 없지 않은 반면 본 연구결과는 유세포측정기를 이용하여 세포 20,000개 이상의 DNA 유형을 검사한 것이기 때문에 신뢰성에 큰 문제가 없다고 생각된다.

난원형세포의 DNA는 2배수성으로 알려져 있으므로<sup>10,29,30</sup>), 본 연구의 발암제 투여군에서 난원형세포의 증식이 왕성하였던 부분 간절제 후 3일, 1주 및 2주의 2배수성 세포는 대개 난원형세포일 것으로 보이며, 3주, 4주 및 8주의 2배수성 세포는 대개 간세포 증식성 병변을 구성하는 세포들이라 할 수 있다. 또한 본 연구에서 이수배수성이 발생한 개체는 같은 실험소군 중 이수배수성이 나타나지 않은 개체에 비해 4배수성/2배수성의 비가 0.6~0.8로 높았으나 아직 2배수성이 주된 DNA 유형이었다. 이러한 결과로 보아 초기 간암 발생과정에서 필수적인 것은 2배수성 세포들의 증식이고, 이수배수성은 암종의 진행과정에서 나타날 수도 있는 현상임을 알 수 있다<sup>8,28,31</sup>).

부분 간절제 후 초기에 나타나는 간세포 증식병소들은 대개 G6Pase 염색에 음성 반응을 보이는데 이것은 병소를 구성하는 세포들이 아직 간세포 고유의 기능을 획득하지 못하였음을 의미한다. 부분 간절제 후 시간이 경과하면 병변이 커짐에 따라 G6Pase 활성이 점차 회복되고 8주 후에는 대부분의 증식결절이 G6Pase 활성을 보였으며, 동시에 BrdU 표지지수도 초기의 간세포 증식병소에 비하여 낮은 것으로 보아 간세포 증식성 병변이 어느 정도 성장하면 성장속도가 감소하면서 병변을 구성하는 대부분의 세포들이 성숙 과정을 밟는다는 것을 짐작할 수 있다.

간은 중요한 철대사 및 저장 장기이며, 철이 과다하게 축적되면 섬유화, 간경변증 및 HCC가 발생할 수 있다. 생체내에서 철의 대부분은 단백질과 결합하여 독성이 없는 상태로 존재하나 역치이상의 철이 축적하면 촉매작용을 하는 철이 증가하여 자유기가 형성된다. 자유기는 세포막의 성분인 인지질의 지방산을 과산화시켜 세포의 막성 구조가 변성 또는 파괴되고 결

국 세포손상을 초래한다<sup>32)</sup>. 또한 철은 교원질 유전자의 전사를 촉진하여 교원섬유 합성을 증가시킨다. 철을 과다투여하면 간의 propyl hydroxylase 활성과 hydroxyproline이 증가하며<sup>33)</sup>, 인간의 섬유모세포를 배양하면서 다량의 철을 투여하여 과산화물 유발하면 교원질 유전자의 전사 및 교원섬유 합성이 증가하여 철에 의한 섬유화에도 자유기 형성 및 과산화가 중요한 작용을 할 것으로 믿고 있다<sup>34)</sup>.

본 연구에서는 난원형세포와 간세포 증식성 병변의 발생정도 및 BrdU표지수(%)가 화학발암제 단독투여군과 철 병합투여군 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 철 병합투여군의 경우 화학발암제 단독 투여군과 달리 섬유성 담관증식이 발생하였다. Solt-Farber법을 이용한 기존의 연구들에서는 섬유성 담관증식이 기술된 바 없는 것으로 보아<sup>3, 21, 22)</sup> 병합투여한 철이 난원형세포로부터 섬유성 담관증식이 발생하는데 작용하였을 가능성을 배제할 수 없다. 그러나 철 투여가 난원형세포로부터 간세포 증식성 병변이 발생하는 과정에 결정적 영향을 미친다고 할 만한 증거는 없다. 즉 세포증식능을 나타내는 BrdU표지수에 있어서 화학발암제 단독투여군과 철 병합투여군 사이에 유의적인 차이가 없어 이미 발생한 난원형세포와 간세포 증식성 병변의 세포증식력은 철의 영향을 받지 않는다고 생각된다. 다만 철과 HQ를 투여한 I-C군에서 BrdU표지수가 다소 증가하였는데, 이것은 철 축적에 의한 간세포손상에 대한 보상효과로 해석할 수 있다. 뿐만 아니라 화학발암제와 철 병합투여는 DNA 배수성에도 유의적인 영향을 미치지 않았다.

본 연구의 철 병합투여군을 위해서는 일정기간 철을 먼저 투여하여 혈철증을 유발시킨 후 다시 철과 화학발암제를 함께 투여하였으며, 이때 발생한 간세포 증식성 병변들은 Prussian blue염색결과 음성 반응을 보여서 철을 함유한 주변 간조직과의 대조가 명확하였다. 한편 철을 계속 투여하면서 발암제투여를 중단하면 철을 함유하지 않던 간세포 증식성 병변이 감소하면서 점차 철 축적이 일어난다는 연구보고가 있다<sup>35)</sup>. 이러한 사실들을 종합하면 간세포 증식성 병변에서는 철이 축적되지 않는 것이 하나의 특징이라 할 수 있으나 그 기전은 아직 확실히 알려진 바 없다.

간세포 증식성 병변에서는 정상 간세포에 비해 transferrin수용체(TR)의 수가 증가하는 반면에<sup>36)</sup> 세포내 Fe-transferrin의 양이 정상보다 적고<sup>37, 38)</sup> TR의 분자량이나 결합력은 정상 간세포 TR과 차이가 없다고 알려져 있다<sup>36)</sup>. 또한 쥐의 간세포를 배양하면서 <sup>59</sup>Fe-transferrin을 첨가하면 그 흡수가 증가하지만 ferritin과 같은 저장형 철은 형성되지 않는다. 그러므로 간세포 증식성 병변에 철 축적이 일어나지 않는 것은 세포성장에 필요한 철함유효소 합성에 철을 소모하기 때문이라고 해석할 수 있다. 그러나 철과 결합한 TR이 세포막으로부터 세포내로 이동하는

데 장애가 초래되었을 가능성을 완전히 배제할 수 없으며, 따라서 TR에 관한 더 많은 연구가 필요하다고 생각한다.

간암 발생과정 중 간세포 증식성 병변들의 대부분은 재분화하여 정상 간세포가 되며 1~3%에 해당하는 지속성 증식결절들만 성장하여 간암종을 형성한다고 보고 있다<sup>21)</sup>. 간세포 증식결절들의 BrdU표지수(%)가 증식병소보다 높지 않은 것으로 보아 지속성 증식결절들의 성장속도는 대체적으로 느리다고 판단된다. 한편 간세포 증식성 병변들의 G6Pase 활성은 시간이 경과함에 따라 회복되는 반면에 철은 계속해서 축적되지 않는 것으로 보아 병변을 구성하는 세포들의 분화에 있어서 철대사에 관련된 기능의 회복은 매우 늦은 것으로 추정된다.

철 병합투여군에서도 일련의 간세포 증식성 병변이 발생할 뿐 아니라 그 발생빈도에 유의적인 차이가 없으며, 이미 발생한 병변의 BrdU표지수(%) DNA배수성 및 G6Pase활성에 있어서도 철 투여에 따른 차이가 없어 적어도 단기간 철 투여만으로는 간암발생과정에서 아무런 영향도 미치지 못하는 것으로 생각된다.

## 결 론

단기간 철 투여가 실험적 간암 발생과정 중에 나타나는 증식성 병변에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Sprague-Dawley계 흰쥐에 Solt-Farber법으로 화학발암제를 단독 또는 철과 함께 투여한 후 증식성 병변의 조직학적 변화, 철 축적 정도, 세포증식능(BrdU에 대한 면역조직화학염색), DNA배수성(유세포측정) 등에 관하여 비교한 바 다음과 같은 결과를 얻었다. 화학발암제는 철 병합투여 여부와 관계없이 난원형세포의 증식과 일련의 간세포 증식성 병변을 유발하였다. 철을 투여하면 간의 철함량이 현격하게 증가하나 화학발암제 투여군에서는 증식성 병변의 발생이 증가함에 따라 철함량이 점차 감소하였으며, 조직학적으로도 간세포 증식성 병변에는 철 축적이 일어나지 않았다. BrdU표지수는 정상 간세포보다 난원형세포와 간세포 증식성 병변에서 현저하게 높았으나 시간 경과에 따른 차이는 뚜렷하지 않았다. 모든 군에서 간세포들의 DNA 배수성은 주로 2배수성과 4배수성이었으나 증식성 병변이 발생함에 따라 철 병합투여와 관계없이 2배수성 세포군의 비율이 증가하였다. 이상의 결과를 종합하면 철을 과다투여하더라도 화학발암제에 의한 간세포 증식성 병변에는 축적되지 않으며, 단기간 철 과다투여는 간세포 증식성 병변들의 발생이나 그들의 증식능 및 DNA 배수성에 영향을 미치지 못하는 것을 알 수 있다.

## 참 고 문 헌

- 1) Farber E, Sarma DSR. *Biology of disease. Hepa-*

- tocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. Lab Invest* 1987; 56: 1-22.
- 2) Sell S, Leffert HL. *An evaluation of cellular lineages in the pathogenesis of experimental hepatocarcinoma. Hepatology* 1982; 2: 77-86.
  - 3) Solt DB, Medline A, Farber E. *Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. Am J Pathol* 1977; 88: 595-618.
  - 4) Bacon BR, Britton RS. *The pathology of hepatic iron overload: a free radical-mediated process? Hepatology* 1990; 11: 127-37.
  - 5) Hann HWL, Stahlhut MW, Blumberg BS. *Iron nutrition and tumor growth: Decreased tumor growth in iron deficient mice. Cancer Res* 1988; 48: 4168-70.
  - 6) Brown EB, Dubach R, Smith DE, Reynafarje C, Moore CV. *Studies in iron transportation and metabolism. J Lab Clin Med* 1957; 50: 862-93.
  - 7) Yamamoto RS, Williams GM, Frankel HH, Weisburger JH. *8-Hydroxyquinoline: Chronic toxicity and inhibitory effect on the carcinogenicity of N-2-Fluorenylacetamide. Toxicol Appl Pharmacol* 1971; 19: 687-98.
  - 8) Seater G, Schwarze PE, Nesland JM, Juul N, Pettersen EO, Seglen PO. *The polyploidizing growth pattern of normal rat liver is replaced by divisional, diploid growth in hepatocellular nodules and carcinoma. Carcinogenesis* 1988; 9: 939-45.
  - 9) Deleener A, Castelain P, Preat V, De Gerlache J, Alexandre H, Kirsch-Volder M. *Changes in nucleolar transcriptional activity and nuclear DNA content during the first steps of rat hepatocarcinogenesis. Carcinogenesis* 1987; 8: 195-201.
  - 10) Seater G, Schwarze PE, Nesland JM, Seglen PO. *Diploid nature of hepatocellular tumors developing from transplanted preneoplastic liver cells. Br J Cancer* 1989; 59: 198-205.
  - 11) Sarafoff M, Rabes HM, Dormer P. *Correlation between ploidy and initiation probability determined by DNA cytophotometry in individual altered hepatic foci. Carcinogenesis* 1986; 7: 1191-6.
  - 12) Mori H, Tanaka T, Sugie S, Takahashi M, Williams G. *DNA content of liver cell nuclei of N-2-fluorenylacetamide-induced altered foci and neoplasm in rats and human hyperplastic foci. J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 1277-82.
  - 13) Ogawa K, Solt DB, Farber E. *Phenotypic diversity as an early putative preneoplastic hepatocyte population in liver carcinogenesis. Cancer Res* 1980; 40: 725-33.
  - 14) Sciote E. *Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis. Biochem Biophys Acta* 1984; 738: 219-36.
  - 15) Sciote R, Van Eyken P, Facchetti F, Callea F, Van der Steen K, Dijk H, Parys G, Desmet VJ. *Hepatocellular transferrin receptor expression in secondary siderosis. Liver* 1989; 9: 52-61.
  - 16) 박찬일, 김호근, 진소영, 양우익, 이유복. *Ethanol이 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene에 의해 유발되는 백서 간암발생에 미치는 영향. 대한병리학회지* 1991; 52: 21-9.
  - 17) 문정숙, 박영년, 박찬일. *황산구리 투여가 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene에 의한 간암 발생과정에 미치는 영향. 대한병리학회지* 1992; 26: 360-71.
  - 18) Grisham JW, Porta EA. *Origin and fate of proliferating hepatic ductal cells in the rat; Electron microscopic and autoradiographic studies. Exp Molec Pathol* 1964; 2: 242-61.
  - 19) 김호근, 이유복. *발암제(3'-methyl-4-dimethyl aminoazobenzene)로 유도된 간암 발생 과정에 관한 연구. 연세의대논문집* 1987; 20: 285-98.
  - 20) Farber E. *Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals. Cancer Res* 1984; 44: 5463-74.
  - 21) Ogawa K, Medline A, Farber E. *Sequential analysis of hepatic carcinogenesis; the comparative architecture of preneoplastic, malignant, prenatal, postnatal and regenerative liver. Br J Cancer* 1979; 40: 782-90.
  - 22) Ogawa K, Minase T, Onoe T. *Demonstration of glucose 6-phosphatase activity in the oval cells of rat liver and the significance of the oval cells in azo dye carcinogenesis. Cancer Res* 1974; 34: 3379-86.
  - 23) Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS. *A precursor product relationship between oval cells and hepatocytes in rat liver. Carcinogenesis* 1987; 8: 1737-40.
  - 24) Evarts RP, Nagy P, Nakatsukasa H, Marsden E, Thorgeirsson SS. *In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. Cancer Res* 1989; 49: 1541-47.
  - 25) Sell S, Dunsford HA. *Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. Am J Pathol* 1989; 134: 1347-63.
  - 26) Sell S. *Is there a liver stem cell? Cancer Res* 1990; 50: 3811-5.
  - 27) Hsia CC, Evarts RP, Nakatsukasa H, Marsden E, Thorgeirsson SS. *Occurrence of oval-type cells in hepatitis B virus-associated human hepatocarcinogenesis. Hepatology* 1992; 16: 1327-33.
  - 28) 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* 1971; 47-58.
  - 29) Schwarze PE, Pettersen EO, Tolleshaug H, Seglen

- PO. Isolation of carcinogen-induced diploid rat hepatocytes by centrifugal elutriation. *Cancer Res* 1986; 46: 4732-37.
- 30) Scott RJ, Chakraborty S, Sell S, Hunt JM, Dunsford HA. Change in the ploidy state of rat liver cells during chemical hepatic carcinogenesis and its relationship to the increased expression of  $\alpha$ -fetoprotein. *Cancer Res* 1989; 49: 6085-90.
- 31) Danielsen HE, Steen HB, Lindmo t, Reith A. Ploidy distribution in experimental liver carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* 1988; 9: 59-63.
- 32) Bonkovsky HL. Iron and the liver. *Am J Med Sci* 1991; 301: 32-43.
- 33) Weintraub LR, Goral A, Grasso J, Granzblau C, Sullivan A, Sullivan S. Pathogenesis of hepatic fibrosis in experimental iron overload. *Br J Haematol* 1985; 59: 321-31.
- 34) Chojkier M, Houglum K, Solis-Herrunzo J, Brenner DA. Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts: A role for lipid peroxidation? *J Biol Chem* 1989; 264: 16957-62.
- 35) Williams GM, Watanabe KX. Quantitative kinetics of development of N-2-fluorenylacetamide-induced, altered(hyperplastic)hepatocellular foci resistant to iron accumulation and their reversion or persistence following removal of carcinogen. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61: 113-21.
- 36) Eriksson LC, Torndal UB, Andersson GN. The transferrin receptor in hepatocyte nodule; binding properties, subcellular distribution and endocytosis. *Carcinogenesis* 1986; 7: 1467-74.
- 37) Williams GM, Yamamoto RS. Absence of stainable iron from preneoplastic and neoplastic lesions in rat liver with 8-hydroxyquinoline-induced siderosis. *J Natl Cancer Inst* 1972; 49: 685-92.
- 38) Williams GM, Klaiber M, Parker SE, Farber E. Nature of early appearing carcinogen-induced liver lesions resistant to iron accumulation. *J Natl Cancer Inst* 1976; 57: 157-65.
- 39) Linder M, Munro HN, Morris HP. Rat ferritin and their reponse to the iron administration in a series of hepatic tumors and in normal and regenerating liver. *Cancer Res* 1970; 30: 2231-9.
- 40) Bomford AB, Munro HN. Transferrin and its receptor; their roles in cell function. *Hepatology* 1985; 5: 870-5.