

실험적 간세포암종 발생과정에 있어서 효소 변이소의 BrdU와 C-Ha-ras 발현

서울대학교 의과대학 병리학교실 및 부속 암연구소

김 명 숙* · 김 우 호 · 김 용 일

Expression of BrdU and C-Ha-ras in Experimentally Induced Enzyme Altered Foci of the Liver and Hepatocellular Carcinoma

Myung Sook Kim, M.D., Woo Ho Kim, M.D. and Yong Il Kim, M.D.

Department of Pathology, Seoul National University College of Medicine

Four sequential phenotypic changes including enzyme altered hepatocytic foci, hyperplastic nodules, hepatocellular adenomas and carcinomas were produced in Sprague-Dawley rats by Solt-Farber method (administration of diethylnitrosamine and acetylaminofluorene (AAF), and partial hepatectomy). The immunohistochemical expressions of glutathione S transferase P (GST-P) and bromodeoxyuridine (BrdU) were assessed for selective proliferative activity in the enzyme altered foci and the subsequently developed lesions by double immunohistochemical staining technique.

Immunoreactive areas against GSTP gradually increased from early period of carcinogenesis. BrdU labeling in such areas remained high during the first week, but decreased thereafter. BrdU labeling index remained low in the GSTP negative area throughout the experimental period. This suggests that cells in the enzyme altered foci keep away from the suppressor effect of AAF in contrast to the normal cells in which their growth are inhibited by AAF. BrdU labeling index remained very low in both hyperplastic nodule and adenoma which were prevalent during the mid-experimental period, but increased markedly in carcinoma. The long period of low BrdU labeling index seems to correspond to the "slowly growing step of persistent nodule" during hepatocarcinogenesis. The differentiation index, a ratio of S phase fraction between GSTP positive and negative areas, was low in adenoma-developing period and high in carcinoma-developing period. C-Ha-ras p21 was not expressed in foci of enzyme altered hepatocyte and hyperplasia, but highly positive in carcinoma. This indicates that the c-Ha-ras may involve the late step of hepatocarcinogenesis. (**Korean J Pathol 1994; 28: 584~595**)

Key Words: BrdU, Enzyme altered foci, C-Ha-ras p21, Hepatocarcinogenesis, Double immunohistochemical stain

접 수: 1994년 3월 3일, 게재승인: 1994년 7월 20일

주 소: 서울시 종로구 평동 108번지, 우편번호 100-634

고려병원 병리과, 김명숙

*원주소: 고려병원 병리과

**본 연구는 1993년도 학술진흥재단 일반 연구비로 이루어졌음(김용일).

서 론

실험적으로 간암종을 유도하는 방법중 Solt-Farber가 제시한 저항성 간세포 모델¹⁾은 단기간에 초기병변인 세포(효소)변이소(foci of cellular alteration)를 쉽게 유도할 수 있기 때문에 많이 이용되고 있다. 이 모델에서 발암물질에 의해 유도된 기시 간세포(initiated hepatocyte)가 암을 형성하기 까지는 몇 개의 단계를 거치는 것으로 추정하고 있으나 이들이 연속적으로 발생한다는 것을 가시적으로 증명하기는 용이하지 않다. Farber²⁾는 이때 각 단계의 세포를 쥐의 비장에 이식하면 소위 지속성 결절(persistent nodule) 세포만이 간세포암종을 형성한다고 하였으며 이는 발암물질 투여에 의해 성장조절 장애를 일으킨 새로운 간세포가 형성되고 이들의 계속 증식에 의한다고 주장하였다.

세포변이소는 통상의 hematoxylin-eosin(H & E) 염색에서 정상보다 약간 크거나 비슷한 크기의 핵을 가지고 있으며 세포질의 염색상에 따라 호염기성, 호산성, 투명, 그리고 혼합세포로 나눌 수 있다³⁻⁵⁾. 이 변이소는 효소화학적으로 gamma glutamyl transpeptidase(GGT)의 출현^{6,7)}과 glucose-6-phosphatase 및 adenosine triphosphatase의 감소 그리고 periodic acid Schiff(PAS) 염색에 과염색상을 나타내며 면역조직 화학적으로 태반형의 glutathione S-transferase(GSTP)가 특징적으로 나타나고⁸⁻¹³⁾ 또 ras 등의 종양 유전자 발현을 초래한다^{14,15)}. GSTP는 발암물질을 비롯한 각종 화학물질이나 이물질 또는 체내에서 생성되는 steroid계의 지용성 물질들과 결합하여 이들을 불활성화시키거나 배설시키는 등, 해독작용에 관여한다. GSTP 양성 세포변이소는 이전에 전암성 세포의 표지자로 인정받고 있는 GGT 양성 변이소와 일치한다는 사실이 증명되어⁸⁻¹³⁾ 실험적 간암연구에서 GSTP가 새로운 표지자로 널리 이용되고 있다.

또한 최근에는 암발생 원인인자의 하나로 종양 유전자설이 적극적으로 검토되고 있으며 이 중 ras 유전자의 발현 증가는 암발생의 기시단계에서부터 일어난다고 하는 견해¹⁶⁾와 기시세포가 분화되어 가는 과정에서 늦게 나타난다고 하는 설¹⁷⁾이 있다.

실험적 암발생에서 세포증식을 표지하는 방법으로는 ³H-thymidine을 이용한 자가방사법^{6,18)}을 많이 사용하여 왔으나 실험기간이 길고 방사능 물질의 환경오염 및 정확한 병변부위 확인의 어려움 등 많은 문제점이 있다. Gratzner¹⁹⁾는 이러한 단점을 보완하면서 DNA 합성 세포핵을 표지하는 5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU)을 이용한 조직면역화학 염색방법을 개발하였고 그 결과는 ³H-thymidine법을 사용한 결과와 일치한다^{20,21)}고 하였다. 또 세포변이소의 표지자인 GSTP와 함께 한장의 슬라이드에 이중염색이 가능하므로

H-E 표본에서 확인되지 않는 초기병변을 정확하게 그리고 객관적으로 인지할 수 있으며 따라서 병변별로 정확한 증식 정도를 비교할 수 있는 장점이 있다.

저자들은 간의 실험적 발암과정에서 연속적으로 나타나는 병변들의 조직학적 변화와 GSTP 활성부위의 특성 및 세포 증식상의 정도를 이중면역조직화학적으로 조사하고 ras 유전자의 발현시기를 밝힘으로써 Solt-Farber 모델에서의 연속적 발암과정을 증명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 시약

본 실험에 사용된 Sprague-Dawley계 흰쥐는 서울대학교 동물사육실(서울시 관악구)에서 분양 받았다. Diethylnitrosamine(DEN), 2-acetylaminofluorene(AAF), bromodeoxyuridine(BrdU), peroxidase-antiperoxidase complex, poly-L-lysine, chloronaphthol, diaminobenzidine(DAB) 및 glycergel은 Sigma Chemical Inc.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 정상 면양 혈청, biotinylated anti-mouse immunoglobulin, avidin-biotin-peroxidase complex는 Vector Lab.(Burlingame, CA, USA)에서, monoclonal anti-bromodeoxyuridine antibody는 Synbio(Uden, Netherlands)에서, 그리고 biotinylated goat anti-rat immunoglobulin은 Oncogene Science, Inc.(Uniondale, NY, USA)에서 구입하였으며 anti-GSTP 항체는 Kiyomi Sato 교수(일본 Hirosaki 대학)에게서 공여받아 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 간세포암종 유도 방법: 체중이 150~200 gm인 Sprague-Dawley계 흰쥐에게 Solt-Farber 방법을 적용하여 간세포암종을 유발시켰다. 체중 1 kg당 DEN 200 mg을 복강내에 투여하고 2주후부터 0.02% 2-acetylaminofluorene(AAF) 혼합사료를 4주간 투여하였다. AAF 혼합사료를 투여한지 1주후에 부분간절제술(PH)을 시행하였는데 ether 마취하에 개복하여 간 중앙엽과 좌엽의 기저부를 묶고 절제하여 평균 67%의 간을 제거하였다²²⁾. 실험동물은 수술후 제 0일(G0), 1일(G1), 2일(G2), 3일(G3), 5일(G4), 1주(G5), 2주(G6), 3주(G7), 4주(G8), 8주(G9), 16주(G10), 32주(G11), 64주(G12)에 해당하는 날에 각 군마다 3~9마리씩 희생하였다(Fig. 1).

대조군에 대한 DEN 투여와 부분간절제술은 실험군과 동일하게 시행하였으나 AAF 혼합사료 대신 일반사료를 주었고 실험초기 [0일(G0)~2주(G6)]에만 각 군별로 3마리씩 사용하였다. 합성기 세포의 표지를 위

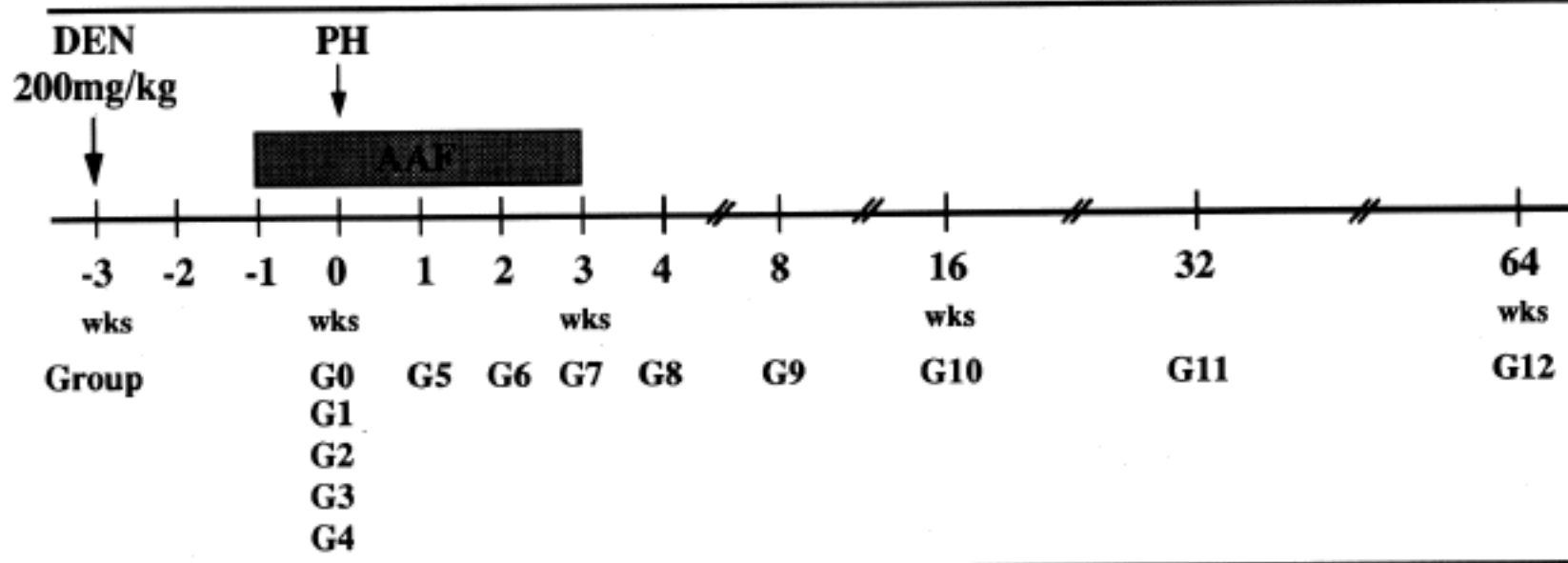


Fig. 1. Experimental procedures of rat hepatocarcinogenesis.

DEN	: diethylnitrosamine	G5	: 1 wk after PH group
AAF	: acetyl aminofluorene	G6	: 2 wk after PH group
PH	: partial hepatectomy	G7	: 3 wk after PH group
G0	: 0 day after PH group	G8	: 4 wk after PH group
G1	: 1 day after PH group	G9	: 8 wk after PH group
G2	: 2 day after PH group	G10	: 16 wk after PH group
G3	: 3 day after PH group	G11	: 32 wk after PH group
G4	: 4 day after PH group	G12	: 64 wk after PH group

하여 도살 2시간 전에 BrdU(10 mM)를 동물 체중 1 kg당 2 ml씩 복강내로 주사하였다²³⁾.

2) 병리조직학적 검색: 간은 5 mm 두께로 잘라 acetone 용액에 5일간 고정 탈수하고 benzene으로 투명시킨 다음 paraffin에 포매하여 4 μm 두께로 박 절하였다. 박절한 조직은 통상적인 방법에 따라 H & E 염색과 PAS 염색을 시행하고 광학현미경으로 검 경하였다.

3) 면역조직화학적 염색: 박절한 조직은 탈파라핀 과정을 거쳐 탈수시킨 다음 0.3% H₂O₂로 내인성 peroxidase를 제거하고 정상 면양 혈청과 반응 후 rabbit anti-GSTP로 30분간 염색하였다. Mouse anti-rabbit IgG로 처리하고 peroxidase anti-peroxidase로 염색한 후 chloronaphthol로 발색하였다. GSTP 염색을 시행한 후 이 슬라이드를 1N HCl에 60°C oven에서 10분간 처리하고 mouse anti-BrdU 에 반응시킨 뒤 biotinylated anti-mouse IgG로 처리하였다. 그후 avidin-biotin-peroxidase complex 로 염색하고 diaminobenzidine으로 발색하였으며 Meyer's hematoxylin으로 염색하고 glycergel로 봉입하였다. 염색된 표본은 영상분석기(Leitz 회사)를 사용하여 간조직내 GSTP 양성 부위의 크기를 측정 하여 단위 면적중 세포변이소의 면적(mm²/cm²), 단위면적내의 세포변이소의 갯수(개/cm²) 그리고 세포 변이소의 평균 단면적(mm²)을 구하였다²⁴⁾. 각 표본에

서 시기별로 GSTP 양성변이소와 GSTP 음성인 주 위 간조직을 현미경사진 촬영하여 이들내의 BrdU 양성세포와 음성세포수를 세어 BrdU 표지계수(labeling index)와 선택계수(differentiation index)를 구하였다²⁵⁾. 표지계수는 전체 간세포핵중 BrdU 양성 세포핵의 비를 나타내며 선택계수는 GSTP 양성부위 와 음성부위의 표지계수의 비로써 나타내었다. 이때 Kupffer 세포, Ito 세포, 난원세포 그리고 혈관 내피 세포는 계수과정에서 제외하였다.

C-Ha-ras 염색은 박절조직을 탈파라핀, 합수, 내인 성 peroxidase 제거과정을 거친 후 saponin으로 처 치하고 정상 면양 혈청을 없앤 뒤 biotinylated horse anti-mouse IgG에 반응시켰다. 그후 streptavidin-horseradish peroxidase에 염색한 뒤 diaminobenzidine으로 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색한 후 현미경으로 검색하여 양성반응 부위를 시기별로 표시하였다.

실험 성적

1. 간의 육안 소견

실험군 쥐의 간은 육안적으로 황갈색의 절단면을 보 였으며 처음 8주(G9)까지는 특이한 소견을 발견할 수 없었다. 실험 제 32주 군에서는 8마리 중 1마리에서 10.5 mm 크기의 회백색 암종이 발견되었고 약 3

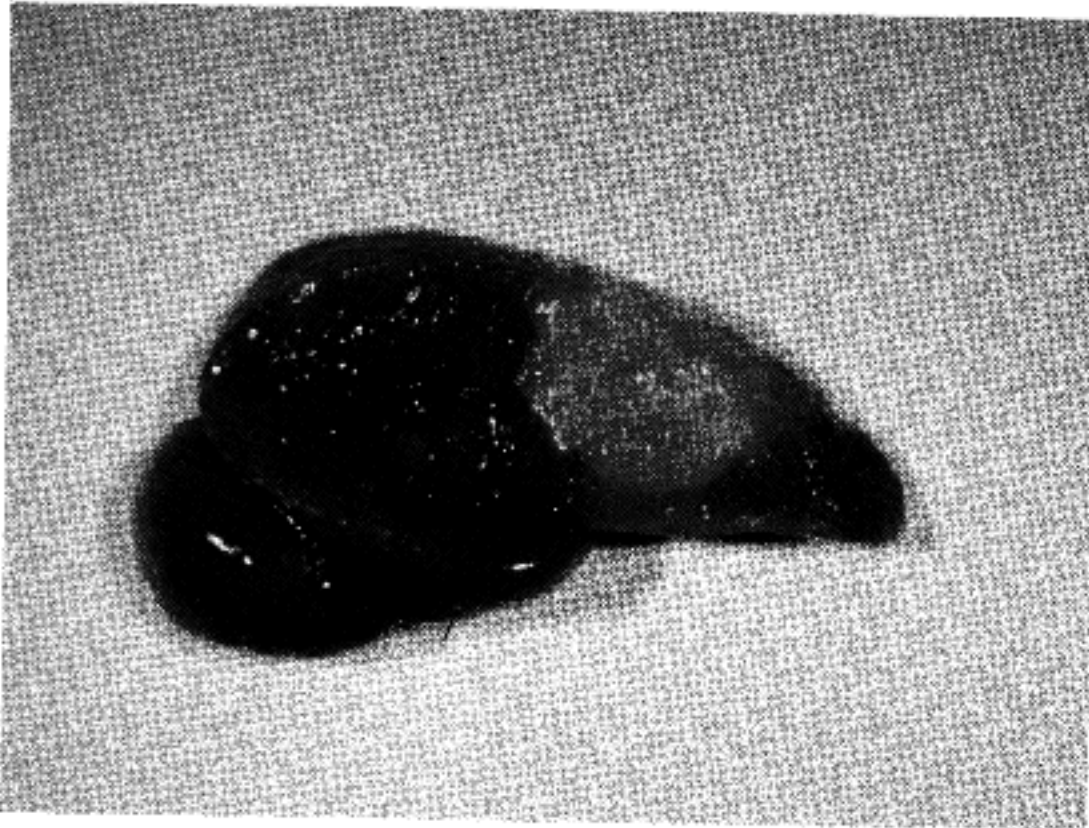


Fig. 2. A well demarcated grayish tan mass (hepatocellular carcinoma) is seen at week 64 (Group 12).

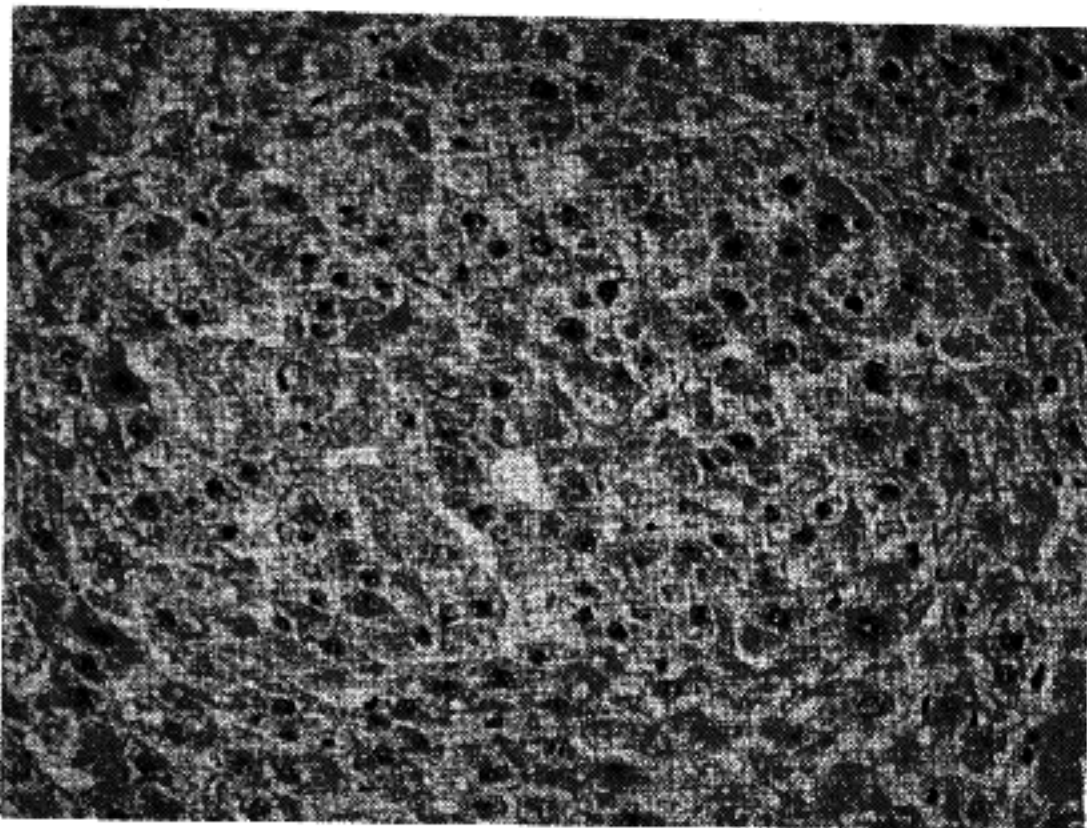


Fig. 3. Basophilic cell focus (area) induced in the rat liver by Solt-Farber method. Basophilic cells are the main component in this altered hepatocytic focus. A pseudoglandular structure is noted at the center of the field.

mm 크기의 충실성인 회백색 결절들이 절단면당 2~3개씩 관찰 되었다. 64주간 10마리 중 4마리에서 4개의 임종을 확인할 수 있었으며 이들 모두 회백색의 단단한 절단면을 가지고 있었다(Fig. 2).

2. 간의 광학 현미경적 소견

원래 간에 나타나는 광학현미경소견에 대한 분류는 Maronpot 등⁵⁾이 제시한 National Toxicology Program 명명법에 근거하여 크게 4단계로 구분하였으며 필요에 따라 Institute of Laboratory Animal

Resources(ILAR)⁶⁾의 분류도 참고하였다.

1) 세포 변이소(Foci of cellular alteration): 실험 2일째(G2)부터 확실한 세포변이소가 여러 곳에서 나타났으며 모두 호염기성 세포로 구성되어 있었고 뚜렷한 핵소체를 가지고 있었다(Fig. 3). 이 세포들은 PAS 염색에서 작은 과립상으로 진하게 염색되는 세포질을 가지고 있어서 주변 간세포들과 확실하게 구별되었다.

실험 기간이 경과할수록 세포변이소의 크기와 개수가 증가하면서 주변 간세포를 압박하거나 자연스럽게

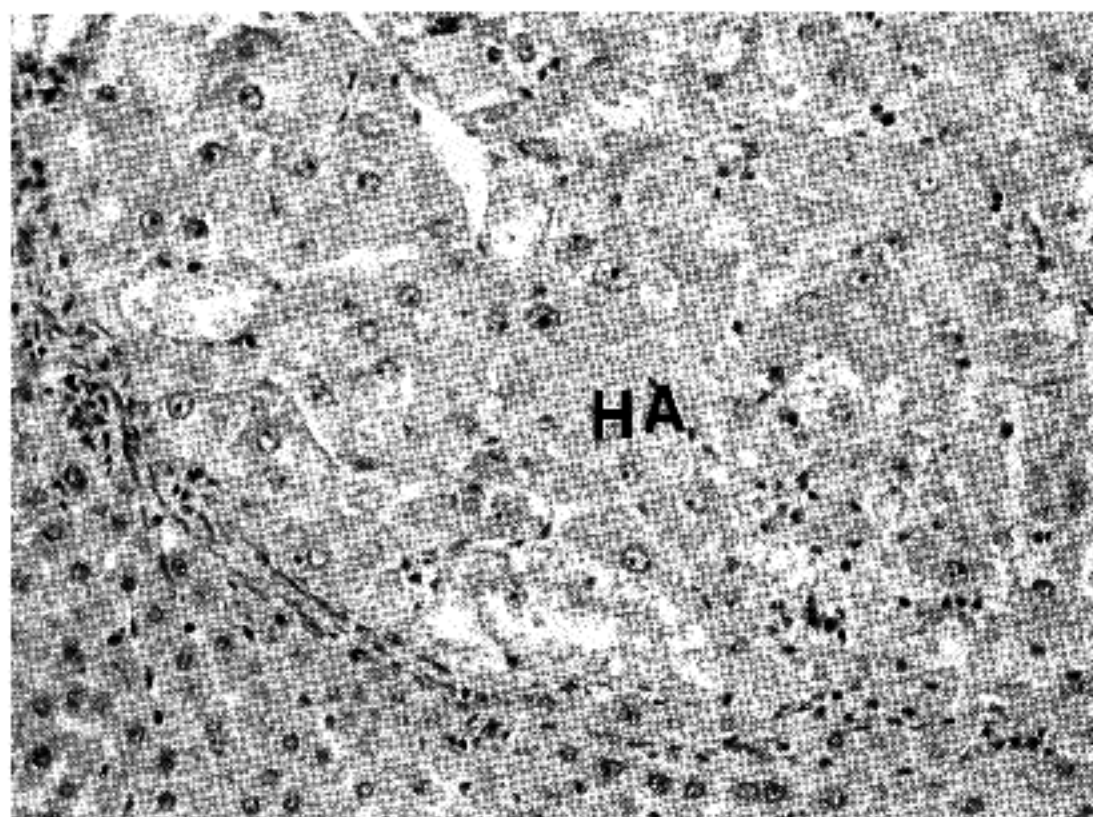


Fig. 4. Hepatocellular adenoma (HA) is well delineated from the adjacent tissue by thin fibrous capsule formation.

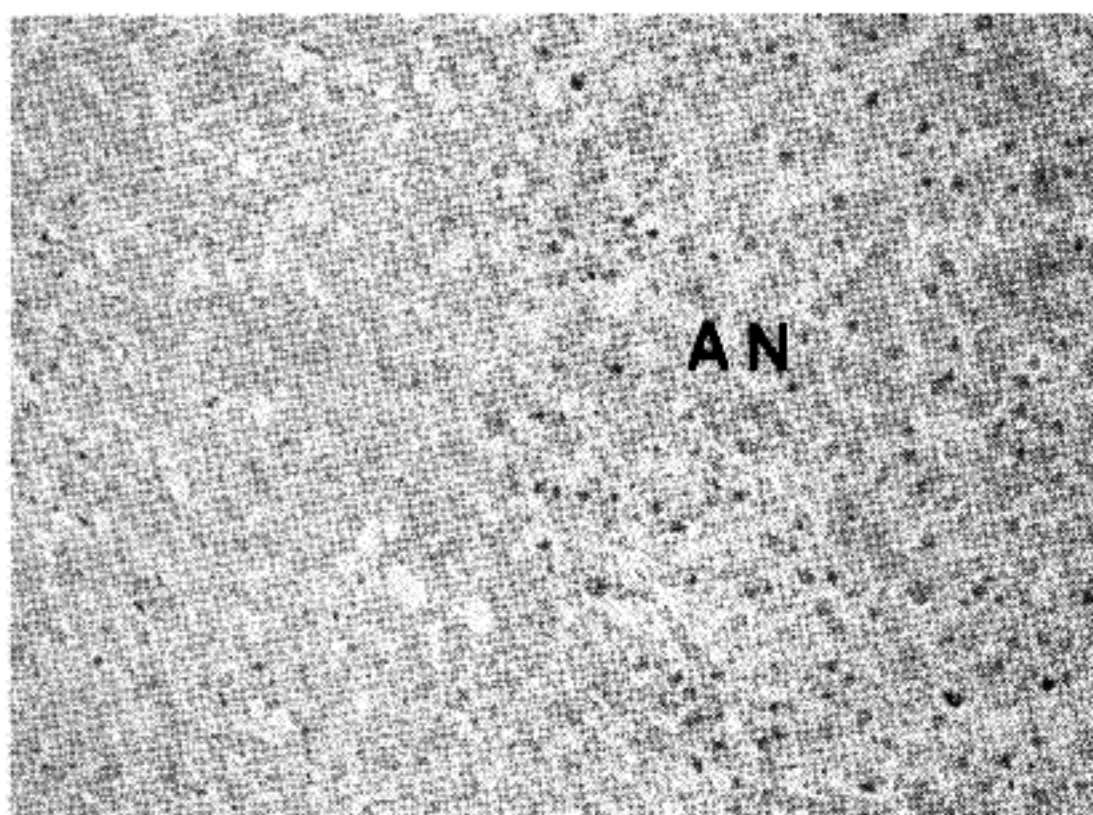


Fig. 5. Atypical nodule (AN) appears in adenoma at the week 32 in a pattern of "nodule in nodule". The adenoma shows focal hypercellularity, hyperchromatic nuclei with clear cytoplasm and scattered mitotic figures.

이행하는 소견과 빈이소네에서 위선(pseudogland 또는 acinus) 배열상이 보였으며 이는 실험 1주(G5)까지 지속되었다.

2) 증식결절(Focal hepatocellular hyperplasia): 이들은 투명세포와 호산성 세포로 구성되어 있었고 그 직경이 0.9~2.2 mm 크기에 이르렀으며 실험 2주(G6)부터 4주(G8)사이에 주로 관찰 되었다. 이 결절의 현미경적 특징은 주변 간 조직을 압박하지만 이행하는 소견을 동반하였다. 세포 이형성은 없었으며 시간이 경과함에 따라 호산성 증식결절이 증가하였다

3) 간세포선종(Hepatocellular adenoma): 간세포선종은 실험 제 8주(G9)부터 나타나기 시작하여 실험 말기인 64주까지 나타났다. 이들의 특징은 증식결절 전체를 둘러싸는 얇은 피막 형성, 세포 충실성의 증가, 정상 간소엽 구조의 소실 등이었다(Fig. 4).

5개의 간세포선종(10-1, 11-3, 11-5, 12-2, 12-5)에서 결절내 결절성 병변(nodule in nodule 또는 carcinoma in nodule)이 관찰되었는데 이들 구성하는 세포들은 선종을 구성하는 세포보다 크기가 작고 뚜렷한 핵소체를 가졌으며 세포 분열상이 자주 관찰되었다

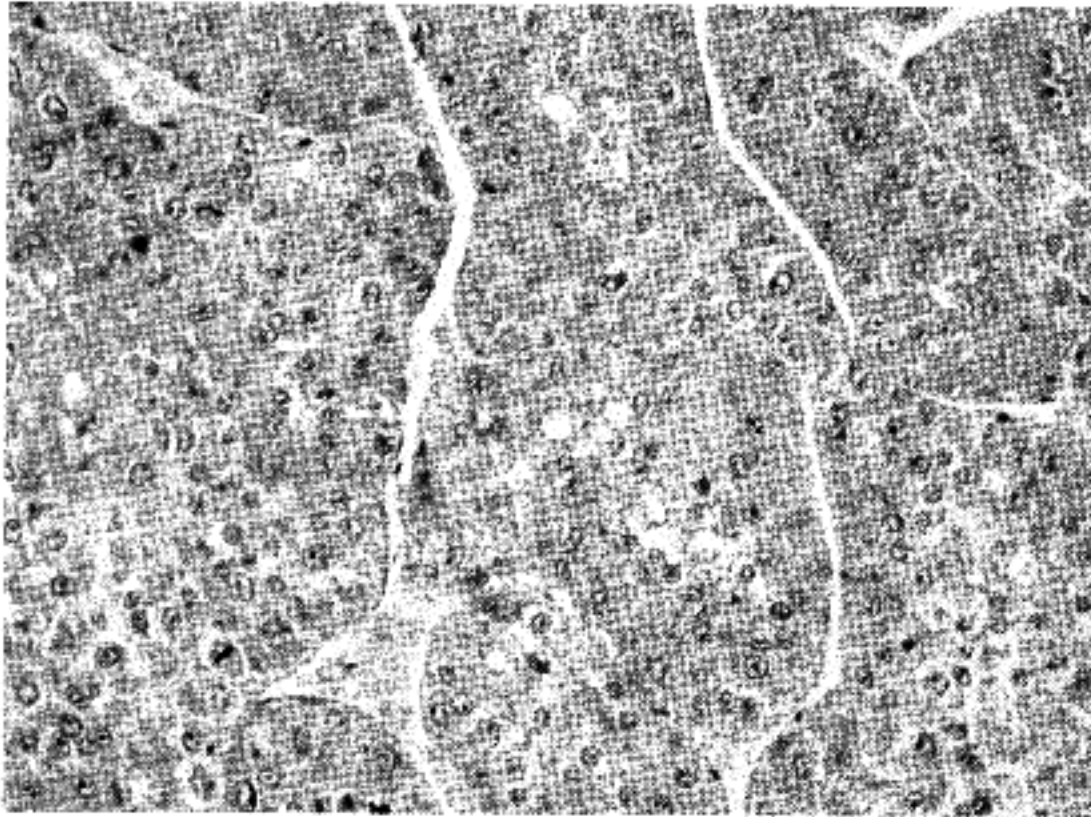


Fig. 6. Trabecular type of hepatocellular carcinoma which developed at the week 64.

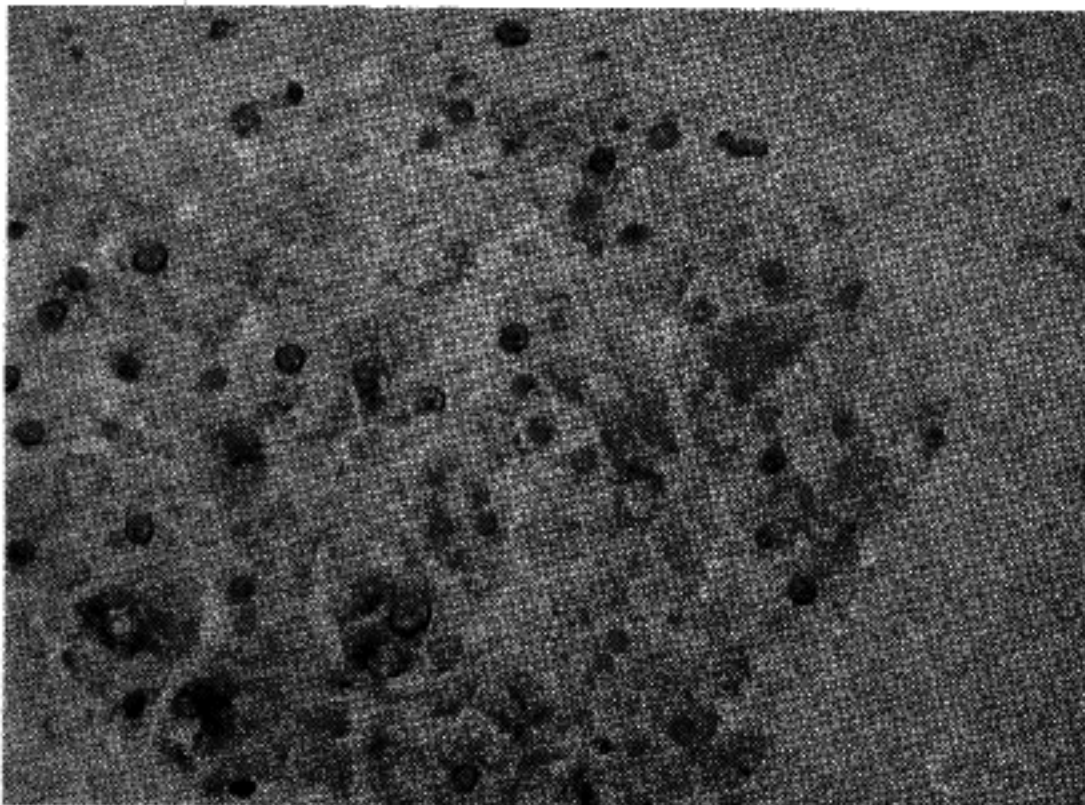


Fig. 7. Photomicrograph of an enzyme altered focus. The nuclei of S-phase cells are stained with DAB (dark brown color), while the cytoplasm of the focus are stained with chloronaphthol (gray color). (Anti-BrdU & anti-GSTP double stain)

(Fig. 5).

4) 간세포암종(Hepatocellular carcinoma): 실험 제 32주(G11)의 1예(11-2)와 64주(G12)의 6예(12-2a, 2b, 4, 5, 6, 10) 포함 7예에서 간세포암종이 발견되었다.

간세포선종으로부터 암종으로 이행하는 소견을 보였던 예는 2예(12-2a, 12-5)였고 나머지 5예는 육안적으로 확인이 가능하였으며 이들의 직경은 4~18mm이었다. 크기가 작은 암종에서는 피막이 잘 형성되어 있었으나 대부분은 주변 조직으로 침윤하는 소견을 보였

다. 현미경적으로 주형 간세포암종이 대부분이었고 3열 이상의 세포삭을 형성하였으며 확장된 유동으로 둘러싸여 있었다(Fig. 6).

3. GSTP 양성 부위와 성장 분획 표지

GSTP 양성 변이소는 chloronaphthol에 의하여 세포질이 회갈색으로 염색되었으며, BrdU 양성인 S시기 세포의 핵은 DAB에 의해 짙은 갈색으로 염색되어 각각 쉽게 구별되었다(Fig. 7). GSTP-BrdU 이중 염색은 병변의 크기가 작은 실험초기(G0~G6)에 한

하여 실시하였고 그 이후에는 연속 절편에서 각각의 염색을 시행하여 비교 분석하였다.

1) 실험 초기의 변화: 실험군과 대조군에서 각각 GSTP 양성 세포변이소의 상대 면적변화, 세포변이소 및 정상 간조직의 BrdU 표지계수와 선택계수를 비교하였다. 상대면적 변화는 실험군에서 제 1일에 0.2%, 3일에 1.3%, 5일에 2.9%, 그리고 2주 및 3주에는 25.9%와 22.2%로 지수적 증가를 보였으나 대조군에서는 0.1~0.3% 범위 내에 머물렀다. 세포변이소의 평균단면적도 실험군에서는 지수적으로 증가하였으나 대조군에서는 거의 증가하지 않아서(Table 1) 세포 변이소의 상대면적 증가 양상과 비슷하였다. 이는 GSTP 양성 변이소의 상대면적 증가가 변이소의 갯수 증가보다 변이소의 크기 증가에 의함을 알 수 있었다.

GSTP 양성 변이소내의 BrdU 표지계수는 실험군과 대조군 모두에서 간절제술 후 급격히 증가하였으나 그 양상은 판이하게 달랐다(Table 2). 즉 실험군과 대

조군 모두 수술후 1일째에 15~20%로 증가하였으나, 시간의 흐름에 따라 대조군은 3일 이후 급격히 감소한 반면(8.5%이하) 실험군에서는 7일까지 20% 이상의

Table 1. Change of mean area of cellular alteration foci by days after procedure

day	Experimental group(mm ²)	Control group(mm ²)
0	0.02	0.02
1	0.02	0.01
3	0.04	0.04
5	0.10	0.05
7	0.14	0.03
14	0.32	0.03
21	0.33	-

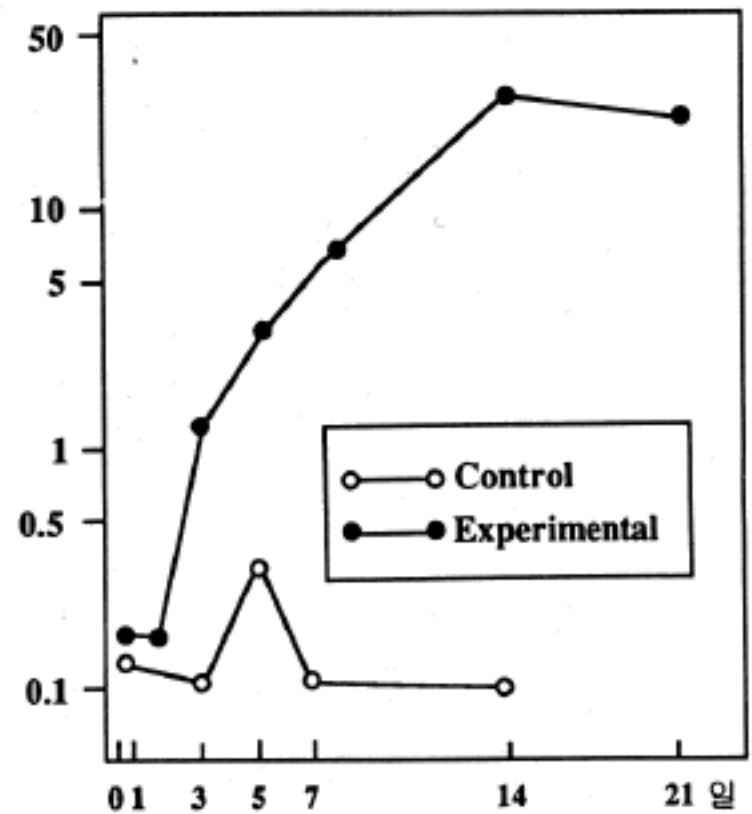


Fig. 8. Sequential change of GSTP positive areas in the livers of the experimental and control animals. The GSTP positive area (expressed as mm²/cm² total area) increased linearly in semilo-garithmic chart in the experimental group. It remains nearly constant in the control animals.

Table 2. BrdU labeling and differentiation indices of proliferating cells in DEN-AAF-PH Model.

Group	Experimental group			Control group		
	LI(%) GSTP(+)-area	LI(%) GSTP(-)-area	diff. Index	LI(%) GSTP(+)-area	LI(%) GSTP(-)-area	diff. index
1 day	15.5	2.1	7.3	19.6	18.9	1.0
3 days	22.4	9.4	2.4	6.8	4.8	1.4
5 days	21.2	4.1	5.2	8.5	7.6	1.1
7 days	25.5	6.7	3.8	3.0	5.7	0.5
2 wks	6.8	5.7	1.2	1.0	1.0	1.0
3 wks	5.1	3.3	1.6	-	-	-
4 wks	6.8	1.9	3.5	-	-	-
8 wks	7.1	1.7	4.1	-	-	-
16 wks	7.1	1.7	4.1	-	-	-
32 wks	6.9	0.6	11.1	-	-	-
64 wks	4.1	0.3	12.6	-	-	-

LI: labeling index(% BrdU positive hepatocytes among total hepatocytes)

Table 3. Histopathologic features, BrdU labeling index and differentiation index of proliferating cells in rats with hepatocellular carcinoma

Animal No.	Tumor size (diameter, mm)	Capsule formation	Portal vein invasion	Histologic type	Labeling index(%)
11-2	10.5	-	-	trabecular	28.5
12-2a	18	-	+	trabecular	17.5
12-2b	5	+	-	solid	8.3
12-4	14	-	-	trabecular	16.2
12-5	4	+	-	glandular	7.8
12-6	9.1	-	-	glandular	16.0
12-10	14.6	-	-	trabecular	20.6

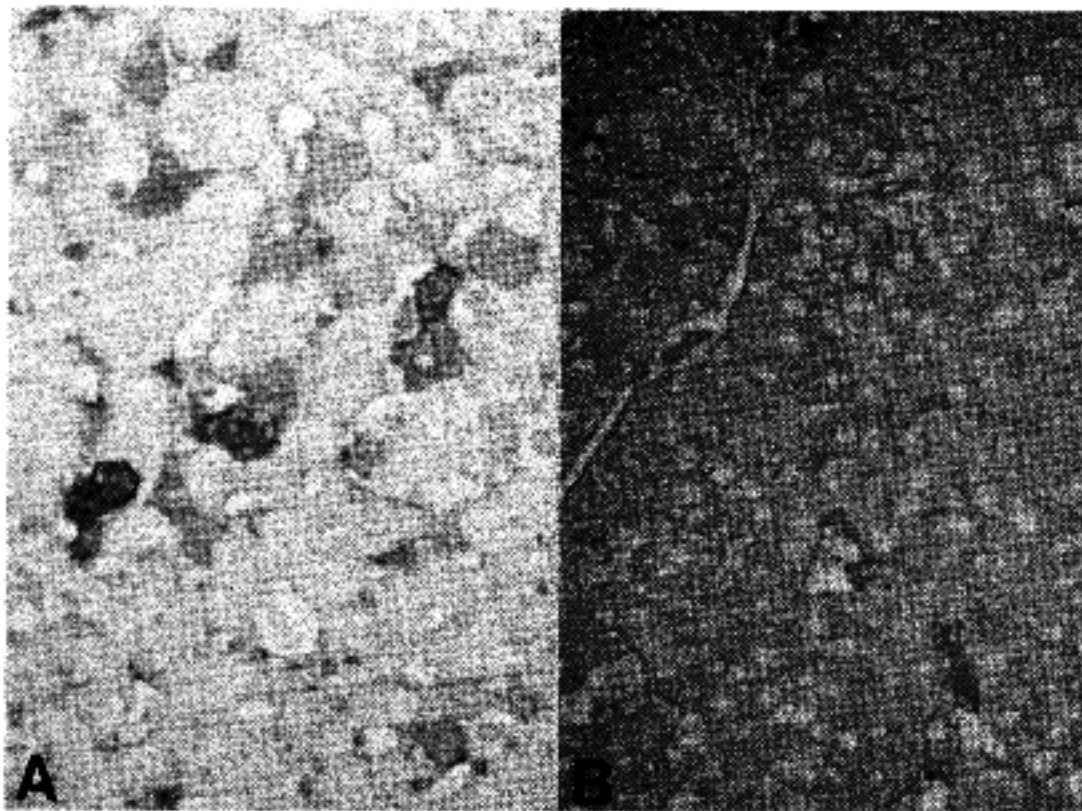


Fig. 9. Photomicrographs of hepatocellular adenoma (A) and carcinoma (B) in immunohistochemical staining for c-Ha-ras p21. The adenoma reveals a few scattered positive cells, while the carcinoma cells are diffusely stained. (PAP stain)

높은 증식 양상을 보였다. GSTP 음성인 주위 간조직의 표지계수는 대조군의 경우 변이소내의 표지계수와 유사하여 선택 계수가 약 1을 나타내었으나 실험군의 경우에는 2.1~9.4%의 표지계수를 나타내어 2.4~7.3배의 증가된 선택계수임을 확인할 수 있었다.

2) 실험 중기 및 후기의 변화: 증식결절과 선종 그리고 암종 부위도 GSTP 염색에 양성 반응을 보였으나 세포변이소의 염색 정도에 비하여 약하게 염색되었다. GSTP 양성 부위에 대한 BrdU 표지계수 산정시 암 발생군의 경우 암 조직 부위는 표지계수 산정에서 제외시켰으며 암종 자체의 표지 계수는 별도로 산정하였다.

이 시기의 BrdU 표지계수는 GSTP 양성 부위에서 4.1~7.1%로 실험 초기(15.5~25.5%)에 비하여 큰 감소를 보였으나 GSTP 음성 부위, 즉 정상 간 부위의 표지계수(0.3~1.9%)도 크게 감소하여 선택계수는 시

간이 경과할수록 증가하였다. 특히 암 발생군(32주와 64주)의 선종에서는 11.1과 12.6의 높은 선택계수를 나타내었다.

암 조직 자체의 BrdU 표지계수는 8.3~28.5%로 매우 다양하였으나 피막 형성이 뚜렷했던 2예를 제외하면 모두 16% 이상의 높은 수치를 나타내었다(Table 3).

4. C-Ha-ras p21에 대한 면역조직화학적 소견

C-Ha-ras p21 면역조직화학적 염색에 대한 양성반응은 간세포 세포질의 농도에 따라 황갈색이나 암갈색으로 염색되어 확인이 용이하였다. 1주까지의 실험군에서는 몇 개의 간세포에서만 양성 반응을 보였으나 세포변이소와의 일치점은 찾을 수 없었다.

실험 3주부터 양성 반응 간세포들이 증식결절내에서 나타났으나 그 수가 많지 않았고 이러한 양상은 간세

포선종에서도 유사하였다. 반면 간세포암종에서는 전체적으로 강한 염색상을 보였다(Fig. 9).

고 찰

실험적으로 유도된 화학적 발암과정은 일반적으로 기시과정(initiation)과 촉진과정(promotion)을 거쳐 이루어진다^{2,26,27}. 기시과정이란 발암원이 세포 유전자(DNA)의 분자구조를 변화시켜서 암세포군으로 발전할 잠재력을 가진 세포로 형질을 전환시키는 세포내 과정을 말한다. 또 촉진과정은 기시과정에서 전환된 세포의 성장을 자극하거나 그 주위에 있는 정상 세포의 성장을 억제함으로써 결국 형질 전환된 세포만을 증식하게 하는 과정을 말한다. 실험적으로 형질 전환된 세포군을 확인하는 것은 매우 어려운 절차이지만 간의 경우에는 여러가지 발암 모델과 함께 각 단계별로 작용하는 발암원이 잘 알려져 있다. 본 실험에서는 저항성 간세포 모델로 알려진 Solt-Farber 방법을 사용하였다. 즉 DEN 투여에 의하여 변형된 간세포는 AAF 투여 후에도 증식이 억제되지 않고 선택적으로 증식하여 여러 단계의 전암성 병변을 형성하게 되는데 이 병변들의 병리학적, 생화학적 특성을 비교적 쉽게 확인할 수 있다. 부분간절제술은 간세포에 강한 재생 능력을 부여하여 발암촉진제 역할을 함과 동시에 간세포의 성숙을 유도하기 때문에 전암성 병변의 연속적인 시간적 변화의 추이를 연구하기에 용이하다. 이렇게 나타나는 일련의 변화들은 시기와 형태학적 양상에 따라 세포변이소(foci of cellular alteration, enzyme-altered foci), 증식결절(focal hepatocellular hyperplasia, hyperplastic nodule, neoplastic nodule), 간세포선종(hepatocellular adenoma, hyperplastic nodule, neoplastic nodule) 등으로 구분하고 있으며 암종은 이러한 병변에서 이행된다고 추정하고 있을 따름이다^{3,5,6}.

초기 변화인 세포변이소는 H & E 염색표본에서 세포질의 염색상에 따라 5가지 세포 즉 호염기성 세포(basophilic cell), 호산성 세포(eosinophilic cell), 투명세포(clear cell), 공포성 세포(vacuolated cell), 그리고 혼합 세포(mixed cell)로 구분한다. 혼합 세포변이소는 한 종류의 세포가 전체의 80% 이상을 차지하지 못하고 섞여 있는 경우이다. 세포변이소의 종류는 실험기간 및 보고자에 따라 다르지만 실험초기에 호산성 세포변이소가 나타났다가 점차 투명세포로 대체되며 실험기간이 길어질수록 점차 세포질내의 당원질이 감소하고 리보솜이 증가하여 호염기성 세포변이소가 생기는데 이 호염기성 세포로 구성된 병소가 전암성 병변이라고 강조된 바 있다²⁸. 그러나 Solt 등⁶은 초기 변화에서 주로 호염기성 세포변이소가 많이 나타났다가 점점 진행하여 후기 증식결절을 이룰 때 주된 구성세포는 호산성 세포라고 하였는데 이는 본

연구결과와 일치하고 있다. 즉 실험 제2일(G2)째부터 나타나기 시작하는 세포변이소는 모두 호염기성 세포로 구성되어 있었고, 실험 제7일(G5)까지 계속 그 크기와 수가 증가하였으며(Table 1) 이들이 증식결절이나 간세포선종으로 변환되면서 호산성 세포나 투명세포로 대체되었다.

본 실험에서 제2주(G6) 후부터 관찰된 증식결절은 Maronpot 등⁵이 처음 제안한 명칭으로서 이전에 Squire와 Levitt³, 그리고 ILAR⁴가 제안한 종양성 결절(neoplastic nodule)에 해당한다. 그러나 Maronpot 등⁵은 다음과 같은 두 가지 이유 때문에 종양성 결절이라는 용어의 부당성을 주장하였다. 첫째 이유는 종양성결절이라 함은 일반적으로 원발성 간세포종양으로 생각하는데 실제로 이때 나타나는 종양성결절의 대부분은 발암제 투여 중지로 소실된다는 점이고, 둘째는 종양성결절이라는 명칭은 진성 종양과 비종양성 병변 모두를 포함한다는 점이다. 따라서 본 연구에서는 종양성결절을 증식결절과 간세포선종으로 구별하였으며 간세포선종은 세포변이소, 간세포암종과 함께 종양을 일으키는 일련의 변화를 의미하고 증식결절은 간의 변성에 의해 이차적으로 나타나는 비종양성 변화의 의미도 함께 갖는 병변으로 정의하였다. 증식결절과 선종은 병변을 구성하는 세포간의 이형성 정도 그리고 주변 정상 간세포와 병변과의 관계 등 두 가지 점으로 감별할 수 있다. 즉 선종은 좀 더 크기가 크고, 피막이 병변 전체를 둘러싸며, 주변 간세포를 압박하는 소견과 세포 이형성의 정도가 증가하는 경우이다²⁹.

본 실험에서는 위의 개개 병변에서 암종으로의 이행을 입증하기 위하여 기시과정에서 형질 전환된 세포를 객관적으로 인지하고 이들의 증식양상을 관찰하였으며 BrdU를 이용한 조직면역화학적 염색법으로 검정하였다. BrdU에 의한 세포 역동학적 연구는 1982년 Gratzner에 의해 개발되었다²⁰. 활발히 성장하는 배양세포를 BrdU에 5분동안 노출시키면 약 55%가 양성으로 표지되는데 그중 약 절반은 heterochromatin과 interchromatin의 경계부위에 표지되며 30%는 interchromatin에 그리고 나머지 20%는 heterochromatin에 염색되므로 초기 합성기에서는 interchromatin domain에서 single replication unit의 활성화로 나타나고 중기 합성기에서는 interchromatin과 heterochromatin에서 복제가 일어나는 일련의 과정을 밟을 것으로 추측되고 있다²⁰.

BrdU 방법으로 표지된 세포와 ³H-thymidine으로 표지된 세포의 수치가 일치한다는 사실은 인체의 암종³¹과 실험적 종양²¹ 두가지 모두에서 이미 증명된 바 있다. 즉 BrdU로 염색되는 세포의 대부분이 ³H-thymidine에 의하여 양성으로 염색되며 BrdU와 ³H-thymidine을 각각 합입시켜 두개의 표지계수를 비교하면 거의 일치하고 있다. 더욱이 BrdU 방법은 ³H-thymidine법에 비하여 장점이 많다. 즉 동위원소

를 사용하지 않기 때문에 사용에 제약이 없으며, 실험 기간이 짧고 또 ^3H -thymidine법과는 달리 동일한 부위에서 현미경적 소견과 면역조직화학적 염색결과를 동시에 관찰할 수 있다는 점 등을 들 수 있다. 이러한 이유 때문에 본 연구에서는 BrdU 방법을 사용하였다. 더구나 광학 현미경만으로 확인하기 어려운 실험 초기의 전암성 병변인 세포변이소의 증식분획을 조사하기 위해서는 세포변이소의 정확한 부위부터 선결되어야 한다. 이를 위하여 저자들은 전암성 병변의 표지자인 GSTP와 함께 BrdU의 이중면역화학 염색법을 시도하였던 것이며 지금까지 이 방법을 이용하여 전암성 병변으로서의 세포변이소를 추적 연구한 바가 없다. 그 이유로는 BrdU를 포함한 이중면역 염색을 성공시키기 위하여 우선 여러가지 까다로운 실험조건을 맞추어야 하기 때문인 것으로 생각된다. 즉 BrdU의 검출을 위해서는 강산 처리에 의해 이중나선구조의 DNA를 단일 DNA로 변성시켜야 하는 반면 GSTP는 강산에 견디어 내지 못하며, DAB 발색제를 사용한 후에는 BrdU가 검출되지 않는 점 및 니켈, 코발트의 중금속 함유 발색제는 강산 처리를 하면 탈색되는 점 등이 이중면역화학 염색법을 대단히 어렵게 하고 있다³²⁾. 따라서 본 실험에서는 먼저 GSTP를 chloronaphthol로 발색하고 강산으로 처리한 후 BrdU를 DAB로 발색하여 만족할만한 결과를 얻을 수 있었으며, 이러한 방법은 간세포암종의 발생뿐 아니라 다른 발암 연구에도 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

원래의 간세포는 안정세포로서 정상 상태에서는 대단히 낮은 표지계수(0.1% 이하)를 보이며, 대부분의 세포 증식은 문맥 부위 근간세포(stem cell)에서 일어나서 중심정맥으로 서서히 이동한다고 한다. 본 실험에서 변이소의 표지계수는 수술 전에는 1%에 불과하였으나 수술 후 제 1일부터 급격히 상승하였다. DEN 투여로 기시화된 간세포가 AAF 투여와 간절제술 후 급격히 성장하는 이유로는 ① 선택적 억제, ② 선택적 자극, ③ 선택적 회복의 세가지 기전이 제안되어 있으나³³⁾ 이중 어느 한 가지 기전만으로는 설명이 어렵고 GSTP 양성 세포와 음성 세포의 상호 작용에 의하리라 추측된다. 이 실험에서 세포변이소(GSTP 양성)와 주변 간조직의 BrdU 표지계수의 비율 "선택계수"라고 표현하여, 변이소내의 간세포가 주변의 간세포에 비해 얼마나 선택적으로 증식하는가를 나타내려고 시도하였는데(Table 2 & 3), 실험군에서는 수술 후 제 1일부터 제 7일 사이에 2배에서 7배에 이르는 선택적 증식이 관찰되었으나 이들은 이후 감소하였다(2주; 1.2배, 3주; 1.6배) 4주부터 다시 서서히 증가하여 암 발생이 관찰되었던 32주와 64주에서는 각각 11.1배와 12.6배로 GSTP 양성 부위(암종 이외의 부위)에서 아주 많은 증식이 관찰되었다. 이러한 소견은 GSTP 양성 부위의 세포가 주변 간조직에 비해 1.2~12.6배 빨리 증식함을 시사하고 있으며 실험 초기에는 주변의

간조직이 AAF에 의해 증식이 선택적으로 억제되는 반면 GSTP 양성 부위의 간세포는 선택적으로 증식이 일어난 것으로 해석된다. 본 실험에서 한가지 특이한 것은 실험 증기 즉 세포변이소에서 증식결절이나 선종이 형성되는 시기에 오랜 기간 동안 표지계수와 선택계수 모두가 현저한 감소를 보인 점이다. 이러한 현상은 Farber²⁾가 제시한 암발생의 단계별 발생과정 중 "slow growth of persistent nodule"의 단계에 해당하는 것이라고 생각하였다. Farber는 발암제에 의하여 기시과정과 선택적 증식의 두 과정을 거쳐 증식된 간세포들이 초기결절(early nodule) 형성 단계를 지나 지속결절(persistent nodule)을 형성하고 이들이 자라서 결절내 결절성 병변(nodule in nodule), 더 나아가 암이 발생한다고 주장하였다. 지속결절의 시기에는 결절의 성장속도가 매우 느리다고 하였는데 본 실험에서 역시 이 시기에 매우 낮은 표지계수와 선택계수가 나타나서 지속성 결절의 성장에 잘 부합된다. 이러한 선택계수의 측정은 Solt-Farber 모델에서 발암제의 선택적 증식 또는 선택적 억제 현상을 비교할 수 있는 척도가 될 수 있을 것으로 생각되며, 다른 발암 연구에도 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

앞에 기술한 세포변이소-선종-암종의 연속적 발암과정에 대한 가설에 대해서는 많은 사람들이 인정하고 있으며 이와 같은 상황 증거에 대해서도 많은 지원보고들이 있지만 아직까지 확실하게 연속성이 입증된 바가 없다. 따라서 그 해답을 얻기 위하여 최근에는 종양유전자에 관한 연구가 활발하다. 실험적으로 유도된 간암이나 간암세포주에서 Ha-ras, Ki-ras 그리고 c-myc의 발현 증가가 나타난다고 한다. 특히 ras 유전자의 증가는 간의 비종양성 부위에서도 관찰되고³⁴⁾, 또 간재생시 일시적으로 증가하기도 한다³⁵⁾. Makino 등³⁶⁾은 간암 유발실험시 발암제 투여 후 며칠내에 ras 유전자의 증가가 나타난다고 하였다. 그러나 이 종양유전자 발현 증가가 발암과 관계된 것인지 아니면 세포증식이 증가된 상태에서 나타나는 단순한 변화인지에 대하여는 확실하게 밝혀진 바 없다. Yaswen 등³⁷⁾의 간암 유발실험에 의하면 난원세포에는 c-Ki-ras와 c-myc의 발현이 실험기간 내내 증가한 반면 간세포에서는 발암제 투여 후 2~4주 동안에만 일시적으로 발현 증가를 나타내었다고 한다. Galand 등³⁸⁾은 DEN 투여로 유도된 간세포암종과 증식결절, 그리고 세포변이소 모두에서 c-Ha-ras 발현이 강하게 증가됨을 보고하면서 이러한 소견은 Ha-ras 발현 증가가 발암과정의 초기단계에 나타나는 변화라고 주장하였다. 그러나 현 단계에서 Ha-ras 발현이 증가된 세포가 곧 암세포라고 할 수는 없고 단지 암세포로 전환될 가능성이 많은 세포라고 하였다. 본 연구에서는 이와 대조적으로 Ha-ras 발현이 간세포암종에서만 미만성으로 관찰되고 전암단계에서는 초점성으로 관찰되는 점으로 미루어 ras 유전자의 발현이 간암 발생의 말기에 일어

나는 변화임을 시사하고 있다.

본 실험에서는 간암발생 초기에 나타나는 GSTP와 말기에 관여하는 ras 단백질의 발현을 시기적으로 관찰하였다. 그러므로 이들의 변화를 경시적으로 추적한다면 실험적 간암발생을 형태학적 변화뿐 아니라 분자생물학적 측면에서도 보다 더 정확하게 관련 해석 할 수 있으리라고 생각된다.

결 론

Solt-Farber 방법을 이용하여 Sprague-Dawley 계 흰쥐에게 간의 각종 전암성 병변과 간세포암종을 유발시키고 이들에 대하여 H & E 염색, GSTP-BrdU 이중면역조직화학적 염색, c-Ha-ras p21 단백질 염색을 시행하여 시간의 경과에 따라 각각의 병변을 관찰하였다.

1) 실험 초기(간절제술 후 1~7일)에 나타나는 세포변이소는 거의 모두 호염기성 세포변이소이었으며, 시간이 경과할수록 호산성 세포로 구성된 결절이 증가하였고 간절제술 후 8주부터 간세포선종이 발생하였다.

2) GSTP 양성 발현부위는 실험초기의 세포변이소와 일치하여 나타났으며 상대면적 변화는 수술 후 지수적 증가를 보였다.

3) GSTP-BrdU 이중면역 염색한 결과 GSTP 양성부위에서 수술직후부터 표지계수가 계속 증가하였으나 GSTP 음성인 주변 간세포에서는 대조군의 표지계수와 비슷하였다. 이상의 소견으로 보아 AAF를 투여하지 않은 경우에는 세포변이소 내의 세포와 주변 정상 간세포 사이에 선택적 증식이나 선택적 억제 나타내지 않는 것으로 해석되었다.

4) 증식결절과 선종에서는 BrdU 표지계수가 세포변이소에 비하여 매우 낮았으며 이 시기가 장기간 지속되었던 바, 지속성 결절의 완급한 성장단계에 해당한다고 생각되었다.

5) 간세포암종 발생군에서, GSTP 양성인 증식결절과 간세포선종 부위의 BrdU 표지계수는 음성 부위에 비하여 높은 선택계수를 나타내었다. 따라서 간세포암종 발생군에서는 증식결절과 간세포선종에서도 높은 증식능력을 갖는다고 판단되었다.

6) 간세포암종의 높은 BrdU 표지계수는 피막 형성 및 간내전이 유무와 관계가 있었다.

7) C-Ha-ras p21은 실험초기에는 발현하지 않았으나 선종부터 발현하기 시작하여 간세포암종 시기에 강한 양성반응을 보였다. 따라서 c-Ha-ras는 간암 유발의 말기에 나타나는 암유전자라고 생각되었다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 화학적 발암기전에 의하여 생긴 간세포암종은 초기 세포변이소 내에서 발생하고 이것들이 각종 전암성 단계를 거쳐 전환된 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Solt DB, Farber E. *New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. Nature* 1976; 263: 701-3.
- 2) Farber E. *Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: G.H.A. Clowes memorial lecture. Cancer Res* 1984; 44: 5463-74.
- 3) Squire RA, Levitt MH. *Report of a workshop on classification of specific hepatocellular lesions in rats. Cancer Res* 1975; 35: 3214-23.
- 4) Institute of laboratory animal resources. *Introduction to histological typing of liver tumors of the rat. JNCI* 1980; 64: 180-206.
- 5) Maronpot RR, Montgomery CA, Boorman GA, McConnel EE. *National toxicology program nomenclature for hepatoproliferative lesions of rats. Toxicol Pathol* 1986; 14: 263-73.
- 6) 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: 595-609.
- 7) Tsuda H, Hasegawa R, Imaida K, Masui T, Moore MA, Ito N. *Modifying potential of thirty-one chemicals on the short term development of glutamyl transpeptidase positive foci of diethylnitrosamine initiated rat liver. Gann* 1984; 75: 876-83
- 8) Soto K, Kitahara A, Satoh K, Ishikawa T, Tatematsu M, Ito N. *The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. Gann* 1984; 75: 199-202.
- 9) Soma Y, Satoh K, Sato K. *Purification and subunit-structural and immunological characterization of five glutathione S-transferases in human liver, and the acidic form as a hepatic tumor maker. Biochim Biophys Acta* 1986; 869: 247-58.
- 10) Rushmore TH, Farber E. *Identification of a characteristic cytosolic polypeptide of rat preneoplastic hepatocyte nodules as placental glutathione S-transferase. Biochim Biophys Res Commun* 1987; 143: 98-103.
- 11) Tatematsu M, Tsuda H, Shirai T, Masui T, Ito N. *Placental glutathione S-transferase(GSTP) as a new marker for hepatocarcinogenesis: In vivo short-term screening for hepatocarcinogens. Toxicol Pathol* 1987; 15: 60-8.
- 12) Sato K. *Glutathione S-transferase and hepatocarcinogenesis. Jpn J Cancer Res(Gann)* 1988; 79: 556-72.
- 13) Bradley G, Sharma R, Rajalakshmi S, Ling V. *P-glycoprotein expression during tumor progression in the rat liver. Cancer Res* 1992; 52: 5154-6.

- 14) Shimizu K, Goldfarb M, Saurd Y, Perucho M, Li Y, Komata T, Feramisco J, Stavnezer E, Fogh J, Wigler MH. *Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. Biochemistry* 1983; 80: 2112-6.
- 15) Slamon DJ, Dekernion JB, Verma IM, Cline MJ. *Expression of cellular oncogenes in human malignancies. Science* 1984; 224: 256-62.
- 16) Hunter T, Sefton BM. *Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 1311-5.
- 17) Sukumar S, Notario V, Martin-Zanca D, Barbacid M. *Induction of mammary carcinoma in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. Nature* 1983; 306: 658-61.
- 18) Tatematsu M, Aoki T, Kagawa M, Mera Y, Ito N. *Reciprocal relationship between development of glutathione S transferase positive liver foci and proliferation of surrounding hepatocytes in rats. Carcinogenesis* 1988; 9: 221-5.
- 19) Gratzner HG, Pollack A, Ingram DJ, Leif RC. *Deoxyribonucleic acid replication in single cells and chromosomes by immunologic techniques. J Histochem Cytochem* 1976; 24: 34-9.
- 20) Gratzner HG. *Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. Science* 1982; 218: 474-6.
- 21) Lanier TL, Berger EK, Eacho PI. *Comparison of 5-bromo-2-deoxyuridine and ³H thymidine for studies of hepatocellular proliferation in rodents. Carcinogenesis* 1989; 10: 1314-43.
- 22) Higgins GM, Anderson RM. *Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch Pathol* 1932; 12: 186-202.
- 23) Kim WH, Kim YI, Kim CW, Chang MS. *In vitro bromodeoxyuridine labeling method of human carcinoma under various conditions. Seoul J Med* 1991; 32: 1-7.
- 24) Lee HK, Kim YI. *Promoting effect of Aflatoxin B1 and D-galactosamine on development of glutathione S-transferase positive foci in diethylnitrosamine-initiated rat liver. Korean J Pathol* 1994; 28: 389-98.
- 25) Going JJ. *How should Bromodeoxyuridine labeling be counted. Am J Clin Pathol* 1990; 96: 435-6.
- 26) Farber E. *The sequential analysis of liver cancer induction. Biochim Biophys Acta* 1980; 605: 149-66.
- 27) Pitot HC, Sirica AE. *The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. Biochim Biophys Acta* 1980; 605: 191-215.
- 28) Bannasch P. *Sequential cellular changes during chemical carcinogenesis. J Cancer Res Clin Oncol* 1984; 108: 11-22.
- 29) Eustis SL, Boorman GA, Harada T. *Liver: Pathology of the Fischer Rat. Academic Press, California* 1990; 72-94.
- 30) Mazzotti G, Rizzoli R, Galanzi A, Para S, Vitale M, Falconi M, Neri LM, Zini N, Maraldi NM. *High resolution detection of newly synthesized DNA by antibromodeoxyuridine antibodies identifies specific chromatin domains. J Histochem Cytochem* 1990; 38: 13-22.
- 31) Meyer JS, Coplin MD. *Thymidine labeling index, flow cytometric S-phase measurement and DNA index in human tumors. Am J Clin Pathol* 1988; 89: 586-95.
- 32) Tanaka Y, Mak KM, Lieber CS. *Immunohistochemical detection of proliferating lipocytes in regenerating rat liver. J Pathol* 1990; 160: 129-34.
- 33) Tatematsu M, Ho RH, Kaku T, Ekem JK, Farber E. *Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy. Am J Pathol* 1984; 114: 418-30.
- 34) Fausto N, Shank PR. *Oncogene expression in liver regeneration and hepatocarcinogenesis. Hepatology* 1983; 3: 1016-23.
- 35) Goyette M, Petropoulos CJ, Shank PR, Fausto N. *Expression of a cellular oncogene during liver regeneration. Science* 1983; 219: 510-2.
- 36) Makino R, Hayashi K, Sato S, Sugimura T. *Expression of the c-Ha-ras and c-myc gene in rat liver tumors. Biochem Biophys Res Comm* 1984; 119: 1096-102.
- 37) Yaswen P, Goyette M, Shank PR, Fausto N. *Expression of c-Ki-ras, c-Ha-ras, and c-myc in specific cell types during hepatocarcinogenesis. Mol Cell Biol* 1985; 5: 780-6.
- 38) Galand P, Jacobovitz D, Alexandre K. *Immunohistochemical detection of c-Ha-ras oncogene p21 product in preneoplastic and neoplastic lesions during hepatocarcinogenesis in rats. Int J Cancer* 1988; 41: 155-61.