대한병리학회지 1995; 29: 727~739

N-nitrosomorpholine으로 유발된 백서의 간암에서 암유전자단백(p53, Pan-ras, C-erbB-2)과 세포증식 항원(PCNA)에 대한 면역조직화학적 연구

이화여자대학교 의과대학 병리학교실

김 옥 경 · 신 현 주

Immunohistochemical Study of the Expression of p53, Pan-ras, c-erbB-2 and PCNA in N-Nitrosomorpholine(NNM)-Induced Hepatocellular Carcinoma of Rats

Ok Kyung Kim, M.D. and **Hyun Ju Shin,** M.D.

Department of Pathology, Ewha Woman's University College of Medicine

The focus of this study was to analyze the morphologic expression of p53, Pan-ras, c-erbB-2, and PCNA in preneoplastic and neoplastic liver lesions induced with NNM of rats. The development of hepatocellular tumors was investigated by histology and electron microscope in 65 Splague-Dawley rats administered with NNM in drinking water at low dose(5 mg/100 ml) and high dose(20 mg/100 ml). Three types of hepatocytic degeneration, glycogenotic, eosinophilic and basophilic changes were followed by the appearance of hepatocellullar carcinoma. Hepatocellular carcinoma was increased in number and size according to NNM dosage and to duration of exposure.

The histological classifications of hepatocellular carcinoma were trabecular type, which was the most common, large eosinophilic, small cell, adenocarcinomatous and clear cell type. The expression of p53, Pan-ras, c-erbB-2, PCNA was examined by immunohistochemical stains.

Eosinophilic degeneration revealed mild positivity at 18~26 weeks for expression of all oncogenic proteins studied and PCNA, whereas precancerous lesions showed variable expression from negative to moderate positivity on PCNA. Hepatocellular carcinoma lesions showed strong positivity for all stains and increased intensity during experimental period. These may indicate that chemical carcinogen produce hepatic eosinophilic degeneration and precancerous lesions by genetic mutation, resulting in hepatocellular carcinoma. **(Korean J Pathol 1995; 29: 727~739)**

Key Words: Hepatocellular carcinoma, Eosinophilic degeneration, Precancerous

접 수 : 1995년 1월 18일, 게재승인 : 1995년 6월 17일
주 소 : 서울시 종로구 종로 6가 72, 우편번호 110-752
이화여자대학교 의과대학 병리학교실, 김옥경

서 론

최근 종양세포에서 암유전자(oncogene)를 확인하는 많은 연구가 진행되어 종양의 진단 및 예후판정에 도움이 되고 있다. p53유전자는 정상에서 종양억제유전인자로 존재하지만 돌연변이를 일으킨 특수형의 복합구조로 작용하게 되면 암유발인자로 작용이 가능하며, 돌연변이로 형성된 단백질을 면역조직화학적방법으로 검출해 낼 수가 있다. p53암유전자단백은 유방암세포에서 핵내에 강하게 양성반응을 보인다[1,2].

Pan-ras유전자는 Ha-ras, Ki-ras 및 myc 유전인자를 합하여 칭하며 특히 Ha-ras와 Ki-ras는 생쥐에 발생시킨 간종양세포에서 활성을 보인다고[3] 했으며 ras-p21암유전자단백은 인체에 발생한 간암의 65%에서 양성을 보인다고[4] 보고한 바 있다.

c-erbB-2유전자는 종양유발단백으로 종양세포막에 주로 염색되며 인체에서 대장 및 직장암종[5], 위암종[6]의 진단과 예후를 판정하는데 쓰이고 있다. 세포증식항원(PCNA)은 세포증식의 표식자로 증식과정의합성기 세포뿐 아니라 모든 증식기에서 찾을 수 있는 단백으로 특히 종양의 예후판정에 좋은 지침이 된다[7].

발암성 화학물질인 N-nitrosomorpholine(이하 NNM으로 약함)을 실험동물인 백서의 식수에 타서 장기간(36주) 투여하여 간종양 발생까지의 형태학적 연구를 하고, 변성과정, 전암병소 및 암병소에서 면역조직화학적방법으로 암유전자단백(p53, Pan-ras, c-erbB-2)과 세포증식항원(PCNA)의 발현현상을 관찰함으로써 암발생과정을 확인하고 암의 조기발견 및 진단에 도움이 되고자 본 실험을 시도하였다.

연구재료 및 방법

1. 연구재료

실험동물은 체중 150 g 내외의 백서 65마리를 실험전 일주일 동안 삼양식품고형압축사료로 사육하여 환경에 적응시킨 후 다음과 같이 세 군으로 분류하여 실험하였다.

제 1 군 정상대조군 13마리
제 2 군 NNM 소량투여군 (5 mg/100 ml) 26마리
제 3 군 NNM 대량투여군 (20 mg/100 ml) 26마리

정상대조군(제 1 군)은 생리식염수를 식수로 먹였으며 12주까지 관찰한 뒤 매 2주마다 1마리씩 회생시켰다. NNM투여군은 1 g(1000 mg)이 들어있는 시약용기에 100 ml의 증류수를 넣어 용액을 만든 뒤 이를 다시 희석하여 제 2 군은 5 mg/100 ml로 제 3 군은 20 mg/100 ml로 만들어 식수로 섭취하게 하였으며 실험 12주까지 관찰한 뒤 36주까지 매 2주마다 각각 2마리씩 회생하였다.

간의 전암병소와 암병소에서 조직을 채취하여 연구에 사용하였다. 실험에 사용한 NNM은 Sigma chemical compound, No883 IsoPAC of N7382(pfc), U.S.A.에서 제조한 연구용 시약을 사용하였다.

2. 연구방법

1) 간조직의 육안적 관찰: 각 군에서 12주부터 시작하여 매 2주마다 채취한 간의 색깔과 종양의 수 및 크기를 관찰하여 각각 비교하였다.

2) 광학현미경적 관찰: 회생 즉시 간조직을 왼쪽 간엽의 중간부나 혹은 병소가 생긴 부위에서 적출하여 10% 중성 포르말린에 고정시켰다. 고정시킨 간실질의 중앙부에서 2×1 cm 크기로 조직을 얻어 파라핀에 포매한 후 6 μm 두께로 절편하여 조직표본을 만들고 hematoxylin & eosin(H & E)염색을 시행하였다. H & E염색 소견상, 간조직의 세포변성의 정도에 따라 음성(-), 경도(+), 중등도(++) 및 고도(+++)의 등급으로 분류하였다.

3) 전자현미경적 관찰: 미세구조의 변화는 12주부터 희생된 백서 간실질을 왼쪽 간엽의 중앙부나 병소에서 1~3 mm 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde 용액에 고정시켰다. 일차 고정한 조직을 4℃에서 1% OsO_4 in phosphate buffer(PH 7.4)용액에 두시간 재고정한 후 무수알콜로 탈수하고 epon 812에 포매하여 유리칼로 400~500 Å 두께의 세편을 만들어 uranyl acetate 및 lead citrate로 염색한 후 Hitachi 600형 전자현미경으로 관찰하였다.

4) 암유전자단백(p53, Pan-ras, c-erbB-2)과 세포증식항원(PCNA)을 위한 면역 조직화학적 검색: 항원으로 p53(Dako Co.)은 1:80, Pan-ras(Oncogene Science)은 1 : 200, c-erbB-2(Zymed)는 1 : 10, PCNA(Novocastra)는 1 : 100으로 양성대조군을 정하여 희석하여 사용하였다. 제 3 군의 파라핀 포매괴에서 4 μm 두께로 절편하여 Xylene으로 파라핀을 제거하고 알콜에 함수시킨 후 내인성 peroxidase의 활성화를 억제시키기 위하여 3% H_2O_2에 10분간 처리하여 Tris완충용액에 3분씩 3회 세척하였다. 그후 blocking serum을 10분간 작용시키고 혈청을 털어내 일차항체로 60분간 부치시키고 Tris 완충용액으로 세척한 후 Biotin이 결합된 이차항체를 30분간 부치시켰다. 완

충액으로 세척한 후 streptavidine peroxidase를 30분간 도포하고 3.3'-diaminobenzidine(DAB)과 H_2O_2를 3~5분간 반응시켜 물로 세척한 뒤 Meyer Hematoxylin으로 대조 염색하고 crystal mount로 봉입하였다. 염색결과의 판정은 광학현미경으로 관찰하여 반응의 강도에 관계없이 양성인 세포수를 백분율로 환산하였다.

연 구 성 적

1. NNM투여후 육안적 소견

NNM 투여후 발생한 종양의 빈도를 보면 제 1 군에서는 종양이 발생하지 않았으며, 제 2 군에서는 32주, 34주, 36주에 종양이 발생하여 26마리 중 4마리

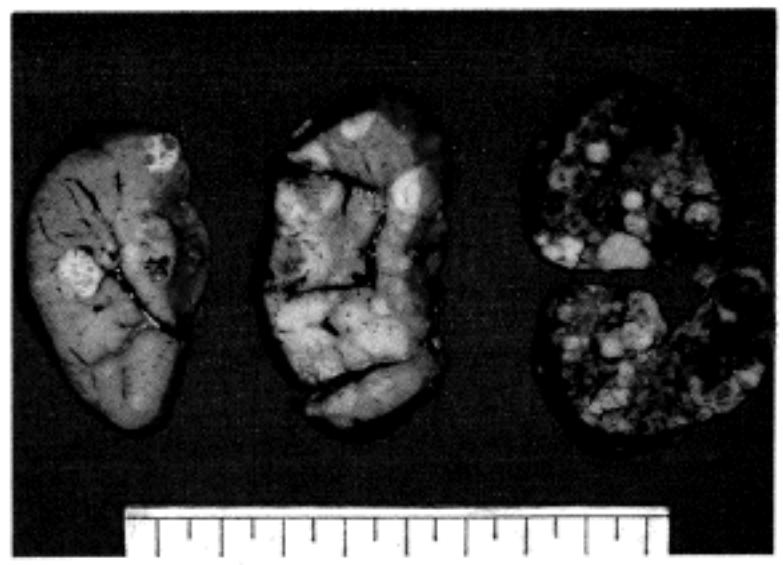

Fig. 1. Increasing number and size of tumor with time, formaline fixed tissue.

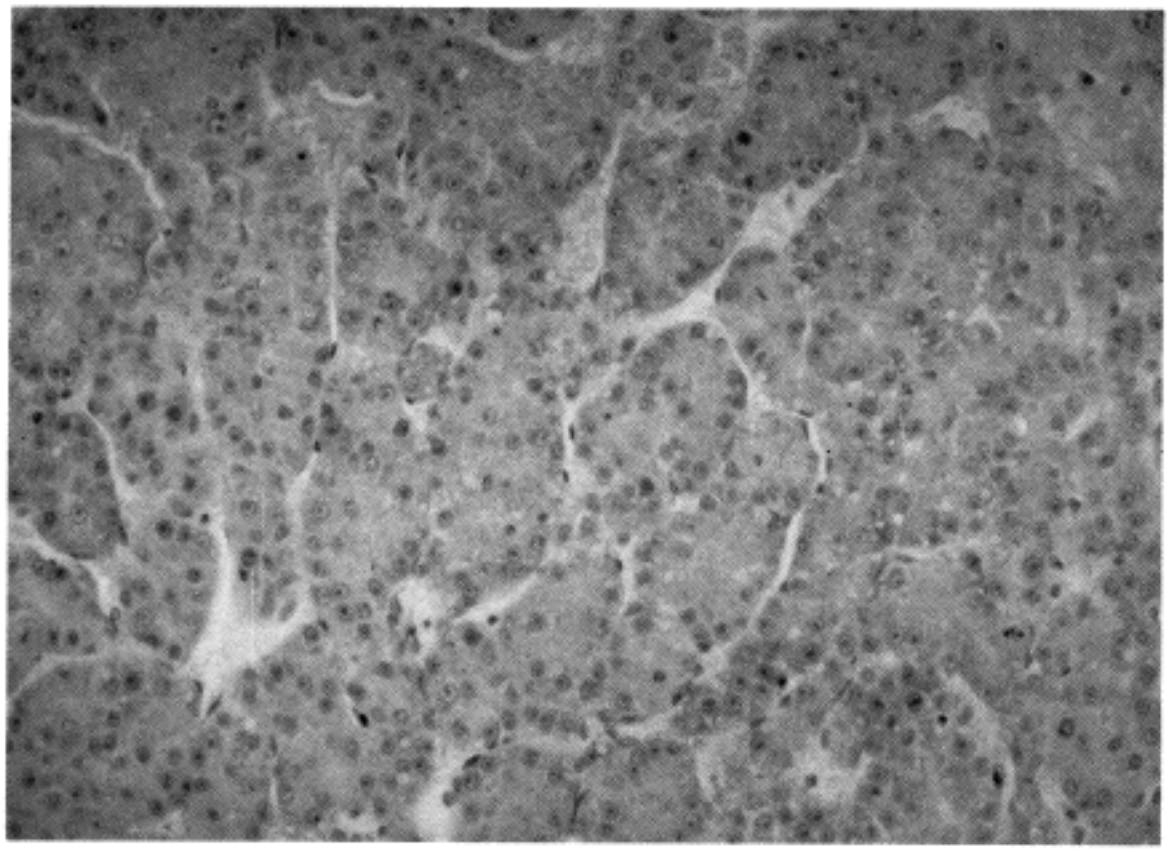

Fig. 2. Trabecular type of hepatocellular carcinoma, group III 26th wks(H & E, ×200).

Table 1. Tumor incindence of liver in NNM treated rats

Group \ Wks	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	No of tumor Total	%
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/13	0
II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	4/26	15.4
III with lung meta.	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	5/26	19.2

Note: I; control, II; rats administered with NNM at 5 mg/100 ml, III; rats administered with NNM at 20 mg/100 ml, meta; metastasis

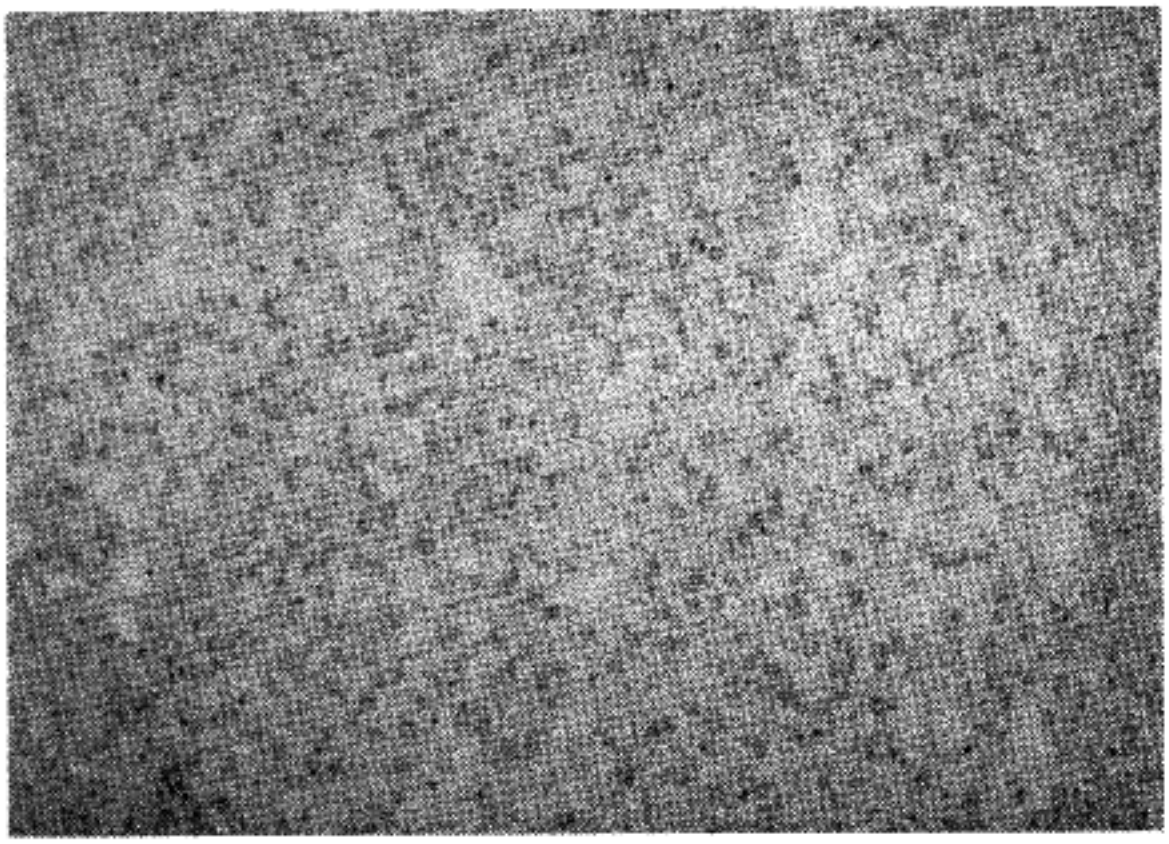

Fig. 3. Clear cell type of hepatocellular carcinoma, group III 20th wks(H & E, ×200).

Fig. 4. Small cell type of hepatocellular carcinoma, group III 24th wks(H & E, ×100).

에서 15.4%의 발생율을 보였고 제 3 군에서는 26마리중 24마리가 발생하여 92.3%의 발생율을 보였다. 제 3군에서는 14주부터 종양의 수와 크기가 증가됨을 보였고 24주에는 종양이 전엽에 퍼지고 간실질의 50%이상을 점유하였다. 또 제 3 군에서 26마리중 5마리에서(19.2%) 폐에 전이된 결절들을 보였다 (Table 1, Fig. 1~3).

2. 광학 현미경적 소견

종양발생 이전의 간실질은 간소엽의 형태를 어느 정도 유지하면서 간세포의 당원성 변성, 호산구성 변성 및 호염기성 변성을 보였다. 병소는 국소적이며 다발적이었고 서로 인접하고는 있으나 서로 섬이지는 않았다. 당원성 변성과 호산구성 변성은 제 2군과 제 3 군에서 12주에 고도 및 중등도 관찰되고 시간이 경과함에 따라 감소되어 음성으로 보였다.

Table 2. Light microscopic findings of liver in NNM treated rats

Groups(wks)		Hepatocyte			Portal triad			Carcinoma		
		Glyco-genotic	Eosino-philic	Baso-philic	Infla-mmation	Fibro-sis	Cystic proliferation	Hepato-cellular	Cholan-gio	Meta-stasis
I	12	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	36	−	−	−	−	−	−	−	−	−
II	12	++	++	−	±	−	−	−	−	−
	14	++	++	−	−	−	±	−	−	−
	16	++	++	−	−	−	−	−	−	−
	18	+	+	+	−	−	−	−	−	−
	20	+	+	+	−	+	±	−	−	−
	22	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	24	±	+	+	−	+	+	−	−	−
	26	+	−	+	+	+	+	−	−	−
	28	±	−	+	−	−	−	−	−	−
	30	−	±	+	−	−	−	−	−	−
	32	−	+	+	−	−	−	+	−	−
	34	−	−	+	−	−	−	++	−	−
	36	−	−	+	−	−	−	++	−	−
III	12	+++	++	+	+	−	−	−	−	−
	14	+++	+++	+	+	+	+	+	−	−
	16	++	++	+	++	+	+	+	−	+
	18	+	+	++	+	+	+	++	+	+
	20	+	+	++	++	++	+	+++	−	−
	22	+	+	+++	+	++	++	+++	−	−
	24	+	+	+++	+	++	++	+++	−	+
	26	±	+	−	+	+++	++	+++	+	−
	28	±	+	++	+	++	++	+++	−	+
	30	−	−	+++	+	++	+	+++	−	+
	32	−	±	++	+	++	++	+++	−	−
	34	−	−	++	+	++	++	+++	−	−
	36	−	−	++	+	+++	++	+++	−	−

Note: −; negative, ±; trace, +; mild, ++; moderate, +++; severe

호염기성 변성은 제 2군의 20주부터 경도로 보이기 시작하였으며 제 3 군은 18주부터 점차 증가하여 고도로 보였으며 염증반응, 섬유증식 및 담관의 증식상은 제 2 군보다는 제 3 군에서 좀더 증가된 양상으로 실험기간이 길어지면서 경도에서 고도의 변화를 보였다.

간세포암종(hepatocellular carcinoma)병소는 제 2 군에서는 32주에 보이기 시작하였으며 제 3 군에서는 14주부터 관찰되어 18주에는 중등도의 암 점유를 나타냈다. 담관에서 기원한 담관암종(cholangiocarci-

Table 3. Classification of carcinoma in NNM treated rats

Histologic type	Number in tumors(%)
Hepatocellular carcinoma	26(92.9)
Trabecular type	16(61.5)
Large eosinophilic type	5(19.2)
Clear cell type	2(7.7)
Small cell type	2(7.7)
Adenocarcinomatous type	1(3.9)
Cholangiocarcinoma	2(7.1)
Total	28(100.0)

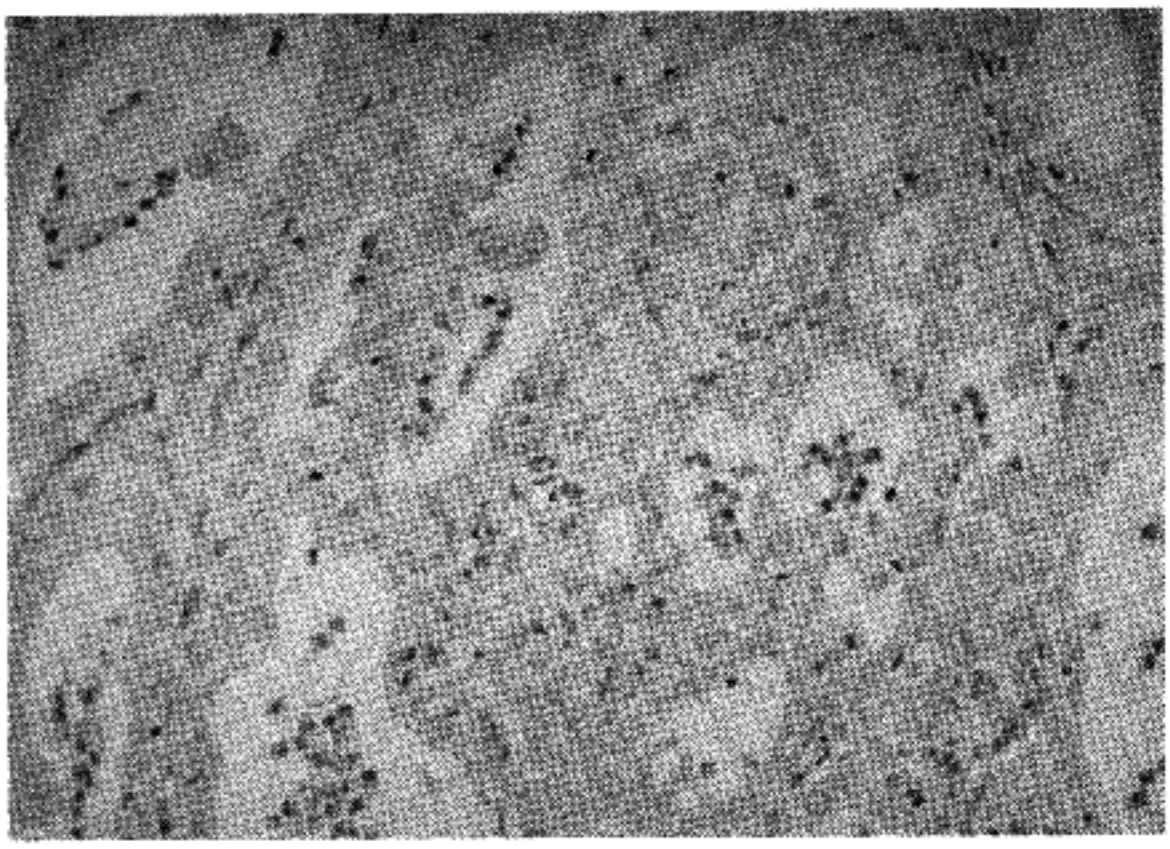

Fig. 5. Adenocarcinomatous type of hepatocellular carcinoma, group III 28th wks(H & E, ×200).

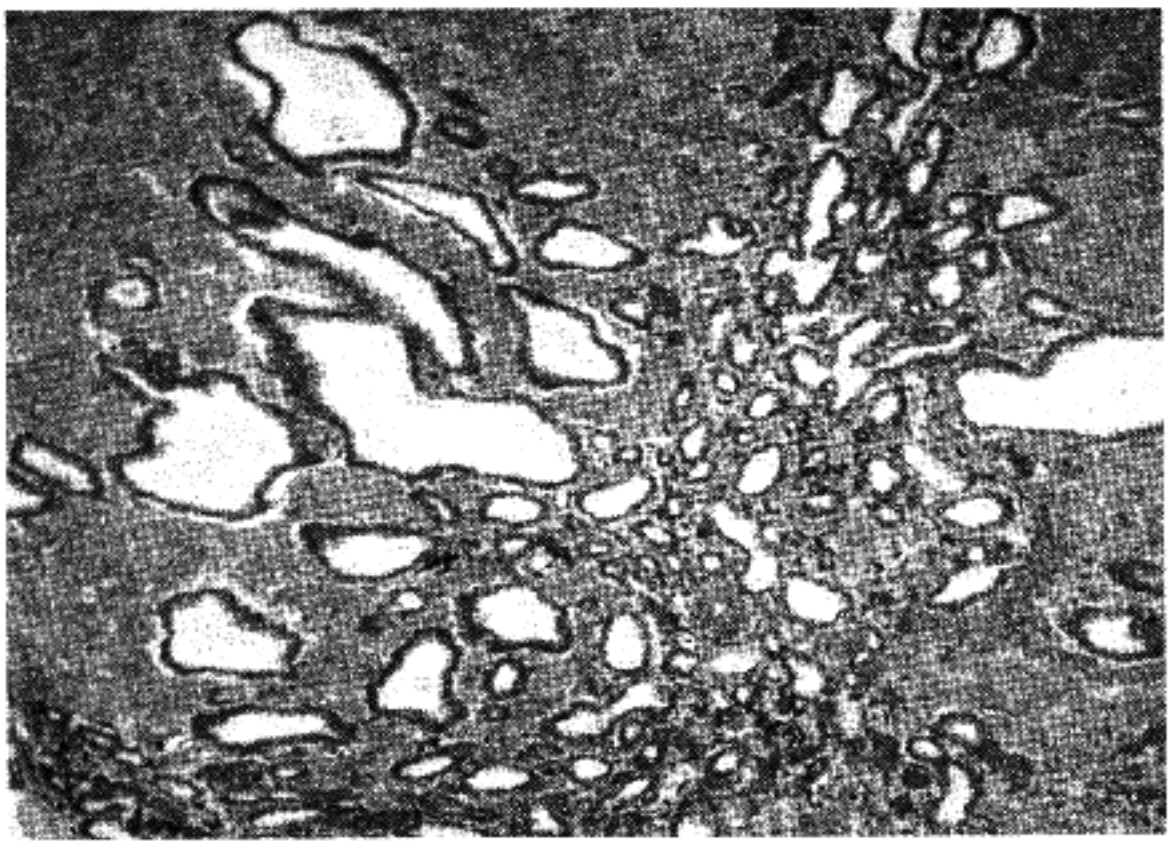

Fig. 6. Cholangiocarcinoma, group III 26th wks(H & E, ×100).

noma)은 제 3 군의 18주와 26주에서 보였으며 비교적 드물게 관찰되었다. 폐의 전이병소는 제 3 군의 16주, 18주, 24주, 28주, 30주에 발생하여 제 3 군의 19.2%에서 전이를 나타냈다(Table 2).

발생된 간암종은 같은 동물에서도 여러형태를 보여 조직학적 분류는 지배적인 형으로 구분하였다. 간세포암종이 26마리(92.9%)였으며 이중 trabecular type 16(61.5%), large eosinophilic type 5(19.2%), clear cell type과 small cell type이 각각 2(7.7%), adenocarcinomatous type 1(3.9%)었으며 담도에서 발생한 담관암종은 2마리(7.1%)였다(Table 3, Fig. 2~6).

3. 전자현미경적 소견

정상 간세포에서는 비슷한 크기의 미토콘드리아가 다수 있었으며 그 사이로 조면세포질내 세망(rough endoplasmic reticulum)이 보였다. 가끔 지질변성과 당원과립이 손제히였다.

간세포의 당원성, 호산구성 및 호염기성 세포등이

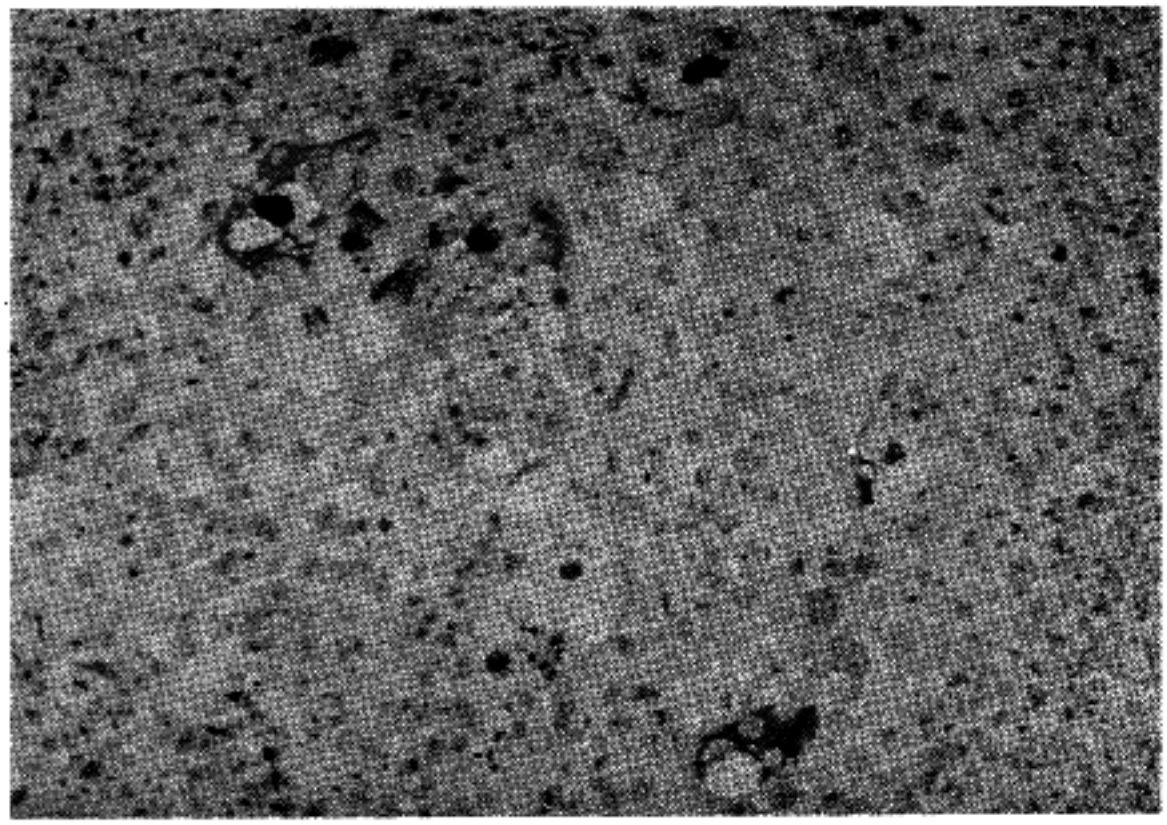

Fig. 7. C-erbB-2, cosinophilic hepatocytes(weak positive), group III 18th wks(×100).

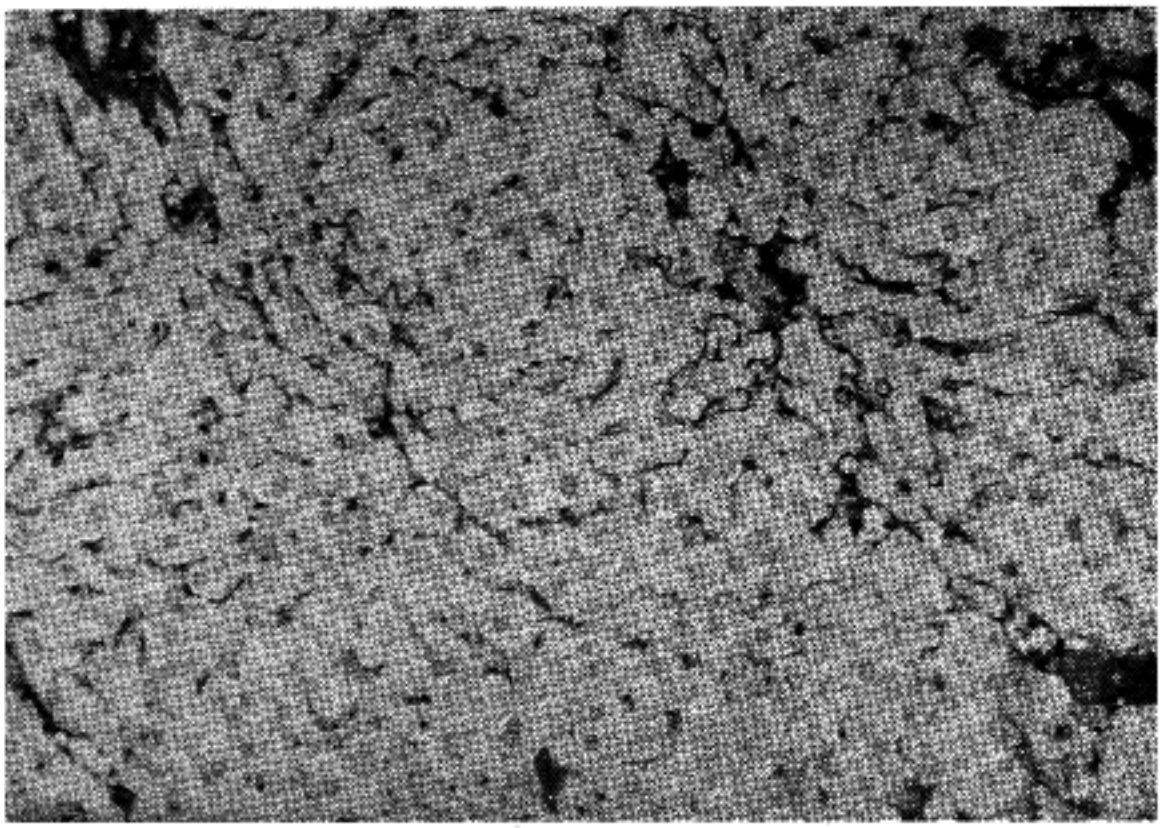

Fig. 8. C-erbB-2, hepatocellular carcinoma(strong positive), group III 26th wks(×100).

크기의 차이는 있으나 핵과 핵소체의 크기는 많이 커져 있지 않았으며 세포질내 소기관은 정상과 유사하였으며 다만 축적 물질의 양이 달랐다.

전암상태라고 볼수 있는 검전에서는 핵이 정상보다 커지면서 핵소체도 부정형으로 변화되며 세포질내 공포형성이 한층 심해져서 낭심변성과 괴사성 과편들이 관찰되었다. 간암부위에서는 핵과 핵소체의 크기가 비정상이며 염색체의 응집이 심하며 세포질내 미토콘드리아의 수는 감소되고 RER도 적어지며 공포와 당원로젯트(glycogen rosette)가 가끔 관찰되었고 지질소(lipofuscin)와 자식공포(autophasic vacuoles)등도 관찰되었다.

4. 암유전자단백과 세포증식항원의 면역조직화학적 소견

제3군의 병소를 당원성 변소, 호산구성 병소, 전암병소 및 암병소로 구분하여 면역조직화학적검색을 하였다. 전암병소는 주로 호염기성의 작은 세포

Table 4. Positive reaction of immunostainings for p53

Wks	Glycogenotic area(%)	Eosinophilic area(%)	Precancerous area(%)	Cancerous area(%)
14	0	<1	5	5
	0	3	ND	0
18	ND	2	<1	0
	0	10	5	10
22	0	30	ND	10
	0	5	0	5
26	0	25	ND	50
	0	30	0	20
30	ND	ND	0	ND
	ND	ND	0	ND

Note: ND; not done

Table 5. Positive reaction of immunostainings for pan-ras

Wks	Glycogenotic area(%)	Eosinophilic area(%)	Precancerous area(%)	Cancerous area(%)
14	0	<1	ND	<1
	ND	5	0	5
18	0	3	0	<1
	0	2	0	10
22	0	30	0	10
	0	2	0	2
26	0	5	0	50
	0	20	0	80
30	ND	ND	0	60
	ND	ND	0	30

Table 6. Positive reaction of immunostainings for c-erb-2

Wks	Glycogenotic area(%)	Eosinophilic area(%)	Precancerous area(%)	Cancerous area(%)
14	0	<1	0	<1
	0	2	0	2
18	0	<1	ND	0
	0	3	0	0
22	0	20	0	<1
	0	2	0	5
26	0	10	5	70
	0	30	2	50
30	ND	ND	0	30
	ND	ND	0	40

Table 7. Positive reaction of immunostainings for PCNA

Wks	Glycogenotic area(%)	Eosinophilic area(%)	Precancerous area(%)	Cancerous area(%)
14	0	<1	30	80
	0	5	ND	90
18	1	10	40	100
	0	10	0	70
22	0	10	0	80
	0	15	ND	90
26	0	10	10	10
	0	20	0	70
30	ND	ND	0	80
	ND	ND	0	30

로 구성되어 있으며 주위조직과 경계가 분명하고 간경변이 동반되는 수도 있으나 혈관침입이 없는 경우로 하였다.

1) p53의 양성반응 소견: p53은 핵과 세포질내 염색상을 보였으며 당원성 변성은 p53이 검출되지 않았으며 호산구성 결절에서는 실험이 길어질수록 양성이 경도로 증가됨을 관찰하였다. 전암결절에서는 14주와 18주에 약하게 보였으나, 22주, 26주, 30주는 음성으로 일정치 않은 p53염색상을 보였다. 간암종은 초기에 5~10%, 후기에 20~50%의 양성을 보였다(Table 4).

2) Pan-ras의 양성반응 소견: Pan-ras는 세포질내 과립상으로 양성을 보이는데 당원성 변성에서는 음성으로 호산구성 변성에서 실험초기에 1~5%, 후기에 20~30%의 양성을 보였다. 전암결절은 음성으로 관찰되었고, 간암종은 초기에 1~5%로 양성을 보였으며 후기에 80%까지 양성이 증가되었다(Table 5).

3) c-erbB-2의 양성반응 소견: c-erbB-2는 주로 종양세포막에 침착하여 양성을 보였는데 호산구성 병소가 초기는 1~3% 미만에서 양성을 보이다가 후기는 20~30%까지 양성을 보였다. 전암병소는 26주를 제외하고 음성으로 관찰되었고 간암종은 후기에 70%까지 양성이 증가되었다(Table 6)

4) PCNA의 양성반응 소견: PCNA는 주로 핵내에서 염색상을 보였는데 호산구성 병소는 초기에 1%

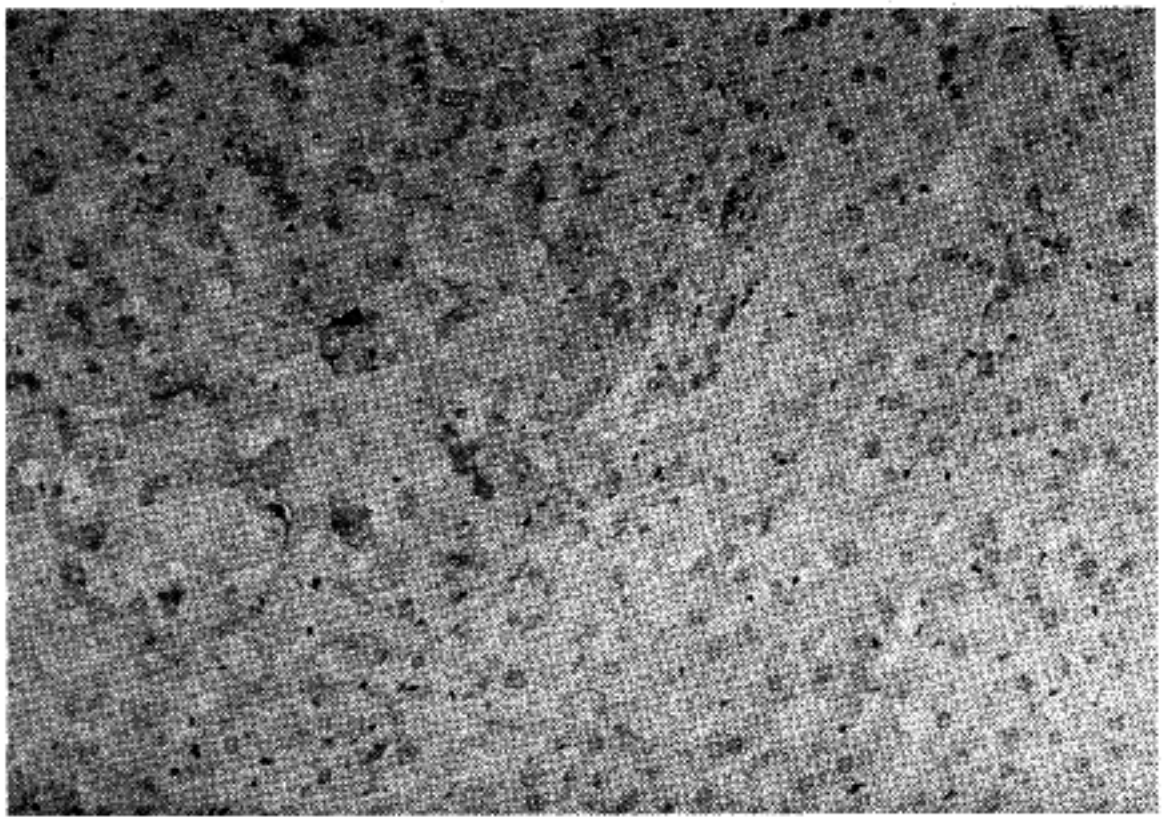

Fig. 9. PCNA, eosinophilic hepatocytes (moderate positive), group III 22th wks(×200).

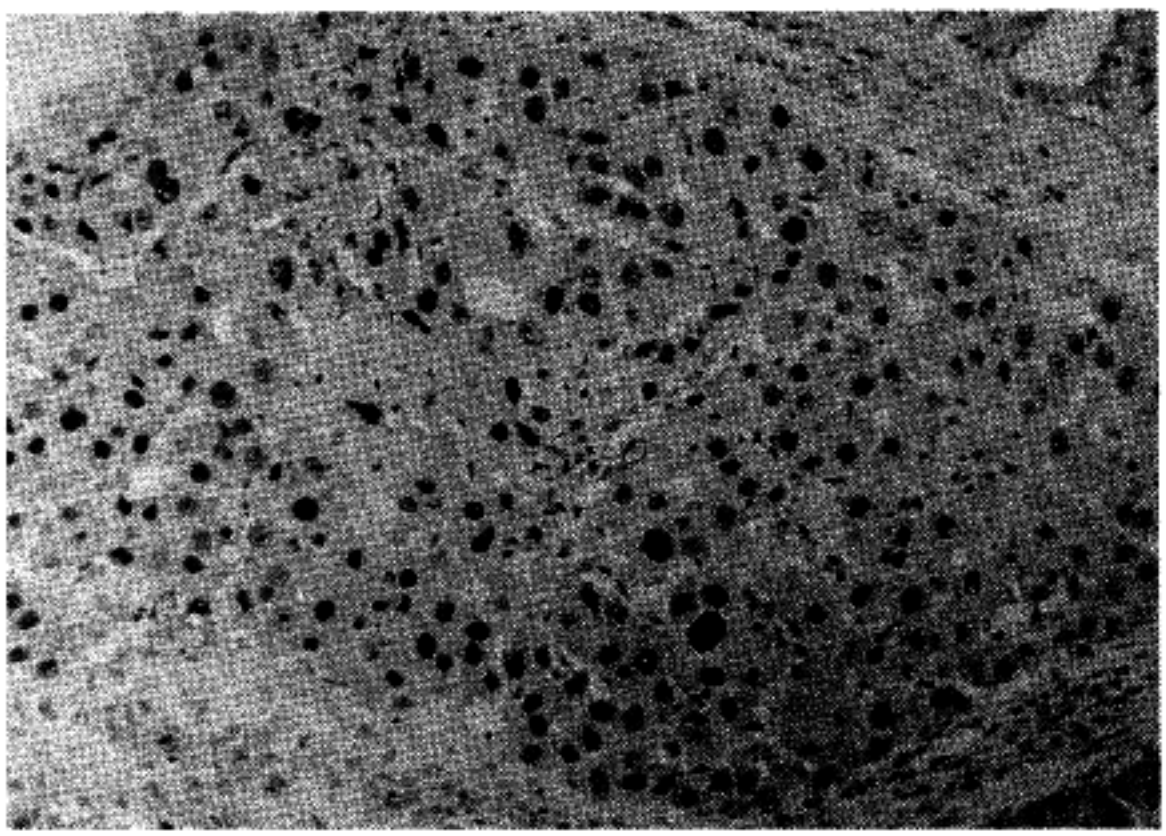

Fig. 10. PCNA, hepatocellular carcinoma(strong positive), group III 26th wks(×200).

미만에서, 후기에 20%까지 양성을 보였고 전암결절은 30~40%까지 중등도의 양성을 보이기도 하였다. 간암종에서는 초기부터 80~90%의 강한 양성을 보이면서 후기에서도 같은 정도의 강한 반응을 보였다(Table 7, Fig. 9, 10)

5) 간암종의 병리조직학적 분류에 따른 소견: 간세포암종의 trabecular type은 PCNA 90%, Pan-ras 15% 및 p53와 c-erbB-2는 음성이었다. large eosinophilic type은 Pan-ras가 70%로 가장 강한 발현을 보였고, PCNA 20%, p53와 c-erbB-2는 각각 15%의 양성으로 관찰되었다. small cell type은 PCNA는 90%, Pan-ras와 c-erbB-2는 각각 40%, p53은 20%에서 양성이었다. clear cell type과 adenocarcinomatous type은 음성이었고 담관암종은 PCNA만 60%로 양성을 보였다(Table 8).

고 찰

p53암유전자단백은 simian virus 40으로 유발시킨

Table 8. Positivity of immunostainings according to histologic type of carcinoma

Histologic type \ Oncogene	p53(%)	Pan-ras(%)	c-erbB-2(%)	PCNA(%)
Hepatocellular carcinoa				
Trabecular type	0	15	0	90
Large cosinophilic type	15	70	15	20
Small cell type	20	40	40	90
Clear cell type	0	0	0	0
Adenocarcinomatous type	0	0	0	0
Cholangl\iocarcinoma	0	0	0	60

인간의 종양세포를 동물에 주사하여 얻어진 항혈청에서 분리해낸 핵내의 단백질이다[8,9]. p53유전자인자 자체는 종양억제유전인자이며 p53암유전자단백을 내어 세포의 주기를 조절하며 이 유전인자는 17번 염색체의단완(band 13)에 위치하고 있다[10]. p53유전자돌연변이는 많은 암에서 볼 수 있는 가장 흔한 유전자돌연변이중 하나라고 보고되었다[11].

돌연변이로 생성된 p53암유전자단백은 정상 혹은 야생형(wild type)의 p53암유전자 단백보다 반감기가 길고 좀더 안정성 있는 단백질이다. 따라서 돌연변이 p53암유전자단백을 면역조직화학적으로 검출할 수 있다고 보고한 바 있다[12,13].

임상적으로 p53암유전자단백의 표현은 침윤성 유방암에서 양성을 보이고[14], Poller등[2]은 조기유방암에서의 양성 반응은 종양내 암세포의 악성도, 괴사정도 및 에스트로젠 수용체의 음성도등과 비례되어 표현된다고 했으며, Barnes등[1]은 p53암유전자단백이 양성인 경우에 예후가 나쁘다고 하였다.

간암에서 p53유전자는 구조이상으로 점상 돌연변이와 핵질의 결손을 보였다고 했으며[15], Puisieux등[16]은 인체에서 p53의 돌연변이가 일어나면 p53의 비활성화로 암이 유발되다고 보고하였다.

본 실험에서 p53가 간세포의 호산구성 변성결절에 세포의 핵 뿐아니라 세포질내에 경도의 염색을 나타내는 것은 인체와는 다른 염색상이며 이는 암유전자단백의 시약이 백서에서는 인체와 다른 생화학적 표현을 나타내는 것으로 추정된다. 전암결절에서는 대체로 음성으로 보였고 간암결절에서는 강한 양성을 보였다.

Pan-ras는 Ha-ras, Ki-ras 및 myc 유전자를 합하여 칭하며 자연발생적으로 30%에서 간종양이 발생하고 화학물질로 60%에서 쉽게 간암이 유발되는 숫생쥐(hybrid B6CFI)에서 검색된 Ha-ras, Ki-ras 및 myc는 돌연변이를 일으켜 활성화되면 암을 유발한다고 하였다[17,18].

Takeuchi등(1990)에 의하면 ras유전자의 산물인 ras p21이 간암과 간경화에서는 양성이며 만성간염과 정상 조직에는 음성으로 관찰되며 ras p21이 간세포의 악성전환에 큰 역활을 할 뿐아니라 간암세포의 분화도와도 밀접한 관계가 있음을 시사하였다.

Voravud등[19]이 담관암에서 조사한 결과, p62 c-myc, p21 c-ras 및 p190 c-erbB-2가 표현되고 정상에서는 c-myc와 c-ras가 태아 18주에서 생후 5년까지만 표현되고 c-erbB-2는 생후에는 전혀 발현되지 않기 때문에, 이 세 유전인자는 종양표식자로 사용할 수 있다고 하였다.

Sinha등[20]은 aflatoxin으로 유발된 백서의 간암중에서 N-ras는 3예, Ki-ras는 1예, Ha-ras는 변형된 간세포에서 활성을 보인다고 하였다. 본 실험에서 Pan-ras는 세포질내 과립상으로 양성을 보였는데 당원성 변성결절은 음성으로 보였고, 호산구성 변성결절은 실험초기에 1~5%, 실험 후기에는 20~30%가 양성을 보였다. 전암결절에서는 음성으로 관찰되었다. 간암결절은 초기에 1~5%의 양성이었으나 후기에 80%까지 양성이 증가하였으며, large eosinophilic type에서 강하게 양성이고 small cell type과 trabecular type에서도 경도 및 중등도로 양성이었다.

c-erbB-2 암유전자는 protein kinase를 활성화시키며 염색체 7번에 위치하여 분자량 185KD의 당단백을 생성하며[21], 여러장기의 선암종에서 발현된다[22,23]. 특히 유방암종에서는 유방암 환자의 30%에서 양성을 보이며 예후가 나쁜 환자에서 발현이 증가되며 특히 림프절 전이를 일으킨 암에서 양성율이 높다고 한다[24,25].

그외 위암종 및 난소암종과 대장 및 직장암종에서 c-erbB-2의 증폭정도와 예후사이에 관련성이 있

으며 예후인자로 사용할 수 있다고 하였다[5,6,26,27].

간세포암과 담관암에서의 c-erbB-2암유전자 표현에 관한 보고로, 간암에서는 8%, 담관암과 간모세포종은 0%를 보인다고 하며 c-erbB-2의 강한표현은 간암과 담관암에서 악성도를 표현하는 것은 아니라고 하였다[28]. 그러나 Brunt 및 Swanson[29]은 c-erbB-2가 간세포와 담도상피증식에 표식자가 될 수 있다고 하며, 간암과 담관암에서 국소적으로 암세포막에 양성으로 보이기도 하며 간모세포종, 혼합담관간세포암종, 담관선종, 간세포선종에서는 음성으로 관찰되었다고 하였다. 특히 c-erbB-2가 원발성 응괴성담관염에서 악성 이행을 알아내는데 유용한 종양표식자가 될 수 있다고 하였다.

본 실험에서는 c-erbB-2는 종양세포막에 양성을 보였는데 이는 c-erbB-2 암유전자가 epidermal growth factor receptor(EGFR)와 구조적으로 유사한 transmembrane receptor라는 주장과 일치한다[30]. 호산구성 변성결절은 초기에 1% 미만에서 양성으로 보였고 후기에 20~30%까지 양성이 증가하였다. 전암병소는 음성이며 간세포암에서는 후기에 70%까지 양성율이 증가하였다.

세포증식항원(Proliferating cell nuclear antigen; PCNA)은 DNA polymerase-delta의 보조효소로 36KD의 분자량을 갖는[7,31] nonhistone nuclear antigen이며 이 단백의 상승은 DNA 합성후 후기G1에서 출현을 시작하며 합성기에 최대치가 되어 그후 감소한다[32].

세포증식표식자인 Ki67에 비해 포르말린에 고정시킨 파라핀포매조직에서도 검출이 가능하다는 장점이 있다[7].

Garcia등[33]에 의하면 종괴형성시 PCNA 양성율이 유세포측정기에 의한 합성기 세포분획보다 높은 수치를 나타낸다고 한다.

본 실험에서는 PCNA는 호산구성 변성결절은 초기에 1% 미만에서 후기에 20% 경도의 양성을 보였고 전암결절은 30~40%의 중등도의 양성을 보였다. 간암결절은 초기부터 후기까지 강한 양성반응을 보였고, 담관암도 60%의 양성율을 보였다.

본 실험에서 NNM 투여후 간세포의 당원성 변성은 점차 소실되고 호산구성 변성은 일부가 지속적으로 남아 large eosinophilic type의 간세포암으로 이행되는 것으로 생각되었다. 호염기성 변성은 점차 전암병소를 이루며 small cell type이나 trabecular type의 간암으로 진행되는 것으로 보였으며 이것은 김등[34]과 Cortinovis등[35]의 결과와 일치하였다.

면역조직화학검사와 세포증식 항원 염색상의 결과를 종합하면 간세포 변성중 호산구성 변성이 모든 암유전자 단백에 18~26주에 경도로 관찰됨은 음성으로 나온 당원성 변성보다 암유전자 단백의 표현이 많았다. 전암병소는 주로 small cell type으로 구성된 결절이였으며 암유전자 단백이 음성 및 경한 양성의 다양한 염색상이 관찰되었으나 PCNA는 중등도로 표현되어 변성보다 강하였다. 간암에서는 모든 암유전자 단백에서 초기의 경도부터 후반의 고도로 표현된 반면 PCNA는 초반부터 고도의 강한 암유전자 단백과 PCNA를 함유하고 있음이 확인되었다.

전암결절에서 결과의 다양성은 세포형이 다양한 것에 기인한 것으로 생각되고 특히 호산성형은 전암상태와 암을 구별하기가 어려웠으며 small cell type만 쉽게 구별이 가능했던 이유일 것으로 사료된다.

따라서 chemical carcinogen이 간세포염색체에 돌연변이등의 변화를 일으켜 호산성 변성을 초래하고 이는 더욱 증식을 유발하여 전암병소를 이루고 다음 단계로 간세포암을 유발하는 단계적 변화를 확인할 수 있었다.

결 론

N-nitrosomorpholine 투여로 발생한 백서 간의 간세포 변화과정을 관찰하고 간암의 발생과정과 발생양상을 육안적, 광학현미경적 및 전자현미경적으로 관찰한 뒤, 전암병소와 간암 병소를 대상으로 암유전자단백인 p53, Pan-ras 및 c-erbB-2와 세포증식항원인 PCNA를 면역조직화학적방법으로 검색하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1) 간세포의 초기변화는 호산구성과 당원성 변성이었고, 후기로 가면서 호염기성 변성이 증가하였다. 간암종은 제 2 군에서 15.4%, 제 3 군에서 92.3% 발생하였고 실험기간이 길어짐에 따라 수와 크기가 증가하였다. 전자현미경상, 간세포의 변성과정에서는 핵과 핵소체의 크기가 증가하며 미토콘드리아는 수의 감소와 동반하여 다양한 형태로 변화되었다. 간세포암에서는 이들 변화가 더욱 현저하여 정상과는 다른 역형성(anaplastic)세포로 되었다.

2) p53 의 경우, 호산구성(eosinophilic)결절은 초기부터 후기까지 1~30%의 양성을 보였다. 간암종결절에서의 발현은 실험기간이 길어질수록 양성반응이 증가하였다.

3) Pan-ras의 경우, 당원성(glycogenotic) 결절은 음성으로 보였고 호산구성결절은 초기에 1~5%, 후기에 20~30%로 양성이 증가되었다. 전암결절은 음성

으로 보였고 간암종결절은 실험초기에 1~5%로 관찰되다가 후기에 60~80%로 관찰되었다.

4) c-erbB-2의 경우, 주로 종양세포막에 양성을 보였는데 호산구성결절이 초기에 1~3% 미만에서, 후기에 30%까지 양성을 보였으며, 간암은 초기에 1~2%, 후기에 70%까지 양성을 보였다.

5) PCNA의 경우, 주로 핵내에서 염색상을 보였는데 호산성 변성에서 초기에 1%미만에서 후기에 20%까지 양성을 보였고 전암결절은 초기부터 후기까지 30~40%의 양성을 보였다. 간암은 초기부터 80~90%의 강한 양성을 보였다.

6) 간세포암의 병리조직학적 분류에 따른 암유전자의 발현을 보면 trabecular type 에서 PCNA는 90%로 가장 높은 양성을 보였으며 Pan-ras 15%, p53과 c-erbB-2는 음성이었다. large eosinophilic type은 Pan-ras 가 70%로 가장 강한 발현을 보였고 PCNA 20%, p53 및 c-erbB-2는 15%의 양성으로 관찰되었다. small cell type은 PCNA는 90%, Pan-ras와 c-erbB-2는 각각 40%, p53은 20%에서 양성이었다. clear cell type과 adenocarcinomatoustype은 음성으로 나타났고 담관암(cholangio-carcinoma)은 PCNA만 60%로 양성을 보였다.

면역조직화학검사와 세포증식 항원 염색상의 결과를 종합하면 간세포 변성중 호산구성 변성이 모든 암유전자 단백에 18~26주에 경도로 관찰된은 음성으로 나온당원성 변성보다 암유전자 단백의 표현이 많았다. 전암병소는 주로 small cell type으로 구성된 결절이였으며 암유전자 단백이 음성 및 경한 양성의 다양한 염색상이 관찰되었으나 PCNA는 중등도로 표현되어 변성보다 강하였다. 간암에서는 모든 암유전자 단백에서 초기의 경도부터 후반의 고도로 표현된 반면 PCNA는 초반부터 고도의 강한 양성으로 표현되어 변성이나 전암결절보다 많은 암유전자 단백과 PCNA를 함유하고 있음이 확인되었다.

참 고 문 헌

1. Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ, Levison DA, Millis RR. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma. Hum Pathol 1993; 24: 469-476.
2. Poller DN, Roberts EC, Bell JA, Elston CW, Ellis IO. p53 protein expression in mammary ductal carcinoma in situ. Hum Pathol 1993; 24: 463-468.
3. Vorce RL, Goodman JI. Altered methylation of ras oncogenes in Benzidine-induced B6C3F1 mouse liver tumors. Toxical Appl Pharmacol 1989; 100: 398-410.
4. Takeuchi T, Kagawa K, Hikia H, Tada H, Deguchi T, Okanoue T, Kashima K, Yonemura Y, Ueda K, Ashihara T. The expression of ras p21 product in hepatocellular cacinoma. Nippon Shokakibyo Gakkai Jasshi 1990; 87: 1686-1691.
5. 김 완, 최 홍란, 이지신, 박종태, 박창수, 조규현. 대장 및 직장암종의 c-erbB-2암유전자 발현과 예후에 관한 연구. 대한병리학회지 1993; 27: 217-215.
6. Bae CD, Park SE, Seong YS, Park JT, Cho KH. The mechanism of c-erbB-2 gene product increase in stomach cancer cell lines. J Korean Medical Science 1993; 8: 153-159.
7. 이지신, 박종태, 정상우, 최홍란, 조규혁. 실험적으로 유발한 악성 섬유성 조직구종에서의 DNA ploidy와 세포증식능에 관한 연구. 대한병리학회지 1993; 27: 205-216.
8. Lane DP, Cawford LV. T-antigen is bound to a host protein in SV-40 transformed cells. Nature 1979; 278: 261-263.
9. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. Cell 1979; 17: 43-52.
10. Isobe M, Emanuel BS, Givol D. Localization of gene for human p53 tumor antigen to band 17p13. Nature 1986; 320: 84-85.
11. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B. p53 mutations in human cancers. Science 1991; 253: 49-53.
12. Iggo R, Gatter K, Bartek J. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. Lancet 1990; 335: 675-679.
13. Wynford-Thomas D. p53 in tumor pathology: Can we trust immuno-cytochemistry. J Pathol 1990; 166: 329-330.
14. Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B. Patterns of expression of p53 tumor suppressor in human breast tissue and tumor in situ and in vitro. Int J Cancer 1990; 46: 839-844.
15. Murakami Y, Hayashi K, Hirohashi S, Sekiya T. Aberration of the tumor supressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas. Cancer Res 1991; 51: 5520-5525.
16. Puisieux A, Ponchel F, Ozturk M. p53 as a growth suppressor gene in HBV-related hepatocellular carcinoma cells. Oncogene 1993; 8: 487-490.
17. Vorce RL, Goodman JI. Diffrential DNase I hypersensitivity of ras oncogenes in B6C3F1, C3H/He, and C57BL/6 mouse liver. J Toxicol Environ Health 1991;

34: 385-395.
18. Vorce RL, Goodman JI. Hypomethylation of ras oncogenes in chemically induced and spontaneous B6C3F1 mouse liver tumors. J Toxical Environ Health 1991; 34: 367-384.
19. Voravud N, Foster CS, Gilbertson JA, Sikora K, Waxman J. Oncogene expression in cholangiocarcinoma and in normal hepatic development. Hum Pathol 1989; 20: 1163-1168.
20. Sinha S, Webber C, Marshall CJ, Knowles MA, Proctor A, Barrass NC, Neals GE, Bassendine MF. Activation of ras oncogene in aflatoxin-induced rat liver carinogenesis. Proc Natl Acad Sci 1988; 85: 3673-3677.
21. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Green MI, Weinberg RA. The neu oncogene; an erb-B-related gene encoding a 185,000 Mr tumor antigen. Nature 1984; 312: 513-516.
22. Tal M, Wetzler M, Josefberg Z, Deutch A, Gutman M, Assaf D, Kris R, Shiloh Y, Givol D, Schlessinger J. Sporadic amplification of the HER-2/neu protooncogene in adenocarcinoma of various tissues. Cancer Res 1988; 48: 1517-1520.
23. McCann A, Dervan PA, Gullick WJ, Carney DN. c-erbB-2 oncoprotein expression in primary human tumors. Cancer 1990; 65: 88-92.
24. Slamon DJ, Clark GM, Wang SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987; 235: 177-182.
25. Berger MS, Locher GW, SaurerS, Gullick WJ, Waterfield MD, Groner B, Hynes NE. Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. Cancer Res 1988; 48: 1238-1243.
26. Berchuk A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper JT, Dodge R, Clarke-pearson DL, Marks P, Mckenzie S, Yin S, Bast RC. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. Cancer Res 1990; 50: 4087-4091.
27. Yonemura Y, Ninomiya I, Yamaguchi A, Fushida S, Kimura H, Ohoyama S, Miyazaki I, Endou Y, Tanaka M, Sasaki T. Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. Cancer Res 1991; 51: 1034-1038.
28. Collier JD, Guo K, Mathew J, May FE, Bennett MK, Corbett IP, Bassendine MF, Burt AD. c-erbB-2 oncogene expression in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. J Hepatol 1992; 14: 377-380.
29. Brunt EM, Swanson PE. Immunoreactivity for c-erbB-2 oncopeptide in benign and malignant diseases of the liver. Am J Clin Pathol 1992; 97: Ps53-61.
30. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, MCGranth J, Seeburg PH, Liberman TA, Schlessinger J, Francke U, Tyrosin kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. Science 1985; 230: 1132-1139.
31. Takasaki Y, Deng JS, Tan EM. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast formation, Its distribution in synchronized cells. J Exp Med 1981; 154: 1899-1909.
32. Morris GF, Matthews MB. Regulation of proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S-phase. Proc Natl Acad Sci 1989; 88: 13586-13864.
33. Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. Am J Pathol 1989; 134: 733-739.
34. 김옥경. N-nitrosomorpholine 투여로 백서간에 발생한 전암병소 및 간암의 형태변화에 관한 연구. 이화의대지 1993; 16: 191-204.
35. Cortinovis C, Klimek F, Nogueira E, Rat hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosodiethylamine and N-nitrosomorpholine administered at low doses. Am J Path 1991; 139: 1157-1171.