

실험적으로 유발된 흰쥐 유방의 종양 형성 과정에서 형태학적 변화에 따른 세포증식능 및 Apoptosis와의 관계

동국대학교 의과대학 병리학교실, ¹연세대학교 의과대학 병리학교실

장 태 정 · 정 우 희¹ · 이 광 길¹

The Relation between Cell Proliferation and Apoptosis According to the Histologic Types in Chemically Induced Rat Mammary Tumorigenesis

Tae Jung Jang, Woo Hee Jung¹, and Kwang Gil Lee¹

Department of Pathology, Dongguk University College of Medicine, Kyungju 780-714, Korea

¹Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul Korea

Balancing the rates of cell proliferation and cell death is important in maintaining normal tissue homeostasis. The relationship among apoptosis, cell proliferation and factors influencing apoptosis according to the histologic types in chemically induced mammary tumorigenesis appears important in understanding the pathogenesis of breast carcinoma. In this study, we investigated alterations in the kinetics of cell proliferation and apoptosis during rat mammary tumorigenesis induced by 7, 12-dimethylbenzanthracene (DMBA) and we related these changes to the expressions of bcl-2, p53, and TGF- β . Seven-week-old female Sprague-Dawley rats were divided into an experimental group (20 mg/ml DMBA by oral intubation) and a control group. The results were as follows. 1. In the experimental group, breast tumors occurred in twenty two of fifty nine rats (37.3%, 22/59) and the total number of tumors was 100 (4.5 ± 2.0 /rat). The histological classification was infiltrating ductal carcinomas (n=5), ductal carcinomas with focal invasion (n=10), intraductal carcinomas (n=36), adenomas accompanied with intraductal proliferation (n=35), intraductal proliferation (n=9), and adenomas (n=5); 2. The differentiation of terminal end bud into alveolar bud (AB) in the experimental group was significantly lower than that of the control group ($p < 0.05$); 3. BrdU labeled tumor cells were mainly located at the peripheral portion of tumor cell nests. BrdU labeling indices were highest in ductal carcinomas, less pronounced in intraductal proliferation, and lowest in adenomas, whereas apoptosis levels were highest in adenomas, less pronounced in intraductal proliferation, and lowest in ductal carcinomas ($p < 0.05$); 4. p53 protein was not expressed in any breast tumors. Although the expression of bcl-2 protein was highest in infiltrating and focal infiltrative ductal carcinomas (58.3%), compared with adenomas, intraductal proliferation, and intraductal carcinomas ($p < 0.05$), the extent of its expression was less than 1% of all tumor cells; 5. TGF- β was mainly expressed in the central portion of tumor cell nests rather than in peripheral portion, and TGF- β immunoreactive tumor cells displayed good differentiation and did not reveal BrdU immunoreactivity. TGF- β labeling index of infiltrating and focal infiltrative ductal carcinomas was significantly higher than that of intraductal carcinomas, intraductal proliferation, and adenomas ($p < 0.05$). Based on these results, it is thought that high cell proliferation and the suppression of apoptosis are closely associated with DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. However the suppression of apoptosis is not related to p53 mutation, bcl-2, and TGF- β . TGF- β seems to be reversely related to tumor cell proliferation but closely associated with the progression of the tumor, especially an invasion of breast carcinomas. (Korean J Pathol 1998; 32: 174~185)

Key Words: Breast carcinoma, Cell proliferation, Apoptosis, DMBA, TGF- β

접 수: 1997년 11월 13일, 게재승인: 1998년 1월 8일

주 소: 경북 경주시 석장동 707, 우편번호 780-714

동국의대 병리학 교실, 장태정

ISSN: 0379-1149

*이 논문은 1996년도 교육부 학술연구조성비 (기초의학)에 의하여 연구되었음.

서 론

Foote 및 Stewart¹는 유방암종의 주위조직에서 유관상피세포 증식을 관찰하고 이 병변이 전암성 병변이라고 주장하였다. 근자에 전암성 병변에 대한 분자생물학적 연구들은 유방암의 진단이나 치료 및 예후 판단에 많은 도움을 주고 있다. 그러나 이러한 유방암의 전암성 병변은 양이 적고 종종 다른 병리학적 변화와 동반되며 전암성 병변이 암으로 진행하기 까지는 많은 시간이 걸리기 때문에 유방암에 대한 동물모델의 필요성이 대두된다. 흰쥐에 7, 12-dimethylbenzanthracene (DMBA) 투여시 유관내 상피세포 증식증 및 관내암종 그리고 침윤성 관암종은 말단종말아체 (terminal end bud, TEB)와 종말관 (terminal duct, TD)에서 기원하며 낭과 선종은 포상아 (alveolar bud, AB) 및 소엽에서 발생한다고 알려져 있다.² 흰쥐 유방암종의 전암성 병변으로 유관내 상피세포 증식증의 존재가 중요하게 생각되고 있다.^{3,4}

세포의 사멸에는 괴사와 apoptosis가 있다. 정상 조직에서는 세포의 증식과 세포의 사멸 간에 수적 평형이 유지되고 있지만 어떤 원인에 의하든 세포의 증식력이 증가하거나 세포의 사멸이 감소하면 세포의 수가 증가하여 종양을 형성할 수 있다.⁵ 따라서 발암 과정에는 세포의 증식과 성장을 조장하는 유전자, 세포의 성장과 증식을 억제하는 종양억제유전자 또 새로운 범주의 종양유전자로서 apoptosis를 조절하는 유전자들이 관여한다.⁵⁻⁷ 유관 상피세포의 apoptosis의 감소가 섬유낭성 변화 (fibrocystic change)와 연관되어 있고 유방암의 발생 위험을 증가시킨다는 보고,⁸ 항에스트로젠제제를 유방암환자에 투여시 유방종양세포의 apoptosis가 증가한다는 보고,⁹ 항에스트로젠제제인 toremifene을 DMBA로 유발된 흰쥐 유방암에 투여하면 종양세포의 세포분열은 감소되고 testosterone-repressed prostate message-2 (TRPM-2)가 증가하여 apoptosis는 유도되어 유방암의 성장이 억제된다는 보고¹⁰ 등은 유방암종의 발생이나 진행 및 치료반응등에 apoptosis가 연관되어 있음을 암시한다. Apoptosis에 관여하는 유전자들에는 *c-myc*, *bcl-2*, *p53*, *APO-1/fas*, transforming growth factor β (TGF- β), 그리고 TRPM-2등이 있다.¹¹⁻¹⁵

*Bcl-2*는 apoptosis를 억제하여 세포수명을 연장시키는 유전자다.^{5,16} 이런 비정상적인 수명 연장은 종양 발생에 필수적인 여러 가지 유전적 또는 환경적인 영향들을 축적시켜 종양 발생에 기여한다고 생각되고 있다.¹⁷ *bcl-2*는 인체 유방암의 전암병변인 상피세포 증식증에서 거의 대부분 발현되고 유방암의 81.6%에서 발현되며 에스트로젠 수용체에 의존하는 유전자임이 밝혀졌다.¹⁸⁻²² *bcl-2* 단백질의 발현은 유방암종에서 좋은 예후를 나타내는 인자로 여겨진다.¹⁸⁻¹⁹

p53 단백질은 DNA 손상이 있는 세포를 G₁기에서 세포순환을 정지시켜 DNA 수리를 유도하거나 수리가 불가능한 경우에 apoptosis를 일으켜 세포사멸을 야기시키는

것으로 알려져 있다.²³⁻²⁶ *p53* 변이는 인체 유방암의 20~50%에서 발견되고 있는데 유방암의 초기에 발생되어 암종의 전이가 일어나는 말기까지 유지된다는 보고와 이미 진행된 유방암에서 발생된다는 상반된 보고가 있다.²⁶⁻²⁸ 야생형 *p53*은 *bcl-2* 유전자의 활성화를 억제하는 반면 *bax* 유전자를 활성화시킨다.²⁹ 따라서 변이형 *p53*은 이러한 기능을 수행하지 못하므로 DNA가 손상되었더라도 *p53* 변이가 있는 세포는 apoptosis를 일으키지 못한다.

TGF는 De Larco와 Todaro³⁰에 의해서 처음 발견된 polypeptide로서 표피 성장 수용체에 반응하는 TGF- α 와 독특한 수용체에 반응하며 동일 이합체로 구성되어 있는 TGF- β 로 분류된다. TGF- β 의 역할에는 세포외 기질의 형성, 세포외 기질에 세포를 부착, 맥관형성 및 면역억제 효과등이 있으며 세포주기 및 증식에 관해서는 세포의 종류나 실험조건에 따라 다양하게 반응하는데 대체적으로 중배엽 기원의 세포의 증식을 촉진시키는 반면 외배엽 기원의 세포의 증식을 억제시키는 것으로 알려져 있다.³¹⁻³³ 또한 apoptosis와의 관계를 살펴보면 대장선종의 세포주, 자궁경부 세포, 간세포, 쥐 간세포 암종의 전암병변, 또 tamoxifen을 처리한 유방암종에서 관찰되는 apoptosis에 TGF- β 가 관련되어 있다고 한다.³⁴⁻³⁷ TGF- β 가 정상세포 및 암세포의 증식을 억제시키는 효과가 일반적인 현상이지만 맥관형성이나 세포외 기질 형성 및 면역억제 효과를 통하여 암세포의 침윤과 전이를 결정하는 인자로 추정된다는 보고도 있다.³⁸

이러한 사실로 보아 유방암종이 형성되는 과정에서 apoptosis, 세포증식능 그리고 apoptosis에 영향을 주는 인자들이 여러 단계의 형태학적 변화와 어떤 관계가 있는지를 알아봄은 유방암종의 병인론을 이해하는데 중요하다고 생각된다. 이에 저자들은 DMBA를 흰쥐에 투여하여 유방의 증식성 병변을 유발시킨 후 흰쥐의 전암병변이 기원한다고 알려진 TEB와 TD의 변화를 관찰하고 증식성 병변을 선종, 상피내 증식증, 관내암종 및 침윤성 관암종으로 구분한 뒤 이러한 병변에서 종양세포의 증식과 apoptosis를 관찰하여 유방암종의 발생에서 종양세포의 증식과 apoptosis의 역동적인 관계를 규명하고 또 apoptosis를 억제시키는 것으로 알려진 *bcl-2* 단백질 및 변이형 *p53* 단백질의 발현과 외배엽 기원의 세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 조장하는 것으로 알려진 TGF- β 의 발현등을 면역조직화학 염색을 통해서 관찰하여 유방암종의 병인론 및 생물학적 특성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험군

실험동물은 생후 49일된 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐 132마리 (실험군 105마리: 대조군 27마리)로서 이를 1주간 동일조건에서 사육 후 실험중 사망한 쥐를 제외한 86마리를 대상으로 하였다. 실험군을 DMBA 투여 후 4

주에 20마리, 7주에 10마리, 10주에 10마리, 13주에 10마리, 16주에 9마리를 각각 희생시키고 대조군은 실험군과 같은 주에 희생시켰다.

2. 방 법

1) 유방암 유발: 실험동물을 1주간 적응 사육 후 생후 56일째에 DMBA (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) 투여를 시작하였다. 유방종양 유발을 위해 DMBA 를 참기름에 10 mg/ml 농도로 녹인 후 DMBA 1 ml를 1주 간격으로 2회 위내관을 통해 위내에 투여하였다. 대조군 및 실험군 공히 bromodeoxyuridine (BrdU) 염색을 위해 희생 1시간전에 동물 체중 1 g당 0.1 mg의 BrdU (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)를 생리식염수 1 cc에 희석하여 ether로 마취된 실험동물의 꼬리정맥에 주입하였다.

2) 육안관찰: 유방종괴 발견을 위한 촉진은 DMBA 투여 후 6주 동안은 1주 1회 그 이후에는 1주 2회씩 하였다. 유방종괴의 수, 위치, 크기와 출혈 및 궤양 유무등을 개체에 따라 조사하고 종괴의 장경을 측정하여 종양의 크기로 하였다.

3) 표본 채취: 실험군 및 대조군을 해당일에 희생시키고 좌우측 유방 12개를 절제하여 10% 중성 포르말린에 고정하였다.

4) 광학현미경 관찰: 일반적인 조직학적 검색을 위하여 10% 중성 포르말린에 고정된 조직에서 대표적인 절편을 절제하여 파라핀에 포매 후 6 μm의 절편을 만들어 hematoxylin-eosin (H&E)염색을 하였다. 종양이 발생

되지 않은 유방조직에서 TEB와 TD 및 AB의 갯수를 유방조직이 가장 많은 부위를 선택하여 100배 시야에서 계산하고 증식성 포상결절 (hyperplastic alveolar nodule, HAN)의 유무를 판정하였다. TEB는 상피세포가 3~6층으로 중첩되어 있는 경우이며 (Fig. 1A), TD는 TEB 보다 내강이 좁아지면서 상피세포가 1층으로 되어 있고 전체적인 모양이 손가락처럼 보이는 경우이고 (Fig. 1B) AB는 상피세포가 1층으로 되어있고 TD 보다 내강이 더 좁은 관이 3~5개 모여있는 경우로 하였다 (Fig. 1C).³⁹ HAN은 확장된 내강에 분비물을 함유한 선방 (acinus)이 여러개 모여있는 경우이다. 종양의 양성과 악성의 구별은 Russo등이 기술한 것을 참고로 하였다.² 즉 정상 유선의 관상포상 구조의 존재유무, 종양세포의 비정형성, 세포분열 갯수, 종양세포의 균질화 (homogeneity), 기질의 섬유화나 염증세포의 침윤여부 그리고 주위 기질로의 종양세포의 침윤등을 기준으로 하였고 양성 및 악성 종양의 분류는 1987년 Hannover에서 개최된 모임에서 결정한 분류안을 기준으로 하였다.⁴⁰ 유관내 상피세포의 증식은 내강이 확장되고 상피세포가 증식하여 내강을 채우는 경우나 사람의 유방에서 관찰되는 관내상피세포의 증식증의 기준을 참고로 하여 결정하였다.⁴¹

5) BrdU 염색 및 BrdU 표지지수 산정: 10% 중성 완충 포르말린에 고정한 후 제작한 파라핀 포매피를 4 μm의 두께로 박절하여 연속 절편을 만든 후 poly-L-lysine (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)이 입혀진 슬라이드에 부착시킨 후 충분히 건조시켰다. 탈파라핀과 흡수과정을 거친 파라핀 절편을 10 mM citrate 완충액 (pH

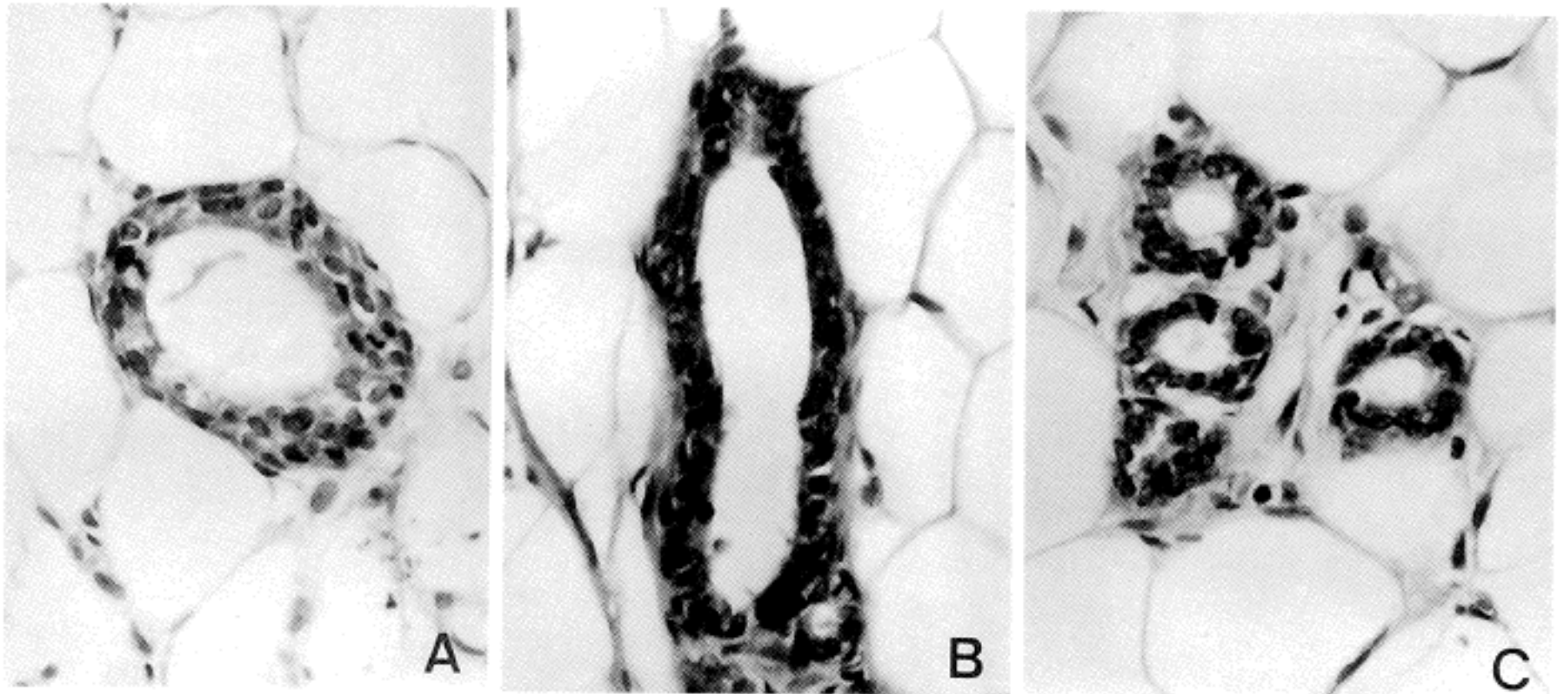


Fig. 1. Histologic findings of terminal end bud, terminal duct, and alveolar bud. A: Terminal end bud is composed of 3~6 layers of epithelial cells. B: Terminal duct has a smaller diameter than that of terminal end bud and is covered by a single layer of cuboidal epithelium and an external layer of myoepithelial cells. C: Alveolar bud appears as clusters of 3~5 tubules, each with a centrally located lumen surrounded by an inner layer of cuboidal epithelial cells and an outer layer of myoepithelial cells.

6.0)에 담근 후 microwave oven에서 15분간 처리하였다. 조직내 내인성 과산화 효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H₂O₂에서 15분간 처리하고 배경의 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 차단혈청으로 15분 동안 전처리 하였다. 항 BrdU 항체 (M744, Dako, Santa Babara, CA, USA)를 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 쥐 조직에 특이적인 DAKO-LSAB kit (K609, Dako, Santa Babara, CA, USA)를 이용하여 biotinylated antibody와 peroxidase가 부착된 streptavidin을 결합시킨 후 aminoethyl-carbazole로 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색하였다. 염색의 판정은 염색이 잘 된 부위를 선택하여 고배율에서 종양세포 1000개를 세어 핵에 뚜렷하게 염색되는 세포의 백분율을 구하여 BrdU 표지치수로 하였다.

6) Apoptosis 확인을 위한 염색: apoptosis는 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)가 잘린 DNA의 3'-OH 끝에 특이하게 deoxynucleotide를 결합시키는 것을 이용하였다.⁴² 파라핀에 포매된 조직절편을 proteinase K (20 µm/ml)로 37°C에서 25분간 처리한 후 증류수로 수세하였다. 그 후 Apoptag kit (S7100-kit, Oncor, San Diego, CA, USA)를 사용하여 염색하였다. 즉 TdT 효소와 반응시켜 digoxigenin이 표지된 nucleotide를 결합시킨 후 효소 반응을 중단시키고 anti-digoxigenin-peroxidase를 반응시키고 3,3'-diaminobenzidine로 발색시켰다. 염색의 판정은 괴사지역을 피해서 염색이 잘 된 부위 10군데를 선정하여 고배율에서 핵에 뚜렷하게 염색된 종양세포를 세어 평균을 내었다. 양성 대조군으로 사람의 편도선 조직을 이용하였다.

7) p53 단백질과 bcl-2 단백질 및 TGF-β의 면역조직화학 염색 및 판정: 쥐조직에 특이적인 DAKO-LSAB kit와 일차항체로 p53 (14211A, 14461A, Pharmingen, San Diego, CA, USA)과 bcl-2 (13456E, Pharmingen, San Diego, CA, USA) 및 TGF-β₁ (SC-146, Santa-Cruz, Biotechnology Inc, Santa cruz, CA, USA)를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. 그 방법은 BrdU에 대한 염색과 동일하였고 희석배수는 p53 단백질항체는 1:50, bcl-2 단백질항체는 1:500, TGF-β₁ 단백질항체는 1:100으로 하였고 양성대조군으로 p53 단백질 및 TGF-β₁은 인체의 위암조직을, bcl-2 단백질은 쥐의 정상 뇌조직을 각각 이용하였으며, 음성대조군은 일차항체 대신 생리식염수를 사용한 후 동일한 방법으로 염색한 것으로 하였다. 염색의 판정은 p53 단백질은 BrdU의 염색판정과 동일한 방법으로 하였고 bcl-2 단백질은 종양세포의 세포질에 과립으로 염색되는 것을 양성으로 하되 염색된 종양세포가 1% 미만, 1% 이상으로 나누어 해석하였다. TGF-β 표지치수는 저배율에서 염색이 잘 된 부위 10군데를 선정하여, 고배율에서 염색강도를 3등급으로 나누고 각각의 등급에 해당하는 세포수의 백분율을 구하여 강도와 백분율을 곱한 평균으로 하였다.

3. 통계학적 분석

유방의 증식성 병변의 형태학적 분류에 따른 세포증식능지수, apoptosis 빈도 그리고 apoptosis와 관련된 인자의 발현을 조사하는 것이므로 분석단위는 흰쥐의 개체가 아니라 흰쥐의 유방으로 하였다. 측정치의 통계적 유의성을 검정하기 위해 one-way ANOVA, t test, Kruskal Wallis test, Mann-Whitney U test, Fisher's exact test를 이용하였고 p값이 0.05 미만을 유의있는 것으로 하였다.

결 과

1. 종양 발생 및 조직학적 유형

실험중 죽은 흰쥐를 제외한 실험군 59마리와 대조군 27마리중 종양 발생은 실험군 22마리에서 발생하였고 총 발생 종양 수는 100개로서 마리당 4.5±2.0 (1~10)개였다. DMBA 투여후 8주에 1마리(1개)에서 0.7 cm의 종괴가 처음 축적되었다. 종양의 조직학적 유형을 보면 침윤성 관암종이 5개 (Fig. 2A), 미세침윤성 관암종이 10개, 관내암종이 36개 (Fig. 2B), 유관상피증식증을 동반한 선종이 35개, 유관상피증식증이 9개 (Fig. 2C), 선종이 5개 (Fig. 2D)였다 (Table 1). 관내암종은 내강내로 유두상 성장을 하면서 체모양을 나타내는 혼합형이 대부분이었지만 종양에 괴사된 조직을 가진 면포형도 있었다. 선종은 확장된 내강내로 유두상 성장을 하는 유두종과 작은 유관들이 증식한 관상선종이 대부분이었고 섬유선종도 소수 있었다. 편평세포화생이 5개의 종양에서, 근상피세포의 증식이 3개의 종양에서 각각 관찰되었다.

면역조직화학 염색 및 apoptosis의 염색은 실험군에서 선종과 유관상피증식증을 포함한 양성 병변 23개, 관내암종 18개, 미소침윤 및 침윤성 관암종 12개, 종양이 발생되지 않은 유방 14개 (4주 7개, 7주 7개), 대조군 12개

Table 1. Histologic types of the mammary tumors of rats

Histologic type	Number
Adenoma	5
Intraductal proliferation	9
Adenoma with intraductal proliferation	35
Ductal carcinoma in situ	22
Ductal carcinoma in situ with intraductal proliferation	4
Ductal carcinoma in situ and adenoma with intraductal proliferation	10
Focal infiltrative ductal carcinoma	10
Infiltrating ductal carcinoma	5
Total	100

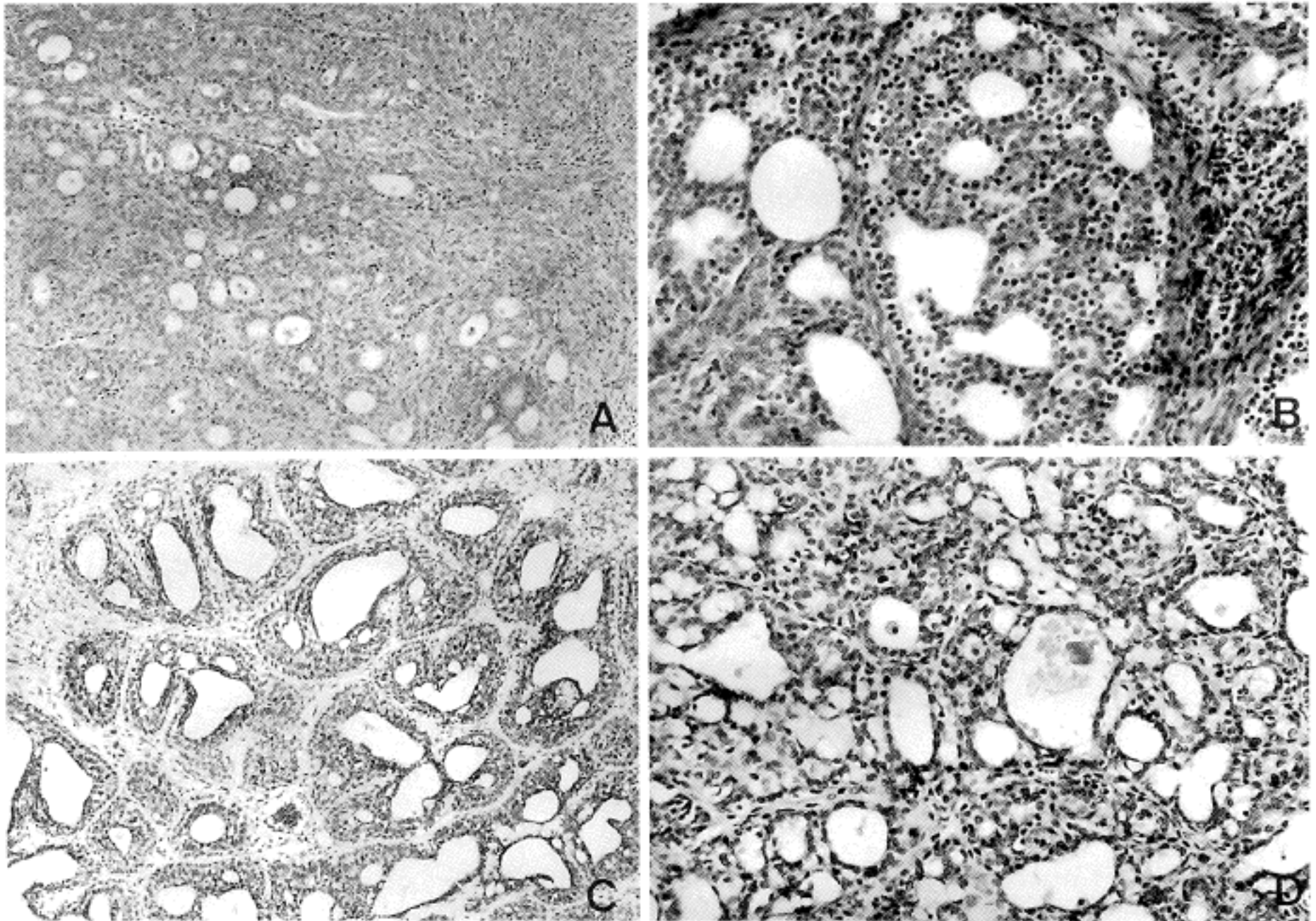


Fig. 2. Histologic types of the mammary tumors of rats. A: Infiltrating ductal carcinoma show stromal invasion. B: Ductal carcinoma in situ of cribriform pattern is shown. C: Intraductal proliferation shows epithelial proliferation within the duct, filling the dilated lumen. D: Adenoma is composed of well differentiated alveolar structures, each of which is composed of a single layer of epithelial cells.

(4주 6개, 7주 6개)를 대상으로 시행하였다. 정상 유방군에는 종양 주위의 정상 유선조직도 포함시켰으며 염색이 실패한 경우는 통계처리시 제외하였다.

2. DMBA 투여후 10주까지 실험군 및 대조군의 TEB, TD, AB, HAN의 변화

실험군의 TEB는 DMBA 투여후 4주 때 0.30 ± 0.70 , 7주 때 0.09 ± 0.35 , 10주 때에는 전혀 없었어 시간이 지남에 따라 통계학적으로 유의있게 감소하였고 ($p < 0.05$), TD는 4주 때 1.97 ± 1.00 , 7주 때 1.82 ± 0.83 , 10주 때 2.75 ± 1.24 개가 관찰되어 10주 때가 4주 때에 비하여 통계학적으로 유의있게 증가하였고 ($p < 0.05$) AB는 4주 때 3.15 ± 1.49 , 7주 때 3.35 ± 1.45 , 10주 때 4.28 ± 1.46 개가 관찰되어 10주 때가 4주 때에 비하여 통계학적으로 유의있게 증가하였다 ($p < 0.05$). 대조군의 TEB는 4주 때 0.38 ± 0.60 , 7주와 10주 때에는 전혀 없었어 4주 때 가장 많았고 ($p < 0.05$), TD는 4주 때 1.88 ± 0.65 , 7주 때 1.76 ± 1.96 , 10주 때 1.75 ± 0.45 개로 시간이 지남에 따라 감

소하는 경향은 있었지만 통계학적 유의성은 없었으며 AB는 4주 때 4.69 ± 1.97 , 7주 때 5.15 ± 2.60 , 10주 때 5.91 ± 1.67 로 시간이 지남에 따라 증가하는 경향은 있었지만 통계학적 유의성은 없었다. 같은 주의 실험군과 대조군을 비교하면 실험군에 비하여 대조군에서 AB의 갯수가 통계학적으로 유의하게 높았다 (Table 2)($p < 0.05$). HAN은 실험군 11마리에서 12개가 관찰되었으며 DMBA 투여 후 7주에 처음 발견되었고 대조군에서는 관찰되지 않았다.

3. BrdU 표지지수

BrdU의 염색은 종양세포 군집의 외곽지역에서 주로 염색되었고 중심부로 향할수록 염색되는 세포가 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 3B, C). 침윤성 관암종에서는 부위에 따라서 종양세포 군집의 중심부나 외곽지역이 비슷한 갯수로 염색되는 곳도 관찰되었고 기질로 침윤하는 부위에서 많이 염색되는 예도 있었지만 그렇지 않은 예도 있었다. 실험군중 종양이 발생되지 않은 정상

Table 2. Number of terminal end bud, terminal duct and alveolar bud in the experimental and control group of rats

Group	Experiment				Control			
	TEB ^a	TD ^b	AB ^c	No.	TEB ^a	TD	AB ^c	No.
4 wk	0.30±0.70	1.97±1.00	3.15±1.49	44	0.38±0.60	1.88±0.65	4.69±1.97	26
7 wk	0.09±0.35	1.82±0.83	3.35±1.45	45	0.0±0.0	1.76±1.96	5.15±2.60	13
10 wk	0.0±0.0	2.75±1.24	4.28±1.46	28	0.0±0.0	1.75±0.45	5.91±1.67	12

^a: p<0.05 when compared between experimental and control groups ^b: p<0.05 when compared in experimental and control groups, respectively ^c: p<0.05 when compared between 4 week and 10 week groups No: number of the breasts observed, TEB: terminal end bud, TD: terminal duct, AB: alveolar bud

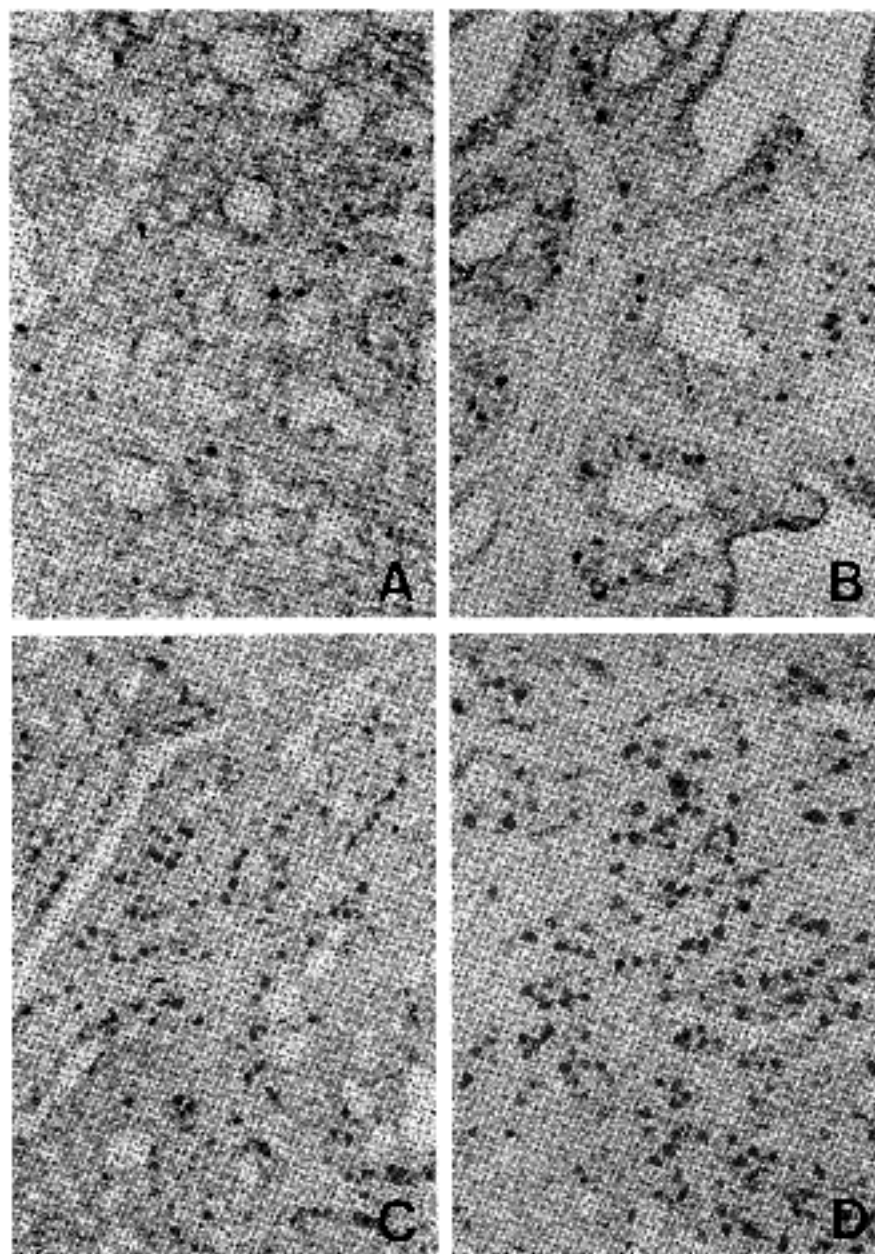


Fig. 3. Immunohistochemical staining of BrdU in the mammary tumors of rats. BrdU labeling indices are the lowest in adenomas (A), less pronounced in intraductal proliferation (B) and the highest in ductal carcinomas (infiltrating, focal infiltrative and in situ C, D). BrdU labeling tumor cells are mainly located at the peripheral portion of tumor cell nests (B, C).

유방은 0.05±0.03, 선종은 0.07±0.05 (Fig. 3A), 상피세포 증식증은 0.13±0.03 (Fig. 3B), 관내암종은 0.28±0.06 (Fig. 3C), 침윤성 관암종은 0.37±0.10 (Fig. 3D)으로 암종으로 갈수록 세포증식은 통계학적으로 유의하게 증가하였다 (p<0.05)(Table 3). 실험군의 정상유방의

Table 3. BrdU labeling indices of the mammary tumors and normal breasts of rats

Histologic type	Number	BrdU labeling index
Normal	42	0.05±0.03
Adenoma	17	0.07±0.05
Intraductal proliferation	30	0.13±0.03
Ductal carcinoma in situ	18	0.28±0.06
Focal infiltrative ductal carcinoma & infiltrating ductal carcinoma	12	0.37±0.10

p<0.05 when compared among the normal, adenoma, and carcinoma (ductal carcinoma in situ, focal infiltrative ductal carcinoma, and infiltrating ductal carcinoma) Number: number of the breasts

BrdU 표시지수는 4주에 0.09±0.03, 7주가 0.04±0.03, 10주가 0.05±0.03 으로 4주가 가장 높았지만 통계학적 유의성은 없었다. 대조군의 정상유방은 4주가 0.07±0.04 7주가 0.04±0.02 으로 4주가 더 높았지만 통계학적 유의성은 없었으며 같은 주수의 실험군과 대조군 사이에 세포증식능은 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 4).

4. Apoptosis 확인

Apoptosis 양성세포들은 종양세포 군집의 특정 부위에 편재되지 않고 불규칙하게 나타났다. Apoptosis 빈도는 실험군중 종양이 발생되지 않은 정상 유방은 0.31±0.43, 선종은 4.62±2.57 (Fig. 4A), 상피세포 증식증은 2.56±1.72 (Fig. 4B), 관내암종은 1.53±1.17, 침윤성 관암종은 1.75±0.88 (Fig. 4C)으로 종양중 암종이 가장 낮았다 (p<0.05)(Table 5). 실험군의 정상유방은 4주가 0.20±0.22, 7주가 0.74±0.86, 10주가 0.10±0.20 이었고 대조군의 정상유방은 4주가 0.13±0.18, 7주가 0.05±0.09 으로 각군 사이에 통계학적으로 유의한 차이는 없었으며 같은 주수의 실험군과 대조군 사이에도 통계학적으

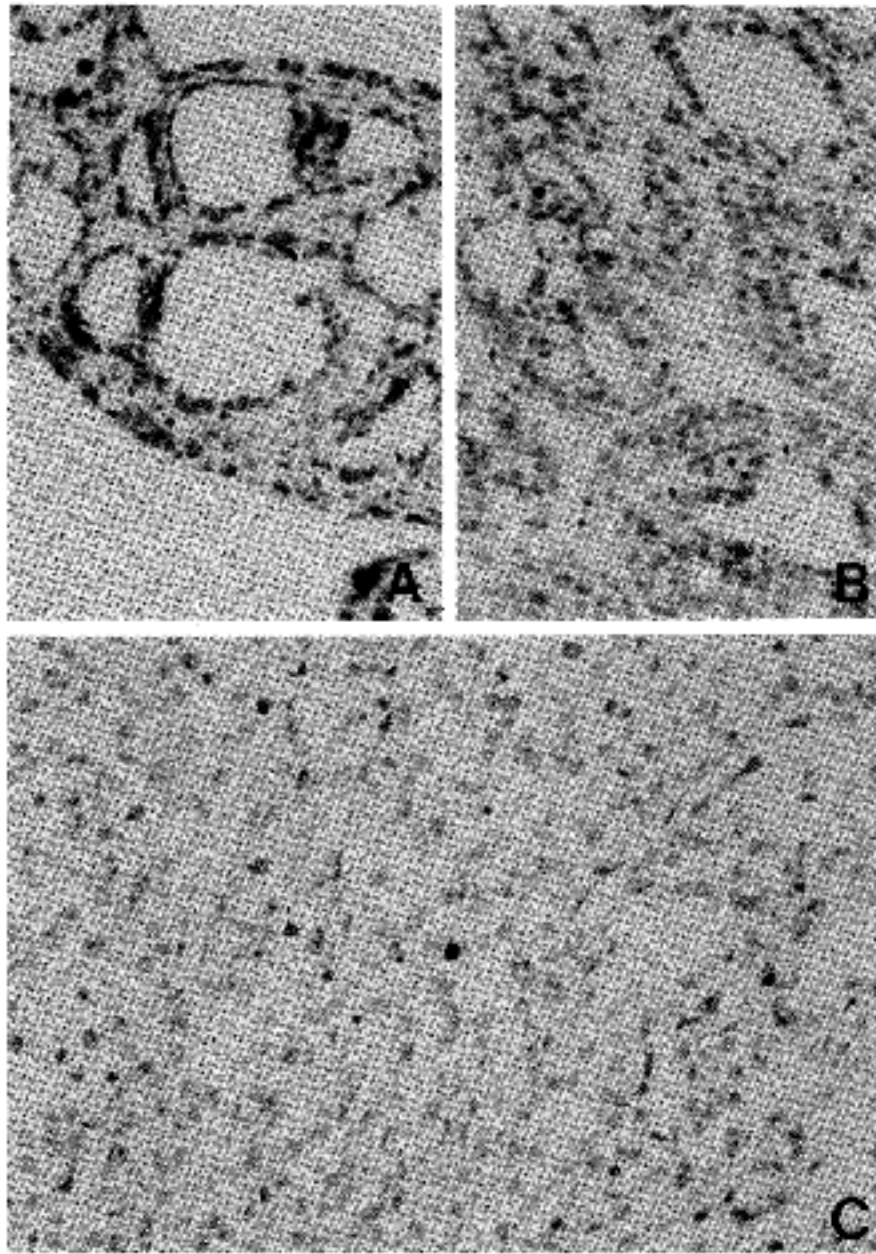


Fig. 4. Apoptosis of the mammary tumors of rats. Apoptosis is observed the highest in adenomas (A), less pronounced in intraductal proliferation (B), and the lowest in ductal carcinomas (infiltrating, focal infiltrative and in situ, C).

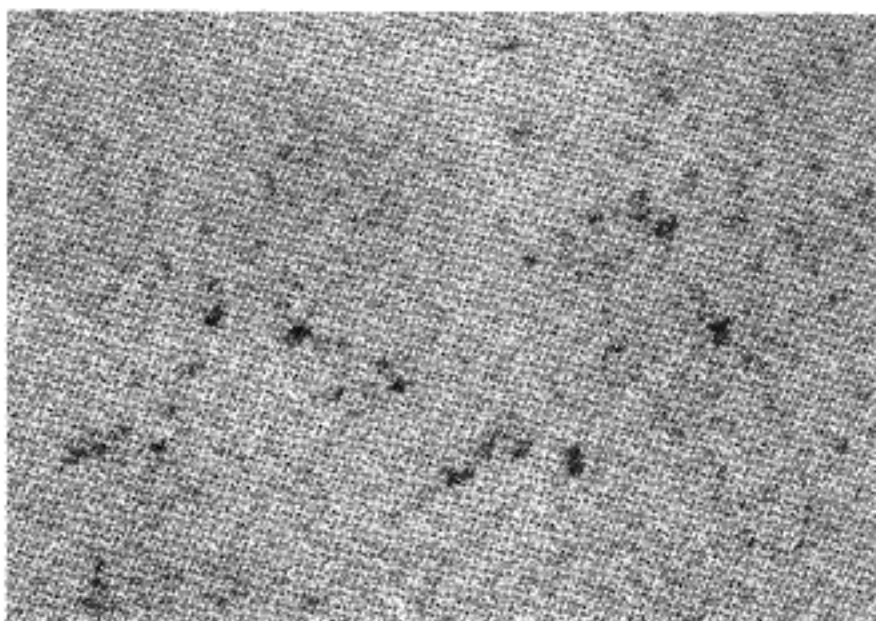


Fig. 5. Immunohistochemical staining of TGF- β in the tumor stroma. Strong immunoreactive reaction of TGF- β is observed in the tumor stroma in the peripheral portion of ductal carcinomas.

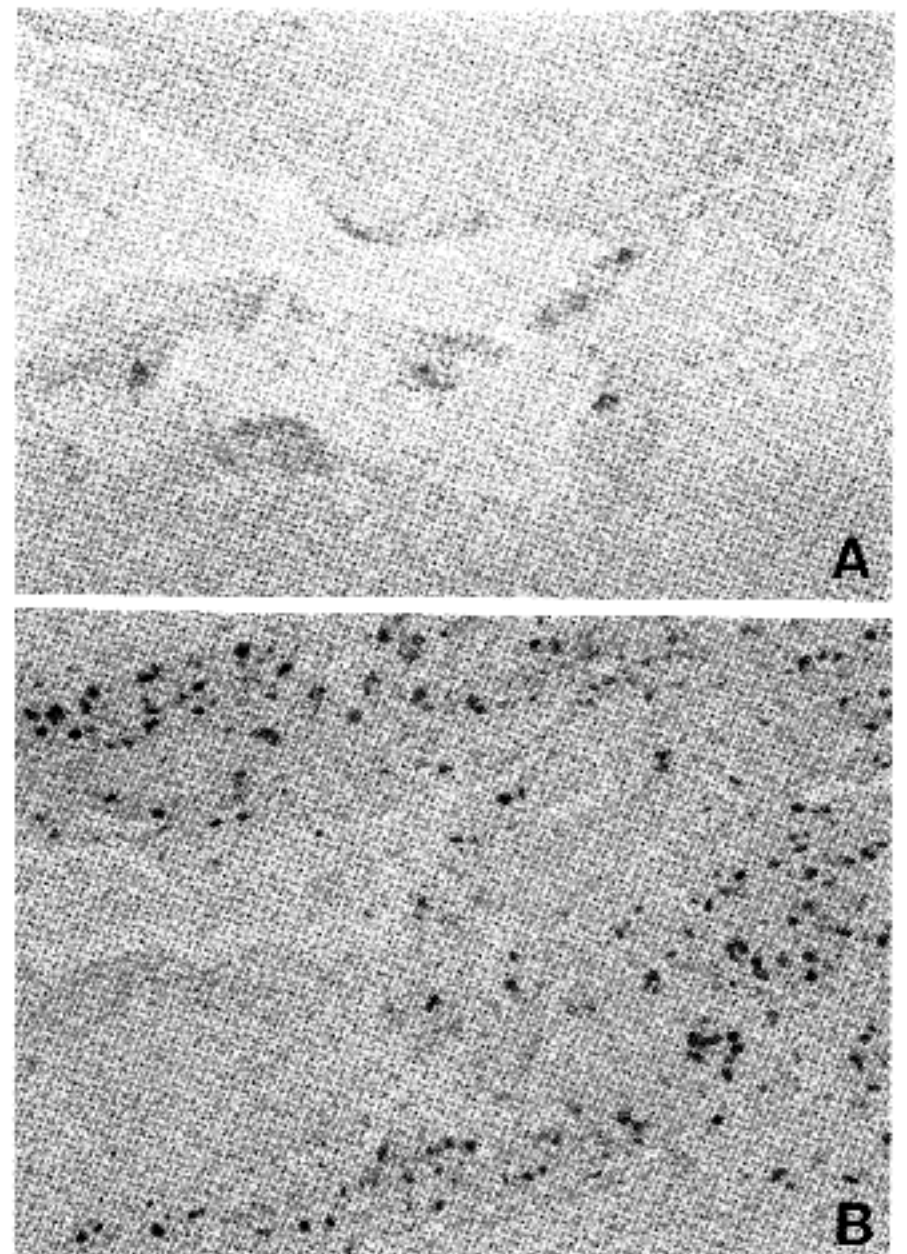


Fig. 6. Comparison of TGF- β expression and BrdU labeling of the tumor cells in two serial sections. A: TGF- β is mainly expressed in the central portion of the tumor cell nests rather than in the peripheral portion. B: TGF- β immunoreactive tumor cells display good differentiation and do not reveal BrdU immunoreactivity.

로 유의한 차이는 없었다 (Table 4).

5. p53 단백질과 bcl-2 단백질 및 TGF- β 의 면역조직화학적 염색

p53 단백질에 대하여 종양세포 및 정상 유선 상피세포는 음성반응을 보였다. bcl-2 단백질은 정상 유선 상피세포에서는 넓은 부위에서 양성반응을 나타낸 반면 종양에서는 모두 1% 미만의 종양세포가 양성반응을 나타내었고 종양의 조직학적 유형에 따른 양성률은 선종 및 상피세포 증식증이 8.7% (2/23), 관내암종이 7.1% (1/14) 침윤성 및 미소침윤성 관내암종이 58.3% (7/12)로 침윤성 관내암종에서 가장 높은 양성률을 보였다 ($p < 0.05$). 일부의 침윤성 관내암종에서 bcl-2 단백질이 양성인 종양세포는 분화가 좋은 경향을 보였으며 이러한 종양세포는 BrdU에 대하여 음성이었다. TGF- β 는 정상유선 조직의 상피세포, 내식구, 섬유보세포, 림프구 및 혈관내피세포에 발현되었고 특히 종양에서는 종양내 기질 보다는 종양

Table 4. BrdU labeling indices and apoptotic counts of the normal breasts of rats

Group	BrdU labeling index	Number	Apoptotic counts	Number
Experiment*				
4 week	0.09 ± 0.03	4	0.20 ± 0.22	4
7 week	0.04 ± 0.03	5	0.74 ± 0.86	5
10 week	0.05 ± 0.03	5	0.10 ± 0.20	4
Control*				
4 week	0.07 ± 0.04	4	0.13 ± 0.18	6
7 week	0.04 ± 0.02	5	0.05 ± 0.09	4

*: p > 0.05 when compared between the experimental and control groups Number: number of the breasts observed

Table 5. Apoptotic counts of the mammary tumors and normal breasts of rats

Histologic type	Number	Apoptotic count
Normal	44	0.31 ± 0.43
Adenoma	17	4.62 ± 2.57
Intraductal proliferation	19	2.56 ± 1.72
Ductal carcinoma in situ	13	1.53 ± 1.17
Focal infiltrative ductal carcinoma & infiltrating ductal carcinoma	12	1.75 ± 0.88

p < 0.05 when compared among the normal, adenoma, intraductal proliferation and carcinoma Number: number of the breasts observed

Table 6. TGF-β labeling indices of the mammary tumors of rats

Histologic type	Number	TGF-β labeling index
Adenoma with/or intraductal proliferation	23	0.06 ± 0.14
Ductal carcinoma in situ	16	0.10 ± 0.19
Focal infiltrative ductal carcinoma & infiltrating ductal carcinoma	12	0.41 ± 0.35

p < 0.05 when compared among the adenoma with/or intraductal proliferation, ductal carcinoma in situ, and ductal carcinoma (focal infiltrative and infiltrating) Number: number of the breasts observed

과 정상 유방의 경계부에 있는 기질 세포에 더 많고 더 강하게 발현되었다 (Fig. 5) 이런 염색 소견은 유방암종에서 더 현저하였다. 종양세포에서는 종양세포 군집의 외곽지역 보다 종양부위에 많이 염색되었다 (Fig. 6A). 즉 TGF-β이 발현되는 종양세포는 BrdU에 대하여 음성 이었고 좋은 분화를 나타내었다 (Fig. 6B). TGF-β의 표 지지수는 상피세포 증식증과 선종은 0.06 ± 0.14 (23), 관 내암종은 0.10 ± 0.20 (16), 침윤성 및 미소침윤성 관암종 은 0.41 ± 0.35 (12)으로 양성병변과 관내암종에 비하여 침윤성 관암종에서 통계학적으로 유의하게 높았다 (p < 0.05) (Table 6).

고 찰

방향성 탄화수소의 일종인 DMBA는 cytochrome P450s (P450)와 epoxide hydrolase에 의해 대사되어 3,4-diol-1, 2-epoxide가 되고 이것이 DNA와 결합하여 DNA의 돌연변이를 초래하고 발암물로 작용한다.⁴³ 흰쥐의 유방종양은 DMBA를 2.5 mg ~ 20 mg을 투여하면 8 ~ 21주의 잠복기를 지나서 100% 발생되는 것으로 알려져 있다.⁴⁴ 유방

종양의 조직학적 유형, 잠복기, 발생빈도, 그리고 마리 당 종양의 갯수등은 투여 용량, DMBA 투여시 나이, 생체내 호르몬의 상태 그리고 종에 따라 다르다.^{3,4,41,44~46} 본 연구에서 유방종양이 처음 발견된 것은 8주 였는데 Rogers 및 Lee⁴⁴가 보고한 잠복기의 범위내에 있지만 같은 용량을 투여한 Huggins등⁴⁷의 74일 보다 빠르다. 본 연구에서 종양의 발생빈도가 37.3%로 낮은 것은 관찰기간이 짧았던 점과 실험초기의 높은 사망률 때문인 것으로 생각되며, 악성종양의 발생빈도는 51.0%로써 다른 연구에서 발표된 25% ~ 94%²의 범위내에 있지만 비교적 낮았는데 이러한 현상은 관찰기간이 짧았던 점이나 DMBA 투여시기가 생후 56일째로 비교적 늦었기 때문인 것으로 생각된다. 왜냐하면 유방암의 발생빈도는 TD와 AB보다 세포증식능이 월등히 높은 TEB의 갯수가 높은 시기에 DMBA 투여를 받은 흰쥐에서 더 높은 것으로 알려져 있고, TEB의 갯수는 생후 21일에 가장 높고 그 후 60일까지 급격히 감소하며 발정주기 (estrus cycle)가 시작되는 35 ~ 42일경부터 AB나 소염으로 분화를 시작하므로 생후 55일을 기준으로 종양의 발생빈도가 차이되기 때문이다.^{2,3,39}

흰쥐의 전암성 병변은 HAN과 TEB에서 기원한 상피

세포 증식증이라는 주장이 있다.^{3,4,48} 본 연구에서 HAN은 DMBA 투여 후 7주 때 실험군 11마리에서 12개가 관찰되었지만 종양과 떨어진 정상 유방조직내에서 발견되어 종양과 직접 이행되는 부위가 없는 점으로 보아 HAN이 전암병변일 가능성은 적다. 근자에는 TEB에서 기원한 상피세포 증식증이 전암병변이라고 알려지고 있다.² 본 논문에서 TEB는 대조군 및 실험군에서 나이가 들에 따라 감소하였고 실험군보다 대조군에서 더 빨리 감소하였다. TD는 실험군에서 나이에 따라 증가하는 경향을 보인 반면 대조군은 비슷한 경향을 보였다. AB는 대조군 및 실험군에서 나이가 들에 따라 증가하였다. 실험군의 TEB와 TD의 갯수는 대조군 보다 많은 경향을 보였고 AB는 대조군에서 통계학적으로 유의하게 더 많았다. 이러한 결과는 DMBA가 투여되면 TEB가 AB로 분화되는 현상이 늦추어지고 TD로 분화되는 경향이 있는 것으로 생각되었다. 이러한 현상은 Russo 및 Russo^{4,39}의 주장과 동일하였다.

본 연구에서 관찰된 관내암종은 내강내로 유두상 성장을 하면서 체모양을 나타내는 혼합형이 대부분으로 van Zwieten⁴⁹의 주장과 동일하였다. 흰쥐에 DMBA 투여시 상피세포 증식증 및 관내암종 그리고 침윤성 관암종은 TEB, TD에서 기원하며 낭, 선종은 AB 및 소엽에서 발생한다고 알려져 있다.² 따라서 본 연구처럼 한 종양내에 관암종, 선종 그리고 상피세포 증식증이 혼합된 병변이 존재하는 것은 TEB와 AB에 DMBA가 동시에 작용한 결과로 생각되었다. 즉 본 연구에서 DMBA를 투여한 생후 56일에는 TEB에서 분화된 AB가 존재하고 있다는 것을 의미한다.

BrdU는 생체내 주입후 곧 thymidine과 치환되므로 BrdU에 대한 단클론 항체를 이용하여 면역조직화학적으로 BrdU 표지세포를 염색하여 세포증식능 측정에 이용되고 있으며 세포주기 중 S기 세포를 표지한다.⁵⁰ 본 연구의 BrdU 표지세포는 상피세포 증식증과 관내암종에서 종양세포 군집의 외곽지역에서 주로 편재되었고 중심부로 향할수록 염색되는 세포가 감소하는 경향을 보인 반면 TGF- β 는 종양세포 군집의 외곽지역 보다 중앙부위에서 많이 염색되었다. 즉 TGF- β 가 발현되는 종양세포는 BrdU에 대하여 음성이었고 좋은 분화를 나타내었다. 이러한 현상은 TGF- β 이 p27^{Kip1}과 p15^{INK4}를 활성화시켜 여러 가지 cyclin과 cyclin dependent kinase의 활성을 억제하여 Rb 단백질의 과인산화 형성을 방해하고 따라서 c-myc과 B-myb 유전자의 전사를 억제하는 기작을 통해서 외배엽 기원의 세포의 세포주기를 G₀, G₁ 단계에서 정지시키는 기전으로 설명될 수 있다고 생각된다.³³ Mammary tumor virus promoter와 TGF- β 가 transgene된 생쥐에 DMBA 투여시 종양의 형성이 억제되는 현상도 TGF- β 의 세포성장 억제효과를 증명하고 있다.³³ 특히 흰쥐에서 발생하는 유방종양은 상피세포 증식증을 동반하면서 유두상 성장을 하고 근상피세포의 증식도 관찰되며 주위 기질로의 침윤도 확실하지 않는 경우도 있

어서 양성 및 악성병변을 구별하는 것이 무척 어려운데 본 연구에서 BrdU 표지세포가 양성병변에 비하여 악성병변에서 높은 사실로 보아 BrdU 염색이 DMBA 투여로 유발된 유방종양의 양성 및 악성병변을 감별하는데 도움이 될 것으로 생각되었다. BrdU 표지세포는 종양이 발생되지 않은 실험군 및 대조군의 정상유방에서 4주 때 가장 높았는데 이러한 결과는 TD와 AB보다 세포증식능이 높다고 알려진 TEB가 4주 때 가장 많고 그 후 감소하기 때문인 것으로 생각되었다.⁴

세포의 증식과 사멸 간에는 수적인 평형이 유지되고 있다가 어떤 원인에 의해 세포의 증식력이 증가하거나 사멸이 감소하면 세포의 수가 증가하여 종양을 형성할 수 있다.⁵ 본 연구에서도 세포증식능은 암종에서 가장 높았고 다음으로 상피세포 증식증 그리고 선종과 정상이가 가장 낮았다. Apoptosis는 선종에서 가장 높았고 다음으로 상피세포 증식증 그리고 암종순으로 감소하여 악성종양의 발생에 있어 세포의 증식과 사멸 사이에 역동관계가 있음을 추측할 수 있었다.

bcl-2 유전자가 활성화되는 기전에는 염색체 전위외에 p53이 관여하는 것으로 알려져 있는데 야생형 p53은 bcl-2 유전자의 활성화를 억제하는 반면 bax 유전자를 활성화시킨다.²⁹ 따라서 변이형 p53은 이러한 기능을 수행하지 못하므로 DNA가 손상되었더라도 p53 변이가 있는 세포에서는 apoptosis가 일어나지 않는다. 본 연구에서 p53 단백질은 모든 유방종양에서 발현되지 않았다. DMBA는 화학적으로 adenine과 guanine에 잘 반응하므로 DMBA로 유발된 흰쥐 유방암종의 경우, Ha-ras의 61번 유전부호의 2번째 염기에서 adenine→thymine 변이가 잘 일어나는 것으로 알려져 있다.⁵¹ p53의 경우를 보면, Kito등⁵²은 DMBA로 유도된 40개의 흰쥐 유방암종 2.5%에서 12번 유전부호의 2번째 염기에서 guanine→adenine 변이를 관찰하였고, Jerry등⁵³은 DMBA로 유발된 BALB/c 생쥐의 13개 유방암을 대상으로 면역조직화학 염색을 시행한 결과 p53 단백질은 하나도 발현되지 않았다고 하였으며 Ruggeri등⁵⁴은 DMBA로 유발된 Sencar 생쥐의 피부암 30%에서 p53의 guanine→thymine 변이를 관찰하였다. 이러한 결과들과 본 연구의 결과로 보아 p53의 변이는 동물이나 유도된 종양의 종류에 따라서 다르다고 생각되었고 DMBA로 유발된 흰쥐의 유방암 형성에 p53의 변이가 관여하지 않으며 양성 병변에 비하여 암종에서 apoptosis가 적게 일어나는 것은 p53의 변이와는 무관하다는 것을 알 수 있었다. 그러나 사람의 유방암에서는 p53의 변이가 20~50%에서 발견되고 있고 그 시기에 관해서는 유방암의 초기에 발생하여 암종의 진행과 전이가 일어나는 말기까지 유지된다는 보고와 유방암의 말기에 발생한다는 상반된 보고가 있다.^{26~28} 따라서 사람의 유방암의 진행에 따른 p53의 변이를 연구하는데 DMBA로 유발된 흰쥐의 유방암의 모델은 적합하지 않다고 생각되었다.

Apoptosis를 억제하여 세포수명을 연장시키는 것으로

알려진 *bcl-2* 유전자는 사람의 유방암에서 에스트로젠 수용체에 의존하는 유전자이며^{5,18~21} *bcl-2* 단백질 발현은 좋은 예후인자로 알려져 있다.^{18~19} 본 연구에서 *bcl-2* 단백질은 정상 유선 상피세포에서는 넓은 부위에서 강하게 발현된 반면 종양에서는 아주 국소적으로 약하게 발현되었다. 선종과 상피세포 증식증 및 관내암종보다 침윤성 및 미소침윤성 관암종에서 58.3% (7/12)로 가장 높은 양성률을 보였다. 이러한 결과는 침윤성 관암종에서 관찰된 apoptosis의 빈도가 선종과 상피세포 증식증에서보다 통계학적으로 유의하게 적은 것을 설명할 수 있다고 생각할 수도 있었지만 *bcl-2* 단백질 발현이 종양에서는 강도도 아주 약하고 국소적으로만 발현된 것으로 보아 apoptosis의 억제에는 큰 기여를 할 수 없다고 생각하는 것이 옳을 것 같다. DMBA로 유발된 유방암종에서 *bcl-2* 단백질 발현을 연구한 다른 논문들이 없어서 본 연구 결과를 비교 고찰할 수 없었다. 다만 SV40TAG이 transgene 된 생쥐에서 생긴 유방암종에서 세포증식능과 apoptosis를 연구한 결과를 보면 세포증식능은 암종에서 가장 높았고 다음으로 비정형성 상피세포 증식증 그리고 정상에서 가장 낮았으며 apoptosis는 암종보다는 비정형성 상피세포 증식증에서 더 많이 일어났고 apoptosis의 기전에 *p53* 및 *bcl-2*는 무관하여 본 연구의 결과와 유사하였다.⁵⁵

TGF- β 는 비활성화 형태로 거의 모든 세포에서 분비되며 latent complex가 떨어져 나가면 활성화 형태가 되고 포유류에서는 TGF- β_1 , β_2 , β_3 등이 있고 서로간에 75%의 유전자를 공유하고 있다.³³ TGF- β 의 기능은 세포의 성장과 억제, 세포외 기질의 형성, 세포외 기질에 세포를 부착, 맥관형성 및 면역억제 효과등이 있는 것으로 알려져 있다.^{31~33,37} 본 연구에서 종양세포가 아닌 세포들의 TGF- β 의 발현은 종양의 중앙부 보다는 종양과 정상 유방의 경계부에 있는 섬유모세포, 림프구 및 혈관내피세포등에 염색강도가 더 강하고 더 많았으며 이러한 소견은 침윤성 관암종에서 더 현저하였다. 이러한 결과는 기질의 여러 가지 세포들이 TGF- β 를 생성해서 세포외 기질의 형성과 맥관형성 및 면역억제 효과를 발휘하여 종양의 진행에 관여한다는 것을 시사한다고 생각하였다. Dalal등⁵⁶도 분비형 TGF- β 는 주로 종양의 외곽지역의 세포외 기질에 국한되어 유방암의 침윤과 깊은 연관이 있다고 하였다. 본 연구에서 종양세포의 TGF- β 의 발현이 침윤성 관암종에서 관내암종에 비하여 더 높은 사실도 TGF- β 이 종양의 진행이나 침윤에 깊이 관여한다는 것을 뒷받침하는 것으로 생각된다. TGF- β 이 apoptosis와 관련되어 있다는 보고들이 많은데^{34~37} 본 연구에서 침윤성 관암종이 양성병변과 관내암종에 비하여 TGF- β 의 발현이 높으나 양성병변보다 apoptosis 빈도가 낮은 점과 apoptosis된 세포와 TGF- β 이 발현된 세포의 위치가 서로 다른 점은 DMBA로 유발된 흰쥐의 유방암종에서는 종양세포의 TGF- β 가 apoptosis와 관련없음을 시사하는 것으로 생각된다.

본 연구를 통하여 DMBA로 유발된 유방의 증식성 병변에서 높은 세포증식능과 낮은 apoptosis가 유방암종의 발생에 있어서 중요하며 apoptosis와 관련된 인자들 중 *p53*, *bcl-2*, TGF- β 의 발현은 apoptosis와 특별한 관련이 없는 것을 알 수 있었다. 따라서 DMBA로 유발된 유방암종의 발생에서 낮은 apoptosis를 유발시키는 다른 기작에 대한 연구 예를 들면 APO-1/fas, TGF- β 수용체의 이상유무 그리고 *bcl-2* 관련 유전자인 *bax*, *bak*, *bcl-x*, *bcl-X_L* 등에 관한 연구가 향후 진행되면 종양의 형성과정에서 apoptosis의 역할 및 기전을 연구하는데 더 많은 정보를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

결론

유방암종이 형성되는 과정에서 apoptosis, 세포증식능 그리고 apoptosis에 영향을 주는 인자들이 여러 단계의 형태학적 변화와 어떤 관계가 있는지를 알아보기 위하여 DMBA를 흰쥐에 투여하여 유방의 증식성 병변을 유발시켰다. 흰쥐의 전암병변이 기원한다고 알려진 TEB와 TD의 변화를 관찰하고 증식성 병변을 선종, 상피내 증식증, 관내암종 및 침윤성 관암종으로 구분하였다. 이러한 병변에서 종양세포의 증식과 apoptosis를 관찰하여 유방암종의 발생에서 종양세포의 증식과 apoptosis의 역동적인 관계를 규명하고, 또 apoptosis를 억제시키는 것으로 알려진 *bcl-2* 단백질 및 변이형 *p53* 단백질 발현과 외배엽 기원의 세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 조장하는 것으로 알려진 TGF- β 의 발현등을 면역조직화학 염색을 통해서 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) DMBA를 투여받은 실험군이 대조군에 비해 TEB에서 AB로의 분화가 통계학적으로 유의있게 적었다.
2) BrdU 양성 종양세포는 상피세포 증식증과 관내암종에서 주로 종양세포 군집의 외곽지역에 편재되었고 중심부로 갈수록 염색되는 세포수가 감소하는 경향을 보였다. 세포증식능 지수는 침윤성 관암종과 관내암종에서 상피세포증식증 및 선종에 비해 통계학적으로 유의있게 높았고 apoptosis의 빈도는 세포증식능 지수와 역관계를 보였다.
3) *p53* 단백질은 모든 종양에서 전혀 발현되지 않았고 *bcl-2* 단백질은 침윤성 및 미소침윤성 관암종에서 가장 높은 양성률을 보였으나 (58.3%) 국소적으로만 발현되었다.

4) TGF- β 는 종양세포 군집의 외곽지역 보다 중앙부위에서 주로 발현되었고 TGF- β 양성 종양세포는 BrdU에 대하여 음성이면서 좋은 분화를 보였다. TGF- β 표지 지수는 침윤성 및 미소침윤성 관암종에서 양성병변과 관내암종에 비해 통계학적으로 유의하게 높았다.

이상의 결과로 보아 DMBA로 유발된 유방암종의 발생과정에는 높은 세포증식능 및 낮은 apoptosis가 관련되어 있고, *p53* 변이와 *bcl-2* 및 TGF- β 는 진행과정 중의 유방병변의 apoptosis와는 특별한 관련이 없는 것으로

생각된다. TGF- β 는 종양세포의 증식과는 역관계가 있으나 유방암종의 진행, 특히 침윤과 관련있는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Foote FW, Stewart FW. Comparative studies of cancerous versus noncancerous breasts. *Ann Surg* 1945; 121: 6-53.
2. Russo J, Gusterson BA, Rogers AR, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten M. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 1990; 62: 244-78.
3. Russo J, Saby J, Isenberg W, Russo IH. Pathogenesis of mammary carcinomas induced in rats by 7, 12-dimethylbenzanthracene. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59: 435-45.
4. Russo I, Russo IH. DNA labeling index and structure of the rat mammary gland as determinants of its susceptibility to carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61: 451-9.
5. Korsmeyer SJ. *bcl-2* initiated a new category of oncogenesis: Regulator of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-86.
6. Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987; 235: 305-11.
7. Sager R. Tumor suppressor gene: The puzzle and promise. *Science* 1989; 246: 1406-12.
8. Allan DJ, Howell A, Roberts SA, Williams GT, Watson RJ, Coyne JD, Clarke RB, Laidlaw IJ, Potten CS. Reduction in apoptosis relative mitosis in histologically normal epithelium accompanies fibrocystic change and carcinoma of premenopausal human breast. *J Pathol* 1992; 167: 25-32.
9. Dowsett M, Johnston SR, Newby J, Golding M, Sacks N, Smith IE. Mechanisms of hormone response: a role for apoptosis. *Endocrine-Related Cancer* 1995; 2: 3-11.
10. Huovinen R, Warri A, Collan Y. Mitotic activity, apoptosis and TRPM-2 mRNA expression in DMBA-induced rat mammary carcinoma treated with anti-estrogen toremifene. *Int J Cancer* 1993; 55: 685-91.
11. Yonish-Rouach E, Rensnitsky D, Loten J, Sach SL, Kimchi A, Oren M. Wild type *p53* induces apoptosis of myeloid leukemia cell that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 353: 345-7.
12. Bissonette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by *c-myc* is inhibited by *bcl-2*. *Nature* 1992; 359: 552-4.
13. Evan GI, Wyllie AH, Gillbert CS. Induction of apoptosis in fibroblasts by *c-myc* protein. *Cell* 1992; 69: 119-28.
14. Watanabe-Fukunaga R, Brannon CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferative disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992; 356: 314-17.
15. Warri AM, Huovinen RL, Laine AM, Martikainen PM, Harkonen PL. Apoptosis in toremifene-induced growth inhibition of human breast cancer cells in vivo and in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1412-18.
16. Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts and proteins of *bcl-2*, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5214-8.
17. Clark WH. Tumor progression and the nature of cancer. *Br J Cancer* 1991; 64: 631-44.
18. Doglioni C, Deitos AP, Laurino L, Chiarelli C, Barbareschi M, Viale G. The prevalence of *bcl-2* immunoreactivity in breast carcinoma and its clinicopathological correlates with particular reference to estrogen receptor status. *Virchows Archiv Pathol Anat* 1994; 424: 47-51.
19. Leek RD, Kaklamanis L, Pezella F, Gatter KC, Harris AL. *bcl-2* in normal human breast and carcinoma, association with estrogen receptor-positive, epidermal growth factor-negative tumors and in situ cancer. *Br J Cancer* 1994; 69: 135-9.
20. Hellemans P, van Dam PA, Weyler J, van Oosterom AT, Buytaert P, Marck EV. Prognostic value of *bcl-2* expression in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 1995; 75: 354-60.
21. Wang TTY, Phang J. Effects of estrogen on apoptosis pathways in human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res* 1995; 55: 2487-9.
22. Siziopikou KP, Prioleau JE, Harris JR, Schnitt SJ. *bcl-2* expression in the spectrum of preinvasive breasts lesions. *Cancer* 1996; 77: 499-506.
23. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-3.
24. Levine AJ, Momand J, Finlay C. The *p53* tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
25. Lane DP. *p53*, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
26. Davidoff AM, Kerns BJM, Iglehart D, Marks JR. Maintenance of *p53* alteration throughout breast cancer progression. *Cancer Res* 1991; 51: 2605-10.
27. Leslie KO, Howard P. Oncogenes and antioncogenes in human breast carcinoma. *Pathol Annu* 1992; 27 (Pt 1): 321-48.
28. Faille A, Cremoux P, Extra JM. *p53* mutations and overexpression in locally advanced breast cancers. *Br J Cancer* 1994; 69: 1145-50.
29. Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a *p53* dependent negative response element in the *bcl-2* gene. *Cancer Res* 1994; 54: 3131-5.
30. De Larco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 4001-5.
31. Wrann M, Bodmer S, De Martin R, et al. Transforming growth factor- β 1 induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J Cell Biol* 1990; 111: 673-84.
32. Massague J. The transforming growth factor- β family. *Annu*

- Rev Cell Biol 6: 1990; 597-641.
33. Norgaard P, Hougaard S, Poulsen HS, Thomsen MP. Transforming growth factor β and cancer. *Cancer Treat Rev* 1995; 21: 367-403.
 34. Rotello RJ, Lieberman RC, Purchio AF, Gersgebson LE. Coordinated regulation of apoptosis and cell proliferation by transforming growth factor- β 1 in cultured uterine epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3412-5.
 35. Oberhammer FA, Pavelka M, Sharma S, et al. Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and regressing liver by transforming growth factor- β 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5408-12.
 36. Wang CY, Eshleman JR, Willson JKB, Markowitz S. Both transforming growth factor- β and substrate release are inducers of apoptosis in a human colon adenoma cell line. *Cancer Res* 1995; 55: 5101-5.
 37. Mullauer L, Grasl-Kraupp B, Bursch W, Schulte-Hermann R. Transforming growth factor- β 1 induced cell death in preneoplastic foci of rat liver and sensitization by antiestrogen tamoxifen. *Hepatology* 1996; 23: 840-7.
 38. Arteaga CL, Caffey RJ. Transforming growth factor- β isoform in mammary neoplasms. *Hum Pathol* 1992; 23: 1-13.
 39. Russo IH, Russo I. Development stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7, 12-dimethylbenzanthracene. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61: 1439-49.
 40. van Bekkum DW, Broerse JJ, Hennen LA, Solleveld HA. The gene transfer-misrepair hypothesis of radiation carcinogenesis tested for induction of mammary tumors in rats. *Leuk Res* 1986; 10: 761-70.
 41. Tavassoli FA, Norris HJ. A comparison of the results of the long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductal hyperplasia of the breast. *Cancer* 1990; 65: 518-29.
 42. Gavrieli Y, Stermal Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
 43. Shou, M, Korzekwa KR, Krausz KW, et al. Specificity of cDNA expressed human and rodent cytochrome p450s in the oxidative metabolism of the potent carcinogen 7, 12-dimethylbenzanthracene. *Mol Carcinog* 1996; 17: 241-9.
 44. Rogers AE, Lee SY. Chemically induced mammary gland tumors in rats: modulation by dietary fat. In: Ip C, Birt DF, Rogers AE, Mettlin C, eds. *Dietary fat and cancer*. New York: Alan R Liss Ins, 1986; 255.
 45. Welsch CW. Host factors affecting the growth of carcinogen induced rat mammary carcinoma: a review and tribute to Charles Brenton Huggins. *Cancer Res* 1985; 45: 3415-43.
 46. Isaacs JT. Genetic control of resistance to chemically induced mammary adenocarcinogenesis in the rat. *Cancer Res* 1986; 46: 3958-65.
 47. Huggins C, Briziarelli G, Sutton H. Rapid induction of mammary carcinoma in the rat and the influence of hormones on the tumors. *J Exp Med* 1959; 109: 25-42.
 48. Beuving L. Mammary tumor formation within outgrowths of transplanted hyperplastic nodules from carcinogen-treated rats. *J Natl Cancer Inst* 1968; 40: 1287-91.
 49. van Zwieten MJ. The rat as animal model in breast cancer research. Boston, Martinus Nijhoff Publishers, 1984; 50-68.
 50. Magaud IP, Sargent J, Masson DY. Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake. *J Immunol Methods* 1988; 106: 95-100.
 51. Vuorio T, Warri A, Sandberg M, Alitalo K, Vuorio E. Expression of the c-Ha-ras and neu oncogenes in DMBA-induced, antiestrogen treated rat mammary tumors. *Int J Cancer* 1988; 42: 774-9.
 52. Kito K, Kihana T, Sugita A, et al. Incidence of p53 and Ha-ras gene mutations in chemically induced rat mammary carcinomas. *Mol Carcinog* 1996; 17: 78-83.
 53. Jerry DL, Butel JS, Donehower LA. Infrequent p53 mutations in 7,12-dimethylbenzanthracene induced mammary tumors in BALB/c and p53 hemizygous mice. *Mol Carcinog* 1994; 9: 175-83.
 54. Ruggeri B, DiRado M, Zhang SY, Bauer B, Goodrow T, Klein SA. Benzopyrene induced murine skin tumors exhibit frequent and characteristic G to T mutations in the p53 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1013-7.
 55. Shibata MA, Maroulakou IG, Jorcyk CL, Gold LG, Ward JM, Green JE. p53 independent apoptosis during mammary tumor progression in C(3)/SV40 large T antigen transgenic mice: suppression of apoptosis during the transition from preneoplasia to carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 2998-3003.
 56. Dalal B, Keown P, Greenberg AH. Immunocytochemical localization of secreted transforming growth- β 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastases of human mammary carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 381-9.