

## 신생랫드를 이용한 다장기 발암모델개발에 관한 연구 I

한범석<sup>1</sup>, 김대중<sup>1</sup>, 안병우<sup>1</sup>, 이국경<sup>1</sup>, 한익수<sup>1</sup>, 배종희<sup>2</sup>, 임창형<sup>3</sup>

<sup>1</sup>국립보건안전연구원 병리부, <sup>2</sup>제주대학교 농과대학, <sup>3</sup>서울대학교 수의과대학

(1991. 9. 16 접수)

신생랫드를 이용한 다장기 발암모델의 전암단계 병변에서 간장의 GST-P 활성도와 발암 과정에 영향을 미치는 phenobarbital (PB)의 발암촉진효과 및 병리조직학적 조건을 관찰하였다. 신생랫드를 150마리 3군으로 나누어 diethylnitrosamine (DEN : 100mg/kg.i.p.), N-methyl-N-nitrosourea (MNU : 20mg/kg.i.p.), N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine(DHPN : 0.1% D.W)을 각각 0, 3, 6 주에 투여하였다. 또한 PB(0.5% in basal diet)를 7주부터 계속 투여하여 8, 12, 20주에 경시적인 부검을 실시하였다. DMD(DEN, MNU, DHPN) + PB군과 DMD 단독 투여군과의 결과를 비교해보면 DMD + PB군이 DMD 단독 투여군에 비하여 체중의 변화는 20주에서 유의성 있는 감소를 보였으나 ( $P < 0.05$ ), 간장의 무게는 유의성 있는 증가를 보였다 ( $P < 0.01$ ). 간장의 GST-P양성 증식소 및 증식성결절의 수와 면적은 12주에 유의성 있는 증가를 보였다 ( $P < 0.05$ ). 폐포상피 및 감상선 상피세포의 증생은 20주에 유의성 있게 증가하였다 ( $P < 0.05$ ). 신생랫드를 이용한 다장기 발암모델에서 PB은 간장의 발암을 약한 정도로 촉진하며 그 적정시점은 12주경으로 판단된다.

## 서 론

종양을 조기에 진단하는 방법으로 신생동물을 사용한 모델이 개발되었는데 이는 시험 물질의 양을 줄일 수 있고 시험기간을 단축시킬 수 있으며 간부분절제술 (partial hepatectomy)의 효과를 볼 수 있는 잇점이 있다. (Peraino 등, 1981) Uchida와 Hirano (1979)는 신생 마우스에서 diethylnitrosamine과 phenobarbital의 투여로 간장과 폐장에 종양을 발생시켰고 phenobarbital이 간종양 발생을 촉진시켰다고 보고하였다. Peraino 등 (1981)은 암컷 신생 랫드에 diethylnitrosamine 및 phenobarbital 투여로 11주 만에, benzo(a)pyrene 및 phenobarbital의 투여로 19주만에 간종양을 발생시켰다고 보고하였다. 또한 Peraino 등 (1984)은 랫드에서 성별간의 차이를 알아본 결과 암컷이 수컷보다 높은 종양 발생이 있다고 보고하였다. Carter 등 (1985)은 마우스에서는 암컷보다 수컷에서 전암단계 증식소가 신속히 발생하였다고 보고하였다.

Tsuda 등 (1984)은 methylnitrosourea로 유발시킨 후 phenobarbital이 간장, 감상선, 전위 등에 특이적인 촉진효과가 있다고 보고하였고, 발암물질이 한 장기에만 국한된 것이 아니라

여러 장기에 촉진효과가 있다는 것을 증명하였다. Hiasa 등 (1985) 은 N-Bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine으로 유발시킨후 phenobarbital이 갑상선에 발암촉진효과가 있다고 보고하였다. Shirai 등 (1988) 은 N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)을 투여한 후 phenobarbital이 갑상선에 발암촉진효과가 있다고 보고하였다. Ito 등 (1988) 은 여러 발암유발물질인 diethylnitrosamine, methylnitrosourea 그리고 dihydroxy-di-methylnitrosourea 및 N-bis-(2-hydroxypropyl)nitrosamine을 투여한 후 phenobarbital 혹은 dibutylnitrosamine을 투여하여 간장, 폐장, 신장, 췌장, 방광등에 종양을 발생시켰다고 보고하였다.

전암단계 병변을 진단하는 면역조직화학적 염색 방법은 최근에 GST-P가 주목되고 있는데 이는 정상 간에서는 거의 검출할 수 없으나 전암단계 병변에서는 상당히 증가되며, 기존의 r-GT염색보다 특이성이 높은 것으로 알려져 있다 (Sato, 1988). 본 실험은 신생 랫드를 이용한 다장기 발암모델의 전암단계 병변에서 간에서의 GST-P활성도와 발암과정에 영향을 미치는 phenobarbital의 발암촉진효과 및 병리조직학적 변화를 관찰하기 위하여 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

국립보건안전연구원에서 생산한 Sprague-Dawley계 수컷 신생 랫드 150마리를 사용하였다. 이들 신생 랫드는 랫드용 케이지에 어미 2마리당 15-20마리를 넣어 포유시키면서 실험에 사용하였고, 정상대로 3주 후에 이유시켰으며, 이유 후에는 케이지당 5마리씩 사육하였다. 실험기간동안의 사육환경은  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 10\%$  를 유지하고 인공조명 (12시간 점등, 12시간 소등) 하에서 사육하였으며, 사료(실험동물용 펠렛사료, 제일제당사료)와 정제수는 자유로이 급여하였다.

### 실험설계 및 시험물질 투여

실험동물은 1군과 2군은 50마리, 3군은 40마리 4군은 10마리씩으로 나누어 배치하였다 (Text-Fig. 1). 실험 1군과 2군은 실험개시일에 간암유발물질인 diethylnitrosamine (DEN) 을 생리식염수에 용해시켜 체중 kg당 100mg을 복강내 투여하였고, 실험 3군과 4군은 생리식염수만을 투여하였다. 실험개시 3주 후에 실험 1군과 2군은 methylnitrosourea (MNU) 를 citrate buffered solution (pH 6.0) 에 녹여 체중 kg당 20mg을 3일 간격으로 4회 복강내 투여하였고 실험 3군과 4군은 citrate buffered solution만을 투여하였다.

실험개시 6주 후에 실험 1군과 2군은 N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine을 0.1% 농도로 하여 1주일간 급여하였고 실험 3군과 4군은 정제수만을 급여하였다. 실험개시 7주 후에 실험 1군과 3군은 phenobarbital을 0.05% 농도로 기초사료에 혼합하여 13주간 급여하였고 실험 2군과 4군은 기초사료만을 급여하였다. 여러장기의 암의 발생 관찰을 위해 8주와 12주에 실험 1군과 2군은 15마리, 실험 3군은 10마리를 부검하였고, 20주에는 실험 1군과 2군 및 3군은 20마리, 실험 4군은 10마리를 부검하여 검사하였다. 검사대상동물은 부검전 24시간 절식을 시켰다. 실험 2군은 phenobarbital에 대한 대조군으로 설정하였고, 실험 3군은 발암유발인자들에 대한 대조군으로 설정하였으며 실험 4군은 무처리 대조군으로 설정하였다.

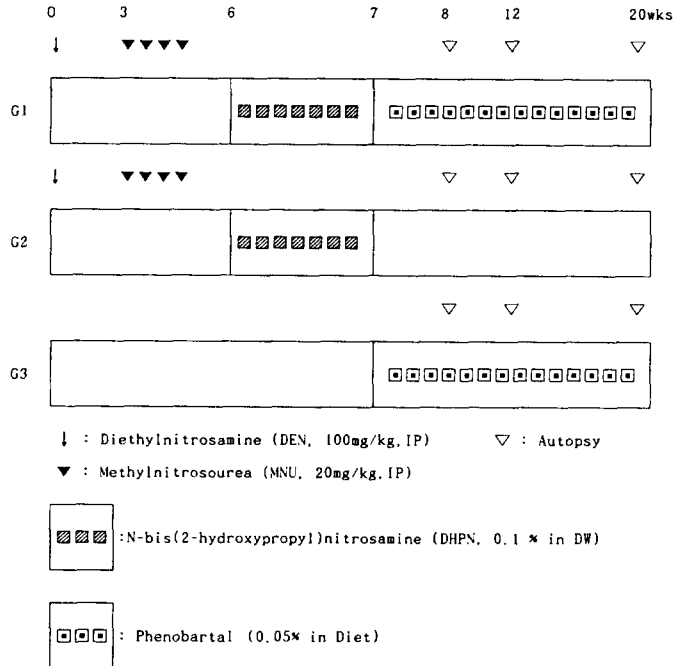
### 병리조직학적 검사

간장, 위장, 신장, 폐장, 갑상선, 장, 고환, 방광 및 흉선등을 육안으로 관찰한 후에 두께 2-3mm로 조직을

채취하여 10% phosphate buffered formalin으로 24시간 고정하고 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하여 hematoxylin & eosin 염색을 하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

GST-P 검사

간장의 좌엽과 중간엽 및 우엽을 육안적으로 관찰한 후 두께 2-3mm로 조직을 채취하여 면역조직 화학적 염색을 위해 cold acetone에 3일간 고정한 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매하였다. 간조직내의 GST-P 양성증식소 및 증식성 결절의 분포를 확인하기 위해 avidin biotin peroxidase complex (ABC) 법을 이용하여 염색을 하였다(Hsu 등, 1981 ; Ogiso 등, 1985). Rabbit anti-GST-P antibody (1차 항체) 는 일본 Hirosaki 대학 의학부 (K. Sato, 교수) 로 부터 공급받았으며 0.01M phosphate buffered saline (PBS) 으로 4000배 희석한 후 bovine serum albumin (BSA) 이 0.1% 되도록 첨가하여 냉장보관 하면서 사용하였다. Biotinylated goat anti-rabbit IgG (2차항체) 와 avidin biotin peroxidase complex (ABC) 는 Vectastatin Elite ABC Kit (PK-6101, Vector Laboratories) 를 사용하였다. 각 조직 절편들을 10분간 3% hydrogen peroxidase(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol)에 담그어 내 peroxidase를 제거하였으며 normal blocking serum은 60배 희석, 2차항체는 200배 희석하여 사용하였다. 발색반응을 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 0.06% 첨가된 diaminobenzidine (DAB : 0.2 M Tris buffer, pH 7.4) 과정을 거친후 hematoxylin으로 핵을 대조염색하여 광학 현미경으로 검사하였다.



### 자료의 분석

GST-P 양성증식소 및 증식성 결절의 수와 면적을 측정하기 위하여 칼라 화상영상분석기 (IBAS, Kontron Co. Ltd., Germany) 를 이용하여 간조직의 단위면적 (cm<sup>2</sup>) 당 직경 0.2mm 이상의 GST-P 양성증식소 및 증식성 결절의 수와 면적 (mm<sup>2</sup>) 을 측정하였다. 체중, 장기무게, 사료섭취량, GST-P 양성증식소 및 증식성 결절의 수와 면적 및 병리 조직학적 변화의 유의성을 검정하기 위하여 Student's t-test, Chi-square, cumulative Chi-square test로 통계처리하였다.

## 결 과

### 체중 및 장기 무게의 변화

20주에 측정된 평균체중은 발암유발물질과 phenobarbital을 투여한 실험 1군이 발암유발물질만을 투여한 실험 2군에 비해서 유의성 있게 감소하였다 (P<0.001, Table 1). 체중에 대한 간의 무게비는 phenobarbital 을 투여한 실험 1군과 3군은 phenobarbital을 투여하지 않은 2군과 4군에 비하여 현저한 증가를 (P<0.001) 보였다. 다른 장기의 무게비는 유의성이 인정되지 않았다.

### 육안 및 광학현미경적 소견

#### (1) 육안적 소견

발암유발물질로서 DENA (100 mg/kg), MNU (20mg/kg), DHPN (0.01%) 을 투여한 후 phenobarbital (0.05%) 을 투여한 실험 1군의 경시적 육안소견은 다음과 같다. 실험개시 후 8주에 검사동물 일부의 간표면에서 침침대의 회백색 반점이 관찰되었으며 간장은 종창되어

Table 1. Final body weights and relative liver weights of the rats at 20th weeks of age.

Group Treatment	No. of rats	Final body weights (gm)	Relative liver weights (gm/100gm b.w.) <sup>a</sup>
DMD <sup>b</sup> +PB	20	333.9±36.3***	3.51±0.46***
DMD alone	20	423.6±29.4	2.68±0.30
PB	20	378.0±35.9	3.38±0.20

a : Each value is mean±SD.

b : DMD represents DEN + MNU + DHPN treatment.

\*\*\* : Significantly different from DMD alone group at P<0.001.

변연이 둔한감을 보였다. 실험개시 후 12주에는 침침대의 회백색 반점이 8주에 비해 다수 관찰되었다. 실험개시 후 20주에도 간 표면에 속립대의 회백색 반점이 다수 관찰되었으며 어느 간장에는 중간엽에 직경 0.7-0.8cm 가량의 돌출부가 관찰되었다.

Phenobarbital을 투여하지 않고 발암유발인자들 만을 투여한 실험 2군의 경시적 육안 소견은 다음과 같다. 실험개시 후 8주에는 간장의 표면에 침침대의 회백색 반점이 소수 관찰되었으며 변연이 둔하여 종창된 간이 있었다. 실험개시 후 12주에는 8주에 비하여 회백색 반점이 다수 산재하였으며 실험개시 후 20주에는 속립대의 회백색 반점이 다수 관찰되었다.

Phenobarbital만을 투여한 실험 3군의 경시적 육안소견으로서 간장은 종창되어 변연이 둔한 감을 보였다. 다른 장기에서는 실험군 전체에서 특징적인 육안적 소견이 관찰되지 않았다.

## (2) 현미경적 소견

간장에서 대부분의 증식소는 주위의 정상 간조직과는 경계가 뚜렷하지 않았다. Clear cell foci의 세포질은 크고 다각형이며 투명하였다. 또한 핵들은 증대되어있고 핵소체가 뚜렷하였다 (Fig. 1). Eosinophilic cell foci의 세포질은 거대하며 호산성을 보이고 있었다. 핵들도 증대되어있고 핵소체도 뚜렷하였다 (Fig. 2). 증식성 결절들은 주위 정상 간조직과 경계가 뚜렷하였고 실질조직을 압박하고 있었다. 증식성 결절내의 세포들은 증대된 해파 선명한 핵소체를 가지고 있으며 다수의 핵소체를 가지고 있는 세포들도 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). 간종양은 주위 정상조직과 한계가 뚜렷하며 세포는 다소 미분화되어 있고 핵들의 크기는 다양하며 변성, 괴사 및 주위 정상조직을 압박하는 소견이 관찰되었다(Fig. 4, 5). 실험 1군과

**Table 2. The incidence of the rats with preneoplastic and neoplastic lesions in the livers.**

Lesions	Treatment (percentage) <sup>a</sup>					
	DMD <sup>b</sup> +PB			DMD alone		
	8	12	20(wk)	8	12	20(wk)
Clear cell foci	12/15(80)**	13/15(87)	10/20(50)	8/15(53)	13/15(86)	9/20(45)
Eosinophilic foci	3/15(20)	4/15(27)	16/20(80)**	2/15(13)	3/15(21)	12/20(60)
Hyperplastic nodules	1/15(7)	3/15(20)*	7/20(25)**	1/15(7)	1/15(7)	3/20(15)
Hepatoma	0(0)	0(0)	1/20(5)	0(0)	0(0)	1/20(5)

a : Each value is incidence ratio.

b : DMD represents DEN + MNU + DHPN treatment.

\*, \*\* : Significantly different from the value of DMD alone group at P < 0.05, P < 0.01.

2군에서 12주부터 담관상피 세포의 증생, 담관의 숫적인 증가, 담관주위의 겹재직 증식 등이 관찰되었다 (Fig. 6).

간의 전암단계 및 암 병변의 발생빈도는 Table 2와 같다. 발암유발인자들과 phenobarbital을 투여한 실험 1군이 발암유발물질만을 투여한 실험 2군에 비해 clear cell foci는 8주에서 ( $P < 0.001$ ), eosinophilic cell foci는 20주에서 ( $P < 0.01$ ), 증식성 결절은 12주 ( $P < 0.05$ )와 20주 ( $P < 0.01$ )에서 각각 유의성 있는 증가를 보였다. Hepatoma는 20주에 실험 1군과 2군에서 각각 1예가 발생되었다.

폐장에서는 폐포상피세포의 증생이 관찰되었고 (Fig. 8, 9) 일부 갑상선의 여포상피세포의 증생이 관찰되었다 (Fig. 12). 방광상피세포는 5-9층 정도의 상피세포 증생이 관찰되었으며, 일부증대된 핵들도 관찰되었다 (Fig. 10, 11).

다른 장기의 증생 발생 빈도는 Table 3과 같다. 발암유발물질과 phenobarbital을 투여한 실험 1군이 발암유발 물질만을 투여한 실험 2군에 비해서 20주에서 상피세포증생 빈도가 폐장과 갑상선에서 유의성 있게 증가함이 인정되었다 ( $P < 0.05$ ).

#### GST-P 양성증식소 및 증식성 결절의 수와 면적

GST-P에 대한 면역조직화학적 염색으로 정상 간세포와 구별이 되는 GST-P 양성증식소 및 증식성 결절들을 관찰할 수 있었다 (Fig. 7). 각 실험군의 간조직 ( $\text{cm}^2$ ) 당 GST-P 양성증식소 및 증식성 결절의 수와 면적 ( $\text{mm}^2$ )에 대한 경시적인 변화는 Table 4 및 Table 5와 같다. GST-P 양성증식소의 수는 시간이 경과함에 따라 증가하며 실험 1군이 실험 2군에 비하여 12주에 유의성 있는 증가가 인정되었다 ( $P < 0.05$ ). GST-P 양성증식소의 면적도 시간이 경과함에 따라 증가하며 실험 1군이 실험 2군에 비하여 8주와 12주에 각각 유의성 있는 증가가 인정되었다 ( $P < 0.05$ ).

**Table 3. The incidence of the rats with hyperplasia in the other organs.**

Organs	Treatment (percentage) <sup>a</sup>					
	DMD <sup>b</sup> + PB			DMD		
	8	12	20	8	12	20
Lung	1/15(7)	4/15(20)	7/20(35)**	0(0)	3/15(21)	4/20(20)
Thyroid gland	0(0)	3/15(20)	4/20(20)**	0(0)	2/15(14)	2/20(10)
Urinary bladder	0(0)	2/15(13)	2/20(10)	0(0)	1/15(8)	2/20(10)
Stomach	0(0)	1/15(7)	1/20(5)	0(0)	0(0)	0(0)

a : Each value is incidence ratio.

b : DMD represents DEN + MNU + DHPN treatment.

\* : Significantly different from the value of DMD alone group at  $P < 0.05$ .

**Table 4.** The number of GST-P<sup>+</sup> foci and hyperplastic nodules in the rat livers.

Treatment	Number of GST-P <sup>+</sup> foci and nodules/cm <sup>2</sup>		
	8	12	20
DMD + PB	3.34±1.48	9.09±4.23*	10.65±6.3
DMD alone	2.96±2.31	5.70±3.02	9.53±5.6

\* : Significantly different from the value of DMD alone group 2 at P<0.05.

**Table 5.** The average areas of GST-P<sup>+</sup> foci and hyperplastic nodules in the rat livers.

Treatment	Areas of GST-P <sup>+</sup> foci and nodules (mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )		
	8	12	20
DMD + PB	0.17±0.09*	0.43±0.19**	0.67±0.47
DMD alone	0.08±0.05	0.28±0.13	0.54±0.44

\*, \*\* : Significantly different from the value of DMD alone group 2 at P<0.01.

## 고 찰

암을 유발시키는 여러 화학물질 중에서 nitrosamine 계통은 뇌와 간장, 신장, 위, 장 및 방광등 여러 장기에 종양을 일으킨다고 알려져 있으며 본 실험에서 사용한 diethylnitrosamine은 강력한 간암유발물질이고 methylnitrosourea (MNU)는 갑상선과 방광에, dihydroxydi-propylnitrosamine (DHPN)은 갑상선, 폐장, 신장 및 방광에 유발을 일으키는 물질로 알려져 있다 (Coombs, 1986 ; Ito 등, 1988). 이 발암물질들은 DNA에 직접 결합하거나 또는 생체내에서 활성화되어 결합하는 두 가지 방식이 있다. Diethylnitrosamine (DEN)은 부분적인 a-hydroxylation에 의해서 강력한 진지진화성을 갖는 ethyldiazonium hydroxide로 전환되어 DNA의 핵 친화성 자리 (nucleophilic site)에 쉽게 결합한다 (Coombs, 1986). 또 methylnitrosourea (MNU)는 자발적으로 diazohydroxide hydroxide를 형성하여 직접 결합한다 (Coombs, 1986). 이런 발암물질이 DNA의 어느 한 복제시기에 결합하면 변형된 DNA 상태로 고정되어 독자적인 세포증식으로 증식소가 형성된다(Pereira, 1985). 그러나 이러한 유발단계만으로는 암이 발현되기에는 어렵고 여러 조건이 필요하다.

암 발생을 촉진시키기 위하여 CCl<sub>4</sub>와 같은 독성물질에 의한 세포괴사 및 상해 (Solt 등, 1983), 간부분절제술 (Hasegawa 등, 1986), 2-acetylaminofluorene 같은 발암물질에 의한 세포의 선택적인 증식 (Solt와 Farber, 1976), 기타 여러 화학물질 (Pitot, 1978) 및 호르몬에

의한 촉진방법 (Ghia와 Mereto, 1989; Cameron 등, 1982)이 있다.

본 실험에서 사용한 phenobarbital의 효과를 살펴보면, phenobarbital의 지속적인 투여는 간장의 전암단계 병변을 촉진한다. 이는 첫째, 증식소의 세포분열은 정상 세포보다 왕성한데 여기에 phenobarbital을 투여하면 세포증식이 더욱 촉진되고 둘째, phenobarbital이 간에서 변조된 간세포 (altered hepatocyte)의 세포소멸 (apoptosis)의 발생빈도를 감소시킴으로 결과적으로 그들의 수명을 연장시켜 증식소의 수를 증가시키고 (Schulte-Hermann, 1985), 셋째, lipophilic 한 화합물의 일종인 phenobarbital은 대사과정중에 cytochrome P-450-PB 및 여러 대사 활성효소들을 증가시켜 증식소에서 변조된 세포들의 증생을 촉진시킨다 (Schulte-Hermann, 1984).

본 실험에서 phenobarbital을 투여한 군이 phenobarbital을 투여하지 않은 군에 비하여 간장의 무게가 증가하였는데 이는 phenobarbital이 간에서 DNA 및 RNA의 합성을 촉진함과 동시에 smooth endoplasmic reticulum을 증식시키기 때문이다 (Peraino 등, 1975). Phenobarbital은 갑상선에도 촉진효과가 있는데 이에 대한 기전은 잘 알려져 있지 않지만 N-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine으로 유발한 갑상선 조직에서 phenobarbital이 갑상선 호르몬 생성을 억제시키고, 이에 대한 반응으로 pituitary gland의 TSH 합성과 방출이 증가되어 갑상선 증을 일으킬 수 있다고 하였다 (Hiasa 등, 1985).

간장에서 발생하는 전암단계 병변에서 초기에 clear cell 증식소들과 호산성 세포증식소들이 증가하는데 clear cell 증식소들의 세포는 다각형이고 현저하게 종창되어 있으며 과다한 glycogen을 저장하고 있는 비정상적인 세포이다 (Bannasch 등, 1985). 핵들은 작고 치밀하며 다소 덜 농축된 chromatin과 뚜렷한 핵소체를 갖고 있다. 호산성 세포 증식소들은 세포질이 smooth endoplasmic reticulum의 증식으로 "ground glass" 형태로 나타나고 많은 glycogen을 저장하고 있으며 핵들은 확장되어 있고 형태는 clear cell 증식소의 핵들과 유사하다 (Porter와 Bruni, 1959).

본 실험에서 clear cell 증식소들은 12주까지는 증가하다 20주에는 감소를 보였고 호산성 세포증식소들은 20주까지 증가하는 양상을 보이고 있다. 전암단계 병변에서 clear cell 증식소들이 먼저 나타나고 호산성 세포증식소들이 연이어 나타나는데 이 현상은 호산성 세포가 clear cell로부터 발달되었다는 사실과 같다 (Bannasch 등, 1985).

본 실험에서 폐장의 조직학적 소견은 주로 폐장의 폐포상피세포의 증생이다. 이는 폐포들에 인접해 있는 선상으로 배열된 입방형 세포들의 수의 증가에 의한 것이다. 폐포상피의 증생을 의미하는 입방상피세포들은 Boorman (1985)이 관찰한 대로 type II pneumocyte와 유사하다.

방광의 조직학적 소견은 주로 방광상피세포의 증생이다. Kunze (1985)의 분류에 의하면 상피세포의 증생은 단순형증생 (simple hyperplasia), 유두상증생 (papillary hyperplasia), 결절상증생 (nodular hyperplasia), 전이성증생 (metaplastic hyperplasia), 재생성증생 (regenerative hyperplasia)으로 구분할 수 있는데, 본 실험에서 나타난 증생은 simple hyperplasia이다.

갑상선의 조직학적 소견은 주로 여포상피세포의 증생이다. Boorman (1985)의 관찰에 의하면 여포상피세포의 증생은 여포를 따라 선상으로 배열된 세포들은 주위의 인접한 갑상선



실질 조직을 압박하고 핵이 대체로 hyperchromatic 하며 단순형 세포에서부터 입방형 세포까지 다양한 구성을 하고 있다. 본 실험에서 나타난 여포상피세포의 증생은 인접한 감상선 실질조직을 다소 압박하며 일부 핵들이 hyperchromatic한 소견이 보였다.

랫드 간에서 화학적 발암물질에 의해 유발된 간암 병변의 초기 변화의 지표효소로서 glutathione S-transferase placental form (GST-P) 이 알려져 있다. GST-P는 glutathione S-transferase group의 한 효소로서 전자친화성이 있는 화합물을 해독하는 작용이 있다 (Tatematsu 등, 1987). GST-P는 전암단계 병변인 증식소와 증식성 결절 및 분화된 간종양에 특이한 지표효소 물질이다(Sato 등, 1984). 또한 초기변화 지표효소인  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT) 보다 특이성이 높은 것으로 알려져 있는데 이는  $\gamma$ -GT 양성증식소는 반드시 GST-P 양성증식소에도 검출이 되나 GST-P 양성증식소가 있는 곳에서  $\gamma$ -GT 양성증식소는 검출되지 않는 경우가 5-10% 가량 되기 때문이다 (Tatematsu 등, 1985).

본 실험에서는 GST-P를 지표효소로 삼아 ABC 법을 이용하여 전암병변을 확인하였으며 간조직 단위면적 ( $\text{cm}^2$ ) 당 전암병변의 수와 면적 ( $\text{mm}^2$ ) 을 대조군과 비교 분석함으로써 암발생과정에 미치는 phenobarbital의 영향에 대해서 알아 보았다. GST-P 양성증식소의 수와 면적에 관하여는 12주경에 실험 1군이 실험 2군에 비하여 유의성 있게 증가하는 것으로 보아 전암단계 병변에서 GST-P에 의한 phenobarbital의 발암촉진 효과의 적정시점은 이 모델에서 12주경으로 판단된다.

## 결 론

신생 랫드를 이용한 다장기 발암모델의 전암단계병변에서 phenobarbital이 발암과정에 미치는 효과, 간장의 GST-P 활성화도 및 병리조직학적 변화는 다음과 같다.

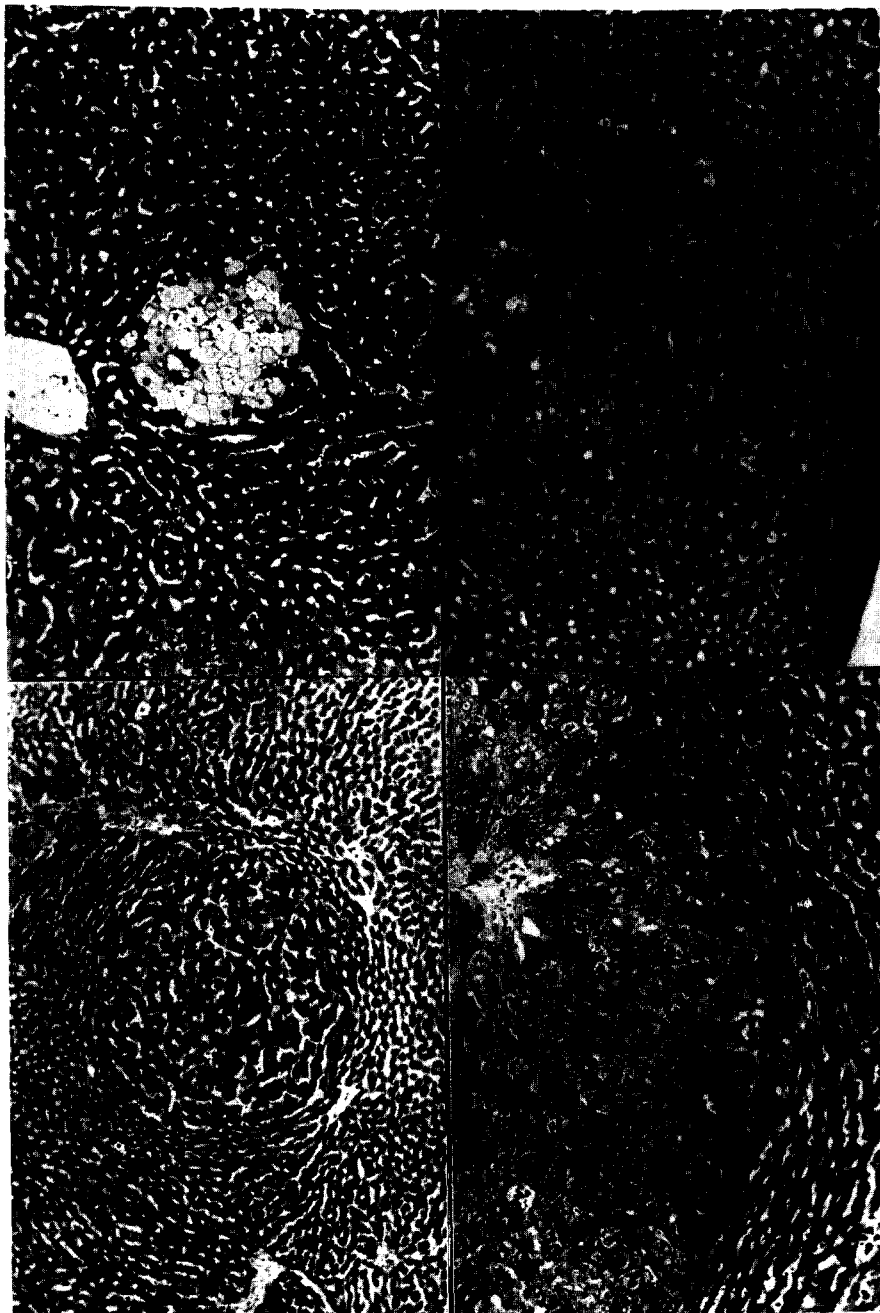
위 모델에서 phenobarbital의 발암 촉진효과는 첫째, 간장의 GST-P 양성증식소의 수와 면적은 12주에 유의성 있는 증가를 보였다 ( $P<0.05$ ). 둘째, 20주의 체중은 유의성 있는 감소를 보였으나 ( $P<0.05$ ), 간장의 무게는 유의성 있는 증가를 보였다 ( $P<0.01$ ). 셋째, 폐포상피세포 및 감상선 상피세포의 증생은 20주에 유의성 있게 ( $P<0.05$ ) 증가하였다.

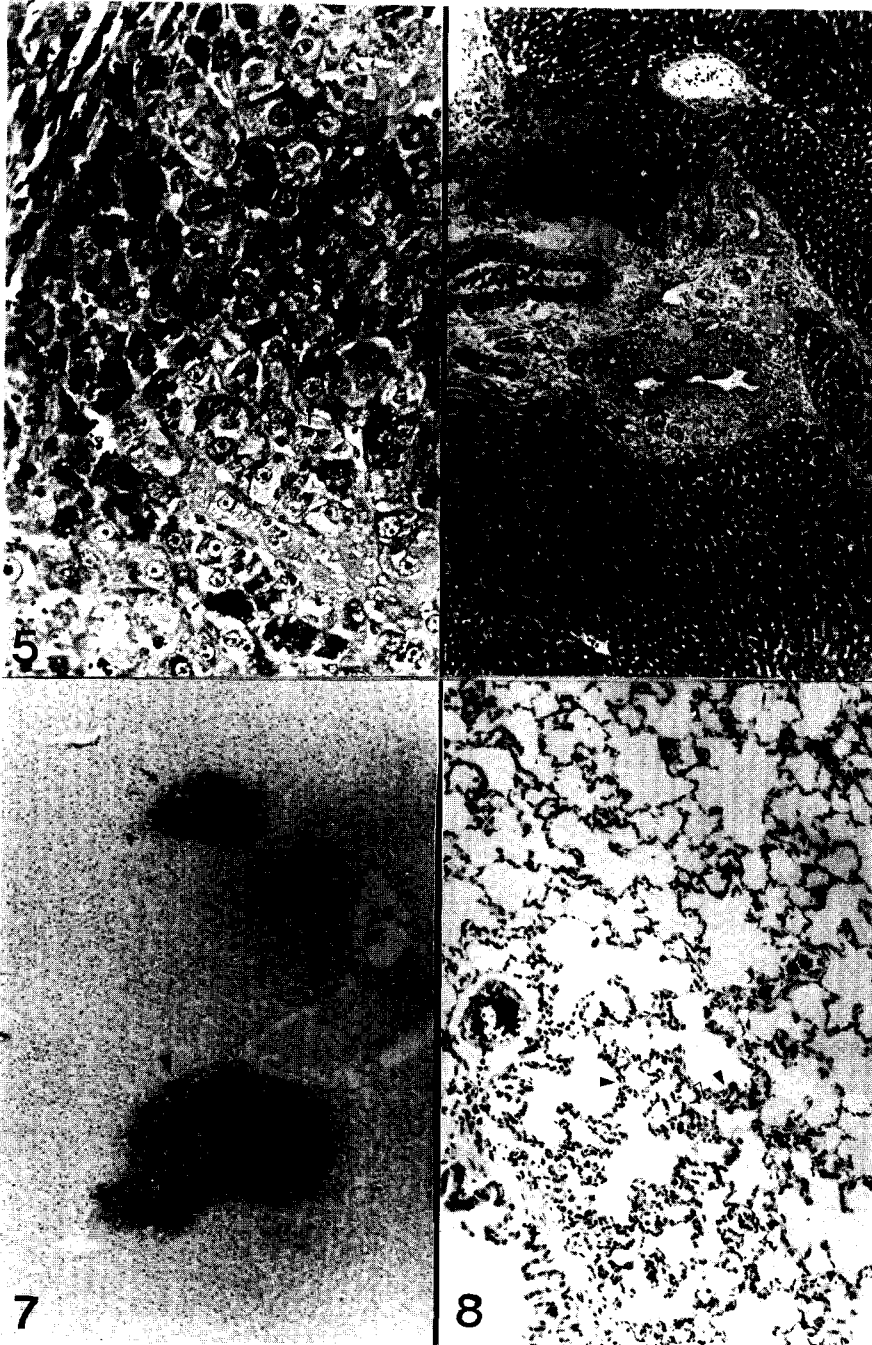
## REFERENCES

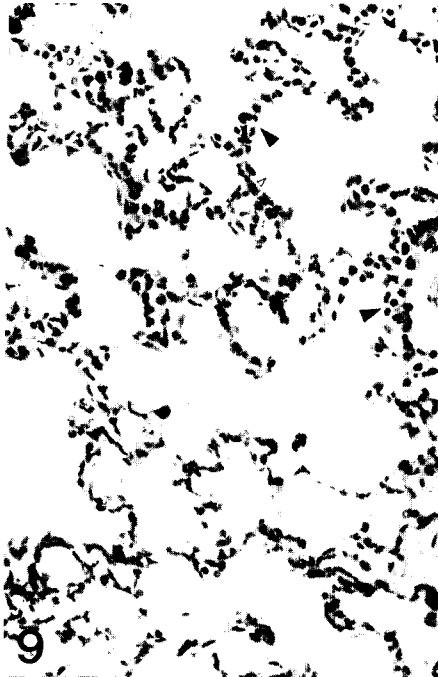
1. Bannasch, P., H. Zerban, and H.I. Hacker, (1985): Foci of altered hepatocyte, rat *In: Monograph on pathology of laboratory animal* (T.C. Jones, U. Mohr, and R.D. Hunt, editors). Springer-Verlag Inc., Berlin Heidelberg, 10-30.
2. Boorman, G.A., (1985): Bronchiolar and alveolar hyperplasia, lung, rat *In: Monograph on pathology of laboratory animal* (T.C. Jones, U. Mohr, and R.D. Hunt, editors). Springer-Verlag Inc., Berlin Heidelberg, 177-179.
3. Cameron, R.G., K. Imaida, H. Tsuda, N. Ito, (1982): Promotive effect of steroid and bile acids on hepatocarcinogenesis. *Cancer research* 42: 426-428.
4. Carter, K.C., A.J. Ganodolfi, I.G. Sipes, (1985): Characterization of dimethylnitrosamine-induced focal and nodular lesions in the livers of newborn mice. *Toxicol. pathol.* 13: 3-9.

5. Coombs, M.M., (1986): Organ specificity in tumor initiation and complete carcinogenesis (including species variation) *In: Target Organ Toxicity* (G.M. Cohen, editor). CRC press Inc., Boca Raton, 181-208.
6. Ghia M., and E. Mereto, (1989): Induction and promotion of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase positive foci in the liver of female rats treated with ethinyl estradiol, clomiphene, tamoxifen and their associations. *Cancer Letters* 46: 195-202.
7. Hasegawa, R., H. Tsuda, T. Shirai, Y. Kurata, A. Masuda, and N. Ito, (1986): Effect of timing of partial hepatectomy on the induction of preneoplastic liver foci in rats given hepatocarcinogens. *Cancer Letters* 32: 15-23.
8. Hsu, S.M., L. Raine, and H. Fanger. (1981): Use of Avidin-Biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (AAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-580.
9. Hiasa, Y., Y. Kitahori, N. Konishi, T. Shimoyama, and J. Chung-lin, (1985): Sex differential and dose dependence of phenobarbital promoting activity in N-Bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine-initiate tumorigenesis in rats. *Cancer Res.* 45: 4087-4090.
10. Ito, N., K. Imaida, H. Tsuda, M. Shibata, T. Aoki, J. Lauro, and S. Fukushima, (1988): Wide-spectrum initiation models: Possible applications to medium term multiple organ bioassays for carcinogenesis modifiers. *Gann.* 73: 413-417.
11. Kunze, E., (1985): Hyperplasia, Urinary bladder, Rat *In: Monograph on pathology of laboratory animal* (T.C. Jones, U. Mohr, and R.D. Hunt, editors). Springer-Verlag Inc. Berlin Heidelberg, 291-310.
12. Ogiso, T., M. Tatematsu, S. Tamano, H. Tsuda, and N. Ito, (1985): Comparative effect of carcinogens on the induction of placental glutathione S-transferase-positive liver nodules in a short-term assay and of hepatocellular carcinoma in a long term assay. *Toxicol. Pathol.* 13: 257-265.
13. Peraino, C., R.J. Michael, E. Staffeldt, and P. Christopher, (1975): Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantion, and dichlorodiphenyl trichloroethane on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat. *Cancer Res.* 35: 2884-2890.
14. Peraino, C., E. Staffeldt, and V.A. Ludeoman, (1981): Early appearance of histochemically altered hepatocyte foci and liver tumors in female rats treated with carcinogens one day after birth. *Carcinogenesis* 2: 463-465.
15. Peraino, C., E.F. Staffeldt, B.A. Carnes, V.A. Ludeoman, J.A. Blomquist, and S.D. Vesselinovitch, (1984): Characterization of histochemically detectable altered hepatocyte foci and their relationship to hepatic tumorigenesis in rats treated once with diethylnitrosamine or benzo(a)pyrene within one day after birth. *Cancer Res.* 44: 3340-3347.
16. Pereira, M.A., (1985): Rat liver foci assay *In: Handbook of Carcinogen Testing* (H.A. Milman, and E.K. Weisburger, editors), Noyes Publ. 152-178.
17. Pitot, H.C., L. Barsness, and T. Goldsworthy, (1978): Biochemical characterization of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. *Nature* 271: 456-457.
18. Porter, K.R., and C. Bruni, (1959): An electron microscope study of the early effects of 3'-Me-DAB on rat liver cells. *Cancer Res.* 19: 997-1009.

19. Sato, K., A. Kitahora, K. Satoh, T. Ishikawa, M. Tatematsu, and N. Ito, (1984): The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Gann.* 75: 199-202.
20. Schulte-hermann, R., I. Timmermann-Trosiener, J. Schuppler, (1984): Aberrant expression of adaptation to phenobarbital may cause selective growth of foci of altered cells in rat liver. *In: Mechanisms and etiology of tumor promotion* (L.K. Borzsony, N.E. Day, and M. Yamasaki, editors). IARC Scientific Publication, 67-75.
21. Schulte-Hermann, R., (1985): Tumor promotion in the liver. *Arch. Toxicol.* 57: 147-158.
22. Shirai, T., A. Masuda, K. Imaida, T. Ogiso, and N. Ito, (1988): Effects of phenobarbital and carbazole on carcinogenesis of the lung, thyroid, kidney and bladder of rats pretreated with N-Bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine. *Gann.* 73: 413-417.
23. Solt, D., and E. Farber, (1976): New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 263: 701-703.
24. Solt, D.B., E. Cayama, H. Tsuda, K. Enmoto, G. Lee, and E. Farber, (1983): Promotion of liver cancer development by brief exposure to dietary 2-acetaminoflourene plus partial hepatectomy or carbon tetrachloride. *Cancer Res.* 43: 188-191.
24. Tatematsu, M., H. Tsuda, T. Shirai, T. Masui, and N. Ito, (1987): Placental Glutathione S-transferase (GST-P) as a new marker for hepatocarcinogenesis *in vivo* short-term screening for hepatocarcinogens. *Toxicol. Pathol.* 15: 60-68.
25. Tsuda, H., T. Sakata, T. Shirai, Y. Kurata, S. Tamano, and N. Ito, (1984): Modification of N-nitrosomethylurea initiated carcinogenesis in the rat by subsequent treatment with antioxidants, phenobarbital and ethinyl estradiol. *Cancer Letters* 24: 19-27.
27. Uchida, E., and I. Hirono, (1979): Effect of phenobarbital on induction of liver and lung tumors by dimethylnitrosamine in newborn mice. *Gann.* 70: 639-644.







- Fig. 1. Clear cell focus in the liver composed of considerably swelling hepatocytes. H&E stain, X 125.
- Fig. 2. Eosinophilic cell focus in the liver composed of cells with eosinophilic cytoplasm. H&E stain, X 125.
- Fig. 3. A hyperplastic nodule in the liver of rat treated with DENA, MNU, DHPN and phenobarbital. H&E stain, X 125.
- Fig. 4. Hepatoma composed of undifferentiated cell (arrows), cell necrosis (arrow head) and compressed normal tissue. H&E stain, X 200.
- Fig. 5. Magnification of Fig. 4 showed pleomorphism and swelling of nuclei (arrow heads). H&E stain, X 400.
- Fig. 6. Bile duct hyperplasia in the rat treated with DENA, MNU, DHPN and phenobarbital. H&E stain, X 100.
- Fig. 7. GST-P positive foci (arrow) and hyperplastic nodule (arrow heads) in the rat liver treated with DENA, MNU, DHPN and phenobarbital at 20th weeks. Avidin Biotin Peroxidase complex (ABC) stain, X 100.
- Fig. 8. Hyperplasia of pulmonary alveolar epithelium (arrow heads) at 20th weeks in the rat. H&E stain, X 125.
- Fig. 9. Magnification of Fig. 8 showed cuboidal epithelial hyperplasia of pulmonary alveolar epithelium (arrow heads). H&E stain, X 100.
- Fig. 10. Hyperplasia of urinary bladder epithelium (arrow heads) at 20th weeks in the rat. H&E stain, X 125.
- Fig. 11. Magnification of Fig. 10 showed multiple layer of urinary bladder epithelium (arrow heads) and swelling of nucleus. H&E stain, X 200.
- Fig. 12. Hyperplasia of thyroid glandular epithelium (arrow head) at 20th weeks in the rat. H&E stain, X 200.

## Medium-Term Multiorgan Bioassays in Newborn Rats I

**Beom Seok Han, Dae Joong Kim, Byeong Woo Ahn, Kook Kyung Lee  
Ik Soo Han, Jong Hee Bae\*, Chang Hyeong Lim\*\***

*National Institute of Safety Research, Seoul 122-020*

*\*College of Agriculture, Jeju National University, Jeju 690-121*

*\*\*College of Veterinary Medicine, Seoul National University,  
Suwon 440-744, Korea*

The present study was to investigate the promoting effects of phenobarbital on carcinogenesis, the optimum point of GST-P positive foci and the histopathological changes in preneoplastic lesion of DMD model with newborn rat. A total of 140 rats were divided into 3 groups. Two groups (group 1, 2) were given DEN (100mg/kg, i.p.), MNU (20mg/kg, i.p.), DHPN (0.1% in D.W.). Another group was given saline alone. Two groups (Group 1, 3) were given phenobarbital (0.05% in diet) during 13 weeks. Other group were given basal diet alone. All rats were sacrificed at 20 weeks of age. Excised organs were fixed in 10% buffered formalin solution for routine staining. And also liver was fixed in cold acetone, embedded in paraffin for immunohistochemical staining.

The promoting effects of phenobarbital on the development of GST-P positive foci and hyperplastic nodules were shown at 12 weeks of age only. The body weight changes ( $P < 0.05$ ) and the relative liver weight changes ( $P < 0.01$ ) were significantly decreased and increased, respectively. Hyperplasia of pulmonary alveolar epithelium and thyroid glandular epithelium were observed ( $P < 0.05$ ).