

흰쥐 간발암화 과정에서의 산소유리기의 동태

김형춘^{#1} · 전완주¹ · 이현우¹ · 권명상² · 송계용³ · 주왕기¹

강원대학교 약학대학¹, 축산대학² 및 중앙대학교 의과대학³

(Received March 26, 1992)

Oxyradical Formation during the Hepatocarcinogenesis in Rat

Hyoung-Chun Kim^{#1}, Wan-Jhoo Chun¹, Hyun-Woo Lee¹, Myung-Sang Kwon²
Kye-Yong Song³ and Wang-Kee Jhoo¹

¹College of Pharmacy and ²College of Animal Agriculture, Kangweon National University, Chun Cheon 200-701, Korea

³College of Medicine, Chung Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract—This study investigated the hypothesis that carcinogen-induced elevation of oxyradical during the hepatocarcinogenesis in rat. The hepatic preneoplastic lesions in the Sprague-Dawley rats were induced by the carcinogen treatment such as diethylnitrosamine(DEN) and acetylaminofluorene(AAF) in combination with partial hepatectomy(PH). The liver sample was taken at 2, 6, 10 and 16 months after carcinogen treatments followed by PH. Carcinogen treatments initially increased the indices of oxidative damage(activities of xanthine oxidase and production rates of superoxide anion, microsomal hydrogen peroxide, hydroxyl radical) in the liver compared to PH groups. However, cytosolic hydrogen peroxide did not change significantly throughout the full time period. Of hydrogen peroxide scavenger, the catalase was remained lower than PH groups, whereas the peroxidase was increased after carcinogen treatments. Morphologically, the immunohistochemical analysis with glutathione-S-transferase of a placenta form(GSTP) antibody was used to detect the induction of preneoplastic nodules. During the hepatocarcinogenesis, both production rate of hydroxyl radical and activity of glutathione-S-transferase(GST) markedly increased with the appearance of the preneoplastic nodule. These results indicated that the hydroxyl radical of reactive oxygen species seemed to have a major influence on the hepatocarcinogenesis and the effect of time after removal of the carcinogen also appeared to be highly critical in the hepatocarcinogenesis.

Keywords □ Reactive oxygen species, hydroxyl radical, glutathione-S-transferase, hepatocarcinogenesis, partial hepatectomy, immunohistochemical analysis, preneoplastic nodule.

동물에서의 간암유발 모델로는 diethylnitrosamine (DEN), acetylaminofluorene(AAF), phenobarbital, ethionine, 3-methyl-diaminoazobenzene(MDAB)등 여러가지 화학적 발암원을 투여하는 방법에 따라 6, 7가지 모델이 연구되고 있는 바,¹⁾ 그중 Solt와 Farber가 고안한 방법²⁾은 개시제(initiator)로 DEN을 1회 투여하고 2주후에 촉진제(promotor)로 AAF를 2

주간 투여한 후 70% 간부분절제술을 시행하기때문에 동시적으로 세포변화를 유발하여 발암과정에 의하여 궁극적으로는 인체의 병변과 유사한 간세포 암종(hepatocellular carcinoma)이 유발된다고 알려져 있어 가장 일반적인 간암유발모델로 이용되고 있다. 이러한 간암 유발모델에서는 전암성 병소(preneoplastic lesion)인 증식성 결절(hyperplastic nodule)이 나타나고 이결절의 내부에서 종양세포가 출현하고, 증식과정을 거쳐 결국 암화가 진행되어 침윤 및 전이까지

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

이르는 암화과정이 유도된다고 보고되고 있다.^{3,4)} 조직중의 암화과정 중 전암성병소에 관한 연구는 형태학적으로 여러시도를 통하여 많은 연구보고들이 있었으나, 전암성병소에 대한 생화학적 지표들이 인정되고 특히 Solt와 Farber가 화학적 간암 유발 모델에서 제시한 증식성결절이 전암성병소로 확인됨에 따라 새로운 전기가 마련 되고 있다.²⁾ 화학적 발암물질에 의한 다단계 발암기전은 개시, 촉진, 전개 등으로 구분되는데, 개시단계는 정상적인 세포가 발암원에 의해 암세포의 유전형질을 갖는 세포로 전환되는 단계이다. 이렇게 변형된 암세포는 대부분 반응성이 적은 상태나 잠복기로 존재하는데, 촉진단계를 통해 반응성이 큰 암세포로 전환되고 전개과정을 통해 암화로 진행된다.²⁻⁴⁾ 최근에 집약되고 있는 이론 중의 하나는 각단계 발암과정에서 발생하는 산소 유리기가 발암화과정에 관여되는 것으로 보고되고 있어 중요한 연구대상으로 부각되고 있다.⁵⁾ 이는 발암원들이 대사과정중 산화 환원 주기에 의해 산소 유리기를 발생시키면서 친전자성으로 작용하여 지질과산화물을 촉진시키고 동시에 친핵성의 DNA와 같은 거대분자와 용이하게 공유결합하기 때문인 것으로 해석되고 있다. 발암원의 세포독성 발현에는 주로 superoxide anion과 hydroxyl유리기가 관여하는 것으로 보고되고 있으며, 종양의 개시 및 촉진화에 peroxy유리기도 관련되는 것으로 시사되고 있다. 그러나, 그 정밀한 작용기전을 이해하는데는 논란의 여지가 되고 있는 부분이 없지 않다. 대부분의 간발암화 모델을 제작시 간부분절제후의 관찰기간을 6개월수준으로 하는 예가 많은데, 간발암화모델의 심한 조직학적 개체차를 고려한다면, 병변상태가 반복적인 만성염증에서 비롯된 것인지 발암화과정에서 비롯된 것인지를 이해하는데에는 혼동이 따를 수 있다. 본 연구에서는 간부분절제후의 관찰기간을 16개월로 설정하고 산소유리기가 간발암화에 미치는 영향을 규명한 결과 유의성있는 결과를 얻었기에 보고한다.

실험 방법

시약 및 기기-Diethylnitrosamine, acetylaminofluorene, xanthine, xanthine oxidase, cytochrome c, phenazine methosulfate, nitro-BT-tetrazolium salt, NADPH, sodium tungstate, guaiacol, sodium azide,

trichloroacetic acid, hydrogen peroxide, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride등은 Sigma사에서, dichloronitrobenzene는 Aldrich사에서, 정상돼지혈청, 돼지에서 만든 항가토 IgG, PAP복합체는 Dako사에서 각각 구입하였으며, 항가토 흰쥐 산성 태반형 glutathione-S-transferase항체는 일본 Tokai대학교 Sato교수가 제공하였다. 그밖의 일반시약들은 시중의 일급 및 특급시약을 사용하였다. 기기로는 분광광도계 (Hitachi U-2000), 저온초고속원심분리기(Beckman J2-21), cell disrupter(Bronson sonic power co.), 저온초고속원심분리기(Beckman J2-21), cell disrupter(Bronson sonic power co.), 광학현미경(Olympus BH-2 model) 등을 사용하였다.

실험동물-일정기간동안 적응시킨 체중 200 g내외의 Sprague-Dawley계의 숫컷 흰쥐를 사용하였는데, 12시간 간격으로 주아리들을 조절하였으며, 사료와 물은 제한하지 않았다.

간 전암성병소 유도 방법-Solt와 Farber의 방법²⁾에 따라 아래와 같이 실시하였다. 즉, diethylnitrosamine(DEN) 200 mg/kg을 복강내 1회 주입하고, 2주 후에 acetylaminofluorene(AAF)를 매일 마리당 1 mg씩 2주간 경구투여하였다. 그후 pentotal sodium 마취하에 Higgins와 Anderson방법⁶⁾에 따라 중앙엽과 좌측엽의 기저부를 3.00유합사로 결찰한 후 절제하고 복벽 전층을 동시에 봉합함으로써 70% 부분간절제술을 실시하였다.

실험군-DEN과 AAF를 투여하고 70%간 절제술을 실시한 실험군과 70%간 절제술만을 실시한 대조군을 동일한 환경에서 사육하면서, 간절제후 2, 6, 10 및 16개월 후에 희생시켜 얻은 간조직에서 검정을 실시하였다.

Xanthine oxidase활성측정-Fried등의 방법⁷⁾에 따라 xanthine이 xanthine oxidase에 의해 forazan이 생성되는 것을 540 nm에서 10분간 측정하였다.

Superoxide 유리기의 생성비율 측정-McCord와 Fridovich의 방법⁸⁾에 따라 superoxide dismutase로 억제 할 수 있는 ferricytochrome C의 환원 속도를 550 nm에서 2분간 측정하였다.

Hydrogen peroxide 생성비율측정-균질화된 간조직을 4℃에서 1,000g로 15분씩 2회 원심분리하여 얻은 상등액을 4℃에서 105,000g로 1시간 원심분리하여 얻은 상층액을 세포질분액으로, 잔액을 마이크로솜분

획으로 사용하였으며, 각각의 분획을 Thruman 등의 ferrithiocyanate법⁹⁾에 따라 480 nm에서 생성되는 ferrithiocyanate를 3분간 측정하였다.

Peroxidase 활성측정—Pütter의 방법¹⁰⁾에 따라 240 nm에서 H₂O₂의 흡광도가 0.485가 되도록 조절한 후 1 mole의 H₂O₂가 1 mole의 guaiacol을 산화시키는 원리에 따라 436 nm에서 변화되는 흡광도를 3분간 측정하였다.

Catalase 활성측정—Aebi의 방법¹¹⁾에 따라 H₂O₂의 흡광도가 1.2가 되도록 조절한 후 240 nm에서 변화되는 흡광도를 3분간 측정하였다.

Hydroxyl유리기의 생성비율측정—Halliwell의 방법¹²⁾에 따라 salicylate의 hydroxylation을 1시간동안 510 nm에서 측정하였다.

Glutathione-S-transferase 활성측정—Habig과 Pabst의 방법¹³⁾에 따라 균질화된 간조직을 4°C에서 105, 000g로 1시간 원심분리시켜 얻은 상층액을 효소원으로 dichloronitrobenzene을 기질로 하여 345 nm에서 변화되는 흡광도를 3분간 측정 하였다.

단백질량—Lowry법¹⁴⁾에 따라 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 측정하였다.

전암성병소의 면역조직화학적 관찰—Sato등의 방법¹⁵⁾에 따라 Paraffin 포매된 조직을 5~6u으로 박절 한후 xylene으로 paraffin을 제거하고, 100%, 95%, 75% 에탄올에 각각 2분씩 통과한후 0.01 M-Phosphate buffered saline(PBS: PH 7.2)에 5분간 처리하였다. 0.5%-H₂O₂, methanol혼액으로 10분간 처리하여 내재성 H₂O₂를 제거한후 태반형 glutathione-S-transferase(1:400)를 15시간 반응 시킨후 돼지에서만든 항가로 IgG(1:200)를 60분간 반응 시키고 peroxidase-antiperoxidase(PAP) 복합제(1:200)를 다시 60분간 반응 시킨후 PBS로 세척하고 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride의 0.1 M Tris-HCl(PH 7.6)에 1%-H₂O₂를 가한 기질용액을 조직절편에 가해 갈색 반응이 나타나면 증류수로 세척하고 Harris hematoxylin으로 대조염색하여 탈수과정을 거친후 canada balsam으로 봉입하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

통계분석—모든 data의 유의성검정은 student's t-test로 행하였다.

실험결과

간발암화과정 동안 간조직중 xanthine oxidase의

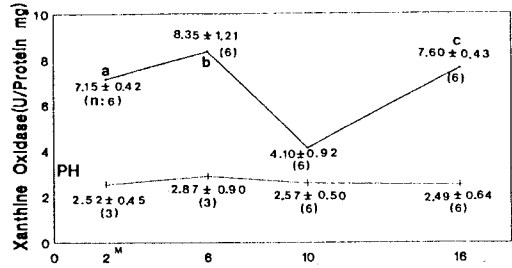


Fig. 1—The activity of xanthine oxidase in the liver during the hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine(DEN) plus acetylaminofluorene(AAF) in rat. Each point is mean ± S.E. Male Sprague-Dawley rats of 200g approximately were treated with DEN intraperitoneally at a necrogenic dose(200 mg/kg). After two weeks, the rats received AAF by p.o, daily at a dose of 1 mg/head in corn oil for further two weeks. Continously, the rats were subjected to two-thirds partial hepatectomy(PH) under the pentothal anesthesia. M means months after partial hepatectomy. n in the parenthesis indicates each experimental number. Thin line shows PH group and thick line represents testing group, respectively. a: p<0.001 vs. 2 months of PH, b: p<0.001 vs. 6 months of PH. c: p<0.001 vs. 16 months of PH.

활성변화—70% 간절제술(partial hepatectomy)만을 실시한 대조군에서는 전체기간 동안 유의한 활성변화가 나타나지 않았다. 최종투여 2개월(p<0.001), 6개월(p<0.001) 및 16개월(p<0.001)후의 활성은 대조군에 비하여 유의차 있게 높았고 10개월 후에 저하되는 경향을 제외하고는 전반적으로 같은 경향을 보였다(Fig. 1).

간발암화과정 동안 간조직중 superoxide기의 생성율의 변화—70% 간절제술을 실시한 대조군의 경우 전기간에 걸쳐 유의한 변화를 나타내지 않았다. 최종투여 2개월(p<0.001), 6개월(p<0.001), 10개월(p<0.001) 및 16개월(p<0.001) 후에 각각 대조군에 비하여 각각 현저히 높은 치를 나타내었다(Fig. 2).

간발암화과정 동안 간조직중 H₂O₂ 생성율의 변화—간 세포질분획에 있어서 70% 간절제술만을 실시한 대조군에서는 전체기간 동안 유의한 변화가 없었고 발암제를 투여하여도 변화가 나타나지 않았다. 간 마이크로솜 분획에있어서 70% 간절제술만을 실시한 대조군에서 16개월후에 H₂O₂생성비율이 증가되는 경향을 나타냈다. 발암제 투여시에는 2개월 후에 대조

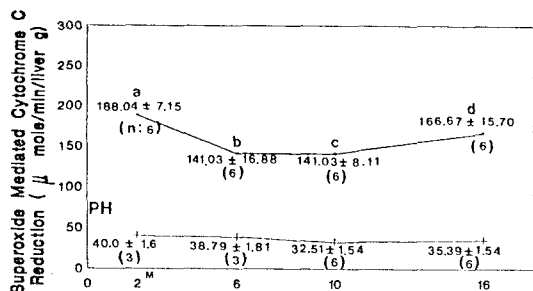


Fig. 2—The production rate of superoxide in the liver during the hepatocarcinogenesis induced by DEN plus AAF in rat. Experimental conditions were the same as those described in Fig. 1. a: $p < 0.001$ vs. 2 months of PH, b: $p < 0.001$ vs. 6 months of PH, c: $p < 0.001$ vs. 10 months of PH, d: $p < 0.001$ vs. 16 months of PH.

군에 비하여 증가($p < 0.02$)되어 6개월까지 증가추세였다. 또한 발암제 투여 10개월 후에는 2개월후에 비하여 현저히 저하($p < 0.01$)되었다가 16개월후에 2개월후의 수준으로 회복되었다(Fig. 3).

간발암화과정 동안 간조직중 peroxidase 활성변화
 70% 간절제술만을 실시한 대조군의 경우 전실험기간에 걸쳐 유의한 변화는 나타나지 않았으나, 발암촉진제 투여 2개월후에는 그활성이 대조군에 비하여 현저히 높았으나($p < 0.001$), 6개월($p < 0.001$), 10개월후($p < 0.001$) 및 16개월후($p < 0.05$)에는 현저히 그활성이 낮아졌으며, 16개월후에는 회복추세를 나타내었으며 대조군에 비하여도 유의차가 있었다($p < 0.05$) (Table I).

간발암화과정 동안 간조직중 catalase 활성변화
 70% 간절제술만을 실시한 대조군의 경우 2개월, 10개월 및 16개월후에는 서로 그활성에 유의차가 없었으나, 6개월후에는 그활성이 2개월후에 비하여 현저히

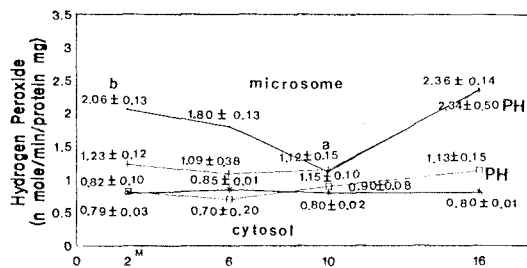


Fig. 3—The production rate of hydrogen peroxide in the liver during the hepatocarcinogenesis induced by DEN plus AAF in rat. Each point shows mean ± S.E of three to six rats. Thick line with asterisk shows cytosolic hydrogen peroxide in testing group, thin line with square represents cytosolic hydrogen peroxide in PH group, respectively. Thick line means microsomal hydrogen peroxide in testing group, thin line indicates microsomal hydrogen peroxide in PH group, respectively. Experimental conditions were the same as those described in Fig. 1. a: $p < 0.01$ vs. 2 months of testing group, b: $p < 0.02$ vs. 2 months of corresponding PH group.

증가($p < 0.05$)되었다. 발암촉진제 투여후 2개월($p < 0.05$), 6개월($p < 0.001$) 및 10개월후($p < 0.05$)에는 대조군에 비하여 현저히 활성이 억제되었다(Table I).

간발암화과정 동안 hydroxyl기 생성비율 변화
 70% 간절제술만을 실시한 대조군의 경우 전기간에 걸쳐 유의한 변화가 나타나지 않았다. 그러나 발암촉진제 투여 2개월($p < 0.05$), 6개월($p < 0.01$) 및 16개월후($p < 0.001$)에는 대조군에 비하여 현저히 그 생성 비율이 증가되었다. 발암촉진제 투여 2개월($p < 0.001$) 및 6개월후($p < 0.01$)에 비하여 16개월후에는 그생성율이 현저히 증가되었다(Fig. 4).

Table I—The activities of hydrogen peroxide scavengers in the liver during the hepatocarcinogenesis in rat

Months		2	6	10	16
Peroxidase (U/protein mg)	Test	9.12 ± 1.09	3.03 ± 0.43 ^a	2.80 ± 0.28 ^a	4.20 ± 0.59 ^{b,c}
	PH	2.80 ± 0.45 ^a	2.58 ± 0.78	2.66 ± 0.60	2.18 ± 0.24
Catalase (U/protein mg)	Test	6.17 ± 1.02 ^B	4.14 ± 0.31 ^A	7.99 ± 0.34 ^C	9.13 ± 0.90
	PH	22.35 ± 5.20	52.46 ± 8.38 ^B	32.18 ± 7.84	21.97 ± 5.66

Each value shows mean ± S.E of three to six animals. Experimental conditions were the same as those described in Fig. 1. a: $p < 0.001$ vs. 2 months of testing group, b: $p < 0.05$ vs. 16 months of PH. A: $p < 0.001$ vs. 6 months of PH, B: $p < 0.05$ vs. 2 months of PH, C: $p < 0.05$ vs. 10 months of PH.

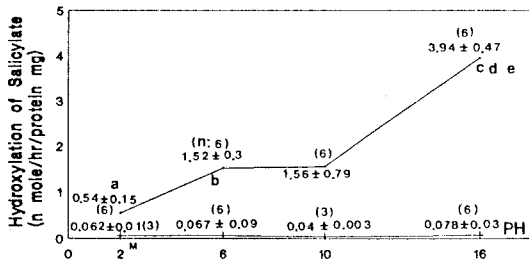


Fig. 4—The hydroxylation rate of salicylate in the liver during the hepatocarcinogenesis induced by DEN plus AAF in rat. Experimental conditions were the same as those described in Fig. 1. a: $p < 0.05$ vs. 2 months of PH, b: $p < 0.01$ vs. 6 months of PH, c: $p < 0.01$ vs. 16 months of PH, d: $p < 0.01$ vs. 6 months of testing group, e: $p < 0.001$ vs. 2 months of testing group.

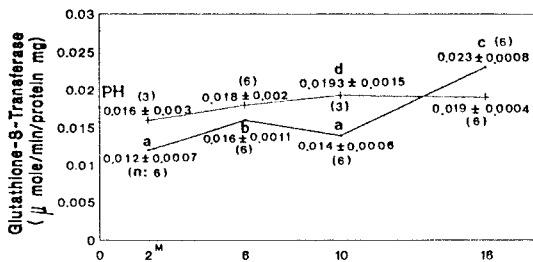


Fig. 5—The activity of glutathione-S-transferase in the liver during the hepatocarcinogenesis induced by DEN plus AAF in rat. Experimental conditions were the same as those described in Fig. 1. a: $p < 0.001$ vs. 16 months of testing group, b: $p < 0.01$ vs. 16 months of testing group, c: $p < 0.01$ vs. 16 months months of PH, d: $p < 0.05$ vs. 10 months of testing group.

간발암화과정동안 간조직 glutathione-S-transferase 활성변화—70% 간절제술만을 실시한 대조군의 경우 전기간에 걸쳐 유의차가 없었다. 발암촉진제 투여 10개월후에는 대조군의 활성보다 유의성 있게 억제($p < 0.05$)되었으나, 16개월후에는 대조군의 활성보다 현저히 증가($p < 0.01$)되었다. 또한 발암촉진제 투여 16개월후에는 2개월($p < 0.001$), 6개월($p < 0.01$) 및 10개월후($p < 0.001$)보다 현저히 그 생성비율이 증가되었다(Fig. 5).

태반형 glutathione-S-transferase(GSTP)항체를 이용한 전암성병소의 면역조직화학적 관찰—GSTP양성 간세포와 H&E염색상으로 증식성 간세포는 단순히 형태학적으로 뚜렷하게 주위세포와 구분이 되지는

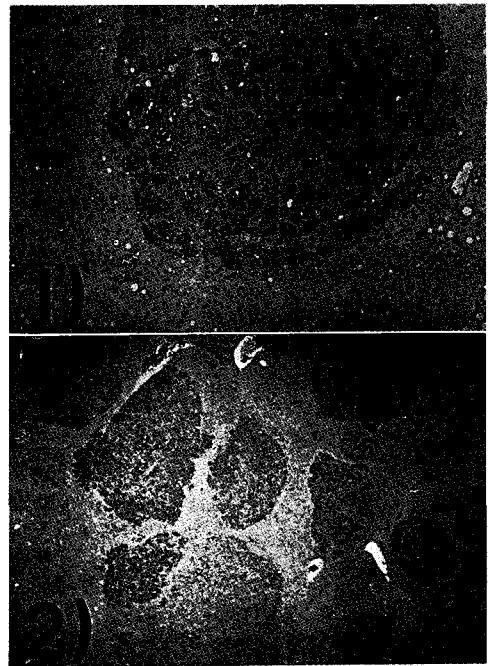


Fig. 6—Immunohistochemical staining of GSTP positive foci with peroxidase-antiperoxidase complex, visualized by diaminobenzidine oxidation. 1) Enlarged positive foci of GST forming hyperplastic nodule: Magnification $\times 200$ (6 months after PH). 2) Dense foci of GST forming hyperplastic nodule: Magnification $\times 40$ (16 months after PH).

않았다. 팽창성숙(expansile growth)하거나, 투명하거나, 호산성변화가 있는 경우에만 주위조직과 경계가 뚜렷하여 알 수 있었으나 소수의 세포가 모여있는 경우에는 정확히 알 수 없었다. 그러나, 항GSTP항체를 사용한 면역조직화학적 염색으로는 쉽게 찾을 수 있었다. GSTP는 거의 모든 결절을 만들고 있는 투명한 간세포에 대부분 양성으로 나타났으나, 발암제 투여후의 기간에 따라 개체차가 인정 되었으며 16개월후에 가장 개체차가 적게 나타났다(Fig. 6).

고 찰

Solt와 Farber의 간암모델에서 DEN투여후 AAF를 투여하는 것은 선택적으로 DEN으로 변형된 잠정적인 전암성 세포(putative preneoplastic cell)의 증식을 촉진하여 증식성 결절을 유도하기 위함이다. 또한 간절제술을 실시하는 이유는 간세포에 재생능력을

촉진시킴으로서 발암촉진화 역할 뿐아니라 간세포들의 성숙과정에 동시성을 부여하여 경시적관찰을 용이하게하기 때문이다. Xanthine oxidase는 xanthine을 uric acid로 대사시키는 과정에서 superoxide anion을 생성한다.¹⁶⁾ 본실험에서도 10개월후를 제외한 전암성병소 유발군들에서 현저히 xanthine oxidase 활성이 증가된 점은 superoxide 생성비율 율과 유사하다. Kensler는 개시작용 동안 다형핵 백혈구(polymorphonuclear leucocyte)의 반응성이 향진되어 호중구에서 유리되는 산소유리기가 발암을 촉진시킬 것으로 보고하였는데,¹⁷⁾ 본 결과에서 6개월까지 나타난 산소유리기의 반응성 향진과 어떠한 관련성이 있는지는 추가적인 연구를 통해 기전제시가 이루어져야 할 것이다.

일반적으로 발암화과정 동안 Mn-SOD(superoxide dismutase) 및 Cu·Zn-SOD가 현저히 억제되는 점^{5,17)}과 본 실험 결과에서의 superoxide의 생성비율이 향진되는 점을 고려한다면 발암화과정에서의 SOD의 보상적 유도는 나타나지 않을 것으로 보인다. 본실험 조건하에서는 전암성병소에서의 H₂O₂는 마이크로솜 분획에서 초기단계에서만 유리되었는데, 이점을 규명하기 위하여 peroxide제거효소인 catalase와 peroxidase의 활성을 검정한 결과 catalase는 전 실험기간에 걸쳐 현저히 억제되었으나, peroxidase는 마이크로솜 분획의 H₂O₂유리와 함께 보상적으로 유도되어 발암화과정 동안 최소한의 내인성 항산화기전에 관여할 수 있음을 시사하고 있다. Loeb는 극미량의 Fe²⁺ 존재하에서 산소유리기는 DNA의 손상을 초래하여 변이원으로 작용할 수 있음을 지적하였고, Fe²⁺ chelator인 desferioxime, H₂O₂제거제인 catalase 및 hydroxyl기 중화제인 mannitol에 의해 변이원성이 억제되는 점으로 미루어, 반응성산소 유리가 변이원유발에 관여함을 보고하였다.¹⁸⁾ 대부분의 악성종양에서 transferrin의 철 포화도가 현저히 저하되고, 혈액에서의 철손상이 생긴 결과 생체내에 비정상적인 철분포도가 이루어지는데, 이때 Haber-Weiss 반응이 촉진되어 hydroxyl기가 생성 될 수 있다고 한다.^{5,18,19)} 본 연구 결과 간부분절제후 10개월 이후에 보여지는 hydroxyl기의 생성비율은 상기이론을 뒷받침한다고 생각되며, 6개월 단계까지 향진된 산소 유리기들이 전암성 병소에서 Haber-Weiss 반응을 유발시켜 16개월후의 병변을 유도하였을 가능성도 배제할 수는

없다. 제2상반응의 포함에 중요한 역할을 하는 glutathione-S-transferase은 간 발암화 과정에서 그 대반형(GSTP)이 조직학적으로 양성인 증식성결절을 이루는데, GSTP는 최근까지 DEN과 AAF를 사용하여 유도된 변형된 전암성 간세포 결절에 가장 좋은 표지(marker)로 알려 지고 있다.^{15,20-23)} Glutathione-S-transferase(GST) 활성이 간부분절제후 2개월에 이를때 증가하는 경향이 있기 때문에²⁴⁾ 본 실험에서는 그 이후부터 분석에 임하였다. GST의 활성증가와 더불어 증가된 hydroxyl생성비율은 특히 후반기에 GSTP에 양성인 증식성결절의 출현과 일치되어 나타나는데, 대부분 항암제의 세포독성 발현기전에 산소유리기들이 관여된 것을 고려한다면,^{25,26)} hydroxyl기가 전암성 후기단계에서의 추가적인 표지로 제시될 수 있을 것으로 생각한다. 본 실험조건하에서 나타난 간부분절제 10개월후에 보여지는 전반적인 활성저하는 본 연구 결과만으로는 설명할 수 없으나, 16개월 후에는 전형적인 간발암화가 보여졌다. 따라서 대다수 *in vivo* 실험에서 제시된 간발암화 모델을 보다 정밀하게 평가하는 방법중의 하나로 간부분절제후의 관찰기간을 연장하여 보완하는 것을 제안하고자 한다.

결 론

장기간의 간 발암화 과정동안 반응성 산소대사물이 어떠한 영향을 미치는 지를 검색하기 위해 diethylnitrosamine(DEN)과 acetylaminofluorene(AAF)을 투여하여 간 전암성 병소를 유발하고 간세포 절제술을 통해 세포 증식능력을 부여한후 간 발암화 과정에서 나타나는 생화학적 및 형태학적인 검정을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 간 전암성병소 유발군이 간절제술만을 실시한 실험군에 비해 10개월후의 활성을 제외하고는 현저히 증가된 xanthine oxidase 활성을 나타내었다.
- 2) 부분간절제술만을 실시한 실험군에 비하여 간 전암성병소를 유발시킨 실험군에서 현저히 높은 superoxide 유리의 생성비율을 나타내었으나, 발암제 투여후 시간이 경과 되어도 유의차가 나타나지 않았다.
- 3) H₂O₂ 생성율은 간발암화 과정에서 세포질 분획보다는 마이크로솜 분획에서 촉진되는 경향을 보였다.

4) Catalase 활성은 부분간절제술만을 실시한 실험군에 비하여 간 전암성병소 유발군이 현저히 억제된 활성을 나타내었다.

5) Peroxidase 활성은 간 전암성병소 유발 실험군에서 초기단계에 현저히 증가된 활성을 나타내었다.

6) Hydroxyl 유리기의 생성비율은 부분간절제술만을 실시한 실험군에 비해 간 전암성 병소 유발군에서 시간 경과와 더불어 현저히 증가된 생성비율을 나타내었다.

7) Glutathione-S-transferase 활성은 간 전암성병소 유발군이 시간이 경과함에 따라 증가되어 hydroxyl 유리기 생성비율과 비례하는 경향을 나타내었다.

8) 전암성병소인 증식성결절을 이루는 변형된 간 세포 즉, GSTP양성세포 결절은 간부분 절제후의 시간이 경과함에 따라 증가되는 경향을 보였고 16개월 후에 가장 현저히 나타났다. 이상의 결과는 간 발암화 과정에서 반응성 산소유리기들이 간 발암화 전개 과정에 관여할 수 있음을 시사하며, 관찰기간을 연장하는 것도 보다 정밀한 간 발암화기전을 연구하기 위한 모델확립 방법임을 제시한다.

감사의 글

본 논문은 1990년도 과학재단 기초일반 연구비의 일부로 이루어 졌음.

문 헌

- 1) Scherer, E. and Emmelot, P.: Kinetics of induction and growth of precancerous liver cell foci and liver tumor formation by diethylnitrosamine in the rat. *Eur. J. Cancer*, **11**, 689 (1975).
- 2) Solt, D.B. and Farber, E.: New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, **263**, 706 (1976).
- 3) Farber, E.: Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: Clows Memorial lecture. *Cancer Res.*, **44**, 5463 (1984).
- 4) Pitot, H. and Sirica A.E.: The stages initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochem. Biophys. Acta.*, **605**, 191 (1980).
- 5) Fischer, S.M., Floyd, R.A. and Copeland, E.S.: Workshop report from the division of research grants,

- NIH. *Cancer Res.*, **48**, 3882 (1988).
- 6) Higgins, G.M. and Anderson, R.M.: Experimental pathology of liver. *Arch. Pathol.*, **12**, 186 (1931).
- 7) Fried, R. and Fried, L.W.: In *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer. p.644, 1974.
- 8) McCord, J.M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase. Enzymatic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049 (1969).
- 9) Thurman, R.G., Ley, H.G. and Scholz, R.: Hepatic microsomal ethanol oxidation-H₂O₂ formation and the role of catalase. *Eur. J. Biochem.*, **25**, 420 (1972).
- 10) Pütter, J.: Peroxidase, in *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd Bergmeyer, Academic Press, p.658, 1974.
- 11) Aebi, H.: Colorimetric Assay. In *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed., p.673, Bergmeyer, H.U., Academic Press, New York, 1974.
- 12) Halliwell, B.: Superoxide-dependent formation of hydroxyl in the presence of iron chelates. *FEBS Lett.*, **92**, 321 (1978).
- 13) Habig, W.H., Pabst, H.J. and Jakoby, W.B.: Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**(22), 7130 (1974).
- 14) Lowry, C.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.S.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 15) Sato, K., Kitahara, A. and Satoh, K.: The placental form of glutathione-S-transferase as new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Gann* **75**, 199 (1984).
- 16) McCord, J.M. and Fridovich, I.: The reduction of cytochrome C by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **243**, 5753 (1968).
- 17) Kensler, T.W. and Taffe, B.G.: Free radicals in tumor promotion. *Adv. Free Radicals Biol. Med.*, **2**, 347 (1986).
- 18) Loeb, L.A., Taffe, B.G., Walters dor Ph. A.M., Stokes, K. and Klebanoff, S.: Mutagenesis by oxygen free radicals *in vitro*. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **28**, 162 (1988).
- 19) Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.: Oxygen toxicity, oxygen radical, transition metals and disease. *Biochem. J.*, **219**, 1 (1984).

- 20) 송계용, 김대영, 김형춘, 김미경, 라영호, 박상철 : 원취 간의 전암성병소의 면역조직화학적 및 유전적 변화. *대한암학회지*, 22, 395 (1990).
- 21) Choi, G.Y., Kim, H.C., Song, K.Y. and Park, S.C.: Histopathologic Studies on carcinogen induced placental glutathione-S-transferase positive hyperplastic nodule in rat. *Chung-Ang J. Med.*, 13, 367 (1988).
- 22) Bannash, P., Meyer, D. and Hacker, H.J.: Hepatocellular glycogenesis and hepatocarcinogenesis. *Biochem. Biophys.*, 605, 21 (1980).
- 23) Roomi, M.W., Sarma, D.S.R.: A common biochemical pattern in preneoplastic hepatocyte nodules generated in four different nodules in rat. *Cancer*, 45, 564 (1985).
- 24) Park, S.C., Kim, E.G., Woo, K.M., Kwak, S.J., Song, K.Y., Lee, K.U. and Kim, S.T.: Effects of carcinogens and partial hepatectomy on the nitrogen utilizing and xenobiotic metabolizing enzymes in the hepatic tissues of rats. *Environmental Mutagens & Carcinogens* 8, 22 (1988).
- 25) Gutteridge, J.M.C., Rowley, D.A. and Halliwell, B.: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts; Detection of free iron in biological system by using bleomycin-dependent degradation of DNA. *Biochem. J.*, 199, 263 (1981).
- 26) Shinha, B.K., Rajagopalan, S. and Meyers, C.E.: Adriamycin acitivation and oxygen free radical formation in human breast tumor cells; Protective role of glutathione peroxidase in adriamycin resistance. *Cancer Res.*, 4, 3844 (1989).