

흰쥐에서 신장암이 발생하는 동안 세포분열속도의 변화

안 영 수

국립환경연구원 환경보건연구부

Changes in Cell Proliferation During the Development of Renal Cell Tumors Induced by N-Nitrosomorpholine in Rats

Young Soo Ahn

Dept. of Environmental Health Research, National Institute of Environmental Research,
613-2 Bulkwang-dong, Eunpyung-gu, Seoul 122-040, Korea

(Received May 30, 1995)

(Accepted June 5, 1995)

ABSTRACT : Sequential changes in cell proliferation during the development of epithelial kidney tumors induced in rats were investigated by autoradiographic determination of the ^3H -thymidine-labeling index. Renal cell tumors were induced in male Sprague-Dawley rats by oral administration of N-nitrosomorpholine at the concentration of 120 mg/l in the drinking water for 7 weeks. At different times between 12 and 34 weeks after withdrawal of the carcinogen (stop model) animals were sacrificed. According to cytological criteria, neoplastic lesions were classified into clear cell, acidophilic cell, basophilic cell and oncocyctic tumors. The labeling index was found to be increased in all types of preneoplastic tubules as compared to their corresponding original tubules. A much stronger elevation of cell proliferation was occurred during the development of renal cell tumors from preneoplastic tubules. Of four tumor types, acidophilic cell tumor showed the highest labeling index while oncocyctoma exhibited the lowest proliferative activity. These findings are in good accordance with the clinical observations that acidophilic cell tumors have a worse prognosis than oncocyctoma. The data presented in this study suggest that the individual proliferation rates may be an objective biological marker of kidney tumor aggressiveness.

Key words : Renal cell tumors, ^3H -thymidine-labeling index, Proliferation, N-nitrosomorpholine

I. 서 론

신장암은 호르몬, 바이러스, 방사선 및 여러 가지 화학 물질에 의하여 유도된다 (Hiasa 및 Ito, 1987). 발암물질 투여후 일정한 잠복기가 경과하면 암세포와 유사한 조직학적 특성을 보이는 세포들로 구성된 세뇨관이 나타나는 데 신장암은 이러한 전암상태 세뇨관(preneoplastic tubules)에서 발생하는 것으로 믿어지고 있다. 신장암을 유발하는 물질은 다양하지만 신장암은 세포화학적 기준에 의하여 몇 종류로 구별된다. Bannasch 등(1990)은 쥐의 신장암을 구성하는 주요 세포에 따라서 clear cell, acidophilic cell, basophilic cell, chromophobic cell, oncocyctic 종양으로 구분하였으며, 이들 종양은 사람에서 발견되는 신장암과 조직화학적 특징에서 유사하다. 최근에 여러 가지 화학물질에 의하여 유도된 신장암의 연속적인

절편에서 암세포와 정상적인 세뇨관세포의 직접적인 연결을 관찰함으로써 신장암의 기원세포가 밝혀졌다. 쥐에 있어서는 발암물질의 종류와 관계없이 basophilic, chromophobic 종양은 근위세뇨관(proximal tubules)에서 유래 되는 반면 clear cell, acidophilic, oncocyctic 종양은 집합관에서 유래된다(Nogueira 등, 1993).

세포분열은 발암과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다. 유전독성 발암물질에 의한 초기의 유전자 변화가 유전성 돌연변이로 고정되어 initiated cells을 형성하는 단계 및 initiated cells의 균증식은 세포분열자극에 의하여 촉진된다 (Cayama 등, 1978; Pitot 및 Sirica, 1980). 사염화탄소, furan 등과 같은 유전독성이 없는 발암물질의 경우는 세포독성에 의하여 괴사가 유발되고 세포괴사에 대한 재생성 세포분열의 증가가 중요한 발암기전으로 생각되고 있다(Butterworth, 1990). 또한 세포분열

속도가 빠른 암세포일수록 화학요법 및 방사선 치료에 민감하기 때문에 (Streffer 등, 1986) 세포분열속도는 암의 예후 및 치료법 선택에 중요한 결정변수이다.

지금까지 인체신장암이나 실험적으로 유도한 신장암에 있어서 세포분열활성에 관한 정량적 연구는 거의 이루어지지 않았다. 더욱이 oncocytoma와 전암상태 세뇨관의 세포분열양상에 대해서는 보고된 바가 없다. 본 연구는 조직화학적 특성, 전이능력, 염색체이상 등에 있어서 상이한 여러 종류의 신장암이 발생하는 동안 세포분열속도의 변화를 알아보기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 체중 180 g 정도의 웅성 Sprague-Dawley 랫트를 실험동물 사육연구소(Hannover, Germany)에서 구입하여 2주간의 순화기간을 거쳐서 실험에 사용하였다. 사육실의 환경조건은 온도 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 5\%$, 환기횟수 10~15회/h, 12시간 조명(150~300 Lux, 07:00~19:00)을 유지하였으며 실험동물용 고품사료 및 음용수는 자유섭취 시켰다.

2. 시험군 및 투여방법

실험동물에 신장상피암을 유발하기 위하여 N-nitrosomorpholine을 120 mg/l의 농도로 음용수에 녹여 7주간 섭취시키고 20마리씩 3군으로 분류하였으며, 순수음용수를 섭취시킨 30마리 랫트는 10마리씩 3군으로 나누어 대조군으로 사용하였다. 발암물질을 투여후 12, 23, 34주가 경과한 다음 처리군과 대조군의 실험동물을 에테르로 가볍게 마취시키고 복부피하에 osmotic minipump(Alza, Alto, CA:Modell 2001)을 이식하였다. 펌프는 3 mCi ^3H -thymidine(Amersham-Buchler, Braunschweig, Germany)와 생리식염수 2 ml가 들어 있으며, ^3H -thymidine을 10 $\mu\text{l/h}$ 의 속도로 피하조직에 유리되도록 고안되었다. 48시간 동안 480 $\mu\text{l/h}$ 의 thymidine 용액을 방출하여 실험동물당 0.72 mCi ^3H -thymidine을 노출시킨 후 가벼운 에테르 마취 상태에서 양쪽 신장을 적출하였다. 적출 즉시 신장을 세로로 양분하고 0.1 mg/ml의 inactive thymidine이 함유된 Carnoy 용액에 고정하고 파라핀으로 포매하였다.

3. Autoradiography

실험동물의 양쪽 신장으로부터 3 μm 두께의 파라핀절

편을 만들고 파라핀을 제거한 후 세포질에 결합되어 있는 ^3H -thymidine을 제거하기 위하여 0.1 mg/ml inactive thymidine 용액으로 세척하였다. 암실에서 42°C 로 가열한 Kodak NTB 현탁액(Eastman Kodak Company, Rochester NY)에 조직절편을 담그어 꺼낸 다음 상온에서 하루밤 건조시키고 4°C 에서 2주간 노출시켰다. 조직절편을 Kodak D-19 현상액(Eastman Kodak Company)에 10분간 담근 다음 Kodak-Unifix 용액(Eastman Kodak Company)으로 고정하였다. 슬라이드를 흐르는 물에 1시간 씻은 후 H&E 염색을 하였다.

4. 세포분열속도 측정

세포분열지표(Labeling Index : LI)는 검색한 전체 세포수에 대한 ^3H -thymidine으로 표식된 세포수의 백분율로 나타내었다. 대조군의 실험동물의 경우 각각의 조직절편에 대하여 400배의 배율로 20시야를 무작위로 선택하여 세뇨관의 위치와 세포학적 특성에 따라서 근위세뇨관과 집합관으로 구별하여 LI를 산출하였다. 전암상태의 세뇨관 및 종양단면적의 최대직경이 2 mm보다 작은 종양의 경우는 모든 상피세포를 검색하였으며 최대직경이 2 mm보다 큰 종양에 대해서는 전체 종양단면적의 절반 이상의 영역을 무작위로 선택하여 표식세포와 비표식세포수를 세었다.

5. 통계학적 방법

정상 세뇨관 및 전암상태 세뇨관의 경우는 한개 이상의 표식세포를 가지고 있는 세뇨관과 표식세포가 없는 세뇨관의 빈도를 Fleiss의 exact-test로 검정하였다. 종양의 경우는 개개의 종양에 대하여 LI를 구하여 종양의 종류에 따라서 평균 LI와 표준편차를 산출하고 세포분열속도를 비교하기 위하여 Wilcoxon-rank-sum-test를 실시하였다.

III. 결 과

정상 세뇨관 및 N-nitrosomorpholine 투여군에서 얻은 전암상태 세뇨관의 LI를 Table 1에 나타내었다. 신장상피암은 근위세뇨관(proximal tubules)과 집합관(collecting ducts)에서 유래하는 것으로 알려져 있는데, 근위세뇨관의 LI는 0.43%로 집합관의 LI보다 7배정도 높았다. 조사한 모든 종류의 전암상태 세뇨관은 그들이 유래된 세뇨관에 비하여 약간 증가된 세포분열활성을 나타냈다. 전암상태 세뇨관 중에서 basophilic 세뇨관이 가장 높은 LI(3.01%)를 보였으며, clear cell세뇨관(Fig. 1)은 oncocytic 세

Table 1. ³H-thymidine labeling indices in normal renal tubular system and different types of preneoplastic tubules induced in rats by N-nitrosomorpholine

	Proximal tubules	Collecting ducts	Oncocytic tubules (n=58)	Clear cell tubules (n=14)	Basophilic tubules (n=65)
LI (%)	0.43	0.06	0.56	1.71	3.01

n : number of preneoplastic tubules counted.

Table 2. ³H-thymidine labeling indices in different types of neoplastic lesions induced in rats by N-nitrosomorpholine

	Oncocytic tumors (n=5)	Clear cell tumors (n=6)	Basophilic tumors (n=6)	Acidophilic tumors (n=4)
LI (%)	2.75 ± 2.24	4.18 ± 1.98 ^a	6.74 ± 2.11 ^b	11.57 ± 2.84 ^c

n : number of neoplastic lesions counted.

^a value is statistically significant from the oncocytic tumors (p<0.05).

^b value is statistically significant from the clear cell tumors (p<0.05).

^c value is statistically significant from the basophilic tumors (p<0.05).



Fig. 2. Oncocytic adenoma composed of oncocytes with finely granular eosinophilic cytoplasm. PAS-toluidine blue. ×190.

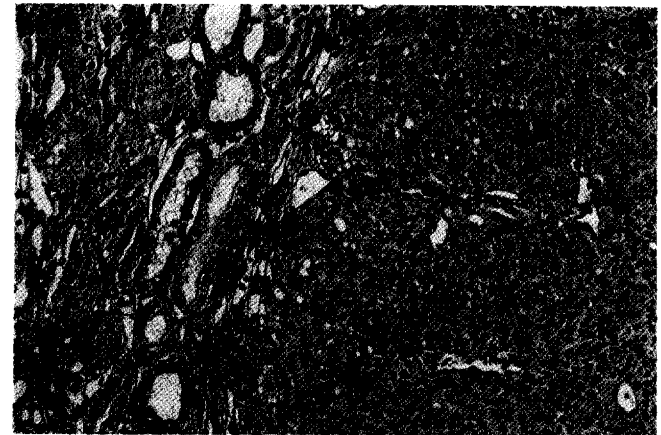


Fig. 3. Portion of a renal acidophilic cell tumor predominantly consisted of acidophilic cells with a strongly eosinophilic granular cytoplasm. H&E. ×64.

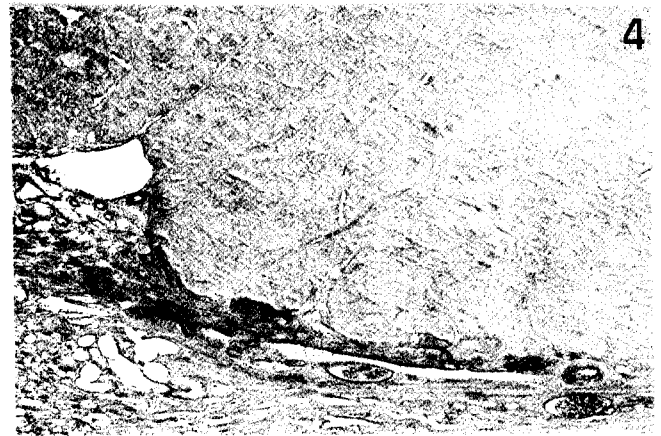


Fig. 4. Portion of a renal basophilic cell tumor compressing the surrounding tissue. PAS-toluidine blue. ×32.

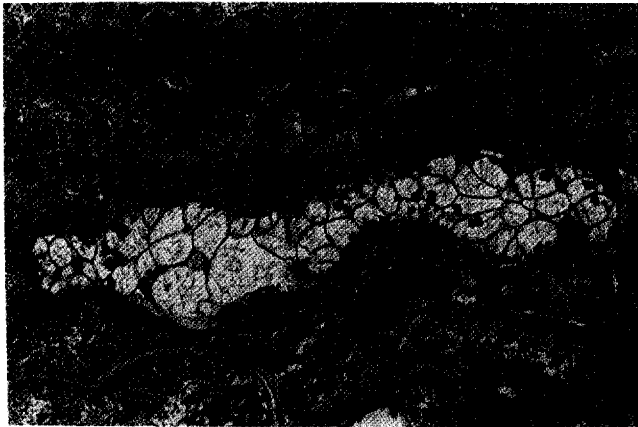


Fig. 1. Clear cell tubule lined by a single cell layer. Note large translucent cytoplasm and chromatin-dense nuclei. H&E. ×190.

뇨관에 비하여 3배정도 높은 LI를 나타냈다. 검색한 전체 세뇨관수에 대하여 ³H-thymidine으로 표식된 세포를 한 개이상 함유한 세뇨관수의 백분율은 basophilic 세뇨관 34.4%, clear cell 세뇨관 21.3%, oncoctic 세뇨관 8.3%, 근위세뇨관 4.9% 집합관 1.2%였다. 표식세포를 함유한 세뇨관의 빈도를 Fleiss의 exact-test로 분석한 결과에 의하면, 전암상태 세뇨관은 그들이 유래된 세뇨관에 비하여 유의적으로 높은 표식세포 함유빈도를 보였다.

여러 종류의 신장상피암에 대한 LI를 Table 2에 종합하였다. 서로 다른 신장암종은 LI에 있어서 유의적인 차이를 보였다. Oncocytoma(Fig. 2)의 LI는 2.75%로 가장 낮은 세포분열활성을 보였으며 acidophilic 종양(Fig. 3)은 clear cell 종양 및 basophilic 종양(Fig. 4)에 비하여 각각 3배, 2배정도 높은 세포분열활성을 나타냈다. 같은 종류의 종양일지라도 개개의 종양에 따라서 LI는 큰 차이가 있었으며, 같은 종양내에서도 위치에 따라서 세포분열활

성이 크게 달랐다. 크기가 큰 종양의 경우는 종양혈관에서 멀리 떨어진 부위에 세포가 집단적으로 죽은 괴사영역이 관찰되었다. 이러한 괴사영역 주변에서는 ³H-thy-

midine으로 표식된 세포가 거의 발견되지 않은 반면 중앙혈관 근접부위에는 많은 표식세포들이 관찰되었다.

IV. 고 찰

화학물질에 의하여 유도된 세포분열은 발암과정에서 매우 중요한 요인으로 여겨지고 있다. 간에서, Marsman 등(1988)은 세포분열자극의 크기 및 지속기간이 간암의 형성에 결정적인 요소라고 제안하였다. 신장에서 무연휘발유, 2,2,4-trimethylpentane 등에 의하여 단백질이 세포질내 과다하게 축적됨으로서 세포괴사가 발생하고 이로 인한 세포분열이 이들 물질에 의한 신장암의 유발과 밀접한 관계가 있다고 보고하였다(Short 등, 1989). 본 연구에서는 여러 종류의 신장암이 발생하는 동안 세포분열속도의 변화를 autoradiography법에 의하여 조사하였다. 전암상태 세뇨관(preneoplastic tubules)은 그들이 유래된 정상적인 세뇨관에 비하여 약간 상승된 세포분열활성을 나타냈으며, 전암상태 세뇨관에서 암으로 진전되는 동안 세포분열지수가 크게 증가하였다.

사람에서 발견되는 신장상피암의 대부분은 clear cell과 acidophilic cell이 혼합된 clear/acidophilic 종양이며, clear cell 또는 acidophilic cell로만 구성된 신장암은 아주 드물게 발견된다(Thoenes 등, 1986). 일반적으로 acidophilic cell은 clear cell에 비하여 악성이 높은 세포유형으로 간주되고 있다. Baretton 등(1991)은 clear/acidophilic 종양에 대하여 핵-DNA 양과 세포분열속도를 조사한 결과 acidophilic cell이 전체 암세포중에서 차지하는 비율이 증가할수록 DNA aneuploidy 및 세포분열속도가 증가하는 것을 관찰하였다. 신장암은 초기에 국소 림프절, 폐, 골, 뇌, 간 등으로 전이하는 것으로 알려져 있는데(Garnick, 1981), 전이능력에 있어서도 acidophilic cell이 clear cell에 비하여 높다고 보고하였다(Novelli 및 Maciver, 1992). 인체 신장암에서 관찰된 acidophilic cell과 clear cell의 생물학적 양태의 차이와 일치하여 쥐를 이용한 실험동물 모델에서도 acidophilic 종양은 clear cell 종양에 비하여 3배 정도 높은 세포분열지수를 보였다.

Oncocytoma는 신장, 타액선, 갑상선 등 여러 가지 장기나 조직에서 발견되는 종양으로(Hamperl, 1962; Cotton, 1990) 종양의 발생부위와 관계없이 공통된 세포학적 특성을 가지고 있다. Oncocytic 세포는 세포막의 경계가 뚜렷한 다각형으로 강한 호산성세포질은 작은 유리질 과립을 다량 함유하고 있다. 미세구조는 cristae가 조밀하게 배열되어 있는 막대모양이나 나선상의 비특이적인 미토콘드리아가 세포질을 가득 채우고 있으며, 다른 소기관들은 거의 찾아볼 수 없다(Krech 등, 1981). 신장 on-

cocytoma는 Hamperl(1962)에 의하여 1962년에 처음으로 사람에게서 발견되었다. Oncocytoma의 발생빈도는 사람에게 있어서는 낮으나 쥐에서는 여러 가지 화학물질에 의하여 쉽게 유도되며, 늙은 쥐에서는 드물지만 자연적으로도 발생한다(Banasch 등, 1990). Oncocytoma는 이웃하는 정상조직을 밀착시키면서 성장하여도 아직까지 전이된 경우가 보고된 적이 없으며, 다른 종류의 신장암은 악성 종양으로 간주되는 반면 oncocytoma는 양성종양으로 간주되고 있다. 쥐의 oncocytoma는 세포분열활성에 있어서도 다른 신장암과 뚜렷한 차이를 보였다. 전암상태의 oncocytic 세뇨관은 그들이 유래된 집합관에 비하여 증가된 세포분열지수를 보였으나 정상적인 세뇨관 중에서 세포분열이 가장 활발한 근위세뇨관과 유사한 수준의 세포분열활성을 나타냈다. Oncocytoma는 다른 신장암에 비하여 매우 낮은 세포분열활성을 보였으며 acidophilic 종양에 비하여 4배정도 낮은 세포분열지수를 나타냈다. Oncocytoma가 전이능력이 거의 없는 양성종양의 특성을 나타내는 것은 최소한 부분적으로 이 종양의 낮은 세포분열활성에 기인한 것으로 생각된다.

In vitro 상태 뿐만 아니라 *in situ* 상태에서도 세포가 생명력을 유지하고 분열을 하기 위해서는 충분한 영양공급이 필요하다(Tannock, 1968; Hahn 및 Little, 1972). *In situ* 상태에서는 영양물질은 혈관순환계를 통하여 운반된다. 대부분의 정상 조직에서는 영양공급이 원만하게 이루어지지만 종양조직에서는 암세포의 분열활성이 혈관세포 및 간질세포의 분열활성보다 높아서 혈관신생이 충분하지 못하게 되어 영양공급이 나쁜 영역이 생겨난다. 본 실험에서도 크기가 큰 종양의 경우 중앙혈관에서 멀리 떨어진 부위에서 암세포가 집단적으로 죽어 형성된 국소 또는 넓은 괴사영역이 발견되었다. 세포분열속도는 같은 종류의 신장암일지라도 개개의 종양에 따라서 큰 차이를 나타냈으며 암의 크기와는 뚜렷한 상관성을 보이지 않았다. 그러나 세포분열양상은 혈관으로부터의 거리에 따라서 차이를 보였는데, ³H-thymidine으로 표식된 세포는 혈관 주위에 밀도 높게 분포하고 있었으나 괴사영역 주위에서는 표식세포가 거의 관찰되지 않았다. 이러한 현상은 실험적으로 유도한 여러 가지 종류의 종양(Kliggermann 등, 1962; Hirst 및 Denekamp, 1979), 인체유방암(Monschke 등, 1991) 및 인체신장암(Rabes 등, 1979)에서도 발견되었다.

참고문헌

Bannasch, P. and Heide, Z. (1990): Animal models and renal carcinogenesis in Tumor and Tumor-like

- Conditions of the Kidney and Ureters (Eble, J. N. Eds.), (Churchill Livingstone, New York), p. 1-34.
- Baretton, G., Kuhlmann, B., Krech, R. and Lohr, U. (1991): Intratumoral heterogeneity of nuclear DNA-content and proliferation in clear cell type carcinomas of the kidney, *Virchows Archive B Cell Pathol.*, **61**, 57-63.
- Butterworth, B.E. (1990): Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential, *Mutation Res.*, **239**, 117-132.
- Cayama, E., Tsuda, H., Sarma, D.S.R. and Farber, E. (1978): Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation, *Nature*, **275**, 60-65.
- Cotton, D.W.K. (1990): Oncocytomas, *Histopathology*, **16**, 507-509.
- Garnick, M.B. (1981): Advanced renal cell cancer, *Kidney Int.*, **20**, 127-136.
- Hahn, G.M. and Little, J.B. (1972): Plateau-phase cultures of mammalian cells: an *in vitro* model for human cancer, *Curr. Top. Radiat. Res.*, **8**, 39-48.
- Hamperl, H. (1962): Benign and malignant oncocytoma, *Cancer*, **15**, 1019-1027.
- Hiasa, Y. and Ito, N. (1987): Experimental induction of renal tumours, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **17**, 279-343.
- Hirst, D.G. and Denekamp, J. (1979): Tumor cell proliferation in relation to the vasculature, *Cell Tissue Kinet*, **12**, 31-38.
- Kligermann, M.M., Heidenreich, W.F. and Greene, S. (1962): Distribution of tritiated thymidine about a capillary sinusoid in a transplanted mouse tumor, *Nature (London)*, **196**, 282-286.
- Krech, R., Zerban, H. and Bannasch, P. (1981): Mitochondrial anomalies in renal oncocytes induced in rat by N-nitrosomorpholine, *Eur. J. Cell Biol.*, **25**, 331-339.
- Marsman, D.S., Cattley, R.C., Conway, J.G. and Popp, J.A. (1988): Relationship of hepatic peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferator di(2-ethylhexyl)phthalate and [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14,643) in rats, *Cancer Res.*, **48**, 6739-6744.
- Monschke, F., Muller, W.U., Winkler, U. and Streffer, C. (1991): Cell proliferation and vascularization in human breast carcinomas, *Int. J. Cancer*, **49**, 812-815.
- Nogueira, E., Cardesa, A. and Mohr, U. (1993): Experimental models of kidney tumors, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **119**, 190-198.
- Novelli, M.R. and Maciver, A.G. (1992): Renal cell carcinoma: Comparison of morphological and flow cytometric parameters of primary tumor and invasive tumor lying within the renal vein, *J. Pathol.*, **167**, 229-233.
- Pitot, H.C. and Sirica, A.E. (1980): The stages of initiation and promotion in hepatic carcinogenesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **605**, 191-192.
- Rabes, H.M., Carl, P., Meister, P. and Rattenhuber, U. (1979): Analysis of proliferative compartments in human tumors. I. Renal adenocarcinoma, *Cancer*, **44**, 799-813.
- Short, B.G., Burnett, V.L. and Swenberg, J.A. (1989): Elevated proliferation of proximal tubule cells and localization of accumulated $\alpha_2\mu$ -globulin in F344 rats during chronic exposure to unleaded gasoline or 2,2,4-trimethylpentane, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **101**, 414-431.
- Streffer, C., van Beuningen, D., Gross, E., Schabronath, J. and Rebmann, A. (1986): Predictive assay for the therapy of rectum carcinoma, *Radiother. Oncol.*, **5**, 303-310.
- Tannock, I.F. (1968): The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumor, *Brit. J. Cancer*, **22**, 258-263.
- Thoenes, W., Storkel, S. and Rumpelt, H.J. (1986): Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas, and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics, *Pathol. Res. Pract.*, **181**, 125-143.