

간과 신장의 암유발과정에서 혈액화학효소 및 DNA ploidy pattern의 변화에 대한 조사

정자영, 장동덕, 조재천 이영순*

식품의약품안전청, 독성연구소, 병리부, *서울대학교, 수의과대학

Study on clinical chemistry and DNA ploidy pattern changes in carcinogenesis of the rat liver and kidney

Ja-Young Jeong, Dong-Deuk Jang, Jae-Cheon Cho, Yong-Soon Lee*

Department of Pathology, Nat'l Institute of Toxicology Research, KFDA

*College of Veterinary Medicine, Seoul Nat'l University

Abstract. This study was carried out to investigate on the serum chemistry and the DNA ploidy changes in carcinogenesis of the rat liver and kidney. Sixty male Sprague-Dawley rats were divided into two groups. Group I was non-treated control. Group II was given initiators (2,2'-dihydroxy-di-N-propylnitrosamine, 0.1% in drinking water(d.w.) for 1 week and N-ethyl-N-hydroxy-ethylnitrosamine; 0.15% in d.w. for 1 week) and promoters (3'-methyl-cholanthrene; 3'MC, 10mg/kg, intraperitoneally(i.p.) twice a week and DL-serine; 0.05% in d.w. for 5 weeks, from 3 to 8 weeks). All examinations were performed at 12 and 20 weeks. RBC, HGB(p<0.05) and PCV(p<0.01) significantly decreased in Group II at 20 weeks. Activities of ALT, AST(p<0.05) and GGT(p<0.01) were significantly increased in Group II at 20 weeks. Flow cytometric analysis showed hepatocyte nuclei from normal livers were predominantly tetraploid(66~67%) and then diploid(28~30%). Most of hepatocyte nuclei from carcinogen-treated rats were diploid (52~68%) and less were tetraploid(28~42%). Neoplastic liver nodules and hepatocellular carcinoma contained almost exclusively diploid nuclei. Renal cell nuclei from normal kidney were predominantly diploid(88~93%), those from carcinogen-treated rats had an abnormal DNA-content peak(aneuploidy, 6~7%), near the tetraploidy area. These results suggest that diploidy may be an effective screening marker of the liver carcinogenesis. Aneuploidy may be an useful marker in assessment of the experimental renal carcinogenesis.

Key words : carcinogenesis, aneuploidy, diploidization, DNA ploidy pattern, flow cytometry analysis.

서 론

종양세포의 특성 규명에 대한 연구는 종양에 대한 전암병변 및 예후의 진단을 병리학적인 형태에 의존하는 경우에 빛어질 수 있는 오류를 극복할 수 있으며, 객관성과 통계

적 처리가 가능하다는 장점을 가지고 있다. 특히 지금까지 조사된 종양세포의 중요한 특징은 증식성, 핵의 과염색성, 다형상(polymorphism), 분열상, 염색체 이상, DNA 함량의 변화, 세포의 증식이나 malignant transformation과 관련된 특정 단백질량의

증가, 발암유전자의 발현 및 발암억제 유전자의 소실 등이다. 모든 암세포나 발암화 과정에 있는 세포들은 종류에 관계없이 공통적으로 높은 증식성을 가지기 때문에, 종양 세포 및 발암화 과정에 있는 세포의 DNA 함량분석은 그 의미가 크다. 실제적으로 DNA 함량 분석은 종양의 감별진단이나, 예후판정을 위한 중요한 정보로서 임상적으로 사람의 간암(Cottier 등, 1994), 대장암(Bawani 등, 1991), 방광암(Wu 등, 1998), 전립선암(Bratt 등, 1996) 그리고 유방암(Borgiani 등, 1994) 등에서 아주 유용한 자료로 이용되고 있다. 종양의 특성을 반영하는 DNA 함량분석 항목은 DNA ploidy pattern과 S phase fraction이다. 특히 DNA ploidy pattern의 변화는 발암화 과정의 세포나 암세포에서 나타나는 세포 생물학적 현상으로서 polyploidy, aneuploidy 그리고 clonal growth와 같은 특징이 발견된다(Willman and Stewart, 1989). 이와같은 DNA 함량 분석은 최근에 도입되고 있는 유세포 측정기(Flow Cytometer, FCM)를 이용하여 신속 정확하게 수행할 수 있으며(Vindelöv 등, 1983), 본 연구에서도 FCM을 이용하였다.

실험적으로 마우스에서 유발한 간세포 선종이나, 암종을 구성하는 간암세포의 핵 DNA는 정상세포의 것과 차이가 있음을 보고하였다(Danielsen 등, 1988; Digernes, 1983). 또한 랫드의 정상적인 간세포의 핵 DNA는 tetraploidy pattern이 우세한 것으로 알려져 있으나, diethylnitrosamine 등과 같은 DNA-reactive carcinogens들에 의하여 간세포의 핵 DNA 분포가 tetraploidy 에서 diploidy pattern으로 변화됨을 보고하였다(Styles 등, 1985; Sudilovsky and Hei, 1991; Wang 등, 1990). 이와 관련하여 본 연구에서는 다장기 발암모델에 이용되고 있는 발암물

질에 의해서도 같은 현상이 확인되는지 조사하고자 하였으며, 또한 간의 전암병변에서 확인된 diploidy hepatocytes의 선택적 증식 현상이 간세포 암종이 발현될때까지 인정되는지를 조사하였다.

한편 랫드 신장의 전암병변 및 암에 대한 DNA 함량측정은 조사된 바 없으며, 사람의 임상예에서 renal cell carcinoma의 aneuploidy가 50% 정도임이 보고되어(Baisch 등, 1986; Di Silverio 등, 1992) 있을 뿐 신장암에서의 DNA 함량분석은 자료가 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 간암과 신장암의 동시발생을 위한 암유발(2,2'-dihydroxy-di-N-propylnitrosamine; DHPN 과 N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine; EHEN) 및 촉진물질(3'-methylcholanthrene; 3'-MC 와 DL-serine)을 처치하고, 12주의 암발생 과정과 20주에 발생한 암에서 각각 분리한 간과 신장세포를 대상으로 DNA ploidy pattern의 변화를 측정하였고, 더불어 혈청중 임상효소와 혈액학적 성상에 대하여 조사하였다.

재 료 및 방 법

실험동물

총 60마리의 수컷 Sprague-Dawley계 랫드(국립독성연구소, 서울)를 사용하였다. 모든 동물의 사육조건 온도는 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도는 $55 \pm 5\%$ 로 그리고 12시간 명주기와 12시간 암주기를 일정하게 유지하였다. 또한 사료(제일사료, 서울)와 증류수는 자유로이 급식시켰고, polycarbonate 케이지에 5마리씩 넣어 관리하였다. 모든 동물은 분양후 1주의 순화기간을 거친 후 6주령이 되었을 때 실험에 사용하였다.

화학물질과 실험설계

2,2'-dihydroxy-di-N-propylnitrosamine (DHPN)과 N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine (EHEN)은 일본(Nakarai Chemical Co. Ltd.)에서, 3'-methylcholanthrene(3'-MC)과 DL-serine은 미국(Sigma)에서 각각 구입하였다. 모든 랫드는 두군으로 나누었는데, 대조군과 암유발 및 촉진물질을 처리한 처치군으로 나누었다(Fig. 1).

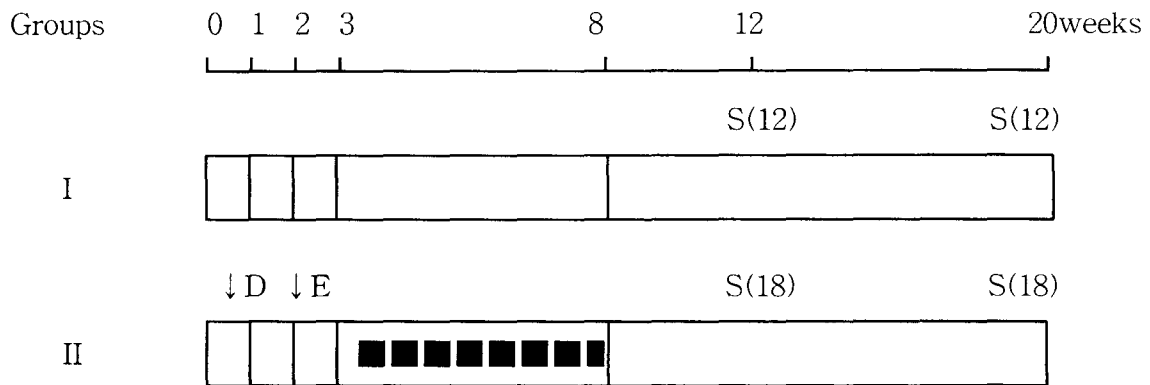
대조군은 아무 처치 없이 정상사료와 증류수로 사육하다 각각 12주와 20주에 부검하여 조사하였고, 발암물질 처치군에는 실험개시일에 발암유발물질로서 0.1% DHPN 과 0.15% EHEN을 음수로 각각 1주간 투여하였다. 이어 1주간의 휴약기간을 둔 후 실험개시 3주에서 8주까지 5주간 발암촉진물질로서, 3'-MC는 10mg/kg의 용량으로 주 2회 복강주사하였고, 같은 기간동안에 DL-serine은 0.05%로 하여 음수로 투여하였다.

부검 및 시료의 보관

12주와 20주에 각각 부검을 실시하여 간과 신장을 적출하였으며, 이들의 일부는 병리조직학적 검사를 위해 10% 중성포르말린에 고정하였고, 나머지 일부는 FCM의 분석을 위하여 dimethylsulfoxide(DMSO)가 포함된 citrate buffer에 넣어 액체질소통에서 급속동결시킨 후 -70°C 냉동고에 보관하였다. 병리조직학적 검사후 간은 전암 및 암병변이 있는 엽을 선택하였고, 신장은 피질부위에서 세포를 분리하여 분석하였다.

혈액학적 검사

부검시 심장에서 채혈하여 항응고제 EDTA가 처리된 병에 혈액을 모아 자동혈구 측정기(S-plus II Coulter Co. U.S.A)를 이용하여 적혈구수(RBC), 혈색소(HGB), 적혈구용적(PCV), 평균적혈구용적(MCV) 및 평균적혈구혈색소량(MCHC) 등을 측정하였다.



Animals : Sprague-Dawley male rats, 6 weeks old

↓ D : 2,2'-dihydroxy-di-N-propylnitrosamine(DHPN), 0.1% in d.w. for 1 week

↓ E : N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine(EHEN), 0.15% in d.w. for 1 week

■ ■ ■ : 3'-methylcholanthrene, 10mg/kg, i.p. twice a week and DL-serine, 0.05% in d.w. for 5 weeks

S (No.) : Sacrifice for examination

Fig. 1. Experimental design of the multi-organ carcinogenesis.

혈청 생화학 검사

채혈 2시간후에 혈청을 분리하여 자동생화학 분석기(RA-XT, Technicon Co. Ltd. U.S.A)를 이용하여 총단백(TP), 알부민(ALB), 혈액요소 질소(BUN), 혈당(GLUC), 콜레스테롤(CHOL), 크레아티닌(CREAT), 중성지방(TRIG), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase(ALT), alkaline phosphatase(ALP), γ -glutamyltransferase(GGT) 및 Ca^{++} 농도 등을 측정하였다.

Nuclei DNA 함량분석

시료 및 염색 : DNA 함량 분석은 Vindelöv 등의 detergent-trypsin법(Vindelöv 등, 1983)을 이용하였으며 시약 및 염색 방법은 다음과 같다. Stock solution : Trisodium citrate $2H_2O$ 2,000mg(3.4mM), Nonidet P 40(NP40) 2,000 $\mu\ell$ (0.1% v/v), Spermine tetrahydrochloride

1,044mg(1.5mM) and Tris (hydroxymethyl) aminomethane 121mg(0.5mM)을 증류수에 용해시켜 총량이 2,000ml이 되도록 하였으며 pH는 7.6이 되게 하였다. A 염색액은 15mg의 trypsin을 500ml의 stock solution에 용해하여 pH가 7.6이 되도록 하였다. B 염색액은 250mg의 trypsin inhibitor와 50mg의 ribonuclease A 를 500ml의 stock solution에 용해하여 pH가 7.6이 되게 하였다. C 염색액은 208mg의 propidium iodide(PI) 와 580mg 의 Spermine tetrahydrochloride를 500ml의 stock solution에 용해하여 pH가 7.6이 되도록 하였다. C 염색액은 알루미늄 호일로 포장하여 빛을 차단하였다. 염색액은 10ml 씩 분주하여 $-70^{\circ}C$ 냉동고에 보관하였다가 DN A 염색시 $37^{\circ}C$ 에서 녹인후 A, B 염색액은 실온에 C 염색액은 냉장고에 보관하면서 사용하였으며, 염색 과정은 그림 2와 같다(Fig. 2).

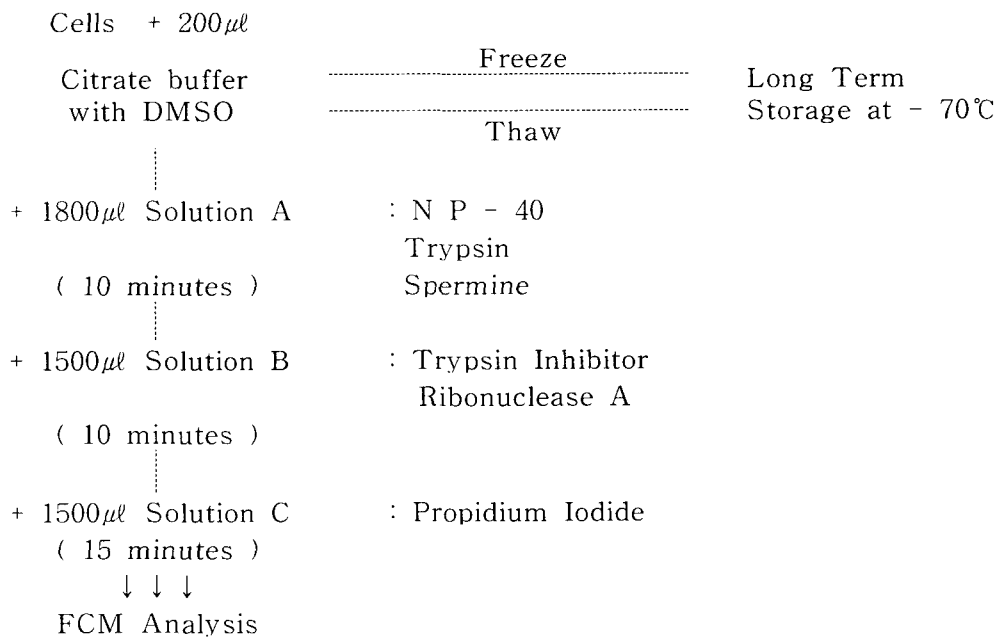


Fig. 2. Nucleic DNA staining methods by Vindelöv method.

DNA 함량측정 및 자료분석. DNA 함량은 EPICS CS system(Technicon Co. Ltd., U.S.A.)을 이용하여 측정하였으며 flow cell tip은 직경이 100 μ m인 것을 사용하였고 excitation 파장과 emission 파장은 각각 488 nm 와 550~600nm로 하였다. 시료당 측정 세포수는 10,000개로 하였다. 측정결과의 분석은 Coulter Easy 2 program(Technicon Co. Ltd., U.S.A.)을 이용하여 실시하였다. 자료에 대한 통계학적 처리로는 DNA 함량 측정의 데이터는 ANOVA후 군간 다중비교(Student's t-test)를 하였으며, 혈액학적 검사 자료 및 혈청생화학적 결과는 독성시험 통계프로그램인 LABCAT(Innovative Programming Associates, Inc. U.S.A.)을 이용하여 군간 다중비교(Dunnett's test)를 하였다.

결 과

혈액학적 검사

부검시 EDTA가 처리된 용기에 채혈하여 분석한 혈액학적 자료를 표 1에 정리하였다.

혈액학적 검사에서는 12주 부검동물에서는 대조군과 처치군 사이에 유의있는 결과가 인정되지 않았으나, 20주 부검동물에서는 처치군에서 대조군에 비하여 RBC, HGB($p<0.05$) 및 PCV($p<0.01$)는 각각 유의있는 감소가 인정되었다.

혈청 생화학적 검사

혈청 생화학적 검사에서는(Table 2) 12주 부검결과에서 유의성이 인정된 항목은 없었으나, 대조군에 비하여 처치군에서 간의 독성평가에 이용되는 항목들, 즉 ALT, AST, 그리고 GGT등에서 약간의 증가를 확인할 수 있었다. 그러나 20주 부검동물에서는 대조군에 비해 ALT, AST, creatinine, cholesterol($p<0.05$) 그리고 GGT($p<0.01$) 등에서 각각 유의있는 증가를 보였다. 또한 ALP($p<0.05$)는 유의수준으로 감소하는 경향을 확인할 수 있었다.

Table 1. Hematological values in normal and carcinogen treated rats

Groups	Wks at autopsy	Tests (units)					
		RBC (millions)	HGB (g/dl)	PCV (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)
I	12	7.90 ±0.37	18.96 ±0.73	57.37 ±2.54	73.13 ±1.37	24.25 ±0.89	33.06 ±0.89
	20	8.78 ±0.51	18.04 ±0.99	65.09 ±3.50	74.10 ±2.29	20.55 ±0.64	17.75 ±1.14
II	12	8.08 ±0.32	18.16 ±0.76	57.73 ±2.71	71.36 ±1.48	22.49 ±0.66	31.47 ±0.67
	20	8.10* ±0.37	17.26* ±0.80	57.74** ±2.76	71.30 ±2.39	21.31 ±0.65	29.89 ±0.69

All values are mean \pm S.D.

* : Significant difference from Group I($p<0.05$) at the same autopsy weeks.

** : Significant difference from Group I($p<0.01$) at the same autopsy weeks.

Table 2. Changes of serum chemistry of the normal and carcinogen treated rats

Groups	Wks at autopsy	Tests (units)					
		ALT (U/l)	AST (U/l)	GGT (U/l)	GLUC (mg/dl)	ALB (g/dl)	T.P. (g/dl)
I	12	52.0 ±7.0	173 ±26.6	1.82 ±0.22	112 ±17.0	4.3 ±0.16	7.2 ±0.42
	20	67.0 ±22.0	200 ±44.1	1.72 ±0.548	168 ±36.8	9.6 ±0.37	7.7 ±0.51
II	12	62.0 ±10.7	199 ±25.7	2.79 ±0.25	120 ±16.5	4.3 ±0.09	7.1 ±0.27
	20	87.0* ±13.9	253* ±64.5	4.24** ±1.16	170 ±34.1	8.5 ±1.20	7.9 ±0.84

All values are mean ± S.D.

* : Significant difference from Group I(p<0.05) at the same autopsy weeks.

** : Significant difference from Group I(p<0.01) at the same autopsy weeks.

Table 2. Changes of serum chemistry of the normal and carcinogen treated rats(continued)

Groups	Wks at autopsy	Tests (units)					
		BUN (mg/dl)	CREAT (mg/dl)	CHOL (mg/dl)	TIRIG (mg/dl)	ALP (U/l)	Ca ⁺⁺ (mg/dl)
I	12	17.0 ±2.3	0.6 ±0.13	70.0 ±11.7	68 ±10.9	77 ±16.9	8.9 ±0.66
	20	27.0 ±4.1	0.6 ±0.16	103 ±17.0	141 ±27.4	87 ±19.2	8.7 ±0.78
II	12	18.0 ±1.1	0.6 ±0.15	71.0 ±7.2	74 ±0.27	73 ±10.5	9.6 ±0.22
	20	30.0 ±9.8	0.8* ±0.12	133* ±34.9	114 ±44.4	71* ±17.5	9.0 ±0.95

All values are mean ± S.D.

* : Significant difference from Group I(p<0.05) at the same autopsy weeks.

** : Significant difference from Group I(p<0.01) at the same autopsy weeks.

DNA 함량측정

간세포에 대한 DNA ploidy pattern 측정 결과는 표 3에 정리하였다. 비처리군의 간에서 분리한 정상 간세포의 DNA ploidy pattern은 12주 및 20주의 부검 시료에서 4N cell(66-67%) > 2N cell(28-30%) > 8N cell(5%)의 순으로 나타났다. 정상 간세포의 DNA ploidy pattern은 부검시간과 관계없이 일정한 분포를 나타내는 것으로 조사되었다(Fig. 3A). 그러나 발암물질이 처리된 간에서 분리한 간세포의 DNA ploidy pattern은 2N cell(52-68%) > 4N cell(28-42%) > 8N cell(5%)로 조사되었다. 이와같은 현상은 20주에서 더 뚜렷한 차이를 나타내었다(Fig. 3B). 발암물질이 처리된 군의 간세포에서 2N cell의 증가와 4N cell의 감소가 유의성있게($p < 0.01$) 나타났지만, 8N cell의 비율은 12

주나 20주에서 변화없이 일정하게 조사되었다.

신장 세포에 대한 DNA ploidy pattern의 측정은 선행된 병리조직학적 검사에 의하여 전암 및 암병변이 확인된 신장을 대상으로 신장의 피질부위에 있는 세포를 선택하여 조사하였고, 그 결과를 표 4에 정리하였다. 정상 대조군의 신장에서 분리한 신장세포의 DNA ploidy pattern은 12주 및 20주의 부검 시료에서 2N cell(88-93%) > 4N cell(5-7%)의 분포이었으며, 대부분 2N cell로 구성되어 있는 것으로 조사되었다(Fig. 3C). 또한 간세포에서 확인되었던 8N cell은 없는 것으로 나타났다. 정상 신장 세포의 DNA ploidy pattern 역시 부검시간과 관계없이 일

Table 3. DNA ploidy pattern in normal and carcinogen treated rat liver

Groups	Weeks at autopsy	Inci. rate of Tumor	DNA Ploidy Patterns		
			2 N cell(%)	4 N cell(%)	8 N cell(%)
I	12	-	29.5 ± 3.8	65.7 ± 3.0	4.8 ± 1.9
	20	-	28.2 ± 4.2	66.8 ± 3.2	4.5 ± 1.7
II	12	3(25%)	41.5 ± 3.7**	41.5 ± 3.7**	5.0 ± 1.8
	20	14(70%)	67.6 ± 6.7**	27.5 ± 6.5**	4.1 ± 1.7

All values are mean ± S.D.

** : Significant difference from Group I($p < 0.01$) at the same autopsy weeks.

Table 4. DNA ploidy pattern in normal and carcinogen treated rat kidney

Groups	Weeks at autopsy	Inci. rate of Tumor	DNA Ploidy Patterns		
			2N cell(%)	4N cell(%)	Aneuploidy ^{a)} (%)
I	12	-	92.9 ± 3.5	4.8 ± 1.9	-
	20	-	88.3 ± 3.9	6.7 ± 1.5	-
II	12	-	78.7 ± 4.1**	12.9 ± 2.4**	7.0 ± 1.1**
	20	9(45%)	77.7 ± 3.6**	13.9 ± 1.6**	6.3 ± 2.4**

All values are mean±S.D.

a) : Aneuploidy is located near the 4N cell.

** : Significant difference from Group I($p < 0.01$) at the same autopsy weeks.

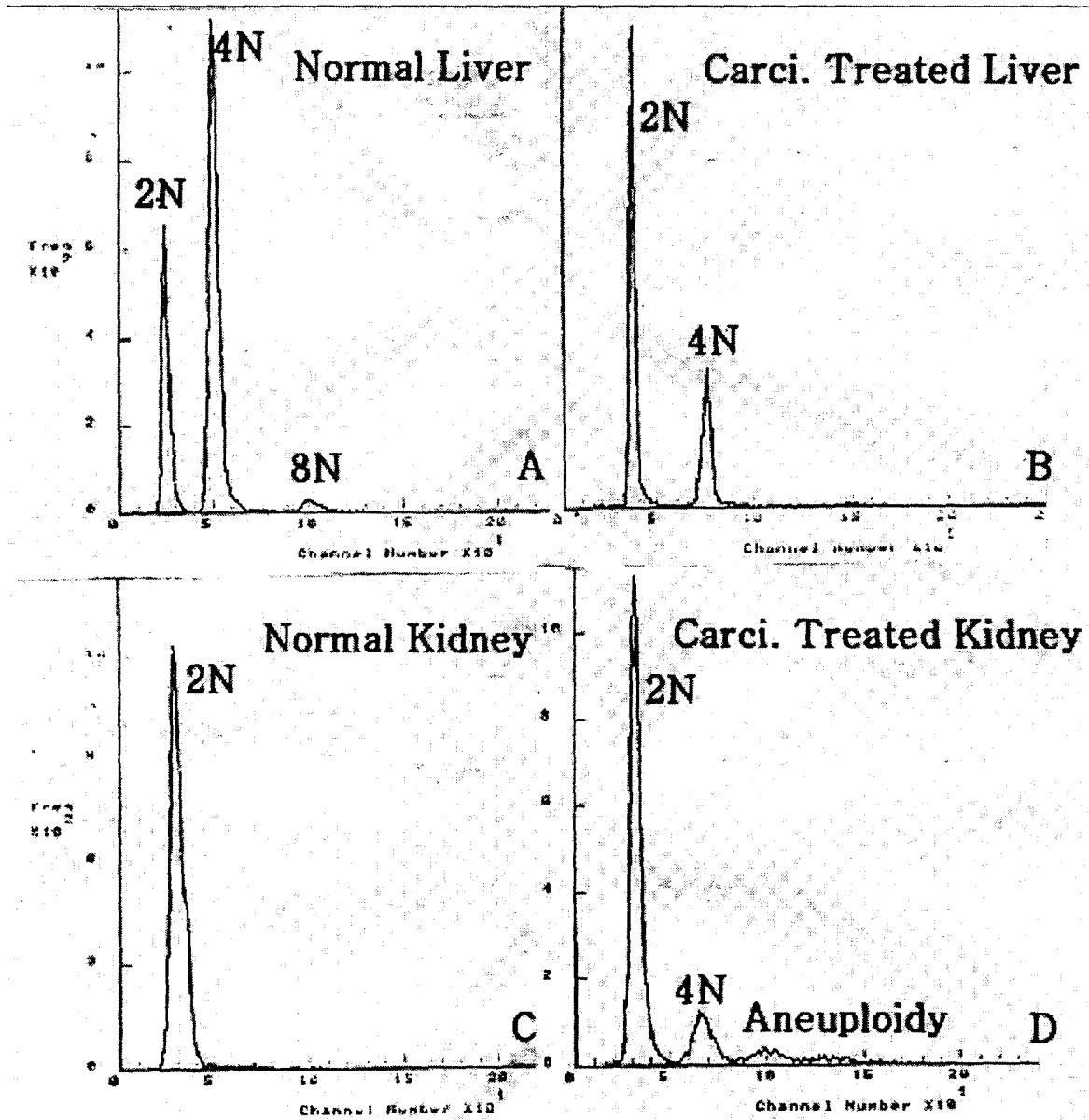


Fig. 3. DNA histogram of the liver and kidney in normal and carcinogen treated rats at 20 weeks. A : normal liver, B : carcinogen treated liver, C : normal kidney, D : carcinogen treated kidney.

정한 분포를 나타내는 것으로 조사되었다. 그러나 발암물질이 처치된 신장에서 분리한 신장 세포에서 발견된 가장 두드러진 DNA ploidy pattern은 4N cell 근처에서 6-7%의 aneuploidy의 출현이다(Fig. 3 D). 뿐만 아니라, 간세포와는 반대로 12주와 20주의 처치군에서 2N cell 비율의 감소와 4N cell 비율의 유의있는 증가($p < 0.01$)가 관찰되었다.

고 찰

암세포 또는 발암화 과정의 전암세포에 대한 유전적 특성을 규명하는 것은 암세포의 조기진단, 악성 및 전이로의 진행 가능성, 예후의 판단 및 궁극적으로 치료방법의 선택까지 아주 중요한 단서를 얻을 수 있다. 특히 DNA ploidy pattern의 변화는 세포의 유전적 변화가 유발됐을 때 공통적으로 동반되며, 비교적 암발생 초기부터 출현하는 현상이므로, 이에 대한 정확한 평가는 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 간암과 신장암의 동시발생을 위한 암유발 및 촉진물질을 처치하고, 12주의 암발생 과정과 20주에 발생한 암에서 각각 분리한 간과 신장세포를 대상으로 DNA ploidy pattern의 변화를 조사하였으며, 더불어 혈청중 임상효소 그리고 혈액학적 성상에 대하여 조사하였다.

본 실험의 12주에 실시한 혈액학적 검사에서는 대조군과 발암물질 처치군 사이에 유의적 결과가 모든항목에서 인정되지 않았으나, 20주에는 처치군에서 대조군에 비하여 RBC, HGB 및 PCV가 각각 유의있게 감소된 점으로 미루어, 암화과정 및 발생한 암에 의한 동물의 빈혈현상이 나타난 것으로 생각할 수 있다. 또한 혈청 생화학 효소의 분석에서 간독성 지표효소로 알려져 있는 ALT와 AST의 활성도와 최근 간발암화 과정에

나타나는 전암병변의 특이 지표효소로 알려져 있는 γ -GT15의 활성도가 발암물질을 처치한 20주에서 각각 유의성있게 증가하였다. 한편 12주에서는 이와같은 경향은 조사되었으나, 유의성은 나타나지 않았다. 또한 신장독성 평가 항목으로 알려져있는 BUN과 creatinine의 측정에서는 20주 부검 처치동물에서 약간의 증가를 보였지만 유의수준은 아니었다. 이로 미루어 일반적인 혈청의 생화학적 효소는 발암물질 투여에 대한 민감한 지표는 아니지만, 암발생 과정에서부터 생긴 그 변화가 지속적으로 암발생까지 유지되는 경향을 특히 간에서 확인할 수 있었다. 이외에도 20주 부검동물에서 콜레스테롤의 유의적 증가가 인정되었는데 이는 연령과 식이에 관계될 것으로 사료된다.

한편 유세포측정기(flow cytometer, FCM)를 이용한 DNA ploidy 패턴에 대한 분석은 발암화 과정 및 발생한 간암과 신장암에서 각각 분리한 세포를 대상으로 조사하였다. 정상 대조군의 간에서 분리한 간세포의 DNA ploidy pattern은 12주 및 20주의 부검 시료에서 4N cell(tetraploid, 66-67%)의 분포가 제일 많았으며, 2N cell(diploid, 28-30%) 및 8N cell(octaploid, 5%)의 순으로 나타났고, 동물의 주령과 관계없이 일정한 분포를 갖는 것으로 조사되었다. 그러나 발암물질이 처치된 경우에는 2N cell(52-68%)의 분포가 현저하게 증가하였으며, 다음으로 4N cell(28-42%) 그리고 8N cell(5%)의 순으로 조사되어, 정상동물의 간세포와는 다른 양상을 나타내었다. 이와같은 결과는 간 발암물질을 처치한 후 조사한 기존의 보고와도 일치하고 있다. 랫드를 대상으로 한 연구에서, Ito의 간발암성 모델(Seglen 등, 1986)과 6개월간 thioacetamide를 복강주사하여 발생한 hyperplastic nodular cirrhosis에서 분석한

DNA ploidy 패턴에서 간세포의 diploidization이 확인되었으며(Sanz 등, 1995), 이와 같은 현상은 처치 초기에 나타나 암과 간경변 조직에까지 유지되는 것으로 조사되었다. 또한 마우스를 대상으로 polychlorinated biphenyls(PCBs)와 Aroclor 1254의 혼합투여 그리고 철의 투여에 의해 발생하는 간 발암화 과정(Madra 등, 1995)과, 신생마우스에 dimethylnitrosamine (DMN)과 2-acetylaminofluorene(AAF)을 투여한 후 조사한 FCM-DNA 분석 결과(Digernes, 1983)에서도 diploidization이 보고되었다. 발암물질 이외에 간의 비대화를 유발하는 hexachlorobenzene(Rizzardini 등, 1990) 및 peroxisome proliferator의 투여나(Styles 등, 1990), 수술적 방법에 의한 간의 보상성 재생을 유발한 실험예에서는(Melchiorri 등, 1993) DNA ploidy 변화가 없거나, 가역적 변화로서 일정 기간 경과 후에는 정상상태로 돌아가는 현상이 보고되었다. 특히 사람의 간암발생 과정에 대한 조사에서 정상, 간경화 및 간암 시료에서 각각 분리한 간세포를 대상으로 binucleated cell에 대한 조사를 수행하였다(Saeter 등, 1988). 정상간에서는 binucleated cell(tetraploids)이 주를 이루었으며, 간암세포에서는 주로 mononucleated diploid cell의 분포가 많아 실험동물에서와 같이 diploidization 현상이 일치되었으며, 약간의 aneuploidy가 존재한다는 점이 실험동물과의 차이점이었다. 이와 같이 간 발암화 과정에 나타나는 diploidization은 사람과 실험동물에서 일치되고, 간 발암화에 필수적인 과정으로 이해된다. 이의 원인은 binucleated hepatocytes에서 찾아 볼 수 있다. 즉 발암물질의 투여에 의하여 diploidization이 일어난 경우에는 diploid binucleated hepatocytes(tetraploid)가 두개로 나뉘어져 mononucleated

hepatocytes(diploid)가 되면서, diploidization이 일어나는 것으로 사료된다. 그러나 어떤 이유에서 binucleated hepatocyte가 발암물질에 표적이 되며, 이것이 분열되어 mononucleated hepatocyte가 되는지에 대하여는 잘 알려져 있지 않다.

신장 세포에 대한 DNA ploidy pattern의 측정은 선행된 병리조직학적 검사에 의하여 전암 및 암병변이 확인된 신장을 대상으로 신장의 피질부위에 있는 병변부위의 세포를 선택하여 조사하였다. 정상 대조군의 신장에서 분리한 신장세포의 DNA ploidy 분포는 12주 및 20주의 부검 시료에서 2N cell은 88-93% 그리고 4N cell은 5-7%의 분포로 조사되었으며, 간세포에서 확인되었던 8N cell은 없는 것으로 나타났다. 정상 신장세포의 DNA ploidy pattern 역시 동물의 주령과 관계없이 일정한 분포를 나타내는 것으로 조사되었다. 그러나 발암물질이 처치된 신장에서 분리한 신장 세포에서 발견된 가장 두드러진 DNA ploidy pattern은 4N cell 근처에서 6-7%의 aneuploidy의 출현이다. 뿐만 아니라, 간세포와는 반대로 12주와 20주의 처치군에서 2N cell의 분포는 감소하고, 4N cell의 비율이 증가하는 현상이 관찰되었다. 사람의 신장암에 있어서는 aneuploidy가 인정되는 예(Baisch 등, 1986; Di Silverio 등, 1992)가 많으며, tetraploidization이 몇몇 예에서 인정된다는 보고(Ljungberg 등, 1986)가 있지만 랫드에서의 보고는 아직 없으며, 본 연구에서 처음으로 확인하였다. 이상의 결과에서 간암화 과정에서 2N cell의 증가 그리고 신장의 암화과정에서 4N cell의 증가 및 aneuploidy의 출현은 polyploidization과 관련된 clonal growth라고 해석할 수 있다. 즉 clonal growth는 종양의 한 특징이고, 이러한 성장을 보이는 대부분의

세포는 종양세포일 것으로 추정하고 있다. 이와같이 polyploidization 및 clonal growth는 발암화 초기단계나 몇몇 실험계에서 발암 물질에 의하여 흔히 유발되는 현상이다. Polyploidy는 chromosome 수 및 핵 DNA 함량의 배수성을 의미하며, 상당한 정도의 성장조건에 적응되어 나타나는 현상으로 생각된다. Aneuploidy는 세포분열하는 동안 생성된 세포의 DNA material의 소실이나, DNA의 불공평한 분포에 의해서 유발된다. Aneuploidy를 유발하는 물질은 아마도 발암 물질이거나 기형유발물질로서 강한 의심을 받게되며, 이러한 증거들이 몇몇 실험법 즉 소핵시험, 자매염색분체 교환시험 및 다양한 세포유전학적 연구방법들에 의하여 입증되고 있다. 따라서 많은 독성물질의 생체내 반응 및 cell kinetics에 대한 평가를 위해 FCM을 이용한 DNA 함량분석은 아주 유용한 방법으로써 많은 활용이 기대된다. 또한 본 연구의 이러한 결과는 발암물질의 생체내 검사를 위한 실험모델에서 조기 검사를 위한 신뢰성 있는 지표로서 FCM-DNA 분석법이 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Baisch H, Otto U, et al. Malignancy index based on flow cytometry and histology for renal cell carcinomas and its correlation to prognosis. *Cytometry* 7:200-204, 1986.
- Bawani M, Tibrewala S, et al. DNA flow cytometry of colorectal carcinoma : correlation of DNA stemlines with other prognostic indices. *Am J Gastroenterol* 86(2):191-195, 1991.
- Borgiani L, Cogorno P, et al. Comparative DNA analysis of breast cancer by flow cytometry and image analysis. *Pathologica* 86(4):356-359, 1994.
- Bratt O, Anderson H, et al. Metaphase cytogenetics and DNA flow cytometry with analysis of S-phase fraction in prostate cancer: influence on prognosis. *Urology* 47(2):218-224, 1996.
- Cottier M, Jouffre C, et al. Prospective flow cytometric DNA analysis of hepatocellular carcinoma specimens collected by ultrasound-guided fine needle aspiration. *Cancer* 74(2):599-605, 1994.
- Danielsen HE, Steen HB, et al. Ploidy distribution in experimental liver carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* 9(1):59-63, 1988.
- Di Silverio F, Gallucci M, et al. Biological and clinical implication of cellular DNA content in renal cell carcinomas. *Eur Urol* 21(Suppl 1):43-47, 1992.
- Digernes V. Chemical liver carcinogenesis: monitoring of the process by flow cytometric DNA measurements. *Environ Health Perspect* 50:195-200, 1983.
- Ljungberg B, Forsslund G, et al. Prognostic significance of the DNA content in renal cell carcinoma. *J Urology* 135:422-426, 1986.
- Madra S, Styles J, et al. Perturbation of hepatocyte nuclear populations induced by iron and polychlorinated biphenyls in C57BL/10ScSn mice during carcinogenesis. *Carcinogenesis* 16(4):719-727, 1995.
- Melchiorri C, Chieco P, et al. Ploidy and nuclearity of rat hepatocytes after compensatory regeneration or mitogen-

- induced liver growth. *Carcinogenesis* 14(9):1825-1830, 1993.
- Rizzardini M, Cantoni L, et al. Biochemical, morphological and flow-cytometric evaluation of the effects of hexachlorobenzene on rat liver. *Cell Biol Toxicol* 6(2):185-203, 1990.
- Saeter G, Lee CZ, et al. Changes in ploidy distributions in human liver carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 80(18):1480-1485, 1988.
- Sanz N, Diez-Fernandez C, et al. Relationship between antioxidant systems, intracellular thiols and DNA ploidy in liver of rats during experimental cirrhogenesis. *Carcinogenesis* 16(7):1585-1593, 1995.
- Seglen PO, Schwarze PE, et al. Changes in cellular ploidy and autophagic responsiveness during rat liver carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 14(3):342-348, 1986.
- Sidransky H, Verney E, et al. Effects of varying fat content of a high tryptophan diet on the induction of gamma-glutamyltranspeptidase positive foci in the livers of rats treated with hepatocarcinogen. *Cancer Lett* 31(3):235-242, 1986.
- Styles JA, Elliott BM, et al. Irreversible depression in the ratio of tetraploid:diploid liver nuclei in rats treated with 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene(3'M). *Carcinogenesis* 6:21-28, 1985.
- Styles JA, Kelly MD, et al. Effects produced by the non-genotoxic hepatocarcinogen methylclofenapate in dwarf mice : peroxisome induction uncoupled from DNA synthesis and nuclearity changes. *Carcinogenesis* 11(3):387-391, 1990.
- Sudilovsky O and Hei TK. Aneuploidy and progression in promoted preneoplastic foci during chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Cancer Lett* 56(2):131-135, 1991.
- Vindelöv LL, Christensen IB, et al. A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 3:323-327, 1983.
- Wang JH, Hinrichsen LI, et al. Nuclear DNA content of altered hepatic foci in a rat liver carcinogenesis model. *Cancer Res* 50(23):7571-7576, 1990.
- Willman CL and Stewart CC. General principles of multiparameter flow cytometric analysis: applications of flow cytometry in the diagnostic pathology. *Lab Seminar in Diagnostic Pathology* 6:3-12, 1989.
- Wu L, Lochhead A, et al. DNA-flow cytometric analysis of bladder TCC using paraffin-embedded tissues. *Urol Int* 60(4):208-215, 1998.

Request reprints from Dr. Ja-Young Jeong, Department of Pathology, National Institute of Toxicology Research, KFDA, Seoul, 122-704, Republic of Korea.

Tel) 02-380-1826, Fax) 02-380-1828, E-mail : youngjy@yahoo.com