

햄스터 oval cell의 간흡충감염 후 담관암으로의 분화에 관한 세포병리학적 연구

윤병일 · 김방현 · 김대용*

일본 국립의약품식품위생연구소 안전성연구센터 독성부, *서울대학교 수의과대학

Cholangiocarcinogenesis Following Oval Cell Induction and *Clonorchis sinensis* Infestation in Hamster

Byung-Il Yoon, Bang-Hyun Kim, and Dae-Yong Kim*

Cellular and Molecular Toxicology Division, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501

Japan and *Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology
Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea

Abstract : Oval cell is considered as facultative precursor cells for both hepatocytes and biliary cells, as well as origin of hepatocellular and cholangiocellular carcinoma (CCC) during carcinogenesis or toxic liver injury. To clarify the cellular origin or differentiation of cholangiocarcinogenesis, the fate of carcinogen-induced oval cells was pathologically and phenotypically chased in Syrian golden hamster liver after *Clonorchis sinensis* (CS) infection which would give rise to a promoting effect. Two week treatment of hamsters with 0.005% diethylnitrosamine (DEN) followed by 2 week treatment of 1% 2-acetylaminofluorene (AAF) under choline deficient diet resulted in massive proliferation of BrdU labeled and PCNA positive oval cells showing various distinct morphology, histochemical and immunohistochemical phenotypes for GGT, cytokeratin 19 and OV-6. Oval cells also frequently form ductular-like structures or phenotypically show hepatocyte-like characteristics. After CS infection, the oval cells showed sequential morphological changes to atypical proliferating bile ductules and all hamsters thereafter developed well differentiated and anaplastic CCC at 16 week after CS infection. In electron microscopy, some bile ductules were constructed by intermediate oval cells and bile ductular cells surrounded by thick basement membrane. The results of this study strongly suggest that CCC developed in the present study were originated from hepatic stem-like oval cells, supporting the theory of stem cell origin of cancers. In addition, this hamster model would be valuable for the molecular mechanistic study during chemical-triggered cholangiocarcinogenesis.

Key words : Oval cell, hamster, diethylnitrosamine, *Clonorchis sinensis*, cholangiocellular carcinoma

서 론

종양은 성숙세포의 역분화 또는 pluripotential한 줄기세포 (stem cell)의 비정상적인 분화과정에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다^{17,18}. 그 중 줄기세포이론은 종양의 발생이 세포의 분화능력과 밀접한 관계가 있다고 하는데 근거하고 있다. 실제로 피부, 위장점막, 골수와 같이 세포의 발생과 분화가 빠른 장기가 신경조직과 같이 낮은 cellular turnover를 가진 장기보다 종양의 발생률이 훨씬 높다¹⁷. 줄기세포는 자세포 (daughter cell)를 생산하고 이 세포가 분화하는 동안 줄기세포로 남아있는 pluripotential한 세포로서, 증식과 분화과정을 통하여 정상상태에서 노쇠한 세포를 대체하거나 병적 상태에서 파괴된 세포를 복구한다¹⁷.

간장에서 줄기세포의 존재는 많은 연구들에 의해 증명되어

왔다. 현재까지의 연구에서 간장 줄기세포로서 blast-like cell, periducatal cell, bile duct cell등이 제안되었는데^{13,15,19}, 간장 줄기세포의 정확한 존재위치는 아직도 논란 중에 있으나, 담관과 밀접하게 연관되어 있을 것이라고 알려져 있다.

간장 oval cell은 간장 줄기세포의 후대세포로, 발암물질을 포함한 화학물질 등에 의한 간장의 심한 손상이 있을 후 성숙간세포의 증식 및 복구능력이 충분하지 못할 때 간장의 문맥주변부로부터 증식하여, 세포 환경적 요소에 의존하여 간세포와 담관세포로 분화, 손상된 간장복원에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며^{2-5,9,12,14,16}, 또한 간세포암과 담관암의 기원세포일 가능성이 많은 연구들에 의해서 보고되었다^{11,18}. Oval cell은 양성한 증식성과 함께 면역염색결과 α -fetoprotein, albumin, cytokeratin 8/18, cytokeratin 7/19 (CK7/19)등 간세포와 담관세포의 특성을 함께 가지고 있을 뿐 아니라^{3,7,14}, in

*vitro*에서 종양화 된 oval cell로부터 간세포암, 담관암 그리고 분화정도가 다양한 종양의 발생이 확인되었다²⁰.

간장 oval cell 및 간세포암 (hepatocellular carcinoma)과 담관암 (cholangiocellular carcinoma; CCC)으로 대별되는 간암의 발생기전에 관한 연구는 랫드와 햄스터에서 주로 이루어져왔다. 랫드가 간장 줄기세포의 간세포로의 분화와 간세포암 연구에 자주 이용된 반면, 햄스터 담관암모델은 사람의 담관암 발생 연구에 유용한 동물모델로 알려져 왔다^{10,11}. 다단계 종양 발생과정, 즉 initiation, promotion, progression에 기초하여 고안된 햄스터 담관암 모델은 dimethylnitrosamine (DMN)투여와 함께 promoter로서 간흡충 (*Clonorchis sinensis* 또는 *Opisthorchis viverrini*)을 감염시킴으로써 이루어졌다^{10,11,21}. 담관암모델은 지금까지 아시아에서 보고된 담관암의 높은 발생이 종양 발생 촉진인자로서 작용하는 간흡충 감염과 관련이 있음을 증명하였다.

담관암의 발생 및 진행기전은 아직도 탐구 중에 있으며, 그 기원세포로서는 담관상피세포와 간장 줄기세포 모두 가능성이 있는 것으로 보고되어 오고 있다^{1,20}. 그러나, 간장 oval cell 과 관련한 담관암의 발생 및 진행기전에 대한 병리학적 및 분자생물학적 기전 연구는 매우 미흡한 실정으로 있다.

본 연구는 햄스터를 이용, 간장 줄기세포로 잘 알려진 oval cell로부터 담관암발생에의 가능성을 동물모델을 이용하여 알아보고, 줄기세포이론에 기초한 담관암발생의 세포병리학적 기전을 규명하기 위하여 수행되었다. 간장 줄기세포의 증식을 유도하기 위해 diethylnitrosamine (DEN)를 음수로 투여하였으며, 동시에 2-acetyl aminofluorene (AAF) 투여로 성숙간세포의 재생성 증식이 억제되도록 하였다. 이 후 간흡충을 경구감염 시킴으로써 담관암으로의 전진을 촉진 유도하였다. 담관암 발생기간 동안 실험 초기에 유도된 oval cell의 움직임을 조직병리학적, 조직화학적 및 면역조직화학적, 그리고 전자현미경적으로 검사하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육환경

Oval cell에 대한 연구를 위한 적합한 모델을 확립하기 위하여 생 후 5 주령 (체중 약 50~65 g)된 수컷 햄스터를 랫드용 케이지에 3 마리씩 합사하여 1 주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실내온도는 22±2°C로, 상대습도는 55±10%로 유지하였다. 사료는 실험개시 후 5 주까지는 특수하게 제작된 choline 결핍사료를, 그 외는 일반사료를 자유급식 하였고, 음수는 oval cell의 증식을 유도하는 실험 첫 번째 2 주 동안은 0.005%의 DEN을 함유한 음수를, 그 외는 수돗물을 자유롭게 급수하였다.

간흡충 (*Clonorchis sinensis*) 피낭유충의 수집과 감염

낙동강의 간흡충 유행지역에서 잡은 참붕어 (*Pseudorasbora*

parva) 또는 물개 (*Gnathopogon coreanus*)의 근육을 인공위액 (pepsin 1.5% wt/v, 0.9% HCl, pH 1.25)으로 소화시킨 후 간흡충의 피낭유충을 얻었다. 분리한 피낭유충을 stereoscopic microscope하에서 생리식염수로 깨끗이 세척한 다음 15마리씩 나누어 경구로 감염시켰다.

실험군의 구성

Oval cell의 증식을 유도하기 위하여 0.005% DEN을 음수에 혼합하여 특수 제작된 choline 결핍사료와 함께 2 주 동안 급여하였다. 1 주일간의 휴식기를 거쳐 1% AAF를 체중 kg당 15 mg으로 매일 1회씩 2 주간 경구로 투여하였다. Choline 결핍사료는 실험개시일부터 AAF투여종료시까지 계속하여 급여하였다. AAF 투여개시 4일 후 햄스터 1 마리 당 간흡충의 피낭유충을 15개씩 경구감염 시킨 다음 담관암발생을 위하여 20 주 동안 유지하였다.

동물의 부검과 조직처리

실험기간동안 자연폐사한 동물은 부검하여 가능한 경우 조직학적 검사를 실시하였으나, 기타 다른 검사를 위해서는 사용하지 아니하였다.

동물은 간흡충 감염 전 (실험개시 4주)의 oval cell의 증식과 이의 재연성을 확인하기 위하여 6마리의 동물을 부검하여 병리조직학적 검사를 실시하였으며, 간흡충 감염 이후의 조직에 대한 대조군으로 사용하였다. 실험개시 5 주와 7 주 (간흡충감염 후 1 주와 3 주)에 각각 햄스터를 부검하여 간흡충 감염 후 초기 간장에서 조직학적변화를 검사하였다. 실험개시 20 주에는 그때까지 생존한 햄스터를 모두 부검하여 종양의 발생여부를 확인하고 조직학적 검사를 실시하였다. 동물은 부검하여 육안소견을 관찰하고, 간장은 적출하여 일부는 10% 중성 완충 포르말린 용액에 12시간동안 고정하거나, Gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) 염색을 위한 조직화학적 검사를 위해서 4% paraformaldehyde (0.1 M PBS, pH 7.4, 1 mM CaCl₂)에 4°C에서 4시간 동안 고정시킨 후 12, 15 및 18% sucrose에 순차적으로 침투시킨 다음 OCT compound (Miles Laboratories, USA)에 포매한 후 사용하기까지 -20°C에 보관하였다. BrdU검사를 위하여 조직의 일부는 metharcan (methanol 70%, chlorform 20%, glacial acetic acid 10%)에 12시간 고정하였다. 10% 중성포르말린과 metharcan에 고정한 장기는 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하고 3~5 μm로 박절하여 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색 또는 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

세포의 증식성을 검사하기 위한 BrdU labeling

실험개시 4 주 부검 전날에 BrdU를 3 mg/ml의 농도로 멸균된 주사용 증류수에 녹여 60 mg/kg을 3시간 간격으로 4회로 나누어 복강 내로 투여하였다.

조직화학적 검사

Gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) 발현검색을 위한 조직화학적 검사를 위하여 동결조직을 7~8 μm로 절편하여 염색을 실시하였다. 동결절편한 간장조직을 25°C의 용액에서 30분 동안 배양하여 염색하였으며, 2분 동안 0.85% saline에 수세하고, 0.1 M cupric sulfate solution에 2분 동안 처리한 후 증류수로 수세하였다. 표본을 건조한 후 글라이세린으로 마운트하여 광학현미경으로 관찰하였다. 염색용액은 γ-glutamyl-4-methoxy-2-naphthylamide(GMNA) (Sigma, USA) 2.5 mg/ml용액 1 ml, 0.1 M Tris buffer 5 ml, 0.85% saline 14 ml, glycy-glycine(Gly-Gly) (Sigma, USA) 10 mg과 fast blue BBN (Sigma, USA) 10 mg을 섞어 제조하였다.

면역조직화학적 검사

BrdU, PCNA, CK19 및 OV-6에 대한 면역조직화학적 검사를 위해서 동물을 부검하여 얻는 조직을 10% 중성 포르말린 (PCNA, CK19, OV-6) 또는 metharcane (BrdU)에 12시간 정도 고정하여 일반적인 조직처리과정을 거친 뒤 파라핀 포매한 블록을 3~5 μm로 박절하여 poly-L-lysine에 피복된 슬라이드위에 조직표본을 만들었다. 항원의 복원 (retrieval)을 위해 CK19에 대해서는 trypsin (0.1% in 0.1 M Tris-HCl 0.1% CaCl₂ pH 7.6)으로 실온에서 10분간 소화시켰으며, PCNA염색을 위해서 조직표본을 증류수 안에서 15분 동안 멸균하였다. 내인성 peroxidase의 활성을 차단하기 위하여 표본을 0.3% H₂O₂가 함유된 메탄올로 30분 동안 침잠시켰다. PBS로 수회 수세한 후 BrdU 면역염색의 경우 10 mmol의 CaCl₂를 함유한 0.1% trypsin (pH 7.6)에 실온에서 30분 동안 배양하였으며, PBS 수세 후 DNA를 변성시키기 위하여 2 M의 염산용액에 30분 동안 침잠시켰다. PBS로 수회 수세한 후 비특이적 반응을 제거하기 위해 말 혈청으로 실온에서 1시간동안 배양하였다. 각각의 희석된 1차 항체로 4°C에서 밤새도록 배양하였다; mouse anti-BrdU monoclonal (1:2,000, Sigma, USA), mouse monoclonal anti-human PCNA (PC10) (1:200, Novocastra, USA), mouse monoclonal anti-cytokeratin 19 (1:100, Novocastra, USA), mouse monoclonal anti-rat OV-6 (1:100, a gift from Dr. Sell of Albany Medical College). PBS로 수세한 후 biotinylated secondary antibody를 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 통상적인 avidin biotin complex (ABC)법에 의해 염색하였으며, 발색을 위해서 diaminobenzidine (DAB)으로 1~2분 동안 처리하였다. Mayer's 헤마톡실린으로 대조염색을 실시한 후 광학현미경하에서 관찰하였다.

전자현미경적 검사

전자현미경적 관찰을 위해서는 부검하여 적출한 간장조직을 크기 1×1×1 mm로 절단하여 2.5% glutaraldehyde 용액에 4°C

에서 4시간 동안 고정한 후 0.1 M의 PBS (pH 7.4)로 3회 수세한 후 1% OsO₄에 90분 동안 후 고정하였다. 후 고정한 조직을 0.1 M PBS로 세척하고 에탄올과 propylene oxide로 탈수한 다음 epon 복합체로 포매하였다. 포매된 조직을 1 μm두께로 박절한 후 1% toluidine blue로 염색하여 관찰부위를 선정하였다. 선정된 부위만을 60~90 nm로 초박절한 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경 (Philips CM12)으로 80 kv에서 관찰하였다.

결 과

실험경과

실험개시 2 주와 3 주에 햄스터의 약 30%가 폐사하였으며, 체중의 변화는 DEN투여기간 동안에 완만한 감소세를 나타내었으나, 휴식기를 거치면서 서서히 증가하기 시작하여, AAF 투여 종료 이후 정상사료를 급여하면서 정상체중으로 회복되었다 (data not shown). 실험초기 2 주 동안 음수로 투여된 DEN의 전체 양은 70~80 mg/kg이었다.

육안 및 병리조직학적 소견

1) 간흡충 감염 전

실험개시 2 주

실험개시 2 주 (DEN 투여기간)에 자연폐사한 햄스터를 부검한 결과 간장은 육안적으로 별다른 이상소견은 관찰되지 않았다. 그러나, 조직학적으로는 간문맥부위에 핵이 난원형 또는 다소 길다란 oval cell들의 증식이 관찰되었다. 이들은 작은 무리를 형성하기도 하였으며, 일부는 간 실질의 동양모세혈관을 따라 침투하고 있는 양상을 나타내고 있었다.

실험개시 4 주

육안적으로 간장은 전반적으로 매우 창백하였으며, 표면이 결절성으로 관찰되었다. 조직학적으로 크기가 직경 약 9~14 μm의 oval cell이 간문맥부위로부터 간 실질 중심정맥에 이르기까지 심하게 증식하여 간장 구성세포의 70%정도를 차지하고 있었으며, 정상적인 간장의 구조를 소실하고 있었다 (Fig. 1A) 세포질은 거의 관찰되지 않거나 매우 빈약하였다. Oval cell은 또한 소담관을 형성하기도 하였으며, 개별적으로 증식하기도 하였는데 (Fig. 1A), 다소 기다랗고 내강이 좁은 소담관들은 주로 문맥주변에서 많이 관찰되었으며, 중심정맥쪽으로 갈수록 작고 원형에 가까운 소담관들과 개별적으로 침투하고 있는 single oval cell들이 주로 관찰되었다 (Fig. 1A). 소담관들은 4개에서 수십 개의 oval cell로 구성되어 있었으며, 소담관들 중에는 모두 oval cell로만 이루어진 경우도 많았지만, 한 개 또는 두 개 이상의 ductular hepatocyte를 포함하는 경우도 다수 관찰되었다 (Fig. 1A, Table 1).

한편, 간세포들은 결절성으로 증식한 oval cell에 의해 둘러싸여 있거나, 개별적으로 또는 작은 무리를 형성하고 있었다.

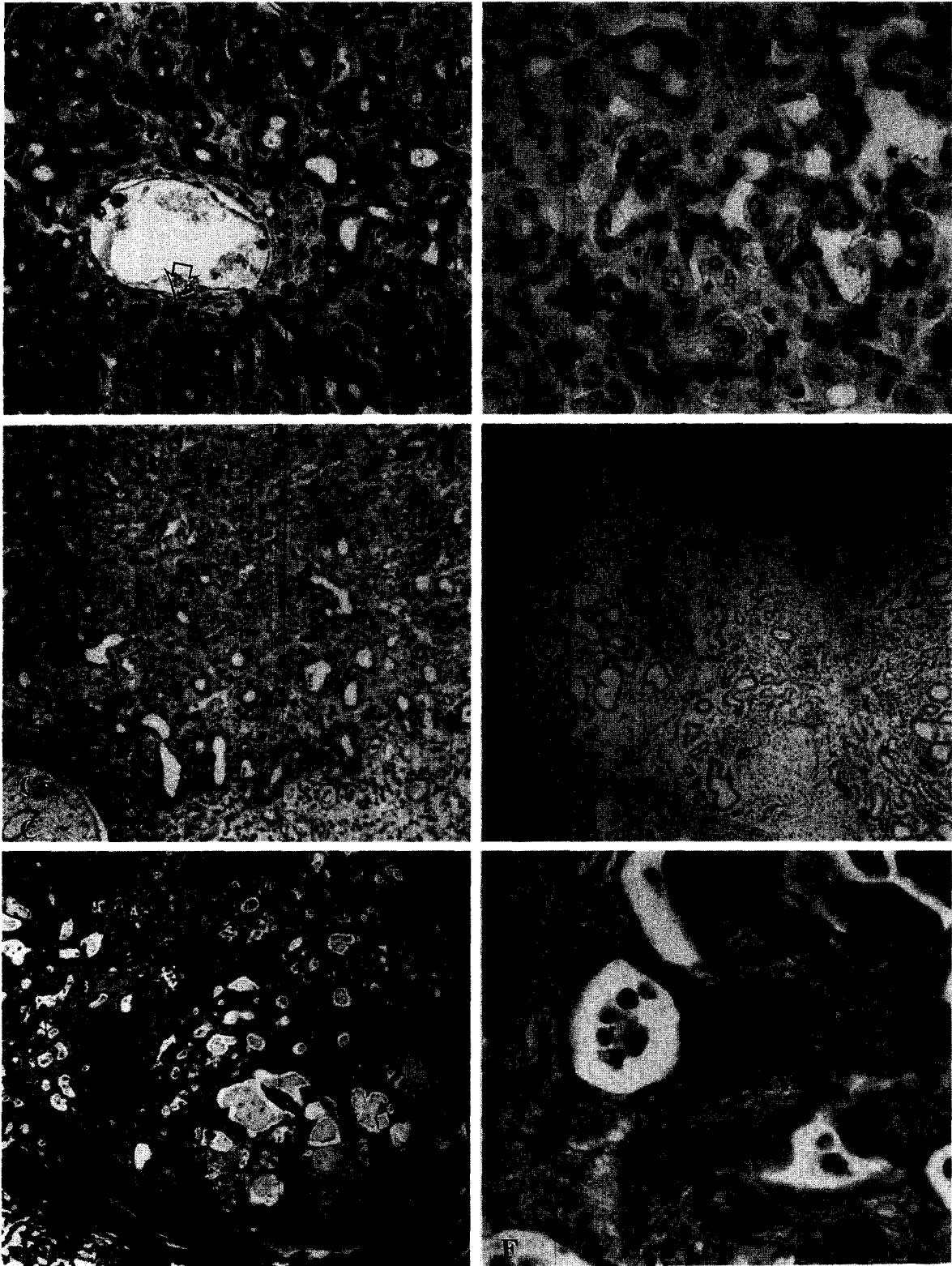


Fig. 1. A, Proliferation of single and ductular oval cells was prominent. Note ductular (arrows) and small hepatocytes (open arrows) which have a round nucleus and eosinophilic cytoplasm; B, Single, ductular oval cells and some cells of small ducts were positive for OV-6; C, Note numerous proliferated small ducts at the periphery of the bile duct; D, Neoplastic cells of the well differentiated cholangiocellular carcinoma (CCC) were strongly positive for CK19. E, Note CCC consisted of ductular structures of tumor cells with desmoplasia; F, Higher magnification of the E. The tumor cells was composed of very pleomorphic "oval cell" type ductular cells. A, H&E, $\times 200$; B, ABC, $\times 200$; C, H&E, $\times 200$; D, ABC, $\times 100$; E, H&E, $\times 100$; F, H&E, $\times 400$.

Table 1. Histopathological findings and cell proliferation of the livers of the hamsters during the experiment

Type	week	4(6)	5(2)	7(2)	20(3)
Oval cells		+++ ^a	+++	++	++
individual oval cells		+++	+++	+	+
ductular-like oval cells		+++	+	+	±
ductular hepatocytes		++	+	±	-
Proliferated bile ductules		++	++	+++	+++
Normal hepatocytes		+	++	++	++
Bile duct epithelial cells		+	++	++	+
Cholangioma		-	-	-	3/3 ^b
Cholangiocarcinoma		-	-	-	3/3
Inflammatory cell infiltration		+	++	+	±

() ; number of animals examined.

^aDegree of cell proliferation was assessed subjectively on a scale - for negative, ± for slight, + for mild ++ for moderate, and +++ for severe, respectively.

^bNumber of animals with the lesion/number of animals examined.

간세포들은 그 크기에 있어 무처리한 성숙 간세포의 약 1/6 정도인 것까지 관찰되었다 (small hepatocytes) (Fig. 1A). 염증 세포의 침윤은 주로 간문맥주변에서 미약한 정도로 관찰되었는데 주로 림프구와 형질세포들이었다 (Table 1).

2) 간흡충 감염 후

실험개시 5 주 (감염 후 1주)

간장은 매우 창백하고 종대 되어 표면은 결정성을 나타내었다. 조직학적으로는 역시 4 주 때와 비슷한 양상을 나타내

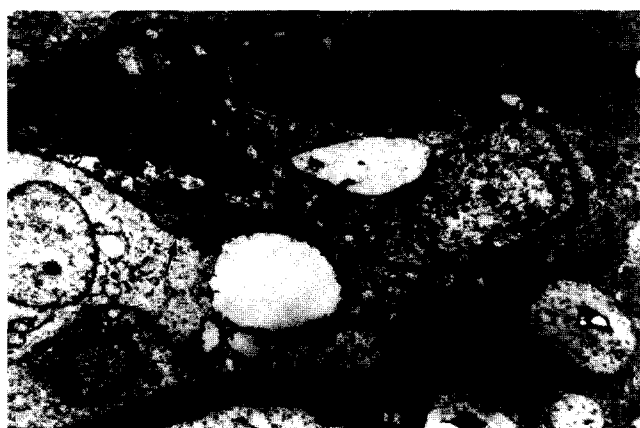


Fig. 2. Electron microscopy of a ductular structure of the hamster infected with CS for 16 week after oval cell induction. Two lumina lined by microvilli were formed by contiguous oval cells and ductular cells. Note the desmosome between the oval cell and ductular cell (arrow). Uranyl acetate & lead citrate stain, ×3500.

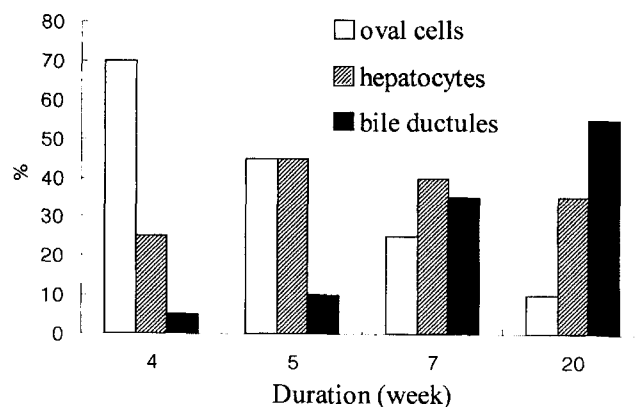


Fig. 3. Changes of intrahepatic cellular components in hamster liver after *C. sinensis* infection during the study.

었으나 전체적으로 간세포의 비율이 증가되어 있었으며, 간흡충 감염 주변부로 비교적 크고 입방형의 상피세포로 이루어진 분화된 형태의 소담관의 수적 증가가 관찰되었다 (Fig 1C, Fig. 3). Ductular hepatocyte를 포함하는 소담관들도 관찰되었다. 담관주변으로는 림프구와 형질세포, 호산구 및 대식구로 이루어진 염증세포가 두껍게 침윤되어 있었다 (Table 1, Fig. 1C).

실험개시 7 주 (감염 후 3주)

간장은 육안적으로 종대 되고 갈색조이며 과립상을 나타내었으며 우측엽 복면에 직경 0.5 cm 크기의 낭상결절이 존재하기도 하였다. 조직학적으로는 전체 간장에서 간세포의 비율이 더욱 증가하였다. 또한, 간흡충감염부에서 간 실질에 이르기 까지 크기와 모양이 다양한 비 전형적인 담관양 구조들의 현저한 증가가 관찰되었다 (Fig. 3). 간흡충이 감염된 담관주변으로 결체조직의 증식과 함께 림프구, 형질세포 및 대식구로 이루어진 염증세포의 침윤도 관찰되었다 (Table 1).

실험개시 20 주 (감염 후 16주)

육안적으로 간장은 전체적으로 회갈색조이며 과립상이다. 좌엽의 상부와 중앙부위에 크기 0.3×0.4 cm, 0.3×0.5 cm의 회백색 결절이 돌출 되어 있었다. 중간엽의 중하부에는 크기 0.7×0.8 cm와 상부에 0.1×0.1 cm 크기의 회백색결절이 관찰되었다. 우측엽 복면에는 직경 0.1 cm 가량의 3-5개의 결절들이 군집을 이루고 있었다.

조직학적으로 간장은 매우 복잡한 양상을 나타내었다. 간장은 전체적으로 납작한 상피세포 또는 입방형의 세포들로 이루어진 담관의 증식이 현저하게 관찰되었다 (Fig. 3). 비교적 잘 분화된 담관으로 이루어진 결체조직의 증식을 동반한 cholangioma 또는 CCC가 다발적으로 관찰되었으며 (Table 1, Fig. 1D), 개체에 따라서는 이형성이 심한 큰 원주형의 상피세포들로 이루어진 비 전형적인 담관들의 증식이 현저하였다. 이들 담관을 구성하는 일부 세포들은 점액화생을 나타내었다. 또한 매우 미분화된 악성 담관암도 관찰되었는데, 이들 종양세포들은 핵이 난원형(oval shape)이고, 밝고, 크기가 매우

Table 2. Immunohistochemical reactivity of the hamster livers treated with 0.005% DEN for 2 weeks followed by 1 week recovery period and 1 week AAF administration

	BrdU	PCNA	CK19	OV-6
Single oval cells	++ ^a	+++	±	++
Ductular oval cells	+++	+++	+	+
Small duct cells	+++	+++	++	+
Ductular hepatocytes	*	*	-	+
Small hepatocytes	*	*	-	++
Normal hepatocytes	+	+	-	±
Inflammatory cells	*	+++	-	++

*; not identified.

^a% of positive cells: <10%; ±, 10~30%; +, 30~50%; ++, >50% +++
Antigens: BrdU, bromodeoxyuridine; PCNA, proliferating cellular nuclear antigen; CK19, cytokeratin 19.

다양하였으며, 담관구조를 이루고 핵분열상은 간간이 관찰되었다 (Figs. 1E and 1F). 간질의 반응은 왕성하였다.

조직화학적 및 면역조직화학적 소견

GGT 발현

실험개시 4 주에 동결절편조직에서 실시한 GGT에 대한 염색에서 기존의 담관상피세포와 일부의 oval cell, 특히 ductular oval cell에서 강한 효소반응을 나타내었다(Table 2).

BrdU labeling

부검 12 시간 전부터 3 시간 간격으로 4회 BrdU를 복강 내로 투여한 후에 부검한 실험개시 4 주 후의 간장에 대하여 BrdU 면역조직화학적 검사를 실시한 결과 전반적으로 증식한 single oval cell 및 ductular oval cell에서 강한 양성반응을 나타내어 oval cell이 이 기간동안에 매우 왕성한 증식을 하고 있다는 것을 알 수 있었다.

PCNA의 검출

합성기 세포의 증식을 알기 위해 실시한 PCNA 면역염색에서 실험개시 4 주의 간장에서는 증식한 많은 수의 oval cell과 납작한 상피세포로 이루어진 담관상피세포에서 강한 양성반응을 확인할 수 있었으며, 간세포의 경우 소수만이 양성을 나타내었다 (Table 2). 또, follicle내의 대식구들도 강한 양성반응을 나타내었으나, 정상 담관상피세포는 음성이었다. 실험개시 20 주에의 간장에서는 미분화된 담관암 상피세포와 oval cell에서 강한 양성반응을 나타내었으며, 비교적 잘 분화된 담관암의 일부 상피세포와 입방 또는 원주형의 세포에 의해 형성된 작은 소담관의 일부 상피세포도 양성반응을 나타내었으나 납작한 상피세포로 이루어진 담관상피세포들은 음성이었다. 많은 수의 간세포에서도 강한 양성반응을 관찰할 수 있었다.

Cytokeratin 19 항원의 검출

실험개시 4 주된 간조직의 면역염색에서 ductular oval cell

들의 대부분은 미약한 정도의 양성반응을 나타내었으며, single oval cell의 경우 소수만이 양성을 나타내었다 (Table 2). 정상 담관상피세포는 진한 양성반응을 보였으며, 간세포들은 음성이었다. 실험개시 5 주와 7 주의 간혹총 감염군의 간장에서는 증식한 소담관의 상피세포에서 양성반응을 관찰할 수 있었다. 실험개시 20 주된 간혹총 감염군의 간장에서는 미분화된 담관암의 상피세포들 일부에서 미약한 정도의 양성반응을 보였으며, 비교적 잘 분화된 담관암의 상피세포 대부분과 납작한 상피세포로 이루어진 증식된 담관상피세포와 소담관 및 정상 담관 상피세포에서 강한 양성반응을 나타내었다(Fig. 1D).

OV-6 항원의 검출

실험 4 주된 간장에 대한 염색에서 증식한 일부 single 또는 ductular oval cell들과 다수의 small hepatocyte 및 ductular hepatocyte에서 양성반응이 관찰되었으며 (Fig. 1B, Table 2), 대부분의 정상 간세포들은 음성이었으나 일부에서는 미약한 정도의 양성반응도 관찰되었다 (Table 2). 염증세포들에서도 양성반응이 관찰되었다. 실험 7 주된 간혹총 감염군에서는 다수의 small hepatocyte, ductular hepatocytes, oval cell 및 염증세포에서 양성반응이 나타났으며, 정상 또는 증식한 담관상피세포들과 정상 간세포는 음성을 나타내었다 (Table 2).

전자현미경적 소견

실험 4 주에 증식한 oval cell의 핵은 난원형으로, 이형 염색질이 핵막으로 치우쳐 진한 띠를 형성하고 있었으며, 미세한 염색질 덩어리들이 핵 전체에 고루 산재하고 있었다. 세포질은 약간의 차이는 있었으나 일반적으로 세포소기관들의 발달은 매우 미약하였으며, 소수의 미토콘드리아와 극소수의 조면소포체 및 리보솜을 가지고 있었다. 미토콘드리아의 크기와 수가 oval cell에 따라 차이가 있었는데, 작고 원형의 미토콘드리아를 가진 것도 있었으며, 비교적 크고 원형 또는 난원형의 미토콘드리아를 가진 세포도 관찰할 수 있었다. 세포막 표면에는 microvilli들이 형성되어 있었다.

실험 20 주의 간혹총 군에서는 기저막으로 둘러싸인 소담관내에서 난원형의 small cell과 소담관 세포들이 긴밀하게 관련되어 있는 모습이 관찰되었다 (Fig. 2). 소담관 상피세포들의 핵은 다소 불규칙하며 이형 염색질이 핵막 쪽으로 치우쳐 존재하고 있었으며, 작은 염색질 덩어리들이 핵내에 고루 산재하고 있었다. 세포질 내에는 10개 내외의 미토콘드리아와 조면소포체 및 리보솜이 두루 관찰되었다 (Fig. 2). 인접한 oval cell과 소담관 세포는 desmosome에 의해 연결되어 있었으며, oval cell 상호간에도 desmosome으로 긴밀한 관계를 유지하고 있었다. 세포 표면에는 microvilli가 소담관의 내강쪽으로 돌출 되어 있었다 (Fig. 2). 또 다른 부위에서는 핵이 난원형이고 6~7개 정도의 미토콘드리아를 함유한 oval cell 또는 중간단계의 세포들이 기저막에 둘러싸여 내강을 형성하고 있었다 (Fig. 2).

고 찰

본 연구는 발암물질에 의해 유도된 oval cell이 간흡충 감염 후 다양한 분화형태의 담관암으로 분화해 가는 일련의 세포 병리학적 과정을 보여주고 있다.

본 실험에서 유도된 햄스터 간장 oval cell은 형태 및 면역 조직화학적 특성에 있어 랫드와 햄스터에서 지금까지 연구 보고된 것들과 동일한 양상을 나타내었다^{2,3,11-15,19,24}. 조직학적으로 실험 초기의 oval cell들은 단독으로 또는 duct 모양을 형성하며 간 실질 내로 증식하고 있었는데, 간세포의 중간단계의 세포로 알려진 “small hepatocyte”나 “ductular hepatocyte”들의 모습이 자주 관찰되었다. 본 실험과 유사한 방법에 의해 유도된 oval cell의 간세포로의 이와 같은 분화성향은 Novikoff 등 (1996)의 랫드 모델에서도 특징적으로 관찰되었다¹³. 따라서, DEN과 AAF에 의해 유도된 oval cell은 간세포로 분화해 가는 특성을 가지고 있는 것으로 여겨진다. 그러나, 간흡충 감염 후 담관구조의 현저한 증식이 확인되었는데, 이는 간흡충 감염 후 관찰된 가장 두드러진 변화이다. 이것은 간흡충 감염이 실험초기에 유도된 facultative bipotential oval cell로 하여금 담관세포로 분화하도록 하는 priming factor로 작용했을 가능성을 시사하여주고 있다. 실제로 간흡충을 감염시키지 않았거나 감염시킨 햄스터에서 분리한 oval cell은 형태적 및 면역조직학적으로 매우 유사한 특성을 가지고 있으나, *in vitro* 상에서 배양하였을 때 전자는 간세포로, 후자는 담관세포로 분화해감이 확인되었다²³. 입방형의 세포들로 이루어진 소담관들은 간흡충 감염 이후 시간이 경과함에 따라 현저히 증가하기 시작하였으며, 간흡충이 감염되어 있는 담관주변부 뿐 아니라 간 실질내에서도 현저한 증식을 나타내었다. 그 후 실험개시 20 주 (간흡충 감염 16 주 후)에는 분화정도가 다른 다양한 형태의 CCC와 cholangioma가 발생하였다. 특히, 분화도가 매우 낮은 형태의 담관암 (anaplastic cholangiocarcinoma)의 발생은 지금까지의 다른 *in vivo* 담관암모델에서 보여지지 않은 본 햄스터 담관암 모델의 특징적인 소견이라 할 수 있다. Figs. 1의 E와 F는 종양세포들이 크기와 모양에 있어 매우 다양하며, 형태학적으로 oval cell과 유사한 anaplastic carcinoma의 소견을 보여주고 있다. 또한, 일부 간문맥 주변부에서 이형성이 심한 담관 상피세포들에서는 점액분비세포로의 화생 (mucinous metaplasia)을 관찰할 수 있었다. 이상의 간흡충 감염 전후의 일련의 소견들은 oval cell이 담관세포의 전구세포이며, 본 햄스터모델에서 유발된 담관암이 미분화된 형태의 oval cell에서부터 담관상피세포로 분화해 가는 과정에서 발생했을 것이라는 것을 시사하고 있다. 실험개시 20 주의 간장에 대한 전자현미경소견도 이를 뒷받침하여주고 있다. 소담관들은 두꺼운 기저막에 둘러싸여, 세포소기관의 발달이 극히 미약한 oval cell들로만 또는 oval cell과 담관상피세포가 서로 긴밀하게 연결하여 관을 형성하고

있었으며, oval cell에서 담관상피세포로 분화해 가는 중간단계의 세포들이 자주 관찰되었다. 이 같은 결과는 DMN과 간흡충 감염 후에 발생한 담관암이 실험초기에 간문맥주위로 증식한 원시 oval cell (primitive oval cell) 또는 세담관양 oval cell (ductular-like oval cell)에서 유래한다는 Lee등(1997)의 주장과 같은 것이다¹¹. 또, 이것은 Hacker등(1992)이 1% DL-ethionine을 함유한 choline결핍사료를 4, 6, 10, 14, 22 주 동안 급여한 후 정상사료를 59 주까지 급여한 모델에서 persistent oval cell, cholangiofibrosis, cholangioma등의 일련의 병변을 관찰하였는데⁶, 이러한 일련의 병변은 oval cell이 담관암의 전구세포라는 것을 나타내 주고 있다고 한 주장과 맥을 같이하는 것이다. Oval cell이 담관암의 기원세포라고 하는 주장은 Steinberg (1994)등의 연구결과에 의해 더욱 현실화되었는데, 그는 랫드에서 분리한 두 가지의 oval cell line을 변형시킨 후 1일령 된 랫드에 이식하여 cholangiocellular, adenoid 및 solid type등 다양한 형태들로 이루어진 악성종양을 유발함으로써 oval cell이 미분화된 종양의 기원세포일 수 있다고 보고한 바 있다²⁰.

간흡충 감염과 관련된 담관암 발생기전에 대해서는 아직 뚜렷하게 정의되지 않고 있으나, 병리학적으로 간흡충 감염은 담관 상피세포의 지속적인 물리적 자극 및 손상을 유발하고, 특히 간흡충 감염에 따른 심한 만성염증반응과정 중에 산생되는 각종 cytokine, free radical, 및 성장인자들이 이에 복합적으로 관여할 것으로 여겨진다^{8,21}.

사람에서 담관암의 발생은 드문 것으로 알려져 있으나, 조기진단이 어렵고, 일단 발생이 확인된 후에는 예후가 불량하여 그 기전에 대한 보다 심도 있는 연구가 이루어져야 할 것이다. 최근 담관암과 그 전암병변에 대한 면역조직화학적 검사결과 epithelial cell growth factor의 수용체의 하나인 ErbB-2와 COX-2가 담관암의 초기 진행에서 중요한 역할을 할 것으로 보고되었다¹. 하지만, 사람 담관암 시료를 이용한 연구는 종양 발생과 진행의 각 단계에서의 수집이 어렵기 때문에 종양의 발생과 진행기전연구를 위해서는 동물모델을 이용한 체계적인 연구가 필수적이라 할 수 있다. 담관암의 기원세포에 대해서는 기존의 담관상피세포와 stem cell이 모두 가능성이 있는 것으로 추측된다. 본 햄스터 모델은 담관암의 stem cell 기원이론에 기초하여 고안되었으며, 실제로 oval cell로부터 다양한 담관암의 발생이 가능함을 *in vivo*에서 보여주었다. 앞으로 본 햄스터 담관암모델을 이용한 간장 줄기세포유래 담관암의 분자생물학적 기전에 대한 체계적이고 심도 있는 연구를 기대해본다.

감사의 글

본 연구는 서울대학교 수의과대학 수의과학연구소의 지원에 의해서 수행되었음.

참고문헌

1. Endo K, Yoon BI, Pairojkul C, Demetris AJ, Sirica AE. ERBB-2 overexpression and cyclooxygenase-2 up-regulation in human cholangiocarcinoma and risk conditions. *Hepatology* **36**: 439-450.
2. Everts RP, Nagy P, Nakatsukasa H, Marsden E, Thorgeirsson S. *In vivo* differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Research* **49**:1541-1547, 1989.
3. Germain L, Goyette R, Marceau N. Differential cytokine and α -fetoprotein expression in morphologically distinct epithelial cells emerging at the early stage of rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Research* **45**:673-681, 1985.
4. Germain L, Blouin M-J, Marceau N. Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationship in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, α -fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed compound. *Cancer Res* **48**:4909-4918, 1988a.
5. Germain L, Noël M, Gourdeau H, Marceau N. Promotion of growth and differentiation of rat ductular oval cells in primary culture. *Cancer Research* **45**:673-681, 1988b.
6. Hacker HJ, Steinberg P, Toshkov I, Oesch F, Bannasch P. Persistence of the cholangiocellular and hepatocellular lesions observed in rats fed a choline-deficient/DL-ethionine-supplemented diet. *Carcinogenesis*, **13**:271-276, 1992.
7. Hixon DC, Allison JP. Monoclonal antibodies recognizing oval cells induced in the liver of rats by N-2-fluorenylacetylamine or ethionine in a choline-deficient diet. *Cancer Research*, **45**:3750-3760, 1985.
8. Holzinger F, Z'raggen K, Buchler MW. Mechanism of biliary carcinogenesis: a pathogenetic multi-stage cascade towards cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* **10**(Suppl 4):122-126, 1999.
9. Lazaro CA, Rhim JA, Yamada Y, Fausto N. Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture. *Cancer Res* **58**:5514-5522.
10. Lee JH, Rim HJ, Sell S. Promotion of cholangiocarcinomas by *Clonorchis sinensis* infection in hamsters after induction by dimethylnitrosamine. *J. Tumor Marker Oncol*, **10**:7-16, 1995.
11. Lee JH, Rim HJ, Sell S. Heterogeneity of the "oval-cell" response in the hamster liver during cholangiocarcinogenesis following *Clonorchis sinensis* infection and dimethylnitrosamine treatment. *J Hepatol* **26**:1313-1323, 1997.
12. Lemire JM, Shiojiri N, Fausto N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* **139**:535-552, 1991.
13. Novikoff P.M., Yam A, Oikawa I. Blast-like cell compartment in carcinogen-induced proliferating bile ductules. *Am J Pathol* **148**:1473-1492, 1996.
14. Novikoff PM, Ikeda T, Hixson DC, Yam A. Characterizations of and interactions between bile ductule cells and hepatocytes in early stages of rat hepatocarcinogenesis induced by ethionine. *Am J Pathol* **139**:1351-1368.
15. Sarraf C, Lalani EN, Golding M, Anikumar TV, Poulson R, and Alison M. Cell behavior in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. *Am J Pathol*, **145**:1114-1126, 1994.
16. Sell S. Comparison of oval cells induced in rat liver by feeding N-2-fluorenylacetylamine in a choline-devoid diet and bile duct cells induced by feeding 4,4'-diaminodiphenylmethane. *Cancer Research* **43**:1761-1767, 1983.
17. Sell S. Is there a liver stem cell? *Cancer Research* **50**:3811-3815, 1990.
18. Sell S, Dusford HA. Evidence of the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Am J Pathol*, **134**:1347-1363, 1989.
19. Sell S, Salman J. Light- and electron-microscopic autoradiographic analysis of proliferating cells during the early stages of chemical hepatocarcinogenesis in the rat induced by feeding N-2-fluorenylacetylamine in a choline-deficient diet. *Am J Pathol* **114**:287-300, 1984.
20. Steinberg P, Steinbrecher R, Radaeva S, Schirmacher P, Dienes HP, Oesch F, and Bannasch P. Oval cell lines OC/CDE6 and OC/CDE22 give rise to cholangio-cellular and undifferentiated carcinoma after transformation. *Lab Invest*, **71**:700-709, 1994.
21. Thamavit W, Pairojkul C, Tiwawech D, Shirai T, Ito N. Strong promoting effect of *Opisthorchis viverrini* infection on dimethylnitrosamine-initiated hamster liver. *Cancer Lett* **78**:121-125, 1994.
22. Watanapa P, Watanapa WB. Liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Br J Surg* **89**:962-970, 2002.
23. Yoon BI, Jung SY, Hur K, Lee JH, Joo KW, Lee YS, Kim DY. Differentiation of hamster liver oval cell following *Clonorchis sinensis* infection. *J Vet Med Sci* **62**:1303-1310, 2000.
24. Yoon BI, Lee JH, Joo KW, Lee YS, Kim DY. Isolation of liver oval cells from hamsters treated with diethylnitrosamine and 2-acetylaminofluorene. *J Vet Med Sci* **62**:255-261, 2000.
25. Yoshimura H, Harris R, Yokoyama S, Takahashi S, Sells MA, Pan SF, Lombardi B. Anaplastic carcinoma in nude mice and in original donor strain rats inoculated with cultured oval cells. *Am J Pathol*, **110**:322-332, 1983.