

## 발암제 (DEN) 투여 rat의 간암 진행상태의 기능학적 및 형태학적 변화와 항암제 (5-FU) 처리효과 시험

김철호, 천성화, 박종식, 김남철, 강정부\*

경상남도 축산진흥연구소북부지소, \* 경상대학교 수의과대학  
(접수 2006. 8. 21, 게재승인 2006. 9. 8)

### Functional and morphological changes of the livers by 5-fluorouracil treatment on diethylnitrosamine-treated rat

Cheol-Ho Kim, Sung-Hwa Cheon, Jong-Sik Bhak, Min-Hee Kim,  
Nam-Cheol Kim, Chung-Boo Kang \*

Northern branch of Gyeongnam Livestock Promotion Research Institute, Hapcheon, 678-801, Korea, \* College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Korea

(Received 21 August 2006, accepted in revised from 8 September 2006)

#### Abstract

This study is concerned with assessment of diethylnitrosamine (DEN 0.01%) induced liver cell carcinogenesis by measurement of changes preceding the development of neoplasms. Therefore, it was undertaken to investigate changes of liver-specific enzyme activities in Sprague-Dawley (SD) rats by *ad libitum* feeding of DEN. And also, the changes of hepatic morphology in SD rats were detected by haematoxylin-eosin stain and immunohistochemistry (PCNA). 5-Fluorouracil (5-FU) is one of the most widely used anticancer agents for digestive cancers including hepatocellular carcinoma, and is known to affect the cell cycle and induce apoptosis of cancer cells. In the present study, SD rats were given drinking water containing 0.01% diethylnitrosamine (DEN) for 8 weeks. Minor behavioral change, brittleness of hair and decreased amount of water and diet intake were observed in rats 4 weeks after DEN administration.

---

<sup>1</sup>Corresponding author

Phone : +82-055-751-5814, Fax : +82-055-751-5903

E-mail : cbkang@gsnu.ac.kr

The body and liver weights were significantly ( $p < 0.05$ ) decreased in rats 11 weeks after DEN administration. The liver weight ratio to body weight was rather stable and not significantly decreased in the all treatment groups. The liver specific enzyme activities (AST, ALT,  $\gamma$ -GTP) were significantly increased in all treatment groups compared to control group ( $p < 0.05$ ). Variable size of liver tumor and hepatomegaly were observed in rats treated with DEN after 10 weeks. Numerous vacuoles were seen on the midzonal and or peripheral areas of hepatic lobules. The large and polymorphological hepatocytes with eosinophilic cytoplasm or densely basophilic mitotic nucleoli were seen. Several proliferative small round cells were seen on vacuolated and necrotic areas in peripheral hepatic lobules or portal areas. PCNA-positive cells were seen on the vacuolated portal areas and peripheral areas of hepatic lobules in the areas of small round cells. We examined functional and morphological changes of livers by 5-FU treatments on DEN-treated rat. The DEN-treated rats compared to 5-FU-treated rats after DEN treatment for 8 weeks. The serum total protein and triglyceride were significantly ( $p < 0.05$ ) decreased, and the liver enzyme activities of AST and ALT were significantly ( $p < 0.05$ ) increased. After 8 weeks, in the non-5-FU-treated group, the size of liver tumor were varied and hepatomegaly were observed, hepatocellular vacuolization, necrosis and steatosis were observed on the midzonal and peripheral areas of hepatic lobules. The large and polymorphological hepatocytes were seen, the interlobular connective tissues were proliferated. PCNA positive cells were seen in the portal areas and peripheral areas of hepatic lobules in the non-5-FU-treated group. In hepatocytes, condensation of nuclear chromatin and vacuolization were observed, shape of the nuclei were irregular, the degraded nuclei and organelles were observed. The livers of rats in the 5-FU treatment group were seen grossly brilliant, red-brown color, and the vacuolated and degenerated regions, hyperplastic nodules were not nearly observed. In the electron microscope, the cytoplasm of the hepatocytes contained a large number of mitochondria, rough endoplasmic reticulum, developed organelles surrounding nuclei. The above findings suggest that 5-FU will be effective as anti-liver tumor drug.

**Key words** : Diethylnitrosamine, 5-Fluorouracil, Liver, Enzymes, Rat.

## 서론

최근 환경오염 등으로 인하여 가축이 각종 발암성 유해물질에 노출되기 쉬우며 또한 섭취 기회가 늘어나 가축에게도 간암 등의 각종 암발생 가능성이 높아지고 있다. 따라서 동물에서의 간암 발생을 규명하기 위한 실험에는 여러 제제가 사용되어 왔으나 근년에는

diethylnitrosamine (DEN)투여에 의한 방법이 주로 활용되고 있다. 실험동물 중에서도 특히 mouse 및 rat는 수명이 짧아 단기간에 초기의 DNA변화로부터 완전한 전이암까지의 모든 단계별 진행과정을 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 인위적으로 가변성이 있는 요소를 고정할 수 있는 잇점이 있어 가축에서는 물론 사람의 간암 발생과정을 연구하는 데에도 가장 적합한 모델로 인정되고 있다.

근래 간암에 대한 연구가 활발해져 이의 발생 기전과 원인에 관한 정확한 규명과 진단을 위한 노력이 심화되고 있으나, 아직까지 이의 발생 기전에 대한 기본적인 연구가 충분하지는 못한 실정이다. 간암을 주로 일으키는 원인으로는 간염 바이러스, aflatoxin, radiation 및 여러 가지 화학적 발암물질이 밝혀져 있으며, 이런 원인들이 간세포의 돌연변이원 또는 발암원으로 작용하여 간암을 일으키는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서는 현재 실험동물에서 간암 유발에 많이 쓰이고 있는 화학적 발암제 중 단순 투여로 발암 형성이 비교적 용이한 DEN을 흰쥐에 단독 투여하여 간암(hepatocellular carcinoma)을 유발시켜 쥐의 임상적 소견과 간암의 형태학적 관찰 결과를 비교함으로써 간암 발생과정과 기전을 추론할 수 있는 기초자료를 제공하고, 실험동물 간암 발생 연구 모델이 확립되면 인축의 간암 발생과정을 규명하고 발암 억제 및 유발 억제 규명과 암치료에 이용될 수 있는 모델 동물로 활용이 가능하다고 판단된다.

사람에서의 간암은 세계적으로 특히, 아시아나 아프리카에서 많이 발생하며 주로 40-50대의 남성에서 주로 발생하고 여자보다 약 4-7배 발생률이 높다. 간암은 1) hepatitis B 또는 C virus의 만성 간염, 2) 간경변증, 3) aflatoxin, 4) 남성, 5) 가족의 병력, 6) 연령 등의 factor들을 가진 사람들이 간암에 걸릴 가능성이 많다. 오늘날 지구상의 많은 연구진들이 막대한 연구비와 노력을 기울이고 있지만 아직까지 확실한 간암의 원인이 알려져 있지 않고 있다.

DEN은 유전자 독성발암물질이며, 최근에 DEN이 직접적으로 간에 작용하여 간암을 발생시킨다는 보고가 있다<sup>1-3)</sup>. 1991년 Peto<sup>4)</sup>는 6주령의 Wistar rat에 DEN을 다양한 농도로 음수공급 하였을 때, DEN의 농도가 0.01% 일 때 많은 종양결절이 형성된다고 하였다. DEN은 생체 내에서 흡수된 후, 간에서 생체 활성화의 첫번째 단계인 cytochrome P450-

mediated  $\alpha$ -hydroxylation되어 N-Nitroso-N-ethyl-N-(2-hydroxyethyl) amine이 생성되며<sup>5)</sup>, 이 물질은 DEN의 대사물질로서 주로 간에서 종양을 생성한다. DEN은 짧은 시간 내에 간 종양을 유도할 수 있어 암 연구에서 널리 응용되고 있다.

5-Fluorouracil (5-FU)는 1957년 Heidelberger<sup>6)</sup>에 의해 항 대사제로서 처음 합성된 후 40년이 지난 오늘날까지 간암을 포함한 소화기 암 등에 항암제로 가장 광범위하게 사용되고 있다. 5-FU는 2000년 Edoardo Midean<sup>7)</sup>는 conjunctival squamous cell carcinoma에, 2003년 Mizutani<sup>8)</sup>는 renal cell carcinoma의 치료에 효과적이었다고 하였다. 5-FU는 pyrimidine nucleotides의 유도체로서, 우라실의 5번 위치의 수소원자 자리에 비슷한 크기의 불소 원자가 대신하고 있다<sup>9)</sup>. 이 분자는 target enzymes의 활성 부위를 차지하여 악성종양세포의 대사를 방해한다. 5-FU의 항종양 작용기전 중의 하나는 thymidylate synthase (TS)의 활성을 억제함으로써 DNA의 합성을 차단한다. TS는 2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (dUMP)가 DNA 복제와 복구에 필수적인 thymidine-5'-monophosphate (dTMP)로의 전환에 관여하는 효소이다. 또 다른 기전은 RNA 기능을 억제한다. 5-Fluorouridine-5'-triphosphate (5-FUTP)는 uridine-5'-triphosphate (UTP)와 유사하여 RNA polymerase에 의해 인식되어진다. 이것은 5-FU가 RNA와 결합을 하여 종양세포의 대사를 차단한다<sup>10-12)</sup>. 5-FU는 암세포의 분열을 억제하고 암세포를 파괴시키면서 정상적인 세포를 손상시킨다. 정상조직에 대한 5-FU의 세포독성은 RNA와의 융합과 DNA 합성 억제로 인하여 단백질이 부족하여 독성이 증가되며<sup>8,13,14)</sup>, 5-FU 대사의 활성화로 간 기능장애를 초래한다<sup>15)</sup>.

본 실험에서는 8주령된 SPF SD rats를 이용, 발암형성 과정과 항암제의 치료 효과를 검증하는 자료로 활용하기 위해 발암물질인 DEN

을 0.01% 농도로 8주 동안 단독으로 음수를 이용하여 투여한 후, 간암 발생과정의 변화관찰과 항종양제인 5-FU를 투여한 후 5-FU가 간기능에 미치는 영향과 형태학적 변화를 관찰하여 발암 모델 및 항암제 투여에 따른 치료효과 가능성을 확인코자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 공시동물

SPF SD rats 6주령의 100마리 (female 40, male 60)를 (주)오리엔트에서 공급 받아 2주간 적정 사육환경에서 사육하며 순화시켰으며 임상관찰 등 이상 유무를 확인한 후, 8주령 (♀ 190g - ♂ 240g)부터 공시하였고, 사육조건은 조명시간 (12 hrs/day), 온도 ( $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ), 습도 ( $50 \pm 10\%$ ) 환경에서 사육하고, 펠렛 사료와 음수는 자유 공급하였다.

### 실험방법

본 실험은 8주령의 SD rats 100두 중 대조군 20두를 제외하고 80두를 56일(8주) 동안 DEN (Sigma, USA)을 음수에 0.01% 농도로 희석하여 자유 공급하였다. 투여 후 57

일부터 DEN의 음수공급을 중단하였다.

DEN에 의해 처리된 80마리는 5-FU를 투여할 그룹(40마리)과 5-FU를 투여하지 않은 대조 그룹(40마리)으로 나누었다. 5-FU 투여 그룹은 56일째, DEN 투여를 정지한 후, 4일간 휴지기를 거쳐 60일째 20두, 115일째 20두를 실험 I, II군으로 나누어 5-FU (중외제약, 500 mg/ 10ml)를 체중 kg당 20mg으로 복강내 주사로 1차 투여하고, 1주일 후에 같은 방법으로 2차 투여하였다. 생화학적 변화를 조사하기 위해 5-FU 투여 직전과(0일), 투여 후 1주(67일, 122일), 3주(81일, 136일)와 6주(102일, 157일)에 혈액과 간을 각각 채취하였다 (Fig 1, 2).

### 시료채취 및 육안적 관찰

혈액의 채취는 rat를 ether로 흡입 마취한 후, 심장에서 평균 5ml를 채혈하고 2500 rpm, 10분,  $4^\circ\text{C}$ 에서 원심 분리하여 혈청을 분리하여 실험에 공시할 때까지  $-30^\circ\text{C}$  냉동고에 보관하였고, 개복하여 간의 종양발생 여부, 색상, 경도, 부종 등의 외부 변화상을 관찰하고, 간을 적출하여 4% paraformaldehyde로 관류

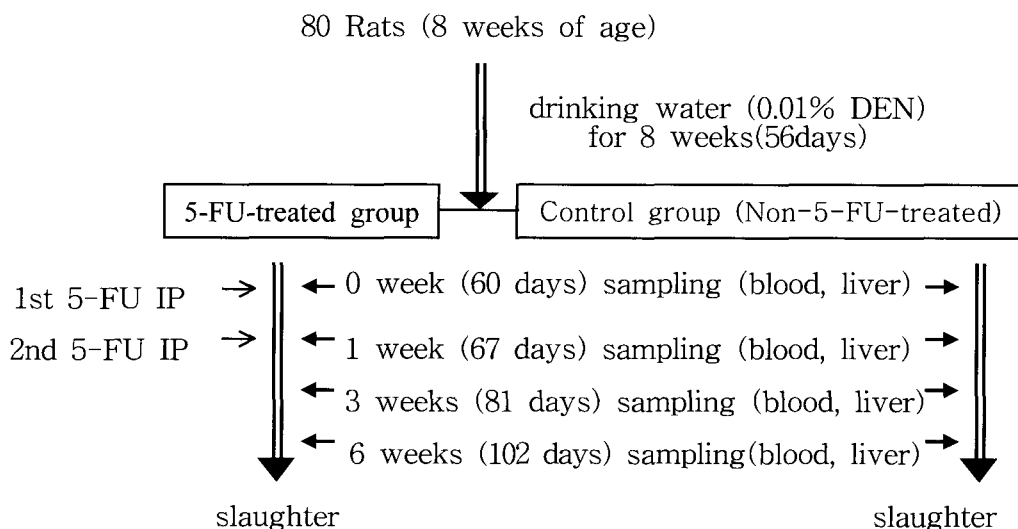


Fig 1. Experimental design I of 5-FU-treated group and non-5-FU-treated group

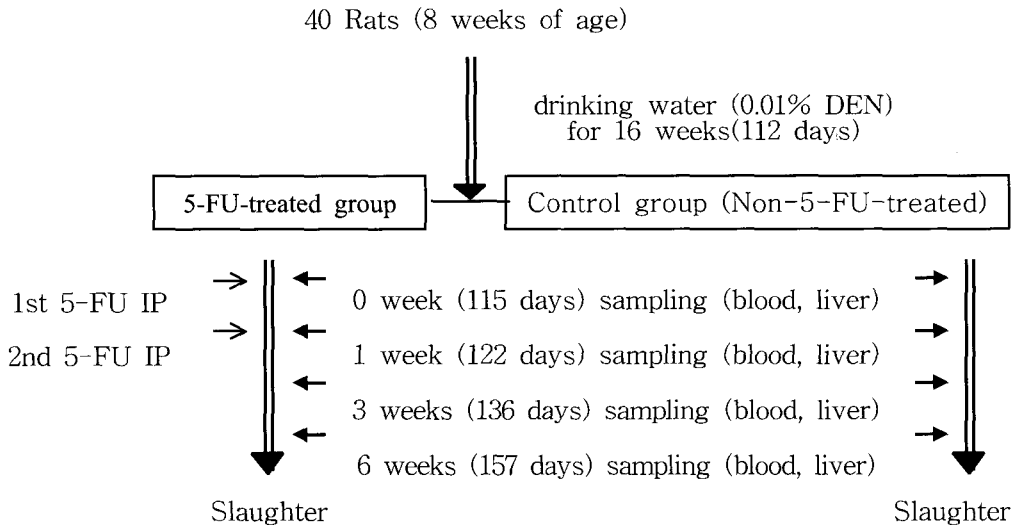


Fig 2. Experimental design II of 5-FU-treated group and non-5-FU-treated group

고정 10% 중성 formalin에 재고정하였다.

조직학적 및 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)를 이용한 면역조직 화학적 검사

#### 체중 및 간중량의 변화

실험에 사용한 쥐들에서는 발암 유발의 확인을 위하여 DEN을 계속 투여한 후 4주령군부터 16주령군까지 경구로 발암제를 투여하여 부검을 실시하였으며 각 주령별 발암 유발 정도를 비교하기 위하여 주령별로 부검을 하여 비교, 분석하였다.

부검 직전 체중을 측정하여 기록하였으며, ether 마취 후 부검 실시 즉시 간을 먼저 적출하여 간중량을 측정하였다.

#### 혈액의 생화학적 검사

간 기능을 검사하기 위해 혈청 중의 total protein은 Buret method로, triglyceride는 enzyme method로, aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)의 활성치는 Reitman-Frankel method로 아산제약주식회사(경기도 화성시)의 및 자동생화학 분석기를 이용하여 실시하였다.

간조직의 변화상을 관찰하기 위하여 4% paraformaldehyde로 관류 고정 10% 중성 formalin에 재고정하였다. 고정한 조직을 통상 방법과 같이 paraffin 절편을 만들어 haematoxylin-eosin 염색을 실시하였고, 일부조직은 종양세포의 증식의 marker인 PCNA에 대한 단클론성 항체에 대한 양성반응세포를 조사하기 위하여 primary antibody는 mouse anti-PCNA mAb (PC-10)를 이용하였고 secondary antibody reaction은 biotinylated anti-mouse IgG를, third antibody reaction은 avidin peroxidase conjugated로, substrate reaction은 diaminobenzidine (DAB)에 의한 방법으로 면역 염색한 결과 세포핵이 갈색으로 염색되는 세포를 PCNA 양성반응 세포인 증식세포로 간주하였다.

#### 전자현미경 검사

부검시 채취한 간 조직의 일부는 PBS Buffer (pH 7.0-7.4)로 세척한 뒤, 2.5%

glutaraldehyde (pH 7.0-7.4, 4°C) (Sigma, USA)에 1-2시간 선고정한 후 1mm 크기로 잘라 다시 PBS buffer (pH 7.0-7.4)에 후고정한 후, 1-2% osmium tetroxide 용액 (pH 7.0-7.4)로 1-2시간 고정하고 PBS buffer (pH 7.0-7.4)로 세척하였다. 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% ethanol에 각각 15분씩 탈수를 실시한 후 hexamethyl-disilazane에 1시간동안 건조시키고 propylene oxide를 이용하여 치환하여 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

### 통계 처리

혈액의 생화학적 결과치는 평균치와 표준오차 (Mean±SE)로 표기하고 통계처리는 Student's *t*-test를 사용하여 유의성을 검정하였다 ( $p < 0.05$ ).

## 결 과

### 임상증상

발암제인 DEN을 각 주령별 계속 투여한 뒤 4주령이 경과하면서 약간의 행동 둔화와 탈모 현상이 일부 개체에서 나타나기 시작하였다. 1일 개체당의 음수량도 DEN을 계속 투여후 3-4주령이 경과하면서부터 조금씩 감소하기 시작하여 6주령 이후에서는 현저하

게 감소하였으며 대조구 개체당 평균 음수량 42ml에 비하여 발암제 투여군의 1일 개체당의 음수량은 22ml 정도로 음수량이 감소하였음을 관찰할 수 있었다.

사료 섭취량도 DEN 투여후 4주령이 경과하면서 조금씩 감소하다가 DEN 투여후 6주령 이상에서 거의 반정도로 감소하였다. 1일 오줌 배설량은 DEN 투여 주령이 경과할수록 개체에 따라 조금씩 감소하였으나 전체적으로 큰 차이는 발견되지 않았다. 발암제를 투여하지 않고 같은 조건으로 16주간 사육한 대조군에서의 특이한 임상증상 및 생리학적 변화는 관찰되지 않으며 발암제 (DEN) 및 항암제 (5-FU) 투여군에도 특이한 부작용은 관찰되지 않았다.

### 체중 및 간중량의 변화

Table 1 및 2와 같이 발암제 DEN을 계속 투여한 군의 각 주령별 체중 변화는 발암제를 투여하지 않은 대조군에 비해서 DEN 투여후 4주령군 이후부터는 유의하게 감소되었으며 ( $p < 0.05$ ), 10주령에서부터 약간 상승하였고, 간중량은 8주령부터 체중과 반비례하여 대조군에서보다 발암제 투여군에서 주령이 경과될수록 유의성 있게 증가되었다 ( $p < 0.05$ ).

체중에 대한 간중량 비율은 각 주령별로는 대조군의 암·수 평균  $3.2 \pm 0.5\%$ 에 비해 발암

Table 1. Changes of body- and liver-weights in DEN administrated and control rats

Duration of treatment (weeks)	DEN treatment				Control*			
	B. W (g)		L. W (g)		B. W (g)		L. W (g)	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
0*	180±5.3	281±5.2	-	-	185±5.3	283±6.4	-	-
4	215±14.3	308±9.2	-	-	256±5.2	401±11.0	-	-
8	261±7.4	355±14.3	21.3±4.7	23.5±1.8	295±5.3	413±6.7	8.3±0.2	13.3±0.9
16	295±5.3	413±8.2	25.5±8.8	35.9±6.4	334±5.2	464±8.4	11.4±0.6	15.0±0.3

\*: Control : No treatment during 8 weeks,

L. W : Liver weight, B. W : Body weight (Mean±SEM)

Table 2. Rates of body- and liver-weights in DEN administrated and control rats

Duration of treatment (weeks)	B. W / L. W (%)			
	DEN treatment		Control*	
	Female	Male	Female	Male
8	8.1±0.5	6.6±0.6	2.8±0.4	3.2±0.5
16	8.6±0.8	8.7±0.9	3.4±0.7	3.2±0.6

\*: Control : No treatment during 8 weeks,

L. W : Liver weight, B. W : Body weight (Mean±SEM)

제 투여후의 8주령군에서는 7.4±0.6%이며, 16주령에서는 8.7±0.8%로 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.05$ ).

혈청 간효소 활성치의 변화

AST 활성치 : DEN을 계속 투여한 군의 각 주령별 AST 효소활성치 (IU/ml)는 발암제를 투여하지 않은 대조군의 49.96±22.17에 비해서 유의하게 증가되어 있고( $p < 0.05$ ), DEN 투여 8주령군에서는 127.37±56.30으로 가장 높게 증가되었다. 10주령군 이후의 DEN 투여군은 다소 감소하였지만 각 주령별 사이의 변화는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Table 3).

Table 3. Changes of AST(GOT) activity in DEN administrated rats

Duration of treatment (weeks)	No. of rats used	Activity (IU/ml)
0	10	49.96 ± 22.17
8	12	127.37 ± 56.30**
10	11	105.58 ± 19.73**
16	12	107.60 ± 39.26**

\*\* : Significantly ( $p < 0.05$ ) different within column.

ALT 활성치 (IU/ml) : Table 4와 같이 DEN을 계속 투여한 8주령군에서 대조군 33.40±12.45 보다 ALT 효소활성치가 8주령에서 88.73±32.53으로 증가되었고, 발암제 투여 10주령, 16주령에서도 유의하게 증가되었다( $p < 0.05$ ).

Table 4. Changes of ALT(GPT) activity in DEN administrated rats

Duration of treatment (weeks)	No. of rats used	Activity (IU/ml)
0	10	33.40 ± 12.45
8	12	88.73 ± 32.53**
10	11	97.39 ± 39.22**
16	12	106.67 ± 42.48**

\*\* : Significantly ( $p < 0.05$ ) different within column.

$\gamma$ -GTP 활성치 : Table 5와 같이  $\gamma$ -GTP 효소활성치 (IU/ml)는 대조군의 37.24±19.22에 비해서 발암제 투여군의 8 주령군에서부터 87.67±21.51로 나타나 각 주령별 활성치는 유의하게 증가되었으나( $p < 0.05$ ), 각 주령군별 간의 뚜렷한 차이 없이 일정한 수준으로 유지되었다.

Table 5. Changes of  $\gamma$ -GTP activity in DEN administrated rats

Duration of treatment (weeks)	No. of rats used	Activity (IU/ml)
0	10	37.24 ± 19.22
8	12	87.67 ± 21.51**
10	11	94.78 ± 28.52**
16	12	102.99 ± 32.94**

\*\* : Significantly ( $p < 0.05$ ) different within column.

DEN 투여된 쥐에서 5-FU 투여시의 간효소 활성치 변화(항암제 효과시험)

Serum total protein 농도의 변화 : Fig 3 과 같이 혈청단백농도 (g/dl)는 5-FU 투여 그룹에 5-FU를 1차 투여시  $6.20 \pm 0.12$ , 1주일 이후 2차 투여시  $5.9 \pm 0.01$ 으로 protein 농도가 약간 낮아졌으나, 5-FU 투여 후 3주에  $6.77 \pm 0.15$ 로 나타났다. DEN 단독 투여한

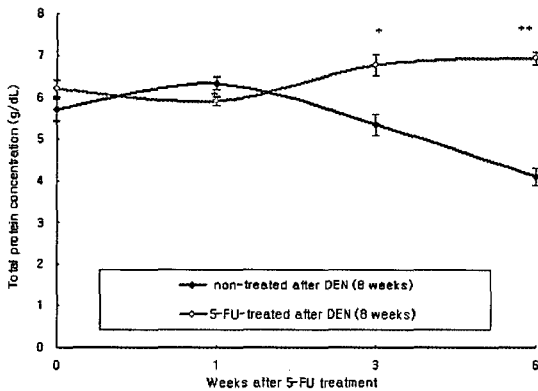


Fig 3. Changes in the serum total protein concentration after 5-FU treatment in rats. \* $p < 0.05$  vs. non-treated after DEN (8 weeks), \*\* $p < 0.01$  vs non-treated after DEN(8 weeks)

#### ALT 효소 활성치의 변화

ALT는 간세포의 cytosol에만 존재하므로 간 질환에 특이적인 효소이다. Fig 4에서와 같이 5-FU 투여 그룹은 5-FU 1차 투여시  $80.33 \pm 1.86$  IU/ml, 2차 투여시  $76.33 \pm 1.33$ 으로 대조그룹보다 높아졌으나( $p < 0.05$ ), 5-FU 투여 후 3주째  $53.0 \pm 1.16$ , 6주에는  $40.33 \pm 2.03$ 으로 낮아졌다( $p < 0.05$ ). DEN만 투여한 대조그룹은 DEN 투여 정지 후 2일째  $72.33 \pm 1.33$ , DEN 투여 정지 후 1주째  $69.0 \pm 1.73$ , 3주째  $84.33 \pm 2.33$ , 6주에  $121.33 \pm 4.33$ 으로 현저히 증가하였다. ALT 효소 활성치는 5-FU의 1차 투여 후 1일, 1주, 3주와 6주에 유의성이 있었다( $p < 0.05$ ).

#### AST 효소 활성치의 변화

대조그룹은 DEN 투여 정지 후 2일째  $5.7 \pm 0.15$ , DEN 투여 정지 후 1주째  $6.33 \pm 0.09$ 로 증가한 후, 3주에  $5.33 \pm 0.15$ , 6주에  $4.10 \pm 0.12$ 로 현저히 감소하였다. 혈청단백 농도는 5-FU의 1차 투여 후 1주, 3주와 6주에 유의성의 차이가 있었다 ( $p < 0.05$ ).

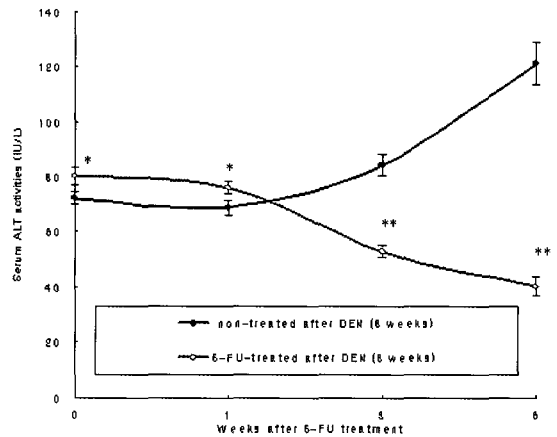


Fig 4. Changes in the serum ALT activities after 5-FU treatment in rats. \* $p < 0.05$  vs. non-treated after DEN(8 weeks), \*\* $p < 0.01$  vs non-treated after DEN(8 weeks)

AST는 간, 심장, 근육, 신장세포의 미토콘드리아에 존재하는 효소로서 ALT와 마찬가지로 Fig 5에서와 같이 5-FU 투여 그룹에서 5-FU 1차 투여시  $113.0 \pm 2.89$  IU/ml, 2차 투여시  $107.0 \pm 2.65$ 으로 일정하게 상승되었다가 5-FU 투여 후 3주에  $48.0 \pm 1.53$ 으로 현저히 낮아져 6주에  $35.3 \pm 2.60$ 으로 유지되었다.

DEN만 투여한 대조 그룹도 DEN 투여 정지 후 2일에  $88.7 \pm 2.03$ , 1주에  $81.7 \pm 3.84$ 로 일정하게 유지되다가 DEN 투여 정지 후 3주에  $91.7 \pm 4.01$ 로 상승하며 6주에  $145.0 \pm 3.65$ 로 현저히 상승되었다.

AST와 ALT는 거의 일정한 패턴으로 상승 및 감소하는 경향으로 나타났으며, AST 효소 활성치는 5-FU 처리 이후부터 유의적인 차이가 나타났다( $p < 0.05$ ).



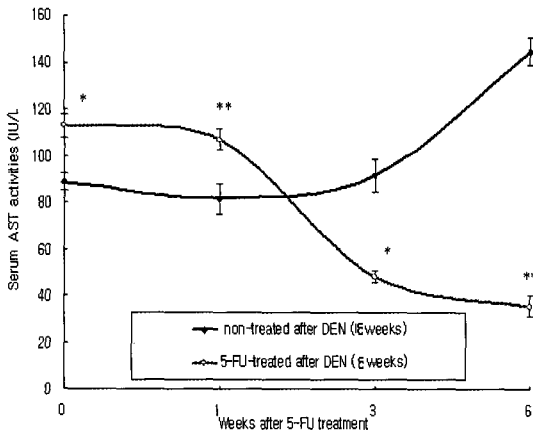


Fig 5. Changes in the serum AST activities after 5-FU treatment in rats. \* $p < 0.05$  vs. non-treated after DEN(8 weeks), \*\* $p < 0.01$  vs non-treated after DEN(8 weeks)

### Triglyceride (TG) 농도의 변화

TG는 지방조직과 간에 에너지원으로 저장되며 잉여의 TG는 간에서 very low-density lipoprotein, VLDL) 형태로 합성된다. 간질환의 경우 VLDL의 합성감소로 혈청 중의 TG 농도(mg/dl)가 감소된다.

Fig 6에서와 같이 5-FU 투여 그룹에서 1차 투여시  $58.33 \pm 1.86$ , 2차 투여시  $54.67 \pm 0.88$ 로 약간 상승되었으나, 5-FU 투여 후 3주와 6주에 각각  $50.67 \pm 0.88$ ,  $51.67 \pm 1.20$ 으로 유지되었다.

대조 그룹은 DEN 투여 정지 후 2일에  $55.33 \pm 0.88$ , DEN 투여 정지 후 1주에  $48.67 \pm 1.45$ , 3주에  $41.0 \pm 1.16$ 으로 일정하게 감소하였고, 6주에  $29.0 \pm 1.16$ 으로 현저히 감소하였다. TG의 농도는 5-FU 투여 후 3주와 6주에 유의성이 나타났다 ( $p < 0.01$ ).

### 형태학적 변화

육안적 소견 : Fig 7과 같이 DEN투여 6주후부터 황갈색으로 변하고 약간 종대되며 회백색 종양이 직경 1mm이하로 5-6개 형성

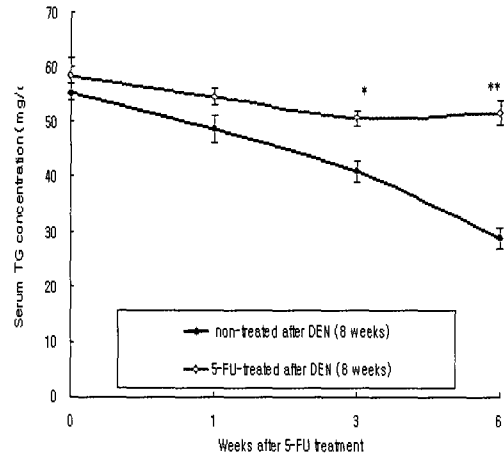


Fig 6. Changes in the serum triglyceride(TG) concentration after 5-FU treatment in rats. \* $p < 0.05$  vs non-treated after DEN(8 weeks), \*\* $p < 0.01$  vs non-treated after DEN(8 weeks)

되었음을 관찰할 수 있었으며, 8주후부터 종양이 3mm 내외로 전형적으로 관찰할 수 있었다.

DEN만 투여한 대조 그룹은 DEN 투여 정지시 간은 종대되고 황갈색으로 짙어졌으며, Fig 8.과 같이 DEN 투여 정지 후 8주째, 간은 종대되고 회백색의 반점이나 결절이 형성되었고, 5-FU 투여 그룹은 5-FU투여 후 8주째에 간의 종대가 회복되고 표면은 평활하고 연한 적갈색을 나타내었다.

조직학적 소견(H-E Stain) : Fig 9에서와 같이 DEN만 투여한 대조 그룹의 조직학적 소견에서는 간소엽 중심부와 주변부의 문맥과 동양혈관의 확장과 공포변성이 있었고 다형태성의 공포가 많이 나타났고, 증식성 소형세포 또는 다형태성 세포의 출현 등의 소견이 있었다.

PCNA를 이용한 면역화학적 소견 : Fig 10과 같이 PCNA 양성반응세포는 DEN만 투여한 대조 그룹은 문맥부위와 간소엽의 주변에 담관상피세포 소형의 간세포 등의 양성반응세포가 많았고, 간소엽 전반에서 간세포 또는 결합조직세포의 양성반응세포가 5-FU 투여 그룹보다 유의적으로 많았다.

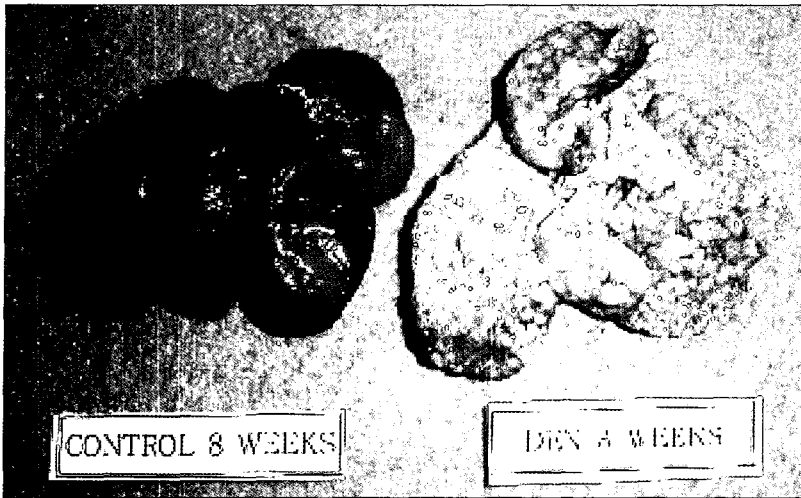


Fig 7. Right is liver of DEN-treated rat for 8 weeks. Left is DEN non-treatment(control) for 8 weeks.

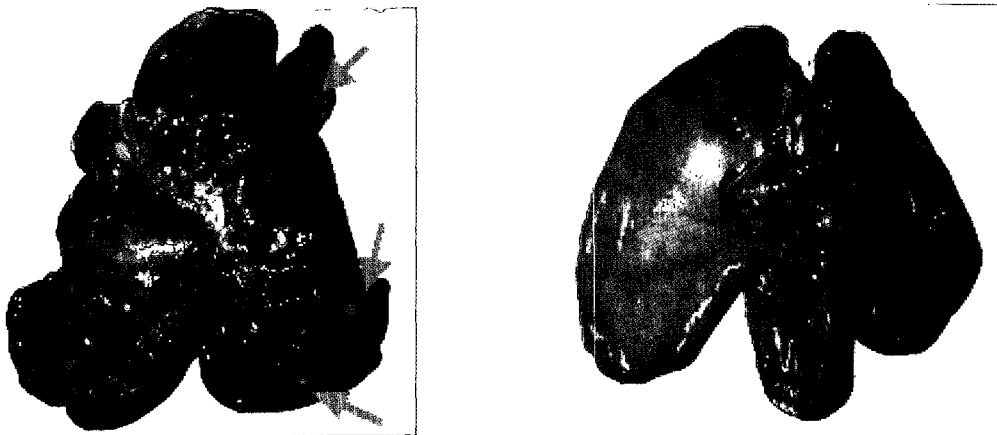


Fig 8. Left is liver of DEN-treated rat for 8 weeks. Right is DEN treatment for 8 weeks and then 5-FU treatment and then liver of survived rat for 8 weeks.

전자현미경적 소견 : Fig 11에서와 같이 DEN만 투여한 대조 그룹은 공통적으로 간세포의 세포질 내 사립체 형질내세망 등의 수종 공포화 등의 변화가 많았고, 간세포의 핵은 증대하고 chromatin의 농축 또는 핵분절, 세포질의 농축이 있었고, 5-FU 투여 그룹은 간세포의 세포질 내 mitochondria가 증가되고 소기관이 많이 발달되고 세포질이 균일하고 공포형성이 거의 없었다.

### 고 찰

간은 신체의 기관 중 가장 큰 기관으로 그

무게는 전체 몸무게의 약 2%를 차지하고 있다. 간은 복부의 오른쪽 윗부분에 위치하고 있으며, 늑골에 가려져 있고 간은 폐 바로 밑에 있다. 간 동맥과 문맥으로부터 이중의 혈액공급을 받는다. 간은 기능 단위인 미세한 소엽으로 되어 있고 혈액의 저장 및 여과, 담즙분비, 당의 당원로의 전환 등 다수의 대사기능을 수행하고 있다.

그러나 간은 각종 중양이 호발하는 장소이다. 위 장관에서 나오는 혈류는 일단 문맥을 통하여 간을 거치게 된다. 그리하여 위암, 대장암, 췌장암 등 각종 소화기 암들이 간에 전이되어 간암이 발생된다. 우리나라는 전체 암

환자의 10%을 차지한다. 간은 침묵의 장기로서 초기에는 증상이 거의 없으며 증상이 나타난 후의 간암은 많이 진행된 상태로서 임상증상은 상복부 통증, 복부팽만, 체중감소, 식욕부진, 피로 등이 나타난다.

유전자 발암물질인 DEN은 cytochrome p450에 의하여 생활성화되어 세포 내 DNA와 반응하여 DNA 부가체를 형성한다. 이러한 DNA 부가체로 인하여 변형된 염기나 nucleotide가 수복효소에 의하여 제거되지 않는 한 DNA 복제과정을 거쳐 돌연변이가 일어나고 유전적으로 고정되어 종양의 원인이 된다<sup>5)</sup>. 환경발암물질에 의한 DNA 손상 정도와 이를 수복할 수 있는 능력은 악성 형질전환과 발암물질의 조직 특이성에 매우 중요한 인자가 된다. 대부분의 화학발암물질이나 발암개시제들은 유전독성 기전에 의하여 작용한다<sup>16)</sup>.

유전독성물질로 분류된 많은 화학물질이 DNA와 화학반응을 하기 위해서 먼저 불활성

인 발암원 물질(precursor 또는 precarcinogen)이 활성형(친전자성 물질, electrophiles)으로 대사 전환되어야 하며 유전독성 물질의 1차 표적은 DNA 이다. 대부분의 발암 물질은 불용성이어서 생체 내에 들어오면 약물 대사에 관여하는 phase I과 phase II 효소에 의하여 보다 수용성으로 대사가 된다. 그러나 해독과정 중에 형성된 중간 대사산물은 반응성이 강한 친전자성 물질로 대사가 된다.

친전자성 물질들은 생체 내에 존재하는 친핵성 물질인 단백질, RNA나 DNA와 같은 핵산 또는 glutathione 등과 쉽게 반응한다. 즉, 대사과정 중에 형성된 중간 대사산물이 배설되기 전에 이들 단백질 부가체나 RNA 부가체는 단백질이나 RNA의 기능에 영향을 주며 특히 DNA 부가체의 경우 DNA 복제 과정에 영향을 줄 수 있다.

DEN의 투여시 간에서의 특징적 소견은 괴사, 증식, 과호염기성, 그리고 종양을 발생하는 것으로 알려져 있다<sup>17,18)</sup>.

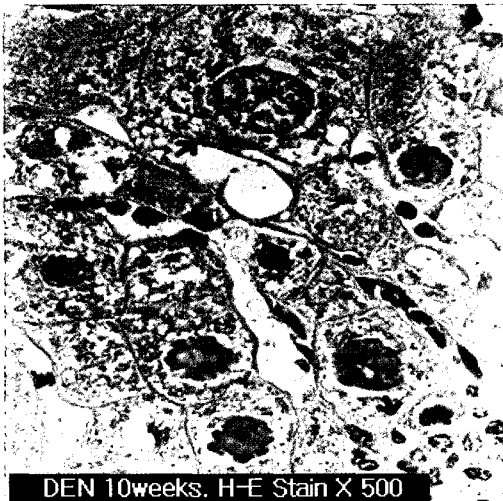


Fig 9. The large and polymorphological hepatocytes with granular eosinophilic cytoplasm and densely basophilic mitotic nucleoli or proliferative small round cells are seen areas on the peripheral area in the rat liver treated with DEN for 10 weeks. H-E stain,  $\times 500$  (Left). Several proliferative small round cells arrows on the vacuolated and necrotic areas and dense nuclei of hepatocytes with mitotic figures are seen in a hepatic lobule of the rat liver treated with DEN for 12 weeks. H-E stain,  $\times 200$  (Right).

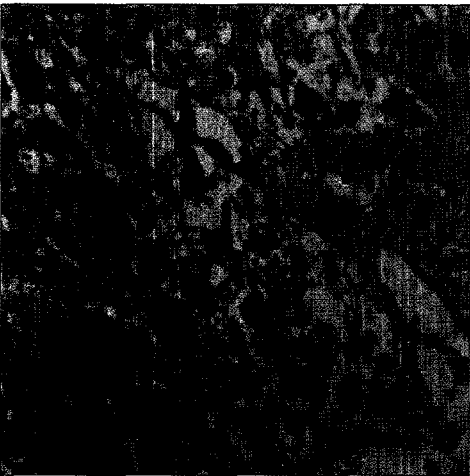


Fig 10. Appearance of PCNA positive cells (arrows) on the peripheral areas (upper) and on the midzonal areas (lower) of hepatic lobules the DEN administration for 8 weeks and then survived-rat for 8 weeks (x 200).

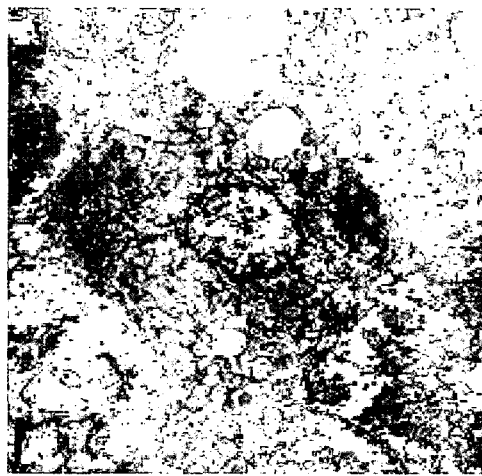
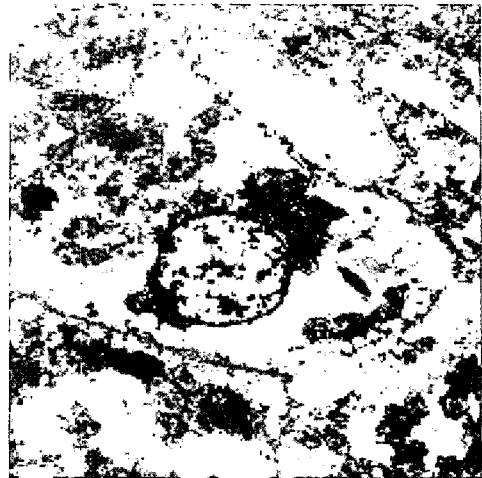


Fig 11. Comparison of EM photography of rat hepatocyte on the DEN administration for 8 weeks and then 8 weeks after 5-FU treatment, the left hepatocyte (DEN-treated) was vacuolated loose cytoplasm, the nucleus and organelles were degraded. The cytoplasm of right hepatocyte (5-FU-treated) contained a large number of mitochondria, rough endoplasmic reticulum, developed organelles surrounding nucleus (x 7,800).

항암제는 암세포의 분열을 억제하고 암세포를 파괴하는 작용을 한다. 그러므로 항암제를 어느 경로로 투여하여도 혈액을 통하여 전신의 암의 병소를 파괴하는 전신적인 효과를 발휘한다. 암 병소를 수술로 제거하고 남은 암 조직, 또는 전이된 암을 죽이기 위하여 부득이 화학요법을 시행한다.

화학요법은 치유와 환자의 생명을 연장하

거나 환자의 고통을 제거하는 목적도 있다. 1957년 Heiderberger<sup>6)</sup>가 5-FU를 처음 합성한 후, 40년이 지난 오늘날까지 5-FU 기능의 증강 및 부작용의 경감을 목적으로 개발되어 왔다. 이 항암제는 단독 및 병용 요법으로 높은 효과를 나타내며 근래에는 경구용으로도 주목 받고 있으며, 부작용이 적어 장기간 사용할 수가 있고 경제적인 면에서 환

자에게 큰 효과를 주어 최근에 많은 각광을 받고 있다.

일반적으로 5-FU는 cell cycle-의존성 항암제로서 효과는 농도와 치료시간에 좌우되며, 5-FU는 암세포 내 DNA 합성을 저해하는 우라실 유도체로, 5-FU의 활성체 중에서 5-FdUMP와 암세포를 형성화 하는 thymidylate synthase(TS)의 효소와 결합하여 효소의 기능을 억제하여 5-FU의 항종양 효과를 일으킨다. 또한 류코보린(LV)과 메토틱렉세이트(MTX)는 5-FU와 결합하여 효과를 증강시킨다. 이 약들은 생화학 조절제(biochemical modulator)로써 생체 내에서 5-FU의 기능을 증강시키는 기능을 갖고 있다.

근래에는 투여가 간편하면서도 같은 효과를 내며 경제적으로 환자에게 도움이 되는 경구용 5-FU 제제로서 1970년대 tegafur, 1980년대 camofur, UFT가 개발되었다. 이것들은 5-FU 분해 효소를 저해하는 우라실과 화합하여 종양조직 내에 5-FU의 고농도를 유지하지만 암세포를 파괴시키면서 정상적인 세포를 손상시키기 때문에 정상조직에 대한 5-FU의 독성은 RNA와의 융합과 DNA합성 억제로 인하여 단백질이 부족하여 독성이 증가한다<sup>13)</sup>. 부작용은 약물의 투여를 중지하면 정상으로 되돌아온다.

간 기능을 검사하는 방법은 100 여종이 있으나 대부분 감수성이 낮아 몇 가지 방법만이 실제 임상에 유용하다.

혈청 단백(serum protein)은 혈청의 각종 성분 중 가장 많고 이들 성분 중에 albumin, fibrinogen, prothrombin이 간에서 합성되므로 간 질환시, 영양상태 및 신장질환 등의 다른 요인에 의해서도 감소된다.

정상적인 rat의 serum total protein (g/dl)의 평균치는 4.7-8.1로서, 5-FU 투여 그룹은 1차 투여시 6.20±0.12, 2차 투여시 5.9±0.01로 약간 protein치가 낮았으나 5-FU 투여 후 3주 이후로는 6.77±0.15로 정상으로 회복되어 유지되었다. Serum total protein 농도는 5-FU의 1차 투여 후 1주, 3주

와 6주에 유의성의 차이가 있었다( $p < 0.05$ ).

ALT는 간세포의 cytosol에만 존재하므로 간 질환에 특이적이다. 정상 rat의 ALT 활성치 (IU/ml)의 평균치는 17.5~30.2이며, 5-FU 투여 그룹은 5-FU 1차 투여시 80.33±1.86, 2차 투여시 76.33±1.33으로 DEN만 투여한 대조 그룹보다 높아졌으나( $p < 0.05$ ), 5-FU 투여 후 3주에 53.0±1.16으로 낮아지기 시작하여 6주에는 40.33±2.03으로 나타났다( $p < 0.05$ ).

AST는 간, 심장, 근육, 신장 세포의 미토콘드리아에 존재하는 효소이므로 이들 장기의 질환에서 모두 증가할 수 있지만 viral hepatitis나 drug hepatitis에서는 정상상한치의 10배 이상까지 아주 높게 상승하기도 한다.

정상 rat의 AST 활성치 (IU/ml)의 평균치는 45~80으로, ALT와 마찬가지로 5-FU 투여 그룹에서 5-FU 1차 투여시 113.0±2.89, 2차 투여시 107.0±2.65로 일정하게 상승되었다가 5-FU 투여 후 3주에 48.0±1.53으로 현저히 낮아져 6주에 35.3±2.60으로 유지되었다.

AST와 ALT는 거의 일정한 패턴으로 상승 및 감소하는 경향으로 나타났으며, AST의 활성치는 5-FU 투여 이후부터 유의적 차이( $p < 0.05$ )가 나타났다.

김<sup>19,20)</sup>, 및 강<sup>21-23)</sup>은 흰쥐에 사염화탄소를 투여하여 간세포 손상을 유발시켜 혈청 내 AST와 ALT등의 간 효소 활성치가 크게 증가함을 밝힌 바 있다.

TG는 glycerol과 fatty acid와의 ester형으로 지방조직과 간에 에너지원으로 저장된다. 잉여의 triglyceride는 간에서 VLDL형태로 합성되고 당이 에너지원으로 부족할 때 lipoprotein lipase에 의해 glycerol과 fatty acid로 가수분해되어 혈중에 방출되고 나머지는 간에 저장된다. 간 질환의 경우 VLDL의 합성 감소로 혈청 중의 TG의 농도가 감소된다. TG는 체내에서 에너지의 운반, 축적, 장기나 조직의 형태유지 등에 이용된다. TG는 심혈관 기능검사와 고지혈증검사의 검사 항

목으로 너무 낮은 농도로 나올 때는 영양실조의 유무를 조사해야 하며, 간 질환과 지방간일 경우 상승되고, 간경변증과 중증의 간세포 기능부전의 경우 저하된다.

정상 rat의 TG (mg/dl)의 평균치는 40-60으로서, 5-FU 투여 그룹에서 1차 투여시  $58.33 \pm 1.86$ , 2차 투여시  $54.67 \pm 0.88$ 로 약간 상승되었으나, 5-FU 투여 후 3주에  $50.67 \pm 0.88$ , 6주에  $51.67 \pm 1.20$ 으로 유지되었다. TG의 농도는 5-FU 투여 후 3주와 6주에 유의성 ( $p < 0.05$ )이 나타났다.

본 실험에서 형태학적 변화를 조사한 바, 5-FU 투여 그룹과 DEN만 투여한 대조 그룹에서 DEN 투여 정지 후부터 약간의 간의 증대가 있었고, 간의 표면 색깔 및 육안적 변화는 없었다. DEN 투여 정지 후 6주째에 간의 표면에 노란색의 작은 결절들이 많이 관찰되었고 간의 크기가 5-FU 투여 그룹보다 배로 증대되어 있었다. 5-FU 투여 그룹의 경우 6주째에 간의 크기가 작아지고 간의 표면이 깨끗하며 암적색을 띠었다.

간의 육안적 소견에 관해서 지<sup>24)</sup>는 0.01%을 함유한 DEN을 투여한 결과, 4주째에는 간의 외형, 색깔, 크기의 변화가 없고, 10주째는 간의 표면에 많은 소 돌기가 발생되었다고 하였다. Trischer<sup>9)</sup>은 10주째 간은 증대되고 색깔이 짙어지고 백색의 무수한 반점이 형성되었다고 하였고 Tamano<sup>25)</sup>은 간의 표면에 황갈색의 불규칙한 종양이 형성되었다고 하였다. 콕<sup>26)</sup>은 8주째부터 반점상에서 소 결절상으로 경과 주별로 증가되며 17주째는 간의 전 표면을 점유하였다고 하였다.

본 실험에서는 DEN만 투여한 대조 그룹의 조직학적 소견에서는 간소엽 중심부와 주변부의 문맥과 동양혈관의 확장과 공포변성이 있었고 다형태성의 공포가 많이 나타났고, 간세포의 핵은 증대하고 chromatin의 농축, 핵분절, 세포질의 농축이 있었고 mitochondria가 많이 증가하였다. Zafiriou<sup>27)</sup>에 의하면, 5-FU 투여 후 16 시간의 간세포에 괴사 및 공포화, 미토콘드리아의 감소와 lysosome의

크기와 수가 증가되었다. Dunsford<sup>28)</sup>은 DEN 투여 후 5주부터 공포성 간세포의 병소가 출현하여 9주째에 증가되었다고 하였다. 본 실험에서는 DEN만 투여한 대조 그룹에서 주령이 경과할수록 간세포 변성과 괴사, 증식 소견이 뚜렷하였다.

증식성 세포핵 항원(PCNA)은 흥반성 낭창에 걸린 환축의 혈청에서 최초로 발견된 36k dalton의 핵단백질이다. PCNA는 cyclin이라고도 불리는 증식성 세포핵 단백질로 세포주기와 관련되고 증식성인 세포의 후기 G1기와 S기에 축적되므로<sup>29)</sup> 여러 악성질환자에서 종양세포의 증식활동은 전이 가능성, 재발 및 전반적인 진단에 사용되고<sup>30)</sup> 또한 정상 및 종양조직의 생리학적 특성을 규명하는데 중요한 것으로 여겨진다. PCNA 면역반응은 단크론 항체를 이용한 정상 formalin 액으로 고정된 조직의 증식과정에서 발견되었다<sup>31)</sup>. 분열세포의 조직학적 규명은 세포핵 내 복제되는 DNA와 관련 <sup>3</sup>H-thymidine을 분열세포와 결합하게 하는 방사선 기법이나 세포핵의 nucleotides의 구성성분인 bromodeoxy-uridine (BrdU)을 이용하거나 세포가 증식하기 전 휴지기에 나타나는 DNA polymerase delta의 보조단백질로서 세포 분열주기 조절 단백질인 PCNA가 형성되는데 이 PCNA에 대한 단크론 항체로서 면역조직화학적 방법으로 분열세포(DNA합성 및 유사분열)를 검색하게 되며 이러한 방법을 이용하여 소화기 관과 생식기관 등의 상피 재생에 관한 연구, 암의 악성, 양성 구별 및 예후 확정, 상처 치유 등에 관한 연구에 활용되어 왔다. PCNA는 복제 전기의 말기, 복제기, 복제 후기의 초기 세포에도 검색할 수 있어 분열세포의 범위가 넓고 출현세포가 많다고 한다. PCNA 염색은 핵에 한정되며 주로 핵의 주변부나 명변부에 출현한다.

본 실험에서는 PCNA 양성반응세포가 DEN만 투여한 대조 그룹의 DEN투여 정지후 6주에 괴사된 부위와 큰 세포의 증식성 결절 주변에 작은 원형의 세포 집단이 출현하였다.

간 소엽의 주변에 담관상피세포 소형의 간세포에 양성반응세포가 많았고, 간소엽 전반에서 간세포 또는 결합조직세포의 양성반응세포가 많았다. 1993년 Deugnier<sup>32)</sup>은 사람의 간 종양세포에서, 1993년 Adachi<sup>33)</sup>는 간암의 진행정도에 따라 양성반응세포의 출현이 다르다고 하였다. 일반적으로 악성종양은 높고 양성종양은 낮다고 하나 정확한 한계는 제시된 바 없다.

이상의 결과로 보아 6주간 DEN의 단독 투여만으로 간암이 형성되는 것을 확인하였으며, 간 기능 효소치와 조직학적 소견 등 종합적으로 볼 때 항종양제인 5-FU가 종양 형성을 억제시키는 것이 확인되었으며 간암치료 활용에 손색이 없을 것으로 보이며 앞으로 더 많은 검정이 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

Carcinogen인 diethylnitrosamine (DEN)에 의해 손상된 rat의 간에 anticarcinogen인 5-fluorouracil (5-FU)이 미치는 영향을 알아보기 위해 임상적으로 건강한 8주령의 암컷 rat를 8주 동안 음수에 0.01% DEN을 함유하여 공급한 후, 5-FU를 1주 간격으로 2회 투여하여 혈액의 생화학치 및 형태학적 변화에 관하여 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DEN을 투여한 6주령 이후의 쥐에서는 약간의 행동둔화, 탈모, 음수량 감소, 사료 섭취량 감소 등의 소견들이 관찰되었으나, 다른 특이한 임상 증상은 없었다.
2. DEN 투여 6주후부터는 체중은 대조군에 비하여 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 감소하였으나 간중량은 종양이 진행될수록 증가하였다.
3. 체중에 대한 간중량의 비율은 DEN 투여 6주후부터 대조군에 비해 다소 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 증가하였다.
4. 간특이효소인 AST, ALT,  $\gamma$ -GTP 활성치는 대조군에 비해서 DEN 투여군에서 증가하였고, AST 활성치가 다른 효소활성치에

- 비해 더 높은 수치를 나타내었다 ( $p < 0.05$ ).
5. DEN 처리군과 항암제 (5-fu) 효과 비교 시험에서 serum total protein 농도는 DEN 투여군 보다 5-FU 처리 그룹에서 투여 후 3주와 6주에 유의성의 차이가 있었다 ( $p < 0.05$ ).
  6. AST와 ALT는 5-FU 1차 투여시 일시적으로 상승되었다가 2차 5-FU 투여 후 3주에 현저히 낮아져 6주에 정상 대조군과 유사한 수치로 유지되어 DEN 대조군과 유의적 차이를 나타내었다 ( $p < 0.05$ ).
  7. TG는 5-FU 투여 후 3주와 6주에서 유의성 ( $p < 0.05$ )이 있게 나타났다.
  8. DEN을 8주 동안 투여한 대조 그룹에서는 육안적 소견에서 간장의 종대, 회백색의 반점과 결절이 관찰되었다.
  9. 현미경적 소견 (H-E Stain)에서 간세포의 공포화, 괴사, 대소부동의 다형세포의 출현과 결합조직 및 미분화된 작은 원형세포 집단이 관찰되었다.
  10. PCNA 면역조직화학적 염색소견에서 작은 원형세포 집단의 양성반응 세포가 DEN 투여군에서 5-FU 투여 그룹보다 간소엽의 주변부와 문맥부위에서 많이 관찰되었다.
  11. DEN을 8주 동안 투여한 후 다시 5-FU를 투여한 그룹에서는 5-FU 투여 후 6주째에 간의 종대가 회복되고 표면은 평활하고 연한 적갈색을 띄었고, 전자현미경상에서는 간세포의 핵이 중심에 위치하고 chromatin과 핵 주위의 세포 소기관들이 발달되었다.
  12. 간암형성시 초, 중기 (DEN 8-10주령)보다 말기 (DEN 16-18주령) 간암에서 항종양제 (5-FU) 투여시 효과가 감소하였다.
- 이상의 결과로 보아 8주간 DEN의 단독 투여만으로 간암이 형성되는 것을 확인하였으며, 항종양제인 5-FU 투여는 종양 형성을 억제시켜 초기 간암 항암제로서 효과가 있는 것으로 판단된다.

## 참고문헌

1. Kang CB, Ha WS, Kim CK. 1999. Development of apoptosis model and bioimmune responses in experimental animal 1. Induction and indicator of apoptosis and hepatic tumorigenesis. *Korean J Vet Clin Med* 16(1) : 100-107.
2. Kang CB, Kim CK, Song SH, et al. 2001. Study on mechanism of multistep hepatotumorigenesis in rat: Bioindices on hepatic tumorigenesis. *Korean J Vet Res* 41(4) : 583-589.
3. Ha WS, Kim CK, Song SH, et al. 2001. Study on mechanism of multistep hepatotumorigenesis in rat: development of hepatotumorigenesis. *J Vet Sci* 2(1) : 53-58.
4. Peto R, Gray R, Brantom P, Grasso P. 1991. Effects on 4080 rats of chronic ingestion of N-nitrosodiethylamine or N-nitrosodimethylamine: a detailed dose-response study. *Cancer Res* 51(23 Pt 2) : 6415-6451.
5. Verna L, Whysner J, Williams GM. 1996. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther* 71(1-2) : 57-81.
6. Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, et al. 1957. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 179 (4561) : 663-666.
7. Midena E, Angeli CD, Valenti M, et al. 2000. Treatment of conjunctival squamous cell carcinoma with topical 5-fluorouracil. *Br J Ophthalmol* 84 (3) : 268-272.
8. Mizutani Y, Wada H, Yoshida O, et al. 2003. Significance of thymidylate synthase activity in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 9(4) : 1453-1460.
9. Tritscher AM, Clark GC, Sewall C, et al. 1995. Persistence of TCDD-induced hepatic cell proliferation and growth of enzyme altered foci after chronic exposure followed by cessation of treatment in DEN initiated female rats. *Carcinogenesis* 16(11) : 2807-2811.
10. Mo B, Pater A. 2003. Apoptosis, 5-fluorouracil sensitivity and expression of apoptotic proteins in a human ectocervical cell carcinogenesis model using different media. *Eur J Pharmacol* 467(1-3) : 15-22.
11. Malet-Martino M, Martino R. 2002. Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (capecitabine, UFT, S-1): a review. *Oncologist* 7 (4) : 288-323.
12. Matsusaka S, Yamasaki H, Kitayama Y, Okada T, Maeda S. 2003. Differential effects of two fluorouracil administration regimens for colorectal cancer. *Oncol Rep* 10(1) : 109-113.
13. Roos G, Stenram U. 1997. Incorporation of 5-fluorouracil into hepatoma and normal tissue RNA at protein depletion in the rat. *J Surg Oncol* 65 (3) : 155-158.
14. Berrada M, Yang Z, Lehnert S. 2002. Tumor treatment by sustained intratumoral release of 5-fluorouracil: effects of drug alone and in combined treatments. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54(5) : 1550-1557.
15. Ueno H, Okada S, Okusaka T, et al.



2002. Phase I and pharmacokinetic study of 5-fluorouracil administered by 5-day continuous infusion in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 49(2) : 155-160.
16. Pitot HC, Sirica AE. 1980. The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 605(2) : 191-215.
17. Ito N, Imaida K, Hasegawa R, et al. 1989. Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. *Crit Rev Toxicol* 19(4) : 385-415.
18. Kovalszky I, Szeberenyi S, Zalatnai A, et al. 1992. Modification of DENA-induced hepatocarcinogenesis by CCl<sub>4</sub> cirrhosis. Comparison of the marker enzyme patterns. *Carcinogenesis* 13(5) : 773-778
19. 김길수, 박준형. 1992. 사염화탄소에 의한 랫드의 간손상에 미치는 인진호추출물의 영향. *대한수의학회지* 32(3) : 347-356.
20. 김길수, 박준형. 1994. 사염화탄소에 의한 랫드의 간손상에 대한 인진호메타놀 추출물의 억제효과. *대한수의학회지* 34(3) : 619-629.
21. 강정부, 이은석, 허주형. 1997. 사염화탄소(CCl<sub>4</sub>)의 투여가 쥐의 간 기능에 미치는 영향. 1. 임상증상 및 혈액화학치. *한국임상수의학회지* 14(2) : 268-272.
22. 강정부, 이은석, 허주형. 1997. 사염화탄소(CCl<sub>4</sub>)의 투여가 쥐의 간 기능에 미치는 영향. 2. 혈청 효소 활성치. *한국임상수의학회지* 14(2) : 273-278.
23. 강정부, 손호상, 김철호. 1998. 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH)의 투여가 쥐의 간기능에 미치는 영향. 1. 임상증상 및 혈액 화학치 소견. *한국임상수의학회지* 15(1) : 75-78.
24. 지관자. 1991. Diethylnitrosamine에 의한 흰쥐 간세포의 유전적 변화에 관한 연구. 인하대학교 대학원 박사학위 논문.
25. Tamano S, Merlino GT, Ward JM. 1994. Rapid development of hepatic tumors in transforming growth factor alpha transgenic mice associated with increased cell proliferation in pre-cancerous hepatocellular lesions initiated by N-nitrosodiethylamine and promoted by phenobarbital. *Carcinogenesis* 15(9) : 1791-1798.
26. 광수동, 강정부, 하우송. 1998. Diethylnitrosamine을 투여한 rat 간장의 tumorigenesis에 관하여. 1. 간장의 육안적 소견. *대한수의학회지* 38(2) : 379-385.
27. Zafiriou G, Grekou A, Stravoravdi P, et al. 2002. Histological and ultrastructural study of the effect of chemotherapy with 5-fluorouracil on normal liver of Wistar rats. *Chemotherapy* 48(6) : 298-302
28. Dunsford HA, Karnasuta C, Hunt JM, et al. 1989. Different lineages of chemically induced hepatocellular carcinoma in rats defined by monoclonal antibodies. *Cancer Res* 49(17) : 4894-4900.
29. Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR Jr, et al. 1984. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309(5966) : 374-376.
30. Hall PA, Levison DA. 1990. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 43(3) : 184-192.
31. Waseem NH, Lane DP. 1990. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detec-

- tion of a nucleolar form. *J Cell Sci* 96(Pt 1) : 121-129.
32. Deugnier YM, Charalambous P. 1993. Preneoplastic significance of hepatic iron-free foci in genetic hemochromatosis a study of 185 patients. *Hepatology* 18(6) : 1363-1369.
33. Adachi E, Hashimoto H, Tsuneyoshi M. 1993. Proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma and small cell liver dysplasia. *Cancer* 72(10) : 2902-2909.