Kor. J. Food Hygiene 6(1), 1-12(1991)

간발암성 물질 검색에 있어서 Glutathione S-transferase Placental Form 양성 병소와 철 저항병소의 유효성 비교연구

강경선 · 김형진 · 이영순

서울대학교 수의과대학 공중보건학교실

The Comparison of Efficacy of Glutathione S-transferase Placental Form Positive and Iron-Resistant Lesions in the Detection of Hepatocarcinogens

Kyung-Sun Kang, Hyoung-Chin Kim and Yong-Soon Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, 103, Seodun-dong, Suwon, 441-744

ABSTRACT—Fischer 344 rats aged six weeks were divided into four groups and group 1, 2, and 3 of rats were given an intraperitoneal injection of diethylnitrosamine at 200 mg/kg body weight and group 4 was given saline alone. Two weeks after beginning of the experiment, group 1 and 2 of rats were begun to feed on diets containing 0.02% 2-acetylaminofluorene as a promoter for four weeks. Three weeks after beginning of the experiment, all groups were performed partial hepatectomy. During the last two weeks, group 1 and 3 of rats were received subcutaneously 3 consecutive weekly doses of iron dextran at 0.125 ml/100 g body weight.

Subcutaneous injection of iron dextran resulted in hepatic siderosis in group 1 and 3 of rats. Preneoplastic nodules were identified histopathologically by two markers, resistance to exogenous iron accumulation and glutathione S-transeferase placental form (GST-P) activity, while early carcinogen induced foci were hardly resistant to iron accumulation and though a few lesions were identified, it could hardly be distincted from normal hepatocytes of surroundings. However, GST-P positive nodules as well as foci were clearly distincted from normal hepatic cells of surroundings. In the quantitative analysis of carcinogen-induced nodules and foci, more lesions were detected by immunohistochemical method for GST-P than by prussian blue staining for resistant to iron accumulation.

It is concluded that immunohistochemical marker for GST-P is more sensitive and reliable than iron-resistance marker, and that iron-resistance is not useful marker for early detection of carcinogen-induced hepatic lesions.

Keywords□Fischer 344 rats, glutathione S-transeferase placental form, iron-resistance, carcinogen-induced early hepatic lesions.

최근 산업의 발달과 식생활양식의 변화에 따라 의약품, 농약, 식품첨가물, 화장품 등의 사용량이 많이 증가하였고, 바이러스, 방사선 및 자외선에 의한 암 발생과 천연생산물인 곰팡이 독소,[2,11] 식물성 독소,[23] 스테로이드[5] 및 담즙산[6,38] 등의 발암성 또는 발암촉진에 대한 연구논문이 보고된 바 있다. 사람이

Received for publication 15 January, 1991
Reprint request: Dr. Y.S.Lee at the above address

이들 발암물질에 직접 또는 간접적으로 노출될 수 있는 기회가 많아지고 있어, 국민보건과 환경위생학적인 측면에서 발암물질을 정확하고 신속하게 평가하는 것이 매우 중요한 것으로 되어 있다. 그러나 이러한 물질들이 실제로 사람에 있어서 암을 일으키는데는 오랜 시일이 걸리고, 사람을 상대로 실험을 할 수 없기 때문에 암의 원인 물질을 밝히는 일은 대단히 어려운 일이다. 이러한 까닭에 사람의 수명보다 훨씬 수명이 짧고, 검색물질을 용이하게 적용할 수 있는 실험동물을 이용한 장기 생체시험법이 발암물질을 검색하는데 주로 이용되어 왔다. 이러한 방법은 많은 동물종과 동물수를 필요로 하고, 장기간에 걸친 시험으로 비용이 많이 들고 시간이 오래 걸린다는 점과 면밀한 병리조직학적 관찰이 필요하다는 단점을 가지고 있다. 따라서 시간과 비용을 절약하기 위하여 *in vitro* 단기 시험법이 개발되어 있으나,[1,4,39] 이러한 방법들에 의하여 발암성이 없는 것으로 밝혀진 물질인 acetamide 등 15종의 물질들이 간장에서 암을 일으키는 것으로 판명되었다.[18] 또한 *in vitro* 단기시험법은 장기생체시험 성적에 비하여 위양성 뿐만 아니라 위음성이 나타나고 있고, 표적장기 특히 발암물질이나 발암촉진제를 결정할 수 없다는 한계성이 있다. 그래서 의약품의 안전성을 평가할 때 시험항목으로 요구하고 있으나 어디까지나 참고사항으로 볼 뿐이다. 따라서 *in vitro* 단기시험법과 장기생체시험법의 교량역할을 할 수 있고 경비와 시간을 줄이면서 정확하게 발암성을 평가할 수 있는 중기생체시험법이 개발되었다.[19]

화학적 발암물질에 의한 암의 발생은 유발(initiation) 및 촉진(promotion)과정을 거쳐 이루어진다는 2단계 이론(two-step theory)[15,22,27,38]과 종양으로의 진행과정(progression)을 포함하는 3단계 이론이 일반적으로 받아들여지고 있고,[10] 이러한 이론에 기초를 해서 여러 가지 생체내 발암성 검색법이 개발되었다.[19,26,33,34,35] 이러한 방법들 중 Ito 등[16]이 개발한 나고야 대학법은 시험기간이 8주로서 짧고, 장기생체시험성적과 비교시에 높은 적중률을 나타내며,[7,25] 위양성이 없다는 점[17]에서 화학물질의 발암성유무를 검색하는데 매우 유용한 방법으로 인정되고 있다. 또 이러한 발암성 검색은 랫드의 간장을 이용한 검색법을 주로 채택하고 있으며, 이러한 발암성 검색법을 확립하는데는 발암을 인정할 수 있는 지표(marker)가 중요하다. 랫드의 간에서 발암을 검색하기 위한 지표는 크게 세가지로 분류된다.[32]

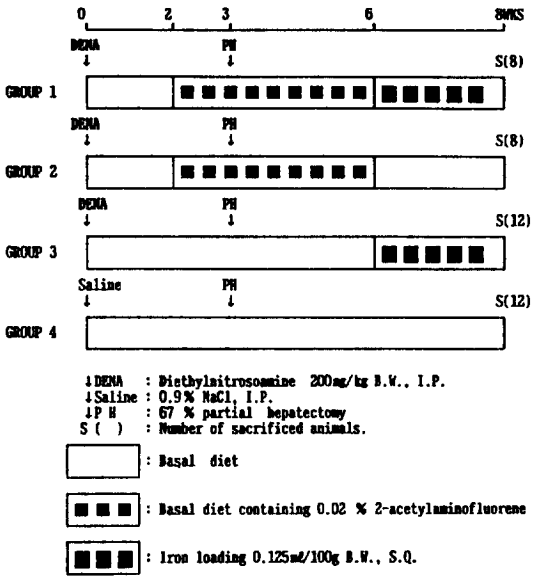
첫째로 전암병소에서 감소하는 지표로 glucose-6-phosphatase, tryptopan oxygenase, adenosine triphosphatase 등이 있고, 둘째로 증가하는 것으로는 epoxide hydrolase, γ-glutamyltranspeptidase (GGT, or γ-GTP), glutathione S-transferase(GST) 등이 있으며, 셋째로는 glucose-6-phosphate dehydrogenase, 철 저항능 등이 있다.

이들 지표중 Williams와 Yamamoto[40]는 화학물질로 간암을 유발시킨 후 철을 투여한 결과 전암병소에는 철이 축적되지 않기 때문에 철이 축적되는 주위의 정상조직과 구별이 잘되어 철저항능이 전암병소를 검색하는데 믿을만한 지표가 된다고 주장하였다. 또한 Hirota와 Williams[14]는 랫드에서, Kathleen 등[20]은 마우스에서 전암병소 검색을 위한 지표인 γ-GTP와 철 저항능을 비교하여, 철 저항능이 더 민감하고 믿을만한 지표가 된다고 주장하였다. 한편, Sato[32]는 γ-GTP와 GST-P 양성병소(position lesion)를 비교한 결과, GST-P는 γ-GTP로 검색할 수 없는 작은 병소는 물론 diethylnitrosamine을 체중 Kg당 200 mg을 투여한 후 1~2주에도 수개의 전암세포를 검출할 수 있고, 같은 병변에서도 더 진하고 확실하게 염색이 된다고 주장하였으며,[24] Tatematsu 등[36,37]은 γ-GTP가 전암병변 검색을 위해 불안정하여 GST-P가 발암을 검색하는데 가장 적당한 지표가 된다고 주장하였다. 즉, 화학적 물질에 의해서 랫드의 간에 암이 유발되는 과정에서, 전암병소의 검색을 위한 두지표인 GST-P와 철 저항능 모두 γ-GTP와 비교한 결과 전암병소의 검색을 위한 전자들이 후자보다 더 민감하고 믿을 만한 지표라고 각각 주장하였다.

따라서 본 연구에서는 전암병소 검색을 위한 지표로써 GST-P 양성병소(GST-P positive lesions)와 철저항 병소(iron-resistant lesions)를 중기 발암성 검색법(8주)으로 비교분석하여, 어느것이 보다 효과적으로 전암병소를 검색하는데 유용한 지표(marker)인가를 알아보았다.

재료 및 방법

실험동물—한국 화학연구소에서 분양받은 5주령 Fi-



Text-Fig. 1. Design of experiment.

scher 344계 숫컷 랫드 48마리를 사용하였다. 1주 동안 실험실환경에 적응시킨 후 6주령(체중 100~110 g)에 실험에 사용하였다. 사육 및 실험기간동안 사육실 환경은 23± 2℃, 상대습도 60± 10%를 유지하였고, 자연채광에서 랫드용 케이지(polycarbonate, 26×24×18, 명진기계제작)에 4마리씩 넣어서 사육하였으며, 실험동물용 사료(제일사료)와 식수는 충분히 급여하였다.

실험설계 및 시험물질 투여—실험동물은 각 군 12마리씩 4군으로 나누어 배치하였으며(Text-Fig. 1), 제 1, 2, 3군에 시험개시일에 간암 유발물질(initiator)인 diethylnitrosamine(DENA, Sigma)을 생리적 식염수에 용해시켜 체중 Kg당 200 mg씩 복강내로 투여하였으며,[16,34] 제 4군은 생리식염수만을 복강내로 투여하였다.

제 1군에는 시험개시 제 2주부터 6주까지 2-acetylaminofluorene(2-AAF)이 0.02%가 되도록 사료에 혼합하여 급여하고, iron dextran(Sigma)을 부검하기 2주전부터 시험종료시까지 주 3회 서혜부에 피하로 체중 100 g당 0.125 ml(100 mg of elemental iron/kg)을 투여하였다.

제 2군에는 시험개시 제 2주부터 제 6주까지 4주일동안 2-AAF가 0.02% 되도록 사료에 혼합하여 급여하고, 그 후 시험종료일까지 basal diet만 급여하여 제 1군의 철투여에 대한 대조군으로 하였다.

제 3군은 시험종료일까지 전 기간동안 기초 사료만을 급여하였고, 시험개시 제 6주부터 시험종료시까지 2주동안 주 3회 iron dextran을 투여하였다.

제 4군은 대조군으로 제 3군과 마찬가지로 시험종료까지 기초사료만을 급여하였다.

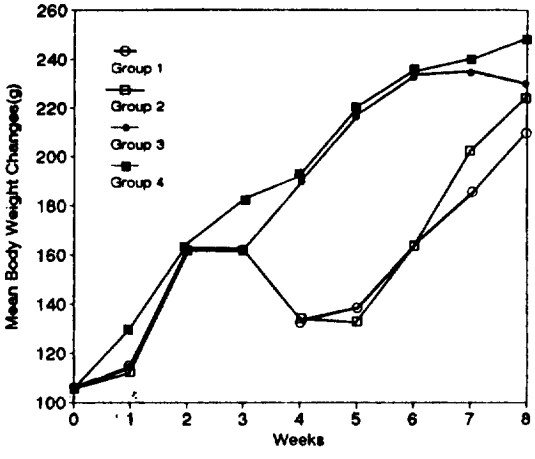
시험개시(DENA와 saline투여) 3주후에 간변화의 증폭을 위하여 모든 랫드에서 간의 약 2/3(67%, 좌우 중심엽 및 좌측외엽)를 절제하였다.[12,13] 시험개시 8주후에 모든 랫드를 부검하였다.

장기의 처리—시험종료 하루전에 모든 군의 동물을 절식시켰으며, 체중을 측정한 후 부검하여 간을 적출하고, 간의 무게를 측정하여 체중에 대한 간의 무게비를 계산하였다.

광학 현미경 관찰—철에 대한 반응과 GST-P 효소의 활성에 대한 반응을 비교하기 위하여 간의 우측외엽의 중앙을 잘라 한쪽은 냉 아세톤(cold acetone)에 고정하여 파라핀 블럭을 만든 후 단면에서 가장 가까운 부위를 6 μm 두께의 조직절편을 만들어 전암병소(preneoplastic lesions)의 지표효소인 glutathione S-transferase placental form(GST-P) 양성 병소에 대한 면역 조직학적 염색을 하였고, 다른 한쪽은 냉 알콜(cold absolute ethanol)에 고정한 후 단면에서 가장 가까운 부위를 6 μm 두께의 파라핀 절편으로 만들어 prussian blue 염색에 의하여 철을 염색하였으며, 대조관찰을 위해서 간 부분절제 후 남은 우측외엽(right lateral lobe) 및 미상엽(caudate lobe)에서 2~3 mm 두께로 간 조직을 채취하여 일부는 10% phosphate buffered formalin에 고정한 후 일반적인 파라핀 절편을 만들어 hematoxylin 및 eosin 염색을 하여 병변을 관찰하였다. 병소의 수와 면적은 칼라 화상분석기(color image analyzer, Q520, Cambridge)를 이용하여 간조직의 직경 2 mm 이상의 GST-P 양성 및 철 저항 foci와 nodules의 수와 면적을 1 cm^2 당으로 계산하였다.[43]

본 논문에서 foci는 주위의 정상조직을 압박하지 않으면서 foci 주위에 결합조직이 형성되지 않아 경계가 불확실한 병소를 말하여, nodule은 주위의 정상조직을 압박하며 병소의 주위에 결합조직이 형성되어 주위의 정상조직과 한계가 확실하게 구별이 되는 병소를 말한다.[42]

면역 조직화학적 염색—간 조직내의 GST-P 양성



Text-Fig. 2. Mean body weight changes.

foci와 nodules의 분포를 확인하기 위해서 avidin biotin peroxidase complex(ABC)법을 이용하여 염색을 하였다(Ogiso 등, 1985). Rabbit-anti-GST-P antibody(1차 항체)는 나고야 시립대학 의학부로부터 공급받았으며, 0.01 M phophate buffered saline으로 항체를 10배 희석한 후 bovine serum albumin이 1%가 되도록 첨가하여 냉장보관 하면서 사용하였다. Biotin-labeled goat anti-rabbit IgG(2차 항체)와 ABC(Vectastain Elite ABC kit, PK 6101, Vector Laboratories)를 사용하였다. 파라핀 조직절편의 파라핀을 xylene으로 제거하고, 단계적 알콜과정을 거쳐, moisture chamber에서 비 특이 반응을 줄이기 위해 정상 goat 혈청(1 : 5희석 ; 0.01 M, PBS, pH 7.4)으로 blocking시켰고, rabbit anti-GST-P-antibody(1 : 6000희석), biotin labled goat anti-rabbit IgG(1 : 4000희석), avidin biotin peroxidase complex(ABC) 처리과정을 거쳐, H_2O_2 0.02% diaminobenzidine(0.2 M tris buffer, pH 7.6)에 incubation 시켜 정색반응을 일으킨 후 hematoxylin으로 핵을 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

철 염색—간 조직내의 철 저항 foci와 nodules의 분포를 확인하기 위해서 Perl's법을 이용하여 염색을 하였다. 즉, 조직절편의 파라핀을 xylene으로 제거하고 단계적 알콜과정을 거쳐 실온에서 45분간 2% potassium ferrocyanide와 2% 염산을 동량 혼합한 용액에서 반응시킨 후 safranine으로 핵을 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.[8]

자료의 통계처리—시험결과치는 two-tailed t-test를 이용하여 대조값과 비교, 분석하였다. 전 항목에 대하여 공히 5%($p<0.05$), 1%($p<0.01$) 및 0.1%($p<0.001$)의 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

체중변화—간암 유발물질인 DENA를 투여한 후 제 1, 2, 3군의 체중이 서서히 증가하다가 1주후부터 빠르게 증가하기 시작하였고, saline을 투여한 제 4군은 계속적으로 체중이 증가하였다(Text-Fig. 2).

DENA 투여후 2-AAF를 급여한 제 1군과 제 2군은 체중의 증가를 거의 보이지 않다가 67% 간부분절제를 실시한 시기인 시험개시 제 3주후부터 현저하게 체중감소를 보이다가 제 4주째부터 회복되었다. 그러나 2-AAF를 급여하지 않은 제 3군과 대조군인 제 4군은 같은 기간에 체중의 감소를 확인할 수 없었다(Text-Fig. 2).

간의 무게비—체중에 대한 간의 무게비에 있어서 발암촉진 물질인 2-AAF(0.02%)를 급여한 제 1군 및 제 2군이 제 3군과 제 4군에 비하여 둘다 현저하게 높았다($p<0.001$). 철을 투여한 제 1군과 투여하지 않은 제 2군간의 유의성은 인정되지 않았다(Table 1).

육안 및 광학 현미경 소견—간암 유발물질인 DENA를 투여한 후 발암촉진 물질인 2-AAF를 급여한 제 1군과

Table 1. Final Body Weight and Liver/Body Weight Ratio

Group	Final liver weight(g)	Final B.W. (g)	Liver/B.W. ratio (%)
Group 1	16.15± 1.50***	210.39± 5.27	7.67± 0.63***
Group 2	16.02± 2.58***	225.19± 15.77	7.09± 0.81***
Group 3	9.14± 1.02	229.36± 17.47	3.98± 0.22
Group 4	10.12± 2.01	245.24± 20.12	3.78± 0.14

value: mean± SD, B.W.: body weight
***: Significantly different from group 3 and group 4 ($p<0.001$)

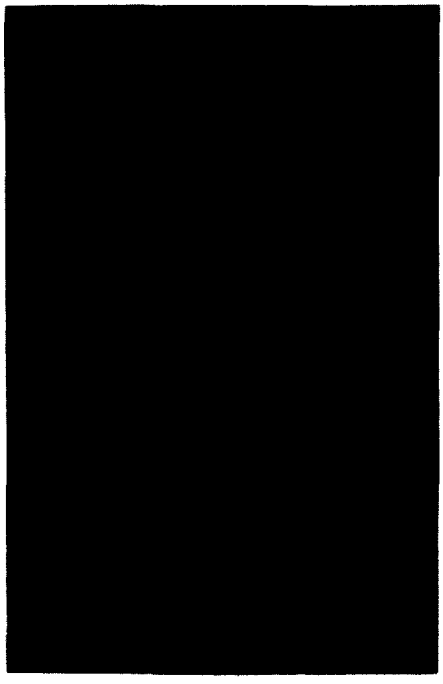


Fig. 1. GST-P positive hyperplastic nodules induced by diethylnitrosamine (DENA) as an initiator and promoted by 2-acetylaminofluorene (2-AAF) for 4 weeks in partially hepatectomized rat. Avidine-biotin complex (ABC) ×40.

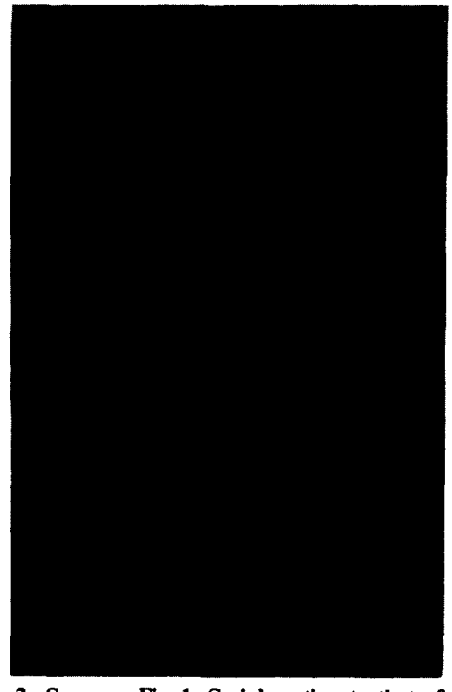


Fig. 2. Same as Fig. 1. Serial section to that of Fig. 1. H & E ×40.

제 2군의 전개체의 간표면에서 많은 수의 회백색 증식결절(hyperplastic nodule)을 육안으로 확인할 수 있었고, 직경 2~3 mm 크기의 결절에 의해 간표면이 매끄럽지 않게 관찰되었다(Fig. 8).

철을 투여한 제 1군의 간장은 제 2군에 비하여 암적색을 띄고 있었고, 전 개체의 간엽의 변연부는 둔탁하였으며, 전체적으로 종창된 감을 보였다. 제 3군과 대조군인 제 4군의 간장의 표면에서는 별다른 증식소견을 확인할 수 없었다.

제 1군과 제 2군에서 확인된 GST-P 양성병소(GST-P positive lesions)와 철저한 병소(iron-resistant lesions)의 광학 현미경적 소견을 각각 H & E 염색에 의한 병소와 비교한 결과, GST-P 양성 nodules는 주위정상조직과 한계가 뚜렷한 원형으로 nodules의 크기가 다양하게 나타났으며, 간 전체에 다발적으로 산재해 있는 것이 관찰되었고, 이러한 병소를 연속절편에 의하여 같은 증식결절에 대하여 H & E 염색상과 비교해 볼 때, H & E 염색보다 훨씬 한계가 뚜렷하고 명확하여 검색이 용이하였다 (Fig. 1, 2).

철 저항 nodules 내의 간세포들은 대부분 철을 함유하지 않는 것이 관찰되었으나 완전히 철을 배척하는 것이 아니라, nodules내 곳곳에서 철이 염색되고 있는 것을 관찰할 수 있었고 주위의 정상조직과는 어느 정도 한계를 구분할 수 있었다(Fig. 3, 4). 결절보다 더 작은 병소인 전암성 foci에서, GST-P 양성 foci는 정상조직과의 한계를 명확히 구분할 수 있었으나, 철 저항 foci는 한계를 명확히 구분할 수 없었고, 구분이 가능한 foci인 경우에도 H & E 염색에 의한 foci와 비슷한 정도로 주위의 정상조직과 겨우 구분할 수 있었다(Fig. 5, 6, 7).

증식결절 및 증식소의 수와 면적—각 실험군의 간조직 1 cm^2당 증식 결절 및 증식소의 수와 면적(mm^2)은 Table 2와 같다.

DENA 투여후 2-AAF와 철을 투여한 제 1군 및 철을 투여하지 않은 제 2군과 DENA만을 투여한 제 3군간의 전암병소의 면적에 있어서 유의차가 인정되었다($p<0.001$). 전암병소의 수는 제 3군과 제 1, 2군을 비교하였을 때 면적과는 상반되게 대조군이 오히려 수가 크거나 거의 비슷한 결과로 나타났다

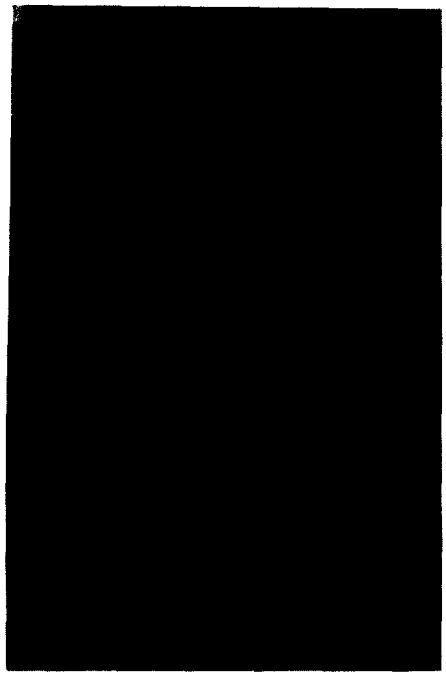


Fig. 3. Iron-resistant hyperplastic nodules induced by DENA and promoted by 2-AAF in partially hepatectomized rat. Prussian blue ×40.

Fig. 4. Same as Fig. 3. Serial scetion to that of Fig. 3. H & E ×40.

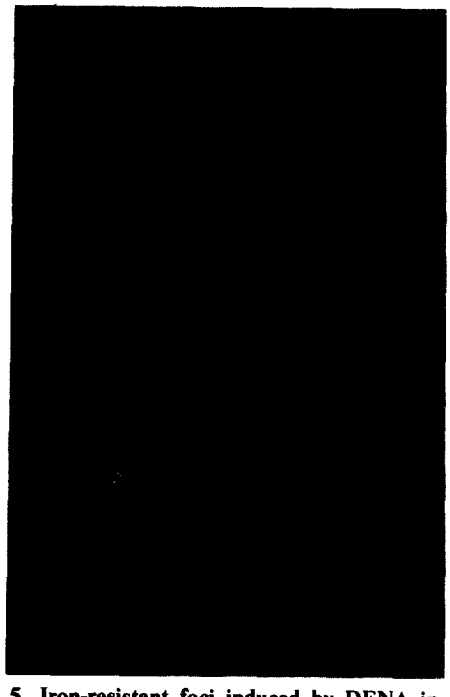


Fig. 5. Iron-resistant foci induced by DENA in partially hepatectomized rat. Prussian blue ×40.

Fig. 6. Same as Fig. 5. Serial section to that of Fig. 5. H & E ×40.

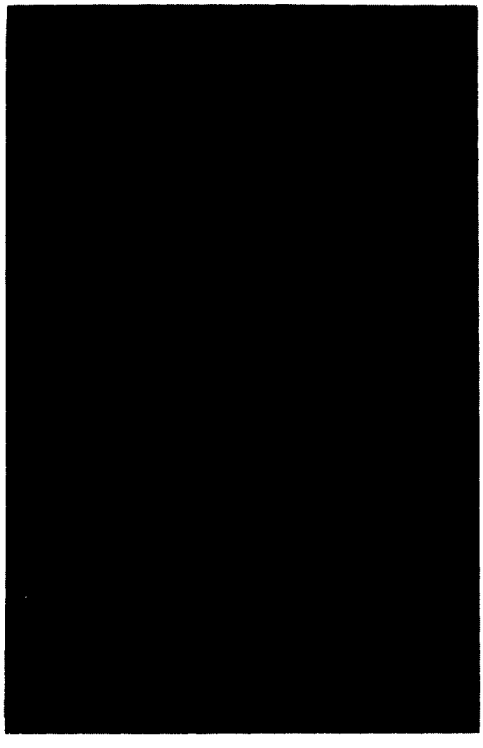


Fig. 7. GST-P positive foci induced by DENA in partially hepatectomized rat. ABC ×40.

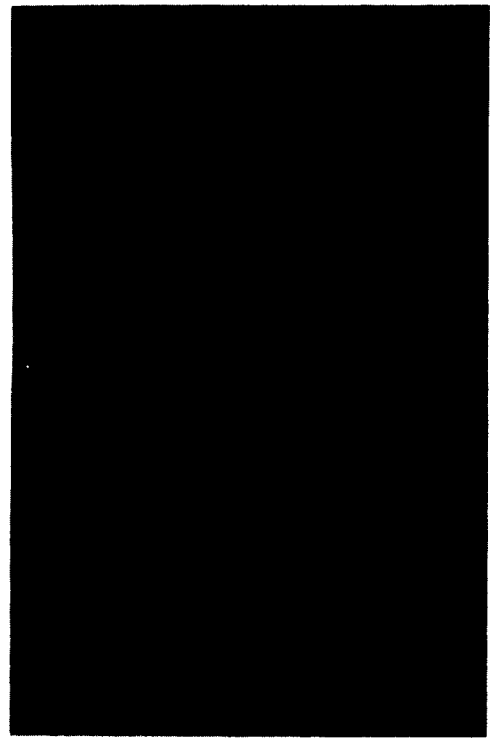


Fig. 8. Gross finding of multiple hyperplastic nodules. DENA and 2-AAF treatment in partially hepatectomized rat.

Table 2 Number and Total Area of Glutathione S-Transferase Placental Form Positive and Iron-resistant Foci, and Nodules in Rat Liver

Group & Treatment	No. of rat		Total area (m^2/cm^2) of GST-P foci and nodules		Total area (mm^2/cm^2)of iron-resistant foci and nodules	
	initial	final	No/cm^2	area(mm^2/cm^2)	No/cm^2	area(mm^2/cm^2)
Group 1						
DENA→2-AFF			9.54	60.5***	11.77	48.15*
+iron dextran	12	8	± 4.58	± 6.09	± 4.69	± 10.8***
Group 2			13.22	53.89***		
DENA→2-AAF	12	8	± 4.28	± 12.51	—	—
Group 3			11.66	0.9	0.72	0.52**
DENA→basal diet	12	12	± 4.19	± 0.32	± 4.31	± 0.11
+iron dextran						
Group 4						
Saline→basal diet	12	12	–	–	–	–

Each value is the mean± SD.
* : Significantly different from GST-P positive lesoin of group 1 ($p<0.05$).
** : Significantly different from GST-P positive lesion of group 2 ($p<0.01$).
***: Significantly different from group 3 ($p<0.001$).

(Table 2). 이러한 결과는 제 1, 2군의 병소들이 서로 융합되어서 병소의 면적은 커졌으나 병소의 수가 대조군에 비해 적게 나타날 수 있으므로 병소의 수는 큰 의미가 없어 유의성 검정을 하지 않았다.

철을 투여한 제 1군과 철을 투여하지 않은 제 2군 간에는 증식결절의 면적에 있어서 유의성이 인정이 되지않아 철투여에 의한 전암병소의 증폭효과가 없는 것으로 인정이 된다(Table 2). 제 1군에서 철염색과 GST-P에 대한 염색을 위한 고정법이 서로 달라 같은 병소에 대한 연속 절편을 만들어 비교할 수는 없었으나, 각각의 연속절편에 의해서 H & E 염색을 하여, 각 병소에 대하여 두 가지 염색법의 민감성을 H & E 염색과 비교함으로써, 철저항 병소와 GST-P양성 병소를 간접적으로 비교하였을때 GST-P 양성 병소가 철저항 병소보다 더 확실하게 병변이 염색 되었다 (Fig. 1, 2, 3, 4, 5 and 6). 제 1군에서 간엽전체의 전암성 nodules의 면적을 비교해 볼 때, GST-P 양성 nodules은 철 저항 nodules에 비하여 nodules의 총 면적이 유의성 있게 높게 나타났다($p<0.05$).

제 3군에서도 GST-P 염색에 비하여 철염색에 의해 검색된 전암성 foci의 면적이 유의성 있게 낮았으며 ($p<0.01$)(Table 2), 대조군인 제 4군에서는 앞의 두가지 조직염색 방법에 의해 전암병소라고 인정할 수 있는 어떠한 병소도 관찰할 수 없었다.

고 찰

종양은 여러 단계를 거쳐서 발생한다는 이론이 인정되어 왔고, 이러한 이론에 기초를 두어 화학물질로 암을 유발시키는 많은 연구가 이루어진 결과로 다단계모델이 개발되었다.

다단계 이론에 관하여 학자에 따라 약간씩 견해의 차이를 보이고 있는데 유발(initiation)과 촉진(promotion)과정을 거쳐 암이 발생한다는 2단계 이론[9,31]과 암유발 이후에 암으로 진행되는 모든 과정을 진행과정(progression)으로 보는 견해이다.[10] 그러나 지금은 2단계 개념(two-stage concept)과 종양으로의 진행단계의 개념을 결합해서, 유발, 촉진 및 진행과정을 포괄하는 3단계 과정이 종양의 발생을 설명하는데 있어서 일반적으로 인정되고 있다. 유발이라함은 발암물질이 유전자에 작용하여 구조의 변화를 이르키는 비가역적 진행과정이고, 촉진과정은 유발단계 후에 좀더 오랜 기간동안 직접 유전자에 작용하지 않고 유발된 변이 세포의 발현을 도우면서, 이들 세포군들이 가역적으로 팽창·증식하도록 하는 과정이며, 진행단계는 유발, 촉진된 세포군이 악성종양으로 자율적으로 발달해 나가는 비 가역적인 과정이다.[28]

한편, 간장은 생체로 들어온 많은 화학물질들을 여러 대사작용을 통하여 생체외로 배설이 가능한 물질로 바꾸어 주는 중요한 기관으로써 이러한 기능에 알맞게 많은 효소들을 가지고 있다. 이들 효소들 중 약물대사계 효소가 중요한 역할을 하는데, 간의 전암병소와 관련하여 증감하는 것으로 알려져 있다.[9]

일반적으로 약물대사계효소는 제 1상(phase 1)과 제 2상(phase 2)으로 나누어지는데, 제 1상은 산화(수산화)반응이나 환원반응에 의하여 약물의 활성에 관계된 효소(활성화효소)들이 관여하고, 제 2상은 결합반응(conjugation)에 관계된 효소(불활성화 효소 또는 해독효소)들이 관여하는데, 이들 효소들 중에는 유산결합(lactic acid conjugation)이나 glutathione 결합반응으로 움직일 때도 있다.[41]

간장의 전암병소에서는 일반적으로 제 1상의 효소는 감소되는데, 여기에 속하는 효소 중 전암병소를 검색하기 위한 것으로 glucose-6-phosphatase, tryptopan oxygenase, adenosine triphosphatase 등이 있고, 제 2상의 효소는 증가되어 발암물질을 빨리 배출하는데 관여하며, 지표로써 이용될 수 있는 효소로는 epoxide hydrolase, γ-GTP, GST 등이 있다.[32]

특히, γ-GTP와 GST-P 효소는 생체내 환원물질에 대해 극히 중요한 일을 하고 있다. 약물대사계 중에서도 중요한 glutathione 결합반응은 각종의 약물투여시 발생하는 활성산소로 인하여 생기는 발암과 연관해서 중시되고 있는 지방과산화물의 제거에 관여한다.[2]

따라서 glutathione 대사계 효소는 화학적 발암과정에서 중시되며, 전암 지표효소로서 관심이 집중되어 많이 활용되고 있다. γ-GTP는 아미노산의 재흡수에 관여한다고 믿어지고 있으나, 약물의 중요한 해독경로의 하나인 mercapturic acid 생성경로에서 GST에 의한 glutathione 결합체에서 γ-glutamyl기를 전이 시키므로 이 효소도 약물대사계 효소로 볼 수 있다.[41] γ-GTP는 정상 간세포에는 거의 존재하지 않으나, 화학적 발암과정의 전암병소

에서 선명하게 발현이 된다.[3] 그러나 γ-GTP는 항산화제인 butylated hydroxyanisde(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT) 및 ethionine을 투여시에는 전암병소와 무관하게 유도되어 전암병소 판별이 곤란하므로 특이성이 문제가 되고 있다.[32]

GST 효소 중 본 논문에서 전암병변 검색을 위한 지표효소로 이용한 GST-P(태반형) 효소는 DENA를 투여하고 2-AAF를 4주간 급여한 제 1군에서는 물론 DENA만을 투여한 제 3군의 전암병소에서 선명하게 발현되는 것이 면역조직화학적 방법으로 증명이 되었다. 또한, GST-P는 γ-GTP로 발암성을 검색하기 어려웠던 항산화제인 BHT, BHA, ethionine 등의 물질투여시에도 비특이적 반응이 약하기 때문에 전암병소를 검출하는데 적합하다.[19]

또한, 전암병소 검색을 위한 지표에는 이러한 효소와는 다르게, Williams와 Yamamoto[40]가 보고한 철 저항능이 있다. 본 논문에서도 화학적으로 간암을 유발시킨 후 철을 과도하게 투여한 결과 주위의 정상 간세포에는 철이 축적된 반면에 전암병소에서는 철이 축적되지 않았으나, 완전하게 철축적에 저항하지 않고 병소의 여러 곳에서 철이 염색되고 있는 것이 관찰되었으며, 병소내의 Kupffer's cell은 많은 철을 함유하고 있었다. 이러한 병소에서 철이 축적되지 않는 원인으로는 간장에서 철을 저장하는 단백질인 ferritin과 관련지어 생각할 수 있는데 전암병소에서 ferritin이 감소하는 경우나 구조상으로 변형이 되어 ferritin 자체가 철을 함유할 수 없는 경우의 두 가지로 생각해 볼 수 있다. 그런데 ferritin이 감소하기 때문인 것 보다는 구조상의 변화에 의한 것으로 생각되는데 정상 간세포와 전암성 병소사이의 ferritin의 정량적, 정성적 차이에 대하여는 더 많은 연구가 필요하다.[21,30]

Rao 등[29]이 peroxisome proliferator에 의해 유도된 전암병소를 판별하는데 철저항능이 간세포 암종으로 진행될수록 더욱 확실히 나타난다고 주장하였다. 본 시험에서 두 지표를 이용한 전암병소의 검색에서 철 저항 병소의 면적이 GST-P 양성병소의 면적에 비하여 종양성 foci에서는 약 57%, 종양성 nodules에서 79.5%정도로 적게 검색되어 Rao 등이 주장한 것과 비슷한 결과를 얻어 전암병소 검색을 위한 지표로 철 저항능은 GST-P에 비하여 불완전한 것으로 생각된다.

본 실험에서 전암병소 검색을 위한 지표중의 하나인 철 저항능은 전암성 foci에서 보다는 전암성 nodules이상의 병소를 어느정도 검색할 수 있는 것으로 생각되지만 발암성이 미약한 물질의 검색이나 단기간에 발암물질을 검색하기 위한 지표로 적합하지 않은 것으로 생각된다. 즉, 철 저항병소와 GST-P양성 병소의 면적을 비교 하였을때, 철 저항병소가 유의성 있게 낮게 나타났고, 또한 DENA로 암을 유발한 후 2-AAF로 발암촉진을 하여 철을 투여한 제 1군의 전암성 nodules에서는 비록 완전히 철을 배척하고 있지는 않았지만 주위의 정상조직과 한계가 확실하게 구별이 되고있는 것에 반하여, DENA로 암을 유발한 후 부검하기 2주전에 철을 투여한 제 3군에서는 주위 정상조직과 한계를 명확히 구별할 수 있는 foci를 관찰하기가 쉽지 않았고, 관찰되어진 foci일지라도 H & E 염색으로 구별할 수 있는 정도와 비슷한 수준이었다. 그러나 GST-P 양성병소는 제 1군 뿐만 아니라 제 3군에서도 주위 정상조직과 확실하게 구별이 되고있어 철 저항 병소나 H & E 염색에서 나타나는 병소와는 비교되지 않을 정도로 병소를 검색하기가 용이하였다.

이상의 결과를 종합해보면 대부분의 발암물질에 의하여 유도된 병소를 검색하기위한 지표로 GST-P 양성병소가 철 저항병소보다 더 민감하고 믿을만한 지표가 됨을 알 수 있었으며, 철 염색에 의하여 병소를 검색할 수 있는 시기보다 훨씬 빠른 시기에 전암병소를 검색할 수 있다고 사료된다.

결 론

화학물질에 의해 발생된 랫드의 간에서 전암병소(preneoplastic lesions)를 검색하기 위한 지표(marker)로써 glutathione S-transferase placental form (GST-P)과 철 저항능(iron-resistant activity)을 비교해 봄으로써 철 저항능이 전암병소 검색을 위해 유용한 지표가 되는지 알아보았으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 철을 투여한 제 1군과 철을 투여하지 않은 제 2군간에는 증식결절의 면적에 있어서 유의성이 인정되지 않았다.

2. 제 1군에서 간엽전체의 전암성 nodules에 대한 면적을 비교한 결과, 철 저항 nodules의 총 면적이

GST-P양성 nodules의 면적보다 유의성 있게 낮았고 ($p<0.05$), 제 3군에서도 GST-P양성 foci에 비하여 철 저항 foci에 의한 면적이 유의성 있게 낮았다($p<0.01$).

3. 제 3군에서 철염색에 의해 검색된 전암성 foci는 H & E 염색으로 검색한 전암성 foci와 비슷하였으며, 주위의 정상조직과 한계가 명확하지 않기 때문에 병소의 검색이 어려웠으나, GST-P양성 foci (GST-P positive foci)는 이러한 작은 foci일지라도 주위의 정상조직과 한계가 명확하여 전암성 foci의 검색이 용이하였다.

국문요약

생후 6주령된 Fischer 344 랫드를 4개군으로 나누어 시험개시일에 diethylnitrosamine을 제 1, 2, 3군에 복강내로 각각 체중 kg당 200 mg을 1회 주사하였고, 제 4군에는 생리적 식염수를 복강내로 1회 투여하였으며, 간 변화의 증폭을 위해 시험개시 3주후에 간의 약 67%를 부분절제 하였다. 제 1, 2군은 시험개시 후 제 2주부터 2-acetylaminofluorene(2-AAF)를 사료에 0.02%가 되게 섞어 4주간 투여하였고, 제 3군과 대조군인 제 4군에는 기초사료만을 급여하였다. 제 1, 3군은 철 저항병소의 검색을 위하여 시험종료 2주전에 iron dextran을 체중 100g당 0.125 mg을 주 3회 피하로 투여하였고, 시험종료 후에 모든 랫드를 부검하여, 고정제로 고정한 후 일반적인 조직표본을 만들었다. 전암병소 검색을 위해 glutathion S-transferase placental form(GST-P)에 대한 면역조직화화적 염색과 Perl's법에 의한 철염색을 한 후, 동일한 조직을 연속절편하여 hematoxylin & eosin 염색한 것과 비교하였고, 칼라 화상분석기로 병소의 면적을 계산하여 통계학적 분석을 하였다.

본 연구의 결과는 철 저항 nodule이 주위의 정상조직과 한계가 어느정도 구별되어 병변을 검색할 수 있었으나 GST-P양성 nodule에 비하여 확실하지 않았고, 또한 철저항 foci는 주위의 정상조직과 한계가 명확하지 않아 검색이 쉽지 않았던 반면에, GST-P양성 nodule은 물론 foci와 같은 작은 병소까지도 주위의 정상조직과 명확하게 구별할 수 있었다. 간엽 전체에 대한 병소의 면적비교는 철 저항병소의 면적이 GST-P양성 병소의 면적보다 유의성 있게 낮았다($p<0.01$). 따라서 전암병소를 검색하는데는 GST-P양성 병소에 의한 검색이 철 저항병소에 의한 검색보다 더 민감하고 믿을만한 지표가 되는 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Ames, B.N.: Identifying environmental chemicals causing mutation and cancer, *Science,* **204**, 587 (1979).
2. Ames, B.N.: Dietary carcinogens and anticarcinogens, *Science,* **221**, 1256(1983).
3. Bannasch, P.: Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. I. Hepatic neoplasia, *Carcinogenesis,* 7, 689(1986).
4. Bridges, B.A.: Short term screening tests for carcinogens, *Nature,* **261**, 195(1976).
5. Carmeron, R.G., Imaida, K. and Ito, N.: Promotive effects of ethynylestradiol in hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine in male rats, *Gann,* 72, 339(1981a).
6. Cameron, R.G., Imaida, K., and Ito, N.: Promotive effects of deoxycholic acids on hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine in male rats, *Gann,* 72, 635(1981b).
7. Cameron, R.G., Imaida, K., Tsuda, H. and Ito, N.: Promotive effcts of steroids and bile acids on hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine, *Cancer Res.,* **42**, 2426(1982).
8. Erwin H.: 50 Diagnostic special stains for surgical pathology, Philadelphia, Lippincott Co., 1980.
9. Farber, E.: Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemical: G.H.A. Clowes memorial lecture, *Cancer Res.,* **44**, 5463 (1984).
10. Foulds, L.: The experimental study of tumor progression: a review, *Cancer Res.,* **14**, 327(1954).
11. Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F. O., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vieggaar, R., and Kriek, N.P.J.: Fumonisins-Novel mycotoxin with cancer-promoting activity produced by Fusarium moniliforme, *Appl. Environ. Microbiol.,* **54**, 1806 (1988).
12. Hasegawa, R., Tsuda, H., Shirai, T., Kurata, Y., Masuda, A., and Ito, N.:Effect of timing of partial

hepatectomy on the induction of preneoplastic liver foci in rats given hepatocarcinogen, *Cancer letters*, **32**, 15(1986).
13. Higgins, G.M. and Anderson, R.M.: Experimental pathology of the liver; I. Restoration of the white rat following partial surgical removal, *Arch. Pathol.*, **12**, 186(1931).
14. Hirota, N. and Williams, G.M.: The sensitivity and heterogenicity of histochemical markers for altered foci involved in liver carcinogenesis, *Am. J. Pathol.*, **95**, 317(1979).
15. Ito, N., Tatematsu, M., Imaida, K., Hasegawa, R., and Murasaki, G.: Effects of various promoters on the induction of hyperplastic nodules in rat liver, *Gann*, **71**, 415(1980a).
16. Ito., Tatematsu, M., Imaida, K., Hasegawa, R., and Ogiso, T.: The effects of various chemicals on the development of hyperplastic liver nodules in the hepatectomized rats treated wilth N-nitrosodiethylamine or N-2-acetaminofluorene, *Gann*, **71**, 832(1980b).
17. Ito, N., Inoue, T., Tagawa, Y., Aoki, T. and Kagawa, M.: Development of new rapid bioassay for carcinogens to predict the results of long term carcinogenesity test, *Toxicol. Forum*, **9**, 601(1986).
18. Ito, N., Tsuda, H., Hasegawa, R., Tatematsu, M., Imaida, K., and Asamoto, M.: Medium-term bioassay models for environmental carcinogens Two-step liver and multi-organ carcinogenesis protocols, *Korean J. Lab. Ani. Sci.*, **4**, 65(1988a).
19. Ito, N., Tsuda, H., Tatematsu, M., Inoue T., Tagaura, Y., Aoki T., Uwagawa, S., Ogiso, T., Tsuneo, M., Imaida, K., Fukushima, S., and Asamato, M.:Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats an approach for a new medum-term bioassay system, *Carcinogenesis*, **9**, 387(1988b).
20. Kathleen, C., Cater, A., Gandolfi, J., and Glenn S. I.: Characterization of diethylnitrosamine-induced focal and nodular lesions in the liver of newborn mice, *Toxicol. Pathol.*, **12**, 13(1985).
21. Linder, M., Munro, H.N., and Morris, P.: Rat ferritin isoproteins and their response to iron administration in a series of hepatic tumors and in normal and regenerating liver, *Cancer Res.*, **30**, 2231-2239(1970).
22. Marx, J.L.: Tumor promoters: Carcinogenesis gets more complicated, *Science*, **201**, 515-518(1978).
23. Miller, J.A. and Miller, E.C.: Carcinogens occuring naturally in foods, *Federation Proc.*, **35**, 1316-1321 (1976).
24. Moore, M.A., Nakamura, T., and Ito, N.: Immunohistochemically demonstrated glucose-6-phosphate dehydrogenase, γ-glutamyl transpeptidase, ornithine decarboxylase and glutathione S-transferase enzymes: abscence of direct correlation with cell proliferation in rat liver putative preneoplastic lesions, *Carcinogenesis*, **7**, 1419-1424 (1986).
25. Ogiso, T., Tatematsu, M., Tamano, S., Tsuda, H., and Ito, N.: Comparative effects of carcinogen on the induction of glutathione S-transferase positive liver nodule in a shorterm assay and of hepato cellular carcinogens in a long term assay, *Toxicol. Pathol.*, **13**, 257-265(1985).
26. Pitot, H.C., Barsness, L., Goldsworthy, T., and Kitahara T.: Biochemical characterization of stages of hepatocarcinogenesis after single dose of diethylnitrosamine, *Nature*, **271**, 456-458(1978).
27. Pitot, H.C.: Biological and enzymatic events in chemical carcinogenesis, *Ann. Rev. Med.*, **30**, 25-39 (1979).
28. Pitot, H.C.:Progression: The terminal stages in carinogenesis, *Gann*, **80**, 599-607 (1989).
29. Rao, M.S., Subbarao, V., and Reddy, J.K.: Increased resistance of peroxisome proliferator induced hepatic lesions to iron overload in rats, *Cancer Letters*, **32**, 33-39 (1986).
30. Richter, G.W. and Lee J.C.K: A study of two types of ferritin from rat hepatomas, *Cancer Res.*, **30**, 880-888 (1970).
31. Rolf, S.H.: Irene, T.T., Gertrud, B., and Wilfried B.: DNA synthsis, apoptosis and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion, *Cancer Res.*, **50**, 5127-5135 (1990).
32. Sato, K.: Tumor markers with special reference to marker enzymes for chemical hepatocarcinogenesis, *Toxicol. Forum*, **10**, 55-64 (1987)
33. Scherer, E., Hoffmann, M., Emmelot, P., and Friedrich-Freksa, M.:Quantitative study on foci of altered liver cells induced by diethylnitrosamine and partial hepatectomy, *J. Natl. Cancer Inst.*, **49**, 93-106 (1972).
34. Solt, D. and Farber, E.: New principle for the analysis of chemical carcinogenesis, *Nature*, **263**,

701-703 (1976).
35. Tatematsu, M., Murasaki, G., Nakamishi, K., Miyata, Y., Shinihara, Y., and Ito, N.: Sequential quantitative studies on hyperplastic nodules in the liver of rats treated with carcinogenic chemicals, *Gann,* **70**, 125-130 (1979).
36. Tatematsu, M. Mera, Y., Ito, N., Satoh, K., and Sato, K.: Relative merits of immunohistochemical demonstrations of placental, A, B and C forms of glutathione S-transferase and histochemical demonstration of γ-glutamyl transferase as markers of altered foci during liver carcinogenesis in rats, *Carcinogenesis,* **6**, 1621-1626 (1985).
37. Tatematsu, M., Mera, Y., Inoue, T., Satho, K., Sato, K., and Ito, N.: Stable phenotypic expression of glutathion S-transferase placental type and unstable phenotypic expression of γ-glutamyltransferase in rat liver preneoplastic and neoplstic lesions, *Carcinogenesis,* **9**, 215-220 (1988).
38. Tsuda, H., Masui, T., Imaida, K., Fukshima, S., and Ito, N.: Promotive effect of primary and secondary bile acids on the induction of γ-glutamyltranspeptidase positive liver cell foci as a possible endogenous factor for hepatocarcinogenesis in rats, *Gann,* **75**, 871-875 (1984).
39. Venitt, S.: Bacterial mutation as a indicator of carcinogenicity, *British Med. Bull.,* **36**, 57-62 (1980).
40. Williams, G.M. and Yamamoto, R.S.: Abscence of stainable iron from preneoplastic and neoplastic lesions in rat liver with 8-hydroxy quinoline-induced siderosis, *J. Natl. Cancer Inst.,* **49**, 685-692 (1972).
41. Williams, G.M. and Weisburger, J.H.: Chemical carcinogens. In: Carsarett and Doull's Toxicology. 3rd ed., Klassen, C.D., Amdur, M.O. and Doull, J.(ed), New York, Macmillan, 1986.
42. 김윤배, 이영순: 단기 발암성 검색법으로 본 홍삼의 간 발암 억제효과, 한국독성학회지, **4권**, 159-179 (1988).
43. 김종수, 이영순: 새로운 단기 항암성 스크리닝법에 의한 영지 추출물의 효과에 관한 연구, 한국독성학회지, **5권**, 135-149 (1989).