

## 1, 2-Dimethylhydrazine 투여후 백서 대장점막 변화에 대한 광학 및 전자현미경적 연구

이화여자대학교 의과대학 임상병리과

홍기숙 · 한운섭 · 김옥경

= ABSTRACT =

### The Light and Electron Microscopic Study of Mucosal Changes of Colonic Lesion Induced by 1, 2 - Dimethylhydrazine · 2HCl in the Rats

Ki Sook Hong, M.D., Woon Sup Han, M.D., Ok Kyung Kim, M.D.

*Department of Clinical Pathology, College of Medicine, EWHA WOMANS University*

The fact that the administration of 1,2-dimethylhydrazine 2HCl (DMH) to rats by weekly subcutaneous injections causes the development of epithelial tumors of the large intestine has been known. But the exact processes of early morphologic changes of colonic lesion induced by DMH treatment in the rats have not been fully testified as yet.

The objective of the dissertation research is to examine early morphologic changes of colonic lesion induced by DMH treatment in the rats.

Total seventy cases including 14 control rats of Sprague Dawley male rats were analyzed by histopathologic changes. One is 20mg/kg/wk DMH treated rat group and the other is 40mg/kg/wk DMH treated rat group. DMH was injected s.c. at the start of each treatment weekly during 20 weeks, and the animals were killed at 1, 3, 5, 6, 7, 9, 12, 14, 17 or 20 weeks both in 20mg/kg/wk DMH treated group and in 40mg/kg/wk DMH treated group.

The following results were obtained :

Hyperplasia and mitosis of the crypt are presented in early phase of DMH treatment. Cellular dysplasia, carcinoma in situ, and invasive carcinoma are shown in later phase of DMH treatment. The same changes as the above are also identified in electron microscopic findings. The more doses of DMH are injected to rats, the more evident these findings are presented. The alkaline phosphatase activity in glandular epithelial cells are observed in cellular dysplasia and neoplastic changes. The alkaline phosphatase may be considered as tumor marker.

## 서 론

화학물질은 종양발생의 원인중 중요한 인자로 알려져 있고 특히 실험동물에 화학적 발암물질 투여로 종양발생기전에 대한 연구가 많이 시행되고 있으며, 이러한 화학적 발암물질중 1,2-dimethylhydrazine · 2HCl(DMH)와 연관된 화학물질들은 Laqueur<sup>1</sup>와 Druckrey등<sup>2</sup>의 실험이후 백서<sup>3)4)5)6)</sup>와 마우스<sup>7)8)9)</sup>에서 대장종양을 발생시키는 약물로 이용되어 왔다.

DMH 투여로 유발된 종양에 대한 조직학적 변화과정<sup>6)10)</sup> 및 종양주변점막에 대한 변화<sup>11)12)</sup>에 대해 최근에는 자가방사<sup>13)14)15)16)</sup> 조직화학 및 전자현미경적 방법<sup>17)</sup>을 이용하여 연구가 시행되고 있다. 이러한 연구에서 DMH 투여후 대장점막에서 세포역학의 변화<sup>9)18)</sup>, 대장 소낭선 구조내의 형태적 변화<sup>19)</sup>, 입파세포의 수적증가<sup>20)</sup> 및 점액생성의 변화 등이 나타남을 관찰하였으며 이는 대장암의 전암단계의 변화로 해석할 수 있다고 하였다.

이러한 변화중 가장 중요한 것은 대장 점막상피에 대한 발암물질의 영향으로 초기에는 상피세포의 핵산복제기에 핵산합성이 억제되다가 점차 핵산합성이 증가하며<sup>14)21)</sup>, 증식되는 대장 점막 소낭선에서 핵의 변이를 초래하여 상피세포핵에 급성 독손상을 일으킨다고 하였다. 이러한 대장암 발생 초기에서 DMH로 유발된 핵산합성의 억제에 조직내 효소변화로는 핵산전구물질의 분자합성에 관여하는 hypoxanthine phosphoribosyl transferase의 효소가 감소되는 것을 관찰할 수 있었고 이 때 종양특이의 태아항원의 출현을 보고 하였다.

대장암내 종양표식자로는 carcinoembryonic antigen (CEA) 이 이미 널리 알려져 있으나 CEA 이외에도 대장암에서 alkaline phosphatase가 종양표식자로서의 의의가 있다는 보고가 있으나 연구자에 따라서는 종양과 특별한 관계가 없다는 보고도 있다. CEA와 homoarginine에 민감한 장 alkaline phosphatase를 비교한 바 장 alkaline ph-

osphatase는 대장종양에 그 민감도 및 특이도가 CEA와 유사하여 대장암의 예견 및 진단에 효울적이라는 보고도 있다<sup>22)</sup>. 그러나 대장암의 조직내 alkaline phosphatase의 출현 및 변화는 연구자에 따라 상이한 보고가 있고, 이에 대한 뚜렷한 정설은 없다<sup>23)</sup>. DMH로 유발되는 대장점막 변화에 대한 미세구조의 연구는 적고 일부 연구자에 의하면 점막세포의 기저층에서 개창구 (fenestration) 나타나고 상피세포의 미세구조 변화로는 미분화 소낭선의 미세구조와 유사한 미세구조의 변화를 나타낸다고 하였으나 이에 대한 정확한 기술이 미비한 실정이다<sup>17)</sup>.

저자는 이러한 관점에서 DMH 투여양에 따른 백서 대장점막의 변화를 시기적으로 광학 및 전자현미경으로 관찰하고 종양발생과정에 따른 장내 alkaline phosphatase의 출현 가능성 및 그 의의를 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

## 연구재료 및 방법

### A. 연구재료

연구재료로는 체중이 140g 내외되는 웅성백서 (Sprague Dawley) 70 마리를 실험전 1주동안 시판표준사료로 기초사육한 후 다음과 같은 실험군으로 분류하였다.

제 I 군 (정상대조군) ..... 14마리

제 II 군 (DMH 20 mg / kg / wk 투여군) • 28마리

제 III 군 (DMH 40 mg/kg/wk 투여군) • 28마리

이상의 실험군의 DMH 투여 방법은 1,2-dimethyl hydrazine · 2HCl (Sigma chemical Co.)를 1.5% EDTA를 함유한 0.9% NaCl에 넣어 2% DMH 용액을 만들고, 1% NaOH를 첨가하여 PH 6.5로 맞춘 다음 주 1회씩 대퇴부에 피하주사 하였으며, 대조군에는 1.5% EDTA를 함유한 0.9% NaCl 용액을 같은 부위에 투여 하였다.

이들 실험동물들은 최초 DMH 투여후 1, 3, 5, 6, 7, 9, 12, 14, 17 및 20 주에 도살하고 도살 즉시 직장을 포함한 대장 전부위를 적출 하였다.

## B. 연구방법

### 1) Hematoxylin - eosin (H & E) 염색

대장 조직을 10% 중성 포르마린에 고정한 후 전길이를 "swiss roll" 모양으로 말아서 파라핀에 포매한 후 다음에 열거한 방법으로 관찰 하였다.

#### (1) 대장점막 상피세포 증식

마리당 대장 점막에서 10 개의 소낭선을 선택하여 분석 하였으며, 표층부터 기저층까지 잘 나타난 소낭선에서 상피세포의 수를 세어서 평균을 내고 이때 표준편차를 얻어 통계적 유의성을 검증하였다.

#### (2) 핵분열수

대장점막 소낭선 10 개를 선택하여 핵분열수를 세어서 표준편차를 구하고 차이에 대한 통계적 유의성을 검토 하였다.

#### (3) 세포이형성

세포이형성은 조직학적 역분화정도<sup>24)</sup>의 분류에 따라 경도·중등도·고도의 이형성으로 나누고 상피내암과 침습암을 분류하였다.

### 2) Feulgen 염색

파라핀에 포매한 조직을 박절하여 IN Hcl 용액에 넣어 핵산을 가수분해 시킨다음 Schiff 시약과 반응시켜 홍색의 양성반응을 얻었다<sup>25)</sup>.

양성반응의 판정기준으로는 각 대조군의 점막 소낭선의 핵에 염색된 정도를 경도로 하였고 가장 진하게 염색되는 임파구의 핵을 고도, 그사이를 중등도로 하였으며, 이에 따라 각 실험군의 대장 점막 소낭선의 핵의 염색정도를 분류하였다.

### 3) Alkaline phosphatase 염색

근위부 대장점막 및 병소가 나타난 대장점막을 취하여 동결 박절한 다음 Gomori 씨 방법<sup>26)</sup>에 의한 alkaline phosphatase 염색을 시행하였다.

염색방법으로는 동결박절된 조직편을 0.1M  $\beta$ -glycerophosphate 의 기질용액에 넣어 37°C 에

서 120분간 항온 시켰다. 이때 효소의 가수분해로 유리된 calcium phosphate 를 cobalt 로 치환시키고 1% 유화암모니아수로 처리하여 얻은 흑색 cobalt sulfide 로 alkaline phosphatase 의 활성도를 검색하였다.

#### 4) 전자현미경 소견

전자현미경적 검색을 위해 원위부 대장 및 병소 부위를 1mm 크기로 세절한 다음 2.5% glutaraldehyde 용액에 고정 시켰다. 일차 고정된 조직을 4°C 에서 1% osmium tetroxide 용액에 2시간 재고정한 후 무수 알코홀로 탈수하고 epon 812 에 포매하여 유리칼을 사용 400~500Å 두께로 박절하였다. 이 절편들을 uranyl acetate 와 lead citrate 로 복염색하여 Hitachi Hu-600 형 전자현미경으로 관찰하였다.

## 연구성적

### A. 육안적 소견

#### 1) 제 I 군(정상 대조군)

대장점막의 육안적 소견으로는 맹장에서 점막의 주름양상이 다각도로 주행하며 근위부위의 대장에서는 herring bone 모양의 주름을 나타내고, 원위부위의 대장점막에서는 대장의 장축과 평행되는 주름의 모양을 관찰할 수 있어 대장의 맹장부, 근위부 및 원위부의 구별이 용이하였다. 전실험기간 동안 한 두개 정도의 임파조직 비후만 관찰되었을 뿐 특이한 육안적 점막변화는 없었다.

#### 2) 제 I 군(DMH 20mg/kg/wk 투여군)

DMH 투여 14주에 항문으로부터 3.8, 6.9cm 의 원위부 대장에 각각 0.5×0.4cm, 0.6×0.3cm 의 점막융기가 발생되었고, 17주 투여군에서는 원위부 및 근위부 대장에서 점막에 용종의 종괴를 관찰하였다. 종괴주변의 점막은 정상 대조군에 비하여 점막표면이 불규칙하고 주름이 둔화된 소견을 관찰하였다(Table 1).

#### 3) 제 II 군(DMH 40mg/kg/wk 투여군)

DMH 투여 12주부터 점막융기가 관찰되기 시

작하였으며 약물투여 14주 및 17 주에는 중앙부위가 함몰된 점막용기를 볼 수 있었고, 20주 투여군에서는 용종형의 종괴도 관찰할 수 있었다 (Table 1).

B. 조직학적 소견

1) 대장점막의 상피세포 증식소견

(1) 제 I 군(정상 대조군)

정상 대조군의 대장점막소견을 관찰하면 점막층은 비교적 얇고 소낭선이 대체로 곧으며 소낭선은 표층 1/3~1/2이 주로 흡수세포로 피복되

어 있었고, 심층 1/2~2/3는 배상세포 (goblet cell)를 비롯한 분비세포로 이루어져 있었다.

원위부의 대장점막은 소낭선이 근위부의 소낭선 보다 더욱 곧고 깊으며, 소낭선의 전장에 걸쳐 배상세포가 균일하게 분포하고 있었다(Photo 1).

직장부위의 점막층은 근위부의 대장보다 더 얇고 소낭선의 수도 다른 부위보다 현저하게 적었다.

여러 소낭선에서 세포수를 관찰하여 한개 소낭선당 세포수를 평균해 보면 DMH투여 1주에는 세포수가  $43.5 \pm 5.9$ 개로 나타났고 3주부터 20주까지의 세포수를 비교하여도 비교적 대동소이하여 각주에 따른 유의있는 차이가 없었으며 평균 세포수는 63.3개로 나타났었다(Table 2, Fig. 1)

(2) 제 II 군(DMH 20mg/kg/wk 투여군)

DMH투여 1주에 소낭선의 세포수는  $65.1 \pm 16.7$ 로서 정상 대조군  $43.5 \pm 5.9$ 에 비해 유의하게 증가( $P < 0.05$ )하고 있으며, DMH투여 5주에는  $78.8 \pm 8.5$ 로서 정상 대조군  $65.4 \pm 6.3$ 에 비해 뚜렷한 증가를 나타내었고 DMH투여 1주군보다 다소증가된 세포수를 보였다. 또한 DMH투여 12주에는  $89.7 \pm 13.0$ 으로 정상 대조군의 1.5배 정도 증가된 소견을 보여 주었다(Table 2, Fig. 1, Photo 2). DMH투여 12주 이후에는 12주의 세포수와 대동소이한 세포수를 관찰할 수 있었다.

Table 1. The location and the size of tumor occurring at various weeks with DMH administration

Case No. (Group-week- animal No.)	Location *	Size (cm)	Gross
GIII-12-1	5.0	0.3 × 0.2	elevated
	7.0	0.5 × 0.3	elevated
GIII-12-2	7.0	0.5 × 0.3	elevated
	GII-14-1	3.8	0.5 × 0.4
6.8		0.6 × 0.3	elevated
GIII-14-1	6.5	0.3 × 0.2	depressed
GII-17-1	9.0	0.5 × 0.4	polypoid
	16.0	0.8 × 0.4	elevated flat with central ulcer
GIII-17-1	10.0	0.5 × 0.5	polypoid
GIII-20-2	7.0	0.7 × 0.3	polypoid

\* Cm proximal to the anal verge

Table 2. The average number of glandular epithelial cells in one tubular gland of colonic mucosa during DMH administration

Group	Weeks									
	1	3	5	6	7	9	12	14	17	20
Group I	43.5 *	61.6	62.4	65.4	79.0	60.4	64.0	64.7	70.4	69.0
	± 5.9	± 6.5	± 6.5	± 6.3	± 11.3	± 7.0	± 6.1	± 2.4	± 5.6	± 11.3
Group II	65.1	67.4	85.5	78.8	82.4	83.3	89.7	94.2	88.0	92.3
	± 16.7	± 8.3	± 10.7	± 8.5	± 13.4	± 23.7	± 13.0	± 17.2	± 13.4	± 13.4
Group III	77.5	84.3	76.2	88.4	97.6	94.6	100.4	90.5	109.8	105.4
	± 12.0	± 11.5	± 13.0	± 14.0	± 8.9	± 13.0	± 14.0	± 11.0	± 16.4	± 13.0

\* Mean ± S.D., Group I- II, I- III, II- III ; P < 0.05

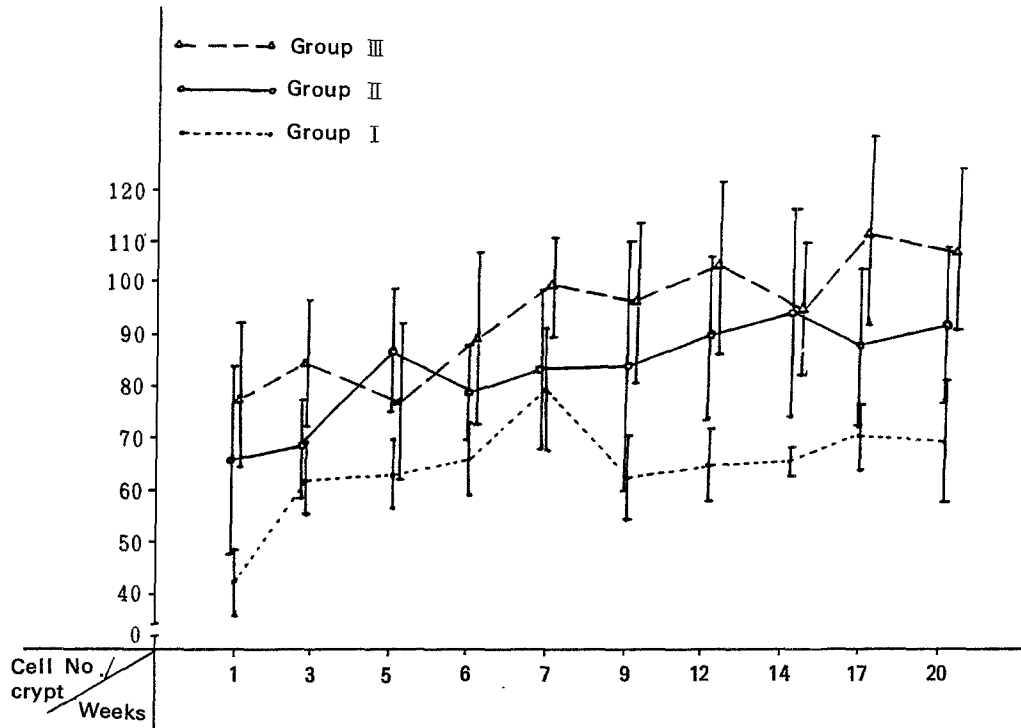


Fig. 1. Changes of the average number of epithelial cells in one tubular gland of colonic mucosa during DMH administration.

Table 3. The average mitotic number in one crypt of colonic mucosal gland during DMH administration

Weeks	1	3	5	6	7	9	12	14	17	20
Group I	0.6* ± 0.6	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.4	1.0 ± 1.0	0.6 ± 0.4	0.5 ± 0.5	0.7 ± 0.7	0.6 ± 0.6	0.4 ± 0.4	0.3 ± 0.4
Group II	0.8 ± 0.8	1.2 ± 1.4	1.9 ± 0.9	1.8 ± 0.8	1.9 ± 1.2	2.0 ± 0.7	2.3 ± 0.6	3.7 ± 2.8	4.0 ± 1.6	4.7 ± 2.3
Group III	0.6 ± 1.2	0.6 ± 0.6	1.0 ± 0.8	1.0 ± 1.1	2.2 ± 1.2	3.3 ± 1.8	3.3 ± 2.1	5.0 ± 1.7	5.1 ± 1.8	4.9 ± 2.1

\* Mean ± S.D., Group I - II, I - III, II - III; P < 0.05

(3) 제 III군(DMH 40mg/kg/wk 투여군)

DMH 투여 1주에 정상 대조군의 1.8배 정도의 세포증식 소견을 보였으며, 투여 기간이 증가하면서 계속 정상 대조군보다 뚜렷한 증가를 나타내었고 같은 DMH 투여군에서도 1주에서 12주까지는 계속 세포수가 증가 되었으나 12주 이후에

는 대동소이한 세포수를 나타내었다(Table 2, Fig. 1).

2) 대장점막의 세포 분열변화

(1) 제 I군(정상 대조군)

소낭성 1개당 세포분열수는 실험 전기간 동안 별 차이가 없었으며 평균하여 한개의 소낭선당 0.5

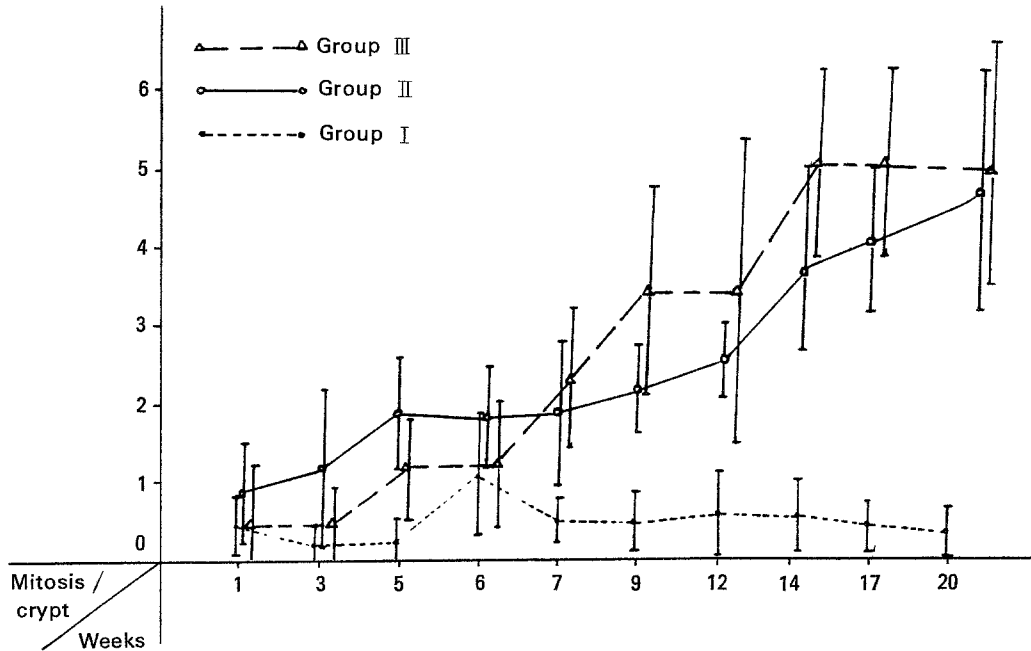


Fig. 2. Changes of the average mitotic number in one crypt of colonic mucosal gland during DMH administration.

개의 세포분열이 관찰되었다(Table 3, Fig. 2).

(2) 제Ⅱ군(DMH 20mg/kg/wk 투여군)

소낭선 1개당 세포분열수는 DMH투여 3주에  $1.2 \pm 1.4$ 로서 정상대조군 0.2보다 유의하게 ( $p < 0.025$ ) 증가하였으며 DMH투여 주수가 증가할수록 현저하게 증가하여 DMH투여 20주에는 1개의 소낭선당 4·7개 정도의 핵분열을 관찰하였다(Table 3, Fig. 2). 또한 실험 1주부터 14주까지는 세포분열이 계속 증가되는 소견을 나타냈고 14주 이후에는 뚜렷한 증가 양상은 없었다.

(3) 제Ⅲ군(DMH 40mg/kg/wk 투여군)

DMH투여 3주부터 세포분열수가  $0.6 \pm 0.6$ 로서 정상 대조군 0.2보다 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 증가하였으며, DMH 20mg/kg투여군의 증가보다 높은값을 나타냈으나 DMH투여 14주 이후로는 더 이상의 증가 경향은 보이지 않았다(Table 3, Fig. 2). 각 실험기간에 따른 세포 분열수의 증가소견은 제Ⅱ군과 대동소이 하였다.

3) 대장점막의 이형성변화

(1) 제Ⅰ군(정상 대조군)

정상 대조군에서의 소낭선의 상피세포들의 핵은 규칙적으로 기저부에 위치하고 있었고, 소낭선의 크기도 비교적 균일하였다. 이러한 양상은 전 실험기간 동안 별 변화가 없었다.

(2) 제Ⅱ군(DMH 20mg/kg/wk 투여군)

DMH투여 5주까지는 이형성의 소견을 관찰할 수 없었다. DMH투여 6주에 1마리에서는 일부 소낭선에서 경도의 이형성을 보였고, 또 다른 1마리에서는 두세개의 소낭선에서 중등도의 이형성을 관찰할 수 있었다. DMH투여 12주에는 상피내암이 발견되었고 그 주위점막에서 경도 및 중등도의 이형성 소견이 관찰되었다. 또한 17주 투여군중 1마리에서 signet-ring세포형의 침습성암이 발생되었다.

(3) 제Ⅲ군(DMH 40mg/kg/wk 투여군)

DMH투여 5주에 처음으로 이형성의 소견이

**Table 4.** The degree of dysplasia and carcinoma of colonic mucosal gland during DMH administration

Ani-Group	mal No.	Weeks									
		1	3	5	6	7	9	12	14	17	20
Group I		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Group II	1	-	-	-	+	-	‡	‡‡	+	CV	+
	2	-	-	-	‡	-	‡	CI	‡	‡	CI
Group III	1	-	-	+	+	+	‡	CI	CI	CV	CI
	2	-	-	-	+	‡	CI	CI	CI	‡	CI

Dysplasia: - ; absence, +; mild, ‡; moderate, ‡‡; severe, CI; carcinoma in situ, CV: Invasive carcinoma

**Table 5.** The degree of feulgen positivity in nucleus of colonic mucosal gland during DMH administration

Group	Weeks									
	1	3	5	6	7	9	12	14	17	20
Group I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Group II	+	+	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡‡	‡‡
Group III	+	+	‡	‡	+	‡	‡	‡	‡‡	‡‡

+, mild, ‡; moderate, ‡‡; severe

관찰되었고, DMH투여 9주째는 1마리에서 상피내암이 관찰되었다. DMH투여 12주 이후에는 두마리에서 모두 상피내암을 관찰하였으며, 17주 투여군중 1마리에서 signet-ring 세포형의 침습성암이 발생되었다(Table 4, Photo 3-5).

#### 4) 대장 점막의 핵내 feulgen 염색소견

정상대조군에서는 소낭선의 핵에 균일한 정도의 홍색의 양성반응이 나타났으나 제Ⅱ군과 제Ⅲ군에서는 DMH투여 5주부터 중등도의 양성반응을 나타내었고 signet-ring 세포형의 대장 침습성암에서는 고도의 양성반응이 관찰되었다(Table 5).

#### C. 조직화학적 alkaline phosphatase 염색소견

정상 대조군에서는 대장점막의 혈관에 고도의 활성도를 나타냈으나 점막상피에서는 정도의 양성반응만이 나타났었다. DMH투여 제Ⅱ군과 제

Ⅲ군에서는 약물투여 전 기간동안 대장의 혈관에 고도의 염색도를, 소낭선의 경부 및 상피세포 변연부(brush border)에서 DMH투여수가 증가할수록 활성도의 증가를 관찰할 수 있었다. DMH투여 17주에 발생한 signet-ring 세포형의 침습성암에서는 침습된 암종세포에서 고도의 활성도를 관찰할 수 있었다(Table 6, Photo 6).

#### D. 전자현미경적 소견

정상 대조군에서의 대장점막 상피세포는 3~5층으로 구성되어 있었으며 세포들은 비교적 규칙적으로 배열되었고, 실험군에서는 세포층이 6층 이상으로 증식상을 보였으며 선내강으로 돌출상을 보이기도 하였다. 이러한 변화는 DMH투여기간이 길어질수록 현저하게 나타났고 증가되는 양상을 보였다.

배상 세포는 정상 대조군의 장점막에서 다수 관찰되었으나 실험군에서 그 수가 현저히 감소되었

Table 6. Alkaline phosphatase activity of the colonic mucosal gland during DMH administration

Weeks Group	1	3	5	6	7	9	12	14	17	20
	Group I	+	+	##	##	##	##	##	##	##
Group II	+	+	##	##	##	###	###	###	###	###
Group III	+	+	##	##	##	##	###	###	###	###

+; mild, ##; moderate, ###; severe

Table 7. Electron microscopic findings of colonic mucosal gland during DMH administration

Group	Weeks	Findings				Inclusion & electron dense body	Discontinuity of basal lamina
		Hyperplasia	Goblet cell	Microvilli	Vacuolization		
Group I	5	-	##	##	-	-	-
	12	-	##	##	-	-	-
	14	-	##	##	-	-	-
Group II	5	±	##	##	-	-	-
	12	+	+	+	-	-	-
	14	##	+	+	±	±	±
Group III	5	±	##	##	-	-	-
	12	##	+	±	±	+	+
	14	##	-	±	+	±	±

-; negative, +; mild ##; moderate, ###; severe

다.

소용모는 정상 대조군에서 수가 많고 잘 발달되어 변연부를 이루었으나, 실험군에서는 DMH 투여 주수가 길어질수록 소용모의 수도 적어지고 길이가 일정치 않았으며 때로는 소용모의 소실도 관찰되었다. 공포형성은 실험군의 대량 투여군에서만 상피세포의 세포질내에서 관찰되었고, electron dense body도 형질내에서 관찰되었다. 기저층은 정상 대조군에서는 선명하게 연속상으로 나타났으나, DMH의 투여기간과 용량이 증가될수록 불연속된 부분이 자주 보였으며 세포질이 불연속된 기저층을 통하여 간질내로 돌출된 부분도 관찰되었다(Table 7, Photo 7-10).

## 고 찰

화학적 발암물질인 1, 2-dimethyl hydrazine (DMH)에 의한 백서 대장 점막의 육안 및 조직학적 병소는 사람의 대장직장암과 유사해서 대장암 발생의 여러면을 연구하는데 좋은 모형이 되고있다<sup>5)(13)(14)(15)(16)</sup>.

DMH는 강력한 alkylating 물질이며 그 작용은 DNA와 RNA의 purine 염기 guanine을 메틸화시켜 7-methyl guanine을 만든다<sup>27)(28)</sup>. 7-methyl guanine은 대장 소낭선의 기저막 부위에서 세포증대를 일으켜 소낭선내 방사선 동위원소를 이



용한 연구에서 소낭내 표식된 세포수의 증가를 관찰할 수 있으며 핵산내 전구효소중 hypoxanthine phosphoribosyl transferase(HPRT)의 활성을 감소시키므로써 미성숙세포의 증식을 일으킨다는 보고가 있다<sup>8)</sup>.

실험동물에 DMH를 투여하면 15주 또는 20주 이후에 대장암이 발생하며<sup>6)11)13)</sup> 그 이전에 반드시 여러 단계의 이형성 변화를 볼 수 있다. 대장암의 발생율은 발암물질의 투여량과 투여기간에 따라 다르며 과량 투여시에 소량 투여시보다 핵내 핵산량의 변화를 좀더 뚜렷하게 볼 수 있다고 하였다<sup>18)</sup>.

본 연구에서는 DMH를 반복 투여시 백서 대장 점막에 20주내지 30주에 종양을 발생시키기 위해서 20mg/kg/wk 용량<sup>4)5)</sup>과 40mg/kg/wk 용량<sup>15)</sup>을 선택하여 약물을 사용 비교하였다.

육안적으로 관찰할 수 있는 종괴의 출현은 DMH 투여 9주<sup>10)15)</sup>부터 DMH 투여 20주까지<sup>13)</sup> 다양하며 본 연구에서는 DMH 20mg/kg 군에서는 14주째에, 40mg/kg 군에서는 12주째에 각각 점막을 기를 관찰하였다.

DMH에 의한 대장암의 발생부위도 대개 원위부 대장에 호발한다고 알려져 있으나<sup>4)10)11)</sup> 보고에 따라서는 대장 근위부에 생긴 예도 보고되어 있어<sup>12)</sup> 그 발생부위가 일정치 않음이 보고되었다. 본 연구에서는 항문으로부터 5~7cm의 대장 원위부에 대부분의 종양이 발생되어 Sunter등<sup>14)</sup>이 선택적으로 대장 원위부에 종양이 발생한다는 관찰과 일치하였다.

DMH투여후 백서 및 마우스에서 소낭선의 상피세포 증식이 암종보다 선행된다는 것이 여러 관찰자들에 의해 보고되고 있으며<sup>6)8)13)</sup>, 이와는 반대로 소낭선의 증식이 암종발생 보다 선행되어 나타나지 않는다는 주장도 있다<sup>5)</sup>. 그러한 차이는 실험동물의 종류와 개체에 따라 다르지만 소낭선의 세포증식이 대장암 발생과정 동안 필수적으로 일어나는 것은 아니라는 것을 지적하고 있다. 상피이형성 변화를 동반하지 않는 소낭선 세포증식에서는 미분화세포가 공포성 원주세포, 점액세포, 장분비세포의 변화가 같은 정상적인 세포들의

증식이 유지되어 상피세포의 수가 증가한다 할지라도 <sup>3</sup>HTdR-표식세포의 분포는 정상 소낭선에서와 비슷하다고 보고되어 있다<sup>10)</sup>. 따라서 대장암 발생전에 소낭선의 세포증식이 관찰되지만 이는 암종병소의 전구단계로 여겨지지는 않는다고 보고하였다. 그러나 화학물질, 바이러스 등과 같은 환경적 요인이 세포증식을 일으킴으로 암종발생을 촉진시킬 수 있다고 사료된다. 본 연구결과는 DMH투여 1주부터 소낭선을 이루는 세포수의 증가가 DMH 20mg/kg 투여군 및 DMH 40mg/kg 투여군 사이에서 정상 대조군에 비해 유의한 결과를 나타내었고( $p < 0.05$ ), 또한 DMH 40mg/kg 투여군이 DMH 20mg/kg 투여군에 비해 보다 큰 소낭선 세포수의 증가가 나타났다.

DMH투여후 대장점막 상피세포의 핵분열수 및 세포분열증가의 속도가 대장암 발생과정에 나타나는 이형성변화 정도에 따라 다르다<sup>13)</sup>. 즉 상피세포의 이형성 정도가 증가할수록 1개 소낭선의 핵분열수는 증가한다고 하였다. 본 연구에서는 DMH투여 3주부터 정상 대조군에 비해 유의한 세포분열의 증가를 나타내기 시작하여 DMH 투여 20주에는 소낭선당 평균 핵분열수는 4내지 5개에 달하고 있었으며 DMH 40mg/kg 군에서 DMH 20mg/kg 군보다 세포분열수의 증가를 관찰할 수 있었다.

DMH투여에 따른 대장점막 상피세포의 이형성변화는 이형성변화가 없는 경우 소낭선 세포의 증식이 미만성(diffuse)으로 나타나는 것과는 다르게 한개의 소낭선에서부터 시작하여 발생한다고 하였으며 이후 두개 또는 그 이상의 주위의 소낭선의 이형성 변화가 서로 합쳐지게 된다<sup>10)</sup>. DMH투여후 이형성변화가 관찰되기 시작하는 것은 DMH투여 3주<sup>10)</sup>부터 16주<sup>13)</sup>까지 다양하게 보고되고 있다. 본 연구에서 DMH 40mg/kg 투여군에서는 제5주째에 경도의 이형성 소견을 보이고 제9주에는 상피내암이, 17주째는 침습암이 발생하였다. 반면 DMH 20mg/kg 투여군에서는 제6주째에 경도의 이형성소견을 보이고, 제12주째 상피내암이 제17주째 침습암이 발생하였다. 따라서 본 실험에서 DMH 20mg/kg와 40mg/kg의

투여양에 의해 암의 발생 시기는 서로 비슷하나 상피의 이형성 변화는 DMH 40mg/kg 투여군에서 보다 조기에 나타나는 것을 알 수 있었다.

대장 점막의 DNA 양을 대략적인 측정을 위하여 조직화적인 핵내 feulgen 양성반응 정도와 생화학적으로 측정된 DNA 양을 비교한 바 feulgen 양성반응 정도가 높을수록 핵내 DNA 양이 증가한다고 하였다<sup>15)</sup>. 본 연구결과에서도 핵내 feulgen 염색상 증식성 변화때는 정상대조군과 유사한 양성반응을 보였으나 이형성 변화 및 암종변화시에는 feulgen 양성반응이 증가되었으며 이는 증식성 변화보다 이형성변화에서 더욱 증가된 양성반응을 보였고 암종에서는 가장 강한 양성반응을 나타내어 이형성 변화와 암종에서 DNA 양의 증가가 관찰된 것으로 생각되었다.

최근 악성종양의 연구에 있어서 종양 표식자의 검출에 관심이 높으며 종양표식자로는 carcino-embryonic antigen(CEA), carcinomatous antigen, ferritin, 이소성으로 생성되는 효소, 효소 및 isozyme 등이 있다. 만일 종양에 대한 특이성과 예민도가 높은 표식자가 있다면 치유가능한 초기 단계에서 악성종양을 찾아내는데 의의있는 검사 방법을 제공할 수 있을것이라는<sup>29)</sup> 가정하에 대장 점막 상피세포내 alkaline phosphatase 에 대한 실험을 시도하였다.

Alkaline phosphatase는 monophosphate 의 가수분해를 촉매하는 대장점막 상피세포내 효소로서 PH9.0에서 최대 활성도를 나타내며 장을 비롯하여 태반, 신장, 간장, 골 등에 존재하고 전기영동 및 각종 방해검사시 혈청내 alkaline phosphatase가 증가할때 어느 장기의 병소라는 것을 아는데 도움을 준다. 대장암의 경우 혈청내 alkaline phosphatase증가가 있다는 보고가 있으며 대장암의 조직 추출물에서도 정상 대장조직보다 활성도가 2~3배 높다는 보고도 있지만<sup>23)30)</sup> 아직까지는 정설이 없는 실정이며<sup>31)32)33)</sup> Larson 등<sup>22)</sup>에 의해 대장암표식자로서 homoarginine 에 예민한 alkaline phosphatase가 이미 잘 알려져 CEA의 민감도와 비슷한 결과를 보이는 검사라고 보고하고 있다. 저자의 본 연구 결과에 의하면

정상대조군과 DMH투여로인한 대장점막 상피세포의 변형을 초래한 조직내 alkaline phosphatase 염색 소견을 관찰한 바 정상대조군의 대장 점막 상피세포에도 소량 alkaline phosphatase의 활성도를 지니고 있으며, 세포이형성 변화가 나타난 조직과 침습된 암종 조직에서 고도의 활성도를 나타내었다. 이로써 alkaline phosphatase가 대장 종양지표로서 사용될 가능성을 암시해 준다고 할 수 있다.

본 연구에서 DMH로 유발된 백서 대장점막 상피세포의 전자현미경적 변화는 다음의 6가지를 대별하여 관찰할 수 있었다. 백서 대장점막 상피세포는 정상 대조군에서는 3~5층으로 구성되어 있었으며 세포표면이 일정하였으나, 실험군에서는 세포층이 6층이상으로 증식상을 보였으며 선내강으로 증식하여 돌출상을 보이기도 하였고, 이러한 변화는 DMH투여기간 및 투여용량에 비례하여 증가되었다. 배상세포는 정상 대조군에서 많이 관찰되지만 암종이 있는 조직에서는 그 수가 현저히 감소됨을 관찰하였으며 이는 상피세포가 태생형으로 전환하는 것으로서 해석할 수 있으며, 암종전환으로의 초기단계의 가능성을 나타낸다고 할 수 있다<sup>34)35)</sup>. 본 연구에서 대장 점막 상피세포의 소용모(micro-villi)는 정상 대조군과 세포증식성 변화를 보인 경우에서는 소용모의 수도 많고 일정한 모양을 지니며 잘 발달되어 변연부를 이루었는데 반해 상피암종이 발생한 부위에서는 그 수가 적어지고, 짧아지며, 불규칙하게 나타났고 소용모가 소실된 소견도 관찰되었다.

본 연구에서와 같은 소용모의 형태학적 변화는 사람의 대장 점막에 생긴 유두상 선종에서 관찰되는 소용모의 수적 감소 및 길이의 축소 소견과 일치되었고<sup>36)</sup>, Barkla 등<sup>17)</sup>의 보고에 의하면 정상 대조군의 상피 대장암 조직에서 좀더 많은 소용모를 관찰했다는 보고의 결과도 있으나 본 실험에서는 이와 반대되는 소견이 관찰되었다. 이는 좀더 많은 연구로 추적되어야만 할 사항이라고 생각되었다. 본 실험에서는 실험군에서 대장 점막 상피세포의 세포질내에서 소포형성이 자주 관찰되었으며 정상 대조군에서는 이들 소견이 나타

나지 않았다. 이러한 소포 형성은 초기 세포변성의 소견으로서 설명되고 있다<sup>17)</sup>. 또한 실험군에서 소낭선 세포질내의 봉입체 (inclusion body) 가 관찰되었으며, 이 봉입체는 핵과 세포질의 변성이라는 보고도 있다<sup>5)</sup>.

대장 점막의 기저층은 정상 대조군에서 연속적으로 선명하게 존재하였으나 실험군에서는 불연속적이고 선명치 않게 관찰되었으며 상피세포의 일부가 이러한 불연속적인 기저층을 통해 간질내로 돌출되기도 하였다. 이러한 현상은 Barkla등<sup>17)</sup>에 의해 백서 대장점막에서 발생한 암종의 소견과 일치하며 분명치는 않지만 종양의 국소확산을 가능하게 한다고 하였다. 이외의 교소체(desmosome), 핵인, 소기관(micro-organelle)등은 정상 대조군과 실험군 사이의 큰 차이점은 관찰되지 않았다.

## 결 론

DMH투여로 인한 대장암 발생의 형태학적 변화를 규명하고자 체중 140g 정도의 웅서백서(Sprague Dawley)에 DMH를 매주 20, 40mg/kg투여한 후 1, 3, 5, 6, 7, 9, 12, 14, 17, 20주에 각각 도살하여 대장점막에 나타나는 변화를 광학 및 전자현미경적으로 관찰하고 대장조직내 alkaline phosphatase 염색을 하여 조사하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 대장의 육안적 검색시 정상 대조군에서는 점막 용기현상이 관찰되지 않았으나 DMH 20mg/kg 투여군에서는 14주부터, DMH 40mg/kg 투여군에서는 12주에 대장점막의 용기를 관찰할 수 있었다.

2) 대장점막 상피세포의 증식소견은 DMH 20mg/kg 투여군과 DMH 40mg/kg 투여군 모두 1주부터 상피세포의 증식소견을 보였고, DMH 40mg/kg 투여군에서 보다 높은 증가를 나타냈다.

3) 대장점막의 세포분열 변화를 보면 DMH 20mg/kg 투여군과 DMH 40mg/kg 투여군 모두에서 3주부터 증가하기 시작하여 20주에는 심한 세포분열 소견이 관찰되었다. 이는 DMH 40mg/kg 투

여군에서 그 증가가 더욱 현저하였다.

4) 대장점막의 이형성변화를 보면 DMH 40mg/kg 투여군에서는 5주에 관찰되었고, 상피내암은 DMH 20mg/kg 투여군에서는 12주에, DMH 40mg/kg 투여군에서는 9주에 유발되었으며, 17주에는 양군에서 침습암이 발생되었다.

5) 대장점막의 핵내 feulgen 양성도는 DMH 20mg/kg, 40mg/kg 투여군 모두에서 5주부터 중등도의 양성소견을 보였으며, 선암종 변화를 보이는 부위의 핵에서는 고도의 feulgen 양성도를 나타내었다.

6) 대장점막내의 alkaline phosphatase 염색은 정상 대조군에 비해 DMH 투여군의 상피세포에 양성도가 증가하였으며, 약물투여 주수가 증가할수록 양성도가 증가하고, 선암종부위에서는 고도의 alkaline phosphatase 양성도를 나타내고 있다.

7) 전자현미경적 소견을 보면 대장점막 상피세포의 다층성이 실험군에서 현저하고, 배상 세포는 정상 대조군에 비해 실험군에서 그 수가 현저히 감소되었다. 소용모는 정상 대조군에 비해 실험군에 수도 적어지고, 길이도 일정치 않았으며 때로 그의 소실도 관찰되었다.

또한 DMH대량 투여군의 상피세포내에서 공포형성 및 electron dense body를 관찰하였으며 기저층의 불연속된 부분을 실험군에서 용량이 증가될수록 자주 관찰되었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 백서장 DMH를 장기간 투여시 초기부터 대장점막에서 세포증식 및 세포분열 증가를 일으키며, 장기적으로는 세포이형증 및 상피세포내암과 침습암을 발생시키며, 전자현미경으로도 종양세포와 같은 미세구조의 변화를 관찰할 수 있었고, 이러한 변화는 DMH 투여량 증가에 따라 더욱 현저하였다. 세포내 alkaline phosphatase는 이형증 및 암발생시 나타나고 암세포로 변화시 더욱 증가되어 종양표식자로 이용될 가능성을 암시할 수 있었다.

## REFERENCES

- 1) Laqueur GL: *The induction of intestinal*

- neoplasms in rats with the glycoside cyca-sin and its aglycone. Virchows Arch, 340: 151-163, 1965, quoted in Chang, WWL: Histogenesis of symmetrical 1, 2-dimethylhydrazine-induced neoplasms of the colon in the mouse. J Natl Cancer Inst 60: 1405-1418, 1978*
- 2) Druckrey H, Preussmann R and Matzkies F, et al: *Selektive erzeugung von darmkrebs bei rattern durch 1,2-dimethylhydrazin. Naturwissen Schafren 54: 285-286, 1967 quoted in Chang, WWL: op. cit, 1978*
  - 3) Ward JM, Yamamoto RS and Brown CA: *Pathology of intestinal neoplasms and other lesions in rats exposed to azoxymethane. J Natl Cancer Inst 51: 1029-1039, 1973*
  - 4) Ward JM: *Morphogenesis of chemically induced neoplasms of the colon and small intestine in rats. Lab Invest 30: 505-513, 1974*
  - 5) Pozhariski KM: *Morphogenesis and morphology of experimental epithelial tumors of the intestine. J Natl Cancer Inst 54: 1115-1135, 1975*
  - 6) Maskens AP: *Histogenesis and growth pattern of 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon adenocarcinoma. Cancer Res 36: 1585-1592, 1976*
  - 7) Haase P, Cowen DM, Knowles JC and Cooper EH: *Evaluation of dimethylhydrazine induced tumors in mice as a model system for colorectal cancer. Br J Cancer 28: 530, 1973*
  - 8) Thurnherr N, Deschner EE, Stonehill EH and Lipkin M: *Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injections of 1, 2-dimethylhydrazine. Cancer Res 33: 940-945, 1973*
  - 9) Deschner EE: *Experimentally induced cancer of the colon. Cancer 34: 824-828, 1974*
  - 10) Chang WWL: *Histogenesis of symmetrical 1, 2-dimethylhydrazine-induced neoplasms of the colon in the mouse. J Natl Cancer Inst 60: 1405-1418, 1978*
  - 11) Filipe MI: *Mucous secretion in rat colonic mucosa during carcinogenesis induced by dimethylhydrazine; A morphological and histochemical study. Br J Cancer 32: 60-76, 1975*
  - 12) Park CI Lee KB and Lee YB: *A study on histogenesis of carcinoma of the colon induced by 1, 2-dimethyl hydrazine in rats. The Korean Journal of Gastroenterology 17: 353-360, 1985*
  - 13) Richards TC: *Early changes in the dynamics of cryptic cell populations in mouse colon following administration of 1, 2-dimethylhydrazine. Cancer Res 37: 1680-1685 1977*
  - 14) Sunter JP, Watson AJ and Appleton DR: *Kinetics of the non-neoplastic mucosa of the large bowel of dimethylhydrazine-treated rats. Br J Cancer 44: 35-44, 1981*
  - 15) Kimura O, Laibona N, Miyano Y, Okamoto T, Tamura H, Yurugi E and Koga S: *Nuclear DNA content in dimethylhydrazine-induced colonic carcinoma and mucosal dysplasia in rats. Cancer 53: 1918-1922 1984*
  - 16) Wargovich MJ, Medline A and Bruce WR: *Early histopathologic events to evolution of colon cancer in C57B/6 and CFI mice treated in 1, 2-dimethylhydrazine. J Natl Cancer Inst 71: 125-131, 1983*
  - 17) Barkla DH and Tutton PJM: *Ultrastructure of 1, 2-dimethylhydrazine-induced adenocarcinomas in rat colon. J Natl Cancer Inst 61: 1291-1299, 1978*
  - 18) Chan PC, Cohen LA, Narisawa T and Weisburger JH: *Early effects of a single intrarectal dose of 1, 2-dimethylhydrazine in mice. Cancer Res 36: 13-17, 1976*
  - 19) Richards TC: *Changes in crypt cell populations of mouse colon during recovering from treatment with 1, 2-dimethylhydrazine. J Natl Cancer Inst 66: 907-912, 1981*
  - 20) Oohara T, Ogino A and Tohma H: *Micoscopic adenoma in nonpolyposis coli; Incidence and relation to basal cells & lym-*

- phoid follicles. *Dis Colon Rectum* 24: 120 - 126, 1981
- 21) Zeddeck MS, Sternberg SS, Poynter RW and McGowan J: *Biochemical and pathological effects of methylazoxymethanol acetate, a potent carcinogen. Cancer Res* 30 : 801 - 812, 1970
  - 22) Larson FC, Kahn L, Tormey DC and Davis TE: *A comparison of fast homoarginine-sensitive alkaline phosphatase & CEA as markers in colon carcinoma. J Clin Oncology* 2: 457 - 461, 1984
  - 23) Owens RA and Hartman PE: *Alkaline phosphatase isoenzymes in large intestines and large intestinal tumors of fisher 344 rats. Biochemical and Biophysical Research Communication* 122: 740 - 747, 1984
  - 24) Muto T, Morson BC: *Evolution of the cancer of the colon and rectum. Cancer NY* quoted in *Filipe, MI, : op cit, 1975*
  - 25) McMaus JFA and Mowry RW: *Staining method: Histologic and histochemical, Hoeber international reprint, Harper and Row, New York, Evanston and London and John Weatherhill, Inc, Tokyo, 1964, p 152 - 190*
  - 26) Gomori G: *Proc Soc Exp Biol, NY, 1949a, 70: 7, quoted in McMaus: op cit, 1964*
  - 27) Matsumoto H and Higa HH: *Studies on methylazoxymethanol, the aglucone of cycasin; Methylation of nucleic acids in vitro. Biochem J* 98: 20c - 22c, 1966
  - 28) Shank RC and Magee PN: *Similarities between the biochemical actions of cycasin & dimethylnitrosamine. Biochem J* 105: 521 - 527, 1967
  - 29) Stefanini M: *Enzymes, isoenzymes and enzyme variants in the diagnosis of cancer; A short review. Cancer* 55: 1931 - 1936, 1985
  - 30) Fabricius-Bjerre N, Hanel HK and Holst-Christensen J: *Alkaline phosphatase in colorectal cancer; A quantitative analysis of the enzyme content. Scand J Gastroenterology* 7: 369 - 373, 1972
  - 31) Helander HF: *Enzyme patterns and protein absorption in rat colon during development. Acta Anat* 91: 330 - 349, 1975
  - 32) Vengesa PB and Hopffer U: *Cytochemical localization of alkaline phosphatase and Na<sup>+</sup>-pump sites in adult rat colon. J Histochem Cytochem* 27: 1231 - 1235, 1979
  - 33) Lev R and Griffiths WC: *Colonic and small intestinal alkaline phosphatase; A histochemical and biochemical study. Gastroenterology* 82: 1427 - 1435, 1982
  - 34) Kaye GI, Fenoglio CM, Pascal RR and Lane N: *Comparative electron microscopic features of normal, hyperplastic and adenomatous human colonic epithelium. Gastroenterology* 64: 926 - 945, 1973
  - 35) Johannessen JV: *Electron microscopy in human medicine. vol 7. Digestive system. McGraw-Hill International Book Co, 1980, p 175*
  - 36) Ioachim N, Delaney WE and Madrazo A: *Villous adenoma of the colon and rectum: ultrastructural study. Cancer* 34: 586 - 596, 1974



Photo 1. Normal colonic mucosa of control group (H & E stain, x 400)

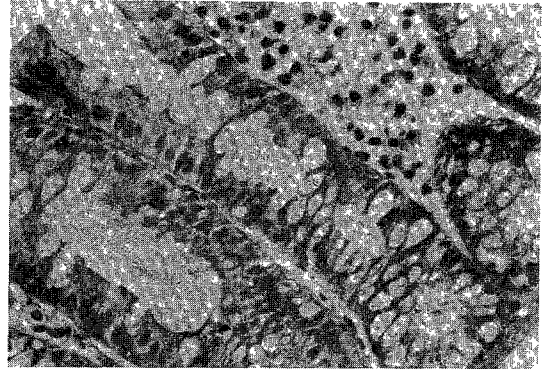


Photo 2. Colonic mucosal hyperplasia treated with 5 weeks of DMH 20mg/kg/wk (H & E stain, x 400)

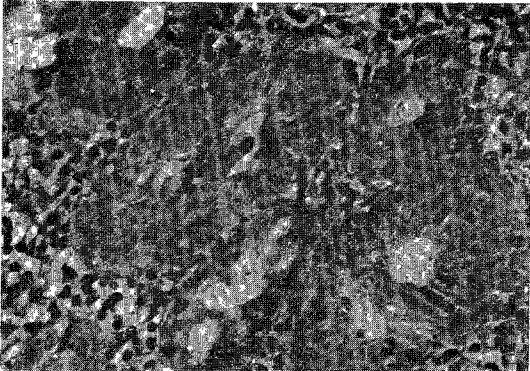


Photo 3. Severe dysplasia treated with 14 weeks of DMH 40mg/kg/wk (H & E stain, x 200)



Photo 4. Carcinoma in situ treated with 14 weeks of DMH 40mg/kg/wk (H & E stain, x 200)

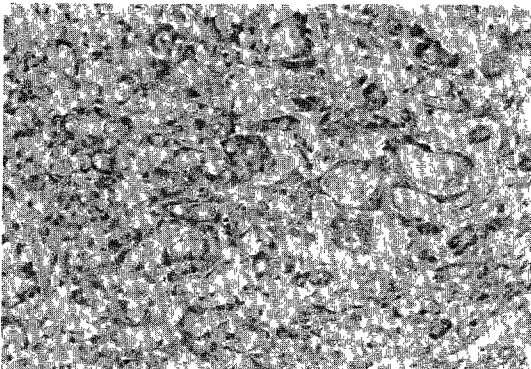


Photo 5. Adenocarcinoma treated with 17 weeks of DMH 40mg/kg/wk (H & E stain, x 200)

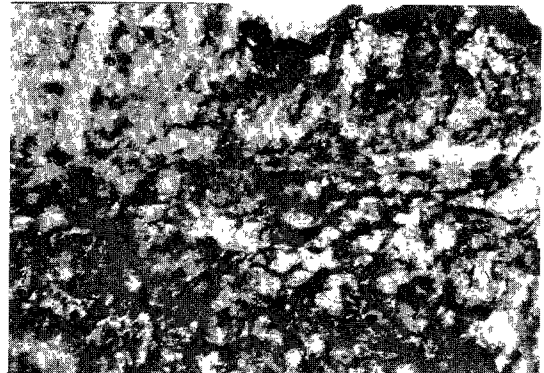


Photo 6. Severe positivity for alkaline phosphatase in the adenocarcinoma treated with 7 weeks of DMH 20mg/kg/wk (alkaline phosphatase stain, x 100)

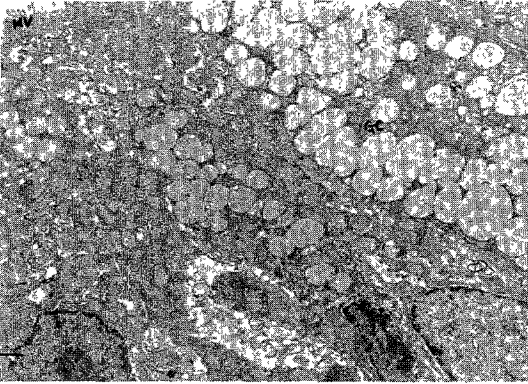


Photo 7. Numerous goblet cell(GC) with microvilli(MV) of the control rat(EM, x 7,000)

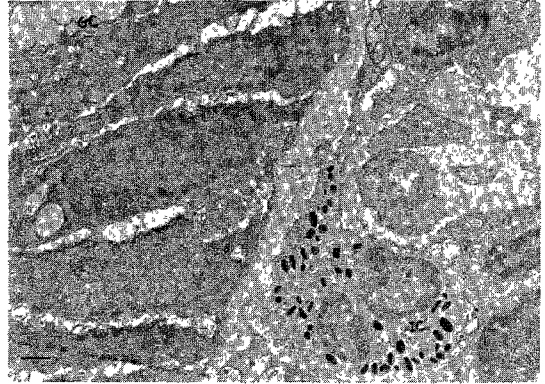


Photo 8. Decreased goblet cell and inflammatory cells(IC) in the stroma treated with 14 weeks of DMH 20mg/kg/wk(EM, x 7,000)

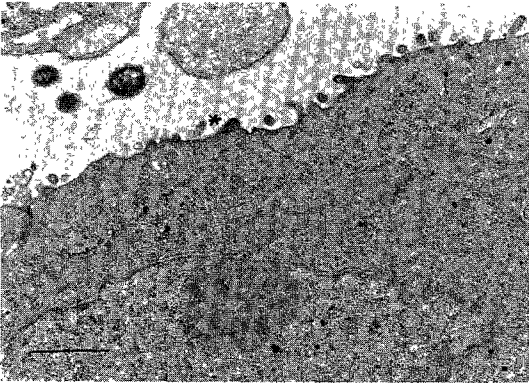


Photo 9. Irregular shortening of microvilli(\*) treated with 14 weeks of DMH 40mg/kg/wk(EM, x 20,000)

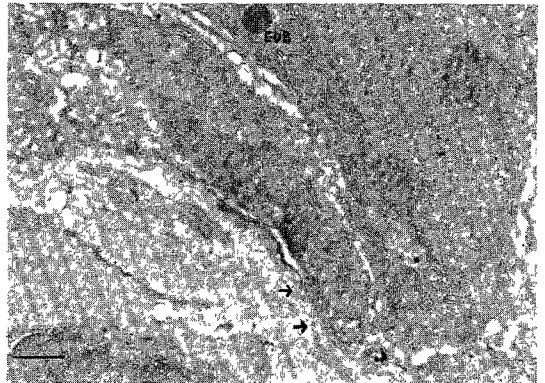


Photo 10. Multiple discontinued basal lamina(→) with electron dense body(EDB) treated with 14 weeks of DMH 40mg/kg/wk(EM, x 12,000)