대한방사선의학회지 2000;43:579 - 583

B형 간염바이러스 X - 유전자를 가진 형질전환생쥐에 발생한 간세포암에 대한 고해상 초음파의 유용성: 예비 연구[1]

윤권하 · 유대열[2] · 박성훈 · 김창근 · 원종진 · 문형배[3]

목적: B형 간염 바이러스 X (HB X) - 유전자를 가진 형질전환생쥐에서의 간세포암을 진단하는데 있어서의 고해상초음파의 유용성을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: B형 간염 바이러스 X - 단백질 유전자를 가진 42마리의 형질전환생쥐에서 10 - 12 MHz의 직선형 트랜스듀서를 이용한 고해상도 초음파를 시행하였다. 형질전환생쥐는 연령 8 - 20개월로 평균 14개월이었다. 초음파상 종양의 유무, 수, 크기, 에코정도를 분석하였고, 복강내 전이여부를 알아보았다. 색도플러검사상 종양의 혈류를 알아보았다. 초음파시행후 다섯시간내에 실험동물을 희생시켜 병리조직학적 소견을 알아보았다.

결과: 육안적소견상 형질전환생쥐 42마리중 16마리의 간에서 20개의 간세포암이 발견되었고, 이들의 크기는 1.5 - 15 mm (평균 4.7 mm)였다. 고해상도초음파에서는 이들 20개 종양중 17개가 균일한 저에코성 결절로 보였고 나머지 세개는 검출되지 않았다. 초음파의 종양검출에 있어서 민감도는 85%, 특이도 96%, 양성예측율 0.94, 음성예측율 0.90, 정확도는 90%였다. 다른 26마리의 쥐에서는 육안적으로는 종양이 없었으나 미세현미경검사상 이중 네마리에서 0.3 - 1.2 mm 크기의 네개의 종양이 있었다. 색도플러검사상 종양내 혈류가 보였던 세개의 종양에서 조직검사상에서도 종양내 혈관이 관찰되었다. 한마리에서 복강내 전이성 종괴가 관찰되었다.

결론: 고해상초음파는 HBX - 유전자를 가진 형질전환생쥐에서 간세포암을 검출하는데 유용한 검사방법으로 생각된다.

B형 간염 바이러스의 만성감염은 간세포암 발생의 주요한 원인중의 하나로 알려져 있다. B형 간염 바이러스의 발암기전에는 c - myc, c - Ha - ras, c - Ki - ras와 같은 유전자의 과도한 발현이나 돌연변이와 관련 있는 것으로 알려져 왔다. 실제로 이 유전자를 가진 형질전환생쥐에서 종양이 발생하였으며, 인간의 간세포암에서 이 유전자의 과도한 발현과 변이가 발견되기도 하였다 (1). 최근에는 B형 간염 바이러스의 X - 단백질 (HB X - 단백질)이 다양한 기능을 가진 바이러스의 조절자로서 HB X - 유전자를 활성화시키는 것으로 알려져 있고, 이 HB X - 유전자가 간세포암 발생에 중요한 원인적 인자의 하나로 인식되고 있다 (2). Yu 등 (3)은 HB X - 유전자를 가진 형질전환생쥐에서 간세포암이 빈번히의 발생하는 것을 관찰하였으며, 이 실험동물에서의 간세포암이 인간에서의 간세포암과 조직학적으로 유사하였음을 보고하였다. 그러나 아직까지 간세포암의 발생과정에서 HB X - 유전자의 작용에 대한 정확한 이해가 부족하며 논란이 있는 실정이다. 따라서 간세포암의 발생과정에 대한 연구와 치료, 특히 최근 관심이 늘어나고 있는 유전자치료를 연구하기 위해서는 발생한 종양에 대한 생체내 감시가 필요하고, 여러가지 유전자치료를 위한 매개체의 전달을 위해서 방사선과 의사의 역할이 중요하게 요청되고 있다 (4).

초음파영상은 해상력이 좋아짐에 따라 간 질환의 초기 선별검사로 널리 이용되고 있으며 소간세포암의 검출에 널리 이용되고 있다. 최근의 한 연구에서 초음파검사는 2.0 cm 크기 이하의 간세포암의 발견율이 98.3%로 CT 나 MRI보다 우월한 방법으로 밝혀졌다 (5). 초음파기기의 발전과 더불어 개발된 고해상도초음파는 높은 영역의 주파수 (7 - 12 MHz)를 사용하여 연부조직이나 위장관등과 같은 얕은 부위의 초음파검사에 활용도가 높아졌고, 생쥐와 같은 실험동물의 영상을 얻는데도 적합한 것으로 평가된다.

본 연구에서는 고해상도초음파를 이용하여 HB X - 유전자를 가진 형질전환생쥐에서 발생한 간세포암을 진단하는데 있어서의 정확도를 알아보고, 종양의 혈류를 검출하는데 있어서의 도플러초음파의 역할을 분석하고자 하였으며, 이 결과를 토대로 이 실험동물을 이용한 치료반응을 보는데 기초자료로 삼고자

[1]원광대학교 의과대학 방사선과학교실
[2]한국과학기술원 생명공학연구소
[3]원광대학교 의과대학 병리학교실
이 연구는 과학기술부 선도기술개발사업 과제 HS2110의 연구비 지원에 의해 수행됨.
이 논문은 2000년 6월 14일 접수하여 2000년 9월 7일에 채택되었음.

하였다.

대상과 방법

형질전환생쥐

1999년 3월부터 1999년 7월까지 HB X-유전자를 가진 42마리의 형질전환생쥐를 대상으로 했다. 형질전환생쥐는 연령 8-20개월로 평균 14개월이었고, 암컷 22마리, 수컷20마리였고, 몸무게는 25-40 g이었다. HB X-유전자를 가진 형질전환생쥐는 Yu등 (3)에 의한 방법에 의해 만들었으며, 간략하게 설명하면 다음과 같다. HB X-유전자를 포함하고 있는 DNA 분절을 잡종1세대 (C57BL/6 X DBA) 암컷 생쥐에서 얻은 수정란에 주입한후, 이DNA가 주입된 수정란을 가임신한 ICR암컷 생쥐에 이식시켰다. 형질전환의 유무는 X-유전자에 해당되는 DNA분절 (발현벡터, pHEX1의 0.6 Kb BamH1/Bg1II 분절)을 Southern-blot분석하였다. 생쥐는 미국 National Institute of Health의 규정에 따라 사육 관리했다.

초음파검사

초음파를 시행하기 전에 Ketamine hydrochrolide 0.3 mL를 경근육 주사하여 마취시킨후 복부모발을 제거하고, 복와위 자세에서 사지를 실험대에 고정한 후 초음파검사를 시행하였다. 초음파는 HDI 5000 스캐너 (ATL Inc., Bothell, WA, U.S.A.)로 10-12 MHz의 직선형 트랜스듀서를 이용하여 간 및 복부를 횡단면으로 스캔을 하여 전체 간이 포함되도록 스캔하였다. 초음파영상은 B-방식과 색도플러방식 모두를 얻었고, 간 종양의 유무와, 수, 크기, 에코정도를 분석하였다. 에코정도는 간실질과 비교하여 고, 등, 저에코로 표시하였다. 색도플러검사상 종양내의 혈류유무를 알아보았고, 복강내 전이성 종괴의 유무를 알아보았다.

조직학적검사

초음파시행후 한시간에서 다섯시간사이에 실험동물을 희생시켜 간을 적출하였다. 육안소견상 간의 표면에서와 횡단면으로 3 mm간격으로 전체 간을 절단하여 그 절단면에서 종양의 유무, 수, 위치, 크기등을 확인하였다. 육안검사를 마친 간 조직은 10% 중성포르마린에 고정한후 통상적인 방법으로 조직편을 만들어 헤마톡실린-에오신 (HE)염색을 시행하였다. 조직학적 검사로 종양의 크기, 분화도, 종양내 혈관의 유무 등을 관찰하였다. 또한 세포의 증식정도를 파악하기 위하여 세포증식항원(proliferative cell nuclear antigen)에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다.

통계분석

초음파검사와 조직학적검사의 결과를 간의 위치별로 일대일 대응하여 비교하였다. 형질전환생쥐의 월령별 종양의 육안적 및 미세현미경상의 발생율을 알아보았다. 육안적소견과 비교하여 초음파검사의 민감도, 특이도, 양성예측율, 음성예측율, 정확도를 알아보았다.

결 과

종양발생율

육안적소견상 형질전환생쥐 42마리중 16마리(38%)의 간에서 20개의 간세포암이 발견되었고, 이들의 크기는 1.5-15 mm (평균 4.7 mm)였다 (Fig. 1). 형질전환생쥐를 월령별로 나누어 발생율을 보았을때 8개월 미만의 다섯마리에서는 한 개의 종양도 발견되지 않았고 (0%), 12-14개월사이의 29마리중 9마리(31%)에서 10개의 종양이 발견되었으며, 15-20개월사이의 8마리중 7마리(87%)에서 10개의 종양이 발견되었다 (Table 1). 나머지 26마리는 육안검사상 종양이 없었으나, 조직학적검사상 네마리에서 종양이 발견되었는데, 이를 월령별로 보면 8개월미만의 5마리에서는 종양이 전혀 관찰되지 않았고, 12-14개월된 20마리중 3마리에서 0.3-1.2 mm크기의 종양이 세개 발견되었으며, 15-20개월의 생쥐 한마리에서도 1.0 mm크기의 종양이 한 개 발견되었다. 육안적 및 조직학적 종양발생율을 월령별 보면 8개월된 미만에서는 0% (0/5), 12-14개월에서는 41% (12/29), 15-20개월에서는 100%(8/8)이었다.

초음파소견

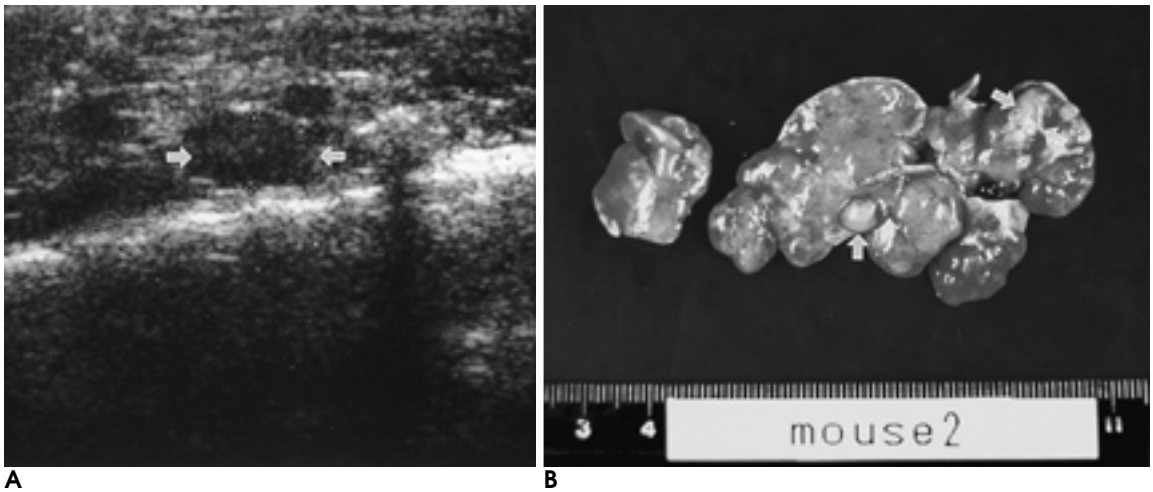
고해상도초음파에서는 이들 20개 종양중 17개가 균일한 저에코성 결절로 보였고 (Fig. 1, 2), 나머지 세개는 검출되지 않았다. 초음파의 종양검출에 있어서 민감도는 85%, 특이도 96%, 양성예측율 0.94, 음성예측율 0.89, 정확도는 91%였다. 회색조초음파에서 검출된 17개의 종양에 대해 색도플러검사를 시행하였을 때, 네개의 종양에서 종양내 혈류가 보였다 (Fig. 3).

병리학적소견

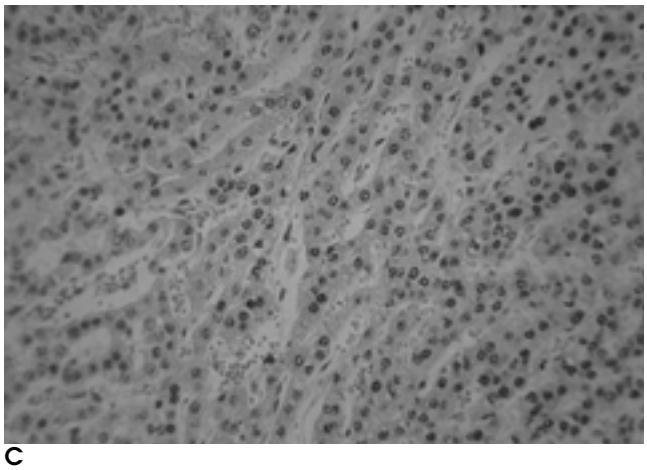
육안적소견상 종양은 황갈색의, 간 실질과 비교적 뚜렷히 경계되는 둥근형 또는 타원형의 결절로 보였다 (Fig. 1). 종양의 조직학적 소견은 사람의 간암세포와 유사하게 보였다. 즉, 종양세포의 크기가 증가하고, 핵은 과염색성이었고 핵소체가 뚜렷했으며 세포분열이 증가되어 있었다 (Fig. 1). 모든 종양조직은 동양혈관(sinusoid)을 포함하고 있었고, 잘 분화된 분화도를 보였고, 섬유주의 형태를 보인경우도 있었다. 종양이 없는 간 조직은 간경변이나 염증소견은 없었으며, 경도 또는 중등도의 다형성 핵을 보이는 이형성의 소견이 있었다. 이런 이

Table 1. Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Transgenic Mice Expressing the Hepatitis B Virus X-Protein

Age of mice	Grossly identified HCC			Microscopic HCC	
(months)	Incidence	No. of tumor	Diameter	No. of tumor	Diameter
8	0/ 5 (0%)	0	No lesion	0	No lesion
12 - 14	9/29 (31%)	10	2 - 13 mm	3	0.3 - 1.2 mm
15 - 20	7/ 8 (87%)	10	3 - 15 mm	1	1.0 mm
Total	16/42 (38%)	20		4	



A B



C

Fig. 1. A. Transverse scan of high-resolution ultrasonogram in the HB X-trangenic mouse at the age of 17 months shows an well-definded hypoechoic nodule (arrows) at the right lobe of the liver.
B. Gross photograph of the liver in the same mouse show two grossly identified nodules at the left lobe (12×8 mm in diameter, arrows) and at the right lobe (5×5 mm in diameter, arrowhead) of the liver, respectively.
C. Microscopic photograph shows well-differentiated tumor cells, which are arranged with trabecular pattern (H & E stain, ×200).

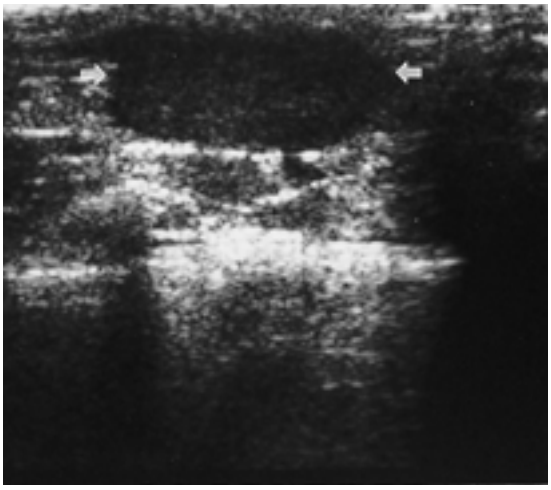


Fig. 2. High-resolution ultrasonogram at the 15 months-aged HBx-transgenic mouse shows an well-definded hypoechoic nodule (arrows) measured 10×8 mm in diameter is seen at the surface of the liver.

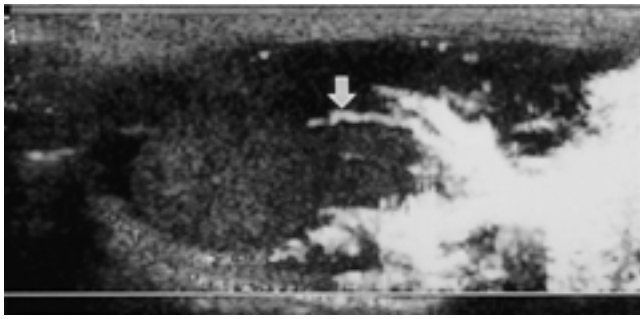


Fig. 3. Power Doppler ultrasonogram at the 15 months-aged HBx-trangenic mouse shows a hypoechoic nodule with strong flow signals in the central (arrow) and peripheral area of the tumor.

형성세포에서는 증식세포핵항원(proliferative cell nuclear antigen)염색에 양성인 세포는 드물었으나, 육안적으로 확인된 종양조직에서는 증식세포핵항원에 양성인 세포가 유의하게 증가되어 있었다. 육안검사상 17개월된 한마리의 생쥐에서 1.5 cm 크기의 장간막 종괴가 발견되었는데, 이는 간에 있는 종양과 같은 병리조직학적 소견를 보인 전이성간암이었다.

고 찰

HB X-유전자는 간의 종양발생과정에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 특히, c-jun 과 c-myc과 같은 종양유전자

의 교차활성은 HBV-감염 세포에서 암이 발생하여 성장하는데 도움을 주며, HB X-유전자는 c-myc유발성 간암의 형성을 촉발시킨다는 것이 형질전환생쥐에서 증명된 바 있다 (6). 저자들의 실험에서 HB X-유전자를 가진 형질전환생쥐의 38%에서 간암이 발생하였는데, 간암은 월령이 증가할수록 발생빈도가 증가하여 8개월이하에서는 한마리에서도 간암이 발생하지 않았는데 비해, 12-14개월에는 육안적으로 31%의 생쥐에서, 15개월이상에서는 87%에서 간암이 발생하는 것을 볼 수 있었다. 이 결과는 Yu등 (3)의 결과와 비슷한것으로서 HBx-형질전환생쥐는 월령11개월부터 간암이 발생하기 시작하여 20개월이전에 대부분의 생쥐에서 발생한다고 보여진다. 병리적으로는 형질전환생쥐에서 육안적으로 확인된 종양에서 증식세포핵항원에 양성인 세포가 매우 증가되어 있었는데 이러한 소견이 간세포암의 발생을 확인하는 결정적인 소견이며 인간의 간암세포와 비슷하다는 증거가 된다 (7).

간세포암의 조기진단를 위한 영상기법은 최근 초음파, 전산화단층촬영, 자기공명영상장치와 같은 비침습적 방법의 진보에 따라 급속히 발전하고 있다. 간의 영상진단은 간암에 있어서 다섯가지의 역할이 요구된다. 즉, 간암의 스크리닝, 다른 간종양과의 감별 및 확진, 간암 또는 경계성 병변의 악성도 판정, 간암의 병기결정, 치료반응 및 재발여부에 대한 평가가 이루어져야 한다 (8). 본 연구는 HB X-유전자를 가진 형질전환생쥐에서 간암의 발생여부를 고해상초음파를 통해 알아보고 이를 병리학적소견과의 일치여부를 알아보는 것이었다. 형질전환생쥐에서의 간암은 사람의 간암에 비해 크기가 매우 작고 얕은곳에 위치하므로 방사선과적 검사가 용이하지 않다. 초음파는 간의 국소병변의 검출에 이용하기 쉬운 장비일 뿐만 아니라 높은 정확도를 보이고, 특히 높은 주파수의 트랜스듀서를 이용한 고해상도 초음파는 표면에 가까운 병변의 검출이 쉬워 생쥐와 같이 작은 동물의 실험에 적합하다. 더욱이 최근 성능이 향상된 초음파기기에는 국소병변을 초점화하여 확대시키는 기능이 있어서 더욱 작은 국소병변의 검출에 유용하다. 그러나 아무리 크기가 작아도 초음파검사에서 에코정도의 차이가 없으면 검출이 어렵거나 불가능하다. 본 연구에서 20개의 병변중 검출이 되지 않았던 세개의 결절은 에코의 차이가 없었던 경우와 병변의 위치가 초음파빔이 도달하기 어렵거나 다른 구조물에 의해 방해를 받았던 경우로 생각된다. 반면 위양성을 보인 예도 있었는데 이는 생쥐의 간에 낭포가 발생하여 종양으로 오인되었던 경우였다.

간암에 있어서의 혈류평가는 간암세포의 분화도를 예측하는데 중요한 지표가 된다. 간암에서 동맥의 혈류가 증가할수록 암세포의 분화도는 감소되는것으로 이해되고 있으며 따라서 색 또는 출력도플러검사로서 종양내의 혈류를 평가하는것은 조직학적 검사없이 간암세포의 분화도를 알아보는데 매우 유용한 검사라 할 수 있다 (9). 또한 이런 검사는 사람의 간암에서 경동맥색전술이나 고주파열치료등 종양의 치료반응을 평가하는데도 매우 유용한 방법으로 알려져 있다 (10). 본 연구에서는 색도플러상 색신호가 검출된 경우는 단지 네예에 불과하였고 이들 종양에서 조직검사상 혈류가 풍부하다는 것이 밝혀졌다. 대부분의 종양에서 혈류가 풍부하지 않은 이유로는 종양의 분화도가 낮고, 크기가 작았기 때문으로 생각된다. 그러나 혈류가 풍부했던 예에서도 조직학적으로 분화도의 차이가 없었던 것은 모든 예에서 혈류의 정도가 분화도를 직접적으로 반영하지 않는다는 것을 보여주는 것이라고 생각된다.

간암모델의 동물실험은 간암세포의 유전자적 또는 환경적요인과 관련한 발생과정을 이해하고, 간암세포의 전구병변과 악성세포의 단계적변화에 따른 조직학적 또는 혈류역동학적 변화를 이해하며, 궁극적으로 효과적이고 근치적인 치료방법의 개발등에 그 목적이 있다고 할 수 있다. 본 연구에서 시행한 형질전환생쥐의 간암모델에서 초음파검사의 의의는 이 실험동물모델에서 간암발생여부를 생체내에서 방사선학적으로 확인할 수 있는 지를 알아보고, 장차 이를 토대로 여러가지 방법의 간암치료를 시도한 후 그 치료반응을 평가할 수 있겠는지를 알아보기 위한 준비단계로서 회색조 및 도플러 초음파소견을 알아보기 위한 것이었다. 이 결과를 토대로 할 때 고해상초음파는 이 실험동물에서의 간암발생여부를 비교적 정확히 알 수 있었으나, 이 동물을 이용한 여러가지 방사선학적 치료반응을 평가하는데는 추가적인 실험이 필요할 것으로 보인다.

본 실험에서 사용한 형질전환생쥐를 이용한 실험에는 몇가지 제약점이 있을것으로 보인다. 첫째는 동물의 크기가 불과 25-40 g정도로 작고, 간의 크기는 5 g정도로 작아서 고해상초음파를 제외한 방사선학적인 검사 및 생체내에서의 치료반응을 검사하는데 제약점이 있을것으로 보인다. 필자들은 CT 및 MRI검사를 시도하였으나 병변의 검출이 불가능하였었다. 둘째는 전신의 혈관의 굵기가 작고 종양의 혈관발달이 미숙하여 대부분의 방사선학적 검사에 필수적인 경정맥조영제 투입후의 검사가 불가능하거나 어렵다는 점이다. 셋째는 사람의 간암발생과정에서 받아들여지고 있는 다단계이론, 즉 재생결절, 이형성결절, 간암의 순차적 변화과정이 실험동물에서 정확히 입증되지 않았고, 또한 사람의 간암세포에서 보이는 다양한 세포의 형태가 없이 대부분이 고형(solid) 또는 섬유주(trabecular)형태로 나타났다. 넷째 형질전환생쥐의 간에서 기생충감염과 관련있는것으로 보이는 낭성병변이 두마리에서 나타났다. 이는 동물의 사육과정에서 감염된것으로 보이며 초음파검사에서 종양의 위양성을 초래할 수 있는 병변이므로 세심한 관찰이 요구된다.

결론적으로 고해상초음파는 HBX-유전자를 가진 형질전환생쥐에서 간세포암을 검출하는데 유용한 검사방법으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Nelson F. Mouse liver tumorigenesis: models, mechanisms, and relevance to human disease. *Semin Liver Dis* 1999;19:243-252
2. Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991;23:317-320
3. Yu DY, Moon HB, Son JK, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis B virus X-protein. *J Hepatol* 1999;31:123-132

4. Voss SD, Kruskal JB. Gene therapy: a primer for radiologists. *Radiographics* 1998; 18:1343-1372
5. Horigome H, Nomura T, Saso K, Itoh M, Joh T, Ohara H. Limitation of imaging diagnosis for small hepatocellular carcinoma: comparison with histologic findings. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14: 559-565
6. Terradillos O, Billet O, Renard C-A, Levy R, Molina T, Briand P, et al. The hepatitis B virus X genepotentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene* 1997;14:395-404
7. Terada T, Nakanuma Y. Cell proliferative activity in adenomatous hyperplasia of the liver and small hepatocellular carcinoma. An immunohistochemical study demonstrating proliferating cell nuclear antigen. *Cancer* 1992;70:591-598
8. Kudo M. Imaging diagnosis of hepatocellular carcinoma and premalignant/borderline lesions. *Semin Liver Dis*,. 1999;19:297-309
9. Kudo M. Morphological diagnosis of hepatocellular carcinoma: special emphasis on intranodular hemodynamic imaging. *Hepatogastroenterology* 1998;45:1226-1231
10. 김승훈, 임효근, 조재민 등. 경도관동맥화학색전술 후 잔류간암에 대한 예비평가: 조영증강출력도플러초음파검사의 유용성-예비보고. *대한방사선의학회지* 1998;39:1135-1142

J Korean Radiol Soc 2000;43:579 - 583

Usefulness of High-Resolution Sonography for Assessement of Hepatocellular Carcinoma in the Transgenic Mice Expressing Hepatitis B Virus X-protein: A Preliminary Study[1]

Kwon-Ha Yoon, M.D., Dae Yeul Yu, Ph.D.[2], Sung Hoon Park, M.D.,
Chang Guhn Kim, M.D., Jong Jin Won, M.D., Hyung Bae Moon, M.D.[3]

[1]*Department of Radiology, Wonkwang University School of Medicine*
[2]*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Korea Advanced lnstitute of Science and Technology*
[3]*Department of Pathology, Wonkwang University School of Medicine*

Purpose: To determine the value of high resolution ultrasonography (US) for the detection of hepatocellular carcinoma in the HBx transgenic mice.

Materials and Methods: Forty-two HBx transgenic mice aged 8-20 (mean, 14) months underwent high-resolution ultrasound using a 10 - 12 MHz linear transducer. US findings indicating the presence or absence, number, size and echogenicity of each hepatic tumor were analyzed, and inaddition, color or power Doppler US was used to analyse tumoral vascularity. In each animal, sacrificed less than five hours after US examination, sonographic and pathologic findings were correlated.

Results: On gross pathologic examination, 20 hepatocellular carcinomas measuring 1.5 - 15 (mean, 4.7) mm in diameter were found in 16 mice; US revealed that 17 of the tumors were homogeneous hypoechoic nodules. With regard to tumor detection, sensitivity was 85%, specificity 96%, positive predictive value 0.944, negative predictive value 0.897, and overall accuracy 90%. Doppler US revealed that in three nodules, intratumoral vessels were present. Inthe other 26 mice, gross examination showed that no mass was present; microscopically, however, four nodules measuring 0.3 - 1.2 mm were found in four of these animals. Tumoral vascularity detected by color Doppler US corresponded to the intratumoral vessel within the nodules. One peritoneal nodule, confirmed as a metastatic tumor, was found at the greater omentum.

Conclusion: In HBx transgenic mice, high-resolution US is valuable for the detection of hepatocellular carcinoma.

Index words : Liver neoplasms
Liver, US
Animals
Ultrasound (US), experimental studies

Address reprint requests to : Kwon-Ha Yoon, M.D., Department of Radiology, Wonkwang University School of Medicine.
344-2 Sinyong-dong, Iksan, Chonbuk 570-711, Korea.
Tel. 82-63-850-1516 Fax. 82-63-851-4749 E-mail: yoonkh@wmc.wonkwang.ac.kr