

N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl) Nitrosamine에 의해서 백서 방광에 유발된 발암현상에 대한 항암제의 복강내 투여효과

계명대학교 의과대학 비뇨기과학교실, 병리학교실*

김상규 · 박관규* · 김천일 · 이성준

=Abstract=

Effect of Intraperitoneal Injection of Single Chemotherapeutic Agent on Rat Bladder Carcinogenesis Induced by N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl) Nitrosamine

Sang Gyu Kim, Kwan Gyu Park*, Chun Il Kim and Sung Choon Lee

From the Departments of Urology and Pathology*, Keimyung University School of Medicine,
Taegu, Korea

Chemotherapeutic agents were evaluated for their effect on the development of urinary bladder tumors, induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) in female Sprague-Dawley rats. For 16 weeks, 0.05% BBN was administered orally, and then chemotherapeutic agents (adriamycin and cisplatin) were injected intraperitoneally for 12 weeks. In our preliminary experimental series, an experimental bladder tumor model induced by BBN was useful in evaluating the effectiveness of chemotherapeutic agents. Cisplatin appears to be effective in inhibiting precancerous histologic changes and carcinoma in rat urinary bladder mucosa by BBN. However, the effectiveness of adriamycin was inconclusive.

Key Words: Bladder tumor, BBN.

서 론

방광암은 비뇨기과 영역에서 가장 흔히 관찰되는 악성종양으로 임상병기에 따라 치료방법이 다양하여 표재성 방광암인 경우 경요도 절제술후 방광내 항암제 혹은 BCG 주입법, 침윤성 방광암에서는 방광전적출술, 전이된 암에서는 항암화학요법이 치료의 근간을 이루고 있으나 최근에는 전이성방광암 뿐만 아니라 침윤성 방광암에서도 항암화학법에 대한 관심이 점차 고조되고 있다.

인체 방광암에 대한 항암화학요법은 cisplatin의 효과가 실험¹⁾ 및 임상성적²⁾을 통해 입증된 아래 CISCA³⁾, CMV⁴⁾, M-VAC⁵⁾의 cisplatin 위주의 복합화학요법이 널리 시행되고

이 논문은 1989년도 계명대학교 동산의료원 특수
과제연구비 일부보조에 의해 작성되었음.

접수일자 1990년 10월 29일

있으며 Sternberg⁶⁾은 M-VAC 병용요법으로 50%의 완전관해를 포함한 71%의 높은 반응율을 보고하기도 하였다.

효과적인 항암제 및 항암화학요법에 대해서는 아직도 논란이 많으며 이와 관련된 자료도 극히 제한된 실정이나 1964년 Druckrey⁶⁾가 BBN을 백서에 경구 투여하여 방광암을 유발시킨 이후 BBN에 의해 유발된 백서의 방광이행상피암의 병리조직학적 소견이 인체의 방광암과 유사하여 방광암의 특성과 항암제의 항암효과등을 관찰하기 위한 실험연구로 많이 이용되고 있다.

이에 저자들은 최근 주로 사용되고 있는 cisplatin과 adriamycin의 복강내 투여가 BBN으로 유발된 백서 방광암에 미치는 효과를 과상피증, 편평상피화생, 유두종 및 암종등의 발생빈도 및 면적백분율을 통해 비교관찰하여 방광암화학요법에 대한 기초자료를 얻고자 이 실험을 시행하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 생후 6주의 140~160g 암컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였으며, 동일한 조건 하에서 22.0%의 조단백질이 포함된 동일한 사료로 사용하였다.

2. 발암제

발암제로는 N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine(이하 BBN)(일본 화성공업주식회사제조)을 사용하였으며 이를 0.05%가 되도록 회색하여(5cc/10L) 식수로서 자유롭게 먹도록 하였으며, 발암제 투여기간 동안은 별도의 식수는 공급하지 않았다.

3. 실험동물의 구분 및 실험기간

총 90마리의 백서를 16주 동안 0.05% BBN을 경구 투여한 후 Fig. 1와 같이 5군으로 구분하고 대조군을 제외한 나머지 4군은 항암제를 12주간 복강내 투여한 후, 모두 28주후에 도살하였다(Fig. 1).

- I 군: 10마리. BBN을 16주 경구 투여한 후 12주간 일반식수만을 투여한 군
- II 군: 20마리. BBN을 16주 경구 투여한 후 2mg/kg의 adriamycin을 주 1회씩 12주간 복강내 투여한 군
- III 군: 20마리. BBN을 16주 경구 투여한 후 1mg/kg의 adriamycin을 3일간 3주간 격으로 4회 투여한 군
- IV 군: 20마리. BBN을 16주 경구 투여한 후 1.2mg/kg의 cisplatin을 주 1회씩 12주간 복강내 투여한 군
- V 군: 20마리. BBN을 16주 경구 투여한 후 0.8mg/kg의 cisplatin을 5일간 3주간 격으로 4회 투여한 군

4. 병리학적 관찰

실험동물을 ketamine으로 마취한 후 도뇨법으로 10% 포르말린을 방광내 충만상태로 주입한 후 즉시 개복하여 방광을 절제하였다. 조직은 10%. 포르말린에 고정하고 탈수한 후 침투파장을 거쳐 파라핀에 포매한 후 3~4 μm 의 박질편을 만들어 hematoxylin & eosin 염색을 하여 관찰하였다. 병리학적 판정기준은 미국립암연구소의 쥐 방광암 판정기준²⁾에 따라 다음

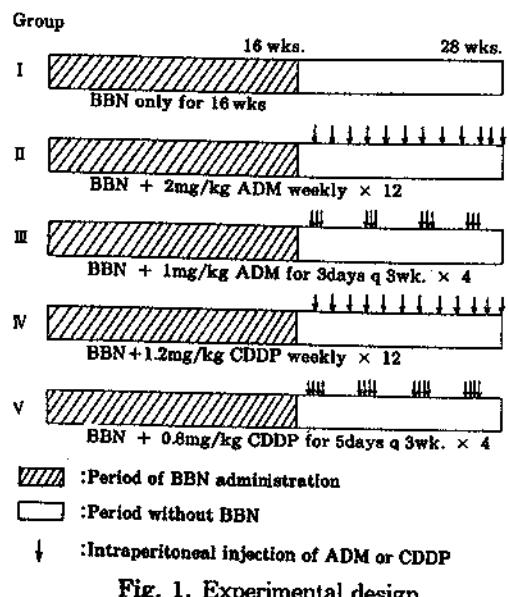


Fig. 1. Experimental design.

과 같이 하였다

1) 이행상피 과증식

상피층의 두께와 세포층수가 증가하는 것을 과증식으로 판정하였으며, 이는 방광팽만 및 절단면이 방광상피에 수직인지 여부에 따라 기준을 달리하였다. 방광팽만 상태에서 주변점막의 상피층수보다 2층이상 두꺼운 초점성 증식과 세포층수가 6층이상인 미만성 증식 및 결절양증식은 과증식으로 하였다(Fig. 2).

2) 편평상피 화생

이행상피의 과증식이 있으면서 표피층세포가 특히 얇아지며, 세포간교(intercellular bridge)나 세포질의 각질화를 보일 때에 편평상피 화생이라 판정하였다(Fig. 3).

3) 유두종

점막상피가 섬유혈관성 간질을 가지고 외장성으로 유두양 증식을 하며, 간질침윤은 없을 때에 유두종으로 판정하였다. 핵은 정상보다 커지고 염색질도 불규칙하며 세포질도 적어서 핵이 춤춤하게 보인다(Fig. 4).

4) 암종

점막 기저부의 배열세포 균일성과 경계가 소실되면서 점막고유층이나 근층으로 침범해 들어가는 종양을 암종으로 판정하였다. 기저막이 유지되어 있고 뚜렷한 간질침윤이 없는 종양은 암종에서 제외시켰다. 이행상피암세포는 핵의 크기와 염색질이 뚜렷하게 증가되며, 방향성은 완전히 소실된다(Fig. 5). 편평상피암은 전체가



Fig. 2. Hyperplasia : An increased number of cell layer and an occasional enlarged nucleus are seen (H & E, $\times 400$).



Fig. 4. Low power view of papilloma shows papillary epithelial surface and downward proliferation of the cells. The bulk of the tumor is made up of broad sheets of cells (H & E, $\times 100$).

편평상피암세포로 이루어진 경우에 한해서 판정하였고(Fig. 6), 이행상피암세포와 동반되어 나타날때는 편평상피암이 대부분을 차지하더라도 이행상피암으로 판정하였다.

결 과

90마리의 실험동물 가운데 실험기간 중 죽은 쥐는 34마리로 전체의 37.8%를 차지하였고 각각 II군 10마리, III군 9마리, IV군 8마리 및 V군 7마리였으며 죽기이전 모발 소실 및 체중감소등의 항암제의 부작용이 심하였다.

BBN만을 투여한 대조군에서는 과상피증, 편평상피화생, 유두종 및 암종이 각각 100%, 30%, 60%, 50%의 빈도로 나타났으며 면적백분율은 33.7%, 2.2%, 13.7%였다. 대조군에 발생한 암종 4례는 이행상피암, 1례는 편평상피암이었으며, 이중 2례는 비침윤성, 3례는 침윤성 암이었으며 침윤성 암중 1례는 장막(serosa)까



Fig. 3. Squamous metaplasia : The epithelium shows overlying keratin materials and keratinization of the individual cells without pleomorphism (H & E, $\times 100$).

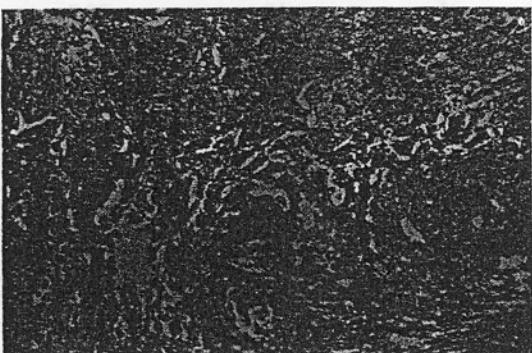


Fig. 5. Areas of this tumor are focal glandular differentiation of infiltrating transitional cell carcinoma (H & E, $\times 100$).

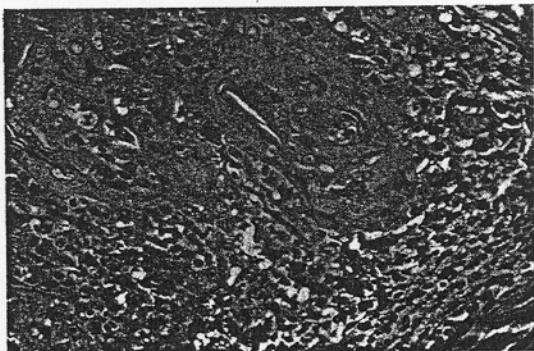


Fig. 6. An infiltrating squamous cell carcinoma is shown with keratinization (H & E, $\times 200$).

지 침범한 소견을 보였다(Table 1-3).

Adriamycin을 주 1회 12주간 투여한 II군에서는 과상피증, 편평상피화생 및 유두종이 100%, 60%, 100%의 빈도로 발생하였으며 면적백분율은 각각 28.0%, 3.4%, 13.5%로 대조군과 큰 차이가 없었다(Table 1, 2).

Table 1. Incidence of urinary bladder lesion in rats

Group	Effective No. of rats	Hyperplasia No. (%)	Sq. Metaplasia No. (%)	Papilloma No. (%)	Carcinoma No. (%)
I	10	10(100)	3(30)	6(60)	5(50)
II	10	10(100)	6(60)	10(100)	0(0)
III	11	10(90.9)	5(45.5)	6(54.5)	3(27.3)
IV	12	12(100)	0(0)	3(25)	0(0)
V	13	13(100)	1(7.7)	2(15.4)	1(7.7)

Table 2. Proportion of urinary bladder lesion

Group	Effective No. of rats	Hyperplasia (%)	Sq. Metaplasia (%)	Papilloma (%)	Carcinoma (%)
I	10	33.7	2.2	7.4	13.7
II	10	28.0	3.4	13.5	0
III	11	22.2	1.0	4.8	11.6
IV	12	6.3	0	1.3	0
V	13	6.3	0.9	1.0	1.1

Table 3. Histologic type, invasiveness and grade of carcinoma

Group	No. of rats	Carcinoma No. (%)	TCC No. (%)	SCC No. (%)	Non-invasive No. (%)	Invasive No. (%)	Low G. No. (%)	High G. No. (%)
I	10	5(50)	4(40)	1(10)	2(20)	3(30)	2(20)	3(30)
III	11	3(27.3)	3(27.3)	0(0)	2(18.2)	1(9.1)	1(9.1)	2(18.2)
V	13	1(7.7)	1(7.5)	0(0)	1(0)	0(0)	1(7.7)	0(0)

Adriamycin을 3일간 3주 간격으로 4회 투여 한 III군에서는 과상피증, 편평상피화생, 유두종 및 암종이 90.9%, 45.5%, 54.5%, 27.3%의 빈도로 나타났으며 면적백분율은 각각 22.2%, 1.0%, 4.8%, 11.6%로 역시 대조군과 큰 차이가 없었으며 발생한 3례의 암종은 모두 이행상피암이었으며 이 중 1례는 비침윤성이었고, 2례는 근층을 침범한 침윤성 암이었다(Table 1-3).

Cisplatin을 주 1회 12주간 투여한 IV군에서는 과상피증과 유두종이 100%, 25%의 빈도로 나타났으며 면적백분율은 6.3%, 1.3%로 대조군에 비하여 방광점막상피의 조직학적 변화가 현저하게 감소되어 있었으며, 암종의 발생도 없었다(Table 1, 2).

Cisplatin을 3주간격으로 5일간 4회 투여한 V군에서는 과상피증, 편평상피화생, 유두종 및 암종이 100%, 7.7%, 15.4%, 7.7%의 빈도로 나타났으며, 면적백분율은 각각 6.3%, 0.9%, 1.0%, 1.1%로 대조군과 현저한 차이가 있었다 (Table 1-3).

고 안

1964년 Druckrey⁶가 백서에서 BBN을 경구 투여하여 방광암을 유발시킨 이래 N-(4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl) formamide (이하 FANFT), 2-acetyl aminofluorene, 4-ethyl sulfonylnaphthalene-1-sulfonamide등의 여러 종류의 발암제가 방광암의 유발시험에 이용되어 왔으며, 여러 실험방광암 모델 중 특히 BBN의 경구투여에 의해 유발된 백서의 방광이행상피암은 병리조직학적 소견이 인체의 방광암과 특히 유사하여 인체방광암의 특성, 발암과정 및 단계, 항암제의 항암효과등을 연구하기 위한 실험모델로 많이 이용되고 있다.

BBN 투여후 백서방광의 조직학적 변화는 Ito 등⁸이 관찰한 바와 같이 초기 병리소견은 과증식이며 뒤이어 유두종이 나타났다가 BBN 투여기간이 길어지면 암종이 나타나는 점진적인 과정을 거친다고 한다. 질소복합물인 BBN의 암유

발 원인은 BBN의 대사산물이 주로 요증으로 배설되어 방광점막상피와 접촉하므로 야기되며 암종의 발생빈도, 숫자 및 크기 등은 BBN 투여 농도와 직접적인 관련(dose-related)이 있다고 한다⁹⁾. Ito 등¹⁰⁾은 0.001% BBN이 암을 유발하지 않는 최소농도이며 0.05% BBN으로는 8주에 전례에서 과증식이 나타나고 16주에 유두종이 발생하며 20주에 84.7%에서 암종이 발생한다고 하였으며 0.1% BBN으로는 4주만에 암발생을 유발할 수 있다고 하였다. 암종의 발생과 관련되는 다른 인자로는 실험동물의 종(species)과 나이(age)에 따라 차이를 보이며 Guinea pig나 Hamster rat에서 보다 Wistar계의 쥐에서 암종의 발생빈도가 높고 호르몬의 영향은 받지 않아 암수에 따른 차이는 없다고 한다^{10,11)}.

또한 초기단계의 과증식에서는 발암제를 중단하면 과증식이 사라지는 것을 관찰할 수 있으나 BBN을 8주이상 투여한 군에서는 과상피 중이 비가역적으로 계속 진행되며 유두종 및 암종도 발암제의 중단과 관계없이 계속 진행된다고 한다¹²⁾.

저자는 BBN만을 16주 투여후 12주 경과한 대조군에서 과상피중의 발생면적이 33.7%로 다른 보고와 상당한 차이를 보이는 것은¹³⁾ 방광팽만 상태, 절단면과의 수직상태 여부등을 고려하여 과증식의 기준을 비교적 엄격히 판정하였으며 또한 조직학적 변화가 진행되어 과상피중에서 유두종 및 암종으로 진행된 결과로 생각되며, 유두종과 암종은 각각 60%, 50%에서 발생한 것을 관찰할 수 있었으며, 발생한 암종 중 4례가 이행상피암, 1례는 편평상피암이었고 이중 침윤암이 3례, 비침윤성암이 2례였다.

문과 김¹⁴⁾은 BBN만을 투여한 경우, 12주 투여군에서는 15.4%, 20주 투여군에서는 18.8%에서 근층을 침범하는 침투성 암이 발견된다고 보고한데 비해 저자들의 경우 60%에서 침윤성 암이 나타나는 것은 Oyasu 등¹⁵⁾이 제시한 고분화도 침투성 암이 발달되는 2가지 이유중 저자들은 심하게 이형성화된 요로상피 즉 상피내암의 존재는 관찰할 수 없었으며 고분화도의 세포집단이 나타나 침윤성암이 더 많이 나타난 것이 아닌가 생각된다. 실제로 저자들은 침윤성암 모두에서 편평상피 분화가 관찰되는 고분화도의 세포소견을 보였다. 그러나 중례수가 적고 종(species)에 따른 차이를 고려한다면 향후 계속적인 연구에 의해서 결론 내릴 수 있을 것으로 생각된다.

90마리의 실험동물 가운데 실험기간중 죽은 쥐가 34마리로 전체의 37.8%나 차지하였으며 그 원인으로는 항암제 주입후 체중감소 및 모발소실등을 심하게 보여 항암제의 독성에 의해 죽은 것으로 생각되며 향후 용량 및 항암제 주입후 실험동물의 사육에 대한 주의가 좀더 필요하리라 생각된다.

여러 항암제중 cisplatin은 방광이행상피암에 대한 항암효과가 우수해 cisplatin 단독요법¹⁶⁾으로는 32%, CISCA병용요법³⁾으로는 46%, CMV 병용요법¹⁷⁾으로는 63%, M-VAC병용요법¹⁸⁾으로는 71%의 높은 반응률이 보고 되고 있으며 동물 실험에서도 Soloway¹⁷⁾는 FANFT의해 유발된 방광암에서, Babaya 등¹⁸⁾은 BBN에 의해 유발된 방광암 모델에서 암종발생을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고하였다. 또한 Babaya 등¹⁸⁾은 cisplatin의 심각한 부작용인 신독성을 감소시키기 위하여 생리식염수와 이뇨제를 투여한 군에서는 투여하지 않은 군에 비해 cisplatin의 항암효과가 감소되어지는 것을 보고하였으나 이에 대한 결론은 추후 계속되는 연구가 필요할 것으로 생각된다. 저자들은 cisplatin을 투여한 군에서는 대조군에 비해 유두종 및 암종 빈도가 현저하게 감소되었으며 면적백분률에 의한 조직학적 변화 정도도 대조군과 현저한 차이를 나타내어 cisplatin의 복강내 투여가 BBN으로 유발된 백서방광점막의 비가역적인 조직학적 변화를 억제하고 암종의 발생을 억제하는 작용을 하는 것으로 보여지나, cisplatin의 투여방법을 달리한 IV군과 V군에서는 거의 유사한 조직학적 변화 소견을 나타내었다.

Adriamycin의 항암효과는 인체에서는 효과적이나 BBN에 의한 백서의 실험방광암은 주로 유두암이고 표재성이어서 adriamycin의 전신적 투여로는 큰 효과가 없다고도 하며 같은 이유로 cyclophosphamide, mitomycin-c 등의 전신투여로 저분화도의 표재성 방광암에 대해서 큰 효과를 나타내지 못한다고 한다¹⁹⁾.

저자들의 경우 adriamycin 2mg/kg를 매주 1회씩 12주간 투여한 II군에서 과상피중, 편평상피화생 및 유두종의 발생은 대조군과 유사하나 암종의 발생은 없었으며 adriamycin 1mg/kg를 3일간 3주 간격으로 4회 투여한 III군에서는 과상피중, 편평상피화생, 유두종 및 암종 모두가 대조군과 유사하여 adriamycin의 암발생 억제 효과에 대해서는 결론을 내리기가 어려우며 향후 계속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

결 론

BBN으로 유발된 백서 방광의 발암과정에 대한 cisplatin과 adriamycin의 억제효과를 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BBN으로 유발된 백서의 방광암 모델은 항암제의 항암효과를 연구하기 위한 좋은 모델이 될 수 있을 것으로 생각되며, BBN으로 유발되는 방광점막병변은 과증식, 편평상피화생, 유두종 및 암종으로 나눌 수 있었다.

2. Cisplatin의 복강내 투여는 이 모델에서 암종유발을 억제하는 효과가 있는 것으로 보여지며 BBN으로 유발되는 조직학적 변화를 전반적으로 감소시키는 효과가 있는 것으로 보여진다.

3. Adriamycin의 복강내 투여로 인한 암발생 억제 효과에 대해서는 결론을 내리기가 어려우며 추후 계속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

REFERENCES

- 1) Soloway, M.S. : *Single and combination chemotherapy for primary murine bladder cancer.* *Cancer*, 36: 333-340, 1975.
- 2) Herr, H.W. : *Cis - diamminedichloroplatinum (II) in the treatment of advanced bladder cancer.* *J. Urol.*, 123: 853-857, 1980.
- 3) Soloway, M.S. : *A comparison of cisplatin and the combination of cyclophosphamide in advanced urothelial cancer.* *Cancer*, 60: 574-585, 1987.
- 4) Harker, W.G., Meyers, F.J., Freiha, F.S., Palmer, J.M., Shortliffe, L.D., Hannigan, J.F., McWhirter, K.M. and Torti, F.M. : *Cisplatin, methotrexate and vinblastine (CMV); An effective chemotherapy regimen for metastatic transitional cell carcinoma of the urinary tract: A Northern California Oncology Group study.* *J. Clin. Oncol.*, 3: 1463-1470, 1985.
- 5) Sternberg, C.N., Yagoda, A., Scher, H.Z., Watson, R.C., Ahmed, T., Weiselberg, L.R., Geller, N., Hollander, P.S., Herr, H.W., Sogani, P.C., Morse, M.J. and Whitmore, W.F. : *Preliminary results of M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium.* *J. Urol.*, 133: 403-407, 1985.
- 6) Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S., Schmidt, C.H., Mennel, H.D. and Stahl, K.W. : *Selektive Erzeugung von Blasenkrebs an Ratten durch Dibutyl und N-Butyl-N Butanol (4) nitrosamin.* *Zeitschrift fur krebsforschung*, 66: 280-290, 1964.
- 7) Squire, R.A., Sporn, M.B., Brown, C.C., Smith, J.M., Wenk, M.L. and Springer S. : *Histopathological evaluation of inhibition of rat bladder carcinogenesis by 13-cis-retinoic acid.* *Cancer Res.*, 37: 2930-2936, 1977.
- 8) Ito, N., Hiasa, Y., Tamai, A., Okajima, E. and Kimamura, H. : *Histogenesis of urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in rats.* *Gann*, 60: 401-410, 1969.
- 9) Ito, N., Shirai, T., Fukushima, S. and Hirose, M. : *Dose-response study of urinary bladder carcinogenesis in rats by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine.* *Cancer Res. Clin. Oncol.*, 108: 169-173, 1984.
- 10) Ito, N., Matayoshi, K., Arai, M., Yoshioka, Y., Kamamoto, Y., Makiura, S. and Sugiura, S. : *Effect of various factors on induction of urinary bladder tumors in animals by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine.* *Gann*, 64: 151-159, 1973.
- 11) Hirose, M., Fukushima, S., Hananouch, M., Shirai, T., Ogiso, T., Takahashi, M. and Ito, N. : *Different susceptibilities of the urinary bladder epithelium of animal species to three nitro compounds.* *Gann*, 67: 175-189, 1976.
- 12) Bryan, G.T. : *The pathogenesis of the experimental bladder cancer.* *Cancer Res.*, 37: 2813-2816, 1977.
- 13) 노충희, 김영균 : *N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine 투여에 의한 실험적 방광상피 병변의 경시적 변화에 관한 미세구조 연구.* *대한비뇨회지*, 27: 803-806, 1986.
- 14) 문우칠, 김영균 : *Vitamin A acetate*가 흰쥐의 방광발암에 미치는 영향의 실험적 연구. *대한비뇨회지*, 31: 1-13, 1990.
- 15) Oyasu, R., Samma, S., Ozono, S., Bauer, K., Wallmark, C. and Homma, Y. : *Induction of high grade, high stage carcinomas in the rat urinary bladder.* *Cancer*, 59: 451-458, 1987.
- 16) Yagoda, A. : *Chemotherapy of urothelial tract*

- tumors. *Cancer*, 60: 574-585, 1987.
- 17) Soloway, M.S.: *Intravesical and systemic chemotherapy of murine bladder cancer*. *Cancer Res.*, 37: 2918-2929, 1977.
- 18) Babaya, K., Takahasi, S., Momose, H., Matsuki, H., Sasaki, K., Samma, S., Ozono, S., Hirao, Y. and Okajima, E.: *Effect of single chemotherapeutic agents on development of urinary bladder tumor induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) in rats*. *Urol. Res.*, 15: 329-334, 1987.
-