

햄스터에서 N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine 투여후 단기간내 유발된 췌장암과 간내담관암의 초기 보고

아주대학교 의과대학 외과학교실, 병리학교실*
류기선, 정승규, 김옥환, 왕희정, 진윤미*, 김명욱

Abstract

The Preliminary Report of Rapid Production of Pancreas Cancer
and Cholangiocarcinoma by Cyclic Injection of Carcinogens

in Syrian Hamster initiated with N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine
Ki-Sun Ryu, M.D., Seung-Kyu Jung, M.D., Wook-Hwan Kim, M.D.,
Hee-Jung Wang, M.D., Yoon-Mi Jin, M.D.* and Myung-Wook Kim, M.D.

Department of Surgery and Pathology*
Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Background/Aims: It is well known that N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine(BOP)-induced pancreas cancer and cholangiocarcinoma in Syrian hamster is similar to that of humans in morphological, biological and immunological aspects. The cyclic administration of BOP and ethionine, choline-deficient diet and methionine is known to rapidly induce the ductal type of carcinoma in pancreas and bile duct. Authors studied whether the rapid production of this cancer can occur in Syrian hamster and what its features are. Methods: Sixteen Syrian hamsters aged 6-7 weeks and weighing 100 gm were used. All hamsters received 70 mg/kg body weight of BOP followed by three cycles of dl-ethionine, choline-deficient diet, l-methionine and 20mg/kg BOP. Hamsters were killed 9, 10 and 11 weeks after the beginning of the experiment and their gross and histologic features were observed. Results: Nine cases, killed withan 10weeks after the begining of experiment, showed no development of cancer. Of seven Syrian hamsters, killed more than 10weeks after the begining of experiment, the incidences of BOP-induced cancer included one case(14,3%) of pancreas cancer and five cholangiocarcinomas(71,4%). The morphological change of pancreas carcinogenesis was shown at first in cell mitosis and atypia(6 weeks) and then in atypical ductal hyperplasia(9 weeks) and carcinoma in situ(10 weeks). The change in cholangiocarcinoma, first progressed with ductular proliferation and surrounding fibrosis(6 weeks) followed by focal cholangiocarcinoma(10 weeks) and multiple invasive cholangiocarcinomas(11 weeks). Conclusion: Pancreas cancer and intrahepatic cholangiocarcinomas can be induced rapidly within 10 weeks by cyclic injections of carcinogens in Syrian hamsters initiated with N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine and the morphologic changes can be observed.

Key words: Pancreas cancer, Cholangiocarcinoma, N-nitrosobisamine, Hamster

서론

실험 동물에서 췌장암과 담관암을 유발하는 발암 물질은 20여가지가 넘는 것으로 알려져 있다¹. 이 중 에서 특히 N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine(BOP) 은 햄스터에서 췌장암과 담관암을 일으키는 발암물 질로 그 작용 기전은 DNA를 alkylation시켜 햄스터 에서 ductal type의 암을 유발시킨다. BOP에 의해 유발된 암은 사람의 췌장암에서 가장 흔한 ductal carcinoma와 많은 유사성을 가지고 있다^{2,3}. 햄스터 에 BOP를 투여하면 약 4개월이내에 췌장암과 담관 암이 유발되지만 그 빈도와 양이 많지 않았다⁴. 따 라서 몇몇 보고⁵⁻¹¹에서는, high cholesterol diet를 투여하거나 cholecystectomy와 lithocholic acid diet를 병용하거나 co-carcinogenic effect를 가진 CCK나 EGF를 투여하거나 여러 발암물질을 주기적 으로 복합투여하여 10주내에 많은 양의 ductal adenocarcinoma를 유발하였다.

이와같이 BOP로 유발된 췌장암 모델에서 암발생 단계의 형태학적 변화, 특정 유전자의 발현과 항암 제의 투여 효과를 연구하여 사람의 췌장암의 조기 발견, 진행도와 치료 효과에 응용할 수 있다. Wendy 등¹²은 K-ras mutation이 췌장암의 발생기 전중 초기 변화에 관여한다고 보고하였고 Margie 등^{13,14}은 Oltipraz나 Synthetic trypsin inhibitor(Camostat)가 햄스터에서 BOP로 유발한 췌장 암의 암억제효과를 보인다고 보고하였다.

저자들은 N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine을 Syrian hamster에 투여하여 단기간내에 췌장암 및 간내담관암이 유발되는지 여부와 유발된다면 그 암 발생단계의 형태학적 특징이 무엇인지를 알아보고 자 하였다.

대상 및 방법

생후 6-7주된 것으로 체중 100gm 내외의 Syrian hamster 16마리를 사용하였다. 각 동물들은 표준 실험조건하에서 사육되었다. 기초 식이와 choline-deficient 식이(Oriental Yeast Co., Japan)는 구입 하여 사용하였다. N-nitrosobis(2-hydroxypropyl) amine(BOP)는 Nacarai Tesque Inc., Kyoto, Japan

Table 1. Experimental Protocol of N-nitroso-bis(2-oxopropyl)amine(BOP)-induced Carcinogenesis in Syrian Hamster.

No.	Time	Material	Dosage
1	#1d	BOP	70 mg/kg
2	#12d-15d	dl-ethionine Choline-deficient diet	500 mg/kg
3	#16d	l-methionine	800 mg/kg
4	#32d	BOP	20 mg/kg
5	more 2 cycles(No.2-4)		
6	#9w,10w,11w	sacrifice	

에서 구입하여 생리식염수에 희석하여 사용하였 다. 또 ethionine과 methionine은 Sigma Korea에 서 구입하여 생리식염수에 희석하여 사용하였다. 동물 실험 일정표는 표 1과 같다(Table 1). 우선 BOP 70 mg/kg를 피하주사하고 11일후에 4일간 dl-ethionine 500mg/kg과 Choline-deficient diet를 투여하였다. 실험 16일째에 l-methionine 700 mg/kg를 투여하고 실험 18일째에 BOP 20 mg/kg 를 투여하였다. 이와같은 일련의 주기적 복합발암 제 투여(ethionine, choline-deficient diet, methionine 과 BOP 20mg/kg)를 1주일 간격으로 2회 더 시 행하였다. 실험 시작후 9주, 10주와 11주에 각각의 hamster를 희생시켜 췌장암과 간내담관암의 육안 적, 현미경적 특징을 관찰하였다.

결과

실험시작후 1주내에 6마리, 4주와 5주에 각각 1마 리씩 죽어 부검을 시행한 결과 모든 hamster에서 심한 복강내 출혈과 장내 괴사를 보이고 있었으나 췌장은 정상이었고 약간의 간내 울혈이외에는 종양 등은 관찰되지 않았다. 실험 시작후 6주 3일에 다 시 1마리가 죽어 부검 결과 복강의 출혈과 장내 괴 사가 관찰되었고 췌장과 간은 육안적으로는 정상이 었으나 현미경 소견상 focal dysplasia and increased mitosis in ductular cells이 관찰되었으나 종양은 없었다. 실험 시작후 9주에 2마리, 10주에 2 마리 그리고 11주에 3마리를 각각 희생시켜 육안

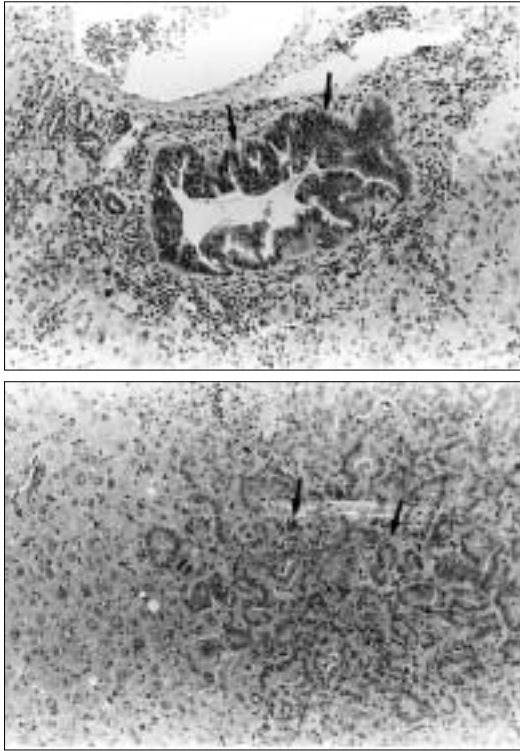


Fig. 1. Microscopic findings of pancreas were shown. a) at 9 weeks, atypical ductal hyperplasia and dysplasia, islet cell hyperplasia were appeared (arrow). b) at 10 weeks, carcinoma in situ was noted (arrow).

적, 현미경적 소견을 관찰하였다. 췌장암은 나머지 총 7마리중 1마리에서(14.3%), 간내담관암은 5마리(71.4%)에서 유발되었다.

췌장의 특징을 살펴보면, 9주에 희생시킨 2마리에서 atypical ductal hyperplasia, dysplasia와 islet cell hyperplasia 소견이 뚜렷이 있었으나 carcinoma in situ나 carcinoma의 소견은 없었다. 10주에 희생시킨 2마리중 1마리에서 carcinoma in situ 소견이 보였고 11주에 희생시킨 3마리에서는 severe atypical ductal hyperplasia 소견이 여러군데에서 보였으나 분명한 carcinoma의 소견은 관찰되지 않았다(Fig. 1).

간내담관의 변화를 살펴보면, 9주에 희생시킨 2마리에서 intrahepatic ductular proliferation and surrounding fibrosis(Von-Myenberg complex) 소견이 보였으나 분명한 carcinoma의 소견은 관찰되지

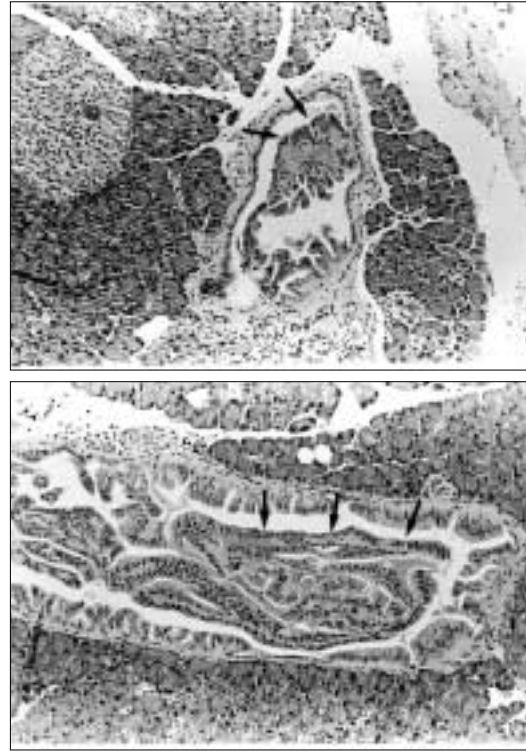


Fig. 2. Microscopic findings of intrahepatic biliary ducty were shown. a) at 9 weeks, intrahepatic ductular proliferation and surrounding fibrosis(Von-Myenberg complex) was noted (arrow). b) at 10 weeks, definite cholangiocarcinoma was noted (arrow).

않았다. 10주에 희생시킨 2마리는 분명한 cholangiocarcinoma의 소견이 보였고 11주에 희생시킨 3마리에서는 여러군데의 종괴가 관찰되었으며 invasive cholangiocarcinoma의 소견이 보였다(Fig. 2).

고찰

암발생 연구에서 단기간내 암발생 유발 모델의 가장 중요한 점은 암발생시작후 부가적인 과정을 통하여 암병변이 얼마나 많이 진행될 수 있는가 하는 것이다. 발암물질로 유발한 동물모델에서 세포독성이나 변이에 의해서 비정상 세포군이 만들어질수 있는 데, 이러한 높은 성장 잠재력을 가진 초기세포군이 증식을 계속하여 눈에 보이는 종괴가 되고 결국 종양으로 발생된다. 실험 동물에서 췌장암과 담관암을 유발하는 발암물질은 20여가지가 넘는 것으로 알려져 있다¹. 이중에서 특히 N-nitrosobis(2-

oxopropyl)amine(BOP)은 햄스터에서 췌장암과 담관암을 일으키는 발암물질로 햄스터에서 ductal type의 암을 유발시킨다. 햄스터의 췌장암은 사람의 췌장암과 많은 유사성을 가지고 있다^{2,3}. 햄스터에 BOP를 투여하면 약 4개월이내에 췌장암이 유발되지만 그 빈도와 양이 많지 않았다⁴. 따라서 몇몇 보고⁵⁻¹¹에서는, high cholesterol diet를 투여하거나 cholecystectomy와 lithocholic acid diet를 병용하거나 co-carcinogenic effect를 가진 CCK나 EGF를 투여하거나 여러발암물질을 주기적으로 복합투여하여 10주내에 많은 양의 ductal adenocarcinoma를 유발시켰다.

Scarpelli 등¹⁵은 햄스터의 암발생기전에서 암발생은 세포독성에 대한 저항에 의한 선택이라고 주장하였다. 즉 저자들의 실험에서도 사용한 ethionine은 췌장 세포 손상을 유도하는 것으로 알려져 있으며 choline-deficient diet는 아미노산의 흡수를 완전히 차단하여 ethionine의 손상 효과를 극대화시킨다. 그러나 BOP로 변형된 췌장관 세포들은 부가적으로 투여되는 ethionine과 choline-deficient diet의 세포독성에 대해 저항적이다. 따라서 methionine을 투여하여 이미 시작된 암전구 세포군을 재생시킨 후에 BOP를 다시 투여하면 정상 세포의 재생 및 증식은 억제되고 암의 전구 세포들은 계속 증식하게 된다. 결과적으로 암전구 세포군의 선택적인 성장이 계속되어 암의 빠른 유발을 기대할 수 있다. 또한 주기적으로 2-3회 계속되는 발암물질의 복합 투여는 악성 변화를 촉진하게 되어 10주내에 암을 유발하게 된다⁸.

BOP를 투여하면 췌장암이외에도 담관암이 같이 유발되는 데, 이것은 두 암 사이의 조직학적 유사성 때문이라고 생각된다. 따라서 BOP를 투여하면 췌장관의 상피세포 뿐만아니라 간내담관의 상피세포들도 함께 암이 된다고 여겨진다. 앞으로 두 암의 암발생기전의 유사성과 상이성에 대해서는 보다 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

BOP로 유발된 동물 암모델에서 암발생 각 단계의 형태학적 변화, 특정 유전자의 발현과 항암제의 투여 효과를 연구하여 사람의 췌장암의 조기 발견,

진행도 파악과 항암제 선택 등에 응용할 수 있다. K-ras mutation이 췌장암의 발생기전중 초기 변화에 관여한다고 알려져있어 췌장관 상피세포의 변화와 K-ras mutation을 검사하여 암의 진행도를 파악할 수 있다. 최근에는 Oltipraz나 Synthetic trypsin inhibitor(Camostat)와 같은 암예방물질(chemopreventives)이 햄스터에서 BOP로 유발한 췌장암의 암억제효과를 보인다고 보고하였다. 향후 단기 간내에 췌장암 및 간내담관암을 유발한 동물 모델을 통하여 보다 많은 분자생물학적, 면역학적 및 생화학적 연구가 필요하리라 사료된다.

요약

(목적) 햄스터에서 N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine(BOP)에 의해 유발된 췌장암은 사람의 췌장암과 형태학적, 임상적, 생물학적 그리고 면역학적으로 많은 유사성을 가지는 것으로 알려져 있다. BOP와 ethionine, choline-deficient diet, methionine 등을 주기적으로 투여하면 약 10주후에 췌장과 담도의 ductal carcinoma를 유발시킬 수 있다고 알려져 있다. 저자들은 햄스터에서 BOP 투여후에 각 단계별 형태학적 특징을 관찰하였다. (대상 및 방법) 생후 6-7주, 체중 100gm되는 syrian hamster 16마리를 실험하였다. 각각의 햄스터에서, 초기 BOP 70mg/kg 투여후에 3회 주기의 dl-ethionine, choline-deficient diet, l-methionine 과 BOP 20mg/kg를 투여하였다. 각 햄스터는 9주, 10주와 11주에 희생시켜 육안적, 조직학적 관찰을 하였다. (결과) 9에는 투여후 1주내, 4주 및 5주에 사망하여 부검시행하였다. 췌장암은 나머지 총 7마리중 1마리에서(14.3%), 간내담관암은 5마리(71.4%)에서 유발되었다. (결론) 본 연구 결과 저자들은 BOP 투여한 햄스터에서, 단기간에 췌장암 및 간내담관암을 유발하였고 그 형태학적 특징을 관찰하였다. 향후 더 많은 분자생물학적, 면역학적 연구가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

1. Longnecker DS, Wiebkin P, Schaeffer BK, Roebuck BD, Experimental carcinogenesis in the pancreas. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1984;26:177-229
2. van Kraun HJ, Vermeulen E, Schoren L et al, Activation of c-K-ras is frequent in pancreatic carcinomas of Syrian hamsters, but is absent in pancreatic tumors of rats. *Carcinogenesis* 1991;12:1477-1482
3. High yields of K-ras mutations in intraductal papillary mucinous tumors and invasive adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in the pancreas of female Syrian hamsters. *Carcinogenesis* 1996;17:303-309
4. Sequential alteration of the pancreas during carcinogenesis in Syrian hamsters by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Cancer Research* 1977;37:4602-4607
5. Ogawa T, Makino T, Kosahara K, Koga A, Nakayama F, Promoting effects of both dietary cholesterol and cholestyramine on pancreatic carcinogenesis initiated by N-nitrosobis (2-oxopropyl)amine in Syrian golden hamsters. *Carcinogenesis* 1992;13: 2047-2052
6. Woutersen RA, van Garden-Hoetmer A, Longnecker DS, Characterization of a 4-month protocol for the quantitation of BOP-induced lesions in hamster pancreas and its application in studying the effect of dietary fat. *Carcinogenesis* 1987;8:833-837
7. Howatson AG, Carter DC, Pancreatic carcinogenesis-enhancement by cholecystokinin in the hamster-nitrosamine model. *Br. J. Cancer.* 1985;51:107-114
8. Misumoto K, Kitazawa S, Ito S. et al, Cycles of repeated augmentation pressure in rapid production of pancreatic and cholangiocellular carcinomas in hamsters initiated with N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Carcinogenesis.* 1989;10:1457-1459
9. Birt DF, Julius AD, White LT, Pour PM, Enhancement of pancreatic carcinogenesis in hamsters fed a high-fat diet ad Libitum and at a controlled calorie intake. *Cancer Research.* 1989;49:5848-5851
10. Ura H, Makino T, Ito S. et al. Combined effects of cholecystectomy and lithocholic acid on pancreatic carcinogenesis of N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in Syrian golden hamsters. *Cancer Research.* 1986;46:4782-4786
11. Chester JF, Gaissert HA, Malt RA. Pancreatic cancer in the Syrian hamster induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine: Cocarcinogenic effect of epidermal growth factor.
12. Cerny WL, Mangold KA, Scarpelli DG. K-ras mutation is an early event in pancreatic duct carcinogenesis in the Syrian golden hamster. *Cancer Research* 1992;52:4507-4513
13. Claaper ML, Wood M, Leahy K. et al. Chemopreventive activity of oltipraz against N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine(BOP)-induced ductal pancreatic carcinoma development and effects on survival of Syrian golden hamsters.
14. Furukawa F, Nishikawa A, Imazawa T. et al. Blocking effects of synthetic trypsin inhibitor(camostat) on pancreatic carcinogenesis in hamsters initiated with N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine. *Pancreas* 1994;9(1):78-82
15. Scarpelli DG, Subbarao V, Rao MS. Pancreatic lesions induced by a single dose

of N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine
(BOP) and selection by resistance to cytotoxicity. *Toxicol. Pathol.* 1986;14:324-330