

## PhIP의 경구투여에 의한 SD 쥐 대장의 전암성 병소의 유도

한양대학교 의과대학 외과학교실

김 용 석 · 이 광 수 · 전 규 영

= Abstract =

### Induction of Preneoplastic Lesion in the Large Intestine of Rats by Oral Administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine

Yong Suk Kim, M.D., Kwang Soo Lee, M.D. and Kye Young Jun, M.D.

Department of Surgery, College of Medicine, Hanyang University

Carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP) to rat colon was investigated using the appearance of colonic Aberrant Crypt(AC), a preneoplastic lesion, as a marker. The number of AC foci per colon at experimental week 4 was  $2.5 \pm 1.9$ ; No ACs were observed in rats of the control group. A repeat experiment showed that induction of AC foci by PhIP administration was reproducible and a significant increase in the number of AC foci,  $4.40 \pm 1.14$ , was observed after 12 weeks of PhIP administration. The majority of ACs induced by PhIP were localized in rectum. The minority were localized in the middle part of the colon. These data suggested that PhIP is possibly carcinogenic to rat colon.

**Key Words:** PhIP-Aberrant Crypt-Preneoplastic lesion

### 서 론

음식물중에 수많은 돌연변이 유발성 물질(mutagenic compounds)이 있음이 증명되었고 그 대부분은 이종원자고리 아민(heterocyclic amines)이다<sup>1)</sup>. 그것들 중 많은 것이 설치류(rodents)의 여러장기에서 종양을 유발한다는 것이 장기간의 연구를 통하여 입증된 바 있다<sup>2,7,8)</sup>. 특히 간과 소장 및 대장에서 악성종양의 출현빈도가 높게 관찰된바 있다. Fried ground beef로 부터 새로이 추출된 이종원자고리

아민 중의 하나인 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP)가 다른 이종원자고리 아민<sup>3)</sup>들과 마찬가지로 유전자 변이를 일으키는 물질<sup>4)</sup>로서 본 연구에서 SD쥐 (Sprague-Dawley rat)의 대장에 변이성 소여포(Aberrant Crypts)를 발생 유도케 함으로서, 문헌고찰과 함께 PhIP가 SD쥐의 대장에 발암성이 있음을 증명하고자 하였다.

### 실험재료 및 실험방법

6주 정도의 연령(체중 150~200 gm)인 웅성 SD쥐를 선택구입하여, 철사로 판지붕과 대패밤을 바닥에 깔 플라스틱상자 속에서 12시간 간격의 밤과 낮 주기로 먹이와 물을 자유롭게 섭취하도록 하면서, 환기장

\*이 논문은 1992학년도 한양대학교 교내 연구비에 의하여 연구되었음.

치가 잘 된방에서 일주일동안 순응화(acclimation)하였다. 순도 98%의 PhIP를 Osaka 소재의 Nard 연구소로 부터 구입하였고, 실험군은 0.05%의 농도로 powder basal diet에 섞어 자유롭게 먹을 수 있도록하고, 물을 PhIP 0.05%의 농도로 만들어 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 대조군은 먹이와 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

제 1실험은 2주말과 4주말에 각각의 해당군을, 제 2실험은 4주, 8주, 12주와 16주말에 각각의 해당군을 해부 하였다. 대장을 적출하는 동안에도 심장이 정상 기능을 할 수 있을 만큼의 알은 ether 마취상태에서 해부하였다. 적출한 대장은 Bird의 방법<sup>1)</sup>에 따라 longitudinal median axis를 따라 절개하였고, 하트만 용액으로 점막에 손상을 주지 않으면서 flushing하였고, 10% 완충 포르말린액에 적서진 여과지(filter paper)위에 편평하게 깔아 고정한후, 0.2%의 메

틸렌 블루로 30~60분간 염색하여 소여포(crypt)의 경계를 관찰할 수 있도록 하였다. 광학현미경의 일정한 배율(12.5×2.5)에서 ACs의 출현수와 분포를 조사하였다. ACs출현수는 Colon당 AC foci의 평균수, focus당 AC의 수를 기록하였고, AC의 분포를 결정하기위해 적출된 대장의 rectal end로 부터 2cm을 Rectum, Cecum으로 부터 하방 2cm까지를 Cecum로 명하고, 나머지 colon은 다시 임의로 세등분하여 Cecum에서 가까운 부위로부터 근위부(P), 중간부(M), 원위부(D)로 나누었다. 병변의 촬영은 Zeiss microscope(West german)에 부착할 수 있는 Contax(Japan)카메라를 이용해 Kodak color film으로 촬영하였다.

### 결 과

PhIP에 의해 유도발생된 'AC'는 그림 1에 나타냈

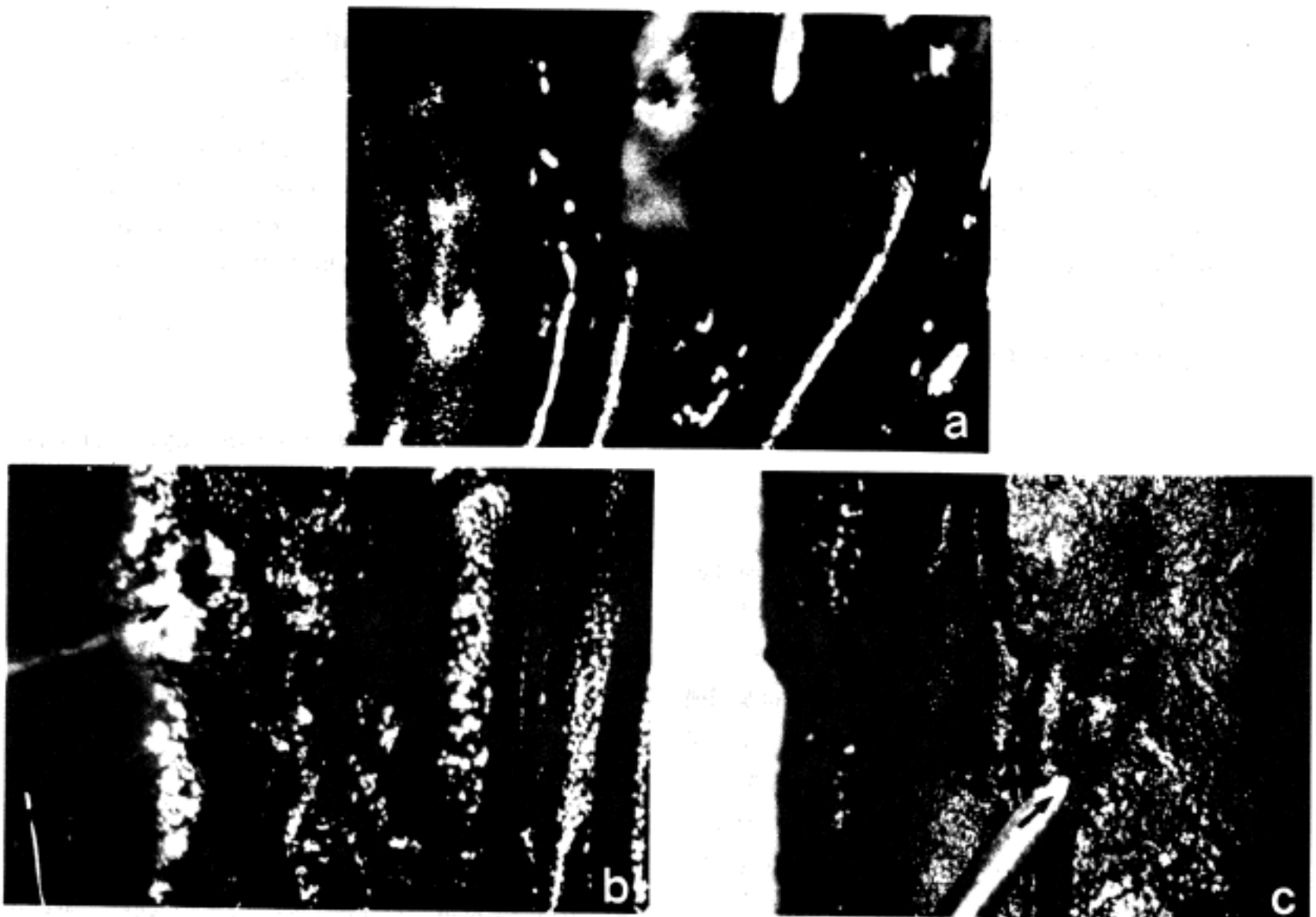


그림 1. a) PhIP 투여 4주후 대장점막에 유도된 변이성 소여포(Aberrant Crypt) (화살표가 지시한 부분). b) PhIP 투여 8주후 AC foci. 우측화살표는 1AC/focus를, 좌측 화살표는 2 AC/focus를 나타낸다. c) PhIP 투여 12주후 2 AC/focus를 나타낸다.

다. 그림 1에서 a), b)와 c)는 각각 4주, 8주와 12주째의 사진이다. 그림 a)의 화살표로 지시된 부위가 전형적인 변이성 소여포(AC)의 모습이다(소여포의 크기가 증가되고, 상피세포가 커져있으며 소여포의 주변지

역이 넓어져 있다). 그림 b)의 우측 화살표는 한개의 focus에 한개의 AC를, 좌측 화살표는 한 개의 focus에 두 개의 ACs를 나타낸다. 그림 c)의 화살표는 한개의 focus에 두개의 ACs를 보인다.

표 1. Rat 대장에서의 Aberrant crypts의 출현

Treatment	Period(Weeks)	No. of rats bearing Ac	No. of foci/Colon	No. of Ac/focus
<b>Experiment 1</b>				
PhIP	2	2/5	0.6±0.9	1.3±0.6
	4	4/4	2.5±1.9	1.2±0.4
Control	2	0/5	0	0
	4	0/4	0	0
<b>Experiment 2</b>				
PhIP	4	4/4	3.00±1.83	1.17±0.39
	8	5/5	3.80±0.70	1.21±0.42
	12	5/5	4.40±1.14	1.23±0.43
	16	3/3	4.67±0.58	1.29±0.47
Control	4	0/5	0	0
	8	0/4	0	0
	12	0/4	0	0
	16	0/4	0	0

값: 평균±SD    유의수준 <0.05, <0.01

표 2. SD rats의 대장에서의 Aberrant crypt foci의 분포

Treatment	Period(Weeks)	No. of foci	Cecum	Colon			Rectum
				P	M	D	
<b>Experiment 1</b>							
PhIP	2	3	0	0	0	0	3
	4	10	0	0	0	0	7
Control	2	0					
	4	0					
<b>Experiment 2</b>							
PhIP	4	12	0	0	4	0	8
	8	19	0	0	4	2	13
	12	22	0	0	7	2	11
	16	12	0	0	5	1	8
Control	4	0					
	8	0					
	12	0					
	16	0					

P; proximal, M; middle, D; distal.

제 1실험에서 출현수에 대한 결과는 표 1에 나타났다. PhIP투여를 시작한 후 2주말과 4주말에 AC foci의 수는  $0.6 \pm 0.9$ 와  $2.5 \pm 1.9$ 였다. 대조군에서는 ACs가 유발되지 않았다. 제 1실험에서 PhIP에 의해 유도된 AC foci수는 대조군에 비해 통계적으로 유의하지 않지만 대조군에서 ACs의 자발적 형성이 없기 때문에 잠재적으로 의미가 있는 듯하다. AC 유도의 재현성(reproducibility)을 확인하고, PhIP에 대한 장기간 노출(long-term expose)의 효과를 조사하기 위해 제 2실험을 실행하였다. 결과는 표 1에 나타났다. AC 유도의 재현성은 확인 되었으며, 장기간 노출에 따른 AC foci의 수는 4주, 8주, 12주와 16주째에 각각  $3.00 \pm 1.83$ ,  $3.80 \pm 0.70$ ,  $4.40 \pm 1.14$ 와  $4.67 \pm 0.58$ 로 증가하는 양상을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다. Focus당 AC의 수는 각각  $1.17 \pm 0.39$ ,  $1.21 \pm 0.42$ ,  $1.23 \pm 0.43$ 과  $1.29 \pm 0.47$ 로 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 대장에서 ACs의 분포는 표 2에 나타났다. 유도된 ACs는 초기에는 주로 rectum에 분포하였고, 제 2실험에서 시간 factor가 증가할수록 colon의 중앙부쪽에도 분포하였다. 우리는 항문으로부터 대장의 근위부쪽으로 약 2 cm를 직장으로 정의했다. Sprague-Dawley 쥐에서의 ACs분포는 F344쥐에서의 Ac분포와 차이가 있었다. F344쥐에서는 주로 distal colon에 분포한다<sup>6)</sup>.

## 고 찰

일상적 음식물 중에는 수많은 돌연변이원(mutagen), 발암원(Carcinogen), 종양촉진자(tumor promoter)가 함유되어 있고<sup>1)</sup>, 이러한 돌연변이원의 발암성(Carcinogenicity), DNA와 발암원과의 상호작용 및 발암원의 대사(metabolisem)에 대한 연구의 필요성이 대두되었다. 1975년에 Ames와 동료들은 환경 속에 있는(특히 음식물) 발암원을 발견하기 위해 *Salmonella typhimurium*을 이용한 돌연변이 실험(mutation test)을 보고하였다. 어떤 물질이 돌연변이 유발성(mutagenicity)을 지닌다면 이 물질의 발암성도 동시에 연구되어야 한다. 일반적으로 화학물(chemical)의 돌연변이 유발성과 발암성의 중복정도는 화학물의 형태(chemical type)에 주로 의존하는데 돌연변이 유발성과 발암성의 강도(potencies)에

대한 언급이 없는 중복은 큰 의미가 없다.

발암은 initiation과 promotion의 두단계로 나뉘어 질 수 있고, initiation은 DNA구조변화와 관련이 있으나 promotion은 반드시 관련되는 것은 아니다. 동물세포가 돌연변이원에 의해 initiation되면, 한가지 촉진자(promotor)의 적용이 종양발생의 빈도를 증가시킨다. 암발생의 결정적 단계는 tumor promotion 단계이다. 발암원으로서의 어떤 물질을 입증하기 위하여는 발암원과 돌연변이원임을 입증하는 동시에 종양촉진자를 이용하여 발암성 시험을 포함한 광범위한 연구를 필요로 한다.

아미노산, 단백질, 그리고 단백질이 충분한 음식물의 열분해에 의해 새로이 추출된 이종원자 고리 아민(heterocyclic amines)은 음식물에 포함된 돌연변이 유발성 물질의 대부분이다<sup>1)</sup>. 수 많은 이종 원자고리 아민은 설치류(Rodents)의 여러장기, 간, 소장 및 대장에서 악성종양 및 임파종을 유발시킴이 알려져 왔다<sup>2,7,8)</sup>. 기름으로 볶아 요리한 쇠고기(fried ground beef)로 부터 일련의 정제과정을 통해 추출한 중요한 돌연변이원은 세군으로 분류된다: imidazoquinolines(ex: IQ, MeIQ), imidazoquinoxalines(ex: MeIQx), imidazopyridine(ex: Trp-p-1, Trp-p-2, Glu-p-1, Glu-p-2, PhIP). 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP)은 쇠고기로부터 새로이 추출된 이종원자고리 아민인 돌연변이원으로 Ames/salmonella assay 법에 의해 1,950 revertants/ $\mu$ g의 활성도를 지닌 것으로 알려져<sup>3)</sup> MeIQx(58,000 revertants/ $\mu$ g)에 비해 약한 활성도를 나타내지만, 중량으로 따져 fried beef에 가장 풍부한 돌연변이 유발물질이다. PhIP는 요리안된 쇠고기의 본래무게의 15 P.P.b(genotoxic material의 75%)를 차지하고 전체 mutagenicity의 18%를 차지하는 중요한 돌연변이 원이다<sup>3)</sup>. PhIP는 활성대사물인 2-hydroxyamino-PhIP와 비활성산물인 4-PhIP sulfate로 대사됨이 알려져 있다<sup>11,12)</sup>.

PhIP는 포유류 배양세포의 DNA손상이나 DNA형성을 유발시키기도 한다<sup>13)</sup>. 0.04%의 PhIP를 먹은 CDF1 mice에게서 실험일 579일 동안에 임파종의 조기출현 및 높은 빈도가 관찰되었고<sup>7)</sup>, Nagase analbuminemic쥐에서는 실험일 311일 동안에 대장과 소장에 선암종(adenocarcinoma)의 발생이 관찰되었

다<sup>8)</sup>.

0.05% PhIP를 4주간 먹인 F344쥐의 조사된 모든 장기에서 PhIP-DNA adducts가 형성되었으며, 폐, 위장, 대장에서 상대적으로 높았고, 간에서 상대적으로 낮게 관찰된 것으로 보고되었다<sup>4)</sup>. 이는 다른 이종원자 고리아민과 대조적이다.

따라서 이 실험의 목적은 PhIP가 설치류의 대장에의 전구암성 병변으로 알려진 변이성 소여포(Aber-rant Crypts)를 유발시킴으로서, 쇠고기로 부터 추출한 가장 풍부한 이종원자고리 아민인 PhIP의 발암성을 연구하고자 하였다.

암의 early events에 대해 아직까지 정확히 이해되고 있지 않으나 조기 종양성 병변(early neoplastic lesion)의 확인(identification)과 수량화(quantification)는 암의 원인을 이해하는데 중요하다. 특히 암 유발과 위험 요소(risk factor)로 음식물 성분의 연구에 중요하다. 대장암을 비롯한 여러종류의 종양질환 연구를 위해, 동물 모델이 대장종양의 조직발생학적인 연구와 종양성장(tumor growth)에 대한 음식의 영향에 대하여 많은 공헌을 했지만, 장기간의 연구기간 및 경제성등에 의해 제한을 받는다.

대장의 발암(carcinogenesis)동안, 이 형성 소여포(dysplastic crypts)가 조기 종양성 병변으로 인정되고 있지만 조기 종양의 수량화(quantifying)로는 이용되지 않고 있다. Bird는 발암과정의 초기 단계에서 대장의 발암원에 대한 반응으로 점막층에 형성된 변이성 소여포(Aber-rant Crypts)를 확인하고 수량화 하였다<sup>5)</sup>. Bird에 의하면 Aber-rant crypt는 소여포의 크기가 증가되고(increased crypt size), 상피세포가 커지며(thicker epithelial lining), 소여포 주변지역이 커진다(increased pericryptal zone)고 하였다. ACs는 설치류 대장의 조기, 전구암성 병변이며<sup>9)</sup>, 대장발암물질에 의해서만 유발되고 비발암성 물질에 의해서는 유발되지 않으며, 발암성물질 투여 2주만에 나타나서 지속되며 단순 이형성(mild atypia)에서 형성장애(dysplasia)까지의 조직변화를 보이며 이러한 변화는 대장종양 촉진자(promotor)인 고지방식(high fat diet)에 대한 반응으로 시간에 따라 증가한다<sup>9)</sup>.

결론적으로, 참고논문에 의하면 PhIP는 첫째, fried beef의 가장 풍부한 돌연변이원이고, 둘째, 발암과정의 Initiation과 관련이 있으며(PhIP-DNA

adduct 형성), 셋째, 고지방식(high fat diet)에 의해 촉진(promotion)이 일어난다는 것이고, 우리의 실험결과에 의하면 실험 2주째에 SD쥐의 직장점막에서 전구암성 병변(Aber-rant Crypt)이 유도되었고, 장기간노출의 결과 중부결장에서도 특이적으로 유도되었다. 앞으로의 연구과제는 변이성 소여포를 병리학적으로 규명하고, 장기간 노출(long-term exposure)에 따른 ACs의 크기변화와 조직학적 변화를 추적 관찰해 보아야 할 것이다.

## REFERENCES

- 1) Sugimura T: *Mutagens, carcinogens, and tumor promoters in our daily food. Cancer* 49: 1970-1984, 1982
- 2) William L, Robert MD: *Carcinogenesis by nitrosohydroxyethylurea and nitrosomethoxyethylurea in F344 rats. Jpn J Cancer Res* 79: 181-186, 1988
- 3) Felton JS, Knize MG, Shen NH, Lewis PR, Andresen BD, Happe J, Hatch FT: *The isolation and identification of a new mutagen from fried ground beef: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine. Jpn J Cancer Res* 80: 1145-1148, 1989
- 5) Bird RP: *Observation and Quantification of Aber-rant Crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen; Preliminary findings. Cancer Let* 37: 147-145, 1987
- 6) Takabashi S, Ogawa K, Ohshima H, Eusmi H, Ito N, Sugimura T: *Induction of Aber-rant crypt foci in the large intestine of F344 rats by oral administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine. Jpn J Cancer Res* 82: 135-137, 1991
- 7) Esumi H, Ohgaki H, Kohzen E, Takayama S, Sugimura T: *Induction of lymphoma in CDF<sub>1</sub> mice by the food mitagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine in Nagase Analbumine-mic rats. Jpn J Cancer Res* 82: 363-366, 1991
- 9) McLellan EA, Bird RP: *Aber-rant Crypts; Potential preneoplastic lesion in the murine colon. Cancer Res* 48: 6187-6192, 1988
- 10) Tudek B, Bird RP, Bruce WR: *Foci of Aber-rant Crypts in the colon of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. Cancer Res* 49:

1236-1240, 1989

- 11) Holme JA, Wallin H, Brunborg G, Söderlund E, Hongslo JK, Alexander J: *Genotoxicity of the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP); formation of 2-hydroxamino-PhIP, a directly acting genotoxic metabolite. Carcinogenesis 10: 1389-1396, 1989*
- 12) Alexander J, Wallin H, Holme JA, Becher G: *4-(2-Amino-1-methylimidazo[4,5-b]pyrid-6-yl) phenyl*

*sulfate-A major metabolite of the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in the rat. Carcinogenesis 10: 1543-1547, 1989*

- 13) Thompson LH, Tucker JD, Stewart SA, Christensen ML, Salazar EP, Carrano AV, Felton: *Genotoxicity of compounds from cooked beef in repair-deficient CHO cells versus Salmonella mutagenicity. Mutagenesis 2: 483-487, 1987*