

Apc^{Min/+} 마우스의 소화관 폴립발생에 대한 1,4-PBIT의 암예방 효과

식품의약품안전청 국립독성연구소 병리부, ¹식품의약품안전청 생약평가부,
²서울대학교 의과대학 병리학교실

안병우 · 김대중 · 남기택 · 강진석 · 김기석 · 최미나
박기호 · 홍충만 · 원도희¹ · 장자준² · 장동덕

Chemopreventive Effect of 1,4-PBIT, a Selective iNOS Inhibitor, on Intestinal Polyposis of *Apc*^{Min/+} Mice

Byeongwoo Ahn, Dae Joong Kim, Ki Taek Nam, Jin Seok Kang
Ki Sok Kim, Mina Choi, Ki Ho Park, Choong Man Hong
Do Hee Won¹, Ja June Jang² and Dong Deuk Jang

Department of Pathology, National Institute of Toxicology Research, ¹Natural Medicines
Department of Evaluation, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea
²Department of Pathology, College of Medicine, Seoul National University,
Seoul 110-744, Korea

Accumulating evidences indicate that over production of nitric oxide (NO) is involved in the pathogenesis of colorectal cancer in both rodents and humans. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is responsible for the over production of NO in a variety of parenchymal cells and macrophages. Min (multiple intestinal neoplasia) mice, which have germ-line nonsense mutation at codon 850 of *Apc* gene, spontaneously develop multiple adenomas in small and large intestines at the age of 10~12 weeks. In the present study we utilized *Apc*^{Min/+} mice to investigate the role of iNOS on the intestinal adenoma development. We have found that iNOS protein are expressed in normal mucosa of small and large intestines of most Min mice. In order to suppress iNOS we administered S,S'-1,4-p henylene-bis(1,2-ethanediyl)bis-isothioureia (dihydrobromide) (PBIT), a selective iNOS inhibitor in diet (50 ppm). The number of adenomas in small intestines significantly decreased in *Apc*^{Min/+} mice receiving PBIT in diet. The tumor incidence and multiplicity in colorectal tissues also significantly decreased in PBIT-given mice, comparing with those receiving control diet. Immunohistochemical expression of iNOS was decreased in intestinal tissues from PBIT-given mice, comparing with those from control mice. These results suggest that NO produced by iNOS plays an important role as an endogenous factor in the development of intestinal polyposis in mice and PBIT, a selective iNOS inhibitor, may act as a potential chemopreventive agent for colorectal cancers.

Key Words: *Apc*, iNOS, Min mouse, NO, 1,4-PBIT, Polyp

서 론

최근 식생활의 서구화로 한국인의 암사망률 4위를 차지하고 있는 대장암(colorectal cancer)은 여러 가지 유전적인 변화가 다단계 발암화과정(multistep carcinogenesis process)에 전형적으로 개입하는 종양이다. 이러한 대장암의 발생원인과 기전연구 및 암예방 후보물질(chemopreventive agents)의 효능을 검색하기 위한 시험법으로 설치류를 이용한 화학발암모델 및 형질변형동물모델(transgenic or gene-knockout animal)이 최근 많이 연구되고 있다.¹⁻⁴⁾ 사람의 가족성 선종성 폴립증(familial adenomatous polyposis, FAP) 환자나 대장암 환자중의 일부는 APC (adenomatous polyposis coli) 유전자의 돌연변이가 그 원인으로 작용하고 있다. APC 유전자의 돌연변이의 발생으로부터 임상적으로 문제가 되는 수준의 암으로 진행하기 위해서는 내인성 인자나 환경인자와 같은 다른 부가적인 암위험인자(cancer risk factors)의 영향이 필수적인 것으로 여겨지고 있다.¹⁾

일산화질소(nitric oxide; NO)는 생리적으로 신호전달과정에 매우 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 염증과정을 매개하는 인자로 잘 알려져 있다. 저농도의 NO는 심혈관계, 면역계, 신경계에서 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 하지만 고농도로 만성적으로 세포에 노출이 되면 DNA의 손상이나 세포의 죽음을 초래한다. 실험계에 따라서 종양세포를 억제하기도 하고 촉진하기도 하는 양면성을 지닌 NO는 효소 nitric oxide synthase (NOS)의 작용으로 아미노산 아르기닌으로부터 생산된다. NOS에는 iNOS (inducible NOS), eNOS (endothelial NOS), nNOS (neuronal NOS)의 세 가지 아형(isoform)이 있다. eNOS와 nNOS가 칼슘농도의 지배하에 소량 생산되는데 반하여, iNOS는 과량의 NO를 생산할 수 있다. 기본적으로 NO는 세균이나 바이러스 혹은 종양세포 등의 공격으로부터 방어하는 기능을 갖고 있다. 그러나 과량의 NO가 만성적으로 생성이 되면 암을 비롯한 여러 가지 병리발생에 기여하는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 과량의 NO가 종양을 촉진하는 기전으로 추정되는 것으로는 NO가 유전자의 돌연변이를 초래하고, 과

산화음이온과의 반응부산물인 peroxyinitrite의 강한 산화작용에 의한 산화적 스트레스를 촉진하며, 혈관신생을 촉진하는 것 등을 들 수 있다. NO는 대장암 발생과정 중에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 인식되고 있는 효소 cyclooxygenase (COX)의 활성을 촉진한다. iNOS는 사람의 결장선종과 선암증, 랫드에서 화학적 대장발암의 전암병변(preneoplastic lesion)인 대장이상선와세포소(aberrant crypt foci in the colonic mucosa), 궤양성 결장염(ulcerative colitis), 식도 편평세포암종 등에서 발현이 증가되는 것으로 보고되고 있다. 또한 마우스의 회장에서는 자연적으로 존재하고 있다.⁶⁻⁹⁾

COX-2의 억제효과와 관련하여 최근 비스테로이드성 소염제(non-steroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)의 암예방 효과에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁰⁾ COX에는 COX-1, COX-2 두 종류의 아형이 존재하는데, COX-1은 여러 조직에서 생리적인 항상성을 조절하는데 중요한 역할을 하지만, COX-2는 cytokines, mitogens, 성장인자, 종양촉진인자 등에 의하여 여러 염증세포에서 생산되는 염증매개인자이다. 아스피린과 같은 비스테로이드성 소염제는 대장암을 억제하는 효과를 갖고 있음은 분명하지만, COX-2는 물론이고 생리적으로 중요한 COX-1마저 비선택적으로 억제하기 때문에 위장이나 신장의 출혈을 일으키는 부작용이 있다. 따라서 이러한 부작용을 감소시키기 위하여 COX-2만을 선택적으로 억제하는 약물의 개발에 많은 노력을 기울이고 있다. 그러나 COX-2는 설치류의 뇌와 신장에 자연적으로 존재하는 것으로 알려져 있고, COX-2 유전자를 결핍한 마우스에서는 수정과 착상 및 임신의 유지에 심각한 장애가 있는 것으로 보고되고 있다.¹¹⁾ 이러한 연구결과들은 사람에서는 COX-2의 생리적인 역할에 대하여 잘 알려져 있지 않다고 하더라도 이것이 결핍되거나 억제되었을 때 잠재적인 부작용이 나타날 개연성은 얼마든지 있을 수 있음을 의미하는 것이다.

Min 마우스는 *Apc* 유전자 850번 코돈이 아미노산을 생산할 수 없는 코돈으로 변한 무의미돌연변이(nonsense mutation)가 유전되는 동물로서 생후 10~12주령에 자연적으로 소장과 대장에 다발성의 폴립을 발생시키기 때문에 사람의 가족성

대장암 연구에 각광 받고 있는 모델동물이다.^{12,13)} 화학물질의 투여에 의하여 유발된 대장암 조직에서는 *ras* 유전자의 돌연변이가 문제가 되는데 비하여 *Min* 마우스는 사람의 *APC*의 상동유전자인 *Apc* 유전자의 돌연변이가 직접적 원인이기 때문에 생물학적인 특성상 사람의 대장암과 매우 유사하다고 인정되고 있으며, 다만 대장보다는 소장 에 많은 폴립이 발생한다는 것이 사람과의 차이점이다.

본 연구에서는 *Min* 마우스에서 발생하는 소장 과 대장의 폴립발생에 NO가 미치는 영향을 조사 하고자 iNOS를 억제하였다. iNOS의 선택적 억제 제인 S,S'-1,4-phenylene-bis(1,2-ethanediy)bis-isothiourea (dihydrobromide)(PBIT)를 사료에 혼합하여 투여함으로써 iNOS를 억제하였고, 기초사료를 급여한 *Min* 마우스와 폴립의 발생을 비교하였다. 이러한 연구는 NO의 역할 규명은 물론 보다 안전 하고 효과적인 대장암 예방물질을 개발하는데 기여 할 것으로 사료된다.

재료 및 방법

1) 실험동물

5주령의 수컷 C57BL/6J-*Apc^{Min/+}* 마우스를 The Jackson Laboratories (Bar Harbour, Maine, USA)에서 구입하였다. *Min* 마우스의 계대번식에 이용되는 모체 C57BL/6는 국립독성연구소에서 생산된 것을 이용하였다. *Min* 마우스의 마리수를 늘리기 위하여 수컷 C57BL/6J-*Apc^{Min/+}* 마우스를 암컷 C57BL/6 마우스와 1 : 4로 교배하여 얻은 새끼 중 *Min/+* 유전형질을 갖고 있는 것을 선별하여 iNOS 억제 실험에 이용하였다.

2) iNOS 억제

iNOS의 선택적 억제제인 S,S'-1,4-phenylene-bis(1,2-ethanediy)bis-isothiourea (dihydrobromide) (PBIT; CAS No., 157254-60-9)는 Cayman Chemical (USA) 사로부터 구입하였고, 생후 5주령의 *Min* 마우스 에 대하여 12주 동안 분말의 AIN-76 (Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, USA)에 50 ppm으로 혼합 하여 고형사료로 제조하여 급여하였다. 대조군 동 물에 대해서는 PBIT가 섞여 있지 않은 AIN-76 사

료를 동일 기간동안 급여하였다.

3) 유전자 감별

이유와 함께 절취한 마우스 꼬리에서 QIAamp Tissue Kit (QIAGEN, Santa Clarita, California, USA) 을 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 유전자의 감별을 위하여 PCR 법을 사용하였다. *Apc^{Min/+}* 유전자감별은 Dietrich 등의 방법에 따랐다.¹⁴⁾

4) 폴립발생의 측정

부검시에 채취한 소장과 대장은 장간막과 지방 을 깨끗이 제거하고 포르말린을 내강에 주입하여 24시간 고정 한 다음, 장간막을 따라 소화관을 절 개하고 수세하여 포르말린을 모두 제거하였다. 소 장과 대장의 점막면을 입체현미경으로 10배 확대 하여 폴립의 크기와 개수를 측정하였다. 폴립이 타 원형인 경우에는 장경을 선택하여 측정하였고, 0.5 mm 이하에서 2.5 mm 이상에 이르는 크기의 폴립 을 0.5 mm 단위로 구분하여 개수를 기록하였다.

5) 조직병리학적 검사

폴립의 크기와 개수의 측정이 끝난 소장과 대 장은 스위스롤 법에 의하여 조직을 배열한 다음 일상적인 알코올 탈수 조직처리과정을 거쳤다.¹⁵⁾ 파라핀에 포매된 조직은 3~4 μ m로 절편을 제작 하여 poly-L-lysine이 부착된 유리 슬라이드에 붙 여 일반염색과 특수염색을 실시하였다.

6) 면역조직화학적 검사

PBIT를 투여한 *Min* 마우스에서 얻은 소장과 대 장조직에 대하여 iNOS, COX-2에 대한 면역염색 을 실시하였다. Rabbit anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, sc-651)와 goat anti-COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-1746)는 0.1% bovine serum albumin에 각각 600배, 1,000배 희석하여 사용하였 다. 이차항체와 삼차항체는 Streptavidin 키트를 사 용하였다.

결 과

1) 폴립발생에 대한 iNOS 억제효과

Table 1과 2에 실험군 마우스와 대조군 마우스

에서 발생한 소장과 대장의 폴립발생이 요약되어 있다. PBIT를 급여한 Min 마우스의 소장에서 발생한 폴립은 대조군 마우스에 비하여 크기 및 총 발생수에 있어 유의성 있는 감소를 보이고 있으며($p < 0.05$), 대장에서도 발생률과 마리당 발생개수가 유의성있게 감소하였다($p < 0.05$).

Table 1. Multiplicity and size of polyps developed from small intestines of *Apc^{Min/+}* mice

Size	Number of polyps	
	Control (n=12)	PBIT (n=13)
0.5 mm >	6.25 ± 1.41	2.0 ± 0.52
0.5 ~ 1.0 mm	31.75 ± 3.58	10.77 ± 2.95
1.0 ~ 1.5 mm	21.58 ± 3.66	6.23 ± 1.79
1.5 ~ 2.0 mm	10.75 ± 2.36	2.46 ± 1.86
2.0 ~ 2.5 mm	2.75 ± 1.03	2.15 ± 0.82
2.5 mm <	2.08 ± 0.77	0.92 ± 0.38
Total	75.17 ± 10.33	25.54 ± 6.16*

Values represent mean ± standard error.

*Significantly different from control at $p < 0.05$.

Table 2. Incidence and multiplicity of polyps developed from large intestines of *Apc^{Min/+}* mice

	Control (n=12)	PBIT (n=13)
Incidence (%)	4 (33.33)	2 (15.38)
Number of polyps	0.5 ± 0.23	0.15 ± 0.1*

Values represent mean ± standard error.

*Significantly different from control at $p < 0.05$.

2) 면역조직화학적 염색에 의한 iNOS의 발현

유전적으로 정상인 마우스의 회장 점막상피세포에서는 자연적으로 iNOS 단백질이 발현되었으며, 본 실험에 사용한 Min 마우스에서도 회장점막 상피세포에 모두 iNOS가 발현되었다. 폴립에서는 폴립의 분화 정도에 따라 표면 상피세포에만 특이적으로 발현이 되고 있는 경우와 표면상피세포 뿐만 아니라 폴립을 구성하는 전체상피세포에서 발현되고 있는 경우도 있었다. 어떤 경우에는 주변의 정상 용모상피세포는 특이적으로 발현되고 있는데 폴립은 발현이 미약하거나 없었다. iNOS의 발현은 대체로 점막 상피세포에 국한되었으며, 심부의 선와상피세포와 간질세포에서는 특이적인 염색소견을 관찰할 수 없었다. 대장의 경우에는 정상적인 점막상피에서는 아주 미약하게 발현되었으나, 폴립을 구성하고 있는 상피세포에서는 매우 강한 특이적인 염색반응이 관찰되었다 (Fig. 2, 3). PBIT를 투여한 군에서는 소장과 대장 모두 대조군에 비하여 염색의 강도와 부위가 감소하는 경향을 보이고 있었다.

3) 면역조직화학적 염색에 의한 COX-2의 발현

iNOS 단백질과는 달리 COX-2 단백질은 Min 마우스의 소장 점막의 간질세포에서 특이적으로 발현되었으며, 상피세포의 경우 간혹 특이적인 염색이 나타나는 세포가 관찰되었다. 대장에서는 간질세포에만 특이적인 염색이 관찰되었다. 폴립에서는 소장과 대장 모두 전적으로 간질세포에서만 특이적인 염색을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4, 5). PBIT를 투여한 군의 마우스 소화관에서는 대조군

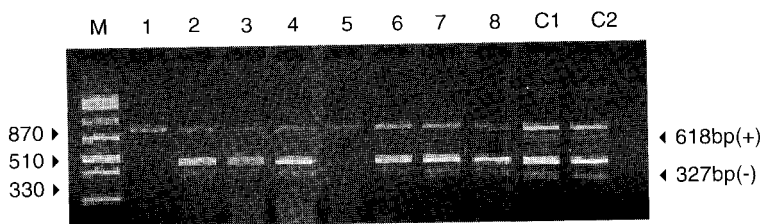


Fig. 1. Genotyping of *Apc^{Min/+}* mice by PCR. Target allele (-) appears at 327 bp. C1, C2: *Min/+* controls.



Fig. 2. Immunohistochemical localization of iNOS in small intestinal polyp. Note iNOS is expressed in surface epithelial cells of polyp and normal mucosa.

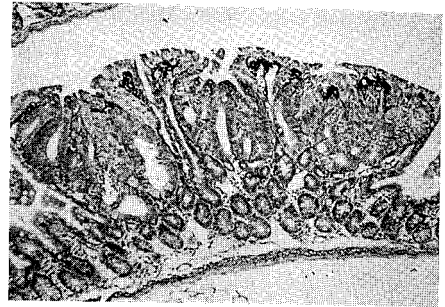


Fig. 4. Immunohistochemical localization of COX-2 in small intestinal polyp. Note COX-2 protein is expressed mainly in stromal cells.

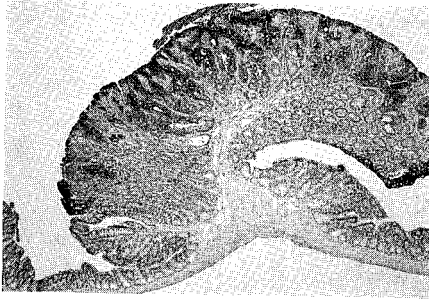


Fig. 3. Immunohistochemical localization of iNOS in large intestinal polyp. Note iNOS is expressed mainly in epithelial compartment.



Fig. 5. Immunohistochemical localization of COX-2 in large intestinal polyp.

에 비하여 COX-2의 면역조직화학적 발현이 감소하는 경향을 보이고 있었다.

고 찰

본 실험에서는 *Apc* 유전자의 돌연변이로 소장 과 대장에서 자연적으로 많은 수의 폴립이 발생하는 *Min* 마우스에서 폴립발생에 미치는 NO의 역할을 파악하기 위하여 장상피세포에서 NO를 과량생산하는 것으로 알려진 iNOS를 억제하고 그 결과를 관찰하였다. iNOS는 선택적 억제제인 PBIT를 사료로 투여하였고 일반사료를 급여한 대조군 마우스에 비하여 소장의 폴립발생수와 크기가 유의적으로 현저히 감소한 결과를 보임으로써 iNOS에 의하여 생산된 NO가 *Min* 마우스의 폴립발생에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

Garvey등의 연구에 의하면 PBIT의 iNOS에 대한 특이성은 eNOS나 nNOS에 비하여 월등하다.¹⁶⁾

PBIT는 구조적으로 guanidine과 유사하기 때문에 L-arginine의 guanidine 부분에 경쟁적으로 결합함으로써 억제하는 것으로 생각된다. 사람에서 발생한 대장암과 발암물질로 실험적으로 유발된 대장암에서 iNOS가 증가한다는 것은 이미 많이 보고되고 있다. 대장암 발생과정에 기여하는 iNOS와 COX-2의 정확한 병리생리적인 기능은 알기 어렵다. 최근의 보고에 의하면 iNOS는 진행단계에 있는 종양세포를 촉진함으로써 종양의 발생에 기여한다. 내인성 발암위해성(endogenous carcinogenic risk)을 떠나 NO는 내피세포성장인자이기도 하며 혈관의 신생을 매개함으로써 혈량을 조절하는 기능을 한다. 본 실험을 통하여 iNOS의 선택적 억제제인 PBIT 투여가 *Min* 마우스의 폴립발생을 억제하였다는 사실은 iNOS가 종양의 발생과정에 중요한 일정부분을 담당하고 있음을 말하는 것이다. PBIT가 랫드에서 대장암 유발물질 azoxymethane을 투여하여 유발된 전암단계병변인 대장이상선

세포소(aberrant crypt foci; ACF)의 수를 유의성 있게 감소시켰다는 보고가 있다.⁷⁾ 이것은 본 연구 결과와 일치하는 것으로 생각된다. 사람의 대장암에서는 iNOS의 활성이 COX-2의 활성을 조절하는 것으로 보인다. 일부 *in vitro* 실험결과에 의하면 NO는 여러 유형의 세포에서 COX-2의 활성과 발현을 조절하는 것으로 보인다. 본 실험결과 중 PBIT를 투여한 마우스에서 실시한 COX-2 면역조직 염색결과는 이러한 사실을 뒷받침하는 것이다. 다만 본 실험에서는 western blotting을 통하여 이러한 사실을 보다 분명하게 할 필요가 있다.

지금까지 종양발생과정에 관여하는 NO의 역할에 관한 연구는 iNOS에 의하여 생산된 NO만을 대상으로 한 것이 대부분이었으며, cNOS에 의한 것은 거의 없었다. 아마도 cNOS는 생리적으로 항상성을 조절하는 중요한 역할을 하기 때문에 종양을 촉진하는 역할을 하고 있는 것으로는 추정하지 않았기 때문으로 생각된다. eNOS는 혈관에서만 특이적으로 생산되어 혈관이완을 주로 담당하기 때문에 이 유전자가 결핍된 동물은 자연적으로 고혈압을 나타내는 것으로 보고되어있다. 그러므로 *Apc^{Min/+} eNOS^{-/-}* 마우스를 생산하면 eNOS 자체가, 종양세포의 성장에 어떠한 역할을 하고 있는 지를 이해하는데 도움을 줄 뿐만 아니라, 간접적으로 만성적인 고혈압이 종양의 발생에 미치는 영향도 추정할 수 있을 것으로 사료된다.

현재 세계적으로 iNOS와 COX-2처럼 cytokine이 tumor promoter 등에 의하여 그 생산량이 많이 증가될 수 있는 효소를 특이적으로 억제하는 약물의 개발에 많은 연구가 진행중이다. 이들 효소에 여러 가지 종양에 개입하고 있음이 알려지고 있으며, 이들 효소를 억제하였을 때 암예방 효과가 나타나는지를 조사하는 것은 매우 흥미로운 연구주제가 되고 있다. 그러나 현재 사람에서는 COX-2가 생리적으로 어떠한 역할을 하는지의 알려진 것이 없기 때문에 이것을 선택적으로 장기간 억제했을 때 나타날 수 있는 잠재적인 부작용에 대한 연구가 선행되어야 하며 그 결과를 바탕으로 보다 안전한 화학적 암예방 물질을 개발할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구결과를 통하여 iNOS의 선택적 억제제인 PBIT는 부작용 없이 그러한 효과를 충분히 기대할 수 있는 대안의

하나로 보다 심도있는 연구가 이루어져야 할 것이다. 아울러 임상적으로 사람을 대상으로 하여 그러한 효과를 시급히 조사하여야 할 것으로 사료된다.

결 론

사람의 가족성 선종성 폴립증과 대장암 모델로 각광받고 있는 Min 마우스에서 발생하는 소장과 대장의 폴립에서 일산화질소(nitric oxide; NO)가 기여하는 역할을 규명하기 위하여 NO를 많이 생산하는 효소인 iNOS를 특이적으로 억제하는 화학물질인 PBIT를 사료에 급여하여 소장과 대장에서 발생하는 폴립의 수와 크기를 측정하였다. PBIT를 투여한 마우스에서는 대조군 마우스에 비하여 소장에서는 폴립의 수와 크기가 모두 유의성 있게 감소하였으며, 대장에서도 발생률과 개수가 유의성 있게 감소함을 관찰하였다. 이러한 결과는 Min 마우스의 소화관 폴립발생과정에 NO가 중요한 역할을 하고 있음을 의미하며 iNOS의 특이적 억제제인 PBIT는 효율적인 대장암의 화학적 암예방 물질로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고 문헌

- 1) Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170.
- 2) Kim DJ, Kang JS, Ahn B, Jang DD. Chemoprevention of colon cancer by indole-3-carbinol (I3C). *The 8th Asian Congress of Nutrition, Seoul, Korea*, pp. 57-58. S 2-5, Seoul, 1999.
- 3) Han BS, Kim DJ, Ahn B, Kim KS, Kang JS, Moon JY, Kim DY, Jang DD. Chemopreventive effects of chitosan on rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane. *Ann Rep KFDA* 1998; 2: 543-551.
- 4) Tsuda H, Sekine K, Nakamura J, Ushida Y, Kuhara T, Takasuka N, Kim DJ, Asamoto M, Baba-Toriyama H, Moore MA, Nishino H, Kakizoe T. Inhibition of azoxymethane initiated colon tumor and aberrant crypt foci development by bovine lactoferrin administration in F344 rats. *Adv Exp Med Biol* 1998; 443: 273-284.
- 5) Lala PK, Orucevic A. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer Metast Rev* 1998; 17: 91-106.
- 6) Ambs S, Merriam WG, Bennett WP, Felley-Bosco E, Ogunfusika MO, Oser SM, Klein S, Shields PG,

- Billiar TR, Harris CC. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res* 1998; 58: 334-341.
- 7) Ambs S, Ogunfusika MO, Merriam WG, Bennett WP, Billiar TR, Harris CC. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8823-8828.
 - 8) Rao CV, Kawamori T, Hamid R, Reddy BS. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci by an inducible nitric oxide synthase-selective inhibitor. *Carcinogenesis* 1999; 20: 641-644.
 - 9) Hoffman RA, Zhang G, Nussler NC, Gleixner SL, Ford HR, Simmons RL, Watkins SC. Constitutive expression of inducible nitric oxide synthase in the mouse ileal mucosa. *Am J Physiol* 1997; 272(2 Pt 1): G383-92.
 - 10) Dove WF, Gould KA, Luongo C, Moser AR, Shoemaker AR. Emergent issues in the genetics of intestinal neoplasia. *Cancer Surv* 1995; 25: 335-355.
 - 11) Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; 12: 1063-1073.
 - 12) Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 1990; 247: 322-324.
 - 13) Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, Gould KA, Dove WF. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the *APC* gene [published erratum appears in *Science* 1992; 256(5060): 1114]. *Science* 1992; 256: 668-670.
 - 14) Dietrich WF, Lander ES, Smith JS, Moser AR, Gould KA, Luongo C, Borenstein N, Dove W. Genetic identification of *Mom-1*, a major modifier locus affecting *Min*-induced intestinal neoplasia in the mouse. *Cell* 1993; 75: 631-639.
 - 15) Moolenbeek C, Ruitenberg EJ. The "Swiss roll": a simple technique for histological studies of the rodent intestine. *Lab Anim* 1981; 15: 57-59.
 - 16) Garvey EP, Oplinger JA, Tanoury GJ, Sherman PA, Fowler M, Marshall S, Harmon MF. Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. *J Biol Chem* 1994; 269: 26669-26676.
-