

## 다장기 중기발암성 시험법을 이용한 셀렌염의 대장암 억제효과에 대한 연구

한법석 · 홍충만 · 신동환 · 이국경 · 안병우 · 장동덕  
국립독성연구소 일반독성부

### The Chemopreventive Effects of Sodium Selenite on Colon Carcinogenesis in Medium-Term Multi-Organ Bioassay

Beom Seok Han, Choong Man Hong, Dong Hwan Shin, Kookkyung Lee, Byeongwoo Ahn and Dong Deuk Jang  
General Toxicology Department, National Institute of Toxicological Research, KFDA, Seoul 122-704, Korea

**Abstract:** This study was conducted to assess the chemopreventive effects of sodium selenite in the rat medium-term multi-organ bioassay using a DMBDD model (DEN+MNU+BBN+DMH+DHPN). Seventy five, 6-week-old, male SD rats were divided into 3 groups. The animals in group 1 received DEN(diethylnitrosamine, 100 mg/kg bw, single i.p., in saline), MNU (N-methyl-nitrosourea, 20 mg/kg bw, i.p., 4 times for 2 weeks), BBN (N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine, 0.2% in drinking water for 2 weeks), DMH (1,2-dimethylhydrazine, 40 mg/kg bw, s.c., in saline, 4 times for 2 weeks), and DHPN (N-bis(2-hydroxy-propyl)nitrosamine, 0.1% in drinking water for 2 weeks), then were placed on sodium selenite (4 ppm in drinking water) for 22 weeks from weeks 4 to 26. The animals in group 2 were given DMBDD alone. The animals in group 3 were given sodium selenite alone. Animals were sacrificed at week 12 for ACF quantitative analysis and at week 26 for tumor induction. The body weights in the group 1 were significantly decreased compared with those of group 2. The tumor multiplicities of large intestine in the group 1 were significantly decreased compared with those of group 2 (P<0.05). These results indicate that sodium selenite may have a potential as chemopreventive agents of colon carcinogenesis.

*Key words:* chemoprevention, sodium selenite, multi-organ carcinogenesis

## 서 론

암 예방물질의 검색을 효율적으로 하기 위한 중기발암성 시험법 중 다장기 중기발암성 시험법은 시험물질이 여러 장기에 미치는 발암수식효과를 동시에 확인할 수 있는 시간적, 경제적 이점이 있는 시험법이다.<sup>1-7</sup>

셀렌(Selenium: Se)은 사람뿐만 아니라 가축의 음식에도 포함되어 있고 특히 새우나 고기, 유제품 및 곡류에 다량 함유되어 있다. 인체에서 셀렌은 세포의 과산화를 막아주며 세포막의 지질을 보호하고 산화제나 활성유리기에 의한 단백질이나 핵산의 손상을 막아주는 glutathione peroxidase의 한 구성 성분이다. 역학조사에서 인체의 암 사망률의 감소는 셀렌이 담긴 곡류섭취의 증가와 상관성이 있다.<sup>8</sup> 실험동물에서는 셀렌이 benzo(a)pyrene과 dimethyl benzantracene으로 유발한 피부암모델에서의 발암억제효과, asbestos에 의해 유발된 폐암의 억제효과, 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH)와 azoxymethane (AOM)에 의해 유발된 대장암 억제효과, N-nitrosobis(2-oxypropyl)amine에 의해 유발된 췌장암의 억제효과, diethylnitrosamine (DEN)으로 유발한 간암의 발암억제효

과에 관한 연구가 이루어져 왔다.<sup>9-11</sup>

본 연구는 다장기 중기발암성 시험법의 일종인 DMBDD 발암성 시험법을 이용하여 식품성분인 셀렌염의 암예방 효과를 관찰하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

식품의약품안전청 국립독성연구소 실험동물자원실에서 생산한 Sprague-Dawley계 수컷 랫드 75 마리를 사용하였다. 이들은 랫드용 사육상자에 4마리씩 넣어 사육하였고 실험기간 동안의 사육환경은 23±2°C, 상대습도 55±10%를 유지하고 인공 조명(12시간 점등, 12시간 소등)하에서 사육하였으며 사료(실험동물용 펠렛사료, 신촌사료)와 정제수는 자유로이 급이하였다.

### 2. 실험설계 및 시험물질 투여

실험동물은 Fig. 1에서와 같이 3군으로 나누어 각 군에 25 마리씩 각각 배정하였다. 실험 1군과 2군은 시험개시일에 간암유발물질인 DEN (CAS No. 55-18-5, D0516; Sigma

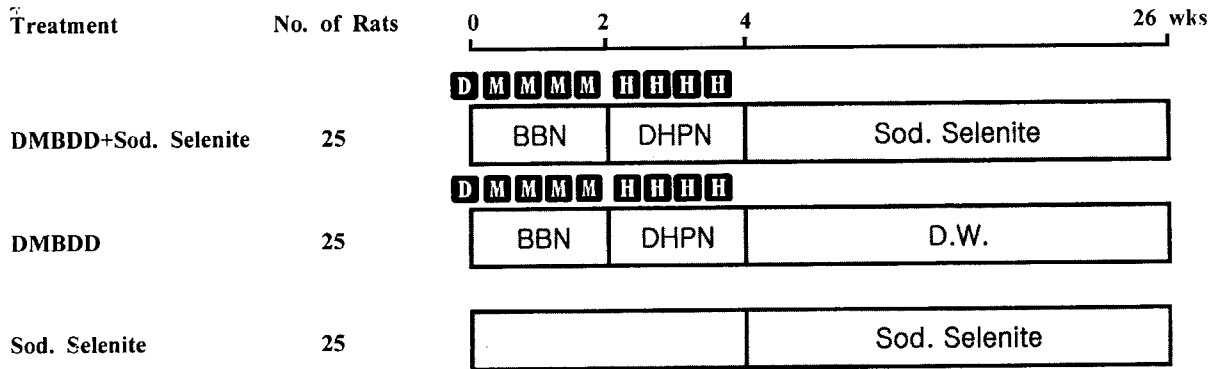


Fig. 1. Experimental Protocol for a medium-term multiorgan bioassay

DMBDD : DEN+MNU+BBN+DMH+DHPN  
 DEN (D): 100 mg/kg bw, single i.p.  
 MNU (M): 20 mg/kg bw, i.p., 4 times for 2 weeks  
 BBN : 0.2%(w/w) in drinking water for 2 weeks  
 DHPN : 0.1%(w/w) in drinking water for 2 weeks  
 DMH (H) : 40 mg/kg bw, s.c., 4 times for 2 weeks  
 Sodium selenite were given in drinking water at a dose of 4 ppm.

Chemical Co. Ltd., USA)을 체중 kg 당 100 mg씩 1회 복강 투여 하였다. 실험 개시일부터 2주까지 2주 동안 다장기 발암 유발물질로 MNU (CAS No. 306-37-6, D 4137, Sigma Chemical Co., USA)를 체중 kg당 20 mg씩 4회 피하로 투여 하였다. 실험개시일부터 2주까지 간암과 폐장암을 동시에 유발하는 N-bis(2-hydroxy propyl)nitrosamine (DHPN; CAS No. 53609-64-6; Nakarai Tesque, Inc., Kyoto, Japan)을 0.1%농도로 음수로 2주간 투여하였고, 실험개시 2주부터 4주까지 방광암을 유발하는 N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN; CAS No. 3817-11-6, D 1349, Tokyo chemical Co., Tokyo, Japan)을 0.2% 농도로 음수로 2주 동안 공급하였다. 실험 1군과 3군은 4주부터 부검일까지 셀렌염을 4 ppm 농도로 음수로 투여하였고, 실험 2군은 실험개시 4주부터 부검일까지 일반 음수를 공급하였다.

3. 병리조직학적 관찰

모든 실험동물은 실험개시 12주와 26주에 부검하였다. 부검 전 24시간 동안 절식시킨 다음 이산화탄소 마취 후 흉대동맥을 절단하여 방혈하고 부검을 실시하였다. 실험 12주와 26주에 각 군에서 부검하여 전 장기를 육안으로 검사하여 병변이 있는지의 여부를 관찰하였고, 간장, 신장, 비장, 및 고환의 장기무게를 측정하고 전 장기를 적출하여 10% 중성완충포름알린 용액에서 고정한 다음 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하고 3-5 μm으로 박절하여 조직표본을 만든 후 헤마톡실린-에오신 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

4. 대장 이상선와소 (ACF)의 측정

랫드의 대장점막의 이상선와소 (ACF)는 Bird 등<sup>12</sup>의 방법에 준해서 염색을 실시한 후 관찰하였다. 실험개시 후 12주에 채

취한 대장조직을 생리식염수로 내장을 부풀리고 세척한 후, 결장부터 항문까지 장간막 면을 따라 절개하여 여과지에 대장 조직을 펼쳐 10% 완충포름알린에 고정하였다. 고정한 조직은 하행결장의 일정한 부위를 1 cm<sup>2</sup> 정도의 넓이로 자른 후 0.2% 메틸렌 블루 용액으로 1-2분간 처리하였다. 처리된 조직을 입체현미경 또는 광학현미경 (X40, X100)으로 관찰하여 ACF의 수를 측정하였고, 단위면적은 영상분석기 (Kontron Co. Ltd., Germany)를 이용하여 측정하였다.

5. 자료의 통계처리

체중의 변화, 장기중량, ACF의 수에 대한 유의성을 검정하기 위하여 Duncan's t-test로 통계처리 하였고 각 장기의 전암 병변 및 종양 발생률에 대한 유의성 검정을 위해 Likelihood ratio Chi-square test로 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 체중의 변화

각 군에 있어서 실험 기간 동안 체중의 변화를 측정한 결과 실험 1군부터 3군까지의 체중은 모두 실험개시일 부터 점차적으로 증가하는 경향을 보였다. 실험 1군과 실험 3군은 실험 2군에 비하여 체중이 유의성있게 감소하였다(P<0.01).

2. 장기무게의 변화

실험 26주에 부검한 모든 동물의 간장, 신장, 비장, 고환의 상대중량의 변화를 분석한 결과는 table 1과 같다. 간장의 상대중량의 경우 셀렌염 투여군이 DMBDD 단독투여군에 비하여 유의성있게 감소하였다 (P<0.01). 뇌의 경우 셀렌염 투여군이 DMBDD 단독투여군에 비하여 유의성있게 증가하였다

**Table 1.** Body weight and relative organ weight of rats

Treatment	Body weight		Relative organ weight(%)					
	0 wk	26wk	Liver	Kidney	Heart	Brain	Spleen	Testis
DMBDD+Se	207.1±11.0	399.8±48.6*	2.75±0.21*	0.84±0.05	0.33±0.04	0.57±0.05*	0.20±0.02	0.85±0.025*
DMBDD	209.0±13.9	580.4±22.5	3.01±0.23	0.77±0.11	0.03±0.02	0.41±0.03	0.21±0.05	0.58±0.03
Se alone	208.1±12.2	641.8±38.4	3.40±0.26	0.66±0.04	0.29±0.03	0.39±0.03	0.16±0.02	0.58±0.04

DMBDD: "DEN+MNU+BBN+DMH+DHPN" treatment.

Se: Sodium selenite.

\*: Significantly different from the values of the DMBDD alone group at P<0.01.

**Table 2.** Numbers of the aberrant crypt foci (ACF) and multiplicities of colon tumors

Treatment	ACF		No. of tumors/colon
	12 weeks (n=10)	26 weeks (n=15)	
DMBDD+Se	109.74±24.38	243.6±88.4	0.45±0.21*
DMBDD	120.81±27.23	322.6±126.6	1.80±0.37
Se alone	0	0	0

DMBDD: "DEN+MNU+BBN+DMH+DHPN" treatment.

ACF: Aberrant crypt foci in the colonic mucosa.

Se: Sodium selenite.

\*: Significantly different from the values of the DMBDD alone group at P<0.05.

(P<0.01). 고환의 경우 셀렌염 투여군이 DMBDD 단독투여군에 비하여 유의성있게 증가하였다 (P<0.01). 그밖에 다른 장기에서는 유의성이 인정되지 않았다.

**3. 육안소견**

실험 12와 26주에 부검한 육안소견으로는 DMBDD를 투여한 실험 1군과 2군의 간장의 각 엽에 직경 1 mm 내외의 황백색 또는 백색 반점이 소수 산재하였고, 폐의 경우 직경 1-2 mm 가량의 백색 반점이 소수 관찰되었다. 또한 방광의 경우에는 점막의 비후 및 유두상 돌기가 관찰되었으며 대장의 경우에는 크기와 모양이 다양한 황백색 또는 적색조의 결절들이 장점막 면을 향해 돌출된 소견이 관찰되었다.

**4. 대장이상선와소 (ACF) 및 종양 발생빈도**

실험 12주와 26주에 부검하여 관찰한 대장점막의 ACF 및 종양 발생률은 table 2와 같다. ACF의 수가 각 군에서 유의성 있게 관찰되지는 않았으나, DMBDD와 셀렌염 투여군이 DMBDD 단독투여군에 비하여 감소하는 경향을 보였다. 또한 개체 당 종양 발생빈도에 있어서 26주에 부검한 경우 DMBDD와 셀렌염 투여군이 DMBDD 단독투여군에 비하여 유의성있게 감소하였다(P<0.05).

**5. 병리조직학적 소견**

실험 26주에 부검한 각 군의 병리조직학적 소견은 table 3과 같다. 간장의 변이세포소는 DMBDD를 투여한 모든 군에서 관찰되었다. 대장의 경우 선암종에서 셀렌염 투여군이 감소하는 경향을 보였다. 폐의 경우 폐포상피과형성과 선종은

**Table 3.** Histopathological findings of preneoplastic and neoplastic lesions

Organ/Lesions	Treatment	DMBDD (n=15)	DMBDD +Se (n=12)
	Liver		
altered foci		15(100)	12(100)
Lung			
hyperplasia		5(33)	2(17)
adenoma		4(27)	1(8)
hyperplasia+adenoma		9(60)	3(25)
Small intestine			
lymphoid hyperplasia		3(20)	0
Large intestine			
adenoma		2(20)	2(17)
adenocarcinoma		7(47)	2(17)
adenoma+adenocarcinoma		9(67)	4(34)
Adrenal gland			
cortical hyperplasia		1(7)	0
Pancreas			
altered foci		1(7)	2(17)
Kidney			
altered tubules		1(7)	2(17)

DMBDD: "DEN+MNU+BBN+DMH+DHPN" treatment.

Se: Sodium selenite

Parentheses represent percentage of incidence.

DMBDD를 투여한 두 군에서 모두 관찰되었다. 신장의 경우 변이세뇨관(altered renal tubule)이 DMBDD와 셀렌염을 투여한 군에서 관찰되었다. 그 외에 소장 림프구 과형성과 선종

, 방광의 상피세포 과형성, 췌장의 변이세포소(altered foci), 갑상선의 선종, 간장의 담관종(cholangioma) 및 간세포암종 등이 소수 관찰되었다.

## 고 찰

본 연구에서는 중기 다장기 발암성 시험법의 하나인 DMBDD 시험법을 이용하여 셀렌염의 발암수식효과를 관찰한 결과, 셀렌염은 대장암의 마리 당 종양발생수의 유의성있는 감소는 물론 전암병변인 대장이상선화소 및 대장의 선암종의 발생률을 감소시키는 경향을 보여 대장암 예방효과를 확인할 수 있었다.

본 실험에서 사용한 셀렌은 항산화 작용이 있는 천연물질이다. 이러한 물질들의 발암억제효과 기전은 체내의 과산화지질의 형성을 억제하는 효소를 활성화·촉진시킴으로써 발암 억제효과를 나타낸다.<sup>13</sup> 본 실험에서의 셀렌염은 대장암 예방효과가 있었는데 이는 Jacobs 및 Finley와 Davis의 연구결과와 일치한다.<sup>16,17</sup> 이에 대한 발암억제기전은 발암유발물질인 DMH가 간에서 대사되는 과정에서 셀렌염이 해독효소인 glutathione-S-transferase를 활성화시켜 전자친화적인 발암물질의 작용을 차단하는 것으로 추정된다. Caroli 등도 대장암환자의 경우 혈청 내에 셀렌의 함유량과 glutathione peroxidase 수준이 정상인보다 낮게 관찰되어 셀렌이 대장암예방효과에 관여하고 있음을 주장하였다.<sup>16</sup> Reddy 등은 유기셀렌 (organoselenium)인 benzylselenocyanate (BSC)가 대장암 발생률과 마리당 종양발생수를 유의성있게 감소시켰으며 신장, 대장, 소장점막에서도 glutathione peroxidase의 활성도를 증가시켜 BSC가 대장암을 예방할 수 있다고 주장하였다.<sup>17</sup>

무기셀렌(inorganic selenium)도 대조군에 비하여 신장, 대장과 소장의 점막에서의 glutathione peroxidase의 활성도를 증가시켜 이 효소가 대장의 발암기전에 관여됨을 알 수 있다.<sup>18</sup> Methylazoxymethanol acetate를 투여한 후 간장과 대장 점막에서 과산화 정도를 24시간 측정된 결과 3-6시간 후에 유의성있게 증가되며, 따라서 이와 같은 지방과산화와 관련한 대장암의 발암기전에 대하여 셀렌이 암예방 효과를 나타내는 것으로 여겨진다.<sup>19</sup> 셀렌염은 투여시기에 따라서 발암억제효과에 대한 결과가 다르다. Nayini 등은 발암개시전단계(preinitiation)보다는 발암개시후단계(postinitiation)에서 결장의 선암종이 더 감소함을 보고하였다.<sup>20</sup> Reddy 등은 셀렌이 발암개시전 단계에서는 선종의 발생률만 줄어든 것에 반해, 발암개시후 단계에서는 선종과 선암종의 발생률 모두 유의성있게 감소하였음을 보고하였다.<sup>18</sup>

본 실험의 셀렌염 투여군에서 체중 및 간장의 상대증량이 감소한 것은 장기간 투여에 의한 독성반응으로 사료되며 대장의 종양발생률의 저하와도 관련이 있는 것으로 사료된다. 또한 뇌와 고환의 상대증량은 셀렌염 투여군이 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였는데 조직학적으로 뇌와 고환의 조

직을 관찰한 결과 특이할 만한 이상소견은 발견되지 않았다.

중기 발암성 시험법은 시험물질에 따라 다양하게 모델을 선택할 수 있으며 본 실험에서 사용한 중기 발암성 시험법은 간장, 대장, 방광, 폐장의 발암수식효과를 관찰하기에 적합한 실험법이다. 중기 발암성 시험법은 국내는 물론이고 일본에서 주로 연구된 시험법으로 발암성 시험법과 결과가 상당히 일치하기 때문에 이에 대한 연구결과를 기초로 하여 시험물질의 암 예방효과를 검색하는데 유용한 자료를 제공해 줄 수 있다.

## 참고문헌

- Ito N, Imaida K, et al. Wide-spectrum initiation models: possible applications to medium-term multiple organ bioassays for carcinogenesis modifiers. *Jpn. J. Cancer Res.*, **79**: 413-417, 1988.
- Ito N, Tatematsu M, et al. Medium-term bioassay system for selection of carcinogen and modifiers of hepatocarcinogenesis utilizing the GST-P positive liver cell focus as endpoint marker. *Toxicol. Pathol.*, **117**: 630-641, 1989.
- Ito N, Hasegawa R, et al. Medium-term liver and multi-organ carcinogenesis bioassays for carcinogens and chemopreventive agents. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **48**: 113-119, 1996.
- Ito N, Hasegawa R, et al. Medium-term rat liver bioassay for rapid detection of hepatocarcinogenic substances. *J. Toxicol. Pathol.*, **10**: 1-11, 1997a.
- Ito N, Hasegawa R, et al. Carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP) in the rat. *Mut. Res.*, **376**: 107-114, 1997b.
- Kim DJ, Lee KK, et al. Biphasic modifying effect of indole-3-carbinol on diethylnitrosamine-induced preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive liver cell foci in Sprague-Dawley rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**: 578-583, 1994a.
- Shirai T. A medium-term rat liver bioassay as a rapid in vivo test for carcinogenic potential: A historical review of model development and summary of results from 291 tests. *Toxicol. Pathol.*, **25**: 453-460, 1997.
- Shamberger RJ. *Biochemistry of Selenium*. New York : Plenum Press, pp. 243, 1983.
- Standnikova NM, Kleimenova EV, et al. The sodium selenite inhibition of asbestos-induced carcinogenesis in Wistar rats. *Vopr. Onkol.*, **37**: 1077-1081, 1991.
- Balansky RM, Blagoeva PM, et al. Modulation of diethylnitrosamine carcinogenesis in rat liver and esophagus. *J. Cell Biochem.*, **56**: 449-454, 1994.
- Nishikawa A, Furukawa F, et al. Effects of caffeine, nicotine, ethanol and sodium selenite on pancreatic carcinogenesis in hamsters after initiation with N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Carcinogenesis*, **13**: 1379-1382, 1992.
- Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypt in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Res.*, **37**: 147-151, 1987.
- Surh YJ and Lee JM. Cancer chemoprevention by dietary phytochemicals: rationale and mechanisms. *Environmental Mutagen.*

- & Carcinogen., **18**: 1-8, 1998.
14. Jacobs MM. Selenium inhibition of 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, **43**: 1646-1649, 1983.
  15. Finley JW, Davis CD, et al. Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer. *J. Nutr.*, **130**: 2384-2389, 2000.
  16. Caroli S, Coni E, et al. A pilot study on colon cancer occurrence as related to serum selenium levels. *Ann Ist Super Sanita*, **30**: 243-247, 1994.
  17. Reddy BS, Sugie S, et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary organoselenium, benzylselenocyanate in F344 rats. *Cancer Res.*, **47**: 901-904, 1987.
  18. Reddy BS, Sugie, S. et al. Effect of dietary excess of inorganic selenium during initiation and postinitiation phases of colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Res.*, **48**: 1777-1780, 1988.
  19. Deschner EE and Zedeckm MS. Lipid peroxidation in liver and colon of methylazoxymethane treated rats. *Cancer Biochem. Biophys.*, **9**: 25-29, 1986.
  20. Nayini JR, Sugie S, et al. Effect of dietary benzylselenocyanate on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Nutr. Cancer*, **15**: 129-139, 1991.