

# N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine 유도 방광암 백서 모델에서 cyclooxygenase-2 억제제의 발암지연효과

## Cyclooxygenase-2 Inhibitor Delayed the Tumorigenesis of N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced Rat Urinary Bladder Cancer Model

Soo Mee Kwon, Hea Young Oh, Sun-Il Kim<sup>1</sup>, Sung Joon Hong

From the Departments of Urology, and the Urological Science Institute, Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, <sup>1</sup>Department of Urology, Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** Cyclooxygenase-2 (COX-2) plays an important role in promoting cancer cell proliferation and angiogenesis in human bladder cancer. The selective COX-2 inhibitor has antitumor activities *in vivo* and *in vitro* in a variety of tumor types. In this study, the antitumor or antiangiogenic effects of selective COX-2 inhibitor on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced rat bladder tumorigenesis were investigated.

**Materials and Methods:** Forty male Fischer 344 rats (Control group) were given only 0.05% BBN in water *ad libitum*, while 40 others (Experimental group) were administered 1,500mg/kg celecoxib once daily through the gavage tube, which started 1 week before the BBN treatment. Ten rats were used as the normal bladder. Ten rats from the control and experimental group were sacrificed 4, 12, 16, and 24 weeks after the start of the BBN treatment. All bladders were evaluated both macroscopically and microscopically. We also measured COX-2 expression, microvessel density (MVD), and vascular endothelial growth factor (VEGF) protein concentrations in the bladder tissues.

**Results:** Macroscopically and microscopically, the incidence of tumor was lower in the experimental group than in the control group from the 12th week to the 24th week. Each incidence of tumor in week 12, week 16, and week 24 was 20%, 50%, and 80% in the control group and 0%, 20%, and 40% in the experimental group, respectively. In both the control and experimental groups, COX-2 expression had a tendency to be concentrated in the cytoplasm of the epithelial cells of the papillary tumor and the endothelial cells adjacent to the vessel the basal layer of bladder. COX-2 and VEGF expression were significantly more decreased in the experimental groups than in the control groups after 4 weeks from the BBN induction ( $p < 0.05$ ). MVD was significantly decreased in the experimental group at week 16 ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** The selective COX-2 inhibitor has an inhibitory effect on BBN-induced rat bladder tumorigenesis because of its partially antiangiogenic properties. In the future, the selective COX-2 inhibitor could be expected to play an important role as a chemo-preventive agent and as therapeutic aids in bladder cancer if these inhibitory effects can be reproduced in human bladder tumorigenesis. (Korean J Urol 2004;45:578-584)

**Key Words:** Butylhydroxybutylnitrosamine, Bladder cancer, Angiogenic factor, VEGF, Factor VIII-related antigen

대한비뇨기과학회지  
제 45 권 제 6 호 2004

연세대학교 의과대학  
비뇨기과학교실, 비뇨의과학연구소,  
BK21 의과학과,  
<sup>1</sup>한양대학교 의과대학  
비뇨기과학교실

권수미 · 오혜영 · 김선일<sup>1</sup> · 홍성준

접수일자 : 2003년 12월 29일  
채택일자 : 2004년 5월 4일

교신저자: 홍성준  
연세대학교 의과대학  
비뇨기과학교실  
서울시 서대문구 신촌동  
134번지  
☎ 120-749  
TEL: 02-361-5806  
FAX: 02-312-2538  
E-mail: sjhong346@yumc.yonsei.ac.kr

## 서론

Cyclooxygenase-2 (COX-2)는 방광암의 발생과정에서 중요한 역할을 한다.<sup>1,4</sup> 특히 COX-2는 암세포가 자라는 데 필요한 혈관을 형성하는 과정과 밀접하게 연관되어 있어 방광암의 발생을 막기 위해서 COX-2를 억제하는 것이 중요하다.<sup>5</sup>

방광암의 발암과정 중 발암단계 이후 COX-2 억제에 대한 연구가 있다.<sup>6</sup> 그런데 방광암의 특성상 치료 후 재발 가능성이 높기 때문에 보다 현실적인 예방을 위해서는 방광암의 발암 이전에 COX-2를 억제할 수 있는 방법을 찾는 것이 중요하다. 그래서 본 연구에서는 발암 이전 단계에서의 COX-2를 억제할 수 있는지 알아보려고 하였다.

발암 이전 단계를 보기 위해서 발암까지의 과정을 단계별로 볼 수 있는 *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) 모델을 사용하였다.<sup>7</sup> 특히 BBN을 0.05% 투여 시, 4-8주 후 백서 방광상피에 단순 과증식, 8-12주 후 유두상 및 결절성 과증식, 그리고 12-16주 후에는 유두종 또는 암종으로 단계적인 발암과정을 보인다. 또한 BBN으로 유도된 백서의 방광암은 조직학적으로 인체 방광 이행상피암과 유사하여 발암과정 연구모델로 이용되고 있으며,<sup>6,8-11</sup> 혈관신생 및 VEGF발현이 전암과정인 단순 과증식으로부터 유두종 및 암종으로 진행될수록 더욱 증가하는 결과를 보여주어 혈관신생과정 연구에서도 활용되고 있다.<sup>8,10,12</sup>

이에 본 연구에서는 발암 이전 단계에서 COX-2 선택적 억제제의 효과를 보다 명확히 파악하기 위해서 BBN 모델의 4가지 단계별로 효과를 검증할 수 있도록 실험을 계획하여 COX-2 선택적억제제는 BBN 투여 1주 전부터 존대를 이용해서 24주까지 경구투여하였고, 단계가 변화되는 4주, 12주, 16주, 24주에 걸쳐 실험군의 COX-2 선택적억제제 효과를 살펴보았다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험동물과 식이

7주령 (200g)의 수컷 Fischer 344 백서 (SLC Inc., Shizuoka, Japan) 90마리를 구입하여 40마리는 0.05% BBN (Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, Japan)만을 투여한 군 (이하 대조군), 다른 40마리는 0.05% BBN투여와 함께 1,500mg/kg celecoxib (Pharmacia Searle & Co., San Juan, Puerto Rico)로 억제를 시도한 군 (이하 실험군), 나머지 10마리는 정상방광을 지닌 군 (이하 정상 방광군)으로 나누었다. BBN은 0.01% tween 80에 용해시켜 음용수에 혼합하여 자유롭게 섭취토록 하였

으며 celecoxib는 이전 연구<sup>13</sup>에서 사용된 1,500mg/kg 농도를 1% methylcellulose로 부유시킨 후 존대를 사용하여 BBN 투여 1주 전부터 매일 1회 경구투여하였다. 사육실은 온도 22±2°C, 상대습도 50±10%, 소음 40-50Phone 이하, 조명 12시간 명/암 및 무균조건이었으며 일반사료 (삼양사료(주), 서울, 한국)가 공급되었다. 모든 사육 백서는 음용수를 자유롭게 섭취토록 하였다. 상기의 모든 실험과정은 연세대학교 의과대학 실험동물 이용규정에 근거하여 수행되었다.

### 2. 육안 및 현미경적 관찰

각 군별 백서는 BBN 투여 후 4주, 12주, 16주, 24주에 에테르로 마취시킨 후 안락사시켰다. 적출된 방광은 확대경을 이용하여 육안으로 관찰한 다음 일부는 10% 인산염완충 포르말린에서 고정하였으며 나머지는 액체질소에 담근 후 -70°C에 보관하였다. 고정된 방광은 파라핀 블록 제작 후 조직박편을 만들어 헤마톡실린과 에오신으로 염색하였고, 현미경으로 관찰된 방광의 조직병변은 이전에 보고된 방법<sup>14</sup>을 근거로 하여 병리학자가 분류하였다.

### 3. COX-2와 von Willebrand factor의 면역조직화학염색

10% 인산염완충포르말린에 의해 고정된 방광조직은 5µm 두께로 파라핀 박편을 만들었으며, InnoGenex immunohistochemistry kits (InnoGenex, San Ramon, USA)를 사용하여 면역화학염색을 실시하였다. 일차항체로는 murine 다클론 anti-COX-2 항체 (1:100, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)와 토끼 다클론 anti-von Willebrand factor 항체 (1:100, InnoGenex, San Ramon, USA)를 사용하였다. 슬라이드를 탈파라핀화와 재수화시킨 후 펩신 (InnoGenex, San Ramon, USA)으로 37°C에서 5분간 항원을 재생시켰다. 이후 InnoGenex immunohistochemistry kits의 방법에 따라 0.3% 과산화수소수를 10분간 처리 후 5분간 수돗물로 씻었고 37°C에서 5분 동안 power block<sup>TM</sup> 시약으로 배양하였다. 과량의 시약을 제거한 다음 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 5분간 0.1% tween 20을 함유한 인산염완충식염수 (phosphate buffered saline containing 0.1% tween 20; PBS-T)로 씻었고 이차항체로 biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin (IgG)를 37°C에서 5분간 배양하였다. 발색제로 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC)을 사용하였다. 대조염색으로 Mayer's 헤마톡실린 (InnoGenex, San Ramon, USA)을 사용하였고 음성 대조군은 일차항체 대신 인산염완충식염수를 사용하였다.

### 4. COX-2발현의 변화

대조군과 실험군의 상대적인 COX-2 발현 변화를 측정하기 위하여 COX-2 면역염색된 슬라이드에서 COX-2 발현밀

도를 image analyzer (MetaMorph Version 4.6r5 Image analyzer, Universal Imaging Co., Downingtown, USA)로 정량적으로 분석하였다. 염색된 각 슬라이드는 Olympus Microscope-Trinocular (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 먼저 저배율 (x40)로 관찰하고 COX-2 발현이 높은 부분을 확인한 후 여러 부분을 선택하여 고배율 (x200)에서 Olympus Camera-Digital CCD Digital Image Capture Application (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 얻은 이미지를 JPEG file (24-bit)로 저장하였다. COX-2 발현 밀도는 측정된 총 면적 (total area)에 대한 COX-2 발현 면적 (threshold area)의 비율 (% threshold area)로 계산하였으며 변수는 평균 및 표준편차로 기술하였다.

**5. Microvessel density**

상대적인 미세혈관 밀도를 살펴보기 위해 MetaMorph Version 4.6r5 Image analyzer (Universal Imaging Co., Downingtown, USA)를 이용하여 MVD를 측정하였다. 이전연구방법<sup>9</sup>을 참고하여 토기 다클론 anti-von Willebrand factor 항체로 미세혈관을 염색시킨 각 슬라이드는 COX-2 발현 밀도 분석과 동일한 방법으로 이미지를 얻었다. 이 때 혈관내부의 염색된 세포나 불분명한 내피세포는 미세혈관으로 정의하지 않았다. MVD는 측정된 총 면적 (total area)에 대한 미세혈관의 면적 (threshold area) 비율 (% threshold area)로 계산하였으며 변수는 평균 및 표준편차로 기술하였다.

**6. VEGF 단백질의 정량화**

백서 방광의 VEGF 농도를 ELISA kit (Quantikine M, R&D Systems, Minneapolis, USA)를 이용하여 측정하였다. 군별로 각각의 동결된 방광조직 50mg에서 차가운 RIPA lysis buffer (50mM HEPES, pH7.6, 150mM NaCl, 0.1% NP-40, 10µl/ml PMSF, 10µl/ml aprotinin)로 단백질을 추출한 후 정제된 recombinant VEGF-A protein의 표준농도곡선과 비교하여 농도를 산출하였다. Spectra MAX340 ELISA plate reader (Molecular Device, Sunnyvale, USA)를 사용하여 450nm에서 측정하였다.

**7. 통계처리**

두 군 간의 비교는 비모수 통계법으로 Mann-Whitney U test (SPSS for Windows, 10th version, SPSS Inc., Chicago, USA)를 이용하였고 p값이 0.05 미만인 경우 의미가 있는 것으로 판정하였다.

**결 과**

**1. 육안적인 변화**

발암 이전 단계에서의 COX-2 선택적억제제의 효과를 보기 위해 방광을 육안으로 관찰한 결과, BBN만 투여한 대조군에서 12주에 정상방광과는 구별이 되는 결절이 관찰되었고 16주와 24주에는 종괴가 관찰되었다 (Fig. 1A). BBN과 COX-2 선택적억제제를 병용투여한 실험군에서는 12주에 육안적으로 결절이 발견되지 않았으나 16주에 결절이 관찰되었고 24주에 종괴가 관찰되었다 (Fig. 1A). 육안적으로 관찰된 대조군과 실험군의 총 종괴수와 크기는 12주부터 실험군에서 감소하였다 (Table 1). 대조군의 총 종괴수와 크기는 12주, 16주, 24주 각각 6 (지름 3-5mm), 8 (지름 3-5mm), 30 (지름 2-10mm)이었고, 실험군은 12주, 16주, 24주 각각 1 (지름 1mm), 8 (지름 <3mm), 19 (지름 3-7mm)이었다.

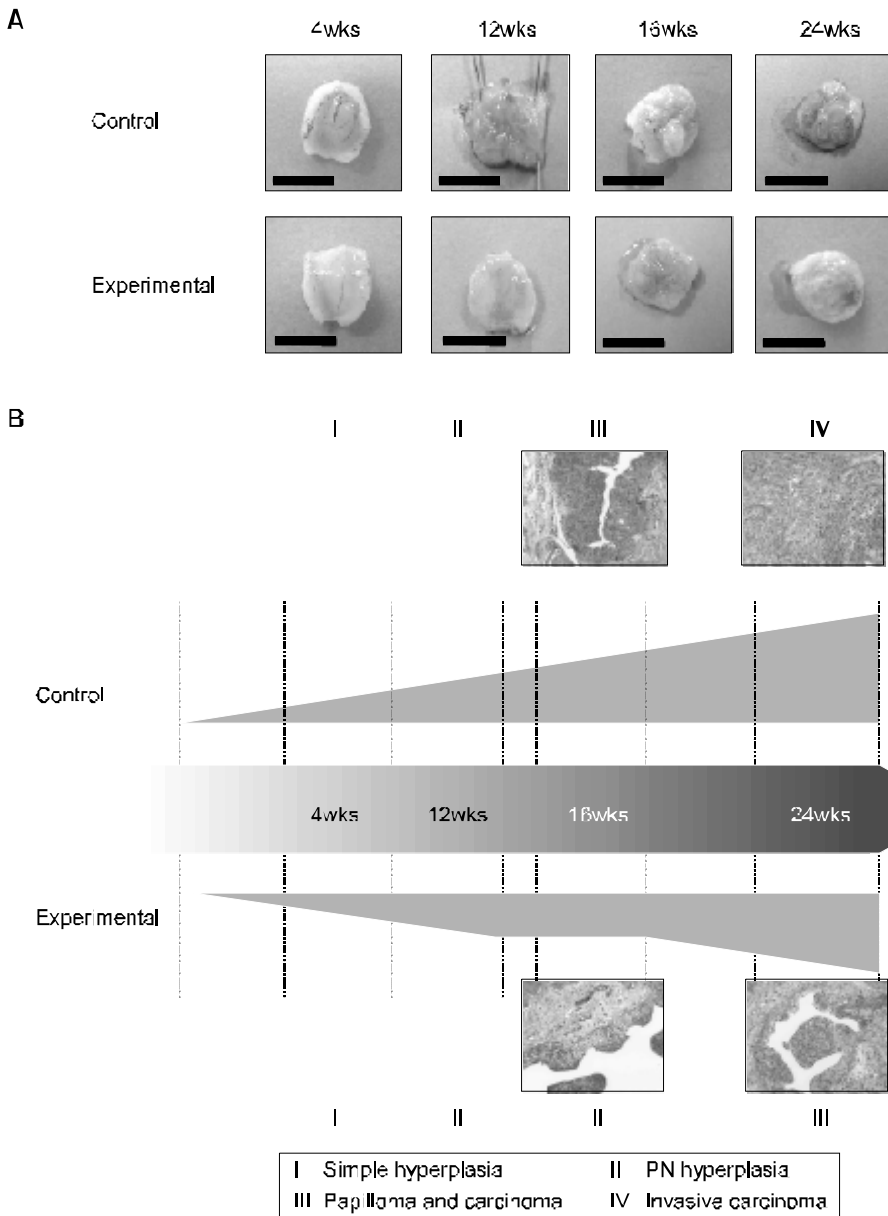
**2. 현미경적인 변화**

발암과정에서 COX-2 선택적억제제의 효과를 보기 위해 방광을 현미경으로 관찰하여 얻어진 결과를 조직학적으로

**Table 1.** Macroscopic and microscopic findings in BBN-induced rat bladder tumorigenesis\*

Weeks	Group (n=10)	No. of total mass <sup>†</sup>	Incidence (%) <sup>‡</sup>	
			Preneoplastic lesions	Cancer
4	Control	0 Ø1mm	50	0
	Experimental	0 Ø1mm	40	0
12	Control	6 Ø3-5mm	100	20 (2/10)
	Experimental	1 Ø1mm	100	0
16	Control	8 Ø3-5mm	100	50 (5/10)
	Experimental	8 Ø<3mm	100	20 (2/10)
24	Control	30 Ø2-10mm	100	80 (8/10)
	Experimental	19 Ø3-7mm	100	40 (4/10)

\*The drinking water is freely accessed by dissolving 0.05% BBN in tap water with 0.01% tween 80 (삼전화학(주), 경기도, 한국) as a solubilizer. Control groups mean 0.05% BBN-treated rats and experimental groups mean 1,500mg/kg selective COX-2 inhibitor and 0.05% BBN-treated rats. <sup>†</sup> Number of total mass was defined as the total number of observed mass in the bladders of ten rats. <sup>‡</sup> These data are evaluated by pathologist. And incidence (%) indicates the percentage for the number of rat having preneoplastic lesions and cancer versus ten rats. BBN: N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, Ø: diameter of mass



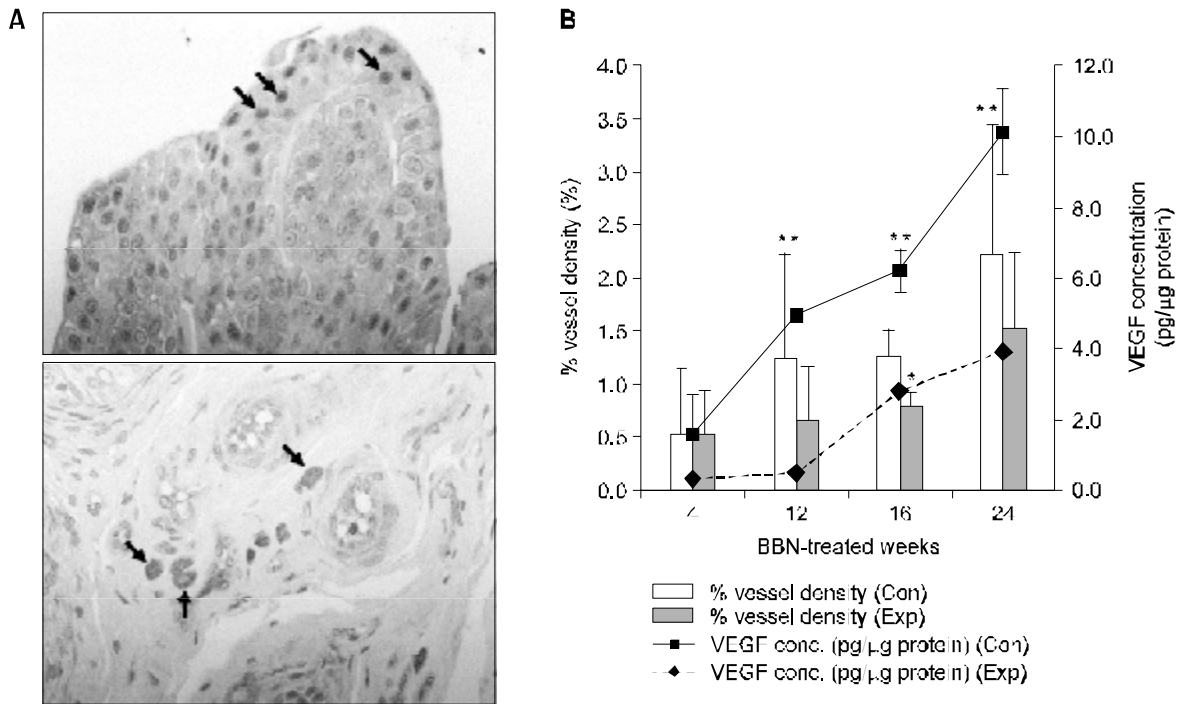
**Fig. 1.** Effects of selective COX-2 inhibitor on macroscopical findings (A) and microscopic changes (B) in BBN-induced rat urinary bladder. (B) shows the scheme of predominant histological changes. Control groups mean 0.05% BBN-treated rats and experimental groups mean 1,500mg/kg selective COX-2 inhibitor and 0.05% BBN-treated rats. We analyzed the tissue sections stained byhematoxylin and eosin for histological changes (x200). PN hyperplasia; papillary nodular hyperplasia Bar, 1cm.

분류하였다 (Table 1). 대조군은 4주에 전암병변인 단순 과 증식, 12주에 유두형 및 결절성과증식이 우세하게 나타났 고 일부 분열기세포 (mitotic cell)가 관찰되었다 (Fig. 1B). 16 주는 유두종과 암종이 나타났고 24주에는 대부분 암종의 양상과 함께 일부 침윤성암이 관찰되었다 (Fig. 1B). 실험군 은 4주 단순 과증식, 12주에 유두형 및 결절성과증식이 나 타났으나 분열기세포는 관찰되지 않았고, 16주는 유두형 및 결절성과증식이 우세하였고 일부 암종이 나타났 (Fig. 1B). 24주는 방광상피에 유두종 및 암종이 관찰되었고 침윤 성암은 발생하지 않았다 (Fig. 1B). 요약하면 12주부터 실험 군에서 발암과정이 지연되는 양상을 보였다(Fig. 1B). 전암 병변 및 암종의 발생률을 총 10마리에 대한 전암병변 및 암

종이 발생한 마리수의 백분율로 나타낸 결과를 Table 1에 나타냈다. 그 결과 대조군은 암종과 전암병변 발생률이 4주 에 0%과 50%, 12주에 20%과 100%, 16주에 50%과 100%, 24주에 80%과 100%이었으며 실험군은 각각 4주에 0%와 40%, 12주에 0%와 100%, 16주에 20%와 100%, 24주에 40% 와 100%로 대조군에 비해 실험군에서 암종의 발생률이 감 소하였다.

### 3. COX-2 발현의 변화

COX-2 발현은 대조군과 실험군에서 발암이 진행될수록 증가하는 모양을 보였고 혈관 주변 내피세포와 방광상피세 포의 세포질과 핵막에 위치하고 있었다 (Fig. 2A). 그러나



**Fig. 2.** COX-2 expression (A), MVD (B) and VEGF concentration (B) in BBN-induced rat urinary bladder. COX-2 (A, arrows) is mainly expressed in epithelial cells (*up*) and in cells adjacent to vessels (*down*) (x400). Control groups mean 0.05% BBN-treated rats and experimental groups mean 1,500mg/kg selective COX-2 inhibitor and 0.05% BBN-treated rats. Only MVD (B) in 16 week-experimental group is significantly decreased in 16 week-control group. Asterisk (\*, \*\*) indicates  $p < 0.05$  compared experimental group with control group in same BBN-treated week as Mann-Whitney U test ( $p=0.016$ ). MVD: microvessel density, VEGF: vascular endothelial growth factor, BBN: *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine.

**Table 2.** Relative densities of COX-2, MVD, and VEGF<sup>†</sup>

Group (n=10)		4wks	12wks	16wks	24wks
COX-2	Control	1.85±0.05	3.45±0.08	3.17±0.16	3.96±0.04
	Experimental	1.87±0.02	2.73±0.04	2.17±0.05	3.75±0.08
p-value		0.38	0.049*	0.049*	0.049*
MVD	Control	0.52±0.006	1.24±0.010	1.26±0.003	2.23±0.012
	Experimental	0.52±0.004	0.66±0.005	0.79±0.001	1.53±0.007
p-value		0.995	0.103	0.016*	0.182
VEGF	Control	1.45±1.50	4.91±0.20	6.20±0.42	10.1±0.86
	Experimental	0.27±0.07	1.77±1.54	2.82±0.04	3.91±0.16
p-value		0.512	0.049**	0.049**	0.049**

Mann-Whitney U test, Mean±SD, \*, \*\* < 0.05, <sup>†</sup> Control groups mean 0.05% BBN-treated rats and experimental groups mean 1,500mg/kg selective COX-2 inhibitor and 0.05% BBN-treated rats. COX-2: cyclooxygenase-2, MVD: microvessel density, VEGF: vascular endothelial growth factor

대조군과 실험군 사이에 4주를 제외하고 COX-2 발현에 유의한 차이가 있었다 (Table 2).

#### 4. MVD와 VEGF 발현

혈관신생과정에서 COX-2 선택적억제제의 효과를 살펴 보기 위하여 미세혈관 밀도인 MVD와 VEGF 발현을 대조군과 실험군에서 비교한 결과, 모든 대조군과 실험군에서 발암과정이 진행함에 따라 MVD가 증가하였고 4주를 제외하고 12주부터 대조군에 비해 실험군에서 낮은 경향을 보였다. 그리고 MVD는 16주 대조군에 비해 16주 실험군에서만 유의하게 감소하였다 (Fig. 2B) (Table 2). 또 하나의 혈관형성인자인 VEGF 발현은 발암과정이 진행함에 따라 대조군과 실험군에서 그 발현이 증가하였고 4주를 제외한 12주부터 대조군에 비해 실험군에서 유의하게 감소하였다 (Fig. 2B) (Table 2).

### 고 찰

본 연구는 방광암의 발암과정 중 발암 이전 단계를 효과적으로 억제시킬 수 있는 방법으로서 COX-2 선택적억제제를 사용하였다. 임상적으로 COX-2 발현은 방광암의 암 발생 및 진행과 밀접히 연관되어 있기 때문에 COX-2 선택적억제제에 의한 COX-2억제가 방광암의 예방 및 항암효과에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 생각되었다.<sup>14</sup> 이러한 가능성은 BBN방광암모델의 발암 이후 과정에서 COX-2 선택적억제제가 방광암 발생률을 억제시키는 것으로 일부 확인되었다.<sup>6</sup> 그래서 본 연구는 실험군에 1,500mg/kg COX-2 선택적억제제를 BBN 투여시작 1주 전에 투여하여 발암이전 과정에서 억제효과를 측정하였고, 이 때 사용한 COX-2 선택적억제제의 농도는 고농도로서 이미 이전 연구<sup>13</sup>의 대장암 백서 모델에서 암예방 및 억제 효과가 있다. 그리고 현실적인 발암환경에 보다 적합하게 하기 위하여 24주간 계속 BBN과 함께 병용투여하였다.

이러한 연구조건에서 먼저 본 연구는 COX-2 선택적억제제의 발암과정에서의 억제효과를 보기 위해 발암단계가 변화할 때 방광을 육안 및 현미경적으로 관찰한 결과, 전암병변이 우세하고 최초 분열기세포가 나타나는 12주부터 발암과정이 억제되었다. 또한 COX-2 발현과 혈관신생인자 (MVD, VEGF)에서도 COX-2 선택적억제제의 억제효과가 12주부터 나타나기 시작하였다. COX-2 선택적억제제의 이러한 혈관신생인자들에 대한 영향은 COX-2가 종양으로 유도되는 혈관신생과정에 연관되어 있다는 여러 연구보고와 일치한다.<sup>5,8,10,15</sup>

COX-2 선택적억제제를 투여한 12주 실험군부터 대조군

에 비해 총 종괴의 크기와 수가 감소하기 시작하고 24주 실험군에서는 대조군에 비해 그러한 차이가 더욱 커졌다 (Table 1) (Fig. 1). 이 의미는 COX-2 선택적억제제가 발암이전 단계부터 부분적으로 발암과정을 억제시킨다는 것이다. 한편 COX-2 발현은 대조군과 실험군에서 모두 발암과정이 진행할수록 그 발현이 증가하였고 대조군에 비해 실험군에서는 COX-2 선택적억제제의 투여에 의해 12주 이후부터 의미있는 감소를 보였다. 그리고 그 발현 양상은 Kitayama 등<sup>16</sup>의 연구결과와 동일하며, 이러한 발현양상 중 혈관 주변의 내피세포에 COX-2의 발현은 인체, 생쥐 및 설치류, 개 방광에서도 연구된 바 있다.<sup>26</sup> 또한 혈관신생과정의 표지자인 MVD는 대조군과 실험군에서 모두 발암과정이 진행할수록 그 수치가 증가하였으나 의외로 대조군에 비해 실험군에서의 의미있는 감소가 16주에만 나타났다. 이런 결과는 12주부터 실험군에서 그 수치가 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였는데 실험 샘플 수를 늘리면 유의한 결과를 얻을 가능성이 있다. 혈관신생인자인 VEGF 발현은 대조군과 실험군의 발암과정 진행에 따라 증가하였으나 12주부터 COX-2 선택적억제제 투여에 의해 의미있게 감소하여 COX-2 선택적억제제에 의한 COX-2억제와 혈관신생과정의 억제효과가 부분적으로 차단되었다. 즉 BBN 모델에서 COX-2 선택적억제제의 투여는 방광암의 발암과정의 진행에 영향을 미치는 것으로 생각되며, 이는 부분적으로 혈관형성억제 효과에 의한 것으로 추정된다. 그러나 본 연구와 같이 발암이전단계에 초점을 맞추어 발암과정 단계별로 COX-2 선택적억제제의 효과를 보고한 연구가 거의 없기 때문에 추후 임상적으로 이러한 효과를 검증할 수가 있다면 방광암의 암예방 및 치료제로서의 이용도 가능할 것으로 보인다.

### 결 론

COX-2 선택적억제제는 부분적인 혈관형성억제 효과에 의해 BBN 유도 방광암 발암과정에 영향을 미치는 것으로 생각되며 다양한 실험적 조건에서 인체 방광암을 대상으로 한 비교연구가 이루어진다면 방광암의 암예방 및 치료제로서의 역할이 가능할 것으로 보인다.

### ACKNOWLEDGEMENT

본 논문의 조직학적인 방광암의 분류에 도움을 주신 서울아산병원 병리학교실 노재운 교수님께 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Shirahama T. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in transitional cell carcinoma and its preneoplastic lesions in the human urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2000;6:2424-30
  2. Ristimaki A, Nieminen O, Saukkonen K, Hotakainen K, Nordling S, Haglund C. Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol* 2001;158:849-53
  3. Kim SI, Kwon SM, Kim YS, Hong SJ. Association of cyclooxygenase-2 expression with prognosis of stage T1 grade 3 bladder cancer. *Urology* 2002;60:816-21
  4. Shirahama T, Sakakura C. Overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2001;7:558-61
  5. Friedrich MG, Toma MI, Petri S, Huland H. Cyclooxygenase-2 promotes angiogenesis in pTa/T1 urothelial bladder carcinoma but does not predict recurrence. *BJU Int* 2003;92:389-92
  6. Grubbs CJ, Lubet RA, Koki AT, Leahy KM, Masferrer JL, Steele VE, et al. Celecoxib inhibits *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder cancers in male B6D2F1 and female Fischer-344 rats. *Cancer Res* 2000;60:5599-602
  7. Lee CCR, Ichihara T, Yamamoto S, Wanibuchi H, Sugimura K, Wada S, et al. Reduced expression of the CDK inhibitor p27<sup>KIP1</sup> in rat two-stage bladder carcinogenesis and its association with expression profiles of p21<sup>WAF1/Cip1</sup> and p53. *Carcinogenesis* 1999;20:1697-708
  8. Takei S, Iseda T, Yokoyama M. Inhibitory effect of clotrimazole on angiogenesis associated with bladder epithelium proliferation in rats. *Int J Urol* 2003;10:78-85
  9. Osawa S, Terashima Y, Kimura G, Akimoto M. Antitumor effects of the angiogenesis inhibitor AGM-1470 on rat urinary bladder tumours induced by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *BJU Int* 1999;83:123-8
  10. Wakui S, Furusato M, Sasaki S, Muto T, Takahashi H, Masaoka T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced rat bladder carcinogenesis. *Vet Pathol* 1999;36:111-6
  11. Piazza GA, Thompson WJ, Pamukcu R, Alila HW, Whitehead CM, Liu L, et al. Exisulind, a novel proapoptotic drug, inhibits rat urinary bladder tumorigenesis. *Cancer Res* 2001;61:3961-8
  12. Streeter EH, Harris AL. Angiogenesis in bladder cancer-prognostic marker and target for future therapy. *Surg Oncol* 2002;11:85-100
  13. Reddy BS, Hirose Y, Lubet R, Steele V, Kelloff G, Paulson S, et al. Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis. *Cancer Res* 2000;60:293-7
  14. Jones TC, Mohr U, Hunt RD. Monographs on Pathology of Laboratory Animals. Urinary System. In: Squire RA editor. Classification and differential diagnosis of neoplasms, urinary bladder, rat. Berlin: Springer-Verlag; 1986;311-6
  15. Gately S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews* 2000;19:19-27
  16. Kitayama W, Denda A, Okajima E, Tsujiuchi T, Konishi Y. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in rat urinary bladder tumors induced by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Carcinogenesis* 1999;20:2305-10
-