



Dietary Selenium Supplement Prevents Colon Carcinogenesis Induced by Azoxymethane and Dextran Sodium Sulfate in ICR Mice

Jun-hyeong Kim¹, Jin-Joo Hue¹, Bong Su Kang¹, Hyunji Park¹, Sang Yoon Nam¹,
Young Won Yun¹, Jong Soo Kim¹, Jae-Hwang Jeong² and Beom Jun Lee^{1*}

¹Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

²Department of Biotechnology and Biomedicine, Chungbuk Province College, Okcheon, Korea

The role of selenium (Se) in modulating colon carcinogenesis induced by azoxymethane (AOM) followed by dextran sodium sulfate (DSS) was investigated in mice. Five-week old ICR mice were fed on diets containing different concentrations (0.02, 0.1 or 0.5 ppm) of Se for 24 weeks. Animals received three (0-2nd weeks) intraperitoneal injections of AOM (10 mg/kg body weight), followed by 2% DSS with drinking water for additional 1 week. There were 4 experimental groups including vehicle control group, positive control group given AOM/DSS with AIN-93G normal diet containing 0.1% Se (NSe), a low (0.02 ppm)-Se diet group (LSe) and a high (0.5 ppm)-Se diet group (HSe). Hematology was analyzed with a blood cell differential counter. Liver Se was analyzed by inductively coupled plasma-mass spectroscopy. Cell proliferation and apoptosis were determined by using proliferating cell nuclear antigen (PCNA) for proliferative activity and apoptotic index by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL), respectively. HSe group showed a low incidence of colonic tumor (64.7%), compared with the NSe positive control (75%) and LSe (77.8%) groups. In contrast, HSe group exhibited lower rate of PCNA-positive cells ($39.3 \pm 6.9\%$) than positive control ($64.3 \pm 0.3\%$) and LSe ($57.3 \pm 2.9\%$) groups. In addition, apoptotic index of HSe group was higher than those of positive control and LSe groups. These results indicate that Se is a chemopreventive agent for colon carcinogenesis induced by AOM+DSS in male ICR mice.

Key words: Azoxymethane (AOM), dextran sodium sulfate (DSS), colon cancer, selenium, cell proliferation, apoptosis

Received 31 August 2010; Revised version received 17 September 2010; Accepted 17 September 2010

암의 진행과정에서 특정 사료와 사료내 특이성분에 의한 환경적 요인이 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다(Rudolf et al., 2008). 셀레늄(selenium; Se)은 다양한 내부 및 외부 스트레스에 대한 colon 세포의 보호에 중요한 역할을 담당하는 미량원소이다(Rudolf et al., 2008). 자연상태에서 셀레늄은 금속형(Se⁰), 무기형{selenite [SeO(OH)₂] 및 selenate [SeO₂(OH)₂]}, 유기형[selenocysteine, selenomethionine (SeMet)] 등의 형태로 존재한다(Patrick, 2004). 셀레늄 흡수에 대한 항상성 조절기전이 없어서 과량이 흡수될 수 있다. Selenite는 80% 이상을, SeMet과

selenate는 90% 이상을 생이용 가능하다(Combs and Combs, 1984; Patrick, 2004). 암 발생 예방 실험에는 sodium selenite나 seMet이 주로 사용되고 있으며 두 화합물은 동물실험을 통해서 발암과정을 억제하는 것으로 알려져 있다(Ip et al., 1991; Abdulah et al., 2005). Finley (1999)의 연구에 따르면 안정한 동위원소를 포함한 셀레늄을 selenate나 브로콜리(broccoli) 형태로 섭취한 남성의 혈장에서 셀레늄 농도를 비교한 결과 브로콜리 유래의 셀레늄이 적게 축적되었음을 확인하였다. 또한, Ip et al. (1991)은 SeMet이 selenite보다 암예방 효과가 적은 것으로 보고하고 있다. 이러한 결과는 암에 대항하는 셀레늄의 형태는 메틸 셀레늄(methyl selenium)인데, selenite가 SeMet보다 더 쉽게 메틸 셀레늄의 형태로 대사되기 때문이다. 본 실험에서는 무기염 형태인 sodium selenate를 사료에 첨가하여 실험동물에 투여하였으며, sodium selenate는 체내에서 selenite로 전환되어 대사된다.

*Corresponding author: Beom Jun Lee, Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, 410 Seongbongro (Gaeshin-dong), Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea
Tel: +82-43-261-3357
Fax: +82-43-271-3246
E-mail: beomjun@cnu.ac.kr

환자-대조군 연구(case-control studies)에 따르면 대장암 환자의 혈청내 셀레늄 농도가 현저히 낮음이 보고되어 있다(Milde et al., 2001). Pawlowicz et al. (1993)은 위암 혹은 대장암 환자의 혈장내 셀레늄, 적혈구내 셀레늄, 혈장내 glutathione peroxidases (GPx) 수치가 현저히 낮음을 보고하였다.

셀레늄의 항암효과에 대한 기전으로는 셀레노단백질(selenoproteins)의 항산화, 발암물질의 무독화를 통한 초기발암과정의 저해, 면역시스템의 활성화, 셀레늄 대사물에 의한 항종양 효과, 암세포의 apoptosis 유도 및 신혈관형성의 저해, DNA수복의 활성화와 DNA손상의 보호 등이 보고되고 있다(Patrick, 2004; Choi and Hesketh, 2006). 다른 연구에서는, 대장암의 진행과정에서 Se의 일부 화학적 형태가 세포증식 억제성 화학물질(cytostatic chemicals)이나 apoptosis 유도물질로써 작용하는 것으로 보고하고 있다(Combs, 2005). Rayman (2005)은 셀레늄이 암 위험인자뿐만 아니라 암의 진행과 전이에도 영향을 끼치는 것으로 보고하고 있다. 미국에서는 2005년부터 셀레늄이 전립선 암에 미치는 영향을 조사하는 Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial를 통해 일차적 및 이차적인 예방적 시도가 진행 중이다(Rayman, 2005). 또한, 여러 임상시험에서 Se이 암환자의 면역상태를 개선시켜 암환자에서의 화학치료제의 부작용을 줄여주는 것으로 보고되었다(Rayman, 2005).

Azoxymethane (AOM)은 유전독성의 대장암 발암물질이지만(Sohn et al., 2001), 설치류에서 대장암을 유발시키기 위해서는 장기간의 투여가 필요하다(Tanaka et al., 2003). 또한, 마우스에서 급성 및 만성 궤양성 대장염을 유도하기 위해서는 합성 dextran sodium sulfate (DSS)를 음수를 통해 투여하는 것이 일반적이다(Okayasu et al., 1990). Okayasu et al. (1990)은 3-10%의 DSS를 마우스에 급여한 후 6-10일 내에 급성 결장염 유발을 관찰하였으며, 이들 마우스에서는 설사, 항문출혈 및 체중감소가 관찰되었음을 보고하였다. 또 다른 실험에서는, AOM으로 대장암의 개시를 유도하고, 비유전독성 발암물질인 DSS로 종양을 촉진시키는 대장염관련 마우스 대장암 발병 모델을 제시하고 있다(Tanaka et al., 2003; Rosenberg et al., 2009).

본 실험에서는 AOM/DSS 처리로 유도한 대장암 발병 모델동물에서 셀레늄의 섭취가 대장암 진행과정에서 미치는 영향을 조사하기 위해 종양의 발생률과 증식 및 apoptosis에 관련된 요소를 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 SLC Inc. (Shizuoka, Japan) 유래 수컷 ICR

mice (5주령)를 중앙실험동물(서울, 한국)에서 구입하여 격리용 마우스 polycarbonate cage(삼광, 대전, 한국)에 5마리씩 사육하였다. 동물 사육실은 일정습도($50 \pm 10\%$)와 일정온도($23 \pm 3^\circ\text{C}$)를 유지하였고, 명암은 12시간을 주기로 하였다. 시험개시 전의 사료는 Americal Institute of Nutrition (AIN)에서 권장하는 0.1%의 Se이 함유된 AIN-93G 표준사료(Dyets Inc., Bethlehem, USA)를 급여하였고, 음수는 자유급여하였다. 즉, 동물을 표준사료를 급여하면서 1주 동안 실험실에 적응시킨 후, 표준사료를 제거하고 셀레늄이 조절된 3가지 사료 중 한 종류를 급여하였다. 동물실험은 충북대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)의 승인을 받아 수행하였다.

사료조성

표준사료(AIN-93G, Dyets Inc.)의 성분은 20% casein, 0.3% L-cystine, 39.7% cornstarch, 8.9% sucrose, 13.2% dyetose, 0.0014% t-butylhydroquinone, 5% cellulose, 3.7% mineral mix, 1% vitamin mix, 0.9% ferric citrate, 0.25% choline bitartrate 및 0.1% sodium selenate를 함유하고 있다. 표준사료내의 sodium selenate 농도 0.1 ppm은 AIN에서 권장하는 농도로, 위내 투여의 LD₅₀인 1.6 ppm의 2.25%에 해당하는 농도이다(NIOSH, 1990). 이를 기준으로 셀레늄 저농도군에서는 권장농도의 1/5인 0.02% (LD₅₀의 0.45%)로, 셀레늄 고농도군은 권장농도의 5배에 해당하는 0.5% (LD₅₀의 11.24%)로 설정하였다(Table 1).

실험군의 배정 및 대장암의 유발

실험군은 1) 용매대조군(대장암 유발 없이 정상농도인 0.1 ppm의 Se이 함유된 AIN-93G 표준사료 급여), 2) 양성대조군(AOM/DSS+NSe), 3) 셀레늄 저농도군(AOM/DSS+LSe) 및 4) 셀레늄 고농도군(AOM/DSS+HSe)으로 구성하였다. 용매 대조군에는 10마리를, 나머지 실험군에는 각각 20마리씩을 배정하였다.

실험군은 대장암을 유발시키기 위해 매주 1회씩 3주 동안 생리식염수에 녹인 AOM (10 mg/kg)을 복강 내로 투여하였다. 그 후에 2% DSS를 음수로 7일간 공급한 후 24주까지 실험을 진행하였다. AOM의 용매로는 생리식염수를 사용하였다(Figure 1). AOM은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, DSS(분자량 36,000-50,000)는 MP Biomedicals (Solon, OH, USA)로부터 구입해서 사용하였다.

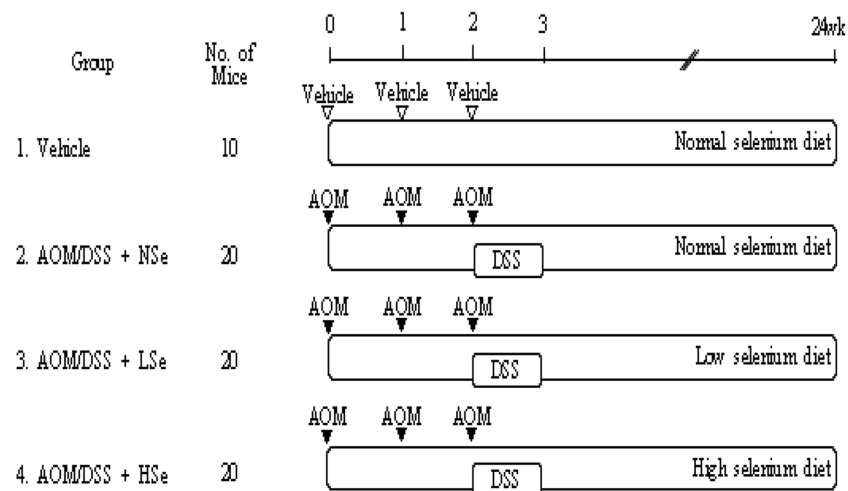
시료채취 및 혈액분석

실험시작 후 24주에 실험동물을 ether (Junsei, Tokyo, Japan)로 마취한 후에 복강을 절개하고 배대동맥(abdominal

Table 1. Composition of the diets at different selenium status

Ingredients (g/kg diet)	NSe	LSe	HSe
	g/kg	g/kg	g/kg
Casein	200	200	200
L-Cystine	3	3	3
Sucrose	88.9	88.98	88.5
Cornstarch	397.486	397.486	397.486
Dyetrose	132	132	132
Soybean oil	70	70	70
<i>t</i> -Butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014
Microcrystalline cellulose	50	50	50
Mineral mix (Rx grade, no Fe, Se)	37	37	37
Ferric citrate 5 mg/g as Fe	9	9	9
Sodium selenate 1 mg/g as Se	0.1	0.02	0.5
Vitamin mix	10	10	10
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
Total	1000	1000	1000

Fe: iron, Se: selenium.

**Figure 1.** Experimental design for colon carcinogenesis in mice. AOM, azoxymethane; DSS, dextran sodium sulfate.

aorta)에서 K_3 -EDTA가 들어있는 혈청분리관(Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA)을 이용하여 채혈하였다. 간, 콩팥, 비장, 폐 및 소장을 채취하여 액체질소에 동결 보관했으며, 대장의 절반은 식염수로 세척한 후 10% 중성포르말린에 고정하였고, 나머지 절반은 액체질소에 동결 보관했다.

혈액은 Abbott CellDyn-3500 (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA)를 사용하여 전체 혈구수 계산(complete blood count)과 감별 혈구수 계산(differential count)를 수행하였다.

간조직 셀레늄 농도 분석

간조직 내의 총 셀레늄의 농도를 알아보기로, 유도결합플라즈마 질량분석법(inductively coupled plasma-mass

spectroscopy; ICP-MS) (820-MS, Varian, Santa Clara, CA, USA)를 이용해 분석하였다. 동결된 간조직과 혈청을 고농도의 질산과 과산화수소를 사용해 200°C에서 시간 동안 분해시킨 후, 분말(ash)화하였다. 처리된 샘플을 분석 전에 2% 질산에 희석하였다.

종양 발생률

육안적으로 각 군의 종양 발생을 관찰하였다. 종양 발생률은 종양을 가진 마우스 개체/각 군의 개체수로 정의하였다.

면역조직화학적 염색 및 평가

대장 조직에서의 apoptosis를 측정하기 위해 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-

end labeling (TUNEL; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)을 수행하였으며, 세포 증식성을 측정하기 위해 proliferating cell nuclear antigen (PCNA; Santa Cruz, CA, USA) 항체를 이용한 면역조직화학적 분석을 실시하였다. 즉, 4- μ m 두께의 파라핀 절편에 diaminobenzidine 을 기질로 이용하는 Vectastain ABC kit (Vector Laboratories)를 사용하였다. 면역조직화화학염색에서 양성반응을 나타내는 세포의 숫자를 파악하기 위해, 각 대장조직 슬라이드의 3시야에서 100개의 세포를 확인한 후, 전체의 세포 중에 갈색으로 염색된 양성 세포를 백분율로 표시하였다 (Tanaka *et al.*, 2010).

통계학적 처리

모든 자료는 평균 \pm 표준오차로 표시하였고, 각 실험군의 유의성은 SPSS ver. 12.0에서 one-way ANOVA 및 LSD로 조사하였고, 유의성은 $P < 0.05$ 및 $P < 0.01$ 의 수준에서 검정하였다.

결 과

체중 변화

모든 AOM/DSS 처리군의 체중은 용매대조군 비해 2주와 4주에만 유의적으로 감소하였으며($P < 0.01$), 투여가 끝나고 다른 처치를 하지 않은 4주 이후부터는 유의적 차이가 없었다. 또한 AOM/DSS로 대장암을 유발한 양성대조군(NSe), 셀레늄 저농도군(LSe), 셀레늄 고농도군(HSe) 간에 체중의 유의적인 차이는 없었다(Figure 2).

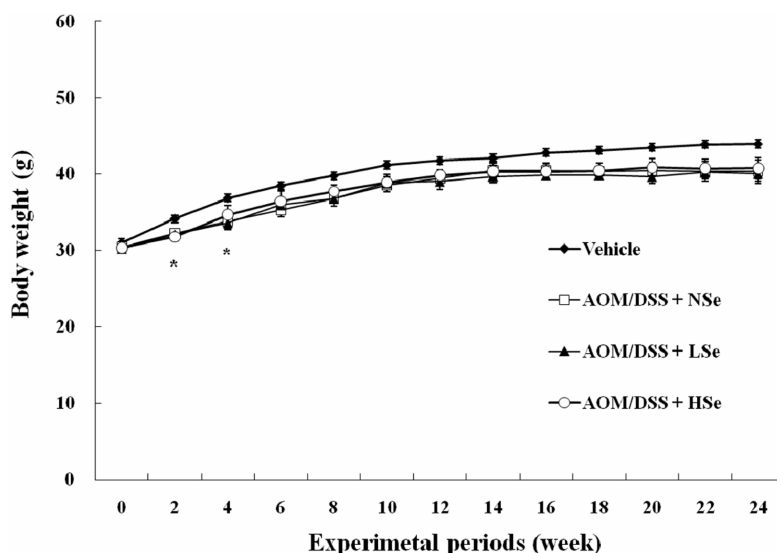


Figure 2. Change in the body weights in mice treated with AOM/DSS and selenium (Se). The body weights of all AOM/DSS treatment groups significantly decreased compared with the body weight of vehicle control group during 2–4th weeks of treatment ($P < 0.05$). AOM: azoxymethane, DSS: dextran sodium sulfate, NSe: normal selenium (0.1 ppm) diet, LSe: low selenium (0.02 ppm) diet, HSe: high selenium (0.5 ppm) diet.

혈액학적 변화

용매대조군, 양성대조군, 셀레늄 저농도군, 셀레늄 고농도군 간에 mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration의 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 그러나, 양성대조군에서는 용매대조군과 비교했을 때 red blood cells (RBC), hemoglobin, hematocrit의 수치가 유의적으로 감소한 것을 관찰할 수 있었다($P < 0.05$). 셀레늄 저농도군과 셀레늄 고농도군에서는 용매대조군과 비교했을 때 white blood cells (WBC)와 hemoglobin 수치가 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$) (Table 2).

간조직 셀레늄 농도의 변화

동결건조 보관한 간조직을 0.5 g씩 전처리해서 ICP-MS로 분석한 결과, 용매대조군의 간에서의 셀레늄 농도는 $0.93 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$ 이었으나, 양성대조군에서는 $0.66 \pm 0.21 \mu\text{g/g}$ 로 유의하게 감소하였다(Figure 3). 또한 셀레늄 저농도군에서는 $0.46 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$ 으로 더욱 감소하였으며, 셀레늄 고농도군에서는 반대로 $1.08 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$ 으로 회복되어 LSe 군과 HSe 군 사이에 유의적인 차이가 나타났다($P < 0.05$) (Figure 3).

종양 발생 및 동물의 생존율

정상 Se농도(NSe) 급여군인 양성대조군의 종양 발생을 75%에 비해 셀레늄 저농도군에서는 종양 발생율이 2.77% 증가한 반면, 셀레늄 고농도군에서는 10.3% 감소하였다. 또한, 24주의 시험기간 동안 동물의 생존율은 양성대조

Table 2. Differential blood cell counts in ICR mice fed different selenium diets

Parameters	Vehicle	AOM/DSS		
		NSe	LSe	HSe
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	4.61 \pm 1.85	2.61 \pm 0.61	2.13 \pm 0.55	2.32 \pm 0.20
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	8.72 \pm 0.40	7.11 \pm 1.66*	7.72 \pm 0.23	7.99 \pm 0.57
Hemoglobin (g/dL)	13.40 \pm 0.60	11.60 \pm 1.13*	12.23 \pm 0.25	12.20 \pm 0.60
Hematocrit (%)	44.05 \pm 2.80	38.20 \pm 4.67*	40.47 \pm 1.76	40.97 \pm 1.44
MCV (fl)	50.53 \pm 0.94	54.50 \pm 6.22	52.43 \pm 2.70	51.40 \pm 2.17
MCH (pg)	15.40 \pm 0.55	16.65 \pm 2.33	15.87 \pm 0.40	15.33 \pm 0.35
MCHC (g/dL)	30.53 \pm 1.23	30.81 \pm 0.68	30.30 \pm 0.89	29.87 \pm 0.76

WBC: white blood cells, RBC: red blood cells, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, AOM: azoxymethane, DSS: dextran sodium sulfate, NSe: normal selenium (0.1 ppm) diet, LSe: low selenium (0.02 ppm) diet, HSe: high selenium (0.5 ppm) diet. *Significantly different from vehicle control ($P<0.05$).

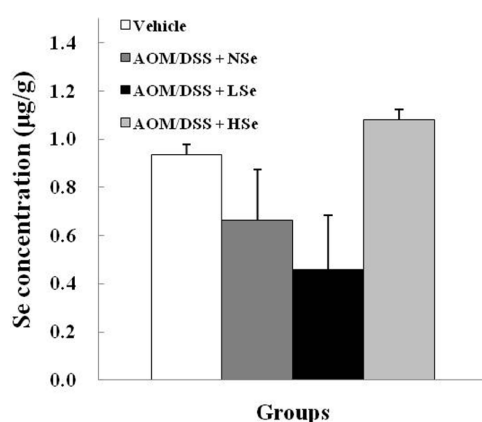


Figure 3. Hepatic selenium levels in mice following feeding of different concentrations of dietary selenium. Selenium concentration was determined using an inductively coupled plasma-mass spectroscopy. AOM: azoxymethane, DSS: dextran sodium sulfate, NSe: normal selenium (0.1 ppm) diet, LSe: low selenium (0.02 ppm) diet, HSe: high selenium (0.5 ppm) diet.

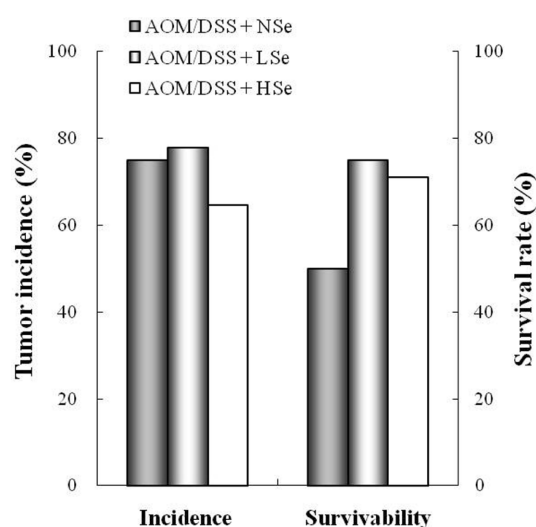


Figure 4. Effect of selenium on tumor incidence and survival rate of mice treated with azoxymethane/dextran sodium sulfate (AOM/DSS). NSe: normal selenium (0.1 ppm) diet, LSe: low selenium (0.02 ppm) diet, HSe: high selenium (0.5 ppm) diet.

군에서 50%인데 비해, 셀레늄 저농도군과 셀레늄 고농도군의 경우 각각 75%와 71%로 높았다(Figure 4).

대장조직에서의 세포증식 및 사멸

용매 대조군에서 proliferative index (PI)는 20.33 \pm 2.91%인데 비해 AOM/DSS를 투여한 양성대조군에서는 64.33 \pm 0.33%로 크게 증가하였다($P<0.05$) (Table 4 and Figure 6). 한편 셀레늄 저농도군의 PI는 57.33 \pm 2.85%로 양성대조군에 비해 큰 변화가 없었으나, 셀레늄 고농도군

에서는 39.33 \pm 6.94%로 양성대조군에 비해 세포증식이 유의적으로 억제되었다($P<0.05$).

용매대조군의 apoptotic index (AI)는 1.33 \pm 0.67%인데 비해 양성대조군은 8.33 \pm 0.67%로 큰 증가를 나타내었다($P<0.05$) (Table 3 and Figure 5). 셀레늄 저농도군에서는 4.50 \pm 0.41%로 양성대조군에 비해 AI가 유의하게 감소한 데 반해, 셀레늄 고농도군에서는 11.25 \pm 1.28%로 더욱 증가시켰다($P<0.05$).

Table 3. Effect of selenium on cell proliferative and apoptotic indices in AOM/DSS- induced colon carcinogenesis

Groups	Selenium (ppm)	Proliferative index (%)	Apoptotic index (%)
Vehicle	0.1	20.33 \pm 2.91	1.33 \pm 0.67
AOM/DSS+NSe	0.1	64.33 \pm 0.33*	8.33 \pm 0.67*
AOM/DSS+LSe	0.02	57.33 \pm 2.85	4.50 \pm 0.41 [†]
AOM/DSS+HSe	0.5	39.33 \pm 6.94 [†]	11.25 \pm 1.28 [†]

AOM: azoxymethane, DSS: dextran sodium sulfate, NSe: normal selenium (0.1 ppm) diet, LSe: low selenium (0.02 ppm) diet, HSe: high selenium (0.5 ppm) diet. *Significantly different from vehicle control ($P<0.05$). [†]Significantly different from AOM/DSS+NSe ($P<0.05$).

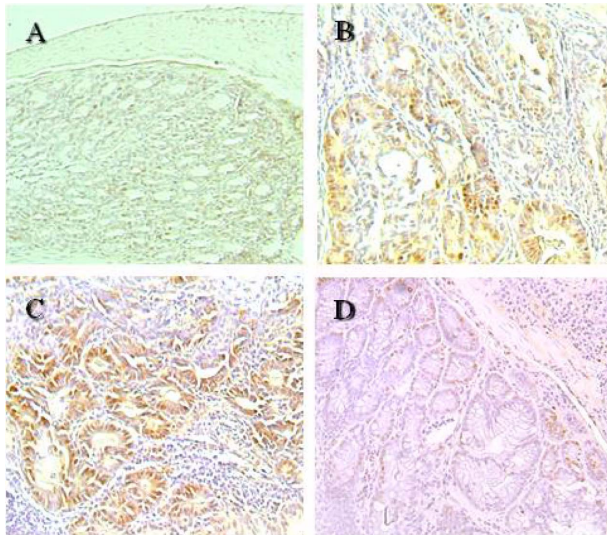


Figure 5. Immunohistochemistry on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the colon of mice treated with azoxymethane/dextran sodium sulfate (AOM/DSS) and selenium (Se). The PCNA-positive cells were greatly increased by treatment with AOM/DSS, which were markedly reduced by co-administration of a high concentration (0.5 ppm) of selenium (Se). (A) Vehicle control. (B) AOM/DSS+normal Se (0.1 ppm) diet. (C) AOM/DSS+low Se (0.02 ppm) diet. (D) AOM/DSS+high Se (0.5 ppm) diet. $\times 100$.

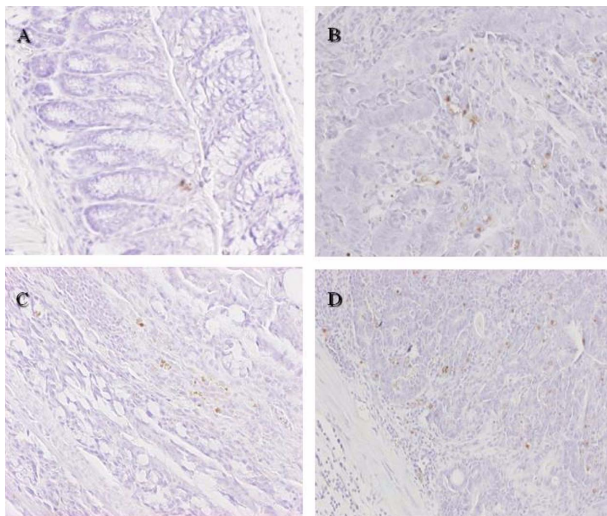


Figure 6. TUNEL assay for apoptotic nuclei in distal colon sections of mice treated with azoxymethane/dextran sodium sulfate (AOM/DSS) and selenium (Se). The TUNEL-positive cells were increased by treatment with AOM/DSS, which were further enhanced by co-administration of Se in a concentration-dependent manner. (A) Vehicle control. (B) AOM/DSS+normal Se (0.1 ppm) diet. (C) AOM/DSS+low Se (0.02 ppm) diet. (D) AOM/DSS+high Se (0.5 ppm) diet. $\times 100$.

고 찰

우리나라에서 대장암의 발병률과 사망률이 90년대부터 점차적으로 증가해서 암 사망률의 네 번째로 높게 나타

나는 것으로 보고되어 있으며(Korea National Statistical Office, 2007), 미국에서도 남성과 여성 모두에서 사망률이 높은 암 중에 하나이다(Jemal *et al.*, 2005). 따라서, 효과적인 예방이 대장암에 의한 사망률을 줄이는데 중요하며 특히 암에 대해 예방적 활성을 가지는 식이 성분에 관한 연구는 매우 중요한 의미가 있다.

본 실험에서는 셀레늄의 대장암에 대한 예방적 활성에 대해 알아보고자 ICR 마우스를 이용하여 셀레늄의 농도를 AIN 표준사료 내 권장농도의 1/5 또는 5배로 달리해서 급여함으로써 셀레늄의 섭취가 AOM/DSS로 유발된 대장암 발생에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. 실험동물에 발암물질인 AOM과 점막을 자극해 염증을 유발하는 DSS를 투여하여 대장암을 유발시키는 동안에 셀레늄을 강화(0.5 ppm)한 사료를 급여함으로써 권장농도(0.1 ppm)의 셀레늄이 함유된 사료를 급여한 양성대조군에 비해 대장암 발생률이 감소하였다.

많은 연구에서 셀레늄의 섭취가 여러 암에 대해 항암 효과를 가지는 것으로 알려져 있다(Clark *et al.*, 1996; Beno *et al.*, 2000; Schrauzer, 2000). Clark *et al.* (1996)의 연구에 따르면, 1,312명의 피부암 환자에 셀레늄을 매일 200 mg 투여했을 때, 피부암의 발생을 줄이지는 못했으나 이차적으로 여러 장기(예, 대장 및 전립선)에서의 암의 발생과 사망률이 감소했다고 보고하였다. 이러한 결과는 본 실험에서 셀레늄에 의해 대장암의 발생률이 감소하는 것과 일치함을 알 수 있다.

셀레늄의 항암작용은 발암물질의 성질이나 셀레늄의 농도, 화학적 형태에 의존적으로 작용하고, 항변이 작용은 정상세포의 악성화와 종양유전자의 활성화를 예방하는 것으로 생각된다(Schrauzer, 2000). Schrauzer (2000)의 보고에 따르면, 내인성 및 외인성으로 생성된 활성산소 라디칼이 세포내 DNA를 공격해서 화학적 발암물질의 산화적 활성화와 변이를 유발하는데, 적정농도의 셀레늄이 공급된 세포에서는 활성산소 라디칼에 의한 손상이 감소되었다.

본 실험에서 셀레늄의 섭취에 따른 간조직 내 셀레늄 농도변화를 분석한 결과, 급여농도에 비례하여 간조직 내 농도가 비례하여 상승하였다. 그러나 0.1 ppm을 급여한 용매대조군과 셀레늄 고농도군(0.5 ppm)을 비교했을 때 농도차이가 크지 않은데, 이는 장벽을 자극하는 염증을 유발하는 물질인 DSS로 인해서 장벽의 세포들이 비정상적으로 기능함으로써 양성대조군에서의 셀레늄 농도가 저하된 것으로 보이며, 마찬가지로 고농도의 셀레늄을 투여해도 정상상태의 용매대조군에 비해 크게 증가되지 않는 것으로 사료된다.

GPx-1은 셀레늄을 섭취했을 때 동물의 간에 저장되는 selenoproteins 중 흔한 형태이다(Choi and Hesketh, 2006). Schrauzer (2000)에 따르면, 셀레늄의 항암작용은 우선적으로 GPx와 관련된 것으로 보이며, 이는 GPx가

DNA와 다른 세포 구성물을 산소 라디칼의 손상으로부터 예방하기 때문으로 여겨진다. 이를 통해, 본 실험의 결과로 셀레늄의 섭취로 인한 간에서의 셀레늄 증가에 따라 GPx도 증가하여 산화적 스트레스에 대한 세포의 손상이 감소함으로써 대장암의 발생률이 감소하는 것으로 사료된다.

본 실험에서의 혈액수치들을 볼 때, WBC와 hemoglobin이 용매대조군에 비해 셀레늄 처리군에서 유의적으로 감소했으며, RBC와 hematocrit도 용매대조군에 비해 양성대조군에서 유의적으로 감소한 것을 볼 수 있다($P < 0.05$). 이는 AOM의 치료로 인해 hemoglobin과 hematocrit의 수치가 유의적으로 감소한다는 보고(Davis and Johnson, 2002)와 일치한 것으로 보아, 본 실험에서 발암물질을 처리군에 따른 이러한 감소는 셀레늄의 농도에 대한 영향보다는 AOM의 유도도 인한 영향으로 보인다.

본 실험에서 셀레늄의 대장암에 대한 영향을 알아보고자 육안적인 종양 발생률뿐만 아니라 대장 조직에서 세포증식을 PCNA 염색을 통해서 관찰한 결과 셀레늄 섭취가 유의적으로 PI를 감소시키는 것을 확인하였다($P < 0.05$). PCNA는 세포 증식의 표지자로 DNA polymerase- α 의 보조단백질로 작용해 DNA 합성에 필요한 비히스톤 핵단백질로 알려져 있다(Bravo et al., 1987). 또한, 대장조직에서 TUNEL 염색을 실시한 결과 고농도의 셀레늄섭취가 유의적으로 AI를 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. Davis and Spallholz (1996)은 Se-induced apoptosis가 세포 내 glutathione의 산화에 의한 프리 라디칼의 산화적 스트레스에 의한 것이라고 보고했다. 또 다른 연구에서는 고농도의 셀레늄을 섭취한 결과, 셀레늄 대사 과정에서 methyl selenol (CH_3SeH)과 seleninic acid ($\text{CH}_3\text{SeO}_2\text{H}$)가 신생혈관 형성을 억제하는 것은 물론, 종양세포의 apoptosis를 유도하여 세포주기의 진행을 억제하는 것으로 보고되었다(Jiang et al., 1999; Ip et al., 2002). 이러한 결과를 종합하면 본 실험에서 셀레늄은 대장세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 촉진하여 대장암의 진행을 감소시키는 것으로 사료된다.

결론적으로, 독성수준에 미치지 않는 0.5 ppm의 셀레늄이 포함된 사료를 투여할 경우 간에서의 셀레늄 농도를 증가시키며, 증가된 셀레늄에 의해 대장에서의 apoptosis를 촉진시키고, 세포증식을 억제함으로써 대장암의 발생과 발암과정을 조절하는 것으로 사료된다. 또한, 대장암에서의 apoptosis를 유발하는 기전에 대한 셀레늄의 역할에 대해서 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구과제는 2008년 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2008-313-E00628).

참고문헌

- Abdulah, R., Miyazaki, K., Nakazawa, M. and Koyama, H. (2005) Chemical forms of selenium for cancer prevention. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19(2-3), 141-150.
- Beno, I., Klvanova, J., Magalova, T. and Brtkova, A. (2000) Blood levels of natural antioxidants in gastric and colorectal precancerous lesions and cancers in Slovakia. *Neoplasma* 47(1), 37-40.
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A. and Macdonald-Bravo, H. (1987) Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 326(6112), 515-517.
- Choi, Y.S. and Hesketh, J.E. (2006) Nutritional Biochemistry of selenium. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 35(5), 661-670.
- Clark, L.C., Combs, G.F., Jr., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Chalker, D.K., Chow, J., Davis, L.S., Glover, R.A., Graham, G.F., Gross, E.G., Krongrad, A., Leshner, J.L., Jr., Park, H.K., Sanders, B.B., Jr., Smith, C.L. and Taylor, J.R. (1996) Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA* 276(24), 1957-1963.
- Combs, G.F., Jr. (2005) Current evidence and research needs to support a health claim for selenium and cancer prevention. *J. Nutr.* 135(2), 343-347.
- Combs, G.F., Jr. and Combs, S.B. (1984) The nutritional biochemistry of selenium. *Annu. Rev. Nutr.* 4, 257-280.
- Davis, C.D. and Johnson, W.T. (2002) Dietary copper affects azoxymethane-induced intestinal tumor formation and protein kinase C isozyme protein and mRNA expression in colon of rats. *J. Nutr.* 132(5), 1018-1025.
- Davis, R. L. and Spallholz, J. E. (1996) Inhibition of selenite-catalyzed superoxide generation and formation of elemental selenium (Se^0) by copper, zinc, and aurointricarboxylic acid (ATA). *Biochem. Pharmacol.* 51(8), 1015-1020.
- Finley, J.W. (1999) The retention and distribution by healthy young men of stable isotopes of selenium consumed as selenite, selenate or hydroponically-grown broccoli are dependent on the isotopic form. *J. Nutr.* 129(4), 865-871.
- Ip, C., Dong, Y. and Ganther, H.E. (2002) New concepts in selenium chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.* 21(3-4), 281-289.
- Ip, C., Hayes, C., Budnick, R.M. and Ganther, H.E. (1991) Chemical form of selenium, critical metabolites, and cancer prevention. *Cancer Res.* 51(2), 595-600.
- Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R.C., Ghafoor, A., Feuer, E.J. and Thun, M.J. (2005) Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J. Clin.* 55(1), 10-30.
- Jiang, C., Jiang, W., Ip, C., Ganther, H. and Lu, J. (1999) selenium -induced inhibition of angiogenesis in mammary cancer at chemopreventive levels of intake. *Mol. Carcinog.* 26(4), 213-225.
- Korea National Statistical Office (2007) *Death and Cause of Death Statistics* 2006. KNSO, Daejeon.
- Milde, D., Novak, O., Stuka, V., Vyslouil, K. and Machaek, J. (2001) Serum levels of selenium, manganese, copper, and iron in colorectal cancer patients. *Biol. Trace Elem. Res.* 79(2), 107-114.
- National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) (1990) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS). Canadian Centre for Occupational Health and Safety, Hamilton, Ontario.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y. and Nakaya, R. (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98(3), 694-702.
- Patrick, L. (2004) selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. *Altern. Med. Rev.* 9(3), 239-258.

- Pawlowicz, Z., Zachara, B.A., Trafikowska, U. and Nowicki, A. (1993) Low levels of selenium and activity of glutathione peroxidase in blood of patients with gastrointestinal neoplasms. *Pol. Tyg. Lek.* 48(25-26), 554-556.
- Rayman, M.P. (2005) selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc. Nutr. Soc.* 64(4), 527-542.
- Rosenberg, D.W., Giardina, C. and Tanaka, T. (2009) Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 30(2), 183-196.
- Rudolf, E., Kralova, V. and Cervinka, M. (2008) selenium and colon cancer--from chemoprevention to new treatment modality. *Anticancer Agents Med. Chem.* 8(6), 598-602.
- Schrauzer, G.N. (2000) Anticarcinogenic effects of selenium. *Cell. Mol. Life Sci.* 57(13-14), 1864-1873.
- Sohn, O.S., Fiala, E.S., Requeijo, S.P., Weisburger, J.H. and Gonzalez, F.J. (2001) Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. *Cancer Res.* 61(23), 8435-8440.
- Tanaka, T., de Azevedo, M.B., Duran, N., Alderete, J.B., Epifano, F., Genovese, S., Tanaka, M. and Curini, M. (2010) Colorectal cancer chemoprevention by 2 beta-cyclodextrin inclusion compounds of auraptene and 4'-geranyloxyferulic acid. *Int. J. Cancer* 126(4), 830-840.
- Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S. and Mori, H. (2003) A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* 94(11), 965-973.