

Cyclophosphamide유발 방광염에 대한 활석의 효능

유지원 · 홍은숙³ · 최영현¹ · 이용태² · 최병태*

동의대학교 한의과대학 해부학교실, 1: 생화학교실, 2: 생리학교실 · 한방바이오연구소, 3: 양천초등학교

Effects of Talc on Cyclophosphamide-Induced Cystitis in the Rat

Ji Won Ryu, Eun Suk Hong³, Yung Hyun Choi¹, Yong Tae Lee², Byung Tae Choi*

Department of Anatomy, 1: Department of Biochemistry,

2: Department of Physiology · Biomedical Research Center of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University,

3: Yangcheon Elementary School

We investigated the effects of aqueous extract from talc for suppression in the process of cyclophosphamide-induced cystitis in the rat. The weight of urinary bladder was increased in the cyclophosphamide-injected rat compared with normal, but the increase of weight was arrested by intake of talc. More similar results showed in the uric test involving nitrate content and blood cell number and serum analysis involving the content of blood urea nitrogen and uric acid in the talc challenged rat compared with control one. More severe histological changes of urinary bladder such as edema, wall thickness, bleeding, vacuolation in mucosal epithelium were demonstrated in the rat injected with cyclophosphamide compared with normal. Fewer scores of these changes such as edema and bleeding were observed in rats treated with talc. In the immunohistochemical analysis, the expression of inflammatory-related protein examined tended to increase in the urinary bladder of cyclophosphamide-injected rat, especially COX-2 and TNF- α in mucosal epithelium and iNOS and IL-1 β in mucosal and muscular layer. The decline of these immunoreaction were observed in the talc treated rat, significant decrease of COX-2 was detected in mucosal epithelium and iNOS in submucosal layer. These results suggest that talc may use as a useful therapeutic agent for noninfectious cystitis.

Key words : Talc, Cyclophosphamide, Cystitis

서 론

Cyclophosphamide는 nitrogen mustard계 합성제로 다양한 신생물 질환에 대한 세포생성 억제작용 뿐 아니라 강력한 면역억제기능을 가져 장기이식 면역반응억제제로 사용된다¹⁾. 구조식은 2-[bis(2-chloroethyl) amino] tetrahydro-2H-1,3,2-oxazophosphorine-2-oxide으로 oxazophosphorine ring에 nitrogen mustard group이 부착되어 있다. 이의 대사산물은 강력한 알킬화 약물로서 DNA염기의 두 다른 퓨린과 피리미딘 염기를 알킬화시킴으로서 DNA의 직접적인 파괴를 초래하여 세포를 손상시키거나 알킬화군 잔여에 의한 복제를 저해한다²⁾. Cyclophosphamide작용에 민

감한 세포집단으로 골수와 림프계의 세포, 종세포 및 장관의 미분화세포 등이며 다량 투여했을 때 구토, 설사 출혈 등 다양한 부작용을 나타낸다³⁾. 조혈기능 활성화에 대한 영향과 더불어^{4,5)}, 비림프기관 중 특히 방광에서 출혈성 방광염을 유발한다⁶⁾. 이러한 비감염성 방광염과 더불어 신세뇨관과사증과 같은 많은 비뇨기계통의 부작용과 독성을 가진다^{7,8)}.

활석은 주로 변질암, 석회암, 백운암 중에 함유되어 있으며 한의학에서 利水通淋, 清解暑熱의 효용이 있고 외용하면 清熱收澀의 기능이 있다고 전해진다. 또한 小便不利, 淋瀝澀痛, 설사, 습창, 습진 등에 쓰여 왔다. 본초위주의 한약재 효능연구는 많으나 광물성 약재 효능에 대한 연구는 많지 않아 본 실험에서는 활석추출물을 cyclophosphamide로 방광염을 유발시킨 흰쥐에 투여하여 요검사, 신장기능관련 혈장 분석과 함께 방광에 대한 조직병리학적 관찰 및 염증관련인자에 대한 면역조직화학적 관찰을 통해 그 효능을 살펴보았다.

* 교신저자 : 최병태, 부산시 부산진구 진리1로 10 동의대학교 한의과대학

· E-mail : choibt@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8635

· 접수 : 2005/01/30 · 수정 : 2005/03/03 · 채택 : 2005/03/28

재료 및 방법

1. 활석추출액

활석은 동의대학교 한의과대학 부속한방병원에서 공급받았다. 원전을 바탕으로 증류수 100 ml 당 활석 8 g을 넣어 1시간 동안 끓이고, 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후 0.45 μm 여과지로 부유성분을 걸러낸 용액을 사용하였다.

2. 실험 동물 및 cyclophosphamide처리

8주된 건강한 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 효상사이언스로부터 구입하여 2주간 자유식이법으로 실험실 환경에 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 정상군, 활석용액군, cyclophosphamide를 주사한 대조군, 활석추출액투여와 함께 cyclophosphamide주사한 실험군 등 4군으로 나누어 각 군당 10마리를 사용하였다. 정상군은 일반 음용수를, 활석용액군은 활석추출액을 음용수 대신 공급하였다. 대조군은 cyclophosphamide (Sigma, USA)를 멸균 증류수에 용해 후 3일 간격으로 3차례 복강주사 (7 mg/kg)하였다. 실험군은 활석추출액을 공급하며 대조군과 같이 cyclophosphamide를 처리하였다. 활석추출액은 10일간 공급하였으며 음용수섭취량과 함께 매일 섭취량을 측정하였으며 최종적으로 체중과 방광무게도 측정하였다.

3. 요분석

요는 실험 10일째 되는 아침 10-12사이에 metabolic cage에 두어 채취하였으며 분석은 시험지법 (Dipstick법)으로 charge coupled device를 이용한 빛의 3원색의 구성 비율을 분석하여 각 반사율의 차이를 농도를 환산하여 정확한 값을 판독하는 reflectance photometers를 사용하였다.

4. 혈장분석

심장천자를 통해 채혈하여 EDTA-2Na 용기에 주입하여 잘 섞고 4℃ 1500 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. Blood urea nitrogen분석은 urease GLDH효소법을, Creatinine는 Jaffe의 화학적 측정법을, uric acid는 효소법을 이용하여 7170 automatic analyzer (Hitachi 7600-110)로 측정하였다.

5. 조직병리학적 검색

방광을 절취하여 4% paraformaldehyde에 4℃ 12시간 고정하여 순차적인 탈수와 투명화를 거쳐 paraffin에 포매한 후 6 μm 연속절편을 제작하였다. 조직병리학적 관찰을 위하여 연속절편을 탈 파라핀한 후 hematoxylin-eosin 및 periodic acid Schiff's염색을 실시하였다.

6. 면역조직화학적 검색

염증관련 단백질의 면역조직화학적 관찰을 위해 탈파라핀한 후 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에서 95℃ 5분간 처리하였고, 이를 3% methanolic hydrogen peroxide에 30분간 실온에서 처리하였다. PBS로 세척한 후 goat normal serum (Vector

Lab., PK-6101)으로 실온에서 30분간 처리하였으며 cyclooxygenase (COX)-1, COX-2, inducible nitric oxide (iNOS), tumor necrosis factor-α (TNF-α) 및 interleukin-1β (IL-1β)항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc)를 200:1로 희석하여 4℃ 습실에 16시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Lab., PK-6101)를 실온에서 30분 동안 반응 시켰으며 PBS로 세척 후 ABC kit (Vector Lab., PK-6101)에 실온에서 60분간 반응시켰다. DAB substrate kit (Vector Lab., SK-4100)로 실온에서 5분간 발색시켰으며 상기 실험 방법 중 일차항체대신 10% BSA/PBS를 처리하고 동일한 과정으로 염색한 것을 대조군으로 삼았다.

7. 통계처리

결과는 평균과 표준편차로 표시하였으며 SigmaPlot version 6.0(SPSS, Chicago, IL)로 student's t-test로 유의차를 검사하였다.

결과 및 고찰

1. 활석추출액의 섭취량, 체중 및 방광무게의 변화

Fig. 1은 음용수와 활석추출액의 섭취량을 살펴본 결과이다. 정상군과 활석용액군의 섭취량을 보면 2일, 3일, 5일에 유의성 있게 활석추출액을 더 많이 섭취하였다. Cyclophosphamide주사군은 정상군에 비해 전 기간에 걸쳐 많은 물을 섭취함을 알 수 있었으며 cyclophosphamide주사와 함께 활석용액을 처리한 실험군과 비교해 보면 5일, 6일, 7일에 유의성있게 더 많은 양을 섭취하였다. 전 기간 평균 정상군은 35.9±1.34 ml의 음용수를, 활석용액군은 43.5±2.27 ml의 활석추출액을 섭취하여 P<0.005의 유의성을 보였다. Cyclophosphamide주사군은 53.87±3.15 ml의 음용수를, cyclophosphamide주사후 활석추출액섭취량은 58.96±4.35 ml로서 유의성 있는 차이를 보여 주지 않았다. 음용수를 대신한 활석용액에 대한 섭취량은 증가하며 이는 cyclophosphamide주사군에서도 유사한 결과를 보여 주었다.

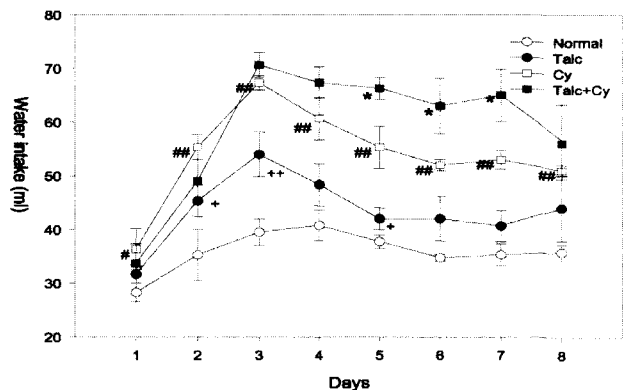


Fig 1. Comparisons of intake of water or talc extract per one rat. + P<0.05 and ++ P<0.01 compared with normal rat; # P<0.05 and ## P<0.01 compared with normal group; * P<0.05 compared with cyclophosphamide-injected control group. All bars indicate means±S.D. (n=10). Talc, talc-treated group; Cy, cyclophosphamide-injected group; Talc+Cy, cyclophosphamide-injected group with talc treatment.

체중은 정상군에 비해 cyclophosphamide주사군에서 현저한 감소를 보였으며 만성방광염의 결과 방광 무게는 유의성 있게 증

가하였다. Cyclophosphamide주사군에 대한 활석추출액의 처리는 체중에는 변화가 없으나 방광 무게는 유의성 있게 감소하였다.

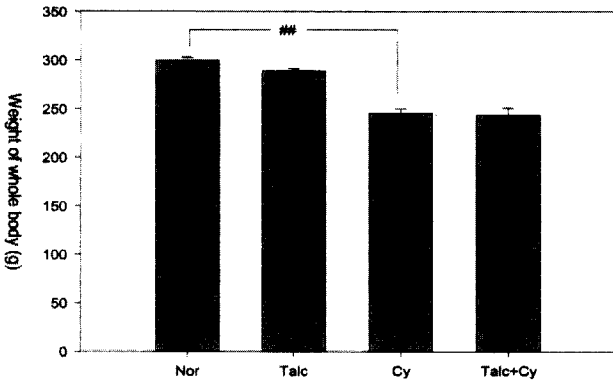


Fig. 2. The weight of whole body on day 10-post talc treatment. Means±SEM (n=10), ##, P<0.01. Abbreviations listed in Fig. 1.

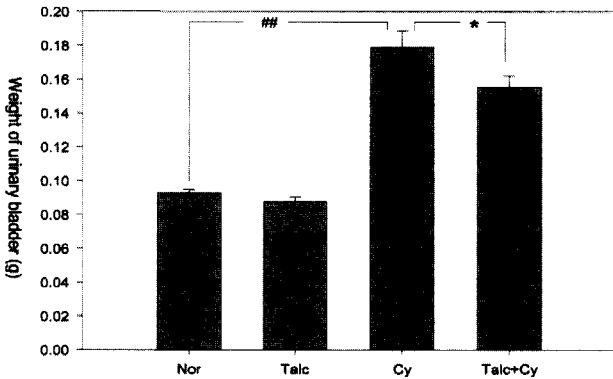


Fig. 3. The weight of urinary bladder on day 10-post talc treatment. Means±SEM (n=10). *, P<0.05; ##, P<0.01. Abbreviations listed in Fig. 1.

2. 요검사

일반적인 임상검사로써 요검사는 예상치 못한 질병이나 이상상태를 추정할 수 있다. 직접적으로 비뇨기계통과 신장기능이 상은 물론 간접적으로 혈액성분의 이상이나 순환기 장애 등에 예민하다. 본 실험에서 각 군의 비중, pH, 단백질, 백혈구 등은 정상군과 유사한 결과를 보여 주었으며 glucose, ketone, urobilinogen, bilirubin 등에서 무반응을 나타내었다. 그러나 nitrite반응을 정상군에 비해 cyclophosphamide주사군에서 현저히 감소하며 활석추출액 투여에 의해 유의성 있는 회복을 보여 주었다. 육안관찰에 의한 혈구수도 정상군에 비해 cyclophosphamide주사군이 유의성 있게 증가하나 활석추출액에 의해 다소 감소하나 유의성은 보이지 않았다. 이 결과는 cyclophosphamide주사가 흰쥐에서 40%의 출혈성 방광염을 유발한다는 보고와 같이 일치하며 활석추출액에 의한 완화작용을 알 수 있다⁹⁾.

Cyclophosphamide에 의한 방광염 유발은 간내 대사과정의 acrolein에 의해 유발되며 비뇨기계 중 특히 방광이 큰 영향을 받는 것은 방광의 요저장기능으로 말미암아 독성대사산물에 오랫동안 노출되기 때문이다¹⁰⁾. 본 실험 결과에서 방광의 무게 증가에 의한 만성 방광염 반응에 비해 요분석에서 현저한 차이를 보여 주지 않으며 nitrate는 방광자체보다 신장의 기능과 연관성이 있는 것으로 보여 진다.

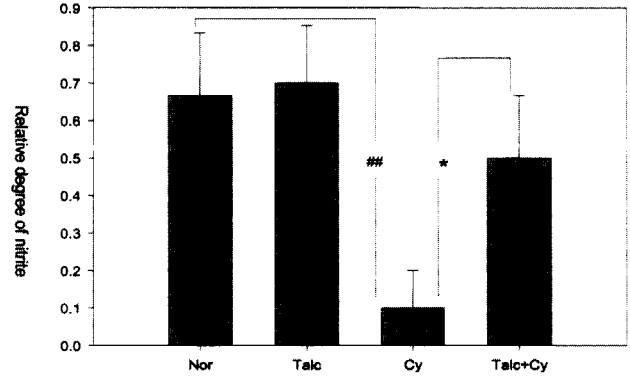


Fig. 4. The relative degree of nitrite on day 10-post talc treatment. Means±SEM (n=10). *, P<0.05; ##, P<0.01. Abbreviations listed in Fig. 1.

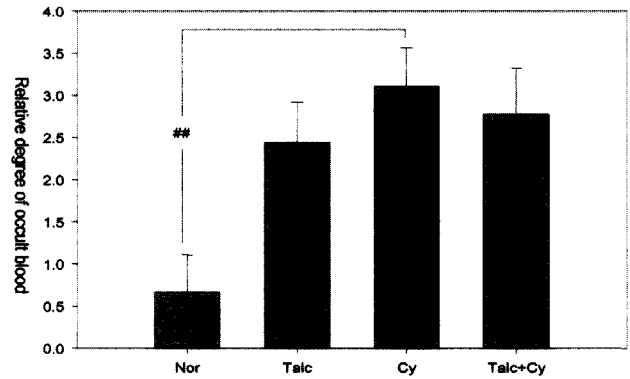


Fig. 5. The number of occult blood cells on day 10-post talc treatment. Means±SEM (n=10). ##, P<0.01. Abbreviations listed in Fig. 1.

3. 혈청분석

Blood urea nitrogen의 결과로 알 수 있는 urea는 단백질의 이화작용으로 인한 nitrogen함유물질로 90% 이상이 신장을 통해 배설된다. Creatinine은 glycine, arginine, methionine 등 3종류의 아미노산으로부터 합성되어 98%는 근육에서 일부는 신경에 분포하여 높은 에너지 화합물인 크레아틴 포스페이트로 합성되어 에너지원으로 중요한 역할을 한다. 이의 증가는 신장질환을 감소는 요붕증에서 나타난다. Uric acid는 purine대사의 마지막 산물로 혈청 중 일부 albumin과 결합하며 나머지는 유리형으로 존재한다. 증가는 배설장애, 요산합성증진 등에서 나타내며 감소는 요산생성부진이나 요산배설항진 등에서 나타낸다.

장기간에 걸친 화학요법은 혈청내 phosphorus, uric acid, calcium potassium 및 bicarbonate의 농도가 저하하고 blood urea nitrogen과 creatinine이 증가하며, 요에서 phosphorus, potassium, calcium, citrate 및 protein 분비가 증가하여 신기능에 대한 주의를 요한다¹¹⁻¹³⁾. Cyclophosphamide단독 처리시나 이를 함유한 복합화학요법에도 혈청내 creatinine의 양이 현저히 증가하며 혈청내 uric acid수준을 조절하는 것은 매우 중요 하다^{9,14)}. 또한 cyclosporin A투여에 의한 일시적인 uric acid감소는 항진된 근위세관세포흡수활성과 연관된 사구체여과 저하에 의한 것이다¹²⁾. 본 결과에서도 선행연구와 유사하게 cyclophosphamide주사에 의해 blood urea nitrogen의 증가와 uric acid의 감소에서 유의성을 나타내었다. 활석추출액처리하는 유의성은 나타나지 않으나 blood urea nitrogen과 uric acid의 회

복을 볼 수 있었다.

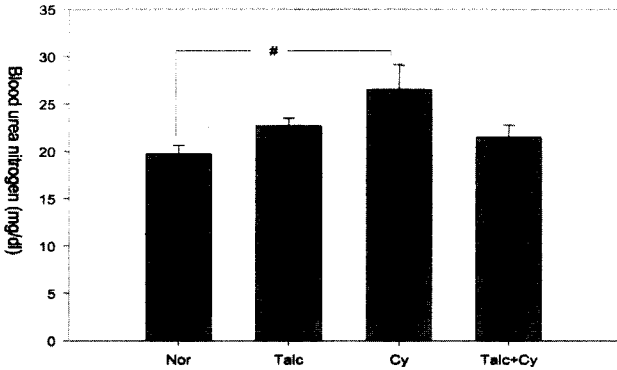


Fig. 6. The content of blood urea nitrogen on day 10-post talc treatment. Means±SEM (n=10). #, P<0.05. Abbreviations listed in Fig. 1.

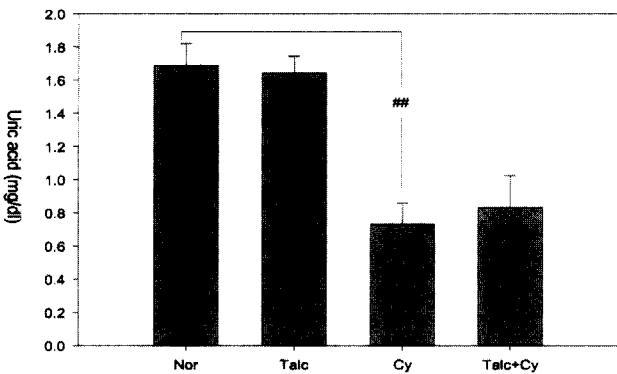


Fig. 7. The content of uric acid on day 10-post talc treatment. Means±SEM (n=10). ##, P<0.01. Abbreviations listed in Fig. 1.

4. 조직병리학적 분석

정상군의 방광은 점막, 점막하조직, 근층 및 장막의 정연한 구조를 가지고 있었으며 활석유액군도 유사한 형태를 보였다. Cyclophosphamide를 주사하였을 때 전체적으로 방광벽이 비후되며 특히 점막층 증식과 점막하조직의 부종이 현저하였다. 심한 출혈이 점막하조직에서 관찰되며 일부 점막층과 더불어 내강에서도 관찰되었다. 점막상피세포 중 일부 공포화된 세포와 내강으로 탈락된 세포가 관찰되었으며 이들은 강한 PAS양성을 보여주었다. 또한 결합조직에서 염증성 침윤세포가 관찰되었다. 활석추출액을 처리했을 때 cyclophosphamide주사군과 유사한 형태를 보이나 점막하조직의 부종과 출혈부위의 감소를 볼 수 있었다.

조직병리학적으로 급성방광염보다 현저한 cyclophosphamide유발 만성 방광염유발은 잘 알려져 있다. 방광에서 가장 큰 영향을 받는 곳은 방광점막으로 cyclophosphamide투여환자의 요검사서 공포화된 상피세포가 관찰된다¹⁵⁾. Cyclophosphamide주사는 부종, 혈관확장, 신경섬유 증가와 함께 방광에 출혈을 동반하거나 동반하지 않은 염증을 유발하며 비만세포, 단핵구, 대식세포 등 염증성 세포의 침윤이 관찰된다^{16,17)}. 본 결과의 병리조직학적 검색도 유사한 결과를 보여 주며 활석추출액은 부종완화와 일부 출혈성 혈구세포 감소하여 요분석과 유사한 결과를 보여 주었다.



Fig. 8. PAS reaction in the urinary bladder of normal (A), cyclophosphamide-injected (B) and cyclophosphamide-injected rat with talc treatment (C) on day 10-post talc treatment. Note a marked staining abilities in the vacuolated epithelium of urinary bladder of cyclophosphamide-injected rat compared with the normal ones. Scale bar = 50 μm.

5. 면역조직화학적 분석

염증관련 인자에 대한 면역반응을 보면 COX는 방광의 점막과 근층에서 약한 반응을 보여주며 COX-1에 비해 COX-2의 반응이 다소 현저하였다. Cyclophosphamide주사군에서 COX-2반응은 점막층에서 증가하며 활석추출액 처리에 의해 감소하였다. TNF-α면역반응도 점막층에서 cyclophosphamide에 의해 증가하며 활석추출액에 의해 미약한 감소를 보였다. iNOS와 IL-1β의 면역반응은 점막층과 근육층에 주로 나타나며 cyclophosphamide에 의해 이들 면역반응도 증가하는데 특히 점막하층 결합조직내 iNOS 면역반응의 증가가 현저하나 활석추출액에 의해 감소하였다. 염증반응은 필수적인 숙주방어체계로 lipopolysaccharide, TNF-α, IL-1과 같은 사이토카인, 여러 화학요법 약물 등의 광범위한 외부 및 내부 자극에 의해 유도된다¹⁸⁾. COX는 arachidonic acid에서 prostanoids 등 변환에 관여하며 COX-1이 구조적 성분에 비해 COX-2는 염증과 관련한 과도한 prostaglandin형성에 관여한다¹⁹⁾. iNOS는 다른 종류의 NOS와 달리 염증성 자극이 주어질 때 발현이 유도되며 L-arginine, O₂, NADPH-derived electron으로부터 L-citrulline, NADP, 그리고 nitric oxide를 생성시켜 생체내 면역체계에서 활성산소종으로 작용하여 자체 방어 기전에 생성되는 물질이다²⁰⁾. TNF-α는 암포를 사멸 시키는 프로그래밍 apoptosis를 유도하는 것으로 알려진 대표적인 물질로 세포내 단백질 분해기구의 또 다른 축인 caspases cascade를 활성화시켜 apoptosis를 유도하며 염증성 자극에 의해 생성된다²¹⁾. IL-1은 기본적인 pro-inflammatory cytokine의 한 종류로 염증 및 자기면역 질환에 관계하는 유전자의 발현을 촉진하며 COX-2, phospholipase 2, iNOS의 발현에 큰 영향을 미쳐 PGE₂, NO 등을 다량 생산한다²²⁾.



Fig. 9. COX-2 immunoreaction in the urinary bladder of normal (A), cyclophosphamide-injected group (B) and cyclophosphamide-injected group with talc treatment (C) on day 10-post talc treatment. Note a marked immunoreaction in the mucosal epithelium of urinary bladder of cyclophosphamide-injected group compared with the normal ones. Scale bar = 50 μm.

본 실험에서 cyclophosphamide주사에 의한 만성방광염을 유발한 후 염증관련 단백질의 발현을 면역조직화화학적으로 살펴보면 대부분 점막상피와 점막하층 그리고 결합조직내 염증성 침윤세포

등에서 증가하는 것을 볼 수 있다. 활성추출액처리가 점막상피에서 COX-2, 점막하층에서 iNOS의 현저한 감소를 보여 활성추출액의 항염증 효능을 알 수 있다. 특히 점막하층의 iNOS면역반응 감소는 활성추출액의 부종 및 염증성 침윤세포 수적 감소와 함께 활성추출액의 비감염성 방광염에 대한 효능을 유추할 수 있다.

결 론

흰쥐에서 cyclophosphamide유발 방광염에 대한 활성추출액의 효능에 대해 살펴보았다. Cyclophosphamide주사에 의해 체중이 감소하며 방광 무게가 증가하나 활성추출액 처리에 의해 방광무게의 현저한 감소를 보였다. 요검사에서 nitrite반응은 cyclophosphamide에 의해 감소하며 혈액세포 수는 증가하나 활성추출액에 의해 완화되었다. 신장기능과 연관된 혈장분석에서 cyclophosphamide에 의해 blood urea nitrogen증가와 uric acid 감소를 나타내나 활성추출액에 의해 회복되었다. 병리조직학적으로 cyclophosphamide에 의해 부종과 더불어 방광벽의 비후, 출혈, 점막상피의 공포화 등이 관찰되며 염증관련인자에 대한 면역반응이 증가하는데 특히 점막상피에서 COX-2와 TNF- α 의 증가가, 점막상피와 점막하층의 iNOS 및 IL-1 β 의 증가가 현저하였다. 활성추출액처리로 방광의 부종, 출혈 부위 감소와 함께 점막상피의 COX-2와 점막하층의 iNOS면역반응이 현저히 감소하였다. 이상의 결과로 보아 활성추출액은 비감염성 cyclophosphamide유발 방광염에 적용가능 함을 알 수 있다.

참고문헌

- Ahmed, A.R., Hombal, S.M. Cyclophosphamide (Cytoxan), A review on relevant pharmacology and clinical uses. *J. Am. Acad. Dermatol.* 11, 1115-1126, 1984.
- Fenichel, R.L., Chirigos, M.A. Immune modulation agents and their mechanisms. Marcel Dekker, New York, 1984.
- Sulikowska, A., Lewicki, Z. Studies on the regeneration of rat intestinal epithelium after exposure to cyclophosphamide. *Mater. Med. Pol.* 22, 73-78, 1990.
- Patchen, M.L., Vaudrain, T., Correira, H., Martin, T., Reese, D. In vitro and in vivo hematopoietic activities of Betafectin PGG-glucan. *Exp. Hematol.* 26, 1247-1254, 1998.
- Janni, W., Rjosk, D., Strobl, B., Bergauer, F., Linka, F., Dimpfl, T., Schindlbeck, C., Rack, B., Kaestner, R., Sommer, H. Chemotherapy-associated myelosuppression in gynecological oncology. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 41, 166-173, 2001.
- Ratliff, T.R., Williams, R.D. Hemorrhagic cystitis, chemotherapy, and bladder toxicity. *J. Urol.* 159, 1044, 1998.
- Anderson, E.E., Cobb, O.E., Glenn, J.F. Cyclophosphamide hemorrhagic cystitis. *J. Urol.* 7, 857-858, 1967.
- Lavin, P., Koss, L.G. Studies of experimental bladder carcinoma in Fischer 344 female rats. II. Characterization of 3 cell lines derived from induced urinary bladder carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 46, 597-614, 1971.
- Skretkiewicz, J., Sekulska, M., Danilewicz, M., Wągrowska-Danilewicz, M., Polakowski, P. Effect of some anticancer drugs and combined chemotherapy on renal toxicity. *Biol. Signals* 5, 51-58, 1996.
- Vanegas, H., Schaible, H.G. Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cyclooxygenases] in the spinal cord. *Prog. Neurobiol.* 64, 327-363, 2001.
- Gracia, J., Gonzalez, N., Gomez, M.E., Plaza, L., Sanchez, J., Alba, J. Clinical and anatomopathological study of 2000 cryptorchid testes. *Br. J. Urol.* 75, 697-701, 1995.
- Teicher, B.A., Holden, S.A., Menon, K., Hopkins, R.E., Gawryl, M.S. Effect of hemoglobin solution on the response of intracranial and subcutaneous 9L tumors to antitumor alkylating agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 33, 57-62, 1993.
- Sondhi, J., Gupta, P.P. Effect of immunosuppression on the clinicopathological changes in experimental zygomycosis in rabbits. *Vet. Res. Commun.* 24, 213-227, 2000.
- Umsawadsi, T., Chong, C., Weedn, V.W., McKenna, R.J. Jr, Barkley, H.T. Jr, Chiuten, D.F. Squamous cell carcinoma of the thymus: a case report of rapid response to cyclophosphamide, doxorubicin, cisplatin, and prednisone. *Med. Pediatr. Oncol.* 14, 338-341, 1986.
- Stella, F., Battistelli, S., Marcheggiani, F., De Santis, M., Giardini, C., Baronciani, D., Manenti, F., Mattioli, S., Troccoli, R. Urothelial cell changes due to busulfan and cyclophosphamide treatment in bone marrow transplantation. *Acta. Cytol.* 34, 885-890, 1990.
- Johansson, S.L., Cohen, S.M. Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Semin. Surg. Oncol.* 13, 291-298, 1997.
- Vizzard, M.A. Up-regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in urinary bladder pathways after chronic cystitis. *J. Comp. Neurol.* 420, 335-348, 2000.
- Rastogi, D., Ratner, A.J., Prince, A. Host-bacterial interactions in the initiation of inflammation. *Paediatr. Respir. Rev.* 2, 245-252, 2001.
- Peleg, I.I., Wilcox, C.M. Role of eicosanoids, cyclooxygenases, and nonsteroidal antiinflammatory drugs in colorectal tumorigenesis and chemoprevention. *J. Clin. Gastroenterol.* 34, 117-125, 2002.
- Nathan, C.F., Xie, F. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269, 13725-13728, 1994.
- Menon, R., Lombardi, S.J., Fortunato, S.J. TNF-alpha promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 19, 201-204, 2002.
- Dinarello, C.A. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* 20, 1-13, 2002.