

발암원을 투여한 쥐에서 식이지방이 대장의 종양발생과 세포증식에 미치는 영향*

송지현 · 박현서 · 서은숙 · 김동연**

경희대학교 가정대학 식품영양학과

성심여자대학교 가정대학 식품영양학과**

Effect of Different Dietary Fats on Colon Tumor Incidence and in vivo Cell Proliferation in Colonic Mucosa of MNU-Treated Rats

Song, Ji-Hyun, Park, Hyun Suh · Seo, Eun-Sook · Kim, Dong-Yeon**

Department of Foods & Nutrition, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Department of Food & Nutrition,** Songsim University, Seoul, Korea

ABSTRACT

The study was designed to observe the effect of different dietary fats on the incidence of colorectal tumor and in vivo cell proliferation in colon carcinogenesis. Male Sprague Dawley rats were intrarectally infused with chemical carcinogen(methylnitrosourea, MNU) and fed 16% (w/w) fat diet containing one of dietary fats(beef tallow, corn oil, perilla oil) for 30 weeks. To measure in vivo cell proliferation, the incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU) into DNA was localized using the monoclonal anti-BrdU antibody.

Large number of tumors were found in the distal colon and tumor incidence was increased in the order of perilla oil(57.7%)<corn oil(82.1%)<beef tallow diet(88.5%). Cell proliferation of colonic mucosa in beef tallow fed rat was significantly increased to give longer crypt length compared to those of corn oil and perilla oil fed rats, which resulted in higher incidence of colon tumor. Corn oil feeding did not significantly increase cell proliferation but gave higher incidence of tumor compared to perilla oil. Thus, n-3 α -linolenic acid rich in perilla oil could have a protective effect against colon cancer compared to saturated fatty acid or n-6 linoleic acid.

KEY WORDS : colon tumor · cell proliferation · n-3 fatty acids · α -linolenic acid · perilla oil.

서 론

역학조사¹⁻³⁾에 의하면 구미지역에서는 심혈관계

*본 연구는 1992~1994년 한국과학재단 일반목적기초 연구과제의 일부임.

질환과 대장암 발병률이 높았는데 이 구미인들은 고지방 저식이 섬유소 식사를 하였던 반면에 아시아, 아프리카 지역에서는 이들 질병의 발병률이 낮았으며 저지방 고식이 섬유소 식사를 하는 것으로 나타나 대장암의 발생률에 식이요인이 크게 영향을

미치는 것으로 밝혀졌다. Reddy와 Maehura⁴⁾ 등과 Nigro등⁵⁾의 보고에 의하면 쥐에서 발암원으로 대장암을 유발시킨 후 고지방식을 투여한 군이 저지방식을 투여했을 때 보다 대장암 발생률이 높았으며, 포화지방산 식이보다 불포화지방산식에 의해서 대장암 발생률이 훨씬 높았다⁶⁾. 그러나 불포화지방산 중에서도 n-3 fatty acid가 풍부한 어유식은 대장암 발생을 억제하는 효과가 있었다⁷⁾. 이와같이 식이지방의 양과 지방산의 구성에 따라 암발생에 미치는 영향이 각각 다르다는 것을 보여주고 있다. 우리나라에서 섭취하고 있는 들기름에는 α -linolenic acid(C18 : 3n-3)가 60~65% 정도 함유되었는데 이 지방산은 세포내에서 eicosapentaenoic acid(C20 : 5n-3, EPA)와 docosahexaenoic acid(C22 : 6n-3, DHA)로 전환되어 어유와 유사하게 대장암 발생을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되었다⁹⁾¹⁰⁾.

대장암 발생과정에서 cell proliferation의 증가는 암발생의 개시, 촉진, 진전과정에 필수적으로 일어나는 과정으로 cell proliferation을 촉진시키는 요인은 대장암 발생을 촉진시키는 것으로 간주할 수 있다고 하였다¹¹⁾. Cell cycle 중 S-phase에 있는 세포수가 증가하거나 S-phase의 기간이 늘어나면 DNA합성이 증가하고 세포분열이 활발히 일어나서 crypt에서 생산되는 세포수가 대장 관내로 탈락되는 세포수보다 증가되어 crypt의 크기가 비정상적으로 길고 넓어지며 분화 및 성숙이 안되고 종양으로 진전된다고 하였다. 실제로 전암단계의 대장질환을 가진 환자의 대장 점막조직, 인체 대장암종에서 S-phase 비율이 증가되는 것과 유사하게 발암물질에 노출된 동물의 경우도 세포증식이 증가하며 동시에 대장암 발생률이 증가함을 관찰할 수 있어서¹²⁾ 식이지방이 대장암에 미치는 효과도 세포증식의 변화를 통하여 일어날 수 있을 것이라고 하였다¹³⁾. 따라서 이러한 세포증식의 상태가 대장암 발생을 예측하는 한 biomarker로 사용되고 있다. 현재까지는 식이지방의 종류에 따라 세포증식에 미치는 영향에 관한 연구가 시행되고 있으나 발암물질을 투여한 쥐에서 식이지방의 종류를 달리 한 경우 전암 과정인 세포증식에 대한 cell kinetics에 관한

연구는 없었다.

그러므로 본 연구의 목적은 식이지방의 종류에 따라 대장암 발생률이 증가 또는 억제되는지 검토하고, 이때 대장 상피조직의 변화를 현미경 관찰하고, thymidine analogue인 5-bromo-2'-deoxyuridine을 사용하여 in vivo cell proliferation에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험계획

생후 7주된 Sprague Dawley종 흰쥐를 크게 2군으로, 즉 대조군과 발암물질 처리군으로 나누며 각 군마다 3가지의 다른 식이지방으로 구성된 실험식을 투여하였다. 발암물질 처리군은 methylnitrosourea(MNU) 2mg(0.2% 용액 0.5ml)을 일주일에

Table 1. Composition of experimental diets

| Ingredients | Experimental diets ¹⁾ | | |
|---------------------------|----------------------------------|----------|-------------|
| | Beef tallow | Corn oil | Perilla oil |
| | g/100g | | |
| Corn starch | 52.0 | 52.0 | 52.0 |
| Casein | 22.5 | 22.5 | 22.5 |
| Fat | 16.0 | 16.0 | 16.0 |
| α -Cellulose | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| DL-methionine | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Choline bitartrate | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| Vitamin mix ²⁾ | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Mineral mix ³⁾ | 4.0 | 4.0 | 4.0 |

1) Vitamin A was provided at the level of 4800 IU/kg diet

2) AIN-76 vitamin mix(modified without vitamin E and vitamin A) ; g/kg of mix : thiamine HCl 0.6, riboflavin 0.6, pyridoxine HCl 0.7, nicotinic acid 3, D-calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, D-biotin premix(1%) 2, cyanocobalamin(0.1%) 1, cholecalciferol(4,000,000IU/g) 0.25, manauquinone 0.05, sucrose 990

3) AIN-76 mineral mix ; g/kg of mix : CaHPO₄, 500 ; NaCl, 74 ; K₃C₆H₅O₇·H₂O, 220 ; K₂SO₄, 52 ; MgO, 24 ; MnCO₃, 3.5 ; FeC₆H₅O₇, 6 ; ZnCO₃, 1.6 ; CuCO₃, 0.3 ; Na₂SeO₃ · 5H₂O, 0.01 ; KIO₃, 0.01 ; CrK(SO₄)₂ · 12H₂O, 0.55 ; sucrose, finely powdered, 118.08

2번씩 4주동안 항문으로(intrarectally) 주입하여 대장암을 initiation시킨 후 각 군당 33~37마리씩 3군으로 다시 나누었다. 대조군은 saline을 항문으로 주입하고 15~16마리씩 3군으로 나누어 같은 3가지 실험식을 30주동안 투여하여 종양 발생 정도와 대장의 상피조직의 변화 및 in vivo cell proliferation에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험식은 Table 1에서와 같이 당질과 단백질 수준은 각각 52% (w/w), 22.5% (w/w)로 하고, 지방의 수준을 16% (w/w)로 총 열량의 32.6%로 구성하였으며, 지방의 종류만 다르게, 즉 포화지방산 급원으로 쇠기름(bccf tallow, BT), linoleic acid (C18:2n-6) 급원으로 옥수수유(corn oil, CO), n-3 α-linolenic acid 급원으로 들기름(perilla oil, PO)을 각각 사용하였다. 각 실험식의 지방산조성은 Table 2와 같으며 각군에서 n-6와 n-3 지방산의 공급량은 Table 3과 같다. Vitamin E는 dl-α-tocopherol을 사용하여 BT 식이에는 60IU/kg diet 수준으로 공급했으며, CO와 PO식이에는 180IU/kg diet 수준으로 공급하였다. 발암물질 처리후 식이를 투여하는 동안 중간의 효과를 알고자 식이 투여후 10주

(발암물질 개시후 14주)에 각 군당 7~9마리씩 일부를 희생시켰으며, 30주에 남은 쥐들을 희생시켰다.

2. 현미경 관찰

대조군과 발암물질 처리군에서 대장을 적출하여 절개한 후 변을 제거하고 4°C saline으로 닦아낸 후 종양의 유무, 수효, 크기, 형태, 위치등을 관찰하고 종양이 생성되었을 경우 종양의 부위를 중심으로 1~1.5cm 길이로 잘라 10% formalin 용액에 넣고 고정시킨 후 종양부위를 2mm 두께로 잘라 하룻밤 동안 수세하였다. 그 다음 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100% cthanol에 차례로 담가 탈수한 후 60°C에서 xylene에 의한 투명과정을 거쳐 paraffin wax를 씌워 불력을 만들어 급냉하였다가 microtome으로 6μm 두께로 자른 다음 gelatin이 들어있는 48~50°C의 항온수조에 띄워 slide로 떼서 60°C의 신전기에서 건조시킨 다음 hematoxylin-eosin 염색을 하여 광학 현미경으로 관찰하였다¹⁴⁾.

3. In vivo cell proliferation(BrdU test)

대장조직에서 in vivo cell proliferation을 검증하기 위한 쥐는 죽이기 1시간전에 체중 1kg당 5mg 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)을 phosphate buffer saline(pH 7.4) 용액에 녹여서 복강으로 주사하였다. 이때 10주때는 각군당 2마리, 30주때는 각군당 6마리씩 처리하였으며 BrdU test를 위해 얻은 대장은 distal 부분에서 1cm 잘라 잘 펴서 고정하여 Carnoy's solution에 저장시켰다. 통상적인 paraffin block을 만들고 조직을 4μm로 절편후 monoclonal anti-BrdU antibody, peroxidase를 붙인 anti-mouse antibody와 diaminobenzidine을 이용한 면역조직학적 방법¹⁵⁾에 의해 BrdU가 DNA에 결합된 정도를 관찰했다. 이때 개체당 정상적인 모양을 갖춘 20개의 crypt를 선택하여 관찰후 평균을 내었다. 10주의 경우 관찰된 쥐의 수는 군당 2마리이나 1마리의 대장에서 20개의 crypt를 선택하여 측정하여 통계처리는 불가능하지만 10주 때 각 index의 변화를 관찰하고자 하였다. 본 연구에서 관찰된 cell kinetic indices는 1) crypt length(대장점막의 crypt당 cell의 총수효), 2) labeled cell의 위치, 3) labeling

Table 2. Fatty acid profile of diets¹⁾

| Fatty acids | Beef tallow | Corn oil | Perilla oil |
|-------------|-------------|----------|-------------|
| | | % | |
| 14:0 | 3.95 | — | 1.00 |
| 16:0 | 30.25 | 10.72 | 6.05 |
| 16:1 | 3.75 | — | 0.25 |
| 18:0 | 16.10 | 1.99 | 2.10 |
| 18:1 | 41.25 | 27.16 | 13.05 |
| 18:2n-6 | 4.15 | 57.40 | 14.05 |
| 18:3n-3 | 0.55 | 1.30 | 63.55 |
| ΣPUFA | 4.70 | 58.70 | 77.60 |
| n-3/n-6 | 0.13 | 0.02 | 4.52 |

1) Expressed in % of total fatty acids

Table 3. N-6 and N-3 PUFA contents of diets

| Diets | Total Fat | 18:2n-6 | 18:3n-3 |
|-------------|-------------|---------|---------|
| | g/100g diet | | % Kcal |
| Beef tallow | 16.0 | 1.34 | 0.18 |
| Corn oil | 16.0 | 18.71 | 0.53 |
| Perilla oil | 16.0 | 4.58 | 20.71 |

index(crypt의 총세포수에 대해 label된 세포수의 백분률), 4) proliferative zone(PZ) (crypt의 전체 세포에서 label된 세포중 crypt의 제일 높은 위치에 있는 세포의 백분률), 5) PZ에서 labeling index, 6) crypt 전체 길이를 4등분하여 각 quarter에서 labeling index 등을 구하였다.

4. 통계처리

식이지방의 종류와 발암원인 MNU 처리의 두요인에 대한 상호작용을 검증하기 위해 two way ANOVA로 분석하였고, 각 평균의 차이는 least significant difference 방법으로 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 대장의 종양 발생빈도와 현미경관찰

실험식이를 10주동안 먹인 후 죽였을 때(Table

Table 4. Colon tumor incidence in MNU-treated rats fed different dietary fats for 10 weeks¹⁾

| Groups | (n) | Rats with | | Tumors per rat |
|---------|-----|-----------|-----|----------------|
| | | tumors | (%) | |
| Control | 24 | 0 | 0% | 0 |
| BT+MNU | 7 | 2 | 29% | 1 |
| CO+MNU | 9 | 2 | 22% | 1 |
| PO+MNU | 8 | 0 | 0% | 0 |

- 1) Tumor incidence was observed at 10 weeks of feeding
 MNU: Methylnitrosourea 16mg infused intrarectally.
 Control: All dietary groups(BT, CO, PO) infused with saline i.r.

4) MNU로 처리하지 않은 대조군에서는 모든 지방군에서 대장에 종양이 발견되지 않았으나 MNU 처리군에서 BT와 CO를 투여한 군에서는 각각 2마리에서 종양이 관찰되었는데 그중 1마리는 H & E 염색후에만 확인되었다. 그러나 PO군에서는 종양이 관찰되지 않았다. 이때 조직검사 결과 10주 정도로 실험식이를 먹었을 때 염증 현상인 lymphoid follicle이 대조군중 PUFA가 많이 함유된 CO와 PO 식이군에서도 발생했는데 종양은 BT와 CO군에서만 관찰되었다. 30주동안 식이지방을 먹인 후에도(Table 5) 대조군에서는 종양이 발견되지 않았지만 MNU 처리군에서는 지방의 종류와 관계없이 모든군에서 종양발생이 증가했다. 포화지방산의 함량이 높은 BT군에서는 26마리 중 23마리가 대장에 종양이 발생되어(88.5%) 그 빈도가 가장 높았으며, 다음으로 linoleic acid의 함량이 높은 CO군에서는 28마리 중 23마리에서 종양이 발생되었으며(82.1%), α -linolenic acid의 함량이 높은 PO군에서는 26마리 중 15마리로서(57.7%) 그 빈도가 가장 낮았다. 대장에 생긴 종양의 크기와 각 동물에서 발견된 종양의 수효를 자세히 관찰해 보면 PO군에서는 대부분 1~2개의 종양이 발생된 쥐가 많았고, 3mm 이상 큰 종양은 CO와 BT군에 더 많았다(Table 6). 또한 종양이 발생된 위치는 모두 대장의 중반이후의 후반부에서 관찰되었으며, 관찰된 종양형태는 유두형(papillary, Fig. 1a)과 용종형(polypoid, Fig. 1b, 1c)이 대부분으로서 그 크기는 2~14mm 정도의 크기 였으며 조직학적 관찰에 의하면 양성종양에서 부터 잘 분화된 선암에 까지 다양하게 나타났으며 타 장기의 전이현상은 발견되지 않았다. 대조군은 점막간질에 경미한 임프구의

Table 5. Colon tumor incidence and tumor size in MNU-treated rats fed different dietary fats for 30 weeks¹⁾

| Groups | (n) | Rats with | | Avg tumors | | Tumor size(mm) |
|---------|-----|-----------|-----------|--------------|---------|----------------|
| | | tumor | Frequency | Total tumors | per rat | |
| Control | 23 | 0 | 0% | 0 | 0 | 0 |
| BT+MNU | 26 | 23 | 88.5% | 60 | 2.3 | 3.6±2.4 |
| CO+MNU | 28 | 23 | 82.1% | 66 | 2.4 | 3.6±1.8 |
| PO+MNU | 26 | 15 | 57.7% | 42 | 1.6 | 3.4±2.7 |

- 1) Tumor incidence was observed at 30 weeks of feeding
 MNU: Methylnitrosourea 16mg infused i.r.
 Control: All dietary groups(BT, CO, PO) infused with saline i.r.

Table 6. Size and distribution of tumors in rats treated with MNU

| Groups | tumor size(mm) | | | Number of Tumors in Tumor-bearing rats | | | | | |
|--------|----------------------------|-----|----|----------------------------------------|---|---|---|---|----|
| | <1.0 | 1-3 | >3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | >6 |
| | Number of rats with tumors | | | | | | | | |
| BT+MNU | 0 | 12 | 11 | 8 | 5 | 5 | 2 | 1 | 2 |
| CO+MNU | 1 | 13 | 9 | 7 | 6 | 2 | 5 | 2 | 1 |
| PO+MNU | 1 | 9 | 5 | 6 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 |

Tumor incidence was observed at 30 weeks of feeding

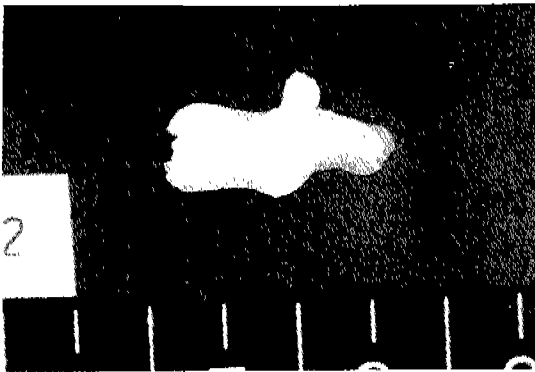


Fig. 1a. Papillary mass is noted in the colon with thin stalk(CO, 30 wk).

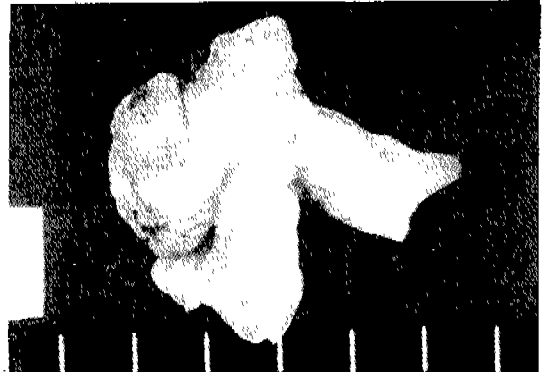


Fig. 1c. The largest polypoid mass is noted in the colon with broad base(BT, 30 wk).

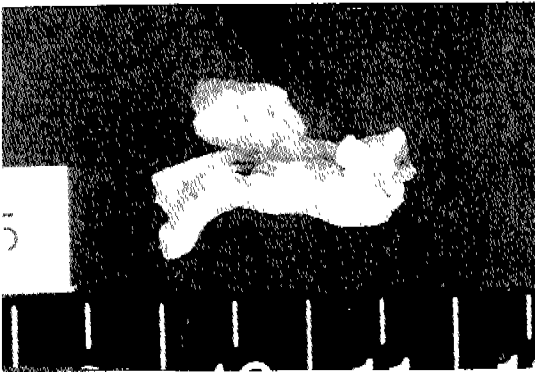


Fig. 1b. Small polypoid mass is noted in the colon(CO, 30 wk).

침윤을 보이는 것 외에는 배상세포를 함유하는 정상 선구조를 보였으나, MNU 처리군에서 관찰된 종양들은 양성 및 악성종양으로 구성되어었는데 양성 종양은 대부분은 정상구조와 유사한 세포로 구성된 선종이었고, 육안적으로 큰 종괴를 형성하고 있는

종양들은 농밀된 핵, 감소된 세포질, 다양한 세포 및 핵의 모양, 복잡한 구조의 장선등을 나타내는 전형적인 선암종 소견을 보였다. 악성종양으로 판명된 종괴에서는 종괴전체가 악성종양세포로 구성된 경우도 있었으나 일부에서는 악성 및 양성종양소견을 모두 가지고 있는 경우도 있었다(Fig. 2a). 악성종양세포의 침윤 정도는 대부분 점막층에서만 악성 종양세포가 관찰되었으나, 점막하층까지 침범한 경우도 있었으며, 악성종양의 간질내에 골형성이 관찰되는 경우도 있었다(Fig. 2b). 악성종양이 관찰되는 실험동물의 대장에서 대장점막이 비교적 경미하게 비후된 장소도 관찰되었는데, 비후된 장점막의 조직학적 관찰에서 대부분의 비후 점막은 확장된 선구조 또는 정상 선구조로 구성되어 있었지만, 비정상적인 핵과 세포질을 지니는 장소도 관찰되었으며 국소적으로 악성변화를 일으킨 장선들이 관찰되기도 하였다(Fig. 2c).



Fig. 2a. A photomicrograph shows polypoid growing mass which have relatively normal glands(left) and anaplastic tubular glands(right)(BT, 30wk, H & E stain, $\times 40$).

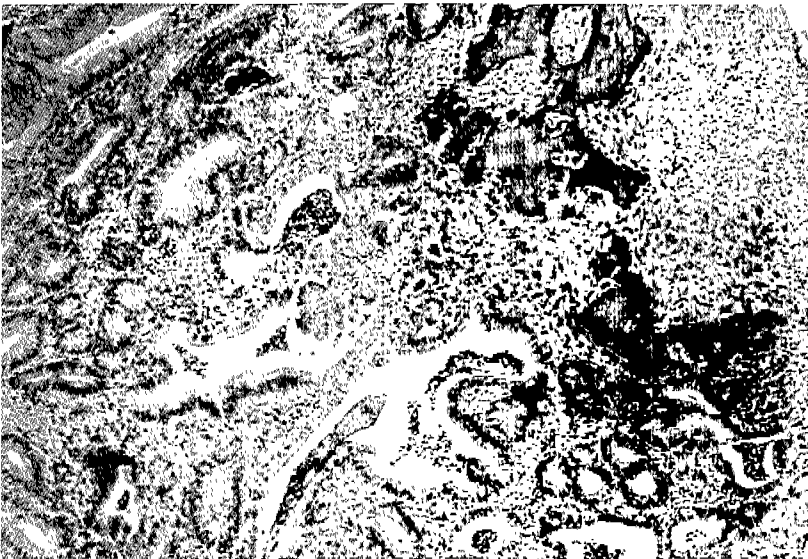


Fig. 2b. A photomicrographi shows anaplastic tubular glands and bony structure in the stroma with inflammatory reaction(BT, 30 wk, H & E stain $\times 200$).

2. Cell kinetic indices

1) Crypt length

실험식이를 먹인후 10주때 각군당 2마리씩만

죽여 관찰하여 본 결과 세포수로 표시된 crypt length는 31.1~38.4로서 BT+MNU군에서 가장 컸었다. 30주때 경우와 비교해 보면(Table 7) 대조군과 MNU 처리된 모든군의 crypt length가 증가

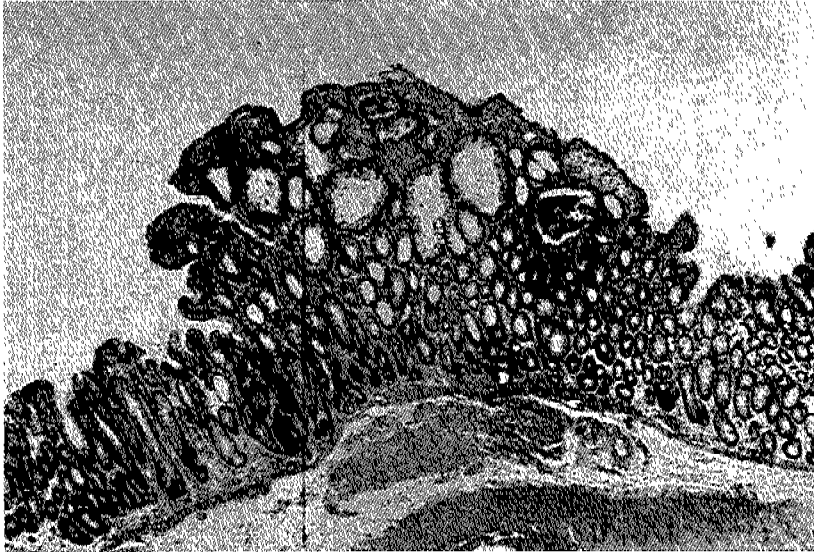


Fig. 2c. A photomicrograph shows focal thickening of mucosa which have dilated benign glands and focal anaplastic glands(CO, 30 wk, H & E stain, ×40).

Table 7. Cell kinetic indices in distal colon of rats treated with or without MNU¹⁾

| Groups | Crypt length | Circumference | Total cells | Labeling | Proliferative | LIPZ |
|----------|--------------|---------------|----------------|-------------|---------------|--------------|
| | cells | cells | per crypt | index | zone | % |
| BT | 40.5±2.5bc | 22.1±0.5bc | 865.1± 82.8bc | 3.47±0.64b | 36.31±4.49b | 14.52±2.86ab |
| CO | 37.9±2.9c | 20.9±1.1bc | 804.6±109.6bc | 4.45±0.38b | 40.50±5.78ab | 11.23±2.07a |
| PO | 33.5±1.5c | 19.6±1.0c | 645.5± 63.6c | 5.53±1.05ab | 35.37±7.20b | 15.12±2.38ab |
| BT+MNU | 50.2±1.9a | 25.8±2.4a | 1256.6± 59.1a | 8.92±2.57a | 61.88±0.89a | 15.30±2.78ab |
| CO+MNU | 40.3±2.7b | 22.7±1.0abc | 982.0±145.7ab | 7.05±1.26ab | 44.37±5.71ab | 17.77±3.48ab |
| PO+MNU | 38.5±1.5b | 23.3±0.6ab | 927.2± 66.0abc | 8.54±2.27a | 47.99±10.36ab | 21.39±1.25b |
| p-values | | | | | | |
| MNU | 0.011 | 0.003 | 0.005 | 0.005 | 0.041 | 0.033 |
| Oil | 0.004 | 0.083 | 0.077 | NS | NS | NS |
| MNU×Oil | NS | NS | NS | NS | NS | NS |

1) Rats were fed dietary fats at 16% level for 30 weeks

Mean±SEM, n=4-6

Crypt length=total # of cells in each crypt

Total cells per crypt=crypt length x circumference

Labeling index=(total # of labeled cells/crypt length)×100

Proliferative zone=(position of highest labeled cell/crypt length)×100

LIPZ=labeling index in proliferative zone

=(total # of labeled cells/position of highest labeled cell)×100

했으며(33~50개), MNU 처리를 한 이후 모든군에서 상대적으로 증가되었고 그중 BT+MNU군에서 crypt length가 가장 증가되었다.

2) Crypt circumference

10주때는 지방의 종류나 MNU처리에 의한 영향이 없었다(19~22개). 30주때는 대조군에서는 지방의 종류나 실험기간에 의한 영향을 볼 수 없었으나 MNU 처리군에서는 모든군에서 증가되었으며 그중 BT+MNU군에서 가장 유의적으로 증가되었다(Table 7).

3) Total cell number in crypt

Crypt length와 crypt circumference로부터 계산된 crypt당 총 세포수는 10주때는 대조군 경우 630개에서 732개의 범위로 CO군이 높았으나 MNU 처리후에는 715개에서 788개 범위로 BT+MNU군이 가장 높았다. 30주때는 BT+MNU군이 가장 많은 세포수를 보였으나 지방의 종류에 의한 유의적인 차이는 없었다(Table 7).

4) Labeling index, Proliferative zone

Labeling index는 10주때 crypt의 세포중 약 5~7%가 labeling되었으며 MNU 처리전과 후에 차이가 없었다. Proliferative zone(PZ)은 crypt의 18~36%로서 대조군에서는 PO군에서 가장 높았으나 MNU 처리후에는 BT+MNU군에서 높았다. 30주때는 crypt의 세포중 약 3~9%가 labeling 되었고 대조군끼리나 MNU 처리된 군안에서는 지방의 영향이 보이지 않았으나 BT군에서만 MNU 처리후에 유의성있게 labeling이 증가되었다(Table 7). PZ는 30주때는 35~62%로서 크게 증가하였으며, MNU 처리후 모든군에서 증가되었으나 그중 BT+MNU군에서만 유의성있게 상승했다. 30주때 각 PZ 안에서 labeling index를 구해보면 MNU 처리후에 증가된 경향을 보였고 대조군끼리나 MNU 처리군끼리는 지방의 영향이 없었다.

5) Labeling index in quarter

다음은 각 crypt를 4등분하여 밑에서부터 1/4 Quarter를 각각 Q1, Q2, Q3, Q4라고 명명하여 각 quarter에서 labeling index를 관찰해 봄으로서 cell

Table 8. Distribution of labeled cells in distal colon crypts of rats treated with or without MNU and fed different dietary fats for 10 weeks¹⁾

| Groups | Labeling index in each quarter | | | |
|--------|--------------------------------|----------------|---------------|----------------|
| | Q1 (first) | Q2 (second) | Q3 (third) | Q4 (fourth) |
| | % | | | |
| BT | 13.5 | 9.0 | 2.4 | 0 |
| CO | 13.2 | 5.7 | 1.0 | 0 |
| PO | 15.0 | 11.0 | 4.2 | 0 |
| BT+MNU | 12.3 | 11.2 | 1.7 | 0 |
| CO+MNU | 13.7 | 6.9 | 0.6 | 0 |
| PO+MNU | 10.1 | 7.3 | 3.5 | 0 |

1) Labeling index in each quarter of crypt was observed at 10 weeks of feeding

proliferation의 경향을 알 수 있는데 10주때는 crypt의 끝부분 즉 4번째 Q4에는 아직 labeling이 발견되지 않았고 대부분이 Q1과 Q2에 해당되는 부분에 가장 많이 있었으나 MNU 처리나 지방의 영향이 유의성있는 수준은 아니었다(Table 8). 30주때는 10주에 비해 Q1, Q2, Q3 범위에 골고루 분산되어 있으며 특히 4번째 Q4 범위에서도 label된 세포가 관찰되었다(Table 9). 즉 10주때와는 다르게 실험기간이 더욱 연장됨에 따라 식이지방과 MNU처리에 의해 세포중식이 더욱 비정상적으로 일어났다고 볼 수 있다. 그러나 대조군내에서는 Q4 범위에 지방의 종류에 의한 영향을 보이지 않았으나 MNU 처리후에는 모든 군에서 증가되었지만 특히 BT+MNU군에서 Q4 범위에 label된 세포가 유의성있게 증가되었다.

전체적으로 볼 때 실험식이후 10주에는 MNU 처리군중 BT를 투여한 경우에만 colon의 crypt length와 PZ이 높아졌으나, 30주에는 MNU 처리에 의해서 모든 cell kinetic indices가 유의성있게 영향을 받았다. 식이지방의 영향을 관찰해보면 crypt length는 MNU 처리후 BT에 의해서 상승하였으며 crypt circumference는 MNU 처리후 BT와 PO에 의해서 증가되었고, crypt당 세포의 총수효는 BT에 의해서 가장 증가되었다(PZ값은 MNU 처리전에는 CO에 의해서 가장 높았으나 MNU 처리후에는 BT에 의해서 가장 유의성있게 증가되었으며 $p <$

발암원 투여쥐의 종양발생과 세포증식

Table 9. Distribution of labeled cells in distal colon crypts of rats treated with or without MNU and fed different dietary fats for 30 weeks¹⁾

| Groups | Labeling index in each quarter | | | |
|----------|--------------------------------|-------------|------------|-------------|
| | Q1 (first) | Q2 (second) | Q3 (third) | Q4 (fourth) |
| | % | % | % | % |
| BT | 5.3±1.1ab | 6.0±1.7 | 3.9±1.2 | 1.0±0.5b |
| CO | 4.0±0.9a | 6.4±1.0 | 6.1±1.6 | 1.4±0.4b |
| PO | 7.3±1.6ab | 7.9±1.5 | 6.3±2.8 | 0.7±0.4b |
| BT+MNU | 7.1±1.2ab | 6.7±1.4 | 11.1±5.4 | 10.9±4.8a |
| CO+MNU | 10.4±3.1b | 10.1±2.3 | 5.2±1.5 | 2.5±1.1b |
| PO+MNU | 10.7±1.5b | 10.4±2.0 | 8.4±4.2 | 4.7±2.9b |
| p-values | | | | |
| MNU | 0.012 | NS | NS | 0.007 |
| Oil | NS | NS | NS | NS |
| MNU×Oil | NS | NS | NS | NS |

1) Mean±SEM, n=4-6

Labeling index in each quarter of crypt was observed at 30 weeks

Values with different alphabet within the same column were significant at $p < 0.05$

0.005). Crypt의 끝부분인 Q4 범위에 가장 label이 많았다. 즉 MNU 처리와 함께 BT공급에 의해 세포가 비정상적으로 증식하여 crypt의 길이가 길어졌고 세포상단까지 S-phase에 있는 세포가 분포되어 있었다.

고찰

고지방 식이가 대장암의 위험인자가 될 수 있다는 역학조사를 뒷받침할 수 있는 여러가지 동물실험들의 많이 이루어져 왔는데 이들 실험에서는 식이의 지방량 뿐만이 아니라 지방산조성이 또한 종양발생에 중요한 요인이 될 수 있다고 하였다. 화학적 발암원으로 대장암으로 유발시키고 지방을 투여할 때 5% (w/w)에 비해 23% (w/w) 수준의 지방을 투여했을 때 tumor 발생율이 증가하였다¹⁶⁾. 그러나 coconut oil, olive oil, fish oil, trans fat등은 5% 저지방 식이에 비해서 23%로 고지방을 투여하여도 colon tumor의 발생율이 증가되지 않았다¹⁶⁾. 이와 같이 지방의 종류에 따라 대장암 발생에 미치는 영향이 달랐으며 식이지방의 영향은 대부분 post-initiation 동안에 나타났다. 필수지방산인 linoleic acid가 대장암 발생에 promoting effect가 있을지도

모른다고 보고되었기 때문에¹⁷⁾ 박동⁹⁾의 연구에서는 9% 수준으로 지방을 투여하면서 beef tallow, corn oil, perilla oil, fish oil의 효과를 비교하였다. 이때 BT, PO, FO군의 n-6 linoleic acid 함량을 총 열량의 2.7~3.4%의 수준으로 조절하여 주었는데, BT군에서는 포화지방산 함량이 7.7% kcal로 주된 지방산이고 필수지방산(C18:2)은 3.2% kcal로 낮은 수준이었으나 CO군에는 C18:2가 11.5% kcal로 더 많이 함유되었지만 대장의 종양발생이 더 촉진되지는 않았다. 본 연구에서도 BT군에 비해 CO군에 C18:2가 월등 더 많이 함유되었지만(1.34% vs 18.7%) 종양 발생률은 오히려 BT군에서 조금 더 높았다. 이와같이 필수지방산이 모든세포의 성장에 어느정도 필요하여 결핍된 경우에는 종양발생이 감소되었지만¹⁶⁾ 만일에 성장에 필요한 양만 있으면 그 이상의 C18:2 함량에 비례해서 종양발생을 더 촉진시키지는 않았다고 사려된다. 또한 박동⁹⁾ 연구에서 9% 지방수준에서 PO와 FO를 투여한 군에서 CO와 BT군에서 보다 종양 발생빈도가 더 낮았을 뿐만 아니라 종양의 크기가 더 적었다고 한것은 PO군에 높은 n-3 α-linolenic acid와 FO군에 높은 n-3 EPA+DHA는 대장의 종양발생을 억제하는 효과가 있었다고 본다. 본 연구에서는 지방의

수준을 16%로 더 높게 먹었을 때도 PO군에서 BT와 CO군에 비해 대장의 종양 발생빈도가 더 낮았다 (57.7% vs 88.5%, 82.1%). 지방의 수준에 관계없이 n-3 fatty acid 함유량이 높은 지방을 섭취한 경우에는 종양 발생빈도가 감소되었으나 총 지방량이 높을 때는 n-3 fatty acid의 함량이 같이 증가되었어도 전체적으로 종양발생이 더욱 촉진되었다.

Table 8에서 보논바와 같이 MNU 처리에 의해서 cell kinetics의 거의 모든 indiccs는 유의성있는 영향을 받았으나 각 지방의 종류에 의해서는 그 결과가 다양하였다. 즉 BT군에서만 다른 CO와 PO군에 비해 crypt length가 유의성있게 더 증가되었으며 또한 종양의 발생빈도가 증가된 것과 일치하는 결과이었다. 세포증식 상태를 시간에 따라 검토해보면 식이지방을 투여한지 10주때는 crypt length가 증가되지 않았으며, 이 crypt를 4등분해서 보았을 때 네번째 Q4에서는 labeling이 나타나지 않았고 아직 세포증식이 활발하지 않았다고 본다. 그러나 30주때는 crypt length가 증식되었고 또한 labeling이 점차 crypt의 끝 부분까지 즉 Q4에서도 발견되었고 (Table 9) CO와 PO에 비해 BT에 의해서 유의성있게 더 높았다. 이와같이 BT는 어느 지방보다도 대장에서 cell proliferation을 증진시켜 종양발생을 더욱 촉진시켰으며, 이에 비해 n-3 α -linolenic acid가 함유된 PO는 대장에서 종양발생을 억제 또는 지연시켰다고 사려된다. 이때 n-6 fatty acid, 즉 율수 지방산의 함량이 높은 CO는 BT보다 종양 발생을 더 촉진시키지는 않았으며 BrdU test에 의하면 BT보다는 cell proliferation이 더딘것으로 표현되었다. 그러나 CO는 PO보다는 종양 발생을 더욱 증가시켰다. Kim¹⁸⁾의 보고에 의하면 발암원으로 처리하지 않았는데도 BT는 FO에 비해 crypt를 더 자극하여 crypt length가 더 커짐을 관찰하였으며, Hirose¹⁹⁾과 Narisawa¹⁰⁾의 보고에서도 발암원으로 대장암을 유발시키고 나서 perilla oil을 식이의 10% (w/w) 수준으로 공급하였을 때 palm oil, safflower oil, soybean oil 등에 비해 대장의 tumor 발생률을 억제하였다. 이와같이 포화지방산을 많이 함유한 지방은 어유나 들기름같은 n-3 fatty acid를 함유한 지방에 비해 cell proliferation을 더욱 증가

시켜 대장의 종양 발생빈도가 높았다고 사려된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 지방의 종류에 따라 대장암 발생빈도와 대장 점막의 cell proliferation에 미치는 영향을 비교하고자 쥐를 발암원인 MNU로 처리하여 대장암을 유발시키고 식이 무게의 16% 수준으로 지방을 투여하되 포화지방산 급원으로 BT, n-6 C18 : 2 급원으로 CO, n-3 C18 : 3 급원으로 PO를 30주 동안 투여하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

대조군에서는 모든 식이지방군에서 대장에 종양이 발견되지 않았으나, MNU로 처리된 군에서는 모든 지방에 의해서 대장의 증반이후 후반부에서 주로 종양이 관찰되었다. 그러나 종양 발생빈도는 지방 종류에 따라 차이가 있어 FO(57.7%) < CO(82.1%) < BT(88.5%) 순으로 증가되었으며, 옥수수유에 많이 함유된 n-6 C18 : 2은 종양 발생을 더 촉진하지는 않았다. n-3 C18 : 3 함량이 높은 들기름은 쇠기름과 옥수수유에 비해 대장암 발생을 억제 또는 지연시키는 효과가 있었다. BrdU test에 의하면 MNU 처리후 다른 지방에 비해 쇠기름에 의해서는 세포가 비정상적으로 증식하여 대장 점막의 crypt length가 가장 길어 졌으며(p < 0.05), 이것은 대장에 종양 발생빈도가 BT군에서 가장 높았던 점과 잘 일치하였다. 옥수수유에 의해서는 세포증식이 유의성있게 높지는 않았으나 종양 발생은 들기름보다 더 높았으므로 동물성 지방과 n-6 fatty acid 함유량이 높은 기름보다는 n-3 fatty acid 함유량이 높은 기름이 대장암 발생을 억제하는데 효과적이므로 식생활에서도 생선이나 들기름같은 지방을 섭취하도록 권장하고자 한다.

Literature cited

- 1) Carroll KK. Neutral fats and cancer. *Cancer Res* 41 : 3695-3699, 1981
- 2) Haenszel W and Kurihara M. Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other di-

- seases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst* 40(1) : 43-68, 1968
- 3) Wynder EL and Shigematsu T. Environmental factors of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 20 : 1520-1561, 1967
 - 4) Reddy BS and Maeura Y. Tumor promotion by dietary fat in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in female F344 rats : influence of amount and source of dietary fat. *J Natl Cancer Inst* 72 : 745-750, 1984
 - 5) Nigro ND, Singh DV, Campbell RL and Pak MS. Effect of Dietary beef fat on intestinal tumor formation by azoxymethane in rats. *J Natl Cancer Inst* 54 : 439-442, 1975
 - 6) Sakaguchi M, Hiramatsu Y, Takada H, Yamamura M, Hioki K, Saito K and Yamamoto M. Effect of dietary unsaturated and saturated fats on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 44 : 1472-1477, 1984
 - 7) Reddy BS and Maruyama H. Effect of dietary fish oil on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Res* 46 : 3367-3370, 1986
 - 8) Minoura T, Takada T, Sakaguchi M, Takada H, Yamamura M, Hioki K and Yamamoto M. Effect of dietary eicosapentaenoic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 48 : 4790-4794, 1988
 - 9) Park HS, Seo ES, Song JH, and Choi CU. Effect of perilla oil rich in α -linolenic acid on colon tumor incidence, plasma thromboxane B₂ level and fatty acid profile of colonic mucosal lipids in chemical carcinogen-treated rats. *Korean J Nutr* 26(7) : 829-838, 1993
 - 10) Narisawa T, Takahashi M, Kotanagi H, Kusaka H, Yamazaki Y, Koyama H, Fukaura Y, Nishizawa Y, Kotsugai M, Isoda Y, Hirano J and Tanida N. Inhibitory effect of dietary perilla oil rich in the n-3 polyunsaturated fatty acid α -linolenic acid on colon carcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res* 82 : 1089-1096, 1991
 - 11) Butterworth BE, Goldsworthy TL. The role of cell proliferation in multistage carcinogenesis. *Cell proliferation* 37 : 683-687, 1991
 - 12) Cohen BL, Raicht RF, Deschner EE, Takahashi M, Sarwal A, Fazzini E. Effect of cholic acid feeding on N-methyl-N-nitrosourea-induced colon tumors and cell kinetics in rats. *J Natl Cancer Inst* 64 : 573-578, 1980
 - 13) Newmark HL, Lipkin M and Maeshwari N. Colonic hyperplasia and hyperproliferation induced by a nutritional stress diet with four components of western style diet. *J Natl Cancer Inst* 82 : 491-496, 1990
 - 14) Bauer JD, Ackermann PG and Toro C. Methods of tissue examination. *Clinical Laboratory Method* 813-817, Mosby, 1974
 - 15) Schutte B, Reynders MMJ, Bosman FT & Blijham GH. Studies with antibromodeoxyuridine antibodies II : Simultaneous immunocytochemical detection of antigen expression and DNA synthesis by in vivo labeling of mouse intestinal mucosa. *J Histochem Cytochem* 35 : 371-374, 1987
 - 16) Reddy BS, Burill C and Rigotty J. Effect of diets high in ω -3 and ω -6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res* 51 : 487-491, 1991
 - 17) Bull A, Bronstein J and Nigro N. The essential fatty acid requirement for azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Lipids* 24 : 340-346, 1989
 - 18) Kim DY. Modulation of biomarkers of colon carcinogenesis by dietary fiber and fat. Doctoral dissertation, Texas A & M University, May 1992
 - 19) Hirose M, Masuda A, Ito N, Kamano K and Okuyama H. Effects of dietary perilla oil, soybean oil and safflower oil on 7, 12-dimethylbenz[a]-anthracene(DMBA) and 1, 2-dimethylhydrazine (DMH)-induced mammary gland and colon carcinogenesis in female SD rats. *Carcinogenesis* 11(5) : 731-735, 1990