

## Conjugated Linoleic Acid(CLA)의 암세포 증식 억제효과 및 Interleukin-1과 Interleukin-2의 생성에 미치는 영향

김소희<sup>†</sup> · 김광혁\* · 박건영\*\* · Michael W. Pariza\*\*\*

동주여자전문대학 식품영양과

\*고신대학 의학부 미생물학교실

\*\*부산대학교 식품영양학과

\*\*\*미국 위스콘신대학교 식품미생물 및 독성학과

### Effects of Conjugated Linoleic acid(CLA) on the Growth of Tumor Cells and the Production of Interleukin-1 and Interleukin-2

So-Hee Kim<sup>†</sup>, Kwang-Hyuk Kim\*, Kun-Young Park\*\* and Michael W. Pariza\*\*\*

Dept. of Food and Nutrition, Dong-Ju Women's Junior College, Pusan 604-080, Korea

\*Dept. of Microbiology, Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea

\*\*Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

\*\*\*Dept. of Food Microbiology and Toxicology, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI53705, USA

#### Abstract

Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid(CLA) are a series of positional and geometric isomers of linoleic acid which are found naturally in food, mainly dietary products and beef. We studied the effects of CLA on the growth of tumor cells and the production of interleukin-1(IL-1) and interleukin-2(IL-2). CLA treatment markedly inhibited the growth of Yac-1 cells and sarcoma-180 cells by 99 and 82% to that of control, respectively, after four days of incubation at 37°C. To elucidate the immunological mechanism of antitumor activity of CLA, spleen cells of Balb/c mouse were exposed to 31, 63, 125, 250 µg of CLA per ml for 24hrs at 37°C. The culture supernatants of CLA-exposed spleen cells reduced the production of IL-1 and IL-2 in all of the test conditions. These results indicate that the anticarcinogenic effect of CLA was mediated by the other actions rather than the production of the IL-1 or IL-2. We suggest that CLA might have an antiinflammatory effect in part due to its inhibitory action on the production of IL-1.

**Key words:** conjugated linoleic acid(CLA), anticarcinogenicity, interleukin-1(IL-1), interleukin-2(IL-2)

#### 서론

Conjugated linoleic acid(CLA)는 linoleic acid의 이중결합 공역체들로서 육류 및 낙농제품을 비롯하여 해산물, 식물유 등 많은 자연식품 중에 존재한다(1,2). CLA는 linoleic acid의 이중결합 공역 이성체들(conjugated dienoic derivatives)의 혼합물을 뜻하는 acronym인데, 이는 linoleic acid의 알칼리 이성화에 의하여 화학적으로도 8개의 기하이성체들, c9, c11, c9,t11, t9,c11, t9, t11, c10,c12, c10,t12, t10,c12 그리고 t10,t12의 octadecadienoic acid를 생성할 수 있다(3)

CLA는 1987년 갈아서 구운 쇠고기로부터 항암효과를 가진 물질로 분리된 이래로 그의 생리기능에 대한 연구가 계속되어 왔다(4,5). CLA는 화학물질에 의해 유도된 피부암과 위암, 유방암에 대한 항암효과를 가지며(4,6,7), 설정된 실험조건에서는  $\alpha$ -tocopherol보다 강한 항산화효과를 나타내었다(6). 이러한 CLA는 항산화작용과 더불어 섭취된 후 생체 인지질에의 편입(incorporation)(8) 및 암세포 증진(tumor promotion)의 활성 저해작용(9) 등의 기전에 의해 암화의 단계 중 개시(imitation) 및 증진(promotion)과정을 억제하는 것으로 알려지고 있다. 또한 리포지단백대사에도 관여하여 토끼

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

의 혈중 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 트리글리세라이드를 낮추는 항고혈압효과도 보고되고 있다(10). 이밖에도 CLA에 관하여는 체중증가와 식이효율을 증가시키는 성장효과 등(11) 그 생리기능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

그러나 CLA의 항암효과나 항암기전에 관한 연구는 1990년 이후 시작되었으며 복잡한 면역계에 있어서의 CLA의 효과에 대하여는 최근 CLA 이성체들이 endotoxin인 lipopolysaccharide(LPS)의 투여에 따른 catabolic loss, 즉 체중감소율을 감소시켰다는 보고(12,13)가 있었으나 환경이나 식이 중에 무수히 존재하는 면역학적 자극물들에 의한 위로부터의 감염에 대한 면역과정에서의 CLA의 역할에 관한 연구는 미흡한 편이다.

따라서 본연구에서는 화학제와는 달리 독성이나 부작용이 없을 것으로 기대되며 사람의 혈청, 담즙, 십이지장에도 존재하는 것으로 알려진 영양소인 CLA(14)의 항암기작을 면역계와 연관하여 추정해 보고자 하였다. 먼저 마우스 lymphoma cell line인 Yac-1과 복수암 세포인 sarcoma-180의 증식에 대한 CLA의 효과를 측정함으로써 암세포의 증식에 대한 CLA의 직접적인 영향을 알아 보았으며, 면역과정의 생물학적 작용과 대사적 변화를 유도하는 사이토카인들인 interleukin-1(IL-1)과 interleukin-2(IL-2)의 생성에 대한 영향을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 시약

CLA(# 0 5507), concanavalin A(Con A), phosphate buffered saline (PBS), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-y]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma Chemical Co.(USA)로부터 구입하였다. Hank's balanced salt solution(HBSS), RPMI 1640, penicillin-streptomycin(X100)는 Gibco Co.(USA)에서, fetal calf serum (FCS)은 Boehringer Mannheim(Germany)로부터 구입하여 사용하였다.

### 실험동물

체중 25g 내외(생후 8주 내외), 암컷의 Balb/c 마우스를 표준사료로 사육하면서 실험에 사용하였다.

### 암세포에 대한 증식 억제효과

#### 암세포 배양

마우스 lymphoma cell인 Yac-1 세포는 미국 ATCC

로부터 분양받아 10%(v/v) FCS, 2mM glutamine, penicillin-streptomycin이 함유된 배지에서  $1 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 배양하면서 사용하였다. 복수암 세포인 sarcoma-180 세포는 실험동물의 복강내에서 1주일 간격으로 계대 배양하여 보존하면서 실험에 사용하였다. 즉 실험동물의 복강내에서 1주일간 배양된 sarcoma-180 세포를 복수와 함께 취하고 PBS로 현탁한 후 원심분리하여 분리하였다. 분리된 세포를 PBS에 다시 부유시켜 원심분리하고 상등액을 제거한 후  $1 \times 10^6$  cells/ml의 sarcoma-180 세포 부유액을 만들어 1ml씩 복강주사하여 이식 보존하였다.

### 암세포 증식 억제효과 측정(15)

Yac-1 세포와,  $1 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 실험동물에 복강주사하여 10일 후 그들의 복강으로부터 채취한 sarcoma-180 세포를 각각 10%(v/v) FCS, 2mM glutamine 및 penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI-1640 배지에서  $1 \times 10^4$  cells/ml로 세포수를 조정한 후 96 well plate에 100μl씩 분주하였다. CLA를 Yac-1 세포배지에는 3, 6, 13, 25, 50, 100 그리고 200μg/ml 농도가 되게 첨가하고 sarcoma-180 세포배지에는 8, 16, 31, 63, 125 및 250μg/ml의 농도가 되게 가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 4일간 배양 후 MTT(5mg/ml, PBS) 용액 10μl를 가하여 37°C에서 4시간 동안 발색시켰다. 다시 0.02N의 HCl용액에 10%의 농도로 녹인 sodium dodecyl sulfate(SDS)용액 25μl를 첨가하여 실온에서 하룻밤 방치한 후 microplate reader(Model 550 microplate reader, Bio-Rad, USA)를 이용하여 540nm에서의 optical density(OD)값을 대조군과 비교하였다.

### 마우스 비장세포의 분리

마우스로부터 비장세포는 Mishell과 Shiigi의 방법(16)에 의해 분리하였다. 즉 실험동물로부터 무균적으로 비장을 적출하여 HBSS용액으로 2번 세척하여 조직 배양용 접시에 옮긴 후 다시 신선한 HBSS용액을 가하여 핀셋으로 가볍게 문질러 비장세포를 유리시켰다. 세포 부유액을 15분 동안 방치한 후 그 상층액을 HBSS 용액으로 다시 세척한 다음 중류수와 PBS를 이용하여 적혈구를 제거하고 10%(v/v) FCS가 함유된 RPMI-1640 배지로 부유시켜 사용하였다.

### 비장세포 배양 상층액의 분리

비장세포 배양 상층액은 Weir 등의 방법(17)에 의해 준비하였다. 준비된 비장세포를 10% FCS를 포함한 RPMI 1640배지로  $4 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 조절하고 CLA

를 ml당 0, 31, 63, 125, 250 $\mu$ g 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. 이들을 300 $\times$ g에서 10분간, 10,000 $\times$ g에서 30분간 원심분리시킨 후 그 상층액을 취하여 -70°C 냉동기에 보관하면서 IL-1과 IL-2 assay에 사용하였다.

#### IL-1 assay

비장세포 배양 상층액의 IL-1 활성측정은 다음과 같은 방법(18-20)에 준하여 측정하였다. 즉, 마우스로부터 흉선세포를 분리하여 10% FCS를 포함한 RPMI 1640 배지에 부유시켰다. 96 well plate에 흉선세포( $1 \times 10^6$  cells/ml)가 부유된 세포액 100 $\mu$ l를 가한 후 다시 Con A용액(4 $\mu$ g/ml)과 비장세포 배양 상층액을 각각 50 $\mu$ l씩 첨가하여 37°C에서 48시간 배양하였다. IL-1 의존성 세포인 흉선세포의 증식 정도는 암세포 증식 억제효과에서와 같은 방법으로 MTT를 이용하여 검토하였다.

#### IL-2 assay

IL-2 의존성 세포주인 CTLL-2 세포를 이용한 방법(21)을 변형하여 IL-2 활성을 측정하였다. 한국 세포주 은행으로부터 분양받은 CTLL-2 세포는 10% FCS, ml당 20IU의 IL-2가 함유된 RPMI 1640배지에서 3일간 배양 후 trypan blue 염색액으로 세포의 viability를 확인하고 ml당  $1 \times 10^4$  세포의 농도로 계대배양하면서 실험에 사용하였다. 10% FCS가 함유된 RPMI 1640배지에 CTLL-2 세포( $1 \times 10^5$  cells/ml)가 부유된 세포액 50 $\mu$ l를 96 well plate에 가한 후 다시 비장세포 배양 상층액 50 $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 18시간 배양하였다. CTLL-2세포의 증식 정도를 암세포 증식 억제효과 측정에서와 같은 방법으로 MTT를 이용하여 검토하였다.

## 결과 및 고찰

### 암세포 증식억제효과

CLA가 암세포 증식에 미치는 직접적인 영향을 검토하고자 CLA를 mouse lymphoma cell인 Yac-1 세포와 복수암 세포인 sarcoma-180 세포에 농도별로 첨가하여 4일간 배양 후, 암세포들의 증식을 MTT를 이용한 colorimetric assay 방법으로 검토하였다.

Table 1에서와 같이, CLA는 Yac-1 세포의 증식에 대한 강한 억제효과를 나타내어 ml 당 6 $\mu$ g 이상 첨가하였을 때 대조군에 비해 증식을 감소시켰으며( $p < 0.05$ ) 그 효과는 농도(3, 6, 13, 25, 50, 100, 200 $\mu$ g/ml) 의존적이었고 특히 ml 당 50 $\mu$ g 이상의 CLA 첨가에서는 증식억제

**Table 1. Inhibitory effect of conjugated linoleic acid on the growth of Yac-1 incubated for 4 days at 37°C**

Treatment	OD <sup>1)</sup> value	Inhibition rate (%)
Media	0.090 $\pm$ 0.006	
Control	0.787 $\pm$ 0.013	
CLA 200 $\mu$ g	0.094 $\pm$ 0.008*	99.87 $\pm$ 1.00
100 $\mu$ g	0.096 $\pm$ 0.010*	99.15 $\pm$ 0.85
50 $\mu$ g	0.101 $\pm$ 0.024*	98.45 $\pm$ 2.42
25 $\mu$ g	0.311 $\pm$ 0.006*	68.27 $\pm$ 0.14
13 $\mu$ g	0.566 $\pm$ 0.023*	31.75 $\pm$ 1.58
6 $\mu$ g	0.697 $\pm$ 0.021*	12.93 $\pm$ 0.90
3 $\mu$ g	0.732 $\pm$ 0.047	7.95 $\pm$ 3.55

Values are means $\pm$ SD

<sup>1)</sup>Optical density, the growth of Yac-1 cells measured by colorimetric assay with 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)

\*Significantly different from the control by Student's *t* test( $p < 0.05$ )

효과가 98% 이상이였다. 이러한 CLA의 암세포에 대한 증식억제효과는 복수암 세포인 sarcoma-180에서도 관찰되었는데(CLA농도: 8, 16, 31, 63, 125, 250 $\mu$ g/ml), ml 당 CLA 125 $\mu$ g 이상의 농도에서 암세포의 증식을 80% 이상 억제시키는 강한 효과를 보였다( $p < 0.05$ , Table 2).

CLA가 가지는 항암작용과 암세포 성장 저해기전에 대하여는 완전히 밝혀지지 않았다. 그러나 Shultz 등(22)도 CLA가 사람의 유방암 세포 성장에 대한 억제작용이 있음을 발표한 바 있으며 CLA로 처리된 MCF-7 세포들은 대조군에서 보다 적은 [<sup>3</sup>H]leucine, [<sup>3</sup>H]uridine, [<sup>3</sup>H]thymidine을 편입(incorporation)하였음(23)을 미루어

**Table 2. Inhibitory effect of conjugated linoleic acid on the growth of sarcoma-180 incubated for 4 days at 37°C**

Treatment	OD <sup>1)</sup> value	Inhibition rate (%)
Media	0.100 $\pm$ 0.004	
Control	0.625 $\pm$ 0.004	
CLA 250 $\mu$ g	0.193 $\pm$ 0.006*	82.27 $\pm$ 1.02
125 $\mu$ g	0.202 $\pm$ 0.002*	80.56 $\pm$ 0.36
63 $\mu$ g	0.254 $\pm$ 0.010*	70.70 $\pm$ 0.90
31 $\mu$ g	0.592 $\pm$ 0.001*	31.74 $\pm$ 1.29
16 $\mu$ g	0.578 $\pm$ 0.022*	8.94 $\pm$ 4.60
8 $\mu$ g	0.624 $\pm$ 0.022*	0.17 $\pm$ 4.51

Values are means $\pm$ SD

<sup>1)</sup>Optical density, the growth of sarcoma-180 cells measured by colorimetric assay with 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)

\*Significantly different from the control by Student's *t* test( $p < 0.05$ )

볼 때 CLA의 암세포 성장억제는 단백질과 핵산의 생합

성을 저해하기 때문으로 생각된다. 또한 CLA는 linoleic acid와 함께 arachidonic acid 및 eicosanoids의 생합성에 경쟁적으로 작용할 것이며(4,24), eicosanoids가 정상세포와 암세포의 증식에 관여한다는 연구결과(25)들을 고려할 때 CLA가 eicosanoids의 대사에도 영향을 미쳐 암세포 성장을 억제시킬 것으로 사료된다.

본 실험결과로 CLA는 림프종(lymphoma) 세포와 복수암 세포의 증식억제나 생존력을 감소시키는데도 작용함을 알 수 있었다. Linoleic acid의 경우 *in vitro*에서 유방암 세포 배양에 첨가되었을 때 그 초기에는 암세포의 증식을 촉진하고 배양 8일 이후부터 암세포의 증식을 억제시켰으며(22), 유선 및 결장의 carcinogenesis의 증가에 관여함이 보고(26)되어 있음을 고려할 때 CLA의 암세포 증식억제효과는 매우 고무적인 일이며 나아가 암의 진행을 차단할 가능성이 있는 물질로 생각된다. 또한 자연식품에도 존재하며 영양소인 CLA의 이용을 위해서는 보다 여러 종류의 암세포에 대한 효과와 *in vivo*에서의 항암효과 및 항암기작 등이 더욱 연구되어야 할 것이다.

IL-1, IL-2 생성에 미치는 영향

면역과정에서 생물학적 작용을 조절하는 cytokine 인 IL-1과 IL-2의 생성에 대한 CLA의 영향을 *in vitro*에서 Balb/c 마우스의 비장세포를 이용하여 실험하였다. Fig. 1.에서와 같이 CLA(31, 63, 125, 250µg/ml)와 함께 24시간 동안 배양되었던 비장세포에서는 IL-1의 생성이 CLA 농도에 의존적으로 억제되어, 그 상등액들은 흉선세포(IL-1 의존성 세포)의 성장을 감소시켰다. IL-1은 세포의 손상, 감염, 항원에 대응하여 대식세포 등에 의해 생성되어 collagenase와 같은 분해성 효소와 prostaglandin을 생성하고 염증반응을 유발한다(27). 따라서 본 결과에서 나타난 CLA의 IL-1 생성억제는 CLA가 항염증작용을 가질 수 있음을 시사하였다. 그리고 본 실험에서 CLA가 IL-1 생성을 억제시키는 기전은 연구되지 않았지만, n-3계 불포화지방산의 섭취에 의하여 세포막 인지질의 arachidonic acid level 및 IL-1 생성이 감소되었다는 보고(28)가 있으므로 CLA도 n-3계 불포화지방산과 같이 세포막의 arachidonic acid를 감소시킴(12,13)과 더불어 IL-1 생성을 억제시키는 것으로 생각된다.

또한 IL-1은 vaccination을 포함하여 환경이나 식이 중에 무한히 존재하는 면역학적 자극물들에 의한 면역 과정에서 생체변화를 초래하여 골격근육의 단백질합성을 저해하거나 분해시키며 체중과 식이섭취를 감소시

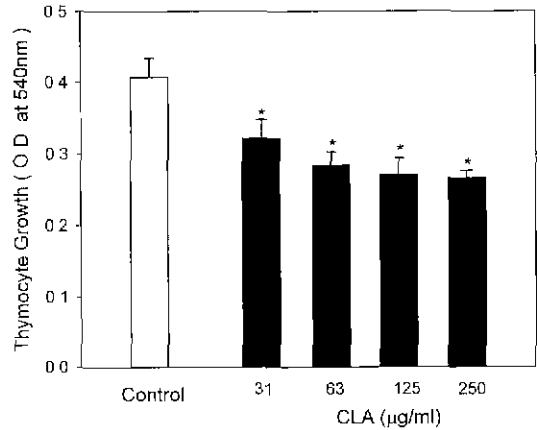


Fig. 1. Effect of conjugated linoleic acid-culture supernatant on the production of interleukin-1(IL-1). Spleen cells( $1 \times 10^6$  cells/ml) of Balb/c mouse were cultivated in RPMI medium supplemented with 31, 63, 125, 250µg of CLA for 24hrs at 37°C. After treatment, culture supernatants were harvested by centrifugation. Each culture supernatant was added to thymocyte cells( $1 \times 10^6$  cells/ml) with concanavalin A(Con A, 4µg/ml). After 4 days culture, the growth of thymocyte cells was measured by colorimetric assay with 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT). \*Significantly different from control by Student's t test( $p < 0.05$ )

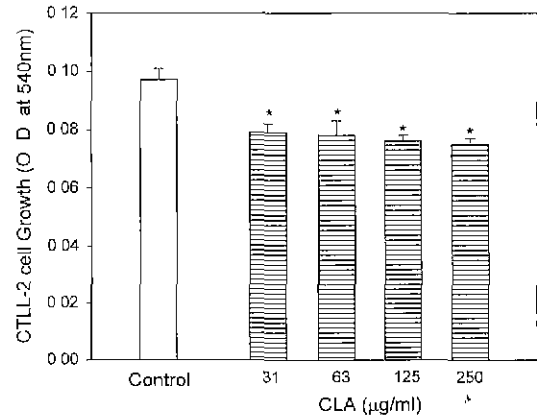


Fig. 2. Effect of conjugated linoleic acid-culture supernatant on the production of interleukin-2(IL-2). Spleen cells were treated with various concentrations (31, 63, 125, 250µg/ml) of CLA by the same procedure as Fig. 1. Each culture supernatant was added to CTLL-2 cells( $1 \times 10^5$  cells/ml). After 4 days culture the growth of CTLL-2 cells was measured by colorimetric assay with MTT. \*Significantly different from control by Student's t test( $p < 0.05$ ).

키는 역효과도 나타내는 것으로 알려져 있다(29). Endotoxin의 투여는 IL-1의 생성을 증가시켰으며(30), 최근

CLA 이성체들이 면역반응에는 영향을 주지 않으면서 endotoxin인 lipopolysaccharide의 투여에 따른 체중감소를 감소시켰다는 연구결과들(12,13)과 더불어 CLA가 IL-1의 생성을 억제시킨 본 실험결과와는 면역학적 자극물들에 의한 대사적 변화에 있어서의 CLA의 방어작용에 대한 한 기전으로 설명될 수 있을 것으로 생각된다.

*In vitro*에서 비장세포의 IL-2 생성에 대한 CLA의 영향을 실험하였다. 마우스의 비장세포에 ml당 31, 63, 125, 250 $\mu$ g의 CLA를 가하여 대조군과 함께 37°C에서 24시간 배양 후 그 상등액을 IL-2 의존성 세포주인 CTLL-2 세포와 18시간 배양하여 CTLL-2 세포 성장의 정도로 IL-2 생성을 확인한 결과는 Fig. 2와 같다. CLA는 모든 실험 농도에서 대조군에 비하여 IL-2의 생성을 저해하여 CTLL-2 세포 성장을 저해하였다( $p < 0.05$ ). IL-2는 주로 T세포에 강력한 성장인자와 활성인자로 작용하는 것으로 알려져 있으므로(21,31) CLA가 가지는 항암효과는 IL-2의 생성과는 무관한 것으로 사료된다.

본 실험에서 얻어진 결과와 같은 효과를 갖는 CLA의 항암기전과 면역반응 및 면역계에서의 작용은 더욱 연구되어야 할 것이며, CLA가 인체에 안전하고 효과적임을 더욱 밝혀 생체의 염증관리와 암의 예방 및 치료에 적용할 수 있다면 매우 바람직할 것으로 생각된다.

## 요 약

육류 및 낙농제품을 비롯하여 많은 자연식품에 함유되어 있으며 사람의 체내에도 존재하는 것으로 알려진 CLA가 암세포 증식에 미치는 효과와 면역계에서 생물학적 작용에 관여하는 cytokine인 IL-1과 IL-2의 생성에 미치는 영향을 흉선세포와 CTLL-2 세포주를 이용한 bioassay 방법으로 검토하였다. CLA는 강한 암세포 증식억제효과를 나타내어 ml당 50 $\mu$ g의 농도에서 마우스의 림프종 세포인 Yac-1 세포의 증식을 98% 이상 억제시켰으며 복수암 세포인 sarcoma-180 세포의 증식도 ml당 125 $\mu$ g의 농도에서 80% 이상 억제시켰다. 또한 CLA는 농도(31, 63, 125, 250 $\mu$ g/ml) 의존적으로 비장세포의 IL-1 생성을 억제시키는 결과를 보여 CLA가 항염증작용을 가지는 성분이 될 수 있음을 시사하였다. 뿐만 아니라 CLA는 모든 실험 농도(31, 63, 125, 250 $\mu$ g/ml)에서 IL-2의 생성을 억제시켰다. 따라서 CLA가 암세포 증식에 미치는 효과는 IL-1과 IL-2와 같은 사이토카인의 생성 증진에 따른 면역 담당 세포의 활성화가 아닌 암세포의 단백질 및 핵산의 생합성 저해 등과 같은 작용과 관련을 가질 가능성이 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 한국과학재단의 1995년도 후반기 해외 post-doc. 연수지원에 의한 연구결과와 일부로 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Chin, S. F., Storkson, J., Ha, Y. L. and Pariza, M. W. : Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogen. *J. Food Comp. Anal.*, **5**, 185(1992)
- Shantha, N. C., Crum, A. D. and Decker, E. A. : Evaluation of conjugated linoleic acid concentrations in cooked beef. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1757(1994)
- Ip, C., Chin, S. F., Scimeca, J. A. and Pariza, M. W. : Mammary cancer prevention by conjugated of linoleic acid. *Cancer Res.*, **51**, 6118(1991)
- Ha, Y. L., Grim, N. K. and Pariza, M. W. : Anticarcinogen from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, **8**, 1881(1987)
- Ha, Y. L., Grim, N. K. and Pariza, M. W. : Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: identification and quantification in natural and processed cheeses. *J. Agri. Food Chem.*, **37**, 75(1989)
- Ha, Y. L., Storkson, J. and Pariza, M. W. : Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.*, **50**, 1097(1990)
- Ip, C., Scimeca, J. A. and Thompson, H. : Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. *Nutr. Cancer*, **24**, 241(1995)
- Pariza, M. W. and Hargraves, W. A. : A beef derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Carcinogenesis*, **6**, 591(1985)
- Benzamin, H., Storkson, J. M., Albright, K. and Pariza, M. W. : TPA-mediated induction of ornithine decarboxylase activity in mouse forestomach and its inhibition by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *FASEB J.*, **4**, 140(1990)
- Lee, K. N., Kritchevsky, D. and Pariza, M. W. : Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, **108**, 19(1994)
- Chin, S. F., Albright, K. J., Cook, M. E. and Pariza, M. W. : Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. *J. Nutr.*, 2344(1994)
- Cook, M. E., Miller, C. C., Park, Y. and Pariza, M. W. : Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poultry Sci.*, **72**, 1301(1993)
- Miller, C. C., Park, Y., Pariza, M. W. and Cook, M. E. : Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic response due to endotoxin injection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198**, 1107(1994)

14. Cawood, P., Wickens, D. G., Iversen, S. A., Braganza, J. M. and Dormandy, T. L. : The nature of diene conjugation in human serum, bile and duodenal juice. *FEBS Lett.*, **162**, 239(1983)
15. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55(1983)
16. Mishell, B. B. and Shiigi, S. M. : *Selected methods in cellular immunology*. 1st ed., Wh Freeman Co., San Francisco, p.4(1980)
17. Weir, D. W., Herzenberg, L. A. and Blackwell, C. : *Handbook of experimental immunology*. 4th ed., Blackwell Scientific Publications, Boston, p.60.1(1986)
18. Gery, I. and Waksman, B. H. : Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogen. I. The responding cell. *J. Exp. Med.*, **136**, 128(1972)
19. Geaung, A. J., Bird, C. R., Bristow, A., Poole, S. and Thorpe, P. : A simple sensitive bioassay for interleukin-1 which is unresponsive to  $10^3$  units of interleukin-2. *J. Immunol. Methods*, **99**, 7(1987)
20. Gilis, S. and Mizel, S. B. : T cell lymphoma model for the analysis of interleukin-1-mediated T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1133(1981)
21. Gilis, S., Ferm, M. M., Ou, W. and Smith, K. A. : T cell growth factor : Parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.*, **120**, 2027(1978)
22. Shultz, T. D., Chew, B. P. and Seaman, W. R. : Differential stimulatory and inhibitory responses of human MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid and conjugated linoleic acid in culture. *Anticancer Res.*, **12**, 2143(1992)
23. Shultz, T. D., Chew, B. P., Seaman, W. R. and Luedcke, L. O. : Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and  $\beta$ -carotene on the *in vitro* growth of human cancer cells. *Cancer Lett.*, **63**, 125(1992)
24. Rose, D. P. and Connolly, J. M. : Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res.*, **50**, 7139(1990)
25. Schatz, F., Markiewicz, L. and Gurside, E. : Differential effect of estradiol, arachidonic acid and A23187 on prostaglandin F<sub>2</sub>  $\alpha$  output by epithelial and stromal cells of human endometrium. *Endocrinology*, **120**, 1465(1987)
26. Ip, C., Carter, C. A. and Ip, M. M. : Requirement of essential fatty acid for mammary tumorigenesis in the rat. *Cancer Res.*, **45**, 1997(1985)
27. Dinarello, C. A. : *Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response*. *N Engl. J. Med.*, **311**, 1413(1984)
28. Endres, S., Ghorbani, R., Kelley, V. E., Georgilis, K., Lonnemann, G. and Dinarello, C. A. : The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl. J. Med.*, **320**, 265(1989)
29. Beutler, B. and Cerami, A. : Cachectin - more than a tumor necrosis factor. *N Engl. J. Med.*, **316**, 379(1987)
30. Klasing, K. C., Laurin, D. E., Peng, R. K. and Fry, D. M. : Immunologically mediated growth depression in chicks: Influence of feed intake, corticosterone and interleukin-1. *J. Nutr.*, **117**, 1629(1987)
31. Roit, I. M., Brostoff, J. and Male, D. K. : *Immunology*. Gower Medical Publishing, New York, p.8.9(1985)

(1997년 7월 18일 접수)