

## n-3 지방산이 유방암세포의 증식과 지질과산화 및 Oncogene 발현에 미치는 영향\*

조성희 · 조일진 · 박희성\*\*

대구효성가톨릭대학교 식품영양학과, 식물육종학과\*\*

### Effects of n-3 Fatty Acids on Proliferation of Human Breast Cancer Cells in Relation to Lipid Peroxidation and Oncogene Expression

Cho, Sung-Hee · Cho, Il-Jin · Park, Hee-Sung\*\*

Department of Food Science and Nutrition, College of Home Economics  
Department of Plant Breeding,\*\* College of Natural Science, Catholic University of  
Taegu-Hyosung, Kyung-buk, Korea

#### ABSTRACT

To investigate the effects of n-3 fatty acids on breast cancer, MDA-MB231 human breast cancer cells were cultured in the presence of  $\alpha$ -linolenic(LNA), eicosapentaenoic(EPA), and docosahexaenoic acid(DHA) at a concentration of 0.5 $\mu$ g/ml in serum-free IMDM medium. Cell growth was monitored and thiobarbituric acid reactive substances(TBARS),  $\alpha$ -tocopherol contents, and oncogene expression were measured. To compare the effects of n-3 fatty acids with other types of fatty acid, stearic(STA), oleic(OA), linoleic acid(LA) were used. After one day, cell growth was retarded most highly when DHA was in the medium. Cellular TBARS level measured after three days of culture was the highest with DHA in the medium and was also increased by LNA and EPA, compared with STA, OA and LA. Alpha-tocopherol contents of cells were decreased by DHA but only modestly. There was no significant difference in  $\alpha$ -tocopherol contents in cells cultured in the presence of the other fatty acids. Northern blot hybridization carried out with cells cultured during 24 hours showed that levels of *erbB-2* mRNA were not altered by six different fatty acids in the medium but those of *c-myc* were transiently decreased in the early period by both n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. The level of the tumor suppressor gene *p53* mRNA, however, was increased by DHA with time. It is concluded that the cytotoxicity of lipid peroxide and increased expression of tumor suppressor gene *p53* are at least partly responsible for the inhibitory effect of DHA on growth of breast cancer cells. (*Korean J Nutrition* 30(8) : 987~994, 1997)

KEY WORDS : n-3 fatty acid · breast cancer cell · TBARS · *p53* gene.

#### 서 론

식이지방이 암발생과 진행에 관련이 있다는 것은 역

채택일 : 1997년 9월 1일

\*본 논문은 과학재단 핵심연구지원(KOSEF 941-0600-015-2)으로 이루어졌음.

학 조사와 동물실험을 통하여 많이 보여진 바 있으며 이 중에서 지방섭취가 많을수록 암 발생이 높아진다는 것에는 대개 의견이 일치한다<sup>1)</sup>. 지방의 종류, 즉 구성 지방산의 차이에 따른 영향에 대하여 다소 서로 엇갈린 결과들이 보고되기는 하였으나 필수지방산인 linoleic acid(LA)의 요구량이 충족되는 한에서는 포화지방이

불포화지방 보다 *in vivo*에서 암 발생을 증진시키는 것으로 보인다<sup>2,4</sup>. 불포화지방간의 차이를 요약하면 LA로 대표되는 n-6 지방산에 비하여  $\alpha$ -linolenic(LNA), eicosapentaenoic(EPA), docosahexaenoic acid(DHA)를 포함하는 n-3 지방산들이 암의 증식을 억제하는 것으로 *in vivo* 동물실험에서 채장<sup>5</sup>, 유방<sup>6-10</sup>, 대장<sup>11-15</sup> 등의 여러 조직과 *in vitro* 유방암 세포 배양 실험<sup>16,17</sup>에서 보고되었다. 이러한 n-3 지방산의 연구는 동물실험에서 주로 어유식이를 통하여 이루어져<sup>5-7,9-13</sup>, EPA와 DHA의 작용으로 결론을 짓는 경우가 많았으나 최근에는 LNA가 많은 지방을 섭취시켜서도<sup>8,14,15</sup> 암억제의 효과가 보고되고 있다.

N-3 지방산들의 암 증식 억제 효과는 현재 몇 가지 기전으로 설명하고 있으며<sup>18</sup>, 다음 두 가지 기전이 현재까지 중요한 것으로 보이나 전부를 설명하기에 부족하게 여겨진다. 그 중 첫째는 n-3 지방산이 prostaglandin(PG)E<sub>2</sub> 등 tumor growth 촉진인자들의 수준을 낮춘다는 것이며 두번째는 peroxidizability가 높은 n-3 지방산으로부터 생성되는 cytotoxic한 여러 종류의 과산화물과 그 부산물에 의하여 세포가 죽는다는 것이다. 이 두 번째 기전은 암 발생이 과산화물에 의하여 촉진된다는 것과 항산화물질에 의하여 암세포의 증식이 억제된다는 결과들<sup>19,20,21</sup>과 대조를 이루고 있다. 또한 과산화물의 작용 기전을 oncogene 발현과 연결시키는 결과<sup>22</sup>도 있어 앞으로 연구의 여지가 많다고 보겠다. 그 외에 n-3 지방산이 생체막에 많이 incorporation되어 막의 구조와 동시에 막기능을 변화시킨다는 것이다. 관련된 막의 기능으로는 세포내외로의 물질 이동, receptor 활성화<sup>23</sup> 및 면역 반응도를 들 수 있다. 암세포의 유전자 발현의 조절<sup>24</sup>도 어느 정도 막을 통한 signal transduction이라는 점에서 연관 짓고 있다. 이상의 여러 복합적인 작용이 조직마다 차이를 가진 것으로 보이고, 국내외로 n-3 지방산의 억제 효과 기전에 대하여 최근 활발히 연구되는 조직이 대장<sup>11-15</sup>임에 반하여 유방암에 대하여는 n-3 지방산의 억제효과는 많이 보고되었으나<sup>6-10</sup> 기전에 대한 연구는 비교적 적다<sup>16,17</sup>. 이에 본 연구자들은 유방암 세포를 선정하고 다른 기관의 영향을 배제하기 위하여 *in vitro* 세포 배양을 시행하며 유방암 세포 자체에 대한 n-3 지방산의 영향에 대한 조사로 지질과산화 과정을 중심으로 시행하고 oncogene의 발현을 조사하고자 하였다.

따라서 본 연구에서는 유방암세포로 estrogen 비의존성인 MDA-MB231 human breast cancer cell line을 사용하여 배지에 n-3 지방산, n-6지방산 및 포화, 단일불포화지방산들을 각각 첨가하여 배양하면서 세포의

성장과 지질과산화 정도, 비타민 E의 함량을 측정하고, *erbB-2*, *c-myc*, *p53* 유전자발현을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

본 실험에 사용한 human breast cancer cell line (MDA-MB231)은 한국세포주은행(서울대학교 의과대학 암연구소 내)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양을 위한 배지는 Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM)를 사용하였으며, trypsin-EDTA, phosphate-buffered saline(PBS), 항생제(penicillin/streptomycin), insulin은 GIBCO BRL(Gaithersburg, MD, USA)제품을 구입하였으며, fetal bovine serum(FBS)는 Hyclone(Logan, Utah, USA)제품을 사용하였다. delipidized bovine serum albumin(BSA), stearic, oleic, linoleic,  $\alpha$ -linolenic acid, eicosapentaenoic, docosahexaenoic acid등과 효소활성 및 tocopherol 측정에 필요한 시약은 미국 Sigma 사(St.Louis, MO, USA)로부터 구입 사용하였다.

### 2. Human Breast Cancer Cell의 배양

MDA-MB231 유방암세포는 CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 5% FBS와 penicillin, streptomycin을 첨가한 IMDM 배지로 animal cell culture dish내에서 배양하였다. 세포의 장기보존을 위해서는, 배양한 세포를 모아 20% FBS가 들어있는 IMDM배지에 10% (v/v)의 dimethylsulfoxide를 첨가하여 이를 vial에 넣어 -70°C에 1일간 두었다가 액체질소내에 넣어 보존하였다. 본 실험인 지방산 첨가조건에서는 1.25mg/ml delipidized BSA와 10 $\mu$ g/ml insulin이 첨가된 serum-free IMDM배지를 사용하였다<sup>16</sup>.

본실험에서는 serum이 첨가된 IMDM배지에서 세포가 tissue culture dish(직경 55mm)의 70%정도의 면적비(confluency)로 자라면 PBS로 세척하고, serum-free media를 넣어 CO<sub>2</sub> incubator에서 하루 정도 배양한 후 ethanol에 용해시킨 지방산을 0.5 $\mu$ g/ml이 되도록<sup>16</sup> 첨가하였다. 대조군은 동량의 ethanol만을 첨가하였고, 배양액내의 ethanol농도는 1%가 되게 하였다. 사용한 지방산의 종류는 stearic(STA ; C18 : 0), oleic(OA ; C18 : 1n-9), linoleic(LA ; C18 : 2n-6),  $\alpha$ -linoleic(LNA ; C18 : 3n-3), eicosapentaenoic(EPA ; C20 : 5n-3), docosahexaenoic(DHA ; C22 : 5n-3) acid로 6종이었다.

### 3. 세포증식 조사

1~4일 동안 배양한 세포를 PBS로 세척한 후 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 떼어내어 다시 10ml의 PBS를 첨가하여 1000g에서 2분간 원심분리 하였다. 상등액을 버린 후 전체 400µl가 되도록 PBS를 넣어 잘 섞은 후 counting의 시료로 사용하였다. 이 세포액 100 µl에 염색시약 trypan blue 100µl를 넣어 잘 섞은 후 hemocytometer를 이용하여 counting하였다.

### 4. 지질과산화물과 alpha-tocopherol 함량 측정

2항과 같은 조건에서 3일동안 배양한 세포를 0.15 NaCl에 분산시켜 빙냉하에서 4~5초동안 초음파(50 watts)로 파쇄한 세포액을 시료로 하여 Yagi의 형광광도법<sup>26)</sup>을 이용하여 과산화물을 측정하였다. 표준품으로 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하였다. 세포 분쇄액 150~250µl에 1/12 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4ml, 10% phosphotungstic acid 0.5ml를 첨가하고 생성된 침전에 증류수 4ml와 thiobarbituric acid(TBA) 시약 1ml을 넣어 95℃ 수조에서 60분간 반응시킨 후 얼음물에서 냉각시켰다. 여기에 n-butanol 5ml를 넣어 섞은 후 4000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액의 형광광도를 excitation 515 nm, emission 553 nm에서 측정하였다.

Alpha-tocopherol은 같은 세포파쇄액에서 Bieri등<sup>26)</sup>의 방법으로 정량하였으며, α-tocopherol acetate를 internal standard로 사용하였다. 세포분쇄액 200µl에 50µg/ml tocopherol acetate 50µl, ethanol 150µl를 넣고 잘 섞은 후 400µl의 hexane을 넣고 1분간 잘 섞어 1500 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층의 hexane을 취하고, 다시 한번 hexane으로 추출하여 0.45 µm filter membrane으로 여과하여 건조시킨 후, 60µl의 diethyl ether-methanol(1 : 3, v/v)에 용해시켜 HPLC로 정량하였다. 사용한 column은 10µm micro-Bondapak column(3.9×300mm, waters, Milford, MA)이었고, mobile phase는 methanol : H<sub>2</sub>O(97 : 3)을 사용하였다. Chromatography peak는 UV detector를 이용하여, 292nm의 파장에서 검출하였다.

### 5. Oncogene expression 조사

#### 1) Probe DNA

Oncogene(*Erb-B2*, *c-myc*)과 tumor suppressor gene(*p53*) probe들은 각각을 포함하는 plasmid를 bacterial transformation으로 증폭한 후<sup>27)</sup>, *erbB-2*는 *Stu* I 과 *Hind* III으로, *c-myc*은 *Pst* I으로 *p53*은 *Bam* H I으로 처리한 후 agarose gel electrophoresis에 의하여 분

리하였다. 각각의 gene clean된 probe는 [<sup>32</sup>P] dCTP를 사용하여 random priming 방법으로 방사능을 표지하였다.

#### 2) RNA 분리 및 northern blot hybridization

지방산을 첨가한 배지에서 0~24시간 배양한 MDA-MB231 유방암세포를 guanidine-thiocyanate denaturing solution에 의한 방법(Promega manual)에 의해 총 RNA를 분리하였다. *Erb-B2*와 *p53* 발현을 조사하기 위해 총 RNA를 사용하여 multi slot blotter (Hoffer, USA)상에서 slot blotting을 실시하였다. 즉, 10µg의 total RNA를 formamide/formaldehyde solution에 첨가하여 65℃에서 5분간 처리하고 이를 vacuum을 이용한 slot blotting을 수행하였으며 UV-crosslinker를 이용해 membrane에 고정시켰다. membrane filter는 2×SSC용액에 적신 후 이를 prehybridization solution(50% formamide, 6×SSC, 5×Denhardt's solution, 100µg/ml denatured salmon sperm DNA, 0.1% SDS)에서 30분이상 42℃에서 처리하였다. Hybridization을 위하여 radiolabelling된 probe DNA를 boiling(3min) 후 첨가하였으며 1~2일간 실시하였다. Washing은 6×SSC, 0.1% SDS/2×SSC, 0.1% SDS/1×SSC, 0.1%/0.1×SSC, 0.1% 순으로 실시하고 autoradiography를 하였다. *C-myc* 발현을 조사하기 위하여는 상기에서 얻은 총 RNA를 다시 1% agarose gel electrophoresis<sup>27)</sup>를 한 후 membrane transfer를 수행하였으며 prehybridization 및 hybridization의 조건은 slot blot의 경우와 마찬가지로였다.

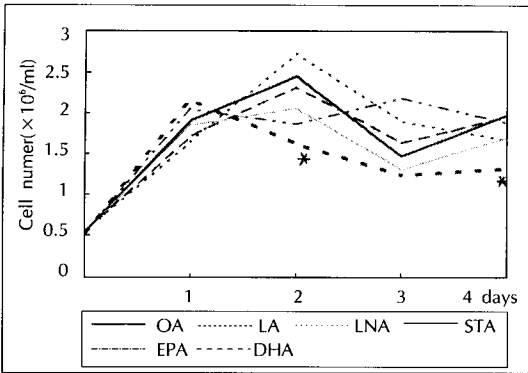
#### 6. 단백질 정량과 통계처리

Bovine serum albumin을 표준용액으로 사용하였으며 Lowry의 방법<sup>28)</sup>에 따라 정량하였다. 자료의 분석결과는 SPSS통계 package를 이용하여 one way ANOVA로 검증하였고 각 군간의 차이를 보기위해 Tukey test를 시행하였다.

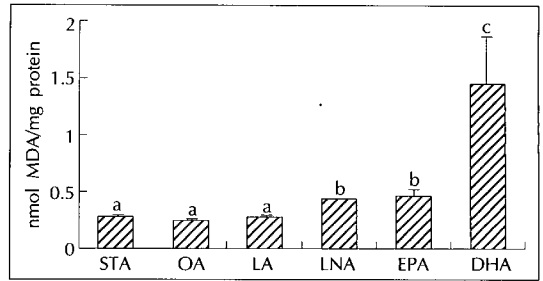
## 결 과

#### 1. 세포 증식

Fig. 1은 stearic(STA), oleic(OA), linoleic(LA), linolenic(LNA), eicosapentaenoic(EPA), docosahexaenoic acid(DHA) 등 6종의 지방산만을 0.5µg/ml로 배지에 첨가한 후 4일간의 세포증식을 나타낸 것이다. 배양 1일 후에는 지방산의 종류와 관계없이 지방산 처리 군 모두에서 세포수가 증가한 것을 볼 수 있었으나 2일 이후부터는 증식이 대체로 줄어 들었다. 그 중 STA와



**Fig. 1.** Growth of MDA-MB231 human breast cancer cells in the presence of six different fatty acids(0.5µg/ml) in culture media.  
 OA : oleic acid                      LA : linoleic acid  
 LNA : linolenic acid                STA : stearic acid  
 EPA : eicosapentaenoic acid  
 DHA : docosahexaenoic acid  
 Values are means of 4 replicates and \*represents p < 0.05



**Fig. 2.** Contents of thiobarbituric acid reactive substances of MDA-MB231 human breast cancer cells cultured in the presence of six different fatty acids at the level of 0.5µg/ml in the media for 3 days.  
 STA : stearic acid                      OA : oleic acid  
 LA : linoleic acid                      LNA : linolenic acid  
 EPA : eicosapentaenoic acid  
 DHA : docosahexaenoic acid  
 Values are means of 5 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at p < 0.05

DHA 첨가에서 다른 지방산 첨가에 비하여 비교적 지속적으로 낮은 수준을 유지하였으며 2일과 4일에서 DHA첨가에서 세포의 수가 유의하게 적었다. 다른 군들 간에는 변화의 폭이 커서 뚜렷한 차이를 볼 수 없었다.

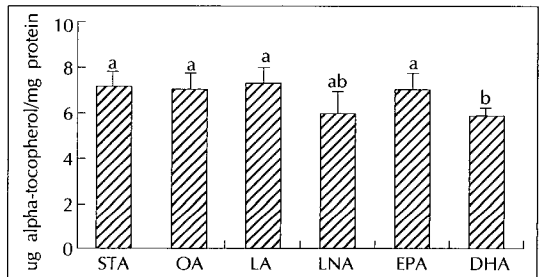
**2. 지질과산화물과 alpha-tocopherol 함량**

6종의 지방산(STA, OA, LA, LNA, EPA, DHA) 만을 0.5µg/ml의 농도로 첨가 후 3일간 배양한 세포의 과산화지질을 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)로 측정 한 결과가 Fig. 2에 있다. Figure에서 보는 바와 같이 LNA, EPA, DHA 등 n-3 지방산 처리군에서 대체로 높게 나타났으며 특히 DHA처리군에서 현저히 높게 나타났다.

세포내 α-tocopherol량을 측정 한 결과가 Fig. 3에 있다. 다른 지방산에 비하여 LNA, EPA, DHA군이 다소 낮았으나 DHA군만 STA, OA, LA 첨가시 보다 유의적으로 낮았다. 그러나 DHA 첨가에 의해 과산화물이 현저히 증가한데 비하여(Fig. 2) 세포내 α-tocopherol량의 변화는 상대적으로 적었다.

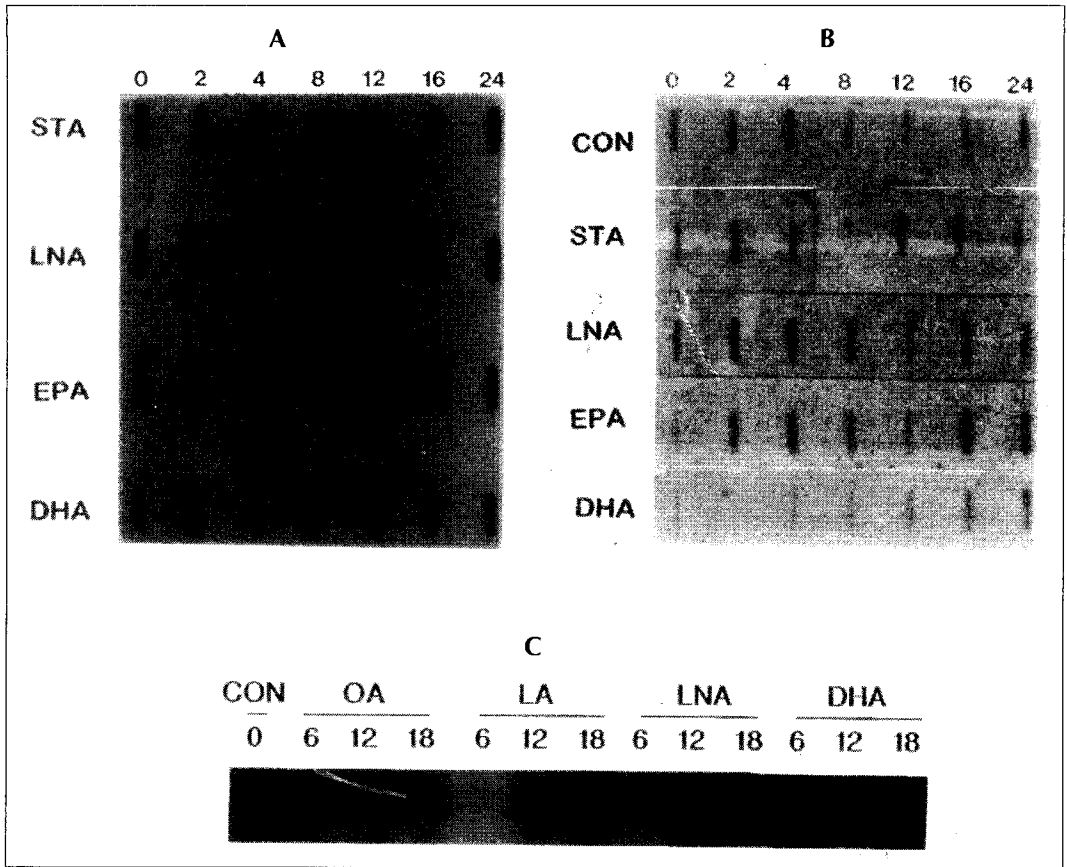
**3. Oncogene Expression**

세포를 STA, LNA, EPA, DHA 등의 4종류의 지방산을 첨가한 배지에서 24시간 배양하는 동안 harvest하여 얻은 총RNA에서 northern slot blot hybridization으로 *erbB-2*와 *p53* gene의 발현을 조사한 결과가 Fig. 4에 있다. *ErbB-2* 발현(A)은 시간적인 경과에 의해서나 또는 지방산종류의 차이에 의해서나 변화는 일어나지 않았으나 전반적인 expression정도는 비교적



**Fig. 3.** Contents of alpha-tocopherol of MDA-MB231 human breast cancer cells cultured in the presence of six different fatty acids for 3 days.  
 STA : stearic acid                      OA : oleic acid  
 LA : linoleic acid                      LNA : linolenic acid  
 EPA : eicosapentaenoic acid  
 DHA : docosahexaenoic acid  
 Values are means of 4-5 replicated and those with different alphabet letters are significantly different at p < 0.05

높은 정도로 나타났다. 한편 *p53* (B)은 STA, LNA, EPA 첨가군에서는 시간의 경과에 따라 일정 수준이 유지되는 것으로 관찰되었으나 DHA첨가에서는 점차적으로 증가하였다. 이의 확인과 OA와 LA첨가 조건을 포함하기 위하여 gel blot을 이용한 northern hybridization을 실시하였는데 결과가 선명치 못해 본 논문에 제시하지는 않고 slot blot에서의 결과만을 보고하는 바이다. *C-myc*의 mRNA생성변화는 OA, LA, LNA, DHA의 네 지방산 첨가 조건에서 gel blot hybridization에 의하여 관찰하였다. Fig. 3의(C)에서 보는데로 OA첨가로는 6, 12, 18시간까지 초기 수준(CON: 0시간)과 별 차이가 없었다. 그러나 LA, LNA, DHA등의



**Fig. 4.** Northern slot blot(A, B) and gel blot(C) hybridization of RNA isolated from MDA-MB231 human breast cancer cells during 24 hour culture with different fatty acids at the concentrations of 0.5µg/ml probed with erbB-2(A), p53(B) and c-myc(C).  
 CON : no fatty acid    OA : oleic acid    STA : stearic acid    LNA : linolenic acid  
 EPA : eicosapentaenoic acid    DHA : docosahexaenoic acid

다불포화지방산을 첨가하였을 경우, 6시간 후 C-myc의 발현이 현저히 감소하였다가 12과 18시간에는 초기수준이나 OA 첨가시의 수준으로 증가되었다.

## 고 찰

Mammary tumor development에 있어서 식이지방의 역할은 아직 완전히 밝혀지지는 않았지만, promotion 단계에 관련되어 있다고 본다. 식이지방의 종류에 따른 암세포 증식의 차이가 이 단계에서 어떻게 작용하는지에 대하여 조건에 따라 강조하는 작용 기전들이 다르다. 특히 *in vitro* 세포 배양 연구에서 첨가하는 지방산의 농도와 albumin이나 비타민 E의 공존 여부가 쟁점으로 보인다. 본 연구에서 사용한 0.5µg/ml는 대부분의 지방산(OA, LA, EPA와 DHA)의 최적농도로 보고되었으며 2.0µg/ml에서는 증식이 저해되기도 하였다

<sup>16)</sup> 반면 Chaejes 등<sup>17)</sup>의 MDA-MB231과 HBL-100 human breast tumor cell 배양 연구에서 20µg/ml의 농도로 여러 지방산을 배지에 첨가한 후, 배양 7일 이후에 지방산들 간의 세포 증식 억제 효과 차이가 관찰한 바도 있다. 본 연구에서 사용한 세포와 유사한 MDA-MB435 human breast cancer cell들에 1µg/ml정도의 지방산을 배양액에 첨가하였을 때, LA와 EPA 모두 24시간 이내에 대부분이 uptake되었으며 이 지방산들의 80~90%가 인지질에서 발견되었다<sup>20)</sup>. 따라서 본 실험에서도 첨가한 지방산들이 배양중에 세포로 잘 uptake되었으리라고 생각한다.

본 연구에서 다른 지방산들에 비하여 DHA첨가로 세포증식이 감소한 것과 세포내 과산화물이 3~5배 증가한 것은 연관이 있어 보인다. 같은 n-3 지방산인 LNA와 EPA도 n-6 LA보다 과산화물이 다소 증가하였지만 그 정도는 적었다. 그리고 LA는 포화지방산이나 OA에

비하여 차이가 나타나지 않았다. 다불포화지방산을 처리한 여러 종류의 암세포의 사멸을 과산화물에 의한 cytotoxicity라고 결론짓는 보고들을 Gonzalez가 종합 정리한 바 있다<sup>18)</sup>. 최근 Chaejes등<sup>17)</sup>의 결과에 의하면 수종의 유방암세포들을 불포화도가 다른 지방산들을 첨가하여 배양하였을 때, 세포 증식은 불포화도가 커짐에 따라 감소하였고, 세포내 conjugated diene과 lipid hydroperoxide의 농도와 역상관관계를 관찰하였다. LA로부터 유래된 conjugated diene에 의한 암세포 증식저해는 Schonberg와 Krokan<sup>30)</sup>에 의하여도 보고되었다. Ellis등<sup>31)</sup> 이러한 과산화물의 효과가 지속적이라기 보다 매우 특정한 순간에 빠르게 일어난다고 하였다. 정상세포의 변이를 유발할 수 있는 과산화물이 암세포증식을 억제한다는 것이 모순되어 보이나, 암세포에 cytotoxicity를 나타내는 과산화물의 수준이 정상세포인 skin fibroblast<sup>17)</sup>나 human glioblastoma cell line<sup>18)</sup>에는 아무 영향을 나타나지 않았다는 것으로 보아 암세포가 과산화물에 민감한 것으로 보인다. 따라서 peroxidizability가 높은 n-3 지방산에 의한 세포 증식 저해가 이들로부터 생성된 과산화물에 기인한다는 것은 타당성이 있어 보이며 비타민 E 첨가로 암세포의 증식이 호전되었다는 것은 이를 뒷받침해 주고 있다<sup>17)18)31)</sup>. 그러나 Diplock등<sup>32)</sup>이 암세포로 전환시킨 kidney fibroblast 세포(BHK-21/pyY)와 전환시키지 않은 세포(BHK-21/C13)내에 과산화물 함량을 조사하였을 때, 세포 증식기간 동안 전환시킨 세포내 과산화물 함량이 더 높았으며 비타민 E의 세포 증식에 대한 효과도 일정하지 않았다. 따라서 본 연구 조건에서는 증가된 과산화물에 의한 세포 사멸 가능성을 인정하지만 다른 기전의 관련성도 배제할 수 없다. 최근 Jenski등<sup>33)</sup>은 n-3 다불포화지방산 함유 liposome을 사용한 mice의 실험에서 과산화물에 의한 암세포 증식억제는 잠정적이며 장기적으로는 세포막의 구조 변화가 주요 역할을 한다고 하였다.

한편 식이지방에 의한 oncogene 이나 tumor suppressor gene의 발현에 대한 연구는 그리 많지 않으며, 결과에도 차이를 보인다. Guillem등<sup>34)</sup>은 식이지방이 달라져도 대장의 정상세포나 암세포에서의 *c-myc*, *H-ras* 유전자 발현에 변화가 없다고 하였고, Ronai등<sup>35)</sup>도 NMU로 유발된 유방암에서 n-3 지방산이 *H-ras* 유전자 발현에 영향을 주지 않는다고 하였다. 그러나 Karmali등<sup>36)</sup>은 n-3 지방산섭취로 DMBA를 처리한 쥐(rat)에서 Fernandes등은 어유를 섭취시킨 nude mice의 유선<sup>35)</sup>과 비장세포<sup>37)</sup>에서 *H-ras*와 *c-myc* 유전자 발현이 감소함을 보였다. 본 연구에서는 LA, LNA,

DHA첨가에서 공통적으로 단일불포화지방산인 OA에 비하여 초기의 *c-myc* 발현 억제가 있었으나 n-6와 n-3의 차이는 관찰하지 못하였다. 타 연구자들이 *in vivo* 식이실험을 한데 비하여 본 실험은 *in vitro* 배양실험으로 조건의 차이가 있었다. 그러나 *in vivo*식이실험에서도 서로 다른 결과들이 보고되어 oncogene에 대한 조사가 더 필요하다고 본다. 그리고 본 실험에서 보인 DHA 첨가로 인한 *p53*의 발현이 전체적으로는 약한 듯 하였으나 시간의 경과로 뚜렷한 증가양상을 보여 n-3 지방산에 의한 suppressor gene의 역할을 부각시키고 있다. 특히 유방암세포에서 *p53*의 유전자 변이가 53~86%에 이르고 있다고 하여<sup>38)</sup> 그 중요성이 큰데 지방산 종류에 따른 조사는 별로 없었다. 또한 지방산에 의한 유전자 발현의 기전이 지방산 자체인지 또는 대사물에 의한 것인지<sup>29)</sup>에 대한 조사가 필요하다고 생각되며 앞으로의 보다 깊은 연구가 수행되어야 한다고 사료된다.

## 요약 및 결론

N-3 지방산이 유방암 세포의 증식과 과산화상태, oncogene expression에 미치는 영향을 조사하기 위하여 human breast cancer cell line(MDA-MB231)을 linolenic(LNA), eicosapentaenoic(EPA), docosahexaenoic acid(DHA)를 각각 0.5µg/ml 씩 첨가한 serumfree IMDM배지에서 배양하였고, 다른 계열의 지방산과 비교하기 위하여 같은 농도의 stearic(STA), oleic(OA), linoleic acid(LA)를 사용하여 배양하였다.

세포의 증식을 보면, 0.5µg/ml농도에서 전체 6종류의 지방산 중 STA와 DHA군의 수가 적었는데 DHA군이 더 낮은 수를 유지하였다. TBARS는 DHA군에서 뚜렷이 높았고, 다른 n-3인 LNA와 EPA는 다른 계열 지방산보다 높은 경향이였다. 세포내의  $\alpha$ -tocopherol의 양은 DHA첨가로 타 조건에 비하여 10~15% 감소하였으며 다른 지방산 첨가에서는 유의적인 차이를 볼 수 없었다. 여러 oncogene 중에서 *ErbB-2* gene은 지방산 종류에 따른 차이가 없었으나 *c-myc*은 다불포화지방산인 LA, LNA, DHA에서 초기에 감소하였으나 후에는 OA수준으로 회복되었다. DHA 첨가로 tumor suppressor gene인 *p53*이 24시간이내에 일시적으로 증가되었다.

결론적으로, n-3 계열의 지방산중 암세포 증식 억제 효과가 큰 DHA의 작용은 과산화물의 증가와 함께 발암억제 유전자인 *p53*의 발현이 중요요인으로 보인다.

Literature cited

- 1) Cohen LA. Lipids in cancer : an introduction. *Lipids* 27 : 791-792, 1992
- 2) Jain M, Cook GM, Davis FG, Grace MG, Howe GR, Miller AB. A case control study of diet and colorectal cancer. *Int J Cancer* 26 : 757-768, 1980
- 3) Reddy BS, Maruyama H. Effect of different levels of dietary corn oil and lard during the initiation phase of colon carcinogenesis in F344 rats. *J Natl Cancer Inst* 77 : 815-822, 1986
- 4) Braden LM, Carroll KK. Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis. *Lipids* 21 : 285-288, 1986
- 5) O'Connor TP, Roebuck BD, Peterson F, Campbell TC. Effect of dietary intake of fish oil and fish protein on the development of L-azaserine-induced preneoplastic lesions in the rat pancreas. *J Natl Cancer Inst* 75 : 959-962, 1985
- 6) Jurkowski JJ, Cave WT Jr. Dietary effects of manhedan oil on the growth and membrane lipid composition of rat mammary tumors. *J Natl Cancer Inst* 74 : 1145-1150, 1985
- 7) Karmali RA, Marsh J, Fuchs C. Effect of omega-3 fatty acids on growth of a rat mammary tumor. *J Natl Cancer Inst* 73 : 457-461, 1984
- 8) Fritsche KL, Johnson PV. Effect of dietary  $\alpha$ -linolenic acid on growth, metastasis, fatty acid profiles and prostaglandin production of two murine mammary adenocarcinomas. *J Nutr* 120 : 1601-1609, 1990
- 9) Abou-El-Ela SH, Prasse KW, Farrell RL, Carroll RW, Wade AE, Bunce OR. Effects of D,L-2-difluoromethylornithine and indomethacin on mammary tumor promotion in rats fed high n-3 and/or n-6 fat diets. *Cancer Res* 49 : 1434-1440, 1989
- 10) Cohen LA, Chen-Backlund J-U, Sepkovic DW, Sugie S. Effect of varing proportion of dietary menhaden and corn oil on experimental rat mammary tumor promotion. *Lipids* 28 : 449-456, 1993
- 11) Reddy BS, Maruyama H. Effect of dietary fish oil on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Res* 46 : 3367-3370, 1986
- 12) Reddy BS, Burill C, Rigotty J. Effect of diets high in  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res* 51 : 487-491, 1991
- 13) Takahashi M, Minamoto T, Yamashita N, Yazawa K, Sugimura T, Esumi H. Reduction in formation and growth of 1,2-dimethylhydrazine-induced aberrant crpyt foci in rat colon by docosahexaenoic acid. *Cancer Res* 53 : 2786-2789, 1993
- 14) Park HS, Seo ES, Song J-H, Choi CU. Effect of perilla oil rich in  $\alpha$ -inolenic acid on colon tumor incidence, plasma thromboxane B<sub>2</sub> level and fatty acid profile of colonic mucosal lipids in chemical carcinogen-treated rats. *Korean J Nutr* 26 : 829-838, 1993
- 15) 송지연 · 박현서 · 서은숙 · 김동연. 발암원을 투여한 쥐에서 식이지방이 대장의 종양발생과 세포증식에 미치는 영향. *한국영양학회지* 27 : 552- 562, 1994
- 16) Rose DP, Connolly JM. Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res* 50 : 7139-7144, 1990
- 17) Chaejes V, Satter W, Stranzl A, Kostner GM. Influence of n-3 fatty acids on the growth of human breast cancer cells in vitro-Relationship to peroxides and vitamin E. *Breast Cancer Res & Treat* 34 : 199-212, 1995
- 18) Gonzalez MJ. Fish oil, lipid peroxidation and mammary tumor growth. *J Am Coll Nutr* 14 : 325-335, 1995
- 19) Prasad KN, Edwards-Prasad J, Ramanujam S, Sakaamoto A. Vtamin E increase the growth inhibitory and differentiating effects of tumor therapeutic agents on neuroblastoma and glioma cells in culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 164 : 158-163, 1980
- 20) Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A. Inhibition of cell proliferationn by alpha-tocopherol. *Role of protein kinase C. J Biol Chem* 266 : 6188-6194, 1991
- 21) Charpentier A, Groves S, Simmons MM. RRR-Alpha-tocopherol or-beta(TGF-beta) by human breast cancer cells. *Nutr Cancer* 19 : 225-39, 1993
- 22) Fazio VM, Barrera G, Martinotti S, Farace MG, Giglioini B, Frati L, Manzari V, Dianzani MU. 4-Hydroxynoneal, a product of cellular lipid peroxidation, which modulates c-myc and globin gene expression in K562 erythroleukemic cells. *Cancer Res* 52 : 4866-4871, 1992
- 23) Burn CP, Spector AA. Membrane fatty acid modification in tumor cells : A potential therapeutic adjunct. *Lipids* 22 : 178-184, 1987
- 24) Fernandes G, Venkatraman JT. Modulation of breast cancer growth in nude mice by  $\omega$ 3 lipids. In : Simopoulos AP, Kifer RR, Martin RE, Barlow SM.eds. Health effect of  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acids in seafoods. *World Rev Nutr Diet* 66 : 488-503, 1991
- 25) Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 15 : 212-216, 1976
- 26) Bieri JG, Tolliver JJ, Catilgnani GL. Simutanous determination of tocopherol and retinol in plasma or red cell by high pressure liquid chromatography. *J Clin Nutr* 32 : 2143-2149, 1979
- 27) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning, A

- laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1989
- 28) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
- 29) Hatala MA, Rayburn J, Rose D. Comparison of linoleic acid and eicosapentaenoic acid incorporation into human breast cancer cells. *Lipids* 29 : 831-837, 1994
- 30) Schonberg S, Krokan HE. The inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid on the growth of human tumor cell lines is in part due to increased peroxidation. *Anticancer Res* 15 : 1241-1246, 1995
- 31) Ells, GW, Chishom KA, Simmons VA, Horrobin DF. Vitamin E blocks the cytotoxic effect of  $\gamma$ -linolenic acid when administered as late as the time of onset of cell death-an insight into the mechanism of fatty acid induced cytotoxicity. *Cancer Lett* 98 : 207-211, 1996
- 32) Diplock AT, Rice-Evans CA, Burdon RH. Is there a significant role for lipid peroxidation in the causation of malignancy and for antioxidants in cancer prevention? *Cancer Res* 54 : 1952S-1956S, 1994
- 33) Jensi LJ, Erouga M, Stillwell W. Omega-3 fatty acid-containing liposome in cancer therapy. *Proc Soc Exp Biol Med* 210 : 227-33, 1995
- 34) Guillem JG, Hsieh LL, O'Toole KM, Forde KA, LoGerfo P and Weinstein IB. Changes in expression of oncogenes and endogenous retroviral-like sequences during colon carcinogenesis. *Cancer Res* 48 : 3964-3970, 1988
- 35) Ronai Lau YY, Cohen LA. Dietary n-3 fatty acids do not affect induction of H-ras mutations in mammary glands of NMU-treated rats. *Mol Carcinog* 4 : 120-127, 1991
- 36) Karmali RA, Chao CC, Basu A, Modak M II. Effect of n-3 and n-6 fatty acids on mammary H-ras expression and PGE-2 levels in DMBA-treated rats. *Anticancer Res* 9 : 1169-1174, 1989
- 37) Fernandes G, Bysani C, Venkatraman JT, Tomar V, Zhao W. Increased TGF- $\beta$  and decreased oncogene expression by  $\omega$ -3 fatty acids in the spleen delays onset of autoimmune disease in B/W mice. *J Immunol* 152 : 5979-5987, 1994
- 38) Horak E, Smith K, Bromley L, LeJune S, Greenail M, Lane D, Harris AL. *Oncogene* 6 : 2277-2284, 1991