

비타민 E가 쥐간세포의 암화과정에서 태반형
Glutathione S-transferase(GST-P) 양성 병소와
항산화효소계에 미치는 영향

최혜미 · 김지원 · 김숙희*

서울대학교 식품영양학과, 해전전문대학 호텔조리과*

Suppressive Effects of Vitamin E on the Induction of Placental
Glutathione S-transferase(GST-P) Positive foci and Antioxidant Enzyme
Activity in Rat Hepatocarcinogenesis

Choi, Haymie · Kim, Jeewon · Kim, Sookhee

Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul, Korea
Department of Hotel Cooking,* Hyejeon Junior College, Hongsung, Choongnam, Korea

ABSTRACT

The influences of dietary supplements of vitamin E on hepatocellular chemical carcinogenesis have been studied. Placental glutathione S-transferase(GST-P) positive foci area, antioxidant enzymes(superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase(GST)), glucose 6-phosphatase(G6Pase) activities, and lipid peroxidation of microsomes(thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) contents) were investigated. For is purpose, we used the murine chemical hepatocarcinogenic procedure induced by modified Ito model, which consists of 200mg/kg body weight diethylnitrosamine (DEN) injection, 0.01% 2-acetylaminofluorene(2-AAF) feeding for 6 weeks, and partial hepatectomy on week 3. Weanling Sprague-Dawley male rats were fed pulverized Purina rat chow with 15,000 IU/kg diet vitamin E from initiation or promotion stages. We found that vitamin E supplement decreased the area of GST-P positive foci. Catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, GST activities, and TBARS contents were decreased. On the other hand G6Pase activities were increased by vitamin E supplement. It seemed that vitamin E supplements helped endogenous defense systems against carcinogenesis by decreasing TBARS contents, H₂O₂, and organic peroxides. So, vitamin E seemed to protect cell from free radical damage in carcinogenesis. Anticarcinogenic effects of vitamin E were more effective at initiation than at promotion stage. These results suggest that vitamin E has suppressive effects on hepatocellular chemical carcinogenesis, probably through antioxidant effects against TBARS contents, H₂O₂, and organic peroxides. (*Korean J Nutrition* 30(7) : 803~812, 1997)

KEY WORDS : vitamin E · hepatocellular chemical carcinogenesis · GST-P positive foci · initiation · promotion.

채택일 : 1997년 7월 24일

저자연락처 : 김숙희, 350-800 충남 홍성군 홍성읍 남장리 해전전문대학 호텔조리과 전화) (0451)30-5253

서 론

암은 외부 인자와 유전적 소인이 원인이 되어 생긴다¹⁾. 지난 수년간 암 원인 물질(종양 개시제 및 촉진제 : tumor initiators and tumor promoters), 암생성 기전 및 암세포 활동에 대한 오랜 연구 결과 많은 종양 개시제와 촉진제가 환경 및 음식물에서 확인되었다²⁾. 인간에게 생기는 모든 암의 약 75~80%가 환경에 의해 유발되며 이중 약 30~40%가 음식물에 의한 것으로 추정되고 있다¹⁾.

많은 암의 개시 및 촉진과정에는 유리라디칼에 의한 생체내 주요 단백질, 지질, 핵산의 손상이 관여하는 것으로 생각되며 몇몇 효소와 항산화제인 비타민 E, A, 및 C와 베타 카로틴이 유리라디칼 손상으로 부터 세포를 보호해 준다³⁾. 비타민 E는 과산화로 인해 세포막이 손상되는 것을 막아 주는 1차 방어선으로서 유리라디칼을 제거해 주며 연쇄 반응을 종식시키고 세포막의 제한된 부위에 손상을 한정시켜 주는 역할을 한다¹⁴⁾. 또한 비타민 E는 protein kinase C 활성을 감소시켜 세포 성장을 억제한다고 보고되었다⁵⁾. 비타민 E succinate와 함께 암세포를 배양했을 때 세포 외관이 좀 더 정상 세포에 가깝게 변하고 암세포의 성장도 억제되었으며⁶⁾, apoptosis를 더 유도하였다고 한다⁷⁾. 결장암을 유발시킨 생쥐를 사용하여 행한 한 실험에서 비타민 E를 체중 kg당 600mg 보충시킨 경우 종양 발생율이 감소했으며 대조군에 비해 침습성 종양의 발생이 적었던 것으로 나타났다⁸⁾. 이와는 대조로 생쥐에 대한 또 다른 연구에서는 더 높은 용량의 비타민 E(사료량의 4%)를 투여한 경우, 디메틸하이드라진의 종양생성 촉진작용이 증가했으며 이는 장 종양의 발생율이 통계적으로 유의하게 증가된 것을 보여준다⁹⁾. 한편 비타민 E에 대한 많은 연구중에서 과량의 비타민 E를 암화 유도 개시과정과 촉진과정에 보강했을 때의 상대적 기여도에 대한 연구는 미진한 편이다.

이에 본 실험에서는 생체 고유의 항산화 물질인 비타민 E가 쥐간의 암화과정에 미치는 영향과 그 기전을 밝히고자, Ito 모델을 이용하여 간 세포암을 유도하면서 과량의 비타민 E 보강 식이가 전암성 병변 형성에 미치는 영향을 살펴보고, 그 가능한 기전으로서 비타민 E의 항산화 효과가 관여하는지를 알아보고자 하였다. 또한 비타민 E를 암화 개시과정부터 보강해 준 경우와 촉진과정에 보강해 준 경우를 비교하여 보강 시기에 따른 차이를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

서울대학교 동물사육장으로부터 이유한 Sprague-Dawley종 숫쥐 중에서 45~80g된 것을 공급받아 사육실의 환경에 순응시킨 후 200g 정도의 무게가 되었을 때 각군 당 10마리씩, 대조군은 8마리로 나눈 후 실험 식이를 8주간 공급하였다. 이 때 온도, 습도, 채광은 각각 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $55 \pm 1\%$, 7:00~19:00으로 조절하였으며, 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 실험식이 및 저지

실험식은 Purina purified rodent diet 5053 (Ralston Purina rat chow, USA)을 곱게 갈아 사용하였고 비타민 E는 15,000 IU/kg diet 수준으로 사용하였다. 실험식은 매번 질소가스로 충전시킨 다음 냉동고에 보관하였다가 사용하였다. 모든 쥐들은 기본 사료로 사육하여 5개 실험군으로 나누어 실험에 사용하였고 쥐 간 세포암 유도를 위하여 8주간의 Ito모델¹⁰⁾을 실시하였다(Fig. 1). 실험시작일에 모든 실험군에 DEN을 생리적 식염수에 녹여 몸무게 kg당 200mg수준으로 1회 복강 주사하고, 3주째에 ketamine hydrochloride로 마취시키고 중앙엽과 좌측엽을 절제하는 70% 간 부분절제술을 시행하였다. DEN주사후 TOO, TOE, TEE군은 2주째부터 8주째까지 2-AAF를 0.01% 수준으로 식이에 섞어 투여하였다. CEE, TEE군은 15,000 IU/kg diet의 비타민 E를 실험시작일부터 8주간 보강하였고, TOE군은 2-AAF를 투여하기 시작한 2주째부터 6주간 보강하였다. DEN 투여후 8주째에 실험군 모두를 희생시켰다.

3. 시료의 수집 및 전처리

실험 동물을 희생시킨 후 간을 절제하여 즉시 차가운 식염수로 세척한 다음 여과지로 표면의 수분을 흡수시킨 후 간 전체 무게를 재고 약 5g의 간을 때내어 잘게 다졌다. 간조직을 균질용 냉용액(154mM KCl, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA buffer, pH 7.4) 약 25ml에 넣고 4°C에서 균질화한 후 고속 원심분리기에서 4°C, 1,000×g의 조건하에 10분간 원심분리하였다. 다음 윗부분의 세포 조각들과 지방층이 섞이지 않도록 조심스럽게 중간층을 뽑아내어 4°C, 10,000×g의 조건 하에서 20분간 원심분리하였다. 아래층(mitochondria, lysosome과 peroxisome층)은 따로 부유하여 -70°C에 보관하였고, 위층은 실험에 사용하기 위해 용액의 일부를 보관하였다. 이어 위층을 다시 초고속 원심분리기에서

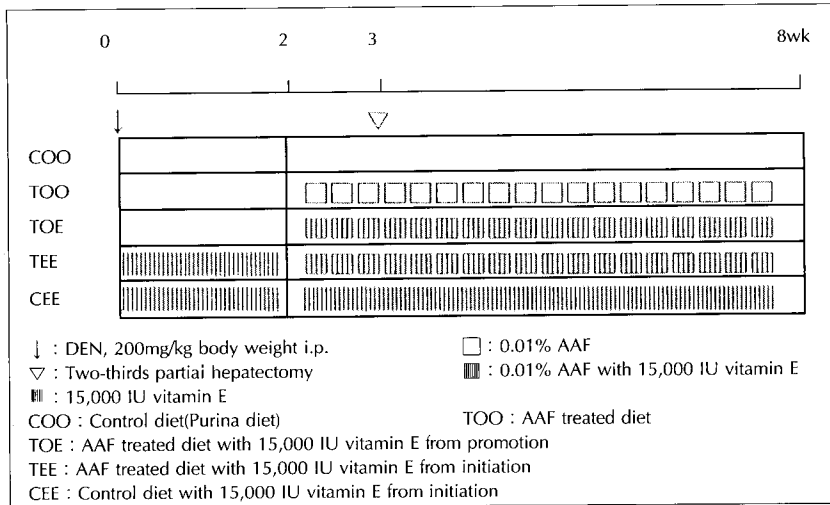


Fig. 1. Design of experiment.

4°C, 100,000×g의 조건하에 1시간 동안 원심분리하여 세포질 분획(상층액)과 소포체 분획(pellet)으로 분리했다. 소포체 분획은 균질용 용액으로 부유시켜 몇 개의 에펜도르프 튜브에 나누어 -70°C에서 냉동 보관하였다가 분석에 사용했다. 간 중 일부는 적당한 크기로 잘라 면역 조직화학적 검사와 조직학적 검사를 위해 냉아세톤과 10% phosphate buffered formalin용액에 고정시켰다.

4. 면역 조직화학적 염색 및 광학 현미경적 관찰

냉아세톤으로 고정시킨 간 조직의 GST-P 양성 증식성 결절을 확인하기 위해 avidin biotin peroxidase complex(ABC)법을 이용하여 면역 조직화학적 염색을 하였다¹¹⁾. GST-P 양성 증식성 결절의 수와 면적은 칼라 화상분석기(Cambridge Instruments, Quantinet 520)를 이용하여 측정하였다. 10% phosphate buffered formalin 액에 고정된 간은 H&E 염색에 사용하였다.

5. 생화학적 검사

Cu/Zn-SOD 활성도는 10,000×g 부유층에서 Misra와 Fridovich법¹²⁾에 의해 측정하였다. Catalase 활성도는 10,000×g pellet에서 Abei법¹³⁾으로, 세포질분획에서 glutathione reductase의 활성도는 Carlberg와 Mannervick법¹⁴⁾으로, total Glutathione peroxidase(총 GPx) 활성도는 Paglia와 Valentina(1967)의 방법을 개선한 Tappel(1978)의 방법¹⁵⁾을 이용하여 측정하였다. 세포질분획에서 Glutathione S-transferase(GST) 활성도는 Habig 등의 방법¹⁶⁾으로, 소포체분획에서 glucose-6-phosphatase(G6Pase) 활성도

는 Baginskie 등의 방법¹⁷⁾으로, 지질 과산화물 함량 측정은 thiobarbituric acid(TBA) 방법을 이용하여 TBARS 함량을 측정했다¹⁸⁾. 단백질 함량은 bovine serum albumine을 표준용액으로 사용하여 Lowry 등의 방법¹⁹⁾을 이용하여 측정하였다.

6. 통계처리

실험결과는 SAS를 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준 편차를 계산하였다. p<0.05 수준에서 ANOVA test후 Duncan's multiple range test에 의해 각 처리(발암원 처리, 비타민 E)에 의한 유의차를 검증하였다. 그리고 각 대조군과의 T-test를 한 후, 각각의 지표 간의 상관관계를 알아보았다.

실험결과

1. 체중 및 간 무게의 변화

실험군 모두 DEN과 간 부분절제술을 시행하였는데, 최종 간 무게는 COO군이 가장 작았고, CEE, TOE, TOO, TEE군의 순서로 간 무게가 나타났으나, 유의적이진 않았다. 최종 체중은 AAF를 투여하지 않은 COO군과 CEE군이 다른 군에 비해 무거웠고, AAF를 투여하면서 암화개시과정부터 비타민 E를 보강해준 TEE군은 대조군(TOO)에 비해 체중이 증가한 경향을 보인 반면, 암화유도과정부터 비타민 E를 보강해준 TOE군은 약간 감소한 경향이였다(Table 1). 체중당 간 무게비(L/B)는 전암성 단계에서 유의적으로 높아졌다. 이때, 비타민 E는 체중당 간 무게비를 약간 감소시키는 경향을 보였는데, DEN과 간 부분 절제술만을 해주면

Table 1. Effect of vitamin E supplement on the final liver weight, body weight and liver/body weight ratio

Group	Liver weight(g)	Body weight(g)	Liver/Body weight ratio(%)
COO	7.67±1.08 ^a	366.67±44.46 ^a	2.11±0.37 ^c
TOO	9.09±1.37 ^a	299.29±25.89 ^b	3.03±0.28 ^b
TOE	8.43±2.76 ^a	288.33±30.72 ^b	2.87±0.63 ^{ab}
TEE	9.12±0.34 ^a	307.44±29.35 ^{ab}	2.99±0.39 ^a
CEE	8.43±1.32 ^a	357.53±41.95 ^a	2.35±0.12 ^{bc}

COO : Control diet

TOO : AAF treated diet

TOE : AAF treated diet with 15,000 IU vitamin E from promotion

TEE : AAF treated diet with 15,000 IU vitamin E from initiation

CEE : Control diet with 15,000 IU vitamin E from initiation

Values are mean± SD.

Means with the same alphabet are not significantly different at $p <$ by Duncan's multiple range test.

서 비타민 E를 보강해 준 CEE군의 경우 COO군에 비해 오히려 약간 증가한 경향을 보였다. 발암원을 투여했을 때 체중에 대한 간 무게비가 증가하는 것은 간 세포암에서 glycogen, cholesterol, triacylglycerol이 세포에 축적되기 때문이라고 보고된 바¹⁹⁾²⁰⁾ 있으며, 김숙희와 최혜미⁴⁾의 실험 결과에서도 체중에 대한 간 무게비가 GST-P 양성 증식성 결절의 면적과 수에 비례하였다. 그러나, 본 실험에서 비타민 E 보강에 의해 체중당 간 무게비가 약간 증가한 경향을 보이는 경우에도 증식성 결절 면적은 유의적으로 감소한 것을 볼 때, 전암성 병변단계에서 항상 체중당 간 무게비가 증가하는 것은 아닌 것으로 보인다.

2. 면역 조직화학적 검사

면역 조직화학적 검사로 GST-P 양성 증식성 결절을 살펴본 결과, 실험군 모두 DEN과 간 부분 절제술을 시행하였기에, GST-P 양성 증식성 결절이 관찰되었다. H&E 염색에 의해 나타난 hyperplastic foci가 GST-P 면역 염색에서도 양성으로 나타났다. 암화과정 동안 GST-P 양성 증식성 결절의 면적과 수는 유의적으로 증가하였고, 비타민 E를 보강해 준 군(TOE, TEE)들은 대조군(TOO)보다 GST-P 양성 증식성 결절 면적이 유의적으로 감소하였다(Fig. 2, 3). 또한 비타민 E를 암화 유도 개시단계부터 보강해 준 TEE군은 촉진 과정에만 보강해 준 TOE군보다 GST-P 양성 증식성 결절의 면적과 수가 작아지는 경향을 보였으며, 결절 수에서는 유의적이었다. CEE군은 대조군(COO)에 비해 GST-P 양성 증식성 결절의 면적과 수를 감소시켰다. 즉, 비타민 E는 암화 촉진효과를 나타내지 않았고, DEN과 간 부분 절제술에 의해 유도된 GST-P 양성 증식성 결절 면적을 감소시켰다. 암화 개시과정부터 비타민 E를 보강해 준 TEE군은 대조군 TOO군에 비해 GST-P 양성 증식성 결절의 면적과 수를 유의적으로

낮추었는데 비하여, 암화 촉진과정에만 비타민 E를 보강해 준 TOE군은 면적만을 유의적으로 낮추었다. 아마도 비타민 E를 암화 유도 개시단계부터 보강했을 때, DEN에 의한 변형 세포(initiated cell)의 생성을 억제할 수 있었을 것으로 생각된다.

3. 생화학학적 검사

1) Cu/Zn-Superoxide dismutase(Cu/Zn-SOD) 활성도

Cu/Zn-SOD 활성도를 측정한 결과 AAF 처리군(TOO, TOE, TEE)들에서 유의적으로 낮은 활성도를 보였다(Table 2). 그러나 비타민 E의 영향은 별로 받지 않는 것으로 나타났다. 대부분의 간암 세포에서 O₂⁻ 생성과 함께 SOD 활성이 감소되며, Mn-SOD는 거의 소실된다고 하였고²¹⁾, 간 질환 상태에서도 Cu/Zn-SOD 활성이 감소되어 활성 산소에 의한 유리라디칼 손상을 더 쉽게 받게 될 것이라고 하였다²²⁾. COO군과 CEE군의 SOD 활성이 높은 것을 볼 때 COO, CEE군은 DEN 처리와 간 부분 절제술에 의해 생성된 O₂⁻을 효과적으로 제거해 주었을 것으로 생각된다. 그런데, TOO, TOE, TEE군의 SOD 활성도는 낮아졌는데, 이로써 O₂⁻을 효과적으로 제거하지 못하여, 세포가 O₂에 의한 산화적 손상을 더 받았을 것으로 생각된다.

2) Catalase 활성도

AAF를 처리한 TOO군의 catalase 활성도는 COO군에 비해 증가하였고, 비타민 E 보강에 의해 감소하였는데, 대조군에 비해 유의적으로 catalase 활성도를 낮춘 비타민 E보강군은 암화개시과정부터 비타민 E를 보강해 준 TEE군이였다(Table 2). Peroxisome 증식제가 간의 무게를 증가시키는 mitogenic activity를 갖는 기전에 대한 연구에서, β -oxidation에 의해 peroxisome에서 생성되는 H₂O₂와 이에 따라 증가된 reac-

tive oxygen species 독성에 의하여 간세포의 증식능이 유도된다고 하였다²³⁻²⁵). 아마도, 전암성 단계에서 발암원 투여로 많이 생성된 H₂O₂에 의해 간세포 증식능이 유도되었고, 비타민 E는 H₂O₂를 제거해 줌으로써,

세포 증식능을 억제하였을 것으로 생각된다. 그리고 비타민 E의 H₂O₂ 제거능은 암화 개시과정부터 보강해 준 경우 더 컸다.

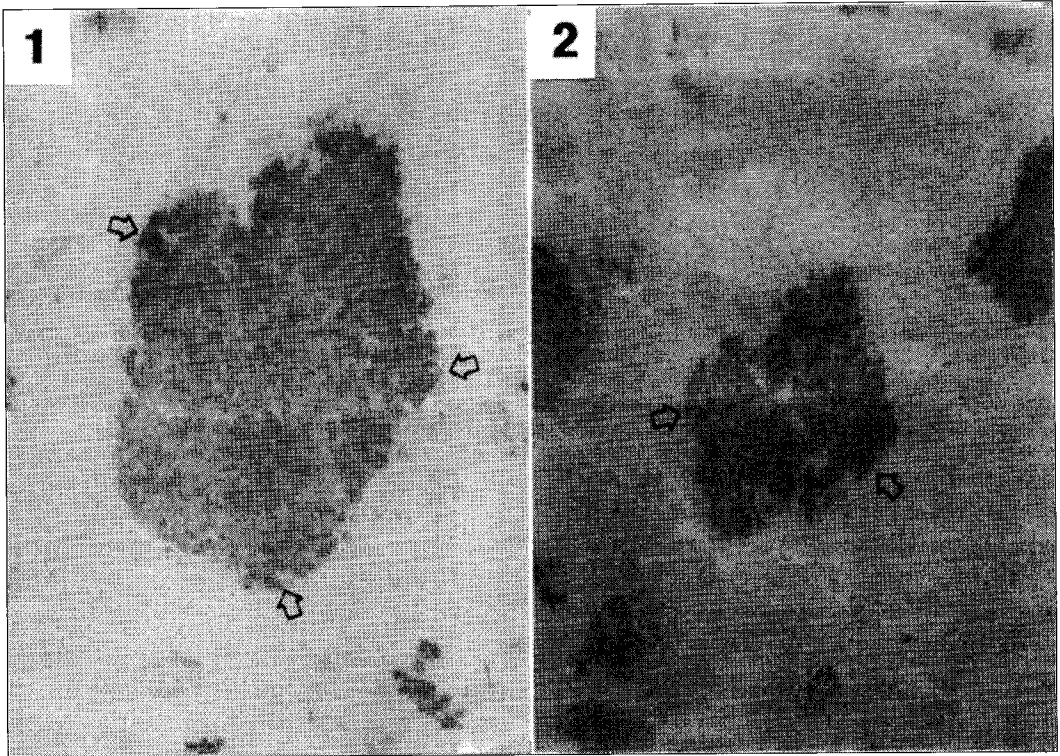


Fig. 2. GST-P positive foci in DEN and AAF treated and partial hepatectomized rats with or without 15,000 IU vitamin E from promotion($\times 100$). 1 : TOO, 2 : TOE

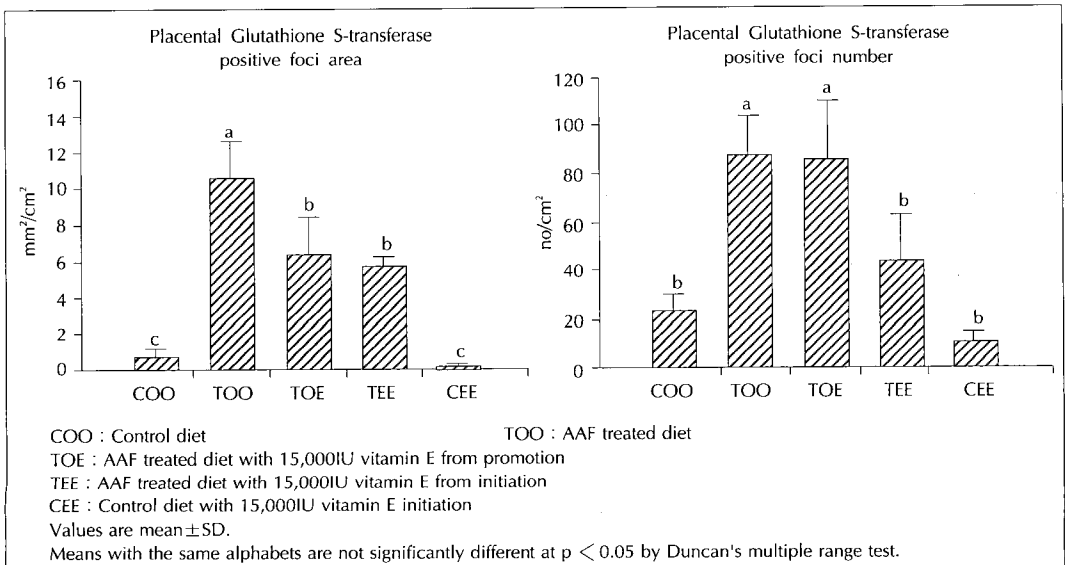


Fig. 3. Effect of vitamin E supplement on the area and number of placental glutathione S-transferase positive foci in DEN treated and partial hepatectomized rats with or without AAF.

Table 2. Effect of Vitamin E supplement on the Cu/Zn-SOD, catalase, glutathione reductase

Group	Cu/Zn-SOD	Catalase	Glutathione reductase nmole NADPH oxidation/mg protein/min
COO	130.11 ± 16.99 ^a	182.44 ± 58.84 ^{abc}	94.79 ± 16.71 ^b
TOO	83.87 ± 12.21 ^b	289.08 ± 105.45 ^a	141.15 ± 11.75 ^a
TOE	88.84 ± 14.19 ^b	231.33 ± 76.52 ^{ab}	123.53 ± 13.99 ^a
TEE	89.77 ± 7.94 ^b	126.71 ± 44.20 ^{bc}	50.80 ± 5.39 ^c
CEE	139.78 ± 6.03 ^a	95.32 ± 22.88 ^c	52.03 ± 3.99 ^c

COO : Control diet

TOO : AAF treated diet

TOE : AAF treated diet with 15,000 IU vitamin E from promotion

TEE : AAF treated diet with 15,000 IU vitamin E from initiation

CEE : Control diet with 15,000 IU vitamin E from initiation

Values are mean ± SD.

Means with the same alphabet are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) Glutathione reductase 활성화

TOO군의 glutathione reductase 활성이 COO군에 비해 유의적으로 증가하였고, 비타민 E보강에 의해 감소하였다(Table 2). Glutathione reductase 활성을 감소시키는 비타민 E효과는 암화 개시과정부터 보강해 준 경우, 촉진과정에 보강한 것보다 더 컸다. TOE군의 glutathione reductase 활성도는 낮아지는 경향을 보였으나, 유의적이진 않았고, 암화 개시과정부터 비타민 E를 보강해 준 TEE군은 TOO군과 COO군 모두에 비하여 유의적으로 낮은 활성도를 보였다. 그리고, AAF를 처리하지 않으면서 비타민 E를 보강해 준 CEE군도 대조군(COO)에 비해 유의적으로 낮은 glutathione reductase 활성도를 보였다. 또한 AAF 처리와 비타민 E 보강 사이에 상호작용이 있었다. Glutathione reductase 활성도에 영향을 미치는 비타민 E효과는 암화 개시과정부터 보강해 준 경우, 촉진과정에 보강한 것보다 더 컸다. 비타민 E가 protein kinase C 활성을 저하시켜 세포 증식을 억제함으로써²⁶⁾ 암화 유도과정을 억제한 결과, glutathione reductase 활성도가 낮아졌을 가능성을 배제할 수는 없다. 그러나 본 실험 결과, 비타민 E에 의해 세포내 과산화물들이 효과적으로 제거되어, 과산화물 제거에 필요한 환원형의 GSH 수요가 줄어 glutathione reductase 활성도가 낮게 나타났을 것으로도 생각해 볼 수 있다.

4) 종 glutathione peroxidase(GPx) 활성화

본 실험에서 측정된 총 GPx활성도는 COO군에 비해 TOO군에서 증가되는 경향을 보였고, 이때 비타민 E를 보강해 주면 유의적으로 감소되었다. 이때, 비타민 E보강을 암화 개시과정부터 해준 TEE군이 촉진과정에만 보강해 준 TOE군보다 총 GPx활성도가 유의적으로 낮았다(Table 3). AAF를 투여하지 않으면서, 비타

민 E를 보강해 준 CEE군도 대조군(COO)군에 비하여 총 GPx활성도가 유의적으로 낮았다. 본 실험의 경우, GST-P 양성 증식성 결절이 형성된 단계이며 총 GPx 활성은 증가하였는데, 다른 연구²⁷⁾에서도 간 세포 암화 과정 초기에는 총 GPx와 Se-의존성 GPx활성도 모두 급격히 감소하다가 GGT 양성 증식성 결절이 형성된 다음부터 총 GPx 활성이 점차 증가하였으며, 이것을 GST B 형태의 GPx활성증가 때문이라고 보고하였다. 본 실험 결과 비타민 E가 암화 유도과정에서 많이 생성된 ROOH, H₂O₂등을 효과적으로 제거함으로써, 이들을 제거하는 총 GPx활성도를 낮게 하였을 것으로 생각된다. 이러한 비타민 E 효과는 암화 개시과정부터 보강해 준 경우 더 컸다.

5) Glutathione S-transferase(GST) 활성화

간 cytosol에서 GST활성도를 측정된 결과(Table 3), AAF처리군들에서 활성도가 유의적으로 증가하였으며, 비타민 E에 의해 활성도가 유의적으로 감소하였다. 그리고, 비타민 E를 암화 개시과정부터 보강해 준 TEE군의 GST활성도가 TOE군보다 유의적으로 낮았다. 또한 CEE군의 GST활성도는 COO군에 비해 유의적으로 낮았다. 암화 유도과정에서 많이 생성된 산화물 제거를 위하여 GST 활성이 유도되었으나, 비타민 E에 의하여 산화물들이 효과적으로 제거됨으로써 GST 활성이 감소된 것으로 생각된다. 이러한 효과 역시 암화유도 개시과정부터 비타민 E를 보강해 준 경우 더 컸다.

6) Glucose-6-phosphatase(G6Pase) 활성화

TOO군의 G6Pase활성은 COO군에 비해 유의적으로 낮았고, 이는 Choi(1996)의 결과와 유사하였다²⁸⁾. TOE군의 G6Pase활성은 TOO군에 비해 아주 약간 증가하였으나, TEE군에서는 유의적으로 높았다. 즉, 비타민 E를 촉진과정에만 보강하였을 때는 약간 높은 활

Table 3. Effect of Vitamin E supplement on the total glutathione peroxidase(TGPx), GST, G6Pase activities and TBARS contents

Group	TGPx		GST		G6Pase	TBARS
	nmole NADPH oxidized/mg protein/min	%	nmole CDNB conjugate/mg protein/min		mmole Pi liberated/mg protein/min	nmole TBARS/mg protein
COO	241.93 ± 20.95 ^{ab}		603.74 ± 86.46 ^c		9.86 ± 1.68 ^a	2.25 ± 0.23 ^b
TOO	265.72 ± 28.71 ^a		886.49 ± 125.69 ^a		6.76 ± 0.76 ^b	3.10 ± 0.97 ^a
TOE	211.45 ± 32.14 ^b		730.81 ± 47.61 ^b		7.03 ± 0.46 ^b	0.94 ± 0.23 ^c
TEE	127.23 ± 14.70 ^c		389.77 ± 31.48 ^d		10.96 ± 1.18 ^a	0.55 ± 0.19 ^c
CEE	102.67 ± 15.73 ^c		282.32 ± 15.39 ^d		11.36 ± 0.81 ^a	0.31 ± 0.07 ^c

COO : Control diet
 TOO : AAF treated diet
 TOE : AAF treated diet with 15,000 IU vitamin E from promotion
 TEE : AAF treated diet with 15,000 IU vitamin E from initiation
 CEE : Control diet with 15,000 IU vitamin E from initiation
 Values are mean ± SD.

Means with the same alphabet are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

성도를 보인데 비해, 암화 개시과정부터 보강했을 때는 유의적으로 높은 활성도를 보였다. CEE군의 G-6Pase 활성은 COO군에 비해 약간 높은 경향만을 보였다 (Table 3). AAF처리시 급격히 증가한 세포내 H₂O₂와 유기 산화물들에 의해 membrane integrity가 저하되어, 막 부착 효소인 G6Pase 활성이 감소된 것으로 보인다. 그러나, 비타민 E 보강에 의하여 암화과정에서 증가한 산화물들이 효과적으로 제거됨으로써 소포체막 안정도가 높아졌을 것으로 생각된다. 이러한 효과는 암화 개시과정부터 보강해 주었을 때 뚜렷하였다.

7) 지질과산화물 생성량

지질과산화물 생성량의 척도로 측정된 TBARS 함량은 COO군에 비해 TOO군에서 유의적으로 많았고, 비타민 E를 보강해 준 모든 군에서 보강하지 않은 군보다 유의적으로 적은 TBARS 함량이 측정되었다. 비타민 E가 지질 과산화물 생성을 억제하는 효과도 비타민 E 보강을 암화 개시과정부터 하였을 때 더 컸다 (Table 3). 소포체막의 다가 불포화지방산은 지질 과산화 반응의 기질이 되며, 지질 과산화 반응은 발암원 자체 혹은 발암원을 대사시키는 과정에 관여하는 효소에 의해 일어날 수 있다²⁹⁾. 또한 지질 과산화물은 membrane integrity를 저하시켜 막 부착 효소인 G6Pase와 약물대사 효소계 자체에도 영향을 주어³⁰⁾ 간 세포 손상을 유발하며 암화 촉진과정과도 관련이 있는 것으로 보고되고 있다³¹⁾³²⁾. 본 실험결과, 암화유도과정에서 생성된 지질 과산화물은 GST-P 양성 증식성 결절의 형성을 촉진시켰을 것으로 보이며, 비타민 E가 지질 과산화물 생성을 억제함으로써 GST-P 양성 증식성 결절 성장을 억제하였을 것으로 생각된다.

고 찰

본 실험은 생체 고유의 항산화 물질인 비타민 E가 간 세포 암화과정에 영향을 미치는지를 전암성 병변의 면적을 측정하여 살펴보고, 비타민 E의 항산화 효과가 암화과정에 영향을 미치는 기전으로 판여하는지를 알아보는 것을 목적으로 하였다. 아울러, 비타민 E를 암화 개시과정부터 보강해 준 경우와 촉진과정에 보강해 준 경우를 비교하여, 보강 시기에 따른 차이를 살펴보았다.

본 실험 결과 DEN 처치와 간 부분 절제술만을 시행한 COO군에 비하여, DEN 처치와 간 부분 절제술 외에 AAF 처치를 함께 해 준 TOO군의 GST-P 양성 증식성 결절의 면적과 수가 유의적으로 많았다. TOO군과 같은 처치를 해 주면서 비타민 E를 암화 개시과정부터 보강해 준 TEE군과 암화 촉진과정부터 보강해 준 TOE군은 TOO군에 비해 GST-P 양성 증식성 결절 면적이 감소되었다. 보강 시기를 암화 개시과정부터 해 준 TEE군은 면적과 함께 수도 감소시켜 GST-P 양성 증식성 결절 형성 자체를 비타민 E가 억제해 주었을 것으로 생각된다. DEN 처치와 간 부분 절제술만을 시행한 COO군과 같은 처치를 해 주면서 비타민 E를 암화 개시과정부터 보강해 준 CEE군의 GST-P 양성 증식성 결절의 면적과 수도 대조군(COO)에 비하여 유의적으로 낮아졌다. Ura등에 의하면 DEN 처치와 간 부분 절제술을 시행할 때 비타민 E 보강은 γ -glutamyl transpeptidase(GGT) 양성 증식성 결절의 생성을 억제하였으나, GGT 양성 증식성 결절이 생성된 뒤에 비타민 E 보강을 해 주었을 때는 오히려 증식성 결절 면적을 증가시켰다³³⁾. 그리고 Kolaja등도 결절 형성후에

보강된 비타민 E는 오히려 결절 성장을 촉진시킨다³⁴⁾고 하였다. 또 다른 연구에서 식이 Kg당 1,000 IU의 비타민 E는 100 IU에 비해 전암성 병변을 조금 감소시키는 경향을 보였다⁴⁾. 그러나 본 실험 결과 비타민 E를 15,000 IU로 과량 보강해 주었을 때는 유의적으로 전암성 병변을 낮춘 것으로 나타났으며, 비타민 E를 암화 개시과정부터 보강했을 때는 DEN에 의한 세포 변형 기작까지 억제해 준 것으로 생각되며, 촉진과정부터 비타민 E 보강을 해준 경우에는 변형된 세포가 생기는 것을 억제하지는 못하였으나, GST-P 양성 증식성 결절의 성장을 억제하였다.

DEN처치와 간부분절제술만을 실시한 COO와 CEE군의 GST-P 양성 증식성 결절 면적은 결절 수($r=0.88$, $p<0.05$), 지질 과산화물($r=0.85$, $p<0.066$), GST($r=0.86$, $p<0.05$), catalase($r=0.95$, $p<0.05$), 총 GPx($r=0.93$, $p<0.05$) 활성들과 양의 상관관계를 보였다. 그리고 AAF를 처리한 경우의 GST-P 양성 증식성 결절 면적은 지질 과산화물($r=0.7$, $p<0.0548$)과 체중당 간 무게비($r=0.90$, $p<0.05$)와 양의 상관관계를 보였다. 이를 볼 때, DEN과 간 부분 절제술에 의하여 세포내에 지질 과산화물과, ROOH, H₂O₂등이 증가되어 세포 증식능을 유도하여 GST-P 양성 증식성 결절을 유도하였고, 이러한 산화물을 제거하기 위해 GST, catalase, 총 GPx활성도가 증가되었을 것으로 생각된다. 이때 과량의 비타민 E 보강은 지질 과산화물, ROOH와 H₂O₂등을 효과적으로 제거함으로써, GST-P 양성 증식성 결절의 면적과 수를 감소시켰다.

또한 세포내 oxidative stress를 낮춤으로써 GST, catalase, 총 GPx활성을 감소시키고, 소포체막 안정도를 높이므로써 G6Pase 활성을 높여 준 것으로 보인다. DEN 처치와 간 부분 절제술만을 한 군(COO, CEE)들에 비하여 AAF 처리까지 함께 해준 군(TOO, TOE, TEE)들의 catalase($p<0.072$), GST 활성이 높았고, SOD와 G6Pase 활성은 낮았다. AAF 처리시, 암화 촉진과정에 비타민 E를 보강해 준 TOE군은 대조군(TOO)에 비해 GST, 총 GPx 활성도와 TBARS 함량을 감소시켰으며, 비타민 E 보강을 암화 개시과정부터 해 준 TEE군은 대조군(TOO)에 비해, 앞의 3가지 지표 외에 catalase($p<0.7$)활성도 또한 감소시켰고, G6Pase활성도는 증가시켰다. TOE군과 비교한 TEE군의 GST, 총 GPx, catalase($p<0.062$), TBARS 함량은 유의적으로 낮았고, G6Pase 활성은 유의적으로 높았다. COO군에 비해 CEE군의 catalase($p<0.063$), GST, 총 GPx 활성도와 TBARS 함량도 감소하였다.

본 실험에서 비타민 E가 SOD활성에 별 영향을 주지 못하면서 GST-P 양성 증식성 결절 면적을 유의적으로 낮춘 것을 볼 때 비타민 E가 암화과정을 억제하는 기작은 SOD 활성과는 직접적인 관련이 없는 것으로 생각된다. DEN 처치, 간부분절제술과 AAF 처리도 함께 해 준 경우 SOD 활성이 감소되어 O₂ 제거를 제대로 하지 못함으로써 활성 산소에 의한 산화적 손상이 많아져 TBARS 함량이 증가되었으며 소포체막 안정도가 떨어진 것으로 보인다. 이때, 과량의 비타민 E 보강은 암화 유도과정에서 많이 생성된 ROOH, H₂O₂등을 효과적으로 제거함으로써, 이들을 제거하는 총 GPx와 GST활성도를 낮추고, 과산화물 제거에 필요한 환원형의 GSH 수요를 감소시켜 glutathione reductase활성도를 낮춘 것으로 보인다. 그리고 TBARS 함량을 감소시키고, G6Pase활성을 증가시킨 것으로 볼 때, 소포체막 안정도를 높였을 것이다. O₂, H₂O₂, ROOH, 지질 과산화물이 GST-P 양성 증식성 결절 생성을 유도하는데 기여했을 것으로 보이며, 비타민 E가 산화물들을 효과적으로 제거함으로써 GST-P 양성 증식성 결절 면적을 감소시켰을 것으로 생각된다. 한편, 비타민 E가 다른 기작을 통해 GST-P 양성 증식성 결절 생성을 감소시켰을 가능성도 배제할 수 없으나, 본 실험 결과 과량의 비타민 E 보강이 보인 뚜렷한 항산화 효과로 미루어 볼 때, 이것이 간세포 암화과정을 억제하는 기작 중의 하나일 것으로 생각된다. 그리고 이러한 효과는 암화 개시과정부터 보강해 주었을 때 뚜렷하였다. 즉, 비타민 E 보강은 지질 과산화물 생성을 억제하고, 세포내 산화물을 효과적으로 제거함으로써 항산화 효소치들을 감소시켰으며, GST-P 양성 증식성 결절면적도 감소시켰다. 이러한 비타민 E 보강효과는 암화 개시과정부터 해 준 경우 더 효과적이었다.

결 론

암화 유도과정에서 세포내의 oxidative stress가 증가되어 대부분의 항산화 효소의 활성도가 높아졌는데 이 중 유의적이었던 것은 GST, glutathione reductase 활성도였다. 이와함께 지질 과산화물 생성이 유의적으로 많아졌으며 G6Pase 활성도로 측정된 소포체막 안정도는 떨어졌다. 이 때 비타민 E를 보충해 주면 암화과정이 억제되었다. 비타민 E 보강에 의해 GST, 총 GPx, glutathione reductase 활성도, 체중당 간 무게비와 지질 과산화물 생성이 유의적으로 감소하여 세포내 oxidative stress가 감소한 것을 알 수 있었다. 비타민 E의 GST-P 양성 증식성 결절 면적, GST, 총

GPx 활성도와 지질 과산화물 생성을 낮추는 효과는 비타민 E를 촉진과정에 보강한 경우와 개시과정부터 보강한 경우 모두에서 나타났다. 촉진과정에 보강해 준 경우만 유의적으로 나타난 것은 체중당 간 무게비 감소였고 개시과정부터 보강해 준 경우에만 유의적으로 나타난 것은 GST-P 양성 증식성 결절 수, catalase 활성도 감소와 G6Pase 활성도 증가였다.

비타민 E 보강은 전암성 단계에서 많이 생성된 H₂O₂, ROOH와 지질 과산화물 등의 산화 물질들을 잘 제거하여 endogenous defense system을 보강해 주었고 GST-P 양성 증식성 결절 면적을 유의적으로 낮추었다. 보강 시기는 암화 개시과정부터로 설정할 때 DEN에 의한 세포 변형을 방어할 수 있으며 보다 효과적으로 항산화 효과를 발휘하는 것으로 보여진다. 이상의 결과 비타민 E 보강이 항산화 효과를 통하여 화학적 발암원으로 유도한 쥐간의 암화과정을 억제하며, 개시과정부터 보강할 경우 그 효과가 더 큰 것을 알 수 있었다.

■ 감사의 글

본 연구는 1993년도 한국 학술 진흥 재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었기에 감사드리며, 면역 조직 검사와 화상분석 및 조직 판독을 도와주신 서울대학교 수의과대학 이영순 교수님께 감사드립니다.

Literature cited

- 1) Watson RR, Leonard TK. Selenium and vitamin A, E and C : Nutrients with cancer prevention properties. *J Am Diet Assoc* 86 : 505-510, 1986
- 2) Ames BN. Dietary carcinogenesis and anticarcinogens. *Science* 221 : 1256-1264, 1983
- 3) Krishnamurthy S. The intriguing biological role of vitamin E. *J Chem Ed* 60 : 456-467, 1983
- 4) 김숙희 · 최혜미. N-6, N-3 지방산과 비타민 E 보강 식이가 전암성 병변에 미치는 영향. *한국생화학회지* 27(2) : 125-131, 1994
- 5) Boscoboinik D, Szweczyk A, Hensy C, Azzi A. Inhibition of cell proliferation by α -tocopherol. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 266 : 6188-6194, 1991
- 6) Prasad KN, Edwards-Prasad J. Effects of tocopherol acid succinate on morphological alterations and growth inhibition in Melanoma cells in culture. *Cancer Res* 42 : 550-555, 1982
- 7) Turley JM, Fu T, Ruscetti FW, Mikovits JA, Bertolette DC 3rd, Birchenall-Roberts MC. Vitamin E succinate induces FAS-mediated apoptosis in estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Cancer Res* 57(5) : 881-890, 1997
- 8) Cook MG, Mcnamara P. Effect of dietary vitamin E on

dimethylhydrazine-induced colonic tumors in mice. *Cancer Res* 40 : 1329-1331, 1980

- 9) Odukoya O, Hawach F, Shklar G. Retardation of experimental oral cancer by topical vitamin E. *Nutr Cancer* 6 : 98-104, 1984
- 10) Ito N, Imaida K, Hasengawa R, Tsuda H. Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. *CRC Critical Review in Toxicology* 19(4), 1989
- 11) Osigo T, Tatematsu M, Tamano S, Tsuda H, Ito N. Comparative effects of carcinogenesis on the induction of placental glutathione S-transferase positive liver nodules in a short-term assay and of hepatocellular carcinogenesis in a long-term assay. *Toxicol Pathol* 13 : 257-265, 1985
- 12) Misra HP, Fridovich I. Superoxide dismutase : A photochemical augmentation assay. *Arch Biochem Biophys* 181 : 308, 1977
- 13) Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105 : 121-126, 1984
- 14) Carlberg I, Mannervick B. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology* 113 : 484-499, 1985
- 15) Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Method Enzymology* 52 : 506-513, 1978
- 16) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 249 : 7130-7139, 1974
- 17) Baginski ES, Foa PP, Zak B. Glucose 6-phosphatase. *Method of Enzymatic Analysis* 2 : 876-880, 1983
- 18) Vaca CE, Harms-Ringdahl M. Lipid peroxidation on the rat liver S9 fraction : Influence of membrane lipid composition. *Mutation Res* 162 : 21-32, 1986
- 19) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
- 20) Laureen DJ, Tsh SJ, Hilton DE. Cytotoxicity phase of diethylnitrosamine-induced hepatic neoplasia in medeka. *Cancer Res* 50 : 5504-5514, 1990
- 21) Oberley LW, Buettner GR. Role of superoxide dismutase in cancer : A review. *Cancer Res* 39 : 1141-1149, 1979
- 22) Togashi H, Shinzawa H, Wakobayoshi H, Nakamura T, Yamada N, Takahashi T, Ishikawa M. Activities of free oxygen radical scavenger enzymes in human liver. *J Hepatol* 11 : 200-205, 1990
- 23) Kvannes J, Ekihom TS, Flatmark T. On the mechanism of stimulation of peroxisomal β -oxidation in rat heart by partially hydrogenated fish oil. *BBA* 1255 : 39-49, 1995
- 24) Chen H, Huang C, Wilson MW, Lay LT, Robertson LW, Chow CK, Glauert HP. Effect of peroxisome proliferators ciprofibrate and perfluorodecanoic acid on hepatic cell proliferation and toxicity in Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 15 : 2847-2850, 1994

- 25) Ashby J, Brady A, Elcombe CR, Elliot BM, Ishmael J, Odum J, Tugwood JD, Kettle S, Purchase IFH. Mechanistically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator induced hepatocarcinogenesis. *Human & Experimental Toxicology* 13(S2) : S1-S117, 1995
- 26) Stauble B, Boscoboinik D, Tasinato A, Azzi A. Modulation of activator protein-1(AP-1) transcription factor and protein kinase C by hydrogen peroxide and D- α -tocopherol in vascular smooth muscle cells. *Eur J Biochem* 226 : 393-402, 1994
- 27) Kitahara A, Yamazaki T, Ishikawa T, Camba EA, Kiyomi S. Changes in activities of glutathione peroxidase and glutathione reductase during chemical hepatocarcinogenesis in the rats. *Jpn J Cancer Res* 74 : 649-655, 1983
- 28) Choi H, Woo J, Kim KT. Effects of ω -3 fatty acids on the preneoplastic lesions and drug-metabolizing enzyme activities in hepatocarcinogenesis. pp633-643. In : Proceedings of the International Symposium on Natural Antioxidants : Molecular Mechanisms and Health Effects ed. by Packer L, et al. AOCS Press, Champaign, Illinois, 1996
- 29) Kawase T, Kato S, Lieber GS. Lipid peroxidation and antioxidant defense system on rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology* 10 : 815-821, 1989
- 30) Lucy R, Wills ED. The effect of dietary lipids and vitamin E on lipid peroxide formation, cytochrome P-450 and oxidative demethylation in the endoplasmic reticulum. *Biochem Pathol* 25 : 175-179, 1979
- 31) Slaga TJ, Klein-Szanto AJP, Triplett LL, Yotti LP, Troko JE. Skin tumor-promoting activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical-generating compound. *Science* 213 : 1023-1025, 1981
- 32) Bull AW, Soullier BK, Wilson PS, Hayden MT, Nigro ND. Promotion of azoxymethane-induced intestinal cancer by high-fat diet in rats. *Cancer Res* 39 : 4956-4956, 1979
- 33) Ura H, Denda A, Yoshihiko Y, Tsutsumi M, Konishi Y. Effect of vitamin E on the induction and evolution of enzyme-altered foci in the liver of rats treated with diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 8(11) : 1595-1600, 1987
- 34) Kolaja KL, Klaunig JE. Vitamin E modulation of hepatic focal lesion growth in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 143(2) : 380-387, 1997