韓國營養學會誌 33(6)632~638 : , 2000

화학적 발암원을 투여한 쥐에서 녹차 추출물의 대장암 억제효과에 관한 생화학적 연구

박 현 서[§] · 신 기 정

경희대학교 생활과학대학 식품영양학과

Biochemical Studies on Colon Tumor Non-Promoting Effect of Green Tea Extract in Chemical Carcinogen-Treated Rats

Park, Hyun-Suh[§] · Shin, Ki-Jung

Department of Food and Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT

This study was designed to observe the effect of green tea on colon tumor incidence and biomarkers of colon carcinogenesis in 1, 2-dimethylhydrazine-treated rats. Male Sprague Dawley rats, at 7 weeks of age, were divided into two groups , control and green tea(GT) groups. Control rats had distilled water as drinking water, but GT group received green tea extracts(2.5%, w/v water) as drinking water throughout the experiment period. All rats were fed the experimental diet containing 15% fat by weight for 20 weeks, and were i.m. injected with DMH for 6 weeks to give total dose of 180mg/kg body weight. Tumor incidence was reduced in GT group(39%) compared with control group(56%). Green tea significantly reduced cell proliferation (total cells per crypt, crypt length and proliferative zone) in colonic mucosa and also significantly reduced the levels of preformed prostaglandin E_2(PGE_2) and thromboxane B_2(TXB_2) in colonic mucosa, but the fatty acid profile of total lipid in colonic mucosa was not significantly influenced by green tea. However, the relative percent of C20 : 4 and the levels of preformed PGE_2 and TXB_2 were significantly higher in tumor tissue compared with normal surrounding mucosa. Green tea increased the fecal excretion of total bile acid but not secondary bile acid which is known as one of promoters for colon cancer. These results suggest that green tea could have preventive effect against colon cancer when consumed daily by influencing on antioxidant effect and the metabolism of arachidonic acid. (*Korean J Nutrition* 33(6) · 632~638, 2000)

KEY WORDS · green tea, colon tumor incidence, cell proliferation, thromboxane B_2, prostaglandin E_2, arachidonic acid.

서 론

녹차는 전 세계적으로 물 다음으로 가장 널리 애용되고 있는 음료로서 이의 주성분인 polyphenol은 항산화작용을 나타내는 물질로서 독성이 없으면서 각종 질병의 예방효과가 있다고 알려져 있다.[1] 역학조사에 의하면 녹차는 각종 암발생을 억제하는 효과가 있다고는 하였으나 일관성 있는 결과를 도출해 내지는 못했는데 이는 사람을 대상으로 하였기에 차의 섭취량 이외에 차의 종류, 섭취 온도, 그밖의 다른 복잡한 식이요인 및 생활습관이 영향을 주었기 때문인 것으로 보고되고 있다.[1,2] 화학적 발암원으로 유도한 피부암과 폐암에서 녹차의 polyphenol 성분은 개시단계와 촉진단계에서 종양발생을 억제하였다고 하였다.[3] 이외에도 녹차의 성분이 종양발생을 억제하는 효과가 있었다는 보고는 많았지만 대장암과의 관계에 대해서는 거의 연구가 되어있지 않은 실정이다.[1,4-7]

역학조사와 동물실험에 의하면 대장암의 발병률은 환경적인 요인과 깊은 연관성이 있으며, 특히 지방섭취량이 총 열량의 40% 정도인 고지방식이를 하는 민족에서 발병률이 증가하였다.[8] 그러나, 중국인의 식습관을 살펴보면 지방 섭취량이 열량의 25~30% 이상인데 대장암, 유방암의 발병율은 낮았다. 그런데 특이하게 중국인은 항상 차를 마시는 습관을 가지고 있었다는 점이다.[9]

녹차의 항암작용에 관한 생화학적인 기전은 아직 정립되지 않은 상태이나 지금까지 알려진 녹차의 암발생 억제효과는 녹차의 성분이 암화과정의 개시단계에서 유전자 변이를

채택일 : 1999년 8월 12일

*Supported by a grant from Korean Foundation of Science Promotion #01-D-0428 (1996).

§To whom correspondence should be addressed

© 2000 The Korean Nutrition Society

가져오는 활성화된 산소와 결합해 발암원의 활성을 저해하여 DNA의 손상을 억제하는 기능을 수행하며, 촉진단계에서는 tumor promotor가 세포막을 자극하여 세포내 신호전달체계에 미치는 영향을 억제하는 기능이 있다는 것이다.[1)6)7)10)11)] 이외에도 녹차의 항암작용에 관한 각종 연구결과를 살펴보면, in vitro에서 세포배양을 하여 각종 산화효소들의 활성을 억제하는 정도를 측정하여 녹차의 항산화작용에 의한 항암효과를 보고하였는데 in vivo 동물실험에서는 암 발생률만을 측정한 것에 불과하였다.[1)4-7)10)]

따라서 본 연구에서는 고지방식이로 쇠기름을 동일하게 공급하고 화학적 발암원으로 대장암을 유발한 후, 암화과정에 미치는 녹차의 효과를 관찰하기 위해 biomarker로써 대장점막의 cell proliferation과 eicosanoids, 점막 세포막의 지방산조성, 변으로 배설되는 2차 bile acid를 측정하여 녹차의 항암작용에 관하여 연구하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험계획

본 연구에서는 생후 6주된 Sprague Dawley종 수컷쥐를 구입하여 1주간 일반사료로 사육하여 적응시킨후, 난괴법에 의하여 체중에 따라 18 마리씩 두군, 즉 녹차의 공급 유·무에 따라 대조군(Control)과 녹차군(Green tea)으로 나누어 20주간 실험식이를 공급하여 사육하였다. 대조군은 녹차를 주지않고 음료수로써 증류수만을 공급하였고, 녹차군은 실험기간 20주동안 증류수 대신 녹차만을 음료수로 공급하였다. 모든 쥐에게 화학적 발암원인 1,2-dimethyl-hydrazine HCl(DMH, 99%, Aldrich chemical Co, Milwoukee, Wis)을 실험식이가 시작된 후 1주에서 7주까지 6주간 주 2회씩 체중 kg당 15mg을 좌·우 대퇴근에 교대로 근육주사하여 총 180mg/kg을 투여하였다. 실험식이는 무게중 단백질이 22%, 당질 53.5%, 지방질 15%로 구성되었으며(Table 1), 지방급원으로 쇠기름을 사용하였고, 쇠기름에 부족한 필수지방산을 보충해 주기 위해 옥수수유를 1.6% 수준으로 첨가하였다. 음료수로 공급된 녹차는 시중에서 판매되고 있는 말린 녹차잎(천수, 태평양주식회사)을 사용하였으며, 녹차의 농도는 2.5%(w/v)로 끓인 증류수에 녹차잎을 넣고 15분간 우려낸 후 차게 식혀 물대신 공급하였다.

2. 시료채취 및 처리방법

해부하기 전 쥐를 overnight fasting 시켰으며 세포증식(cell proliferation)을 보기위한 BrdU test에 사용할 쥐는 해부하기 1시간 전에 bromodeoxyuridine(BrdU)을 복강주사하였으며, 혈액은 복부 대정맥에서 채취하여 혈장을 분리하고, 대장을 잘라내어 길이로 절개하여 대장의 총 길이를 잰 후, proximal과 distal을 구분하여 종양의 수효와 그 위치를 측정하였다. 이때, 대장은 distal 부위의 조직을 1cm 정도 잘라서 거름종이에 잘 펴서 ethanol solution에 담구어 조직병리학적 검사와 cell proliferation을 측정하기 위하여 보관한 후, 스페출라를 이용해 대장의 mucosal layer을 조심스레 긁어서 상피조직을 분리해 내어 prostaglandin E_2(PGE$_2$), thromboxane B_2(TXB$_2$), 총지방산조성 분석을 위해 −70℃에 저장하였고, 대변은 실험이 끝나기 3 일전부터 수거하여 건조시킨 후, 분쇄하여 bile acid를 측정하기 위해 −70℃에 저장하였다.

Table 1. *Composition of experimental diet*

Ingredients	g/100g diet
Corn starch	53.5
Casein	22.0
L-methionine	0.3
Cellulose[1]	4.0
Fat or Oil	
Beef tallow	13.4
Corn oil	1.6
Mineral mix[2]	4.0
Vitamin mix[3]	1.0
Choline bitartrate	0.2

[1]Powdered cellulose PC-200(Pfizer Co)
[2]AIN 76 Mineral mixture: g/kg of mix: Calcium phosphate, dibasic 500; Sodium chloride 74; Potassium citrate, monohydrate 220; Potassium sulfate 52, Magnesium oxide 24, Manganous carbonate (43−48% Mn) 3.5, Ferric citrate(16−17% Fe) 6; Zinc carbonate (70% ZnO) 1.6; Cupric carbonate(53−55% Cu) 0.3; Potassium iodate 0.01; Sodium selenite 0.01, Chromium potassium sulfate 0.55; Sucrose, finely powdered 118.03
[3]AIN 76 Vitamin Mixture: g/kg of mix Thiamin hydrochloride 0.6; Riboflavin 0.6; Pyridoxine hydrochloride 0.7; Nicotinic acid 3.0; D-calcium pantothenate 1.6, Folic acid 0.2, D-biotin 0.02; Cyanocobalamine 0.001, Cholecalciferol(400,000IU/g) 0.25; Manaquinone 0.005, Ascorbic acid 0.2, Sucrose, finely powdered 992.824

1) 대장조직의 조직학적 검사

조직의 조직학적 소견을 보기위하여 distal의 끝 부분으로부터 1cm 떨어진 부위의 조직을 잘라 ethanol에서 탈수시킨 다음 section 하여 통상적인 eosin 염색한 후에 광학현미경으로 세포의 변화정도를 비교하였다.[12)]

3. 생화학적 분석

1) BrdU test

BrdU를 체중 1kg당 5mg씩이 되도록 PBS buffer에 녹여 복강주사한 대장의 distal 부분의 조직을 1cm 정도 잘라

이미 언급된 것과 같이 처리한 후 paraffin block을 만들고 조직을 4μm로 절편한 후 면역조직학적 방법[12]에 의해 BrdU가 DNA에 결합된 정도를 관찰하였다. 그리고 세포증식정도를 측정하는 방법으로 circumference, crypt length, crypt당 총 세포수, labeling index, proliferative zone, proliferative zone 내에서 labeling index를 측정하여 그 정도를 판단하였다.

2) 대장점막과 종양조직의 TXB_2와 PGE_2측정

대장과 종양 조직을 일정량 취해서 0.001% indomethacin이 함유된 0.05M Tris buffer(pH 8.0, 0.25M sucrose, 1mM EDTA)에서 homogenize하여 37℃ shaking water bath에 방치하였다가 ice cold ethanol과 citric acid (1M)를 사용하여 eicosanoid를 추출하였다.[13] 이 추출물을 C-18 solid phase extraction column에 loading한 후 methyl formate를 통과시켜 얻은 용액에서 TXB_2와 PGE_2를 각각[^{125}I]TXB_2 kit와 [^{125}I]PGE_2 kit(DuPont/NEN Research Product, Boston, MA)를 사용하여 radioimmunoassay 하였다. 그리고 다른 조직에서도 녹차의 효과가 있는지 알고자 허파조직에서도 같은 방법으로 TXB_2, PGE_2 함량을 분석하였다.

3) 대장점막과 종양조직 지질의 지방산조성

종양조직과 대장점막을 일정량 취하여 Bligh & Dyer의 방법[14]으로 지질을 추출하여 Morrison & Smith 방법[15]에 따라 methylation시킨 후 gas chromatograph(Hewlett Packard Model 5890 II)를 이용하여 분석하였다. 각 지방산의 retention time은 표준지방산과 비교하여 확인한 다음 각 지방산을 백분율로 표시하였다.

4) 변중의 bile acid 조성

Uchida et al.[16]의 방법을 이용하여 변중 총 bile acid를 추출한 후 gas chromatograph로 bile acid의 조성을 검증하였으며, 각 bile acid를 합하여 total bile acid의 함량으로 하였다.

4. 통계처리

결과처리는 SAS 통계 program(SAS institute, 1989)을 이용하였으며, 결과는 mean과 standard error(SE, 표준오차)로 표시하였고 평균간의 유의성은 t-test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 비교하였다.

결 과

DMH로 대장암을 유발시킨 후 지방을 15%(w/w) 함유된 실험식이를 공급하여 대장에 종양이 더욱 발생되도록 조건을 갖추어주고, 녹차를 음료수로 공급하였으며, 대장암의 biomarker를 이용하여 그 효과를 관찰하였다.

1. 식이 섭취량과 체중 증가량

식이 섭취량과 체중 증가량을 살펴보면 군간에 유의적인 차이가 없이 녹차에 의해서 영향을 받지 않았다.

2. 대장의 종양 발생률

Table 2에서 보는바와 같이 종양발생률은 대조군(56%)에 비해 녹차군(39%)에서 더 낮았으며, 대장의 총 종양수와 한마리당 평균 종양수도 녹차군에서 더 낮았다. Table 3에서 종양의 분포 상황을 살펴보면 종양은 대부분 대장의 distal 부위에서 발생되었으며, 종양의 크기(직경)도 7~9mm로 비교적 큰 종양의 수효가 녹차군에서 더 적었던 경향을 보였다.

3. 대장조직의 조직학적 관찰

대장점막을 이루는 crypt를 수평으로 section하여 circumference를 이루는 세포의 모양을 살펴보면, 정상적인 세포의 경우는 원형으로 잘 분획이 되어 다른 세포로 전이되지 않았으나 본 연구에서 관찰된 세포는 그 모양이 불규칙하게 길어져 타원에 가까우며 crypt 밖에서도 세포가 관찰되어 세포의 분획이 깨어지고 있음을 알 수 있었으며 암세포로 전이해 가고 있었다. Crypt를 수직으로 잘라서 crypt를 이루는 세포를 관찰하면 검게 염색된 세포를 관찰할 수 있는데 이는 labelled cell이라 하여 DNA 합성시 BrdU가 유입된 것을 나타내는 것으로서 crypt의 하단으로부터 중간 위쪽에서도 관찰되어져 세포증식이 활발히 일어나고 있

Table 2. Effect of green tea extract on colon tumor incidence in DMH-treated rats

Groups	Rats with tumors	Tumor incidence(%)	Total tumors	Avg tumors per rat
Control(18)	10	56	22	1.2
Green tea(18)	7	39	8	0.4

Tumor incidence was observed at the end of 20 weeks of experimental period ( ): number of rats

Table 3. Effect of green tea extract on tumor size and distribution of tumors in large intestine of DMH-treated rats

Groups	Tumor size(dia, mm)			Number of tumors in tumor-bearing rats					Site of tumors in large intestine	
	1-3	4-6	7-9	1	2	3	4	5	Proximal	Distal
Control	11	7	4	5	2	1	-	2	5	17
Green tea	4	3	1	6	1	-	-	-	1	7

Table 4. Effect of green tea extract on cell kinetic indices in colonic mucosa of DMH-treated rats

Groups	Circumference	Crypt length	Total cells per crypt	Labeling index	Proliferative zone	LIPZ
	No. of cells	No. of cells	No. of cells	%	%	%
Control	26.30 ± 0.71	40.53 ± 1.13	1270.31 ± 82.11	4.33 ± 0.36	31.89 ± 3.29	16.80 ± 2.25
Green tea	26.51 ± 0.96	35.90 ± 0.60*	951.24 ± 33.42*	3.62 ± 0.70	20.36 ± 3.87*	22.72 ± 3.54
P-value	< 0.0902	< 0.0258	< 0.0153	< 0.0910	< 0.0331	< 0.1487

Mean±SE, n = 5 * Significantly reduced at $p < 0.05$. Grypt length = total # of cells in each crypt.
Total cells per crypt = crypt length × 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

Table 5. Effect of green tea extract on the distribution of labeled cells in colon crypts of DMH-treated rats

Groups	Labeling index in each quarter			
	Q_1	Q_2	Q_3	Q_4
	%	%	%	%
Control	7.73 ± 1.20	10.21 ± 1.47	1.12 ± 0.74	0.21 ± 0.13
Green tea	8.84 ± 2.29	4.94 ± 1.64*	0.25 ± 0.25	0.00

Labeling index in each quarter of crypt was observed at 20 weeks
Means ± SE, n = 5. *Significantly reduced at $p < 0.05$

Table 6. Effect of green tea extract on eicosanoid level in colonic mucosa and lung tissue of DMH-treated rats

	Colonic mucosa		Lung tissue	
	TXB_2	PGE_2	TXB_2	PGE_2
	ng/mg tissue		ng/mg tissue	
Control	1.71 ± 0.09	3.13 ± 0.19	5.41 ± 0.13	2.42 ± 0.12
Green tea	1.00 ± 0.05*	1.37 ± 0.23*	3.39 ± 0.38*	1.74 ± 0.12*

Mucosal layers of 3 rats were pooled and treated with indomethacin solution before eicosanoid assay. Mean ± SE, n = 6 pooled samples
* Significantly reduced at $p < 0.0001$

음을 알 수 있었다.

세포증식의 Cell Kinetic Indices에 미치는 영향

1. Circumference

대장점막의 crypt를 평면으로 절단하여 본 circumference 세포 수는 녹차군과 대조군 사이에 유의적인 차이가 관찰되지 않았다(Table 4).

2. Crypt length

대장점막의 crypt를 수직으로 절단하여 crypt를 이루는 세포 수는 녹차군에서 유의하게 더 낮았으며, 이와 같이 crypt 길이가 더 짧았으므로 녹차에 의해서 세포증식이 더 적게 일어났음을 알 수 있었다.

3. Total cells per crypt

대장점막의 crypt당 총 세포 수는 circumference을 이루는 세포수와 crypt length를 이루는 세포 수를 곱하여 얻어지는 값으로 녹차군은 대조군과 유의적인 차이가 있었다.

4. Labeling index(LI)

Crypt 내의 labelled 된 세포 수를 crypt 총길이로 나눈 값으로 이 LI 수치가 높을수록 DNA 합성이 일어나는 세포가 증가함을 뜻하므로 본 연구에서는 유의적인 차이가 없이 녹차군에서 낮은 경향만을 보였다

5. Proliferative zone(PZ)

PZ 값이 높을수록 세포증식 범위가 증가되었음을 나타내는데, 녹차군에서 PZ 값이 유의적으로 낮아 녹차에 의해서 세포증식 범위가 더 증가되지 않았다.

6. Labeling index in proliferative zone

Proliferative zone 내에서 LI는 총 labelled 된 세포 수를 가장 높게 labelled 된 세포의 위치로 나눈 값으로 녹차군에서 더 높았다.

7. Labeling index in each quater

세포증식이 crypt의 어느 부위까지 진전되었는가를 관찰하기 위하여 대장의 crypt 전체를 4등분한 후, 밑 부분에서부터 Q_1, Q_2, Q_3, Q_4로 명명하여 각 부위에서 LI를 조사한 결과 대조군에서는 Q_4까지 세포증식이 일어나고 있었으나 녹차군에서는 세포증식이 Q_3 부위까지 진전되었으며, 대조군에 비하여 녹차군에서 각각의 부위에서 LI가 모두 낮은 경향을 보여주어 세포증식이 녹차로 인하여 억제되었을 가능성을 보였다(Table 5) 이와 같이 녹차에 의해서 crypt length, crypt당 총 세포수, proliferative zone에서 유의적으로 감소되어 세포증식을 억제하였다.

8. 대장점막과 종양조직 및 허파조직의 TXB_2와 PGE_2 함량

대장점막의 TXB_2와 PGE_2 함량은 녹차군에서 유의적으로 더 낮았으며(Table 6), 또한 종양을 떼어내고 주변의 정상적인 점막을 긁어 낸 조직을 비교하여 보면 정상조직에 비해 종양조직에서는 TXB_2와 PGE_2 함량이 2~3배 정도 더 높았다. 허파조직에서도 TXB_2, PGE_2 함량이 대조군에 비해 녹차군에서 유의하게 더 낮아 대장점막에서와 같은 양상을 보였다.

9. 대장점막과 종양조직의 지방산조성

대장점막의 지방산조성은 식이의 지방산조성을 잘 반영하여 본 연구에서도 같은 쇠기름을 첨가한 실험식이를 섭취하였기 때문에 군간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 대장점막의 지질을 구성하는 지방산중 2계열의 eicosanoid 합성과 가장 관계가 깊은 arachidonic acid 함량(%)만을 선택해서 비교해 보면(Table 7), 대조군과 녹차군 사이에는 유의한 차이가 없었다. 이와 같이 녹차에 의해서 대장점막의 지방산조성은 변화되지는 않았으나 일단 종양조직이 생성된 경우에는 정상조직에 비해 종양조직의 AA 함량(%)이 4배 정도 더 높았다.

10. 변으로 배설된 bile acid 조성

하루동안 배설된 변에 함유된 bile acid의 총함량은 녹차군에서 유의하게 더 높았으나 1차와 2차 bile acid 함량에는 유의적인 차이가 없었다(Table 8).

Table 7. Comparison of arachidonic acid and eicosanoid levels between normal mucosa and tumor tissue in DMH-treated rats

	Arachidonic acid(%)	TXB_2(ng/mg)	PGE_2(ng/mg)
Control(6)	5 14 ± 2.95	1.71 ± 0.09	3.13 ± 0.19
Green tea(6)	4.18 ± 0.53	1.00 ± 0.05*	1.37 ± 0.23*
Normal mucosa(12)	5.48 ± 0.54	1.44 ± 0.10	2.48 ± 0.17
Tumor(6)	20.24 ± 1.43§	3.08 ± 0.61§	7.57 ± 1.12§

Mean ± SE( ) : number of pooled sample
Mucosal layers of 3 rats were pooled and treated with indomethacin solution before eicosanoid assay
*. Significantly reduced at $p < 0.0001$ by green tea extract
§. Significantly increased at $p < 0.0001$ in tumor tissue

고 찰

1. 대장암 발생률에 미치는 영향

본 연구에서 종양은 로 대장의 distal 부분에서 발생되었으며, 녹차를 공급한 군이 종양 발생률이 낮았다. 본 연구에서 사용된 지방의 수준이 비교적 고지방식이므로(총열량의 30%수준) 이미 보고된 결과[8]와 일치되게 대장의 아래 부분에서 종양이 더욱 발생하였다고 사려된다. 화학적 발암원인 azoxymethane이나 N-methyl-N-nitrosourea을 이용하여 대장암을 유발시킨 쥐에게 녹차의 추출물이나 polyphenol 성분을 투여한 결과, 대장암 발생률이 대조군에 비하여 유의적으로 낮았다는 보고[17][18]와 같은 결과를 얻었다.

DMH는 간에서 microsomal monooxygenase에 의해 활성화되어 methylazoxymethanol로 전환되어 혈액을 통해 대장으로 운반되어 암을 유발하게 된다.[19][20] Wang et al.[21]에 의하면 녹차의 추출물이나 polyphenol 성분은 쥐 간세포의 microsomal monooxygenase 활성을 억제하여 DNA와 발암원의 결합을 저해한다고 하였다.[10] 또한 녹차 추출물은 화학적 발암원으로 유발한 피부암에서 항산화작용에 의해서 세포간의 신호전달체계에 변화를 일으켜 암발

Table 8. Effect of green tea extract on fecal excretion of bile acid in DMH-treated rats

Groups	Dry feces	Cholic acid	Chenodeoxy -cholic acid	Deoxycholic acid	Lithocholic acid	Hyodeoxycholic acid	Total bile acids
	g/day	μg/day	μg/day	μg/day	μg/day	μg/day	mg/day
Control	2.36 ± 0.17	183.9 ± 40.6	86.2 ± 17.8	644.3 ± 74.0	123.7 ± 22.2	747 2 ± 120.8	1.79 ± 0.22
Green tea	2.34 ± 0.05	185.9 ± 29.0	82.6 ± 11.7	776.5 ± 110.3	186.6 ± 38.6	1255.1 ± 135.8*	2.49 ± 0.22*

Mean±SE. n = 9 pooled samples(Dry feces of two rats was pooled) *: Significant at $p < 0.05$

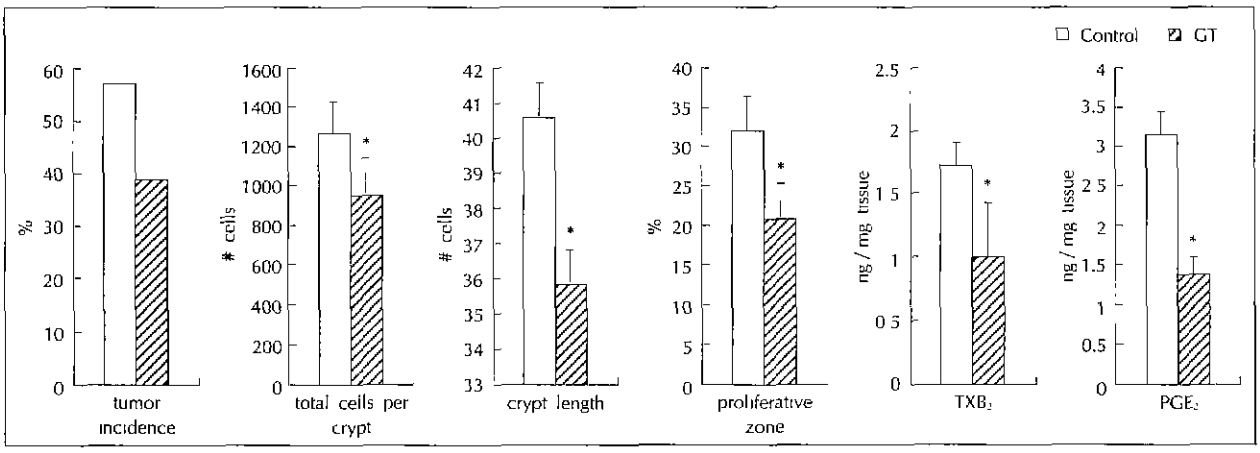

Fig. 1. Effect of green tea extract on colon carcinogenesis in DMH-treated rats * Significantly different at $p < 0.05$

생을 억제시키기도 하였으며,[17] 녹차추출물은 세포막에 promotor가 결합하는 것을 방해하며, protein kinase C의 활성 및 arachidonic acid 의 대사에 영향을 주어 촉진단계에서 암발생을 억제한다고 보고하였다.[3-7] 따라서 본 연구에서 녹차는 개시단계에서 monooxygenase의 효소활성을 억제시켜 DMH의 활성에 영향을 주어 유전자와 결합해 손상을 주는 것을 막아주었을 것이며, 촉진단계에서는 지방의 발암촉진작용을 억제하였을 것으로 사려된다.

2. 대장점막의 세포증식에 미치는 영향

대장점막을 이루는 crypt는 장관내에 그대로 노출되어 있어 대장을 통과하는 여러 물질들에 의해서 세포증식이 영향을 받게 되는데 그 중 식이인자가 미치는 영향이 매우 큰 것으로 알려져 있다. 역학조사와 동물실험에서 의하면 ascorbic acid와 같은 항산화제 등은 세포증식을 억제하였으며 식이지방은 장내에서 bile acid 농도를 증가시켜서 대장점막 표면에 직접 손상을 주거나 cyrpt 하단의 stem cell을 자극하여 세포증식을 촉진시켰다.[22-24]

본 연구에서 녹차를 섭취한 군은 crypt를 이루는 총세포수와 crypt size가 유의적으로 더 낮았으며 proliferation zone도 유의적으로 낮은 것을 관찰하였다. 또한 crypt를 4등분하여 세포의 증식정도가 어디까지 진전되었나를 관찰한 결과, 각 부위에서 모두 labeling index가 녹차군에서 더 낮은 경향을 보였다. 이미 보고된 바[25]에 의하면 과일과 야채에 있는 phenolic flavonoids를 공급한 군에서 대장점막의 세포증식을 억제하였다. 그러므로 본 연구에서 사용된 녹차에도 phenolic flavonoids 등이 있어 세포증식을 억제할 수 있었다고 사려된다. 그러므로 녹차는 지속적으로 장기간 섭취할 시에는 조직이 발암원에 노출될 때도 종양발생률을 감소시킬 수 있다고 사려된다.

3. 대장점막의 AA와 eicosanoid 함량에 미치는 영향

쥐에서 N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine로 대장암을 유발시킨 실험에서 정상조직에 비하여 종양조직에서 PGE_2와 TXB_2의 함량이 유의적으로 더 높았으며,[26] prostaglandin 합성을 저해하는 indomethacin으로 처리한 경우에는 종양발생률이 유의하게 감소하였고,[27] eicosanoids 합성에 관여하는 효소인 cyclooxygenase와 lipoxygenase의 활성을 억제시키는 식물성분을 투여한 경우에도 종양발생이 억제되었다.[28] 이와 같이 PGE_2, TXB_2 생성이 높을수록 암발생률이 증가하였으며, PGE_2 생성이 억제되면 암발생률이 억제되었으므로 eicosanoid 수준을 암발생의 주요한 biomarker로 간주하게 되었다.

세포내에서 PGE_2와 TXB_2의 합성은 세포막을 구성하는 인지질의 지방산조성, 특히 AA와 관련이 있으며 섭취한 식이의 지방산조성에 따라 세포막을 구성하는 지방산 조성에 영향을 미치게 된다. 그러나 본 연구에서는 지방급원으로 쇠기름을 동일하게 공급하였기 때문에 대장 점막의 지방산 조성에서 AA의 분포량은 유의한 차이를 보이지는 않았어도 녹차군에서 AA의 산화적 대사산물인 eicosanoids(PGE_2, TXB_2) 수준이 유의하게 감소되었다는 것은 녹차의 항산화작용이 AA로부터 eicosanoids가 생성될 때 관여하는 산화효소에 영향을 미쳤을 것이라고 사려되며, 점막의 지방산 조성만에 의해서 종양 발생이 결정되는 것은 아니라고 사려된다. 그러나 정상조직에 비해 종양조직에서 AA의 함량이 약 4배가 높았으며 PGE_2와 TXB_2 수준도 2~3 배정도 더 높았다(Table 7). 이와 같은 결과를 Fig 1에서 종합해 보면 녹차섭취에 의해서 대장점막에서 PGE_2와 TXB_2 합성이 억제되었고 세포증식이 억제되어 대장의 종양 발생률이 낮았으며, 또한 이미 종양이 발생된 조직에서는 AA함량이 증가되었고, 이로 인해 eicosanoid 생성도 높아 더욱 세포내 신호전달체계에 변화를 유발시켜 종양발생을 촉진시킨 것으로 사려된다.

참고로 다른 조직에서도 녹차의 영향을 받는지 알아보고자 폐조직에서 eicosanoid 함량을 측정한 결과 대장점막에서와 마찬가지로 녹차에 의해서 PGE_2와 TXB_2 수준이 유의하게 감소하였다. 조직에서 eicosanoids 함량을 암발생의 biomarker로 볼 때, 녹차는 폐에서도 항암작용을 가질 수 있을 것으로 사려되나 더욱 깊은 연구가 필요하다고 본다.

4. 변중의 bile acid 조성에 미치는 영향

대장의 암화과정에서 bile acids는 대장상피세포의 세포증식을 증가시켜 종양으로 발달시키는 것으로 보고되고 있는데 이러한 작용은 대장내에서 bacteria에 의해서 생성된 2차 bile acid(deoxycholic acid, lithocholic acid) 에 의해서 더욱 두드러진 것으로 알려졌다.[31-33] 역학조사에 따르면 고지방식이는 저지방식이보다 변으로 bile acid의 배설이 높았으며 이와 동시에 대장암 발생률도 더 높았다 [29,30] 본 연구에서 실험식이가 끝난 후 하루 동안 배설한 변을 수집하여 건조시킨 변량 중 1차와 2차 bile acids의 조성은 군간에 유의적인 차이가 없었으며 다만 total bile acids의 함량만이 대조군에 비하여 녹차군에서 높은 것으로 나타났는데 이것은 녹차의 성분이 bile acids와 결합하여 더 많이 배설되었으나 녹차는 대장내에서 박테아리아의 작용을 억제하여 2차 bile acid의 생성을 억제하였을 가능성이 있으며 대장의 상피세포에 손상을 주는 작용을 억제하였을 것으로 사려된다.

5. 결론 및 제언

쥐에게 녹차를 계속 공급하면서 발암물질에 노출시켰을 때 대장의 암화과정을 촉진하는 인자인 TXB_2와 PGE_2 합성이 대장에서 감소되었으며, 세포증식과 종양발생도 억제되었다. 녹차는 또한 폐조직에서도 eicosanoids 수준을 감소시켰다. 이와같이 녹차는 오래동안 항상 마시고 있는 동안에는 대장암 발생을 억제하는 효과를 가지고 있으므로 경제수준이 향상되면서 지방 섭취량이 높아짐에 따라 대장암의 발병률이 증가되고 극심한 환경오염과 흡연증가에 의해서 폐암 발생률도 증가되고 있는 현 시점에서 암발생을 예방하는 차원에서 녹차를 많이 마실 것을 권장한다.

■ 감사문

본 연구가 순조롭게 이루어지도록 연구비를 지원해준 한국학술진흥재단에 감사드리며, 녹차에 관한 연구를 할 수 있게 적극 지원해 준 태평양(주) 건강과학연구소장님께 감사드립니다

Literature cited

1) Yang CS, Wang ZY. Tea and cancer *J Natl Cancer Inst* 85(13). 1038-1049, 1993
2) Kono S, Shinchi K, Ikeda N, Yanai F, Imanishi K. Physical activity, dietary habits and adenomatous polyps of the sigmoid colon A study of self-defense officals in Japan *J Clin Epidemiol* 44(11)· 1235-1241, 1991
3) Huang MT, Ho CT, Wang ZY, Ferraro T, Tara FO, Lou YR, Mitchell JM, Laskin JD, Newmark H, Yang CS, Conney AH. Inhibitory effect of topical appliaction of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin. *Carcinogenesis* 13. 947-954, 1992
4) Fujita Y, Yamane T, Tanaka M, Kuwata K, Okuzumi, Takahashi T, Fujiki H, Okuda T Inhibitory Effect of (-)-epigallocatechin gallate on carcinogenesis with N-ethyl-N'- nitro-N-nitrosoguanidine in mouse duodenum. *Jpn J Cancer Res* 80(6)503-505, 1989
5) Wang ZY, Agarwal R, Khan WA, Mukhtar H. Protection against benzo[a] pyrene-and N-nitrosodiethylamine-induced lung and forestomach tumorigenesis in A/J mice by water extracts of green tea and licorice. *Carcinogenesis* 13· 1491-1494, 1992
6) Nishida H, Omori M, Fukutomi Y, Ninomiya M, Nishiwaki S, Suganuma M, Moriwaki H, Muto Y. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on spontaneous hepatoma in C3H/HeNCrj mice and human hepatoma-derived PLC/PRF/5 cells. *Jpn J Cancer Res* 85(3) 221-225, 1994
7) Stich HF. Tea and tea coponents as inhibitors of carcinogen formation in model systems and man. *Pre Med* 21. 377-384, 1992
8) Reddy BS. Dietary fat and its relationship to large bowel cancer. *Cancer Res* 41· 3700-3705, 1981
9) Chen CM, Chang Y, He W, Fu ZY. Current nutrition situation in China. The 7th Asian Congress of Nutrition *Abstract* 7-11, 1995
10) Hayatsu H, Inada N, Kakutani T, Arimoto S, Negishi T, Mori K, Okuda T, Sakata I. Suppression of Genotoxicity of Carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate *Pre Med* 21 370-376, 1992
11) Ruch RI, Cheng SJ, Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* 10(6) 1003-1008, 1989
12) Schutte B, Reynders MMJ, Bosman FT, Blijham GH. Studies with antibromo-deoxyuridine antibodies II. Simultaneous immunocytochemical detection of antigen expression and DNA synthesis by in vivo labeling of mouse intestinal mucosa. *J Histochem Cytochem* 35(3) 371-374, 1987
13) Hwang DH Radioimmunoassay for eicosanoids. In Prostaglandins Reserch and clinical update. *Alabama*, USA, 303-331, 1985
14) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37· 911-917, 1957
15) Morrison WR, Smith LM. Precipitation of fatty acid meyhylesters and dimethylacetals from lipids with boronfluoride methanol. *J Lipid Res* 5 600-608, 1964
16) Uchida K, Nomura Y, Kadiwaki M, Takeuchi N, Yamamura Y. Effect of dietary cholesterol on cholesterol and bile acid metabolism in rats. *Japan J Pharmacol* 27 193-204, 1977
17) Yamane T, Hagiwara N, Tateishi M, Akachi S, Kim M, Okuzumi J, Kitao Y, Inagake M, Kuwata K, Takahashi T Inhibition of azoxymethane induced colon carcinogenesis in rat by green tea polyphenol fraction. *Jpn J Cancer Res* 82(12) 1336-1339, 1991
18) Narisawa T, Fukaura Y. A very low dose of green tea polyphenols in drinking water prevents n-methyl-n-nitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats *Jpn J Cancer Res* 84(10)· 1007-1009, 1993
19) Reddy BS, Burill C, Rigotty J. Effect of diets high in ω3 and ω6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res* 51(1) 487-491, 1991
20) Fiala ES. Investigations in the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer* 36: 2407-2412, 1975
21) Wang ZY, Cheng SJ, Zhou ZC, Athar M, Khan WA, Bickers DR, Mukhtar H. Antimutagenic activity of green tea polyphenols *Mut Res* 223 273-285, 1989
22) Jacobs LR. Role of dietary factors in cell replication and colon cancer *Am J Clin Nutr* 48 775-779, 1988
23) DeRubertis FR, Craven PA, Saito R. Bile Salt Stimulation of colonic epithelial proliferation. *J Clin Inves Inc* 74 1614-1624, 1984
24) Lupton JR, Lee DYK, Cahpkin RS. Modulation of markers of colon carcinogenesis by dietary fiber and fat· I. Interactive effect of different types of fiber and fat on cell proliferation. *J Nutr* 123(9).675-688, 1993
25) Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark HL. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia *Carcinogenesis* 12(7) 1193-1196, 1991
26) Yamaguchi A, Ishida T, Nishimura G, Katoh M, Miyazaki I Investigation of colonic prostaglandins in carcinogenesis in the rat colon. *Dis Colon Rectum* 34 572-576, 1991
27) Narisawa T, Sato M, Tani M, Kudi T, Kakahashi T, Goto A. Inhibition of development of methylnitrosourea-induced rat colon tumors by indomethacin treatment. *Cancer Res* 41 1954-1957, 1981
28) Huang MT, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD, Conney AH Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res* 51(2) 813-819, 1991
29) Reddy B, Engle A, Kataifis S, Simi B, Bartram HP, Perrino P, Mahan C. Biochemical epidemiology of colon cancer Effects of type of dietary fiber on fecal mutagens, acid and neutral sterols in healthy subjects *Cancer Res* 49(8)· 4629-4935, 1989
30) Reddy BS, Maeura Y. Tumor promotion by dietary fat in azomethane-induced colon carcinogenesis in female F344 rats Influence of amount and source of dietary fat. *J Natl Cancer Inst* 72 745-750, 1984