

## 식이지방의 종류 및 d-Limonene 투여가 간 발암과정에 미치는 영향\*

이 미 숙 · 김 정희

서울여자대학교 자연과학대학 영양학과

### Effects of Different Dietary Oil and d-Limonene on Histopathological and Biochemical Changes in Experimental Hepatocarcinogenesis

Lee, Mi Sook · Kim, Jung-Hee

Department of Nutrition, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

#### ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effects of n-3, n-6 fatty acid and d-limonene on histopathological and biochemical changes in experimental rat hepatocarcinogenesis. To attain the above objectives, weanling Sprague-Dawley female rats were intraperitoneally injected twice with a dose of diethylnitrosamine(DEN, 50mg/kg body weight) and after 1 week 0.05% phenobarbital was provided with water. Sardine oil rich in n-3 fatty acids and corn oil rich in n-6 fatty acids were fed at 15% by weight and 5% d-limonene was added to the diet in each group. Ten weeks or 20 weeks after DEN treatment, rats were sacrificed. The formation of glutathione S-transferase placental form positive(GST-P<sup>+</sup>) foci was significantly decreased by the treatment of either sardine oil or d-limonene. HMG-CoA reductase activity was not affected by dietary oils and d-limonene. Protein kinase C (PKC) activity was decreased by either sardine oil or d-limonene. Particularly d-limonene decreased the membrane PKC activity. Membrane Cholesterol/Phospholipid(Chol/PL) ratio was significantly decreased by d-limonene in sardine oil group. The data showed that GST-P<sup>+</sup> foci number was positively correlated with membrane PKC activity and serum cholesterol and negatively correlated with liver cholesterol level. These results suggest informations about the correlation between histopathological and biochemical changes such as cholesterol metabolism and PKC activity in experimental hepatocarcinogenesis and thereby can elucidate the possible mechanism related to the cancer inhibition. (*Korean J Nutrition* 33(1) : 23~32, 2000)

KEY WORDS: N-3 fatty acid, N-6 fatty acid, d-limonene, hepatocarcinogenesis.

#### 서 론

식이의 영양성분중 암의 발생과 가장 밀접한 관련을 갖는 인자는 식이지방이며 특히, 고지방 식이나 n-6계 지방산의 과다 섭취는 여러 가지 암의 발생을 촉진시키는 주요인자로 생각되는데 n-6계 지방산은 암의 발생뿐 아니라 전이과정에서도 촉진 작용을 나타낸다고 한다.<sup>1)</sup> 반면에 어유에 많이 포함된 n-3계 지방산은 다른 불포화지방산과는 달리 발암 촉진효과가 없거나 오히려 발암을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>2,3)</sup> 일반적으로 n-3계 지방산의 발암 억제기전으로는 PGE<sub>2</sub> 생성감소와 같은 prostanoids의 합성변화나, 면역반응의 조절 변화, 세포막 유동성의 변화, 세포 신호전달 체계

의 변화 등으로 설명되고 있으나 정확한 기전은 밝혀지지 않았다.

현재도 이 분야에 대한 연구는 활발히 진행 중에 있으나 대부분의 연구들이 서양에서 발생빈도가 높은 유방암이나 대장암에서 많이 이루어졌고 우리나라에서 발생빈도가 높은 간암에서는 별로 연구가 많이 되어 있지 않다. 특히 우리나라에서의 암 발생 빈도는 식생활의 서구화와 더불어 지속적인 증가추세에 있으며 따라서 식이지방과 암의 관계를 밝히는 연구가 매우 필요한 실정이다.

한편, 본 연구자들의 선행연구에서 n-3 지방산을 함유하고 있는 정어리유를 쥐에게 공급하고 화학적 발암물질로 간암을 유발하였을 때 옥수수유를 공급한 경우와 비교하여 전암성 병변의 지표인 GST-P<sup>+</sup> foci의 크기가 감소되었으며, 이런 감소와 혈청 cholesterol 함량과 양의 상관관계가 있었다.<sup>4,5)</sup> 이와같은 연구 결과는 n-3지방산에 의한 콜레스테롤의 합성억제가 n-3지방산에 의한 발암억제의 기전일수도

채택일 : 1999년 12월 7일

\*This work was supported by GRANT No 961-0604-032-2 from the Korea Science and Engineering Foundation.

있다는 가능성을 시사하는 것으로 생각되며 이에대한 더 많은 연구가 필요하다고 본다.

오렌지 등 감귤류 껍질의 추출물 가운데 95% 이상을 차지하고 있는 d-limonene은 monoterpenoid의 일종으로 향수나 음식, 주스에서 레몬의 향과 맛을 내기 위한 첨가제로 다양하게 사용되고 있으며 최근 항암작용에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있는 매우 흥미로운 물질이다.

d-Limonene은 식물의 secretory gland에서 생성되는 monoterpenoid로써 동물세포의 cholesterol 합성과 비슷한 경로로 합성되며, HMG-CoA reductase의 비경쟁적 저해제로 체내에서 cholesterol의 합성을 억제하는 것으로 알려지고 있다.<sup>6)</sup> 뿐만아니라 식이로 섭취시에 독성효과가 적으며, 체내에서 대사되어 생긴 여러 대사산물들이 발암을 억제하는 작용이 있다고 한다.<sup>7)</sup>

서양에서는 d-limonene을 이용한 실험들이 상당히 전진되어 있으며 발암물질로 유도한 위와 폐의 발암과정<sup>8,9)</sup>이나 유방암의 발암과정<sup>10)</sup>에서 식이에 1%나 5%의 d-limonene투여시 종양의 생성이 저하되었고 10%의 d-limonene 공급시는 유방종양의 퇴화현상도 보고되었다.<sup>11)</sup>

암 발생기전을 밝히기 위한 연구는 매우 다각적으로 이루어지고 있는데 최근에는 PKC활성도와 암의 발생을 연관지어 설명하려는 시도가 활발하게 이루어지고 있다. PKC는 막 단백질 인산화에 관여하는 효소로 세포의 기능과 증식을 활성화하는 신호 변화에 매개체로 작용하여 세포의 성장 및 분화에 매우 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져있다. 따라서 세포의 분열이 활발하게 일어나는 암화과정에서 PKC의 활성도 변화는 중요한 의미를 갖는 것으로 생각되고 있다.

암 조직이나 세포에서의 PKC활성도를 연구한 논문들을 살펴보면 Hatada 등<sup>12)</sup>은 갑상선 암 조직에서 PKC활성도가 정상적인 갑상선 조직보다 현저히 증가한다고 보고하였고 Gorge 등<sup>13)</sup>은 유방암 환자의 종양조직에서 PKC의 활성도를 측정한 결과 Ca<sup>2+</sup>-dependent PKC의 활성은 증가되었고 Ca<sup>2+</sup>-independent PKC의 활성도는 변화가 없다고 하였다. 또한 Schwartz 등<sup>14)</sup>은 위암의 경우 PKC-β의 활성도가 특히 증가되며 Szaniawska 등<sup>15)</sup>은 암의 전이과정에서 PKC활성 억제제가 암세포의 전이를 막는다는 실험결과를 발표하기도 하였다. 그러나 Suga 등<sup>16)</sup>은 대장암 세포에서 PKC의 활성도는 낮게 나타났으며 암의 진행정도에 따라서 활성도의 감소가 더 현저하게 나타났다고 보고하였고 McGarrity 등<sup>17)</sup>의 연구에서도 대장암 조직의 총 PKC 및 세포막의 PKC 활성도는 정상보다 낮은 것으로 나타났다. 한편 La Porta 등<sup>18,19)</sup>은 간암 진행과정에서 Ca<sup>2+</sup>-de-

pendent PKC 분석하였는데 간을 부분 절제한 후의 30분 후부터 60일간 시간변화에 따라 PKC활성도를 측정한 결과 시간이 경과함에 따라 세포막과 핵의 PKC 활성도는 증가하는 대신에 cytosol의 PKC 활성도는 감소됨을 발견하였다.

이상의 연구결과를 종합해 볼 때 PKC활성의 촉진 또는 억제가 발암과정에서 세포의 성장 및 분화에 매우 중요한 역할을 하는 것은 사실이지만 암의 종류에 따라서 PKC의 활성도 변화가 다르게 나타나는 것으로 생각되며 이에 대해 Blobe 등<sup>20)</sup>은 PKC의 활성도가 낮아지는 대장암에서는 PKC가 발암을 억제하는 작용이 있고 PKC의 활성도가 증가하는 유방암에서는 PKC가 발암 촉진작용을 하는 것이라고 해석했다.

따라서 본 논문에서는 이상의 연구결과들을 바탕으로 우리나라에서 발병률이 비교적 높게 나타나고 있는 간암의 발생과정에 있어서 식이 지방산의 종류와 d-limonene의 섭취가 간암의 발생에 미치는 효과를 조사하고, 발암과정에서 나타나는 각종 생화학적 지표들의 변화에 미치는 영향을 조사함으로써 이들의 작용기전을 규명해 보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험설계 및 실험식이

실험군은 먼저 식이지방의 종류에 따라 정어리유(n-3 지방산)군과 옥수수유(n-6 지방산)군으로 나누고 각각의 식이지방군에서 d-limonene을 섭취하는 군과 섭취하지 않는 군으로 나눈 후 각 군을 다시 발암물질 투여여부에 따라서 나누어 총 8군으로 분류하였다.

간암의 유도를 위한 발암물질의 투여 및 사육은 장<sup>21)</sup>의 중기 간 발암모델을 약간 수정하여 체중이 50~60g 정도 되는 3주령의 Sprague-Dawley를 사용하였는데 숫쥐의 경우 d-limonene이 방광에 독성을 나타낸다는 보고<sup>22)</sup>가 있어 본 실험에서는 암쥐를 선택하였다. 발암 유도를 위한 개시물질로 실험 첫 주에 DEN을 20mg/ml 농도로 생리식염수에 녹여서 체중 kg당 50mg이 되도록 3일 간격으로 2회 복강투여하고, 촉진물질로는 DEN 투여 일주일 후부터 정제된 식수에 phenobarbital을 0.05% 농도로 섞어서 공급하였다(Fig. 1).

실험식이는 AIN-76A 식이의 조성<sup>23)</sup>을 참고로 본 연구의 특성상 식이지방의 효과를 명확히 관찰하기 위하여 탄수화물의 함량을 줄이고 지방은 총 중량의 15%가 되도록 상향 조절하고 d-limonene은 예비실험 결과를 참고하여 중량의 5% 수준으로 첨가하였다(Table 1).

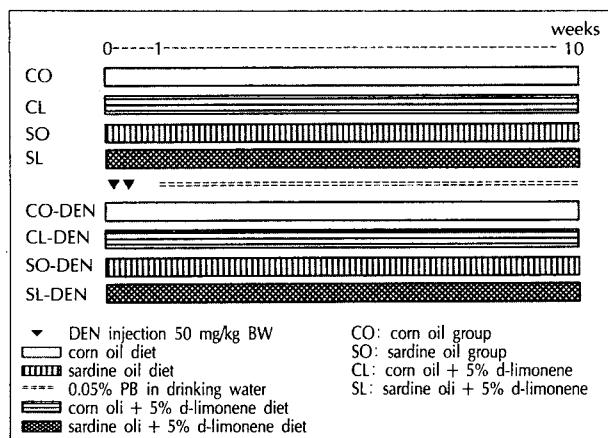


Fig. 1. Experimental design.

Table 1. Composition of basal diet

Ingredients	Amount(%)
Corn starch	55.2
Cellulose	5.0
Casein	20.0
DL-methionine	0.3
Corn oil or sardine oil	15.0
Salt mixture <sup>1</sup>	3.5
Vitamin mixture <sup>2</sup>	1.0
Vitamin E	0.015
Butylated hydroxytoluene	0.01

<sup>1</sup>AIN 76 mineral mixture

<sup>2</sup>Composition of vitamin mixture(Oriental Yeast, Japan), g/kg mixture: Vitamin A acetate(500,000IU/g) 1.0g, Vitamin D<sub>3</sub>(40,000,000IU/g) 2.5mg, Vitamin E acetate 5g, Vitamin K<sub>3</sub> 5.2g, Thiamin chloride 1.2g, Riboflavin 4.0g, Pyridoxine hydrochloride 0.8g, Vitamin B<sub>12</sub> 1.0mg, Ascorbic acid 30.0g, Inositol 6.0g, Choline chloride 200g, p-Aminobenzoic acid 5.0g, Niacin 6.0g, Calcium pantothenate 5.0g, Biotin 0.02g, Folic acid 0.2g, Cellulose finely powdered to make 1,000.0g

모든 식이는 1주일에 한번씩 제조하여 비닐 지퍼백에 넣어서 -40°C에서 보관하였다가 공급하였다.

## 2. 실험동물 희생 및 시료 수집

실험동물은 10주 사육한 후, 12시간 금식시키고 단두기를 사용하여 희생시켰다. 혈청은 경동맥으로부터 채취한 혈액을 원심분리하여 얻었으며, 분주 후 즉시 액체질소로 급속냉동 하여 -80°C에서 냉동 보관하였다가 분석하였다. 같은 혈액채취 후 절제하여 일부는 10% normal buffered formalin에 고정하여 조직학적 분석에 이용하였고, 나머지는 생화학적 분석을 위하여 세포내 소기관을 분리하였다.

간의 세포내 소기관은 Masmoudi 등<sup>24)</sup>의 방법에 따라 분리하였다. 먼저 일정량의 동일한 간엽을 buffer A(0.3M sucrose, 2mM EDTA, 10% glycerol, and 20mM He-

pes, pH 7.5)에 넣어 homogenizer(Wheaton)로 균질화시켜 일부는 분석용으로 냉동시키고 나머지는 고속 냉동 원심분리기(DuPont Sorvall, RC-28S)를 이용하여 각각의 subfraction으로 분리하였다.

간 균질액을 1,000g에서 15분간 원심분리하고 상층액만을 다시 100,000g에서 60분간 원심 분리후 상층액을 취하여 cytosol을 얻었고, 이때 pellet은 membrane fraction으로 명명하였다. 이중 일부는 buffer B(20mM Tris-HCl, 2mM EDTA, and 0.5% Triton X-100, pH 7.5)로 재현탁하여 분석실험을 위해 보관하고, 나머지는 다시 microsome을 분리하기 위해 buffer C(0.25M sucrose, 0.05M potassium phosphate, 75mM nicotinamide, 20mM β-mercaptoethanol, 2.5mM EDTA, pH 7.0)에 재현탁시켜 12,000g에서 20분간 원심분리 시킨 후 상층액만을 취해 다시 100,000g에서 60분간 원심 분리하여 바닥에 가라앉은 pellet을 buffer D(0.05M potassium phosphate, 20mM β-mercaptoethanol, 20mM EDTA, pH 7.2)에 재현탁시켰다. 모든 시료들은 액체 질소를 사용하여 급속 동결시킨 후 -80°C에 보관하였다가 분석시 꺼내어 사용하였다.

## 3. 면역조직학적 측정

면역조직학적 측정을 위하여 간 조직을 조직병리학의 일반적인 방법<sup>25)</sup>으로 파라핀 블록을 만든 후 미세절편을 만들어 면역염색을 실시하였다.

GST-P<sup>+</sup> foci는 일반적인 ABC법을 이용하여 면역조직학적인 염색을 실시하고, 영상분석장치로 측정하여 간 조직의 단위면적당 foci의 수와 면적으로 나타내었다. GST-P 항체(polyclonal Ab, MBL, Japan)는 1:200으로 희석하여 사용하였고, foci 수와 면적은 최대직경이 0.2mm 이상인 것만을 골라서 영상분석장치(VIDEOPLAN, Carl Zeiss, Germany)로 측정하여 단위면적당 수와 면적으로 계산하여 나타내었다.

Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)의 염색방법은 앞에서 설명한 GST-P<sup>+</sup> foci와 동일하고 일차항체만을 PCNA 항체(monoclonal Ab, Santa-cruz)로 바꾸어 사용하였다. 염색의 결과는 현미경으로 관찰하여 PCNA labelling index(LI)로 나타내었다.

## 4. 생화학적 분석

### 1) 혈청 및 간의 콜레스테롤 함량 측정

혈청 및 간의 콜레스테롤 함량은 Sale 등<sup>26)</sup>의 방법을 수정한 효소법을 이용하는 영동제약 kit시약(BC 108-E)을

사용하여 측정하였으며, 간의 콜레스테롤 함량은 먼저 간의 지질을 Bligh 와 Dyer<sup>27)</sup>의 방법을 이용하여 추출하고, 추출한 지질 중에서 콜레스테롤의 함량을 측정하였다.

## 2) 효소 활성도 측정

Microsomal HMG-CoA reductase 활성은 Hulcher와 Oleson<sup>28)</sup>의 방법으로 측정하였다. 반응시약으로 HMG-CoA, NADPH, 0.1M triethanolamine-0.02M EDTA buffer(pH 7.4)와 microsome을 넣고 반응시킨 후 원심분리로 단백질을 침전시키고 0.4M sodium arsenite를 넣어 dithiol-arsenite complex를 형성시켰다. 반응 종료후 3 mM DTNB 용액을 넣고 412nm에서 흡광도 변화를 측정하였으며 효소의 활성도는 monothiol-arsenite complex의 흡광계수 0.136을 이용하여 계산, 생성된 CoA-SH의 량으로 표시하였다.

Protein kinase C의 활성도는 Yasuda 등<sup>29)</sup>의 방법에 의하여 cytosol, membrane fraction에서 각각 측정하였다. PKC fraction에 reaction mixture(20mM Tris-HCl : pH 7.5, 5mM Magnesium acetate, 0.5μg/ml phosphatidylserine, 50ng/ml diolein, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 40μM MBP<sub>4-14</sub>, 10μM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP(3-6 × 10<sup>5</sup>cpm))를 반응시킨 후 원심분리하여 상층액을 P-81 paper에 묻힌 후 scintillation cocktail(BBOT 8g, Toluene 2L, Triton X-100 1L)에 넣어 liquid scintillation counter로 측정한다. PKC의 활성도는 표준조건하에서 1분 동안 ATP로부터 MBP<sub>4-14</sub>로 <sup>32</sup>P를 incorporation 시키는 효소의 양으로 계산하여 cpm/mg protein/min으로 나타내었다.

단백질 함량은 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry<sup>30)</sup>의 방법으로 측정하였다.

## 3) 세포막의 지질 함량 및 조성 측정

Membrane fraction의 지질은 Bligh와 Dyer<sup>27)</sup>의 방법을 이용하여 추출한 후 지질 조성 분석에 사용하였다. 콜레스테롤 함량은 Sale<sup>26)</sup>의 방법을 수정한 효소법(영동제약 cholesterol정량 kit)을 이용하여 측정하였다.

인지질 함량은 인지질중에 들어있는 phosphorus의 함량을 측정하는 Rouser 등<sup>31)</sup>의 방법으로 측정하였다.

막의 인지질 조성은 HPLC를 이용하는 Patton 등<sup>32)</sup>의 방법을 사용하여 측정하였다. 분리용 column으로는 Hiber II column(Merck, LiChrospher Si-100)을 사용하여 세포막에 다량 함유되어 있는 여섯 가지(phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, cardiolipin, phosphatidylinositol, phosphatidylglycerol, phosphatidylserine)로 분리하였으며 각 인지질의 함량은 자동 면적 적

분기에서 면적 %로 구하였다. 분리된 각 peak는 표준 인지질 용액의 retention time과 비교하여 확인하였다.

지방산 조성은 지질 추출액을 Metcalfe 등<sup>33)</sup>의 방법으로 먼저 transmethylation시킨 후 gas chromatography로 측정하였다. Column은 Innowax Capillary Column을 사용하였고 검출기는 Flame ionization detector를 사용하였다. 각 지방산의 함량은 자동 면적 적분기에서 면적 %로 구하였으며 분리된 각 peak는 표준 지방산 methyl ester의 retention time과 비교하여 확인하였다.

## 5. 통계처리

실험 결과의 통계 처리는 Statistical Analysis System (SAS) program을 이용하여 3-way analysis of variance(ANOVA) 및 Duncan's multiple range test에 의해 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 실험동물의 체중 및 간 무게

발암물질 투여나 식이지방의 종류 및 d-limonene 섭취가 체중 및 간 무게에 미치는 영향을 조사한 결과 발암물질 투여군과 d-limonene 섭취군에서 약간의 체중감소가 나타났으나 유의적인 수준은 아니었다(Table 2). 일반적으로 발암물질의 투여는 실험동물의 체중을 감소시키는 것으로 보고되고 있고, 예비실험의 결과 d-limonene의 첨가량이

**Table 2.** Effects of sardine oil and d-limonene on body weight and liver weight

Groups	Body weight(g)	Liver weight(g)	Liver weight/ Body weight(%)
CO	211.5 ± 22.5 <sup>ab</sup>	5.3 ± 0.43 <sup>e</sup>	2.52 ± 0.36 <sup>e</sup>
CD	224.0 ± 19.0 <sup>a</sup>	7.8 ± 1.0 <sup>d</sup>	3.51 ± 0.41 <sup>d</sup>
CL	199.7 ± 11.0 <sup>ab</sup>	7.2 ± 0.5 <sup>d</sup>	3.60 ± 0.10 <sup>d</sup>
CLD	192.7 ± 16.8 <sup>b</sup>	10.4 ± 1.4 <sup>b</sup>	5.39 ± 0.49 <sup>b</sup>
SO	186.6 ± 12.1 <sup>b</sup>	6.8 ± 0.9 <sup>d</sup>	3.86 ± 1.27 <sup>d</sup>
SD	221.0 ± 18.3 <sup>a</sup>	10.6 ± 1.3 <sup>b</sup>	4.84 ± 0.62 <sup>bc</sup>
SL	194.1 ± 9.3 <sup>b</sup>	8.9 ± 0.6 <sup>c</sup>	4.58 ± 0.44 <sup>c</sup>
SLD	210.6 ± 14.0 <sup>ab</sup>	13.9 ± 2.1 <sup>a</sup>	6.57 ± 0.74 <sup>a</sup>
Significant factor	D, L	O, D, L, O × D	O, D, L, D × L

CO = corn oil, CD = corn oil + DEN, CL = corn oil + d-limonene, CLD = corn oil + d-limonene+DEN, SO = sardine oil, SD = sardine oil + DEN, SL = sardine oil + d-limonene, SLD = sardine oil + d-limonene + DEN

1) Values are mean ± SD. Values with different alphabet within the column were significantly different at  $\alpha = 0.05$  by Duncan's multiple range test; n = 7 - 11

2) Statistical significance was calculated by 3-way ANOVA at  $\alpha = 0.05$  O = oil, D = DEN, L = limonene, O × D = oil × DEN, D × L = DEN × limonene

많은 경우 실험동물에게 거부감을 주어 섭취량이 감소하기 때문에 체중에 영향을 미칠수 있는 것으로 사료된다. 따라서 본 실험에서는 발암물질이나 d-limonene 섭취에 의한 식이 섭취량 감소현상에 따른 문제점을 배제하기 위하여 식이 섭취량은 pair-feeding에 의해 균간에 유의적인 차이가 없도록 조절하였다.

간의 무게나 상대적 간무게는 발암물질의 투여에 의해 현저히 증가하였고 d-limonene 섭취도 간의 무게를 증가시키는 것으로 나타났다(Table 2). 발암물질에 의한 간의 비대는 많은 선행연구<sup>34)</sup>와 일치하는 것으로 이러한 현상은 발암물질에 대한 신체의 방어작용으로 간에서 여러 가지 해독효소의 발현이 증가하기 때문이다. 또한 d-limonene에 의한 간무계의 증가도 d-limonene이 간의 효소를 증가시킬 가능성을 시사하는 것으로 생각되나 정확한 원인을 밝히기 위해선는 효소량의 측정 등 더 많은 연구가 필요하다고 본다.

## 2. GST-P<sup>+</sup> foci 생성

본 연구에서 정어리유의 섭취는 옥수수유 섭취에 비하여 전암성 병변의 지표인 GST-P<sup>+</sup> foci의 생성을 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이러한 결과는 본 연구실의 선행 연구<sup>5)</sup>외에 여러 연구결과와 일치한다. 즉 정어리유는 발암

과정에서 세포내 효소의 활성에 영향을 미침으로써 발암물질의 대사를 촉진하고 따라서 발암과정을 억제하는 것으로 생각된다. 또한 선행연구에서 조직학적인 변화를 관찰했을 때 간경변, 괴사, 중격염증, 이형성 세포, 지방변화, 호기성 병소, 호산성 병소 등 형태학적인 변화가 정어리유를 공급한 군이 옥수수유를 공급한 군에 비하여 적었으며 이러한 결과를 통해 정어리유 섭취시 발암물질에 의한 형태학적인 변화를 어느 정도 억제함으로써 옥수수유에 비하여 발암과정으로의 진행을 어느 정도 억제시킬 수 있다는 추측도 가능하다.

본 연구에서 d-limonene의 섭취는 GST-P<sup>+</sup> foci 형성을 억제하는 것으로 나타났으며 이는 d-limonene이 간의 발암과정을 억제할 수 있다는 것을 의미하는 것이다. 이러한 연구 결과는 유방암이나 피부암의 억제 효과를 보여준 다른 연구의 결과들과 일치하는 것으로 d-limonene이 여러종류의 암에서 모두 효과적으로 사용될 수 있는 가능성을 나타낸다. 서양에서는 d-limonene을 이용한 실험들이 상당히 전전되어 있으며 여러 종류의 발암물질로 유도한 위와 폐의 발암과정에서나 유방암의 발암과정에서 식이에 1%나 5%의 d-limonene투여시 종양의 생성 저하가 관찰되었다. 또한 10%의 d-limonene 공급시는 유방종양의 퇴화현상도 보고되었고 이러한 연구 결과들을 바탕으로 유방암 환자에게 limonene을 보조적인 치료제로 일부에서 사용하고 있다.

## 3. PCNA 표지지수

PCNA 표지지수는 정어리유 섭취와 d-limonene 섭취에 의해 감소되는 것으로 나타났으며 이같은 감소는 GST-P<sup>+</sup> foci의 발생과 밀접한 상관관계를 갖는 것으로 나타났다 (Table 3). PCNA는 DNA polymerase-δ의 보조단백으로서 활발하게 증식하는 세포에서 증가하며, 특히 S phase 동안 현저히 증가하는 것으로 알려져 있으며, 최근 apoptosis와 세포주기와의 관계 및 PCNA에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

본 연구의 결과는 정어리유과 d-limonene이 발암물질의 투여에 의해 활발하게 일어나는 세포분열 단계에서 세포분열을 어느정도 억제할 수 있음을 나타내고 있으며 이것이 정어리유와 d-limonene의 발암 억제작용을 설명할 수 있을 것으로 생각된다.

## 4. 혈청 및 간의 콜레스테롤 함량

혈청 콜레스테롤 함량은 식이지방의 종류와 d-limonene 섭취, 발암물질 투여에 의해서 달라지는 것으로 나타났다. 식이지방의 종류에 따라서는 정어리유군이 옥수수유군 보다 유의적으로 낮은 혈청 콜레스테롤을 나타내었으며,

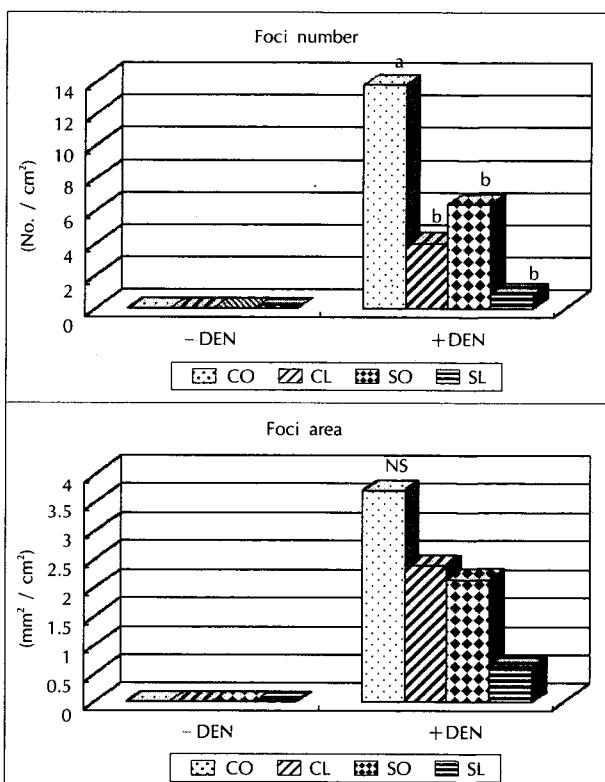


Fig. 2. Effects of sardine oil and d-limonene on GST-P<sup>+</sup> foci number and area.

**Table 3.** Effects of sardine oil and d-limonene on GST-P<sup>+</sup> foci number, area and PCNA labeling index

Groups	Foci number (No./cm <sup>2</sup> )	Foci area (mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )	PCNA labeling index (%)
CD	13.78 ± 10.00 <sup>a</sup>	3.70 ± 6.24 <sup>NS</sup>	1.93 ± 1.76 <sup>a</sup>
CLD	4.01 ± 4.00 <sup>b</sup>	2.40 ± 1.56	0.46 ± 0.52 <sup>b</sup>
SD	6.41 ± 3.99 <sup>b</sup>	2.16 ± 1.77	0.97 ± 0.83 <sup>ab</sup>
SLD	0.92 ± 1.09 <sup>b</sup>	0.64 ± 0.71	0.08 ± 0.11 <sup>b</sup>
Significant factor	O, L	NS	O, L

CD = corn oil + DEN, CLD = corn oil + d-limonene+DEN, SD = sardine oil + DEN, SLD = sardine oil + d-limonene + DEN

1) Values are mean ± SD. Values with different alphabet within the column were significantly different at  $\alpha = 0.05$  by Duncan's multiple range test: n = 7 - 11

2) Statistical significance was calculated by 3-way ANOVA at  $\alpha = 0.05$  O = oil, L = limonene, NS = not significant

d-limonene 섭취나 발암물질 투여시에도 혈청 콜레스테롤 함량이 유의적으로 증가하였다.

간의 콜레스테롤 함량은 혈청 콜레스테롤과는 반대로 정어리유군이 옥수수유군보다 유의적으로 높게 나타났고, 발암물질 투여에 의한 효과는 식이지방의 종류에 따라 달랐다. 즉 옥수수유군에서는 발암물질 투여시 간의 콜레스테롤 함량이 증가한 반면 정어리유군에서는 감소경향을 보여 주었다. 또한 d-limonene 투여효과도 옥수수유 섭취군에서는 d-limonene을 투여시 간의 콜레스테롤 함량이 유의적으로 증가되는데 비해 정어리유 섭취군에서는 감소되는 등 유지의 종류에 따라 상반된 결과를 보여주었다(Fig. 3).

### 5. HMG-CoA reductase 활성도

생체내에서 콜레스테롤 합성을 조절하는 HMG-CoA reductase의 활성도는 식이지방의 종류나 d-limonene의 섭취에 의해서 변화되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4). 식이지방의 종류에 따라서 정어리유는 옥수수유보다 혈청의 콜레스테롤을 감소시키는 효과가 있었음에도 불구하고 HMG-CoA reductase의 활성도는 변화하지 않았다. N-3 지방산의 콜레스테롤 감소효과는 많은 선행연구<sup>35,36</sup>에서 밝혀졌는데 본 연구의 결과를 통해 정어리유의 혈청 콜레스테롤 감소효과는 합성의 조절이 아닌 다른 기전을 통해 일어날 수 있음을 추측할 수 있다.

HMG-CoA reductase의 억제제로 알려진 d-limonene은 쥐에게 섭취시켰을 때 효소의 활성도를 유의적으로 변화시키지 못했다. 반면 d-limonene의 섭취는 혈중 콜레스테롤을 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 예비실험의 결과와 일치되는 것으로 d-limonene이 콜레스테롤의 배설을 억제하거나 지단백질의 대사를 변화시키는 것으로 추측된다.

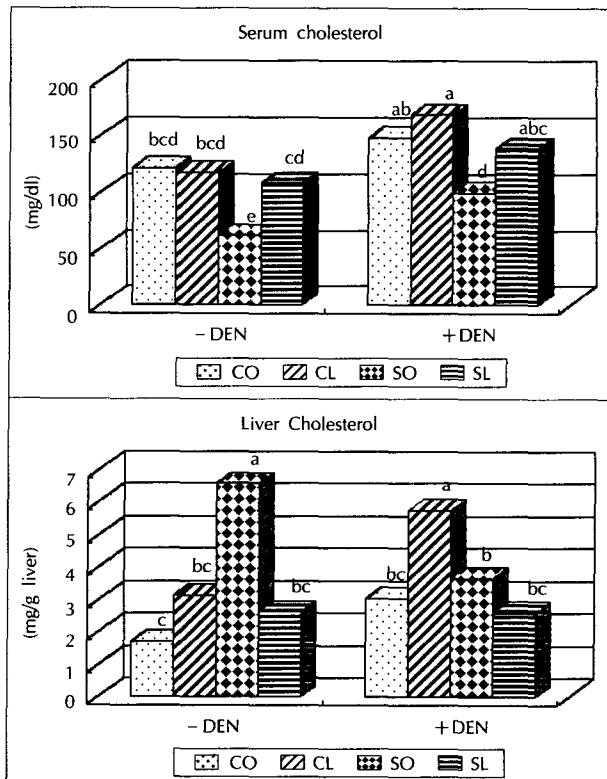


Fig. 3. Effects of sardine oil and d-limonene on serum and liver cholesterol levels.

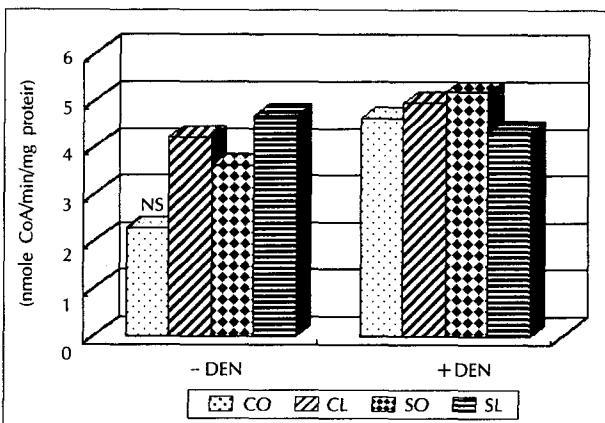


Fig. 4. Effects of sardine oil and d-limonene on microsomal HMG-CoA reductase activity.

### 6. Protein kinase C 활성도

Cytosol의 PKC 활성도는 식이지방이나 발암물질 투여에 따른 차이는 거의 없는 것으로 나타났으나 발암과정에서 중요한 작용을 하는 것으로 알려져있는 세포막의 PKC 활성도는 정어리유 섭취와 d-limonene 섭취시 유의적인 감소를 나타났다(Fig. 5). 이러한 연구 결과는 정어리유와 d-limonene의 발암억제가 PKC 활성도의 변화를 통해 이루어질 수 있다는 가능성을 나타내는 것이다.

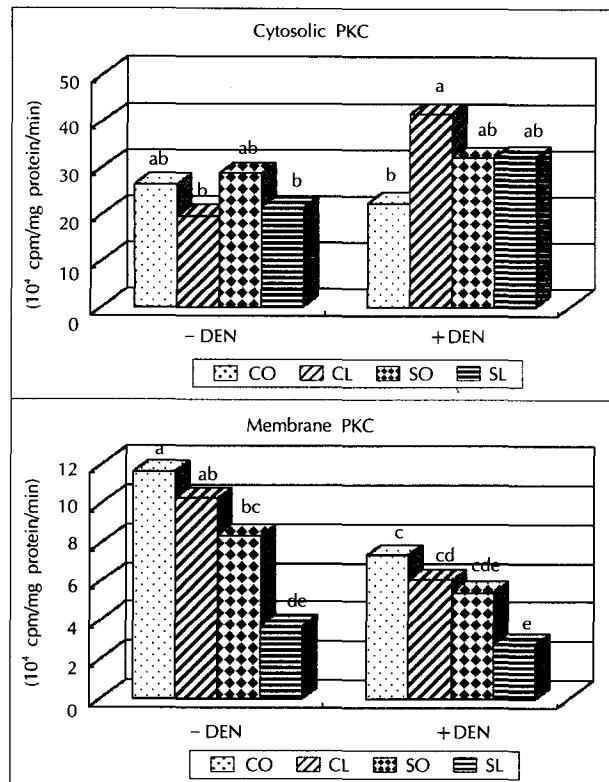


Fig. 5. Effects of sardine oil and d-limonene on hepatic cytosolic and membrane protein kinase C activity.

PKC 활성화와 관련된 발암촉진 기전을 살펴보면 세포가 외부의 발암물질이나 여러 가지 agonists 특히 phobol ester 등에 의해 자극되었을 때 세포막에서 phosphatidyl inositol이 분해되어 diacylglycerol(DAG)과 inositol-1, 4,5-triphosphate(IP<sub>3</sub>)가 생성된다. 이때 DAG는 PKC를 cytosol부분에서 membrane부분으로 이동시켜 phobol ester와 같은 발암물질의 수용체가 되게 하고 또한 IP<sub>3</sub>는 세포내 칼슘을 이동시켜 칼슘에 의해 활성화되는 PKC의 활성을 증가시켜 세포막의 단백질 인산화를 촉진하며 비정상적인 세포증식을 촉진하게 되는 것이다.<sup>37)</sup> 특히 phobol ester의 수용체인 PKC와 phobol ester와의 binding activity가 세포막의 인지질의 조성에 따라 바뀌므로 식이지방의 양이나 지방산의 종류에 따라 세포막의 인지질 조성이 변화되면 membrane-associated PKC의 활성이 변할 수 있을 것으로 기대된다.<sup>38)</sup>

그러나 본 연구의 모든 실험 결과가 일관성 있게 정어리유 섭취시에 막의 PKC 활성도가 감소된 것은 아니므로 이에 대한 더 많은 연구가 필요하며 또한 PKC의 활성도를 총 Ca<sup>++</sup>-dependent protein kinase C만을 측정할 것이 아니라 여러 종류의 isoforms을 종류별로 측정하여 암화 과정에서 나타나는 isoforms들의 변화를 조사하는 것이 필요

Table 4. Effects of sardine oil and d-limonene on hepatic membrane cholesterol and phospholipid contents

Groups	Total cholesterol (nmole/mg protein)	Phospholipid-Pi (nmole/mg protein)	C/PL-Pi (molar ratio)
CO	28.3 ± 3.1 <sup>ab</sup>	114.8 ± 11.9 <sup>bc</sup>	0.249 ± 0.031 <sup>b</sup>
CD	25.1 ± 3.1 <sup>bc</sup>	135.0 ± 14.3 <sup>a</sup>	0.188 ± 0.064 <sup>cd</sup>
CL	23.4 ± 3.3 <sup>cd</sup>	110.0 ± 29.5 <sup>bc</sup>	0.222 ± 0.045 <sup>bc</sup>
CLD	25.7 ± 3.0 <sup>bc</sup>	126.9 ± 17.9 <sup>ab</sup>	0.205 ± 0.031 <sup>cd</sup>
SO	30.2 ± 5.2 <sup>a</sup>	103.8 ± 13.3 <sup>c</sup>	0.293 ± 0.053 <sup>a</sup>
SD	24.4 ± 4.5 <sup>bcd</sup>	129.2 ± 13.5 <sup>ab</sup>	0.190 ± 0.034 <sup>cd</sup>
SL	20.4 ± 4.0 <sup>d</sup>	118.0 ± 17.5 <sup>bc</sup>	0.175 ± 0.038 <sup>d</sup>
SLD	21.7 ± 2.2 <sup>cd</sup>	123.2 ± 14.1 <sup>ab</sup>	0.178 ± 0.024 <sup>d</sup>

Significant factor L, O × L, D, L, O × L, D × L

CO = corn oil, CD = corn oil + DEN, CL = corn oil + d-limonene, CLD = corn oil + d-limonene + DEN, SO = sardine oil, SD = sardine oil + DEN, SL = sardine oil + d-limonene, SLD = sardine oil + d-limonene+DEN

1) Values are mean ± SD. Values with different alphabet within the column were significantly different at  $\alpha = 0.05$  by Duncan's multiple range test

2) Statistical significance was calculated by 3-way ANOVA at  $\alpha = 0.05$  O = oil, D = DEN, L = limonene, O × L = oil × limonene, D × L = DEN × limonene

요하다고 하겠다.

## 7. 세포막에서 콜레스테롤 및 인지질 함량

세포막에서의 콜레스테롤 함량은 정어리유 섭취시 약간 증가하는 경향이 있었으나 d-limonene을 섭취한 경우 정어리유의 이러한 효과는 나타나지 않았다. 발암물질 투여에 따라서는 유의적인 차이를 보이지 않았고 d-limonene 섭취에 의해서는 모든 식이 지방군에서 막의 콜레스테롤 함량이 감소하였다(Table 4). 세포막의 인지질 함량은 식이지방의 종류나 d-limonene의 섭취 여부에 따른 차이는 없었으나, 발암물질 투여시 유의적으로 증가하였다. 막 유동성의 지표인 Chol/PL 몰 비를 계산한 결과 식이지방의 종류에 따른 차이가 나타나지 않았다. 발암물질 투여시에는 감소가 관찰되었다. 한편 d-limonene 섭취는 식이지방의 종류에 따라 다른 결과를 나타냈는데 정어리유군에서만 Chol/PL 몰 비가 유의적으로 감소되는 효과가 관찰되었다.

## 8. 세포막에서 인지질 및 지방산 조성

세포막의 인지질 조성은 phosphatidyl inositol(PI) % 함량이 옥수수유군에서 정어리유군보다 높은 것으로 나타났고 발암물질이나 d-limonene의 투여효과는 발견되지 않았다. 한편 cardiolipin(CL) % 함량은 옥수수유군에서 높게 나타났다. 그외에 다른 인지질과 phosphatidyl ethanolamine/phosphatidyl choline(PE/PC) ratio는 식이지방이나 d-limonene, 발암물질의 투여에 의한 유의적인

효과가 관찰되지 않았다(Table 5). 세포막의 지방산 조성은 식이지방의 종류에 따른 차이가 매우 뚜렷하게 나타나 정어리유군에서는 n-3 지방산의 함량이 높게 나타났고 옥수수유군에서는 n-6 지방산의 함량이 유의적으로 높았다. 따라서 n-6/n-3 ratio를 계산해 보았을 때 옥수수유 섭취에 의해 유의적으로 증가하는 결과를 나타내었다.

지방산의 포화정도를 계산한 결과는 단일불포화지방산(MUFA)의 경우 정어리유군에서 유의적으로 높은 함량을 나타냈고 고도불포화지방산(PUFA)의 경우 옥수수유군에서 함량이 더 높은 것으로 나타났다. 포화지방산(SFA)의 함량과 불포화/포화비율(UFA/SFA)은 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 그 외에 발암물질 투여나 d-limonene의 섭취는 세포막의 지방산 조성에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Table 6).

### 9. 생화학적 변화와 조직병리학적 변화의 상관관계

이상의 결과들로부터 생화학적 지수들과 조직병리학적

지표의 상관관계를 분석한 결과 체중에 대한 상대적인 간 무게는 간의 콜레스테롤과 양의 상관관계를 나타내었다. 또한 GST-P<sup>+</sup> foci의 개수와 면적은 GST의 활성도와 음의 상관관계를 나타내었고, 막분획의 PKC 활성도와는 양의 상관관계를 보여주었다(Table 7).

선행 연구<sup>5)</sup>에 의하면 발암물질 투여시 혈청 cholesterol과 GST-P<sup>+</sup> foci와 높은 양의 상관관계가 관찰되었고 간의 cholesterol 함량도 발암물질 투여시 증가되는 현상을 보여줌으로써 암화 과정이 진행됨에 따라 혈청과 간의 cholesterol이 모두 증가되었음을 관찰할 수 있었다. 특히 n-3계 지방산을 함유하고 있는 정어리유를 공급시 혈청 콜레스테롤을 감소시키나 발암물질 투여시 나타나는 반응은 옥수수유 섭취시와는 달랐다. 즉 발암물질 투여에 의해서 혈청이나 간의 콜레스테롤 농도가 옥수수유군에서는 유의적으로 증가하였으나 정어리유군에서 유의적으로 증가하지 않았다. 이런 결과를 통해 정어리유에 많이 함유된 n-3 지방산

**Table 5.** Effects of sardine oil and d-limonene on hepatic membrane phospholipid composition

Group	PE	PG	PI	PS	CL	PC	PE/PC
CO	33.7 ± 5.2 <sup>ab</sup>	10.2 ± 3.3 <sup>NS</sup>	6.6 ± 2.5 <sup>a</sup>	3.9 ± 1.2 <sup>NS</sup>	2.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	43.2 ± 5.3 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>a</sup>
CD	29.7 ± 2.2 <sup>bc</sup>	11.6 ± 2.2	4.2 ± 1.6 <sup>b</sup>	4.3 ± 2.5	1.8 ± 1.1 <sup>ab</sup>	48.5 ± 5.9 <sup>ab</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>b</sup>
CL	29.2 ± 1.6 <sup>c</sup>	10.5 ± 1.2	4.4 ± 1.2 <sup>b</sup>	3.8 ± 1.6	2.0 ± 0.3 <sup>ab</sup>	50.2 ± 2.4 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>b</sup>
CLD	29.8 ± 1.7 <sup>bc</sup>	11.6 ± 0.6	4.2 ± 0.8 <sup>b</sup>	4.1 ± 1.2	2.2 ± 0.7 <sup>ab</sup>	48.1 ± 2.7 <sup>ab</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>b</sup>
SO	33.1 ± 1.5 <sup>abc</sup>	10.5 ± 2.5	3.3 ± 1.4 <sup>b</sup>	3.8 ± 1.6	1.6 ± 0.3 <sup>b</sup>	47.8 ± 1.7 <sup>ab</sup>	0.7 ± 0.0 <sup>ab</sup>
SD	31.6 ± 3.2 <sup>abc</sup>	10.2 ± 1.8	3.3 ± 0.7 <sup>b</sup>	3.9 ± 1.4	1.6 ± 0.3 <sup>b</sup>	49.4 ± 2.5 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>b</sup>
SL	34.1 ± 2.2 <sup>a</sup>	10.3 ± 1.1	3.5 ± 1.1 <sup>b</sup>	2.3 ± 0.4	1.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	48.4 ± 2.0 <sup>ab</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>ab</sup>
SLD	32.0 ± 2.9 <sup>abc</sup>	11.4 ± 1.7	4.0 ± 0.9 <sup>b</sup>	3.2 ± 0.6	1.9 ± 0.5 <sup>ab</sup>	47.4 ± 4.1 <sup>ab</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>ab</sup>

CO = corn oil, CD = corn oil+DEN, CL = corn oil + d-limonene, CLD = corn oil + d-limonene + DEN, SO = sardine oil, SD = sardine oil + DEN, SL = sardine oil + d-limonene, SLD = sardine oil + d-limonene + DEN, PE = phosphatidyl ethanolamine, PG = phosphatidyl glycerol, PI = phosphatidyl inositol, PS = phosphatidyl serine, CL = cardiolipin, PC = phosphatidyl choline

1) Values are mean ± SD. Values with different alphabet within the column were significantly different at  $\alpha = 0.05$  by Duncan's multiple range test. NS = not significant; n = 5 - 11

2) Data are presented as % of total phospholipids

**Table 6.** Effects of sardine oil and d-limonene on hepatic membrane fatty acid composition

Fatty acid	CO	CD	CL	CLD	SO	SD	SL	SLD
SFA(%)	39.5 ± 4.9 <sup>NS</sup>	39.5 ± 4.9	37.7 ± 3.8	37.5 ± 1.9	37.7 ± 4.9	38.8 ± 1.9	38.1 ± 2.3	38.0 ± 2.4
MUFA(%)	7.3 ± 0.9 <sup>b</sup>	6.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	7.4 ± 2.0 <sup>b</sup>	7.8 ± 0.7 <sup>b</sup>	10.9 ± 3.2 <sup>a</sup>	10.0 ± 2.4 <sup>a</sup>	10.9 ± 2.1 <sup>a</sup>	10.0 ± 1.7 <sup>a</sup>
PUFA(%)	53.2 ± 4.3 <sup>abc</sup>	54.0 ± 5.2 <sup>ab</sup>	54.9 ± 5.5 <sup>a</sup>	54.7 ± 1.4 <sup>a</sup>	51.4 ± 3.4 <sup>c</sup>	51.2 ± 1.9 <sup>c</sup>	51.0 ± 3.4 <sup>c</sup>	51.2 ± 1.3 <sup>bc</sup>
UFA/SFA	1.5 ± 0.4 <sup>NS</sup>	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1
MCL	18.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	18.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	18.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	18.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	19.0 ± 0.1 <sup>a</sup>			
UI	2.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>a</sup>
$\Sigma$ n-6	41.9 ± 2.7 <sup>c</sup>	44.3 ± 4.6 <sup>ab</sup>	43.6 ± 3.5 <sup>b</sup>	45.4 ± 1.5 <sup>a</sup>	19.7 ± 1.4 <sup>d</sup>	18.9 ± 1.9 <sup>d</sup>	19.7 ± 2.0 <sup>d</sup>	20.3 ± 4.5 <sup>d</sup>
$\Sigma$ n-3	10.6 ± 6.0 <sup>b</sup>	8.7 ± 0.9 <sup>b</sup>	10.7 ± 2.1 <sup>b</sup>	8.6 ± 1.1 <sup>b</sup>	30.5 ± 3.2 <sup>a</sup>	31.2 ± 3.5 <sup>a</sup>	30.2 ± 3.0 <sup>a</sup>	30.4 ± 4.2 <sup>a</sup>
n-6/n-3	4.1 ± 1.1 <sup>b</sup>	5.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	4.2 ± 1.5 <sup>b</sup>	5.4 ± 1.3 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.6 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.7 ± 0.3 <sup>c</sup>

1) Expressed as % distribution of fatty acid methyl esters

2) Values are mean ± SD. Means with different superscripts within each row are significantly different at  $p < 0.05$ : n = 5 - 11

CO = corn oil, CD = corn oil+DEN, CL = corn oil + d-limonene, CLD = corn oil + d-limonene + DEN, SO = sardine oil, SD = sardine oil + DEN, SL = sardine oil + d-limonene, SLD = sardine oil + d-limonene + DEN, MCL = mean chain length, UI = unsaturation index,  $\Sigma$  n-6 = sum of n-6 fatty acids,  $\Sigma$  n-3 = sum of n-3 fatty acids, n-6/n-3 = n-6/n-3 fatty acids ratio

**Table 7.** Correlation coefficients between biochemical indices and histopathological changes

	LW/BW	G No.	G area	PCNA LI
S-Chol	-0.215	0.195	0.210	0.260
L-Chol	0.395**	-0.158	-0.150	-0.124
HMG-CoA	0.155	-0.024	-0.036	0.089
GST	0.773***	-0.464**	-0.392*	-0.488**
C-PKC	0.251	-0.145	-0.114	-0.069
M-PKC	-0.651***	0.353*	0.230	0.531**

\*p &lt; 0.05 \*\*p &lt; 0.01 \*\*\*p &lt; 0.001

LW/BW: Liver weight/Body weight

G No.: GST-P<sup>+</sup> foci numberG area: GST-P<sup>+</sup> foci area

S-Chol: serum cholesterol

L-Chol: liver cholesterol

GST: Glutathione S-transferase

C-PKC: cytosolic protein kinase C

M-PKC: membrane protein kinase C

PCNA LI: PCNA labeling index

의 효과가 콜레스테롤 대사와의 관련성을 가질 것으로 추측하였다.

또한 전암성 병소의 생성과 혈청이나 간의 콜레스테롤 함량과의 상관성을 조사했을 때에 혈청의 콜레스테롤 농도가 높을수록, 간의 콜레스테롤 농도가 낮을수록 전암성 병소가 더 많이 생길 수 있는 가능성성이 제기 되었다.

최근에도 콜레스테롤 대사와 암에 대한 연구들은 매우 활발하게 이루어지고 있는데 아직까지 확실한 관련성은 밝혀지고 있지 않다. 이제까지의 여러 연구결과들을 종합해보면 혈청 콜레스테롤 농도가 낮은 것과 암의 발생은 인과관계에 있다고는 생각할 수 없으며, 혈청 콜레스테롤 농도가 낮은 사람의 암 발생률이 높은 이유는 암으로 진단 받지 않은 상태에서 암에 의해 일어난 대사의 변화에 기인한 것이라는 설명이 유력하다. 또한 암 환자의 혈청 콜레스테롤 농도는 암을 효과적으로 치료하면 정상화될 수 있다는 연구결과<sup>39)</sup>는 이러한 결론을 뒷받침하는 것으로 생각할 수 있다. 그러나 본 연구에서 콜레스테롤대사와 전암성 병소의 발생은 명확한 상관관계가 나타나지 않았으며 따라서 이 분야에서도 더 많은 연구가 지속적으로 수행되어야겠다.

PKC의 활성도 변화와 전암성 병변의 상관관계 결과는 d-limonene 섭취에 의한 발암억제 효과가 막의 PKC활성도 변화를 통하여 나타날 가능성 제시했다. 이러한 막의 PKC활성도 변화는 d-limonene에 의한 막의 콜레스테롤 농도나 막의 Chol/PL 몰비의 변화 등 막의 지질조성의 변화에 기인하는 것으로 추측된다.

## 요약 및 결론

본 연구에서는 실험적으로 유도된 간의 발암과정에서 n-

3 지방산의 섭취와 d-limonene 투여가 전암성 병변 생성에 미치는 영향을 조사하고 아울러 이를 투여에 의한 콜레스테롤 합성 변화나 PKC 활성도 변화가 발암촉진이나 억제기전과 관련성이 있는지 알아보고자 하였다.

그 결과를 요약하면

첫째 전암성 병변의 지표인 GST-P<sup>+</sup> foci의 생성이 n-3 지방산의 급원인 정어리유 섭취시 n-6 지방산의 급원인 옥수수유 섭취시보다 유의적으로 감소하여 화학적 발암물질로 유도한 쥐의 간 암화 과정에서 정어리유가 발암억제 효과를 갖는 것으로 나타났다.

둘째 HMG-CoA reductase 억제제인 d-limonene 섭취 역시 GST-P<sup>+</sup> foci의 생성을 억제시키는 것으로 나타나 d-limonene이 유방암뿐 아니라 간암에서도 발암과정에 억제 효과가 있는 것으로 생각된다.

셋째 발암과정에 나타나는 여러 가지 생화학적 변화와 전암성 병변의 지표와의 상관관계를 조사한 결과 GST-P<sup>+</sup> foci 수와 세포막의 PKC 활성도가 일부 실험에서 양의 상관관계를 나타내어 발암 억제 효과가 PKC의 활성도 변화에 관련이 있을 것으로 생각된다. 또한 식이지방에 의한 발암 억제시에는 혈청 콜레스테롤의 감소가 나타났으나 d-limonene에 의한 발암 억제시 혈청 콜레스테롤은 오히려 증가되어 두가지 물질이 서로 다른 기전을 통해서 작용함을 추측할 수 있었다.

결론적으로 정어리유의 공급이나 d-limonene의 섭취는 화학적 발암물질로 유도된 쥐의 간 발암 과정에서 전암성 병소의 생성을 감소시켰다. 또한 이러한 발암 억제 효과는 정어리유나 d-limonene이 암화 과정에 일어나는 세포막의 지방 대사변화에 영향을 미쳐 막 유동성에 변화를 초래함으로써 막의 PKC 활성에 변화를 가져오기 때문으로 생각된다. 한편 콜레스테롤 대사 변화와 발암과의 관련성은 정어리유와 d-limonene의 경우 상반되게 나타나 본 연구에서는 명확하게 그 상관성을 찾기 어려웠으며 이 부분에 보다 많은 연구가 필요하다고 하겠다.

## Literature cited

- Palmer S, Baksh K. Diet, nutrition, and cancer: interim dietary guidelines. *JNCI* 70: 1151-1170, 1983
- Robinson DR, Xu LL, Tateno S, Guo M, Colvin RB. Suppression of autoimmune disease by dietary n-3 fatty acids. *J Lipid Res* 34: 1435-1444, 1993
- Rose DP, Rayburn H, Hatala MA, Connolly JM. Effects of dietary fish oil fatty acids and eicosanoids in metastasizing human breast cancer cells. *Nutr Cancer* 22: 131-141, 1994
- Lee HJ. Effects of sardine oil and vitamin E supplement on serum

- and hepatic lipid metabolism in carcinogen treated rats. The Graduate of Seoul Women's University, 1994
- 5) Yoon HJ. Effects of sardine oil feeding and vitamin E supplementation on histopathological and biochemical changes in experimental hepatocarcinogenesis. Graduate School, Seoul Women's University, 1994
  - 6) Clegg RJ, Middleton B, Bell GD, White DA. Inhibition of hepatic cholesterol synthesis and s-3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by Mono and Bicyclic monoterpenes administered in vivo. *Biochem Pharmacol* 29: 2115-2127, 1980
  - 7) Elson CE, Yu SG. The chemoprevention of cancer by mevalonate-derived constituents of fruits and vegetables. *J Nutr* 124: 607-614, 1994
  - 8) Wattenberg LW, Coccia JB. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butane carcinogenesis in mice by d-limonene and citrus fruit oils. *Carcinogenesis* 12: 115-117, 1991
  - 9) Kawamori T, Tanaka T, Hirose, Ohnishi M, Mori H. Inhibitory effects of d-limonene on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis* 17: 369-372, 1996
  - 10) Haag JD, Lindstrom MJ, Gould MN. Limonene-induced regression of mammary carcinomas. *Cancer Res* 52: 4021-4026, 1992
  - 11) Elegbede JA, Elson CE, Tanner MA, Qureishi A, Gould MN. Regression of rat primary mammary tumors following dietary d-limonene. *JNCI* 76: 323-325, 1986
  - 12) Hatada T, Sakanoue Y, Kusunoki M, Kobayashi A, Utsunomiya J. Protein kinase C activity in human thyroid carcinoma and adenoma. *Cancer* 70(12): 2918-2922, 1992
  - 13) Gorge PC, Hulme MJ, Clegg RA, Miller WR. Elevation of protein kinase A and protein kinase C activities in malignant as compared with normal human breast. *Eur J Cancer* 32A(12): 2120-2126, 1996
  - 14) Schwartz GK, Jiang J, Kelsen D, Albino AP. Protein Kinase C: a novel target for inhibiting gastric cancer cell invasion. *JNCI* 85(5): 402-407, 1993
  - 15) Szaniawska B, Gawrychowski K, Janik P. The effect of protein kinase C inhibitors on invasion of human ovary cancer cells. *Neoplasma* 45(1): 7-11, 1998
  - 16) Suga K, Sugimoto I, Ito H, Hashimoto E. Down-regulation of protein kinase C-alpha detected in human colorectal cancer. *Biochem Mol Biol Int* 44(3): 523-528, 1998
  - 17) McGarrity TJ, Peiffer LP. Protein kinase C activity as a potential marker for colorectal neoplasia. *Dig Dis Sci* 39(3): 458-463, 1994
  - 18) La Porta CAM, Perletti GP, Piccinini F, Comolli R. Analysis of calcium-dependent protein kinase C isoforms in the early stages of DEN induced rat hepatocarcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis* 8: 255-263, 1993
  - 19) La Porta CAM, Comolli R. Membrane and nuclear protein kinase C activation in the early stages of DEN induced rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 15: 1743-1747, 1994
  - 20) Blobel GC, Obeid LM, Hannun YA. Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* 13(3-4): 411-431, 1994
  - 21) Jang JJ, Lee YS, Lee MS, Kim TH. Development of GST-P<sup>+</sup> Foci in 3 Week Old Rats Induced by Diethylnitrosamine: Preliminary data for liver foci model. *Jurnal of Korean Cancer* 26: 23-235, 1994
  - 22) Hard GC, Whysner J. Risk assessment of d-limonene: an example of male rat-specific renal tumorigens. *Critical Rev Toxicol* 24: 231-254, 1994
  - 23) American Institute of Nutrition. Report of the AIN Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 107: 1340-1348, 1977
  - 24) Masmoudi A, Labourdette G, Mersel M, Huang FL, Huang QP. Protein kinase C located in rat liver nuclei. *J Biol Chem* 264: 1172-1179, 1989
  - 25) Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complexes(ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981
  - 26) Sale FD, Marchesini S, Fishman PH, Berra B. A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts. *Anal Biochem* 142: 347-350, 1984
  - 27) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917, 1959
  - 28) Hulcher FH, Oleson WH. Simplified spectrophotometric assay for microsomal 3-hydroxy-3-methyl CoA reductase by measurement of Coenzyme A. *J lipid Res* 14: 625-631, 1973
  - 29) Yasuda I, Kishimoto A, Tanaka S, Tominaga M, Sakurai A, Nishizuka Y. A synthetic Peptide Substrate for Selective Assay of Protein Kinase C. *BBRC* 166: 1220-1227, 1990
  - 30) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RT. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
  - 31) Rouser G, Fleischer S, Yamamoto A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipid and determination of phospholipid by phosphorus analysis of spots. *Lipid* 5: 494-496, 1969
  - 32) Patton GM, Fasulo JM, Robins SJ. Separation of phospholipids by high performance liquid chromatography. *J Lipid Res* 23: 190-196, 1982
  - 33) Metcalfe LD, Schmitz AA, Pelka JR. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 38514-515, 1966
  - 34) Lee MS, Kim JH. Effects of Different Dietary Oils on Hepatic Mitochondrial Lipid Composition, Adenine Nucleotide Translocase and ATPase Activities in Carcinogen Treated Rats. *Korean J Nutrition* 26 (5): 532-546, 1993
  - 35) Smit MJ, Verkade HJ, Havinga R, Vonk RJ, Scherphof GL, Veld GI, Kuipers F. Dietary fish oil potentiates bile acid-induced cholesterol secretion into bile in rats. *J Lipid Res* 35: 301-310, 1994
  - 36) Berr F, Goetz A, Schreiber E, Paumgartner G. Effect of dietary n-3 versus n-6 polyunsaturated fatty acids on hepatic excretion of cholesterol in the hamster. *J Lipid Res* 34: 1275-1284, 1993
  - 37) Russin WA, Hoesly JD, Elson CE, Tanner MA, Gould MN. Inhibition of mammary carcinogenesis by monoterpenoids. *Carcinogenesis* 10: 2161-2164, 1989
  - 38) Crowell PL, Chang RR, Ren Z, Elson CE, Gould MN. Selective inhibition of isoprenylation of 21-26-kDa proteins by the anticarcinogen d-limonene and its metabolites. *J Biol Chem* 266: 17679-17685, 1991
  - 39) Raghavan D, Cox K, Childs A, Grygiel J, Sullivan D. Hypercholesterolemia after chemotherapy for testis cancer. *J Clin Oncol* 10: 1386-1389, 1992