

## 정어리유 섭취와 비타민 E 보충이 실험적 간 발암과정의 병리조직학적 변화와 $\alpha$ -L-fucosidase의 활성도에 미치는 영향

김정희<sup>†</sup> · 윤혜진

서울여자대학교 영양학과

### Effects of Sardine Oil Feeding and Vitamin E Supplementation on Histopathological Changes and $\alpha$ -L-Fucosidase Activity in Experimental Hepatocarcinogenesis

Jung-Hee Kim<sup>†</sup> and Hye-Jin Yoon

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

#### Abstract

This study was done to investigate the effects of sardine oil feeding and vitamin E supplementation on the histopathological changes and  $\alpha$ -L-fucosidase activity in experimental hepatocarcinogenesis. Sprague-Dawley rats weighing 80~90 g were fed the diet containing either 15% corn oil (CO) or sardine oil (SO) with or without vitamin E supplements (dl- $\alpha$ -tocopherol acetate 800 IU/kg diet) for 8 weeks. After 2 weeks of feeding, the rats were given a single intraperitoneal injection of diethylnitrosamine (DEN, 200 mg/kg BW). From the fifth week, rats were given 0.02% acetylaminofluorene (AAF) in diet for 4 weeks. At the seventh week, 0.05% phenobarbital (PB) was incorporated into diet and this regimen was kept till the time of sacrifice. Histopathological changes in liver and hepatic glutathione S-transferase placental form positive (GST-P<sup>+</sup>) foci were examined by Hematoxylin & Eosin (H&E) staining and immunohistochemical method, respectively. Serum  $\alpha$ -L-fucosidase activity was determined. The livers from the carcinogen treated rats showed significantly increased formation of GST-P<sup>+</sup> foci at sacrifice points while the livers from the non-carcinogen treated groups showed almost no foci. Although GST-P<sup>+</sup> foci formation was not affected by dietary oil, it was increased unexpectedly by vitamin E supplementation. Histopathological changes were similar to patterns of GST-P<sup>+</sup> foci formation in almost all groups. Serum  $\alpha$ -L-fucosidase activities were increased by carcinogen treatment in all dietary groups.  $\alpha$ -L-fucosidase activities were positively correlated with GST-P<sup>+</sup> foci formation. These results suggest that excessive vitamin E supplementation can enhance hepatocarcinogenesis although the mechanisms involved are not clearly understood.

**Key words:** hepatocarcinogenesis, sardine oil, vitamin E, GST-P<sup>+</sup> foci,  $\alpha$ -L-fucosidase

#### 서 론

지방은 암 발생과 밀접한 연관을 가지고 있으며, 특히 고지방 식이는 각종 부위의 암 촉진에 기여하고 있어 지방 섭취량이 증가되면 암에 걸릴 수 있는 확률도 높아지는 것으로 알려져 왔다(1,2). 지방의 양 이외에 질도 중요한 요인으로서, 초기에는 포화지방산보다 불포화지방산이 암을 더 촉진시킨다고 알려졌고(3,4), 그후 불포화지방산 중에서도 지방산의 종류에 따라 암발생에 영향이 다른 것으로 알려졌다. 즉 n-6계 지방산인 옥수수유가 외인성 물질에 의한 암 유발능을 높여 종양 생성을 촉진한다는 많은 보고(5,6)가 있었던 것에 반해 n-3계 지방산을 많이 함유하고 있는 생선류를 주식으로 하고 있는 에스키모인들이나 어촌에 있는 일본인들에게서는 순환기계 질환이나 유방암, 대장암 등의 발생을 억제하는

효과가 있는 것으로 보고되었다(7,8).

n-3계 지방산을 많이 함유하고 있는 어유의 섭취와 암 유발과의 상관관계에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔으나 지금까지 대부분의 연구가 서양에서 발생빈도가 높은 유방암이나 대장암에서 많이 이루어졌고(8,9) 우리나라에서 발생빈도가 높은 간암에서는 별로 없었다. 특히 암은 발생부위나 종류에 따라 암화과정에 미치는 식이 지방의 효과가 다를 수 있으므로 간세포암에서의 n-3 지방산의 섭취 효과를 연구하는 것이 필요하다고 생각되었다.

실험적으로 간세포암 유도도 많이 사용되는 방법이 Salt와 Farber의 모델(10)이다. 이 모델은 2단계 발암과정에 바탕을 둔 중기발암 실험법을 이용한 것으로, 발암원으로 유도된 간세포를 선택적으로 성장시킬 수 있으며, 간 결절 및 간암을 짧은 기간에 유도할 수 있어, 발암과정을 경시적으로 관

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: jheekim@swu.ac.kr  
Phone: 82-2-970-5646, Fax: 82-2-970-5646

찰할 수 있는 간 세포암의 기본적인 모델이다(11).

실험적 간암의 경우 전암성 병변의 지표들에 대한 연구가 많이 진전되어서 GST-P<sup>+</sup> foci 함량을 측정하면 전암성 단계에서 암유발의 가능성을 예측할 수가 있으며, GST-P<sup>+</sup> foci 생성 정도에 따른 여러 가지 생화학적 변화를 추적할 수 있다. 특히 GST 중 태반형 GST-P는 정상적인 간조직에서는 나타나지 않으나, 간세포의 전암성 병변에서 현저하게 높게 발현되므로(12,13) anti-GST rabbit 항체를 사용하여 조직면역학적인 방법으로 검색할 수 있다. 따라서 GST-P<sup>+</sup> foci는 간암유발과 높은 상관관계를 가지므로 쥐의 간세포 암화과정에서 전암성 병변의 가장 유용한 지표로 사용되고 있다(14,15).

또한 혈청에서 간암을 조기에 screening 할 수 있는 방법으로  $\alpha$ -L-fucosidase의 활성도 측정이 있다.  $\alpha$ -L-fucosidase 활성도가 간세포성 암종에서 증가되는 사실이 알려지면서 혈청에서 이 효소의 활성도를 측정하여 간의 생검(biopsy) 없이도 조기에 간암을 진단할 수 있는 지표로 사용될 수 있는 가능성 등이 연구되고 있다(16,17).

한편, 어유는 eicosapentaenoic acid(EPA)나 docosahexaenoic acid(DHA) 등의 고도불포화지방산을 많이 포함하며, 이들은 구조상 이중결합이 많아 쉽게 산화되어 과산화물을 형성하므로 지질과산화 반응이 문제될 수 있다. 지질과산화물은 세포를 손상시키고 효소를 불활성화하여 체내 대사적 기능에 장애를 초래할 수 있으며(18,19), 발암과정에 영향을 미칠 수도 있다. 그러므로 비타민 E와 같은 항산화제가 발암과정에서 발암물질에 의하여 생성되어 암의 개시 및 촉진 역할을 하는 유리기를 제거하거나(20), 발암물질에 의한 생성물과 반응하여 암의 발생과 성장을 변화시킬 수도 있다. 따라서 어유 공급시 항산화제의 보충 유무는 발암과정에 다른 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 화학적 발암물질로 유도한 간의 발암모델에 정어리유 섭취가 미치는 영향을 보기 위하여 옥수수유군을 대조군으로 하여 간암의 전암성 병변의 지표로 사용되는 GST-P<sup>+</sup> foci 생성 정도를 측정하여 간조직의 손상 정도를 조사하였다. 또한 고도불포화지방산인 정어리유의 지질과산화반응이 문제될 수 있으므로 이런 지질과산화반응이 발암과정에 영향을 미칠 수 있는지를 알아보기 위하여 항산화제의 첨가유무에 따른 차이도 비교하였다. 아울러  $\alpha$ -L-fucosidase의 활성도를 측정하였고, 이 효소의 활성도 변화와 전암성 병소 생성과의 상관관계를 조사하여 암화과정에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물의 사육

Sprague-Dawley 종 숫쥐 80~90 g 된 것을 3일간 고형사료로 예비 사육한 뒤 실험식이로 각 군당 16마리씩 체중에 따른 난피법에 의하여 8군으로 나누어 사육하였다. 모든 실험동물

은 wire bottomed cage를 사용하여 사육했으며, 온도(20±2°C) 및 채광(07:00~19:00)을 일정하게 유지하였고 물은 자유롭게 섭취시켰다. 발암물질의 투여시 식이 섭취량 감소에 의한 차이를 방지하기 위해 발암물질 투여군의 섭취량에 맞추어 pair feeding을 실시하였다. 식이 섭취량은 매일 측정하였고, 체중은 일주일에 한번씩 측정하여, 실험동물의 상태를 관찰하면서 8주 동안 사육하였다.

### 실험식의 조성

실험식의 조성은 Table 1과 같다. 실험식은 식이 지방의 수준을 15%(w/w)로 하여 대조군은 n-6계 지방산의 주된 급원인 옥수수유(corn oil)를 사용하였고, 실험군에는 n-3계 지방산의 주된 급원인 정어리유(sardine oil)를 사용하였다. 이때 옥수수유는 100 g 당 17 mg의 tocopherol이 함유된 것이고, 정어리유는 tocopherol이 들어 있지 않은 것을 사용하였다.

식이 성분의 조성은 발암연구에 사용되는 Rao(21)의 실험 식이를 참고하여 AIN-76 diet(22)를 약간 수정하여 사용하였다. 각 군의 실험 식이는 유지를 제외한 모든 영양소의 함량을 동일하게 하였고, 발암촉진제와 vitamin E는 식이 제조시에 섞어서 공급하였다. 실험 식이는 지방의 산패를 방지하기 위하여 일주일 분량씩 새로 조제하여 비닐팩 속에 나누어서 -40°C 냉동실에 보관하였다가 매일 일정한 시간에 갈아주면서 섭취량을 조사하였다.

Table 1. Diet composition

Ingredient	Amount (%)
Corn starch	55.2
$\alpha$ -cellulose	5.0
Casein	20.0
DL-methionine	0.3
Oil <sup>1)</sup>	15.0
Salt mixture <sup>2)</sup>	3.5
Vitamin mixture <sup>3)</sup>	1.0
Vitamin E <sup>4)</sup>	0.015
Butylated hydroxytoluene	0.01

<sup>1)</sup>Corn oil or Sardine oil was used.

<sup>2)</sup>Composition of salt mixture (AIN 76), g/kg mixture : Calcium phosphate dibasic (CaHPO<sub>4</sub>) 500 g, Sodium chloride (NaCl) 74 g, Potassium sulfate (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 52 g, Potassium citrate monohydrate (K<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O) 220 g, Magnesium oxide (MgO) 24 g, Manganous carbonate (43~48% Mn) 3.5 g, Ferric citrate (16~17% Fe) 6.0 g, Zink carbonate (70% ZnO) 1.6 g, Cupric carbonate (53~55% Cu) 0.3 g, Potassium iodate (KIO<sub>3</sub>) 0.01 g, Chromium potassium sulfate [CrK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O] 0.55 g, Sodium selenite (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O) 0.01g, Sucrose finely powdered to make 1,000.0 g

<sup>3)</sup>Composition of vitamin mixture (オリエンタル 酵母), g/kg mixture : Vitamin A acetate (500,000 IU per g) 1.0 g, Vitamin D<sub>3</sub> (40,000,000 IU per g) 2.5mg, Vitamin E acetate 5 g, Vitamin K<sub>3</sub> 5.2 g, Thiamin chloride 1.2 g, Riboflavin 4.0 g, Pyridoxine hydrochloride 0.8 g, Vitamin B<sub>12</sub> 0.5 mg, Ascorbic acid 30.0 g, Inositol 6.0 g, Cholin chloride 200 g, p-Aminobenzoic acid 5.0 g, Niacin 6.0 g, Calcium pantothenate 5.0 g, Biotin 0.02 g, Folic acid 0.2 g, and cerelese powder to make 1,000.0 g

<sup>4)</sup>dl- $\alpha$ -tocopherol acetate

**실험설계**

실험설계는 Fig. 1에 나타내었다. 실험동물의 간암유도는 중기간의 간암 유발모델로 고안된 Salt와 Farber(10)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 발암물질 투여군은 실험 개시 2주 후에 개시제로 DEN을 생리식염수로 희석하여 체중(kg) 당 200 mg을 일회 복강내 주사하였고, 발암물질 비투여군은 주사에 의한 자극을 같게 하기 위하여 생리식염수를 같은 양 주사하였다. 4주부터는 발암 촉진제로서 0.02% 2-AAF을 4주간, 그리고 6주부터는 0.05% PB을 식이에 섞어 희생시까지 공급하였고, 발암물질 비투여군은 처음과 동일한 기본 식이를 계속 공급하였다.

Vitamin E 보충군은, 지질과산화물이 쉽게 생성되는 정어리유 사용과 발암물질 투여에 의한 자극들을 고려하여 과량인 800 IU의 dl- $\alpha$ -tocopherol acetate/kg diet를 식이에 섞어 공급하였다.

**시료의 수집**

실험 식이를 공급한 지 8주째에 실험 동물을 12시간 금식 시킨 후 단두로 희생시켜 시료를 수집하였다.

혈청의 분리는 단두 후 즉시 경동맥으로부터 혈액을 받아 상온에서 응고시킨 후 3000 rpm(Refrigerated high speed centrifuge, Dupont Sorvall RC-28S)에서 20분간 원심분리하여 상층액인 혈청을 분리하여 분석 실험에 사용하였다.

간은 단두 후 즉시 절제하여 차가운 생리식염수로 여러 번 씻은 후 여과지에서 여분의 수분을 제거한 뒤 중량을 측정하였고, 오른쪽 전엽과 후엽의 일부는 간의 GST-P<sup>+</sup> foci 측정과 Hematoxylin and Eosin(H&E) 염색에 이용하였다.

**GST-P<sup>+</sup> foci의 측정 방법**

Glutathione S-transferase 태반형 양성 증식성 병소를 면역조직화적인 염색법을 이용하여 확인하였다. 쥐를 희생시킨 즉시 간을 절제하여 면도날로 오른쪽 전엽과 후엽에서 1~2 mm 두께로 2조각씩 잘라 내어 ice-cold acetone으로 고정 한 후 파라핀에 포매(embedding)하여 슬라이드에 조직을 부착시켰다. GST-P 염색은 가토 GST-P 항체를 사용하여 통상적 ABC법(avidin-biotin-peroxidase complex, Vectastain ABC kit, Vector Lab., Burlingame, CA, USA)(23)을 이용하였다. GST-P<sup>+</sup> foci의 갯수, 면적 및 최대 직경은 직경 0.2 mm 이상인 것을 영상분석장치(Video-image processor, VIDAS, KONTRON, Germany)로 측정하여 대조군과 비교 검토하였고, 관찰시 cm<sup>2</sup>당 number, area (mm<sup>2</sup>)와 maximum diameter (mm)로 나타내었다.

**Hematoxylin and Eosin 염색 방법**

GST-P<sup>+</sup> foci의 측정과 같은 방법으로 간을 ice-cold acetone으로 고정하고 파라핀에 포매한 후 hematoxylin 용액과 감별 염색액인 eosin으로 염색하였다. 간경변(liver cirrhosis), 괴사(necrosis), 지방 변화(fatty change), 중격 섬유화(septal fibrosis), 이형성 세포(dysplastic cells), 중격 염증(septal inflammation), 투명세포 병소(clear cell foci), 호염기성 병소(basophilic foci), 호산성 병소(eosinophilic foci) 등을 광학현미경으로 측정하여 간세포의 병변이 전체의 1/3 이하인 경우 1점, 1/3~2/3일 경우 2점, 2/3 이상인 경우 3점의 점수를 주어 측정 쥐의 수로 나누어 나타내었다.

**혈청의  $\alpha$ -L-fucosidase 활성도 측정**

혈청의  $\alpha$ -L-fucosidase의 활성도는 Zielke 등(16)의 방법으로 측정하였다. 10  $\mu$ L 혈청에 0.1 M citrate-phosphate buffer, pH 5에 녹인 1 mM p-nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside를 50  $\mu$ L 가한 후 이 기질 혼합액을 37°C 항온수조에서 1시간 항온처리하였다. 이 반응은 3.5 mL의 반응종결액[15 mM glycine, 7.5 mM sodium chloride, 115 mM sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), pH 10.5]을 가함으로써 멈추어지며 이때 blank는 항온단계만 제외하고 같게 하였다. 생성된 p-nitrophenol의 흡광도는 UV-분광광도계(Kontron, Uvikon 930)를 사용하여 400 nm에서 읽었다. 효소의 활성도는 37°C에서 nanomoles p-nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside cleaved/mL serum/hour로 표시하였다.

**통계처리**

식이지방의 종류, vitamin E의 보충효과 및 발암물질 투여에 따른 효과와 이들간의 상호작용을 보기 위하여 실험결과를 3-way analysis of variance (ANOVA)로 분석하여  $\alpha$ =0.05 수준에서 유의성을 검증하였다. 또한 각 분석실험간의 상관관계를 분석하고 그 유의성을 검증하였다. 모든 결과 분석에는 statistical analysis system (SAS) program package를 사용하였다.

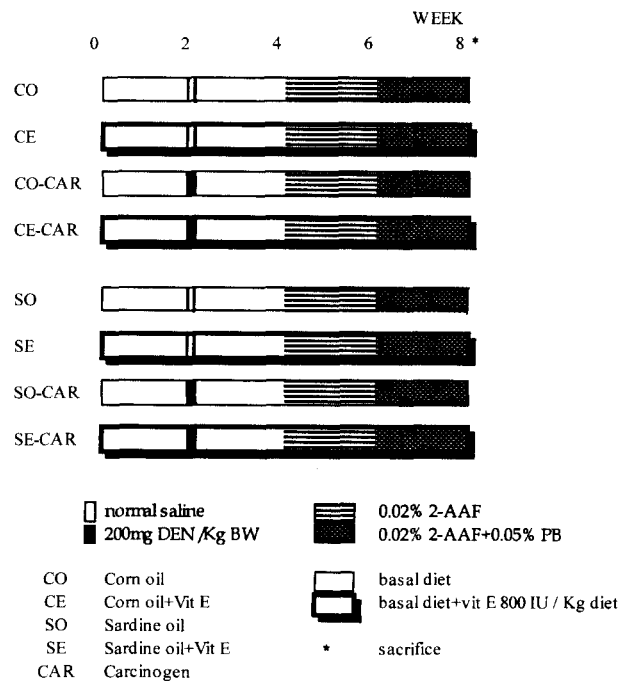


Fig. 1. Experimental design.

결과 및 고찰

실험동물의 체중, 간무게

발암물질 투여군의 체중은 발암물질 비투여군에 비해 유의성 있게 낮아졌다. 발암물질 투여시 식이섭취량의 감소로 체중이 덜 증가한다는 보고(24)에 따라 발암물질 투여군의 섭취량에 맞추어 pair feeding을 실시하였음에도 불구하고, 발암물질 투여군에서는 체중 증가폭이 발암물질 비투여군에 비하여 덜 증가됨을 볼 수 있었다. 간무게는 발암물질 투여군이 발암물질 비투여군에 비하여 증가되었으며 발암물질을 투여한 비타민 E 보충군에서는 더욱 증가되었다. 체중 당 간무게는 발암물질 투여군이 비투여군에 비하여 높았으며 정어리유군에서 증가되었다. 또한 비타민 E 보충과 발암물질 투여에 의한 교호작용으로 발암물질 투여군에서 증가됨이 비타민 E를 보충해 주었을 때 더욱 증가되었다(Table 2).

발암물질을 투여한 다른 연구에서와 마찬가지로 본 연구에서도 발암물질 투여군에서 간무게가 증가되었으며, 이러한 증가는 발암과정에서 간의 형태학적인 변화에서 기인하는 것으로 간에서 발암과정이 이루어졌음을 나타내는 것으로 간 세포암에서 글리코겐, 콜레스테롤, 중성지방 등이 세포에 축적되기 때문으로 추측되고 있다(25). 또한 어유를 장기 간 섭취시 체중이 감소했다는 보고(26,27)와 여러 가지 유지(쇠기름, 올리브유, 옥수수유, 들기름, 정어리유) 중에서 정어리유를 섭취한 흰쥐의 체중이 가장 낮았던 이전의 실험 결과(28)와 비교해 볼 때 정어리유의 감소 경향은 있었지만 유의적인 차이는 볼 수 없었다. 이것은 사람에게서 간암 발병시에는 간에서는 형태학적 및 기능적 변화가 상당히 진전되어 있으

나 체중 변화가 늦게 관찰되어 간암의 조기 진단이 어렵다는 것을 암시하는 결과라고 생각된다.

간세포의 병리조직학적 변화

**간 형태의 변화**: 실험 쥐를 희생시켜 간을 절제하면서 외형적인 간의 형태학적인 변화를 관찰한 결과, 육안으로 보았을 때 옥수수유군에 비해 정어리유군의 간이 훨씬 붉은 선홍색을 나타내었으며, 또한 대조군과 비교했을 때 발암물질 투여군의 간이 크고 형태학적인 변화를 보였다. 그러나 발암물질 투여군 중에서도 정어리유군에서는 형태학적인 변화가 있었으나 옥수수유군보다는 변화가 적었고 항산화제 투여에 의한 효과는 육안으로는 확인할 수 없었다. 정어리유군의 간이 붉은 색을 나타내는 것은 이전의 연구(28)에서도 관찰되었던 것으로, 정확한 이유는 알 수 없으나 cytochrome P450의 함량의 변화를 생각해 볼 수 있다.

**조직면역학적인 방법에 의한 GST-P<sup>+</sup> foci**: GST-P<sup>+</sup> foci는 대조군에서는 발현되지 않았고 발암물질 투여군에서만 염색되었다. GST-P<sup>+</sup> foci 갯수는 발암물질 투여군에서 유의적으로 증가하였고 유지의 종류에 따라서는 큰 차이를 보이지 않았으나 비타민 E 공급에 의하여 약간 높아지는 경향을 보였다. GST-P<sup>+</sup> foci 면적은 발암물질 투여군에서 증가되었으며 비타민 E 보충에 의하여 더욱 증가되었다. GST-P<sup>+</sup> foci 최대직경(maximum diameter)의 측정 결과는 GST-P<sup>+</sup> foci 면적과 유사한 경향을 보였다(Table 3). 따라서 본 연구에서 전반적인 GST-P<sup>+</sup> foci 형성은 발암물질 투여에 의하여 증가되었으며, 이러한 증가는 비타민 E 보충에 의해 더욱 커졌다. 그러나 유지의 종류에 따라서는 GST-P<sup>+</sup> foci 형성에 유의적

Table 2. Effects of sardine oil feeding and vitamin E supplementation on body weight (g), liver weight (g), liver weight per body weight (g/100 g BW)

Exptl groups	Body weight	Liver weight	Liver weight /Body weight
CO	285.8±14.3 <sup>1)</sup>	7.98±0.53	2.27±0.09
CO-CAR	224.7±12.2	10.51±0.93	4.63±0.19
CE	308.8±15.1	9.08±0.62	2.93±0.10
CE-CAR	257.7±15.3	14.68±1.59	5.60±0.39
SO	278.8±24.0	9.26±0.97	3.92±0.18
SO-CAR	261.2±21.0	13.38±0.80	5.17±0.22
SE	289.0±19.7	9.12±0.81	3.16±0.10
SE-CAR	248.5±17.1	14.84±0.81	6.02±0.28
Results of 3-way ANOVA			
Effects			
OIL	NS	NS	0.0050
CAR	0.0012	0.0001	0.0001
VITE	NS	0.0154	NS
OIL×CAR	NS	NS	NS
OIL×VITE	NS	NS	NS
CAR×VITE	NS	NS	0.0039
OIL×CAR×VITE	NS	NS	NS

<sup>1)</sup>Values are mean±SE.

Table 3. Effects of sardine oil feeding and vitamin E supplementation on GST-P<sup>+</sup> foci number (No./cm<sup>2</sup>), area (mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>) and maximum diameter (mm)

Exptl groups	GST-P <sup>+</sup> foci number	GST-P <sup>+</sup> foci area	GST-P <sup>+</sup> foci maximum diameter
CO	0.07±0.07 <sup>1)</sup>	0.01±0.01	0.05±0.05
CO-CAR	53.42±10.70	18.71±6.77	0.73±0.13
CE	0.08±0.08	0.05±0.05	0.10±0.10
CE-CAR	68.86±7.17	46.02±10.80	1.06±0.16
SO	0	0	0
SO-CAR	64.09±9.02	16.80±5.58	0.66±0.07
SE	0	0	0
SE-CAR	69.91±4.12	38.07±9.88	0.97±0.13
Results of 3-way ANOVA			
Effects			
OIL	NS	NS	NS
CAR	0.0001	0.0001	0.0001
VITE	NS	0.0053	0.0163
OIL×CAR	NS	NS	NS
OIL×VITE	NS	NS	NS
CAR×VITE	NS	0.0053	0.0380
OIL×CAR×VITE	NS	NS	NS

<sup>1)</sup>Values are mean±SE.

인 차이가 없었다. 그러나 이러한 연구가 12주까지 계속되었을 때 GST-P<sup>+</sup> foci 형성이 정어리유를 섭취한 군에서 옥수수유를 섭취한 군보다 유의적으로 감소하였다(29).

발암물질 투여에 의한 간의 발암과정에서는 single cell, mini foci, large foci로 병소의 크기가 발전되는데, Sato(30)의 보고와 비교해 볼 때, Solt와 Farber의 간암유도 모델을 변형시킨 본 연구의 분석시기인 8주는 large foci 단계 정도로 추정된다.

발암과정에서의 비타민 E보충에 대한 문헌을 조사하면, 일반적으로 비타민 E 보충은 암세포로의 변형과 성장을 억제하고, 종양발생을 저하시키며, 면역반응을 자극하여 종양생성을 예방하며, 화학적 발암물질로 유도된 발암과정을 억제한다고 보고되고 있다(31,32). McIntosh 등(33)은 쥐에게 과량의 비타민 E(1 g/kg diet)를 사용하여 실험하였을 때 과산화물에 의한 손상에 대하여 보호효과를 보고하였고, DEN 투여시 여러 화학 물질들에 대한 실험에서  $\alpha$ -tocopherol(1500 ppm diet)은 발암을 저해하는 효과가 있다고 보고되었다(34).

그러나 최근에는 비타민 E 보충시의 발암 촉진 효과에 대한 연구도 알려지고 있다. 즉 Kagerud 등(35)은 이식(transplant)한 쥐 종양에서  $\alpha$ -tocopherol(50 mg/kg BW) 보충시에 방사선조사(irradiation)에 의한 독성 효과를 증가시킨다고 보고하였다. 또한 Swick과 Baumann(36)은 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene(3'-Me-DAB)으로 유도한 쥐에게 1~1.6 mg  $\alpha$ -tocopherol/kg BW를 주었을 때, 그 공급시기가 발암물질을 반복 투여하는 동안에는 오히려 간 종양발생이 약간 증가하였으나, 발암물질을 투여한 이후에는 종양발생이 감소되었다고 보고하였다. Horvath와 Ip(37)은 1000 mg vitamin E/kg diet는 유방암의 증식시기에만 selenium의 항암작용을 도와준다고 했다. 즉 개시단계 이후나 촉진단계에 vitamin E를 공급해 줄 때 항암효과가 있다고 보고하였다. 특히 Ura 등(38)은 발암물질에 의한 병소 발생단계에서 비타민 E의 보충(0.36, 0.72, 1.5%)은 억제 효과를 보였으나, 발암물질 투여 후 병소 성장단계에서의 비타민 E 보충(0.18, 0.36, 0.72%)은 오히려 병소를 증가시키는 효과를 보였고, 발암물질 투여 후 비타민 E의 보충을 계속 하였을 때에는 중단하였을 때 보다 병소 형성이 증가되었다고 보고하였다. 그러므로 비타민 E의 보충시 양적인 문제 뿐만이 아니라 비타민 E의 보충 시기도 종양 발생에 관여하는 것으로 생각된다. 따라서 발암과정에서의 비타민 E의 투여량, 투여기간 및 장기간 과량복용시의 독성기작에 대한 지속적인 연구가 앞서야 암예방 목적으로 비타민 E의 복용을 권장할 수 있을 것이다.

**Hematoxylin and Eosin(H&E) 염색법에 의한 조직학적 변화**: H&E 염색법으로 간세포의 형태학적인 변화를 측정 한 결과 발암물질을 투여하고 비타민 E를 보충한 옥수수유군(CE-CAR에서 간경변(liver cirrhosis), 괴사(necrosis), 중격 염증(septal inflammation), 이형성 세포(dysplastic cells), 지방 변화(fatty change) 등이 가장 증가되었다(Table 4). 이

**Table 4. Histopathological finding in rats treated with sardine oil and vitamin E supplementation**

Exptl group	Finding									(n)
	L	N	F	SF	D	I	CF	BF	EF	
8th week										
CO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
CE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
SO	0	0.1	0	0	0	0.1	0	0	0	5
SE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
CO-CAR	0.9	0.9	1	0.4	0.1	1.7	0.3	0.1	0.1	7
CE-CAR	1.8	1.2	2.3	0.5	1.5	2.8	0.5	0	0.2	6
SO-CAR	0.4	0.6	0.6	0.6	0.4	1.8	0.6	0.4	0	5
SE-CAR	0.5	0.5	0.8	0.5	0	1.5	0.4	0.7	0	6

L: liver cirrhosis, N: necrosis, F: fatty change  
SF: septal fibrosis, D: dysplastic cells, I: septal inflammation  
CF: clear cell foci, BF: basophilic foci, EF: eosinophilic foci  
(n): number of animals

러한 결과는 육안으로 관찰한 형태 변화와도 일치하며 또한 GST-P<sup>+</sup> foci 면적과 최대면적이 CE-CAR군에서 가장 큰 것과 일치한다. 따라서 발암물질을 투여하고 비타민 E를 보충한 옥수수유군에서 발암과정이 가장 촉진된 것으로 보인다.

본 연구에서 발암물질을 투여한 옥수수유군에 비타민 E를 보충해 주었을 경우가 정어리유군에 비타민 E를 보충해 주었을 경우보다 발암과정이 더 촉진되는 것으로 보이는데 그 이유 중의 하나가 옥수수유 자체가 가지고 있는 tocopherol 함량을 생각할 수 있다. 본 연구에서 비타민 E 보충군에서는 모두 800 IU를 공급하였는데, 정어리유는 tocopherol이 따로 첨가되지 않은 상태의 유지를 사용하였다. 한편 옥수수유는 100 g 유지 당 17 mg의 tocopherol이 들어 있는 것을 사용하였으므로 실제 tocopherol 공급량은 식이 kg 당 옥수수유 공급군은 76 IU, 정어리유 공급군은 50 IU, 비타민 E 보충군은 이 값에 800 IU를 더한 양을 공급한 셈이다. 특히 Gonzalez 등(39)에 의하면 2% butylated hydroxytoluene(BHA)과 비타민 E를 보충해 준 어유에서 옥수수유보다 지질과산화물의 생성이 높았다는 보고가 있었다. 이와 같이 불포화지방산의 종류에 따라 항산화제 요구량도 달라질 수 있으나 본 연구에서는 같은 양의 비타민 E를 공급하였으므로 옥수수유군에는 실제로 필요량보다 더 과량의 tocopherol이 공급된 것에서 기인할 수도 있다.

William(40)은 쥐의 간조직을 발암원에 노출시켰을 때 형태학적인 변화가 발견되며 이들은 종양세포로 발전될 수 있다고 하였다. 또한 Chander 등(41)은 간세포에 지방이 축적되면 세포막의 구조적, 기능적 변형이 발생하여 세포가 파괴된다고 하였다.

정어리유군에는 8주간의 실험기간 동안에 간세포에 간경변, 괴사, 지방축적 등이 옥수수유군보다 적었다. 특히 같은 내용의 실험을 12주 동안 실시한 병리조직학적인 실험결과에 의하면 간 발암과정에서 GST-P<sup>+</sup> foci와 H&E 등의 전암성 병소의 생성 정도가 정어리유 섭취시 옥수수유군보다 유의성있게 저하되었다(29). 따라서 지방산의 종류에 따른 간

발암과정에서의 효과는 지방의 공급기간에도 영향을 미치는 것으로 사료된다. 그러나 지방산의 종류에 따른 발암과정에 미치는 효과에 대한 지식은 아직까지 정확하게 밝혀지지 않았다. 그러므로 암발생의 예방과 치료에 응용하기 위하여 이러한 지식에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

**혈청의  $\alpha$ -L-fucosidase 활성도 변화**

간세포성 암중 상태에서 증가되어 간의 생검 없이도 혈청에서 간단하게 측정하여 조기에 간암을 진단할 수 있는 새로운 지표(16,17)로 알려져 있는 혈청의  $\alpha$ -L-fucosidase 활성도는 발암물질의 투여에 의하여 증가되었다(Table 5). 그러나 유지의 종류나 비타민 E 보충에 의한 유의적인 효과는 나타나지 않았다.

발암물질 투여에 의하여 증가된  $\alpha$ -L-fucosidase 활성도는 체중 당 간무게나 GST-P<sup>+</sup> foci의 형성과 양의 상관관계를 나타내었다(Table 6). 이것은  $\alpha$ -L-fucosidase의 활성도가 간의 생검 없이도 혈청에서 간단하게 조기 세포암을 진단할 수 있는 조기 간 암화과정의 측정 지표로 사용할 수 있다는 것을 보여준 것이라고 생각된다.

**Table 5. Effects of sardine oil feeding and vitamin E supplementation on serum  $\alpha$ -L-fucosidase activities (nmole/mL/h)**

Exptl groups	$\alpha$ -L-fucosidase
CO	257.12 ± 47.44 <sup>1)</sup>
CO-CAR	629.40 ± 63.39
CE	330.40 ± 57.02
CE-CAR	573.03 ± 97.02
SO	373.83 ± 23.31
SO-CAR	688.19 ± 1.73
SE	339.95 ± 18.13
SE-CAR	747.67 ± 101.06

Results of 3-way ANOVA	
Effects	
OIL	NS
CAR	0.0001
VITE	NS
OIL × CAR	NS
OIL × VITE	NS
CAR × VITE	NS
OIL × CAR × VITE	NS

<sup>1)</sup>Values are mean ± SE.

**Table 6. Correlation between GST-P<sup>+</sup> formation and  $\alpha$ -L-fucosidase activity**

	LW/BW	G No.	G area	G Max.
G No.	0.946***			
G area	0.908**	0.906**		
G Max.	0.928***	0.977***	0.965***	
FUCO	0.938***	0.949***	0.789*	0.891**

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001  
 LW/BW : Liver weight/Body weight, G No. : GST-P<sup>+</sup> foci number,  
 G area : GST-P<sup>+</sup> foci area, G Max : GST-P<sup>+</sup> foci maximum diameter,  
 FUCO :  $\alpha$ -L-fucosidase

**요 약**

본 연구에서는 화학적 발암물질로 유도한 간 발암모델에 정어리유 섭취와 비타민 E의 보충이 미치는 영향을 보기 위하여, 옥수수유군을 대조군으로 하여 간암의 전암성 병변의 지표로 사용되는 GST-P<sup>+</sup> foci의 생성 정도와 혈청에서 조기세포암 진단의 지표로 사용되는  $\alpha$ -L-fucosidase 활성도를 분석하고, 이들의 상관관계를 조사하여 암화과정에 미치는 영향을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 체중은 발암물질 투여군에서 감소하였으나 비타민 E 보충과 정어리유 공급에 의한 차이는 없었다. 간무게는 발암물질 투여와 비타민 E 공급에 의하여 증가되었으며 지방의 종류에 따른 차이는 없었다. 체중에 대한 간 무게로 환산하였을 때는 발암물질 투여군에서 증가되었다. 간을 육안으로 보았을 때 정어리유군에서 붉은 선홍색을 띄었으며, 발암물질 투여군에서 간의 형태학적인 변화를 관찰할 수 있었으나 정어리유군에서 형태학적인 변화가 감소되었다. GST-P<sup>+</sup> foci 개수, 면적, 최대직경은 발암물질 투여군에서만 현저하게 증가하였고 유지의 종류에 따라서는 유의적인 차이가 없었다. 특히 GST-P<sup>+</sup> foci 면적이나 최대직경은 비타민 E 공급군에 의해서 증가하였다. H&E 염색 결과는 GST-P<sup>+</sup> foci와 유사한 경향을 보였으며, 비타민 E를 보충한 발암물질 투여군에서 증가되었다. 혈청에서의  $\alpha$ -L-fucosidase 활성도 변화는 발암물질 투여에 의해 증가되었다. 이상의 결과를 요약해 보면 본 연구에서는 유지의 종류에 따라서는 화학적 발암물질로 유도된 간 발암과정에 유의적인 차이는 없었다. 그러나 과량의 비타민 E 보충에 의해 전암성 병소의 형성은 오히려 증가되었으며 그 효과가 정어리유군에 비하여 옥수수군에서 더욱 현저하였다. 이것은 항산화제의 양이나 보충시기에 따라 항산화제가 발암과정에 미치는 효과가 다를 수 있음을 의미하며 이에 대한 보다 자세한 연구가 요구된다.

**감사의 글**

이 논문은 1999년도 서울여자대학교 교내 학술연구비(자연과학연구소)에 의하여 지원되었습니다.

**문 헌**

1. Erickson, K.L. and Hubbard, N.E. : Dietary fat and tumor metastasis. *Nutr. Rev.*, **48**, 6-14 (1990)
2. Freedman, L.S., Clifford, C. and Messina, M. : Analysis of dietary fat, calories, body weight, and the development of mammary tumors in rats and mice : a review. *Cancer Res.*, **50**, 5710-5719 (1990)
3. Chan, P.C., Ferguson, K.A. and Dao, T. : Effects of different dietary fats on mammary carcinogenesis. *Cancer Res.*, **43**, 1079-1083 (1983)
4. Glauert, H.P., Lay, L.T., Kennan, W.S. and Pitot, H.C. : Effect of dietary fat on the initiation of hepatocarcinogenesis by

- diethylnitrosamine or 2-acetyaminofluorene in rats. *Carcinogenesis*, **12**, 991-995 (1991)
5. Carroll, K.K. and Khor, H.T. : Effects of level and type of dietary fat on incidence of mammary tumors induced in female Sprague-Dawley rats by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Lipids*, **6**, 415-420 (1971)
  6. Sachguchi, M., Minoura, T., Hiramatsu, Y., Takada, H., Yamamura, M., Hiroki, K. and Yamamoto, M. : Effects of dietary saturated and unsaturated fatty acids on fecal bile acids and colon carcinogenesis induced azoxymethane in rats. *Cancer Res.*, **46**, 61-65 (1986)
  7. Reddy, B.S., Burill, C. and Rigotty, J. : Effect of diets high in n-3 and n-6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, **51**, 487-491 (1991)
  8. Reddy, B.S. and Sugie, S. : Effect of different levels of omega-3 and omega-6 fatty acids on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Res.*, **48**, 6642-6647 (1988)
  9. Birt, D.F. : The influence of dietary fat on carcinogenesis : Lessons from experimental models. *Nutr. Rev.*, **48**, 1-5 (1990)
  10. Salt, D. and Farber, E. : New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, **263**, 701-703 (1976)
  11. Hasegawa, R., Furukawa, F., Toyoda, K., Jang, J.J., Yamashita, K., Sato, S., Takahashi, M. and Hayashi, Y. : Study for tumor-initiating effect of acetaminophen in two-stage liver carcinogenesis of male F344 rats. *Carcinogenesis*, **9**, 755-759 (1988)
  12. Moore, M.A., Nakagawa, K., Satoh, K., Ishikawa, T. and Sato, K. : Single GST-P positive liver cells-putative initiated hepatocytes. *Carcinogenesis*, **8**, 483-486 (1987)
  13. Satoh, K., Hatayama, I., Tasteoka, N., Tamai, K., Shimizu, T., Tatematsu, M., Ito, N. and Sato, K. : Transient induction of single GST-P positive hepatocytes by DEN. *Carcinogenesis*, **10**, 2107-2111 (1989)
  14. Satoh, K., Kitahara, A., Soma, Y., Inaba, Y. and Sato, K. : Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase : A new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3964-3968 (1985)
  15. Sato, K., Kitahara, A., Satoh, K., Ishikawa, T., Tatematsu, M. and Ito, N. : The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Gann*, **75**, 199-202 (1984)
  16. Zielke, K., Okada, S. and O'Brien, J. : Fucosidase : Diagnosis by serum assay of alpha-L-fucosidase. *J. Lab. Clin. Med.*, **79**, 164-169 (1972)
  17. Giardina, M.G., Matarazzo, M., Varriale, A., Morante, R., Napoli, A. and Martino, R. : Serum alpha-L-fucosidase : A useful marker in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **70**, 1044-1048 (1992)
  18. Deugnier, Y., David, V., Brissor, P., Mabo, P., Delamaire, D., Messner, M., Bourel, M. and Legal, J.Y. : Serum  $\alpha$ -L-fucosidase : A new marker for the diagnosis of primary hepatic carcinoma? *Hepatology*, **4**, 889-892 (1984)
  19. Gonzalez, M.J., Schemmel, R.A., Gray, J.I., Dugan, L.J., Sheffield, L.G. and Welsch, C.W. : Effect of dietary fat on growth of MCF-7 and MDA-MB 231 human breast carcinomas in athymic nude mice : relationship between carcinoma growth and lipid peroxidation levels. *Carcinogenesis*, **12**, 1231-1235 (1991)
  20. Reddy, C.C., Scholz, R.W., Thomas, C.E. and Massaro, E.J. : Vitamin E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. *Life Sci.*, **31**, 571-576 (1982)
  21. Rao, G.N. : Rodent diets for carcinogenesis studies. *J. Nutr.*, **118**, 929-931 (1988)
  22. American Institute of Nutrition : Report of the AIN Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.*, **107**, 1340-1348 (1977)
  23. Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. : Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 577-580 (1981)
  24. Hagiwara, A., Yamada, M., Hasegawa, R., Fukushima, S. and Ito, N. : Lack of enhancing effects of fenvalerate and esfenvalerate on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive liver cell foci in rats. *Cancer Lett.*, **54**, 67-73 (1990)
  25. Ito, N., Tatematsu, M., Hasegawa, R. and Tsuda, H. : Medium-term bioassay system for detection of carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis utilizing the GST-P positive liver cell focus as an endpoint maker. *Toxicol. Pathol.*, **17**, 630-641 (1989)
  26. LeBoeuf, R. and Veldee, M.S. : Genetically determined body weight loss in mice fed diets containing salmon oil. *J. Nutr.*, **123**, 547-558 (1993)
  27. Satoh, S., Poe, W.E. and Wilson, R.P. : Effect of dietary n-3 fatty acids on weight gain and liver polar lipid fatty acid composition of fingerling channel catfish. *J. Nutr.*, **119**, 23-28 (1989)
  28. Kim, J.H., Yoon, H.J., Song, J.H. and Kim, K.J. : Effects of different dietary oils on hepatic mitochondrial lipid composition and adenine nucleotide translocase activity in rat. *Korean J. Nutr.*, **26**, 547-557 (1993)
  29. Kim, J.H., Yoon, H.J. and Jang, J.J. : Effects of sardine oil feeding and vitamin E supplementation on the preneoplastic hepatic lesion and cholesterol metabolism in hepatocarcinogenesis of rats. *J. Food Sci.*, **1**, 214-219 (1996)
  30. Sato, K. : Glutathione S-transferase and hepatocarcinogenesis. *Gann*, **79**, 556-572 (1988)
  31. Meydani, S.N., Meydani, M., Barklund, P.M., Liu, S., Miller, R.A., Cannon, J.G., Rocklin, R. and Blumberg, J.B. : Effect of vitamin E supplementation on immune responsiveness of the aged. *Ann. NY. Acad. Sci.*, **355**, 18-31 (1980)
  32. Cook, M.G. and Mcnamara, P. : Effect of dietary vitamin E dimethylhydrazine-induced colonic tumors in mice. *Cancer Res.*, **40**, 1329-1331 (1980)
  33. McIntosh, M.K., Goldfarb, A.H., Curtis, L.N. and Cote, P.S. : Vitamin E alters hepatic antioxidant enzymes in rats treated with dehydroepiandrosterone. *J. Nutr.*, **123**, 216-224 (1993)
  34. Sato, K., Niki, E. and Shimasaki, H. : Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C. *Arch. Biochem. Biophys.*, **279**, 402-405 (1990)
  35. Kagerud, A., Holm, G., Larsson, H. and Peterson, H.I. : Tocopherol and local x-ray irradiation of two transplanted rat tumors. *Cancer Lett.*, **5**, 123-127 (1978)
  36. Swick, R.W. and Baumann, C.A. : Tocopherol in tumor tissue and effects of tocopherol on the development of liver tumors. *Cancer Res.*, **11**, 948-953 (1951)
  37. Horvath, P.M. and Ip, C. : Synergistic effect of vitamin E selenium in the chemoprevention of mammary carcinogenesis in rats. *Cancer Res.*, **43**, 5335-5341 (1983)
  38. Ura, H., Denda, A., Yokose, Y., Tsutsumi, M. and 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**, 1595-1600 (1987)

39. Gonzalez, M.J., Gray, J.I., Schemmel, R.A., Dugan, L. and Welsch, C.W. : Lipid peroxidation products are elevated in fish oil diets even in the presence of added antioxidants. *J. Nutr.*, **122**, 2190-2195 (1992)
40. William, G.M. : The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogenesis. *Biochem. Biophys. Acta.*, **605**, 167-189 (1980)
41. Chander, N., Amenta, J., Kandala, J.C. and Lombardi, B. : Liver cell turnover in rats fed a choline-devoid diet. *Carcinogenesis*, **8**, 669-673 (1987)

(2000년 11월 6일 접수)