

Conjugated Linoleic Acid가 대장암 세포인 HT-29의 증식에 미치는 영향*

김은지 · 조한진 · 김석중** · 강영희 · 하영래** · 윤정환[§]

한림대학교 생명과학부, 경상대학교 응용생명과학부**

Effect of Conjugated Linoleic Acid on the Proliferation of the Human Colon Cancer Cell Line, HT-29*

Kim, Eun Ji · Cho, Han Jin · Kim, Seek Jong**

Kang, Young-Hee · Ha, Yeong-Lae** · Park, Jung Han Yoon[§]

Division of Life Sciences, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea

Division of Applied Life Sciences,** Graduate School, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid(CLA) is a group of positional and geometric isomers of linoleic acid(LA) and exhibits anticarcinogenic activity in multiple experimental animal models. *Cis-9,trans-11(c9t11)* and *trans-10,cis-12(t10c12)* CLA are the principal isomers found in foods. The present study was performed to determine whether CLA and the two isomers inhibits HT-29 cell proliferation and to assess whether such an effect was related to changes in secretion of eicosanoids. Cells were incubated in serum-free medium with various concentrations(0 to 20 μ M) of CLA or LA. CLA inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner, with maximal inhibition(70 \pm 1%) observed at 20 μ M concentration after 96 hours. However, LA had no effect at the same concentration range. To compare the ability of *c9t11* and *t10c12* to inhibit cell proliferation, cells were incubated with increasing concentrations(0 to 4 μ M) of these isomers. *T10c12* inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner. A 66 \pm 2% decrease in cell number was observed within 96 hours after addition of 4 μ M *t10c12*. By contrast, *c9t11* had no effect. The concentrations of CLA and the two isomers in the plasma membrane were increased when they were added to the incubation medium. However, they did not alter the levels of arachidonic acid in plasma membrane. To assess whether the proliferation inhibiting effect of CLA was related to changes in eicosanoid production, prostaglandin E₂(PGE₂) and leukotriene B₄(LTB₄) concentrations in conditioned media were estimated by a competitive enzyme immunoassay. Both CLA and *t10c12* increased the production of materials reactive to PGE₂ and LTB₄ antibodies in a dose-dependent manner. By contrast, *c9t11* had no effect. These results indicate that inhibition of HT-29 cell proliferation by CLA is attributed to the effect of the *t10c12* isomer. The materials reactive to PGE₂ and LTB₄ antibodies may inhibit growth stimulatory effect of arachidonic acid-derived eicosanoids on HT-29 cell proliferation. (*Korean J Nutrition* 34(8) : 896~904, 2001)

KEY WORDS : conjugated linoleic acid, *trans-10,cis-12* CLA, *cis-9,trans-11* CLA, eicosanoids, colon cancer cells.

서 론

암은 유전적, 환경적 요인 등 다양한 요인에 의해 발생되며 대부분의 암은 환경적인 요인에 의한 것으로 간주되고

있다. 역학 조사들에 의하면 암 사망률의 약 35%는 여러 환경적 요인 중에서도 식사에 기인하는 것으로 보고되어 식이가 다른 요인들보다 더 많은 영향을 미친다.^{1,2)} 식이를 구성하는 여러 영양소 중 식이 지방은 역학 조사와 동물 실험을 통해 전립선암, 유방암, 대장암 등 여러 암과 관련되어 연구되고 있다.^{3,6)} 이는 식이 지방을 구성하는 지방산과 그 대사 산물이 암세포에서 일어나는 다양한 분자 생물학적 과정의 조절에 영향을 미치기 때문이다.^{7,8)} 현재 발병률과 사망률이 증가하고 있는 대장암은 식이 지방의 양과 식이 지방을 구성하고 있는 지방산의 종류에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다.^{5,9,10)} Reddy 등¹¹⁾은 23%의 옥수수 기름

접수일 : 2001년 9월 12일

채택일 : 2001년 10월 31일

*This work was supported by grant No.(R01-1999-00166) from the Korea Science & Engineering Foundation, a grant from Hallym University, 2001, and a grant of the Korea Science and Engineering Foundation RRC project.

[§]To whom correspondence should be addressed.

과 잇꽃 기름은 대장암의 발생을 촉진하나 코코넛 기름이나 올리브유는 대장암의 발생을 촉진하지 않았다고 보고하였고, Minoura 등¹²⁾은 ω -3 지방산이 풍부한 어유 식이가 대장암의 발생을 억제하는 효과가 있었다고 보고하였다. 또한 인간의 대장암 세포인 Caco-2 세포는 eicosapentaenoic acid와 docosahexaenoic acid에 의해 세포 증식이 억제되었다고 보고되었으며¹³⁾ 위의 결과 등을 통해 식이 지방을 구성하는 지방산의 종류에 따라 대장암의 발생에 미치는 영향이 다르다는 것을 알 수 있다.

Conjugated linoleic acid(CLA)는 공액(conjugated)된 이중 결합을 가지고 있는 linoleic acid(LA: *cis*-9, *cis*-12-octadecadienoic acid)의 위치적, 기하학적 이성체의 혼합물이다. CLA는 쇠고기에서 항암 효과를 가진 물질로 Ha 등¹⁴⁾에 의해 처음 분리 동정되었고 반추 동물에서 유래한 육류와 다양한 유제품에 함유되어 있고 가공처리 과정에 따라 그 함량이 변한다.¹⁵⁾ 동물 실험을 통해 CLA는 체지방 감소, 혈중 cholesterol 감소, 면역 증진 효과 등 여러 가지 생리적인 효과가 있는 것으로 밝혀졌으며 특히 강한 항암 작용이 있는 것으로 보고되었다.^{14,16,17)} 동물실험에서 여러 생리적인 효과를 나타낸 CLA는 화학적으로 linoleic acid로부터 합성된 것으로 *cis*-9, *cis*-11, *cis*-9, *trans*-11, *trans*-9, *cis*-11, *trans*-9, *trans*-11, *cis*-10, *cis*-12, *cis*-10, *trans*-12, *trans*-10, *cis*-12, *trans*-10, *trans*-12 CLA의 8개의 이성체를 모두 함유하고 있으며 그 중 *cis*-9, *trans*-11 CLA와 *trans*-10, *cis*-12 CLA 이성체가 각각 48%를 차지하고 있고 나머지 6개의 CLA 이성체는 미량 존재하는 혼합물이다.^{18,19)} 현재까지는 CLA를 구성하고 있는 각각의 이성체가 어떠한 생리적인 효과를 나타내는지에 대해 연구된 바가 없어 각 이성체의 생리 활성의 비교 연구가 수행되어야 한다.

동물실험에 의하면 CLA는 유방암^{20,21)} 피부암,²²⁾ 전립선암,²³⁾ 대장암²⁴⁾의 유발 및 발생을 저해한다. 인간의 유방암 세포인 MCF-7 세포,²⁵⁾ 폐암 세포인 A-427,²⁶⁾ 악성 흑색종 세포인 M21-HPB²⁷⁾을 사용한 *in vitro* 실험에서도 CLA는 암세포의 증식을 억제하였다.

CLA의 항암 기전에 관해서는 명확하게 밝혀지지 않았다. CLA는 항산화제로 작용함으로써 암의 유발과 발생을 방지하는 것으로 생각되고 있다.^{16,28)} 또한 CLA가 세포막의 인지질에 유입되어 막의 지방산 조성이 변화하여 eicosanoids 합성이 변화됨으로 인해 항암 작용을 하거나 또는 CLA가 linoleic acid와 유사하여 linoleic acid가 arachidonic acid로 전환되어 prostaglandin으로 대사되는 과정에 CLA가 경쟁함으로써 항암 작용을 나타내는 것으로 생

각되고 있다.^{16,29)}

따라서 본 연구에서는 CLA와 그 이성체가 인간의 대장암 세포인 HT-29의 증식을 억제하는지를 조사하고 CLA에 의한 세포 증식 억제가 eicosanoids 생성 변화와 관련이 있는지를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

본 연구에 사용한 대장암 세포인 HT-29(ATCC HTB-38)은 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture Ham's F12(DMEM/F12), fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA, transferrin, penicillin-streptomycin, selenium 등은 Gibco/BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Linoleic acid와 conjugated linoleic acid(CLA)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서, CLA 이성체인 *cis*-9, *trans*-11 CLA와 *trans*-10, *cis*-12 CLA는 Cayman Chemical Co.(Ann Arbor, MI, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), bovine serum albumin(BSA), ascorbic acid, α -tocopherol 등 기타 실험에 사용한 시약은 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양에 사용한 1회용 멸균 용기는 Corning(Corning, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 배지내 첨가 지방산의 조제

지방산을 배지 내에 첨가하기 위해 지방산이 없는 BSA과 복합체를 만들어 사용하였다. 지방산과 BSA의 복합체는 van Greevenbroek³⁰⁾ 등이 사용한 방법을 변형하여 만들었다. 지방산 40 μ moles를 95% 에탄올에 녹인 후 100 mM NaOH가 포함된 95% 에탄올을 가하여 잘 섞었다. 지방산 용액을 질소 가스로 건조시킨 후 55~60 $^{\circ}$ C의 멸균된 증류수 1ml를 가하여 녹인 후 여기에 7.5% BSA 용액 9 ml를 가하여 잘 섞어서 지방산-BSA의 복합체를 만들었다. 지방산-BSA 복합체는 0.25ml씩 분주하여 질소 가스로 충전한 후 밀봉하여 -20 $^{\circ}$ C에 냉동 보관하였다가 사용하였다. 형성된 지방산-BSA 복합체는 지방산과 BSA의 몰비가 4 : 1이며, 지방산의 농도는 4mM이었다.

3. 세포 배양

HT-29 세포는 DMEM/F12 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C 습윤

한 CO₂ incubator(5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. 실험에 사용할 세포를 유지하기 위해서는 DMEM/F12 배지에 10% fetal bovine serum(FBS), 100units/ml penicillin과 100µg/ml streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 세포가 80% confluent 해지면 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후 0.25% trypsin-2.65mM EDTA로 처리하여 계대 배양하였고 배지는 2일마다 교환하였다.

4. 지방산의 농도에 따른 세포 증식 변화 측정

CLA와 CLA 이성체의 농도를 달리하였을 때 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포를 10% FBS가 포함된 배지로 희석하여 50,000 cells/well의 밀도로 24 well-plate에 분주하였다. 24시간이 경과한 후 FBS에 함유되어 있는 다른 지방산의 영향을 배제하기 위해 FBS가 없는 serum-free medium으로 교환하였다. Serum-free medium은 DMEM/F12에 transferrin(5µg/ml), selenium(5ng/ml)을 첨가하여 만들었고 지방산의 산화를 방지하기 위해 ascorbic acid(50ng/ml)와 α -tocopherol(20ng/ml)을 첨가하였다. 24시간 동안 serum-free medium에서 배양하여 FBS의 효과를 배제한 후 지방산이 들어 있는 serum-free medium으로 배지를 교환하였다. 지방산이 들어 있는 배지는 2일 마다 교환하였다. 지방산을 첨가하고 48시간, 96시간이 경과한 후 MTT assay³¹⁾로 세포수를 측정하였다. MTT assay는 미토콘드리아 내에 존재하는 succinate-dehydrogenase가 MTT를 환원하여 푸른색의 formazan을 형성하는데 형성된 formazan을 isopropanol로 용해하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하여 살아 있는 세포수를 간접적으로 측정하는 방법이다. 본 실험실에서 여러 번 예비 실험을 수행한 결과에 의하면 MTT assay의 결과치는 직접 세포수를 측정한 결과치간의 직선적인 상관 관계($r = 0.999$)를 나타낸다.^{13,32)}

5. 세포의 성장 곡선 측정

CLA와 CLA 이성체가 세포의 증식에 미치는 장기적인 영향을 살펴보기 성장 곡선을 측정하였다. 세포는 10% FBS가 포함된 배지로 50,000 cells/well의 밀도가 되게 희석하여 24 well-plate에 분주하였다. 24시간이 지난 후에 DMEM/F12로 세포의 단층을 헹구어 낸 후 지방산이 들어 있는 serum-free medium으로 교환하였다. 세포는 총 14일 동안 배양하였고 2일마다 배지를 교환하였으며 2일 마다 MTT assay로 세포수를 측정하여 각 지방산이 세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하였다.

6. 세포막의 지방산 조성 측정

CLA와 CLA 이성체를 첨가하였을 때 세포막 지방산 조성의 변화를 관찰하기 위해 plasma membrane을 분리하여 지방을 추출한 후, 지방산을 methyl ester로 만들어서 gas chromatography를 이용하여 지방산의 조성을 분석하였다. 세포는 각 지방산을 첨가하여 150mm 접시에서 3일간 배양한 후 배지를 제거한 다음 Hepes buffered saline(HBS, pH 7.56)로 세포 단층을 세척한 후 TES(10mM Tris, 1mM EDTA, 0.25M sucrose, pH 7.4)을 넣어 cell scraper를 이용하여 세포를 수거하였다. 얼음 위에서 Dounce homogenizer로 균질화한 뒤 3,000×g에서 10분 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 상층액을 30,000×g에서 45분간 원심 분리하여 plasma membrane을 분리하였다. Folch³³⁾의 방법을 변형하여 plasma membrane에서 지방을 추출하였다. 추출한 지방은 산 촉매 방법으로 methyl ester로 만들었다. 즉 지방에 1N H₂SO₄/methanol을 가하여 5분간 100℃에서 중탕하였다. 실온에서 냉각한 후 증류수를 첨가하고 hexane으로 추출하였다. Hexane 추출물을 물로 세척하고 sodium sulfate anhydrous를 첨가하여 수분을 제거하여 gas chromatography(GC)로 분석하였다. GC 분석은 flame ionization detector(FID), Supelcowax-10 capillary column(60m×0.32mm, i.d., 25 µm film thickness)와 Hewlett-Packard 5890 integrator가 장착된 Hewlett-Packard 5890GC를 이용하여 분석하였다. Carrier gas는 N₂(2ml/min)이며, 오븐 온도는 180℃에서 200℃까지 분당 2℃ 증가시키는 프로그램을 사용하였다. Injector와 detector의 온도는 260℃이었다.

7. 배지내 Prostaglandin E₂(PGE₂)와 leukotriene B₄(LTB₄) 측정

세포를 24시간 동안 배양한 후 serum-free conditioned medium을 수거하였다. 수거한 serum-free conditioned medium에 glacial acetic acid를 첨가하여 pH 4.0으로 조절한 다음 ethyl acetate(3 : 1, v/v)를 넣어 eicosanoids를 추출하였다. PGE₂와 LTB₄는 enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA)을 사용하여 제조회사에서 제시한 방법에 따라 정량 분석하였다.

8. 통계 처리

모든 분석 수치는 mean ± SEM으로 나타내었다. 수집된 결과는 SAS(Statistical Analysis System) PC 프로그램을 이용하여 통계 분석하였다. 각 실험군들의 평균치간의 유의성은 $\alpha = 0.05$ 수준에서 analysis of variance와 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.³⁴⁾

결 과

1. CLA가 대장암 세포의 증식에 미치는 영향

CLA가 인간의 대장암 세포에서 유래한 cell line인 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 CLA를 0, 5, 10, 20 μ M 농도로 serum-free medium에 첨가하여 48시간 또는 96시간이 경과한 후 세포수를 측정하였다. HT-29 세포는 CLA를 첨가하지 않은 serum-free medium에서 그 수가 증가하여 96시간 동안 5배 정도의 증가를 보였다. 이 세포의 증식은 CLA를 첨가하고 48시간이 경과한 후부터 CLA의 농도가 증가할수록 유의적으로 감소하였으나 5 μ M CLA를 첨가한 경우는 유의적인 차이가 없었다. CLA에 의한 세포 증식의 감소는 96시간에는 더욱 현저하게 나타났으며 20 μ M CLA를 첨가한 세포는 CLA를 첨가하지 않은 대조 세포에 비해 세포 증식이 70% 감소하였다 (Fig. 1).

LA가 세포 증식에 미치는 효과를 관찰하기 위해 LA를 CLA와 같은 농도로 첨가한 후 세포의 증식 정도를 관찰하였다. LA는 세포의 증식을 감소시킨 CLA와는 달리 세포의 증식에 유의적인 영향을 미치지 않았다 (Fig. 2).

Fig. 3은 CLA의 세포 증식 감소 효과가 장기간에 걸쳐서 유지되는지를 살펴보기 위해 14일 동안 세포의 성장 곡선을 측정한 결과이다. Oh 등³²⁾에 의해 보고된 것과 같이 지방산을 처리하지 않은 control군은 세포 배양을 시작하고 10일이 경과할 때까지 직선적인 성장을 보였고 그 이후

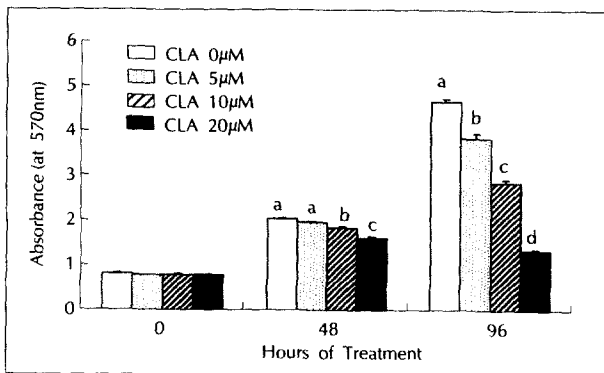


Fig. 1. Effect of conjugated linoleic acid(CLA) on the proliferation of HT-29 cells. HT-29 cells were plated in 24-well plates at 50,000 cells/well in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. One day later, the monolayers were serum-starved with serum-free DMEM/F12 supplemented with 5 μ g/ml transferrin and 5ng/ml selenium for 24 hours. After serum starvation, cells were incubated in serum-free medium containing 0, 5, 10, or 20 μ M CLA. Cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean \pm SEM(n = 6). Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test at each time point.

plateau를 이뤘 정상적인 성장 곡선을 나타냈다. CLA를 10 μ M 첨가 한 경우 세포 증식은 4일부터 대조군에 비해 유의적인 감소를 나타냈으며 CLA의 세포 증식 감소 효과는 세포 배양을 한 14일까지 유지되었다. 지방산의 농도에 따른 세포 증식 결과에서 단기간 동안 세포의 증식에 영향을 미치지 않았던 LA를 10 μ M 농도로 첨가하였을 때 8일까지는 control군과 유의적인 차이가 없었다. LA를 10 μ M 농도로 첨가한 후 10일과 12일에는 세포수가 control에 비해 감소하였으나 그 효과는 별로 주목할 만하지 않았고, 14일에는 세포수의 유의적인 감소는 관찰되지 않았다.

2. CLA 이성체가 대장암 세포의 증식에 미치는 영향

CLA를 구성하는 이성체 중 그 함량이 가장 많은 이성체인 *cis*-9,*trans*-11 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA가 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 각 이성체의 농도를 0, 1, 2 또는 4 μ M으로 달리하여 세포 배양액에 첨가 한 후

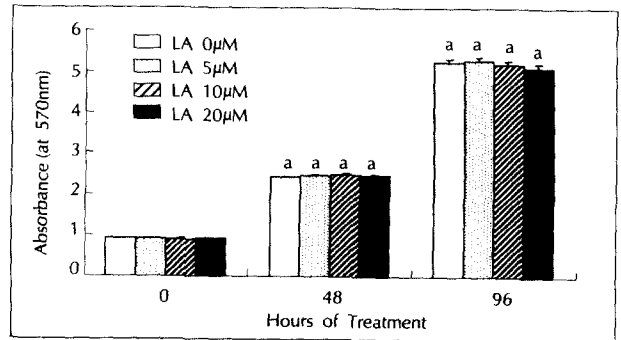


Fig. 2. Effect of linoleic acid(LA) on the proliferation of HT-29 cells. Cells were plated and cultured as described in Fig. 1. After serum starvation, cells were incubated in serum-free medium containing 0, 5, 10, or 20 μ M LA. Cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean \pm SEM(n = 6). Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test at each time point.

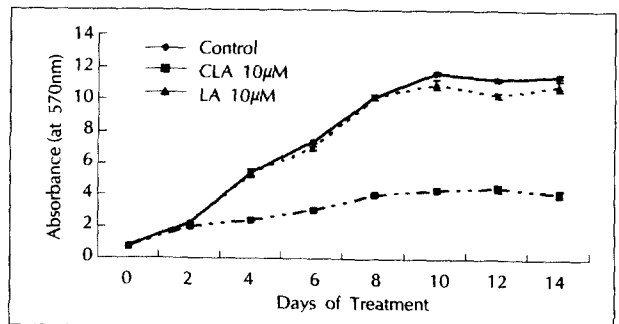


Fig. 3. HT-29 cell growth curves. HT-29 cells were plated in 24-well plates at 50,000 cells/well in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS and serum starved as described in Fig. 1. After serum-starvation, cells were incubated in serum-free medium in the absence or presence of 10 μ M CLA or LA. Cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean \pm SEM(n = 6).

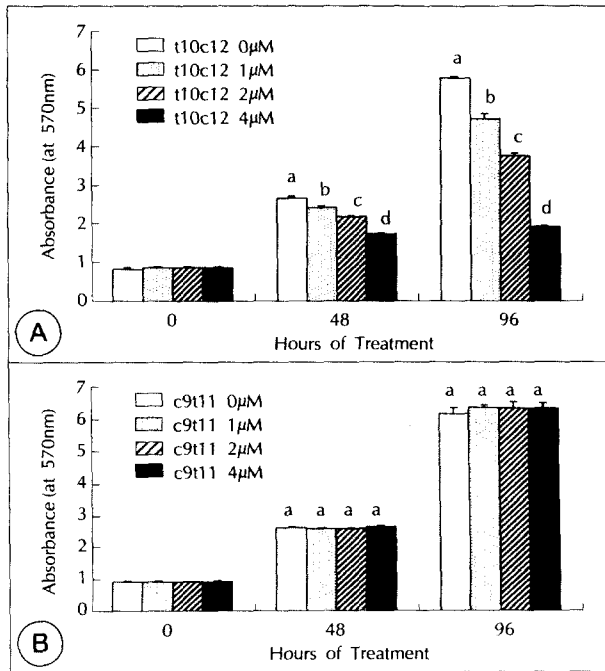


Fig. 4. Effect of the two predominant isomers of conjugated linoleic acid(CLA) on the proliferation of HT-29 cells. Cells were plated and cultured as described in Fig. 1. After serum starvation, the monolayers were incubated in serum-free medium in the absence or presence of various concentrations of *cis-9,trans-11* CLA (c9t11) or *trans-10,cis-12* CLA (t10c12). Cell numbers were estimated by the MTT assay, and represent means \pm SEM(n = 6). Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test at each time point.

세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. CLA 이성체의 농도를 결정하기 위해 이성체의 농도를 1~20μM로 다양하게 하여 세포 배양액에 첨가하여 예비 실험을 실시하였다. *Trans-10,cis-12* CLA의 농도가 5μM 이상에서는 세포가 사멸하였으므로 이성체의 농도를 0, 1, 2, 4μM로 결정하여 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 살펴보았다. Fig. 4A는 *trans-10,cis-12* CLA의 농도를 달리하였을 때 세포의 증식을 나타내었다. *Trans-10,cis-12* CLA은 농도 증가에 따라 유의적으로 세포수가 감소하였다. *Trans-10,cis-12* CLA의 세포 증식 감소 효과는 이성체를 첨가 후 48시간이 지난 후부터 나타났으며 96시간에는 이성체 농도 증가에 따른 세포 증식 감소 효과가 현저하여 4μM *trans-10,cis-12* CLA에 의해 66 \pm 2%의 세포 증식 감소를 관찰하였다. *Cis-9,trans-11* CLA는 세포의 증식에 영향을 미치지 않아 세포 배양액에 첨가하고 96시간이 지난 후에도 세포의 증식에는 유의적인 차이가 없었다(Fig. 4B).

CLA 이성체가 장기간의 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 CLA와 이성체의 농도를 2μM이 되

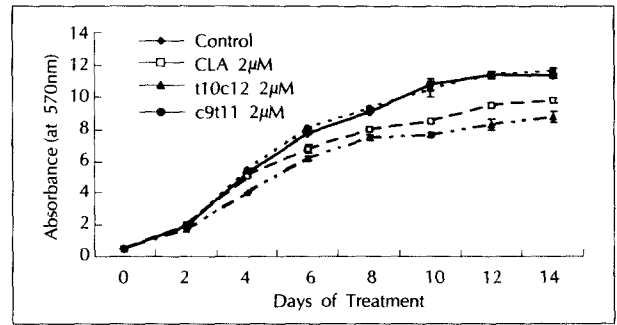


Fig. 5. HT-29 cell growth curves. HT-29 cells were plated in 24-well plates at 50,000 cells/well in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS and serum starved as described in Fig. 1. After serum-starvation, cells were incubated serum-free medium containing 2μM *cis-9,trans-11* CLA(c9t11), 2μM *trans-10,cis-12* CLA(t10c12), or 2μM CLA. Cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean \pm SEM(n = 6).

게 하여 14일간 세포 배양하여 세포의 성장 곡선을 측정하였다. 2μM CLA은 6일부터 유의적인 세포 증식 감소 효과를 나타내었고 세포 증식 감소 효과는 세포를 배양한 14일까지 유지되었다. 2μM *trans-10,cis-12* CLA 효과는 4일부터 나타났고 같은 농도의 CLA 보다 더 큰 것을 관찰하였다. *Cis-9,trans-11* CLA은 지방산을 첨가하지 않은 control군과 유사한 성장 곡선을 나타내었다(Fig. 5).

3. CLA 및 CLA 이성체가 eicosanoids 생성에 미치는 영향

CLA와 LA를 배양액에 첨가한 경우 세포막 지방산 조성의 변화를 관찰하기 위해 20μM CLA, 20μM LA를 각각 첨가하여 3일간 배양한 후 세포막 인지질의 지방산 조성을 분석하였다. 세포 증식을 현저하게 감소시키는 20μM CLA를 첨가하면 인지질 내의 linoleic acid는 감소하는 반면, *cis-9,trans-11* CLA와 *trans-10,cis-12* CLA가 증가하였다. LA를 20μM의 농도로 첨가한 경우 세포막 인지질 내의 linoleic acid가 유의적으로 증가하였다. 인지질 내의 arachidonic acid 함량은 LA의 첨가에 의해 control군보다 증가하나 CLA 첨가에 의해서는 유의적인 차이가 없었다 (Table 1).

Table 2는 4μM *trans-10,cis-12* CLA 또는 4μM *cis-9,trans-11* CLA를 첨가한 경우 세포막 인지질의 지방산 조성의 변화를 나타낸다. 4μM *trans-10,cis-12* CLA가 세포의 증식을 현저하게 감소시켜 이 농도를 사용하였다. 이성체를 각각 배지에 첨가한 경우 각각의 지방산이 세포막의 인지질 내로 유입됨을 관찰할 수 있었다. 인지질내의 linoleic acid 함량은 이성체를 첨가한 경우 control군보다는 낮았고, *cis-9,trans-11* CLA를 첨가한 경우 *trans-10,cis-12* CLA를 첨가

Table 1. Effect of conjugated linoleic acid(CLA) and linoleic acid(LA) on fatty acid composition of the plasma membrane of HT-29 cells

Fatty acid	Control	CLA	LA
18 : 2; 9,12	39.5 ± 1.5 ^b	26.5 ± 1.2 ^c	89.0 ± 2.0 ^a
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	5.0 ± 0.3 ^b	14.5 ± 0.7 ^a	ND
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	ND	12.5 ± 0.6	ND
20 : 4; 5,8,11,14	2.5 ± 0.7 ^b	3.5 ± 1.0 ^b	5.0 ± 0.2 ^a

Values are expressed as µg/mg membrane lipid and represent means ± SEM. Values with different superscripts were statistically different at p < 0.05. ND : not detected

Table 2. Effect of the predominant isomers of conjugated linoleic acid(CLA) on fatty acid composition of the plasma membrane of HT-29 cells

Fatty acid	Control	<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA
18 : 2; 9,12	39.5 ± 1.5 ^a	29.0 ± 0.5 ^b	26.0 ± 0.2 ^c
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	5.0 ± 0.3 ^b	ND	11.0 ± 0.3 ^a
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	ND	7.5 ± 0.1	ND
20 : 4; 5,8,11,14	2.5 ± 0.7 ^a	2.0 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.2 ^a

Values are expressed as µg/mg membrane lipid and represent means ± SEM. Values with different superscripts were significantly different at p < 0.05. ND : not detected

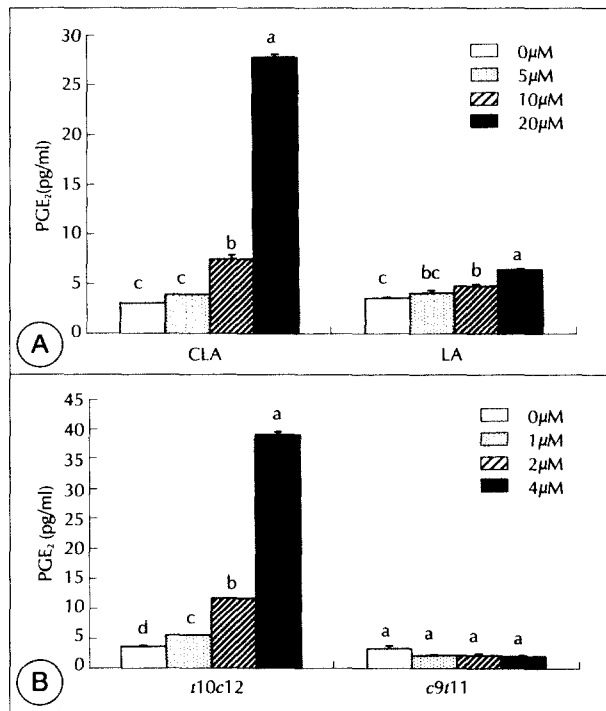


Fig. 6. Effect of conjugated linoleic acid(CLA) and its isomers on prostaglandin(PGE)₂ secretion by HT-29 cells. Cells were plated and cultured as described in Fig. 1. Conditioned media were acidified with HCl, and PGE₂ was extracted with ethyl acetate and estimated by a competitive enzyme immunoassay utilizing a monoclonal antibody against PGE₂. Bars with different letters are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test. LA, linoleic acid; c9r11, *cis*-9,*trans*-11 CLA; r10c12, *trans*-10,*cis*-12 CLA.

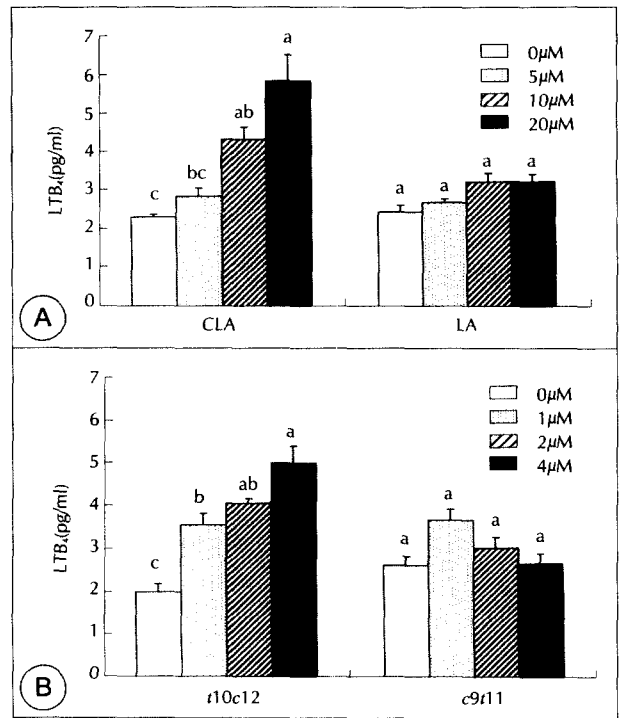


Fig. 7. Effect of conjugated linoleic acid(CLA) and its isomers on leukotriene(LT)₄ secretion by HT-29 cells. Cells were plated and cultured as described in Fig. 1. Conditioned media were acidified with HCl, and LT₄ was extracted with ethyl acetate and was assayed by a competitive enzyme immunoassay utilizing an antiserum against LT₄. Bars with different letters are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test. LA, linoleic acid; c9r11, *cis*-9,*trans*-11 CLA; r10c12, *trans*-10,*cis*-12 CLA.

했을 때보다 linoleic acid 함량이 낮았다. 이 두 가지 이성체는 세포막 인지질 내의 arachidonic acid 함량에는 유의적인 영향을 미치지 않았다.

CLA, LA, 그리고 CLA 이성체에 의한 serum-free conditioned medium의 PGE₂의 농도 변화는 Fig. 6에 나타내었다. CLA의 농도가 증가할수록 PGE₂의 농도가 유의적으로 증가하여 20µM의 CLA에 의해 8배 증가하였다. LA의 농도가 증가함에 따라 PGE₂의 농도는 증가하였으나 CLA에 의한 PGE₂의 농도 증가에 비해 그 증가폭은 현저히 적어 20µM의 LA에 의해 2배 증가하였다. *Trans*-10, *cis*-12 CLA는 농도가 증가할수록 PGE₂의 농도가 유의적인 증가를 보였다. *Cis*-9,*trans*-11 CLA의 농도 증가에 따른 PGE₂의 농도 변화는 없었다.

Fig. 7은 CLA, LA, 그리고 CLA 이성체에 의한 LT₄ 농도 변화를 측정된 결과이다. CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA의 농도가 증가할수록 LT₄의 농도는 유의적으로 증가한 반면 LA와 *cis*-9,*trans*-11 CLA에서 LT₄의 농도는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

고 찰

LA의 위치적, 기하학적 이성체의 혼합물인 CLA는 LA와는 다른 생리적 특성을 나타낸다. LA는 동물 실험에서 암의 발생을 촉진한다고 보고되었다.^{9,11)} *In vitro* 실험에서도 LA는 암세포의 증식을 촉진하고^{26,35)} 특히 대장 암세포인 Caco-2 세포의 증식을 증가시켰다.¹³⁾ *Cis*-9,*trans*-11 이성체와 *trans*-10,*cis*-12 이성체가 각각 48% 함유되어 있고 6가지의 이성체가 미량 존재하는 혼합물인 CLA는 동물 실험을 통해 항암 작용이 있음이 보고되었다.^{20,24)} 본 연구에서 인간의 대장에서 유래한 암세포인 HT-29의 배양액에 동물 실험에서 항암 작용을 보인 CLA 이성체 혼합물을 첨가한 결과 세포의 증식이 현저하게 감소됨을 관찰할 수 있었으며 (Fig. 1), CLA의 세포 증식 억제 효과는 장기간에 걸쳐 유지되었다(Fig. 3). 유방암 세포인 MCF-7^{25,35,36)}과 악성 흑색종 세포인 M21-HPB²⁷⁾에서도 CLA는 본 연구와 유사하게 세포의 증식을 억제하였다고 보고되었다.

위에서 언급한 것과 같이 여러 실험을 통해 항암 작용을 나타낸 CLA는 *cis*-9,*cis*-11, *cis*-9,*trans*-11, *trans*-9,*cis*-11, *trans*-9,*trans*-11, *cis*-10,*cis*-12, *cis*-10,*trans*-12, *trans*-10,*cis*-12, *trans*-10,*trans*-12 CLA의 8개의 이성체를 함유하는 혼합물이다. 본 연구에서 CLA 혼합물은 대장 암세포인 HT-29의 세포 증식을 현저하게 감소시켰다. 하지만 CLA를 구성하고 있는 여러 이성체 각각의 작용에 대해 아직 연구된 바가 없고, 항암 작용을 나타내는 이성체가 어떤 것인지에 대해 연구된 바가 없다. 본 연구에서는 CLA를 구성하는 여러 이성체 중 가장 많이 존재하는 이성체인 *cis*-9,*trans*-11 CLA, *trans*-10,*cis*-12 CLA가 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 살펴보았다. *Cis*-9,*trans*-11 CLA는 HT-29 세포의 증식에 전혀 영향을 미치지 않았다. 반면 *trans*-10,*cis*-12 CLA는 HT-29 세포의 증식을 현저히 감소시켰다 (Fig. 4). *Cis*-9,*trans*-11 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA가 HT-29의 세포 증식에 미치는 영향은 세포 성장 곡선을 측정된 14일 동안 같은 경향을 나타내어 *cis*-9,*trans*-11 CLA는 세포 증식에 영향을 미치지 않았고 *trans*-10,*cis*-12 CLA는 세포 증식을 현저하게 억제하였다(Fig. 5). 위의 결과를 통해 8가지 이성체가 혼합된 CLA의 암세포 증식 억제 효과는 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의한 것임을 알 수 있다.

여러 실험을 통해 CLA가 항암 작용이 있음이 밝혀졌다. 그러나 어떠한 기전에 의해 항암 작용이 나타나는지에 대해 정확하게 알려진 바 없으나 CLA의 항암 작용은 여러 측면에서 고려되고 있다. 첫째, CLA가 강력한 항산화제로 작용

함으로써 항암 작용을 하는 것으로 검토되었으나²⁸⁾ 최근의 연구에 의하면 CLA의 항산화 작용과 항암 작용과는 관계가 없는 것으로 보고되었다.^{28,29)} 둘째, CLA는 eicosanoid의 합성 변화를 초래함으로써 항암 작용을 하는 것으로 생각되고 있는데^{22,37)} 이는 eicosanoids가 정상적인 상피세포, fibroadenomas³⁸⁾와 유방암 세포³⁷⁾의 증식과 밀접한 관계가 있으며, cyclooxygenase metabolite인 PGE₂³⁹⁾와 lipoxygenase metabolite인 LTB₄⁴⁰⁾는 악성 종양 세포의 증식을 증가시키기 때문이다. CLA는 세포막의 인지질에 유입되어 세포막의 지방산 조성의 변화를 초래하여 eicosanoids의 합성에 영향을 미치거나²⁹⁾ LA가 arachidonic acid로 전환되어 eicosanoids로 대사될 때 CLA가 LA와 경쟁함으로써 eicosanoids의 합성에 영향을 미친다고^{14,37)} 생각되고 있다.

본 연구에서 CLA가 세포막의 인지질에 유입되는지를 알아보기 위해 HT-29 세포의 배양액에 CLA와 LA를 각각 첨가하여 세포를 배양한 후 세포막 인지질 내의 지방산 조성을 알아보았다. 세포막 인지질 내의 지방산 조성은 첨가 지방산을 그대로 반영하였다. LA를 첨가시 인지질 내의 LA가 유의적으로 증가하였고 CLA 첨가시 *cis*-9,*trans*-11 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA가 증가하였다(Table 1). *Cis*-9,*trans*-11 CLA, *trans*-10,*cis*-12 CLA를 세포 배양액에 각각 첨가한 경우 각각의 지방산이 세포막의 인지질 내로 유입되어 증가하였다(Table 2). 그러나 세포막 인지질의 arachidonic acid는 linoleic acid에 의해서만 증가하였다(Table 1, 2).

CLA에 의한 eicosanoids의 변화를 관찰하기 위해 본 연구에서는 serum-free conditioned medium 내의 PGE₂와 LTB₄의 농도를 competitive enzyme immunoassay (EIA) 방법에 의해 측정하였다. HT-29 세포의 증식을 유의적으로 감소시켰던 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA는 농도가 증가할수록 PGE₂와 LTB₄의 농도가 유의적으로 증가하였다. 세포의 증식에 영향을 미치지 않았고 세포막 인지질 내의 arachidonic acid의 함량을 증가시킨 LA는 농도 증가에 따라 PGE₂의 농도가 증가하였으나 그 증가폭은 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA 보다 현저하게 적었다. 세포 증식에 영향을 미치지 않았던 *cis*-9,*trans*-11 CLA는 PGE₂와 LTB₄의 농도에 어떠한 영향도 미치지 않았다(Fig. 6, 7). 즉 HT-29의 세포 증식을 억제한 CLA는 세포막 인지질 내로 유입되어 인지질 내의 CLA의 함량을 증가시키고 eicosanoids의 전구체로 알려진 arachidonic acid의 함량에는 영향을 미치지 않았으나 EIA 방법에 의해 검출되는 PGE₂, LTB₄를 증가시켰다. 암세포에서는 정상세포보다 prostag-

glandin(PG)이 고농도로 존재하고 특히 대장암인 경우 대장에서 PG가 고농도로 존재한다고 보고되었다.⁴¹⁾ 또한 *in vitro* 실험에서 PGE₂³⁹⁾와 LTB₄⁴⁰⁾는 악성 종양 세포의 증식을 증가시킨다고 한다. CLA는 HT-29의 증식을 억제하고 arachidonic acid의 변화 없이 PGE₂, LTB₄의 농도를 증가시켰기 때문에 CLA에 의해 증가한 PGE₂, LTB₄는 linoleic acid가 arachidonic acid로 전환된 후 cyclooxygenase나 lipoxygenase에 의해 생성되어 악성 종양 세포의 증식을 증가시키는 물질로 알려진 순수 PGE₂, LTB₄는 아닌 것 같고 이것은 EIA에 사용된 PGE₂, LTB₄의 항체에 반응하는 PGE₂ 또는 LTB₄ 유사물질로 생각된다. 실험에서 사용한 CLA와 두 가지의 CLA 이성체가 PGE₂, LTB₄의 항체에 반응하여 결과에 영향을 미치는가를 알아보기 위해 본 실험실과 제조회사(Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA)에서 검사하였다. CLA는 이 항체들에 대한 친화력이 아주 낮아서 본 실험에서 사용한 농도에서는 EIA에 영향을 미치지 않았다. CLA에 의해 증가한 PGE₂ 또는 LTB₄ 유사물질은 arachidonic acid에서 유래된 PGE₂, LTB₄의 수용체에 결합하여 PGE₂, LTB₄의 작용을 방해함으로써 세포의 증식을 억제하는 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 CLA와 그 이성체가 인간의 대장암 세포인 HT-29의 증식을 억제하는 지를 조사하고 CLA에 의한 세포 증식 억제가 eicosanoids 변화와 관련이 있는지를 규명하고자 하였다. CLA는 대장암 세포인 HT-29의 세포 증식을 유의적으로 억제하였다. CLA 혼합물을 구성하는 8개의 이성체 중 *cis*-9, *trans*-11 CLA는 HT-29 세포의 증식에 영향을 미치지 않았고 *trans*-10, *cis*-12 CLA는 세포의 증식을 현저하게 억제하여 CLA의 세포 증식 억제 효과는 *trans*-10, *cis*-12 CLA에 의한 것임을 알 수 있었다. HT-29 세포의 증식을 현저하게 억제한 농도에서 CLA와 *trans*-10, *cis*-12 CLA는 세포막의 인지질로 유입되어 세포막 인지질 내의 CLA 함량을 증가시켰으나 eicosanoids의 전구체인 arachidonic acid의 함량에는 영향을 미치지 않았다. 또한 CLA는 EIA 방법에 의해 검출되는 PGE₂의 농도와 LTB₄ 농도를 증가시켰다. 그러나 CLA에 의해 증가한 PGE₂와 LTB₄는 암세포의 증식을 증가시키는 것으로 알려진 PGE₂, LTB₄는 아니고, PGE₂ 또는 LTB₄ 항체에 반응하는 PGE₂ 또는 LTB₄의 유사물질로 생각된다. 이 물질들이 암세포의 증식을 증가시키는 eicosanoids의 수용체에 결합하여 eicosanoids의 작용을 방해함으로써 세포의 증식을 억제하는 것

으로 사료된다. 앞으로 CLA에 의해 증가된 PGE₂ 또는 LTB₄ 항체에 반응하는 물질에 대한 더 많은 연구가 요구된다.

Literature cited

- 1) Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66: 1191-1308, 1981
- 2) Doll R. The lessons of life: keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Res* 52: 2024S-2029S, 1992
- 3) Pienta KJ, Esper PS. Is dietary fat a risk factor for prostate cancer? *J Natl Cancer Inst* 85: 1538-1540, 1993
- 4) Giovannucci E, Rimm EB, Coloditz GA. A perspective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 85: 1571-1579, 1993
- 5) Zhao LP, Kushi LH, Klein RD, Prentice RL. Quantitative review of studies of dietary fat and rat colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* 15: 169-177, 1991
- 6) Ip C, Carter CA, Ip MM. Requirement of fatty acids for mammary tumorigenesis in the rat. *Cancer Res* 45: 1997-2000, 1985
- 7) Sumida C, Graber R, Nunez E. Role of fatty acids in signal transduction modulators and messengers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 8: 612-616, 1988
- 8) Lu J, Jiang C, Fontaine S, Thompson H. Ras may mediated mammary cancer promotion by high fats. *Nutr Cancer* 23: 283-290, 1995
- 9) Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: animal model studies. *Lipid* 27: 807-813, 1992
- 10) Cave WT Jr. Dietary n-3(ω -3) polyunsaturated fatty acid effects on animal tumorigenesis. *FASEB J* 5: 2160-2166, 1991
- 11) Reddy BS, Maruyama H. Effect of different levels of dietary corn oil and lard during the initiation phase of colon carcinogenesis in F344 rats. *J Natl Cancer Inst* 77: 815-822, 1986
- 12) Minoura T, Takata T, Sakaguchi M, Takata H, Yamamura M, Hioka K, Yamamoto M. Effect of dietary eicosapentaenoic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 48: 4790-4794, 1988
- 13) Kim EJ, Kim WY, Kang YH, Ha YL, Bach LA, Park JHY. Inhibition of Caco-2 cell proliferation by(n-3) fatty acid: possible mediation by increased secretion of insulin-like growth factor binding protein-6. *Nutr Res* 20: 1409-1421, 2000
- 14) Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881-1887, 1987
- 15) Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Newly recognized anticarcinogenic fatty acid: Identification and quantification in natural and processed chesses. *J Agr Food Chem* 37: 75-81, 1989
- 16) Park HS. Mechanism of cancer prevention and other physiological function by conjugated linoleic acid. *Korean J Nutrition* 33: 556-565, 2000
- 17) Ip C. Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am J Clin Nutr* 66: 1523S-1529S, 1997
- 18) Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Comp Anal* 5: 185-197, 1992
- 19) Ip C, Scimeca J, Thompson HJ. Conjugated linoleic acid. *Cancer* 74: 1050-1054, 1994
- 20) Visonneau S, Cesano A, Tepper SA, Scimeca J, Santoli D, Kritchevsky D. Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID mice. *Anticancer Res* 17: 969-974, 1997

- 21) Ip C, Briggs SP, Haegele AD, Thompson HJ, Storkson J, Scimeca JA. The conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 17: 1045-1050, 1996
- 22) Ha YL, Storkson JM, Pariza MW. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 50: 1097-1101, 1990
- 23) Cesano A, Visonneau S, Scimeca JA, Kritchevsky D, Santoli D. Opposite effect of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res* 18: 1429-1434, 1998
- 24) Liew C, Schutt HA, Chin SF, Pariza MW, Dashwood RH. Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 Rat: A study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis* 16: 3037-3043, 1995
- 25) Shultz TD, Chew BP, Seaman WR. Differential stimulatory and inhibitory responses of human MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid and conjugated linoleic acid in culture. *Anticancer Res* 12: 2143-2145, 1992
- 26) Schonberg S, Krokan HE. The inhibitory effect of conjugated linoleic acid derivatives (CLA) of linoleic acid on the growth of human tumor cell lines is in part due to increased lipid peroxidation. *Anticancer Res* 15: 1241-1246, 1995
- 27) Shultz TD, Chew BP, Seaman WR, Luedecke LO. Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and β -carotene on the in vitro growth of human cancer cells. *Cancer Letters* 63: 125-133, 1992
- 28) van den Berg JJ, Cook NE, Tribble DL. Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids* 30: 599-605, 1995
- 29) Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 51: 6118-6124, 1991
- 30) van Greevenbroek MMJ, Voorhout WF, Erkelens DW, van Meer G, de Bruin TAW. Palmitic acid and linoleic acid metabolism in Caco-2 cells: different triglyceride synthesis and lipoprotein secretion. *J Lipid Res* 36: 13-24, 1995
- 31) Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunological Methods* 89: 271-277, 1986
- 32) Oh YS, Kim EJ, Schaffer BS, Kang YH, Binderup L, MacDonald RG, Park JHY. Synthetic low-calceic vitamin D₃ analogues inhibit secretion of insulin-like growth factor (IGF)-II and stimulate production of IGF-binding protein-6 in conjunction with growth suppression of HT-29 colon cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, in press
- 33) Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509, 1957
- 34) Steel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics, 2nd ed. New York: McGraw-Hill. 17: 1045-1050, 1980
- 35) Park Y, Allen KGD, Shultz TD. Modulation of MCF-7 breast cancer cell signal transduction by linoleic acid and conjugated linoleic acid in culture. *Anticancer Res* 20: 669-676, 2000
- 36) Durgam VR, Fernandes G. The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cell is related to estrogen response system. *Cancer Letters* 116: 121-130, 1997
- 37) Rose DP, Connally JM. Effects of fatty acid and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res* 50: 7139-7144, 1990
- 38) Balakrishnan A, Cramer S, Banyopadhyay GK, Imagawa W, Yang J, Elias J, Beattie CW, Gupta TDK, Nandi S. Differential proliferative response to linoleate in cultures of epithelial cells from normal human breast and fibroadenomas. *Cancer Res* 49: 857-862, 1989
- 39) Lee PP, Ip MM. Regulation of proliferation of rat mammary tumor cells by inhibitors of cyclooxygenase and lipoxygenase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 45: 21-31, 1992
- 40) Snyder DS, Castro R, Desforges JF. Antiproliferative effects of lipoxygenase inhibitors on malignant human hematopoietic cell lines. *Exp Hematol* 17: 6-9, 1989
- 41) Rao CV, Reddy BS. Modulating effects of amount and types of dietary fat on ornithine decarboxylase, tyrosine, protein kinase and prostaglandins production during colon carcinogenesis in male F344 rats. *Carcinogenesis* 14: 1327-1333, 1993