

# DMH로 처리한 쥐에서 식이에 첨가한 Conjugated Linoleic Acid 함량에 따라 대장세포의 Apoptosis와 대장암 Biomarker에 미치는 영향\*

류지혜 · 윤정한\*\* · 하영래\*\*\* · 박현서<sup>§</sup>

경희대학교 생활과학대학 식품영양학과  
한림대학교 생명과학부,\*\* 경상대학교 응용생명과학부\*\*\*

## Effect of Different Level of Conjugated Linoleic Acid on Apoptosis of Colonic Mucosal Cell and Biomarkers in Colon Cancer of 1,2-Dimethylhydrazine-Treated Rats\*

Ryu, Ji-Hye · Park, Jung HY\*\* · Ha, Yeong L\*\*\* · Park, Hyun-Suh<sup>§</sup>

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

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

The study was designed to compare the anti-carcinogenic effect of different level of conjugated linoleic acid (CLA) in 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-treated rats by determining biomarkers (apoptosis, cell proliferation, eicosanoids, 1,2-diacylglycerol) and phospholipid fatty acid profile in colonic mucosa. Eighty male Sprague Dawley rats weighing 180-220g were randomly divided into 4 groups depending on the content of CLA, i.e. 0.0% CLA, 0.5% CLA, 1.0% CLA, 1.5% CLA. The experimental diet contained protein 21.6%, carbohydrate 54.6%, and fat 14.5% including CLA mixture at different level by weight. The experimental diet was fed for 14 weeks with the initiation of intramuscular injection of DMH, which was injected twice a week for 6 weeks to give total amount of 180 mg/kg body weight. Regardless of the amount of CLA supplemented to diet, CLA significantly increased the apoptotic index but did not have significant effect on cell proliferation in colonic mucosa. CLA was undetected in colonic mucosal phospholipid of rats fed the 0% CLA diet and increased to 5.9mg/g phospholipid in rats fed the 0.5% diet. The apoptotic index was increased by 251% and the 1,2-DAG content was decreased by 57% in rats fed 0.5% CLA. No further changes in these variables were observed when CLA in the diet was raised to 1.0% or 1.5%. However, dietary CLA decreased mucosal levels of prostaglandin (PG)E<sub>2</sub>, thromboxane (TX)B<sub>2</sub> and arachidonic acid in dose-dependent manner. The present data indicate that dietary CLA can inhibit DMH-induced colon carcinogenesis by mechanism probably involving increased apoptosis. (*Korean J Nutrition* 35(5) : 505~511, 2002)

KEY WORDS: conjugated linoleic acid, colon cancer, apoptosis, cell proliferation, eicosanoids, 1,2-diacylglycerol.

### 서 론

Conjugated linoleic acid(CLA)는 linoleic acid(LA)의 탄소 원자 중 8번과 10번, 9번과 10번, 10번과 12번 또는 10번과 13번 탄소에 이중결합을 가지며, 기하학적으로 cis

접수일: 2002년 5월 3일

채택일: 2002년 6월 5일

\*This work was supported by a grant from KOSEF (R01-1999-00166).

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

와 trans형의 이성질체를 모두 포함하는 혼합체이다.<sup>1)</sup>

지금까지 CLA는 LA와 구조상으로 유사함에도 불구하고 LA는 식이 내 함량이 증가할수록 유방암 발생률이 증가한 반면,<sup>2)</sup> CLA는 유선암,<sup>3,4)</sup> 피부암,<sup>5)</sup> 위전위부암<sup>6)</sup>과 대장암<sup>7,8)</sup>에 대한 항암 작용을 보였다. Liew 등<sup>7)</sup>은 2-amino-3-methylimidazo(4,5-f)quinoline(IQ)에 의한 대장의 암화 과정에서 식이에 0.5%(w/w) CLA를 첨가하였을 때 colonic aberrant crypt foci의 총 수가 유의하게 감소하였으며 대장 점막의 IQ에 의한 총 DNA adduct도 유의하게 억제하여 CLA가 대장암 발암물질인 IQ에 의한 대장암의

개시 단계에서 억제하는 효과를 관찰하였다. 또 Kim<sup>9)</sup>은 1,2-dimethylhydrazine(DMH)로 대장암을 유발시킨 쥐에게 식이 지방에 CLA 1%(w/w)를 첨가했을 때 CLA를 첨가하지 않은 군보다 대장의 종양발생률을 낮추었으며, 대장상피세포의 apoptosis를 증가시키고 대장 점막조직의 prostaglandin(PG)<sub>E2</sub>, thromboxane(TX)<sub>A2</sub>의 함량을 낮추고 인지질 내의 arachidonic acid(AA)의 함량을 낮춤으로써 대장암 암화 과정을 억제하였다.

앞선 연구<sup>9)</sup>에서는 대장암에 대한 CLA의 항암 작용에 대한 연구는 식이 내의 CLA 첨가량을 식이 무게의 1% 수준에서 그 항암 효과를 관찰하였다. 그러므로 본 연구에서는 식이내의 CLA 첨가량에 따라 대장상피세포의 증식과 apoptosis 및 그 외 biomarker 함량에 미치는 영향을 조사하여 항암효과를 나타내는 CLA의 최소량을 파악하고자 한다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험계획

본 연구에서는 생후 6주된 Sprague Dawley 종 수컷쥐를 1주일간 고형사료로 사육한 다음, 체중에 따라 난괴법에 의해 4군, 즉 식이내의 CLA 첨가량에 따라서 0.0% CLA, 0.5% CLA, 1.0% CLA, 1.5% CLA군으로 나누었다. 화학적 발암원인 DMH(Aldrich chemical Co, Milwaukee, Wis) 1.5g을 0.9% saline 100ml에 용해시킨 후 1M NaOH로 pH 6.7로 조절하여 좌, 우 대퇴근에 체중 kg당 DMH 15mg을 주 2회씩 교대로 6주간 근육 주사하여 총 투여량이 180mg/kg이 되도록 하였다. 실험식은 DMH 주사와 동시에 시작하여 14주간 사육하였다(Fig. 1).

### 2. 실험식이

실험 식이는 무게 100g 중 단백질이 약 21.6g, 당질이 약 54.6g, 지방이 14.5g(약 30%kcal, CLA를 포함해서)가 되도록 구성하였으며, 다른 성분의 양은 동일하게 하였다

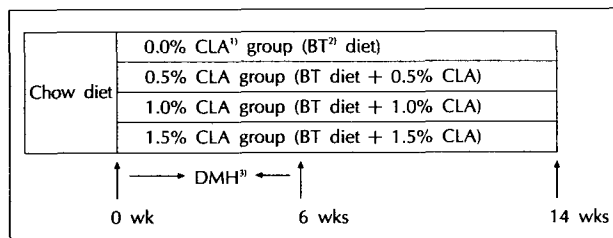


Fig. 1. Experimental design.

<sup>1)</sup>CLA: conjugated linoleic acid, <sup>2)</sup>BT: beef tallow

<sup>3)</sup>DMH: All rats were intramuscularly injected with 1,2-dimethylhydrazine 15mg/kg body weight twice a week for 6 weeks to give total dose of 180mg/kg.

(Table 1). 모든 실험식이의 linoleic acid(LA) 함량은 식이의 총 열량 중 3.7%가 되도록 옥수수유를 첨가하였으며, CLA는 경상대학교 농화학과에서 제조하여 각 실험군에 식이 무게의 0.5%, 1.0%, 1.5% 수준으로 첨가하였다. 2주에 한번씩 제조한 실험식은 -30℃에 냉동 보관하였다. 실험 동물은 12 hr dark-light cycle로 조절되었고 물과 식이는 자유롭게 먹을 수 있도록 공급하였으며, 체중은 일주일에 한번 같은 시간에 측정하였다.

### 3. 시료채취

실험기간 14주가 끝난 후 overnight fasting을 한 상태에서 ethyl ether로 마취시킨 후, 대장을 잘라낸 후 길이로 잘라서 열어 폼다. 대장의 distal 끝 부분으로부터 약 1cm 위에서 1cm씩 잘라 펴서 여과지에 붙여 10% formalin 용액에 고정시킨 다음 apoptosis를 측정하기 위해서 냉장 보관하였다. 또한 대장의 세포증식을 측정하기 위해서는 각 쥐에게 체중 1kg 당 bromodeoxyuridine(BrdU, Sigma Co) 5mg을 복강 주사하고 정확하게 한시간 후에 각 쥐를 ethyl ether로 마취시킨 후, 대장을 잘라낸 후 길이로 잘라서 열어 폼다. 대장의 distal 끝 부분에서 약 1cm위에서 1cm씩 자른 조직을 펴서 여과지에 붙여 70% ethanol에 고정시켜 냉장 보관하였다. 대장의 점막조직은 spatula로 긁어 분리한 후 PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>와 1,2-diacylglycerol(DAG)를 측정하고 인지질의 지방산 조성을 분석하기 위하여

Table 1. Diet composition of experimental groups

Ingredients	Dietary groups <sup>1)</sup>			
	0.0% CLA	0.5% CLA	1.0% CLA	1.5% CLA
	g/100g diet			
Corn starch	54.60	54.60	54.60	54.60
Casein	21.60	21.60	21.60	21.60
Beef tallow	12.00	11.23	10.47	9.70
Corn oil	2.50	2.55	2.59	2.63
CLA-rich oil <sup>2)</sup>	-	0.72	1.44	2.15
L-methionine	0.30	0.30	0.30	0.30
α-Cellulose	3.70	3.70	3.70	3.70
AIN-76 Mineral mix	4.00	4.00	4.00	4.00
AIN-76 Vitamin mix	1.00	1.00	1.00	1.00
Choline bitartrate	0.30	0.30	0.30	0.30
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
	% Nutrients of calculated as calories			
Total calorie, kcal/100g diet	435.3			
Protein, %	19.85			
Fat, %	29.98			
Carbohydrate, %	50.17			

CLA: conjugated linoleic acid

<sup>1)</sup>0.0% CLA group contains no CLA in diet. 0.5%, 1.0%, 1.5% CLA groups contain 0.5%, 1.0%, 1.5% CLA by weight in diet, respectively.

<sup>2)</sup>CLA-rich oil contains 69.98% CLA mixture.

- 70℃에 냉동 보관하였다.

#### 4. 대장점막의 apoptosis 측정

대장 상피조직의 apoptosis를 측정하기 위해서 위에서 준비된 조직을 통상적인 paraffin block을 만들고 조직을 4 μm로 절편 후 apoptosis가 일어나는 세포의 DNA strand break의 DNA의 3-OH 말단에 terminal deoxynucleotide transferase(TdT)의 결합에 기초를 둔 TUNEL 방법 Gavridli<sup>10)</sup>을 이용한 ApopTag Peroxidase Kits(Intergen Co. #2 Manhattanville Rd, Purchase, NY)를 사용하여 염색 후에 광학현미경으로 세포의 변화정도를 비교하였다.

#### 5. 대장점막의 세포증식 측정

세포증식을 측정하기 위해서 위에서 언급된 것처럼 정확하게 쥐를 희생시키기 한시간 전에 BrdU를 체중 1kg 당 5mg을 복강 주사하였고, BrdU는 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4) 용액에 녹여서 만들었다. 쥐를 죽인 후 즉시 distal colon을 세로로 잘라 열어서 ice-cold PBS 용액으로 잘 씻어내고 위에서 언급된 것처럼 70% ethanol에 고정시킨 조직을 통상적인 paraffin block을 만들고 조직을 4μm로 절편 후 albumin으로 코팅한 slide에 올려서 monoclonal anti-BrdU antibody를 이용한 면역조직화학 방법<sup>11)</sup>에 기초를 둔 BrdU staining kit(Zymed, San Francisco)로 BrdU가 DNA에 결합된 정도를 관찰하였다.

#### 6. 대장점막의 PGE<sub>2</sub> 및 TXB<sub>2</sub> 함량 측정

TXB<sub>2</sub><sup>12)</sup>와 PGE<sub>2</sub><sup>13)</sup> 분석을 위해 대장 점막의 일정량을 취해서 indomethacin이 함유된 0.05 M Tris buffer(pH 8.0, 0.25M sucrose, 1mM EDTA) 2ml을 첨가한 후 균질화하였다. 균질액을 37℃ shaking water bath에 30분간 방치하였다가 0.35ml ice cold ethanol을 첨가하고 여기에 1M citric acid를 첨가하여 산성상태로 만든 후 4,000 × g에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 취하여 C-18 solid phase extraction column에 loading한 후 methylformate를 통과시켜 얻은 용출액을 수집하여 질소가스로 건조시킨 뒤 assay buffer에 용해시켜 preformed TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub>를 각각 TXB<sub>2</sub> enzyme immunoassay(EIA) system(Amersham Life Science, Buckinghamshire, England)과 PGE<sub>2</sub> EIA system(Cayman, Ann Arbor, MI)을 사용하여 측정하였다.

#### 7. 대장점막 중 인지질의 지방산 조성

대장점막을 일정량 취하여 Bligh와 Dyer<sup>14)</sup>의 방법으로 지질을 추출하였는데 이때 지방산의 분해를 막기 위해 추출

용매에 butylated hydroxy toluene을 0.005% 수준으로 첨가하였다. 대장에서 추출한 지질은 질소 가스로 건조시킨 후 일정량의 chloroform에 용해시킨 후 silica gel thin layer chromatography(TLC) plate에 spot하여 Duncan과 Lloyd<sup>15)</sup>의 방법으로 전개시켰다. 전개 후 인지질에 해당하는 부위를 취하여 Lepage와 Roy<sup>16)</sup>의 one-step methylation 방법으로 methylation시켰다. Fatty acid Methyl Ester (FAME)는 gas chromatography(Hewlett Packard Model 5890 II)를 이용하여 분석하였으며, 사용한 column은 SP-2330(Spelco, Bellefonte, PA) 0.25mm ID × 60m (film thickness 0.2 μm)이었다. 각 지방산의 retention time은 표준 FAME(Sigma, Louis, MO)과 비교하여 확인하여 각 지방산의 함량은 백분율로 표시하였다.

#### 8. 대장점막의 1,2-DAG 함량 측정

대장점막을 일정량 취하여 인지질 추출할 때와 같은 방법으로 지질을 추출한 후 silica gel TLC plate에 같은 방법으로 전개시킨 후 1,2-DAG에 해당하는 부위를 취하여 Fletcher<sup>17)</sup>의 방법에 따라 함량을 측정하였다. 이때 triolein 대신 diacylglycerol을 표준 용액으로 사용하였다.

#### 9. 통계분석

모든 실험결과는 Statistic Analysis System(SAS) program의 general linear model(GLM)을 이용하여 p<0.05 유의수준에서 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

## 결 과

#### 1. 식이섭취량과 체중증가량

식이의 CLA 첨가량에 따라 14주간 섭취한 식이 섭취량은 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았으며 체중도 군간의 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 2, Fig. 3).

#### 2. 대장 상피조직의 세포증식

대장상피세포의 세포증식은 전체적으로 CLA 첨가에 의해서 crypt height와 labling index 값에 유의한 영향을 미치지 않았으며, proliferative zone 값도 일관성 있는 결과를 보이지 않았다(Table 2).

#### 3. 대장 상피세포의 apoptosis

대장상피세포에서 apoptosis의 정도를 비교해보면 CLA 무첨가 군에 비해 CLA를 첨가한 모든 군에서 유의하게 높았으나 CLA 첨가량에 따른 차이는 유의하지 않았다(Table 3).

#### 4. 대장점막 PGE<sub>2</sub> 및 TXB<sub>2</sub> 함량

Table 4에서 대장 점막조직의 PGE<sub>2</sub>와 TXB<sub>2</sub> 함량을 비교해 보면 CLA 무첨가군에 비해 CLA첨가한 모든 군에서 유의하게 낮았다. CLA 첨가량이 높을수록 PGE<sub>2</sub>와 TXB<sub>2</sub> 함량은 더욱 감소되는 경향을 보였으나 CLA 첨가량

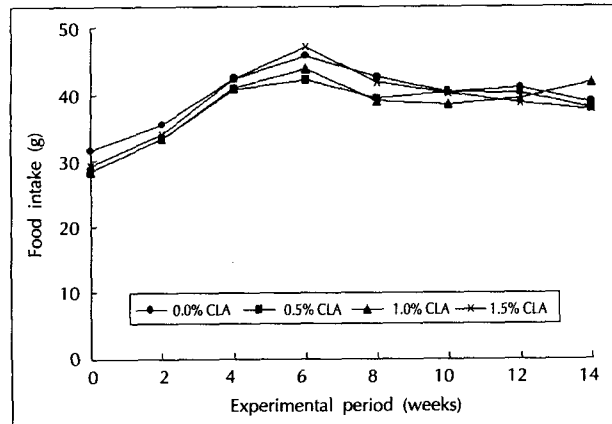


Fig. 2. Changes of food intake in DMH-treated rats fed different level of conjugated linoleic acid (CLA).

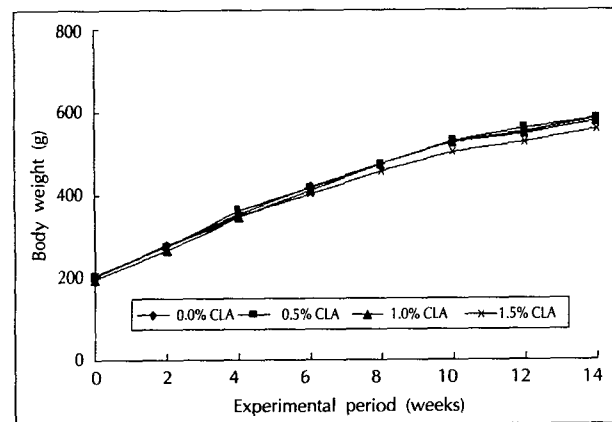


Fig. 3. Changes of body weight in DMH-treated rats fed different level of conjugated linoleic acid (CLA).

Table 2. Effect of CLA mixture on cell kinetic indices of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats

Experimental groups	Crypt height	Labeling index	Proliferative zone
	No. of cells	%	%
0.0% CLA	21.07 ± 1.92	9.11 ± 1.69	52.91 ± 10.76 <sup>ab</sup>
0.5% CLA	19.13 ± 2.25	8.70 ± 1.43	35.51 ± 3.87 <sup>b</sup>
1.0% CLA	18.35 ± 1.90	15.61 ± 3.43	65.43 ± 9.22 <sup>a</sup>
1.5% CLA	19.51 ± 0.82	13.99 ± 4.01	49.13 ± 11.46 <sup>ab</sup>

Mean ± SE. n = 5-7  
 Values with different letter are significantly different at p < 0.05.  
 Crypt height = total # of cells in each crypt.  
 Labeling index = (total # of labeled cells / crypt height) × 100  
 Proliferative zone = (position of highest labeled cell / crypt height) × 100

이 0.5% 수준에 비해 1.5%일 때만이 유의하게 감소되었다. 따라서 식이 지방에 첨가한 CLA 첨가량 증가가 대장 점막 내에서 PGE<sub>2</sub>와 TXB<sub>2</sub> 생성을 감소시켰음을 관찰할 수 있었다.

#### 5. 대장점막 중 인지질의 CLA와 AA의 함량

Table 5에서 총 인지질에 유입된 CLA의 함량은 CLA 무첨가 군에서는 CLA를 발견할 수 없었으며 CLA 첨가군에서는 CLA 첨가량에 상관없이 모두 6.0~8.3% 수준으로 유입되었다. 반면에 C20 : 4(AA)의 함량은 CLA 무첨가군과 CLA 0.5% 수준은 유의한 차이가 없었지만 CLA 1.0%와 CLA 1.5% 수준에서는 유의하게 낮았다. 그러나 1.0% CLA와 1.5% CLA군 사이에는 유의한 차이를 보이지 않았다.

Table 3. Effect of CLA mixture on apoptosis (%) of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats

Dietary group	N	Apoptosis (%)
0.0% CLA	5	19.85 ± 6.64 <sup>b</sup>
0.5% CLA	6	49.83 ± 19.61 <sup>a</sup>
1.0% CLA	5	45.77 ± 14.86 <sup>a</sup>
1.5% CLA	5	51.59 ± 4.92 <sup>a</sup>

Values are mean ± SD. N = number of samples.  
 Values with different letter are significantly different at p < 0.05.

Table 4. Effect of CLA mixture on colonic mucosal levels of PGE<sub>2</sub> and TXB<sub>2</sub> in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats

Dietary group	N	ng/mg tissue	
		PGE <sub>2</sub>	TXB <sub>2</sub>
0.0% CLA	7	21.06 ± 1.11 <sup>a</sup>	6.91 ± 1.11 <sup>a</sup>
0.5% CLA	9	16.04 ± 4.19 <sup>b</sup>	5.70 ± 1.01 <sup>b</sup>
1.0% CLA	7	14.14 ± 2.80 <sup>bc</sup>	4.41 ± 0.81 <sup>bc</sup>
1.5% CLA	8	10.47 ± 5.28 <sup>c</sup>	3.78 ± 0.56 <sup>c</sup>

Values are mean ± SD. N = number of samples.  
 Values with different letter are significantly different at p < 0.05.  
 PGE<sub>2</sub>: prostaglandin E<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>: thromboxane B<sub>2</sub>

Table 5. Effect of CLA mixture on the relative percentage of fatty acid profile of colonic mucosal phospholipid in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats<sup>1)</sup>

Dietary group	N	CLA	AA
		%	
0.0% CLA	6	ND <sup>b2)</sup>	5.56 ± 1.02 <sup>a</sup>
0.5% CLA	6	6.74 ± 2.84 <sup>a</sup>	4.56 ± 0.85 <sup>a</sup>
1.0% CLA	6	8.34 ± 2.06 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.77 <sup>b</sup>
1.5% CLA	6	6.02 ± 1.31 <sup>a</sup>	1.61 ± 0.69 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Fatty acid composition was expressed as the relative % of total fatty acid methyl ester.

<sup>2)</sup>ND: not detected  
 Values are mean ± SD. N = number of samples.  
 Values with different letter are significantly different at p < 0.05.  
 CLA: conjugated linoleic acid, AA: arachidonic acid

**Table 6.** Effect of CLA mixture on colonic mucosal level of 1,2-DAG in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats

Dietary group	N	1,2-DAG
		µg/mg tissue
0.0% CLA	6	0.23 ± 0.12 <sup>a</sup>
0.5% CLA	6	0.10 ± 0.04 <sup>b</sup>
1.0% CLA	8	0.14 ± 0.06 <sup>b</sup>
1.5% CLA	8	0.12 ± 0.04 <sup>b</sup>

CLA: conjugated linoleic acid, 1,2-DAG : 1,2-diacylglycerol  
 Values are mean ± SD. N = number of samples.  
 Values with different letter are significantly different at p < 0.05.

### 6. 대장점막 1,2-DAG의 함량

대장점막의 DAG 함량은 CLA 무첨가군에 비해 CLA를 첨가한 모든 군에서 유의하게 낮았으며, CLA 첨가량에 따른 유의한 차이는 보이지 않았다(Table 6).

## 고 찰

Apoptosis는 형태학적, 생화학적으로 독특한 세포사(cell death)의 한 형태로서 상피 세포 상태에서 중요한 생리학적 과정이다.<sup>18)</sup> 정상 조직에서 apoptosis의 속도는 유사분열(mitosis)의 속도와 같이 일어나지만, 병태 생리학적(pathophysiological)인 과정에서 세포 증식과 세포사의 균형을 이루지 못하게 되므로 암 발생이 촉진되고 암이 진행되게 된다.<sup>18)</sup> 따라서 대장암 발생과정에서 대장 상피세포가 암(carcinoma)으로 변형되는 과정은 세포 증식 증가와 apoptosis의 점진적인 감소와 관련있으며, 이것은 종양의 크기와 수에 영향을 미치게 된다. Ip 등<sup>19)</sup>에 의하면 CLA는 DNA 합성을 감소시키고, bcl-2의 발현을 감소시켰을 뿐만 아니라 pregmalinant lesion에서 apoptosis를 유의하게 증가시켰다. Thompson 등<sup>4)</sup>에 의하면 유선암을 유발한 쥐에서 CLA를 식이로 투여함으로써 유선조직의 apoptosis를 증가시키는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 식이에 첨가한 CLA가 대장암 상피세포의 apoptotic index를 증가시켰으나 대장 상피세포 증식에는 영향을 보이지 않는 것으로 보아 CLA가 apoptosis를 유도함으로써 DMH에 의한 대장암의 암화과정을 억제하는 것으로 사려된다.

식이에 LA를 첨가하면 세포내 LA의 함량이 증가하고 AA의 합성이 증가되어 eicosanoid 생합성을 증가시킨다.<sup>20)</sup> 증가된 PGE<sub>2</sub>와 TXB<sub>2</sub>는 대장의 운동성, 운반성 조절에 관여하며 세포증식, mutagenesis, angiogenesis를 증가시키고 세포사멸(apoptosis)을 감소시킴으로써 암화과정을 촉진한다.<sup>18)</sup> 반면에 CLA를 첨가한 식이를 투여하면 중성지방조직과 인지질 내의 CLA 함량이 증가하고 AA 함량은

감소되며 PGE<sub>2</sub>과 TXB<sub>2</sub> 합성이 감소하였는데 이와 같은 eicosanoid 합성 감소는 cyclooxygenase(COX)와 관련이 있다고 설명하였다.<sup>21,22)</sup> 이는 CLA를 섭취했을 때 CLA와 AA가 대사되는 과정에서 rate-limiting step인 Δ6-desaturase의 기질로서 CLA가 LA와 경쟁하기 때문에 AA 합성이 감소된다.<sup>23)</sup> 또, 세포막 인지질의 sn-2로 CLA유입이 증가하고, CLA는 desaturation과 elongation에 의한 대사과정을 거치며 이 과정동안 conjugated diene 구조를 유지한다.<sup>4,24)</sup> 따라서 CLA가 체내에서 대사되어 conjugated diene C20 : 3Δ8,12,14, conjugated diene C20 : 4Δ5,8,12,14와 conjugated diene C20 : 4Δ5,8,11,13이 생성되는데,<sup>24)</sup> 이와 같은 conjugated diene bond를 가진 C18~20 지방산들은 COX의 inhibitor로서 eicosanoid 생성을 억제하므로<sup>25)</sup> CLA 섭취에 의해 PGE<sub>2</sub>과 TXB<sub>2</sub> 합성이 감소되는 것으로 추측되고 있다.

따라서 CLA는 LA에서 AA로의 합성을 감소시키고 인지질에 AA의 결합을 감소시킬 뿐만 아니라 eicosatetraene-CLA는 COX에 의해서 사용될 수 있는 AA의 양을 감소시키거나 COX에서 AA와 경쟁함으로써 eicosanoid의 생성을 감소시킴으로써 항암 작용을 나타낸다고 하였다.<sup>26)</sup>

본 연구에서도 CLA 첨가군에서 대장 점막 인지질의 CLA 함량이 증가하였는데 식이 중 CLA 함량이 1.0% 이상일 때 인지질 내의 AA 함량이 유의하게 감소함을 볼 수 있었다. 식이 지방의 LA 수준은 인지질의 지방산 조성에 직접적으로 영향을 미치지만 본 연구에서는 모든 실험식이의 LA의 함량이 식이 총 열량의 3.7%로 일정하도록 조정하였기 때문에 식이 중 CLA 함량이 1.0%와 1.5%일 때 인지질 중 AA 함량이 감소한 것은 식이로 섭취한 CLA로 인해 인지질 내로 AA의 유입이 감소되었을 것이라고 사려된다. 또 식이에 CLA를 첨가한 양이 증가할수록 대장점막의 PGE<sub>2</sub>와 TXB<sub>2</sub> 수준이 낮아진 것을 관찰할 수 있었다. 이로 인해 식이에 CLA 첨가량이 증가할수록 인지질의 AA 함량을 감소시키고, PGE<sub>2</sub>와 TXB<sub>2</sub> 수준이 감소함으로써 세포가 외부의 자극을 받았을 때 대장의 암화과정을 예방할 수 있을 것으로 사려된다.

1,2-DAG은 phosphatidylinositol(PI)가 phospholipase C(PLC)의 가수분해에 의해 생성된 물질로서 protein kinase C(PKC)를 활성화시킨다. 세포내 PKC 활성이 증가되면 nuclear protein의 인산화에 의해 세포 증식과 분화, tumorigenesis, apoptosis, 유전자 발현의 조절에 중요한 역할을 하게 된다.<sup>27)</sup> 따라서 1,2-DAG의 함량 변화는 세포 내에서의 신호전달체계의 민감도(sensitivity)에 영향을 주게 되므로 세포 내의 1,2-DAG의 함량을 감소시킬 수

있다면 암으로의 전이과정을 촉진하는데 관여하는 second messenger system의 활성을 저해 또는 지연할 수 있을 것이라고 추측된다.

본 연구에서 CLA 무첨가 군(0.0%)에 비해 CLA를 첨가한 모든 군에서 1,2-DAG 함량이 유의하게 감소하였다 (Table 6). 이는 human prostate cancer cell인 PC3에 100mM의 CLA를 처리하여 24시간 후에 DAG 함량이 50% 감소한 것과 일치하였다.<sup>28)</sup> Apoptosis가 일어나는 동안 세포내의 DAG 함량이 감소되었는데<sup>29)</sup> 이로써 DAG는 antiapoptosis와 세포의 survival signal로서 중요한 기능을 하는 것으로 사려된다. 본 연구에서도 세포내 DAG 함량과 apoptotic index와는 역의 관계를 보여줌으로써 다른 연구 결과와 일치함을 알 수 있었다.

### 요약 및 결론

1) 식이에 첨가한 CLA는 첨가량(0.5~1.5%)에 상관없이 같은 수준으로 대장 상피세포에서 apoptosis를 증가시켰으나 세포증식에는 유의한 영향을 미치지 못하였다.

2) CLA는 첨가량에 상관없이 대장 점막 인지질내 유입되었으며, 첨가량이 1.0%이상일 때 인지질의 AA 함량을 유의하게 감소시켰다.

3) CLA 첨가량이 높을수록 대장점막의 PGE<sub>2</sub>와 TXB<sub>2</sub>의 함량은 더욱 감소되었다.

4) CLA는 첨가량에 상관없이 같은 수준으로 대장점막의 1,2-DAG 함량을 유의하게 감소시켰다.

총괄해서, CLA는 식이 무게의 0.5% 이상 첨가되었을 때는 대장점막 인지질내로 유입되어 대장 암화과정의 신호전달계의 eicosanoids 및 1,2-DAG의 함량을 유의하게 감소시키고 대장상피세포의 apoptosis를 증가시킴으로써 대장의 암화과정을 지연시킬 수 있을 것이라고 사려된다.

### Literature cited

- 1) Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Newly recognized anticarcinogenic fatty acid: Identification and quantification in natural and processed cheeses. *J Agric Food Chem* 37: 75-81, 1989
- 2) Ip C, Carter CA, Ip MM. Requirement of essential fatty acid for mammary tumorigenesis in the rat. *Cancer Res* 45: 1997-2001, 1985
- 3) Ip C, Briggs S, Haegle AD, Thompson HJ, Storkson J, Scimeca JA. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level of type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 17: 1045-1050, 1996
- 4) Thompson HJ, Zhu Z, Banni S, Darcy K, Loftus T, Ip C. Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: implication for a reduction in mammary cancer risk. *Cancer Res* 57: 5067-5072, 1997
- 5) Liu K, Belury MA. Conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester-induced events in murine keratinocyte. *Lipids* 32: 725-730, 1997
- 6) Ha YL, Storkson J, Pariza MW. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 50: 1097-1101, 1990
- 7) Liew HA, Shut HAJ, 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 F 344 rat: a study of inhibitory mechanism. *Carcinogenesis* 16: 3037-3043, 1995
- 8) Yang B, Glickman BW, Boer JG. Effect of conjugated linoleic acid on the formation of spontaneous and PHIP-induced mutation in the colon and cecum of rats. *Mutation Res* 500: 157-168, 2002
- 9) Kim KH. Effect of dietary supplementation of conjugated linoleic acid on tumor incidence and colon carcinogenesis in 1,2-dimethylhydrazine treated-rats. Ph.D. Thesis. *Kyung Hee University*, 2000
- 10) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992
- 11) Schutte B, Reynders MM, Bosman FT, Blijham GH. Studies with anti-bromodeoxyuridine antibodies: II. Simultaneous immunocytochemical detection of antigen expression and DNA synthesis by in vivo labeling of mouse intestinal mucosa. *J Histochem Cytochem* 35(3): 371-4, 1987
- 12) Granstrom E, Samuelsson B. Quantitative measurement of prostaglandins and thromboxanes: general considerations. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 5: 1-13, 1978
- 13) Shaw JE, Ramwell PW. Separation, identification, and estimation of prostaglandins. *Methods Biochem Anal* 17: 325-71, 1969
- 14) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917, 1957
- 15) Duncan EM, Lloyd JV. An increase in phosphatidic acid in the absence of changes in diacylglycerol in human platelets stimulated with ADP. *Int J Biochem* 25: 23-27, 1993
- 16) Lepage G, Roy CC. Direct trans esterification of all class of lipid in a one step reaction. *J Lipid Res* 27: 114-120, 1986
- 17) Fletcher MJ. A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin Chim Acta* 22: 393-397, 1968
- 18) Jones BA, Gores GJ. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *Am J Physiol* 273: G1174-G1188, 1997
- 19) Ip C, Ip MM, Loftus T, Shoemaker S, Shea-Eaton W. Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of the rat mammary gland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 689-696, 2000
- 20) Reddy BS. Novel approaches to the prevention of colon cancer by nutritional manipulation and chemoprevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 9: 239-247, 2000
- 21) Truitt A, McNeill G, Vanderhoek JY. Antiplatelet effects of conjugated linoleic acid isomers. *Biochim Biophys Acta* 1438: 239-246, 1999
- 22) Liu K, Belury MA. Conjugated linoleic acid reduces arachidonic

- acid content and PGE<sub>2</sub> synthesis in murine keratinocytes. *Cancer Letters* 127: 15-22, 1998
- 23) Belury MA, Kempa-Steczko A. Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids* 32: 199-204, 1997
- 24) Sebedio JL, Juaneda P, Dobson G, Ramilison I, Martin JC, Chardigny JM, Christie WW. Metabolites of conjugated isomers of linoleic acid (CLA) in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1345: 5-10, 1997
- 25) Nugteren DH. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by 8cis, 12trans, 14cis-eicosatrienoic acid and 5cis, 8trans, 12trans, 14cis-eicosatetraenoic acid. *Biochim Biophys Acta* 210: 171-176, 1970
- 26) Urquhart P, Parkin SM, Rogers JS, Bosley JA, Nicolaou A. The effect of conjugated linoleic acid on arachidonic acid metabolism and eicosanoid production in human saphenous vein endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1580: 150-160, 2002
- 27) Nishizuka Y. Perspectives on the role of protein kinase C in stimulus-response coupling. *J Natl Cancer Inst* 76: 363-370, 1986
- 28) Farquharson A, Wu H-CL, Grant I, Graf B, Choung J-J, Eremin O, Heys S, Wahle K. Possible mechanism for the putative antiatherogenic and antitumorigenic effects of conjugated polyenoic fatty acid. *Lipids* 34: S343, 1999
- 29) Voziyah PA, Haug JS, Melnykovich G. Mechanism of farnesol cytotoxicity: further evidence for the role of PKC-dependent signal transduction in farnesol-induced apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Comm* 212: 479-486, 1995