

간세포 암화과정에서 p/s 고정비율과 $\omega 3$ 지방산 급원에 따른 전암성 병변과 Glutathione 의존 해독화 효소계에 미치는 영향

이해정 · 김혜경 · 최혜미[§]

서울대학교 생활과학대학 식품영양학과

Different Sources of $\omega 3$ Fatty Acids at the Fixed Ratio of p/s Affect Glutathione Dependent Enzymes in Rat Hepatocarcinogenesis

Lee, Hae-Jeung · Kim, Hye-Kyung · Choi, Haymie[§]

Department of Food & Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT

This study is conducted to determine the effects of dietary source of $\omega 3$ fatty acids on preneoplastic foci and the glutathione dependent enzymes in rat hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine (DEN). Male Sprague-Dawley rats were fed one of three diets containing 10% (w/w) fats fixed p/s = -1.0 and $\omega 6/\omega 3$ ratio = -0.4 or 4.0 ; fish oil-corn oil blended (FC), corn oil-beef tallow-fish oil blended (CF), corn oil-beef tallow-perilla oil blended (CP), from gestation period. At 10 weeks, animals of experimental groups were injected intraperitoneally with DEN (200 mg/kg body weight) and two-thirds partial hepatectomy was carried out 3 weeks later and were sacrificed 8 weeks after DEN initiation. The area and number of glutathione S-transferase placenta (GST-P) positive foci were significantly decreased in rats fed diets containing fish oil (FC and CF) than those fed perilla oil diet (CP). Fish oil feeding significantly increased the activities of glutathione dependent enzymes. Rats fed diets containing fish oil (FC and CF) significantly increased the glutathione (GSH) content and the activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), and glutathione S-transferase (GST). Glutathione dependent enzymes had significantly negative correlation with GST-P positive foci. Glucose 6-phosphatase (G6Pase) was increased in rats feeding fish oil. Thiobarbituric acid reactive substances were not different among groups. Therefore, the preventive effect against hepatocarcinogenesis might be explained by induction of the glutathione dependent enzymes and G6Pase. (Korean J Nutrition 36(8) : 785~792, 2003)

KEY WORDS : fish oil, glutathione dependent enzymes, GST-P positive foci, G6Pase.

서 론

의학의 발달로 대부분의 질병들은 치료가 가능해졌으나 암은 아직도 불치의 병으로 남아 여전히 높은 사망률을 보이고 있다. 현재 한국 사회는 서구화된 식생활로 인해 암 발생 및 암으로 인한 사망이 증가하고 있다. 2001년 사망 원인통계결과¹⁾에 의하면 암, 뇌혈관질환, 심장질환, 당뇨병으로 인한 사망자가 전체 사망자의 50.4%를 차지하고 있는데 그중 암으로 인한 사망자는 전체 사망자의 24.4%로 사망원인 1위를 차지하였다. 이는 하루 평균 162명으로

지난 10년 전과 비교하면 18.3%나 증가되었다. 사람의 경우 암 발생의 80~90%는 환경인자에 기인하며²⁾ 암 발생의 20~40%가 식이 요인과 관련이 있으므로,³⁾ 식이 조절로 암 발생률을 감소시킬 수 있다.⁴⁾

암 발생과 식이 지방간의 관련성에 대한 연구가 많이 이루어져 왔으나^{4~6)} 암에 대한 식이 지방의 영향은 일관성 있게 일치되지는 않았으며,⁷⁾ 식이 지방의 섭취수준과 지방 산의 조성에 따라 암화과정에 미치는 영향이 다른 것으로 나타났다.⁸⁾ 불암물질 투여시 식이 지방의 양이 증가할수록 암의 발생을 증가시키며,^{9,10)} 불포화지방산은 포화 지방산에 비해 덜 촉진시키며,¹¹⁾ 단일 불포화 지방산은 중성적인 경향을 보이는데 비해¹²⁾ 다가 불포화 지방산의 경우 $\omega 6$ 계 지방산 중에서 옥수수기름에 많은 linoleic acid는 암 발생을 촉진시키는 경향이 보이고 $\omega 3$ 지방산은 오히려 암 발

접수일 : 2003년 7월 14일

채택일 : 2003년 9월 15일

[§]To whom correspondence should be addressed.

생을 억제하는 경향을 보인다고 보고하였다.¹³⁻¹⁵⁾

어유의 첨가는 diethylnitrosamine (DEN)과 간 부분 절제술로 유도된 간세포 암화과정¹⁶⁾을 유의적으로 억제하였으며,^{17,18)} azoxymethane (AOM)으로 유도된 간세포 암화 과정에서 22.3% 청어 기름의 첨가에 의해 전암성 병변의 수와 크기가 유의적으로 감소되었다.¹⁹⁾ 어유의 첨가가 간 해독화 효소체계를 자극시키고, 지방산 합성을 감소시키고, 간 세포체막의 구성을 변화시켜 막에 부착된 약물대사 효소계에 영향을 주며,²⁰⁾ 프로스타글란딘 E(2)의 생성을 억제시키고 지질과산화를 증가시키므로써 간세포 암화과정을 억제할 수 있다고 추측되나²¹⁾ 아직까지 정확한 기전은 밝혀지지 않고 있다. 최근에 밝혀진 fish oil의 항암기전은 cyclooxygenase-2의 발현을 억제시켜서 암세포의 증식을 막으면서 동시에 혈관신생도 저하시키고 AP-1과 ras 등의 oncogene 발현을 감소시키고 암세포의 분화를 촉진시키는 기작들이 제안되었다.²²⁾ DEN으로 개시시키고 phenobarbital 투여하여 화학적으로 간암을 유도한 실험에서 전암성 병변은 옥수수 기름에 비해 13.5%의 어유 첨가시 유의적으로 감소되었는데 이는 GSH reductase와 GST 효소를 증가시키는 것과 관련성이 있다고 보고되었다.¹⁹⁾

최근에는 특정지방의 섭취연구와 함께 $\omega 6/\omega 3$ 비율에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. $\omega 6$ 계와 $\omega 3$ 계 모두 우리 몸의 세포막에 중요한 성분들이고 필수 지방산의 공급원들이나 생체 내에서의 대사와 기능은 구별되므로 이들의 균형 있는 섭취가 정상적인 생리기전을 유지하거나 체내 방어시스템에 유리할 것이다.²³⁾ 암과 관련되어 식이 $\omega 6/\omega 3$ 지방산 비율이 9.43보다 4.0이하일 때 간세포 암화

과정을 효과적으로 억제하였다고 보고되었다.²⁴⁾

따라서 본 연구에서는 p/s ratio를 1.0으로, $\omega 6/\omega 3$ ratio는 0.4 또는 4.0으로 유지하면서 식이지방산의 급원을 조절하여 간암억제효과를 관찰하였다. 수태 전부터 다른 급원의 PUFA를 섭취한 Sprague-Dawley rat에 DEN과 70% 간부분 절제술로 암을 촉진시킨 후 전암성 병변과 glutathione 해독화 효소계에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. $\omega 3$ 의 급원으로는 α -linolenic acid (LNA ; 18 : 3) 가 풍부한 들기름과 eicosapentaenoic acid (EPA ; 20 : 5) 와 docosahesanoic acid (DHA ; 22 : 6) 가 풍부한 어유를 이용하였다.

실험방법 및 내용

1. 실험 동물 사용과 실험식이

암컷 Sprague-Dawley 종 흰쥐를 유한양행에서 공급받아 3군으로 나누고 교배시켰다. 어미 쥐에게 임신 2주전부터 실험식이를 공급하여 태어난 새끼 쥐들에게도 어미 쥐와 같은 식이를 공급하였다. 새끼 쥐가 10주령 되었을 때 웅성 30마리를 별암실험에 사용하였으며 실험이 종료될 때까지 같은 식이를 공급하였다(Table 1). 각 군의 식이 지방수준은 식이의 10% (w/w)로 하였고, p/s 비율은 1.0, $\omega 6/\omega 3$ 비율은 0.4 또는 4.0에 가깝도록 유지시키면서 PUFA의 구성만을 달리하였다 (Table 2). fish oil-corn oil (FC)군의 식이는 어유를 다량 첨가하면서 필수지방산을 공급해 주기 위해 식이 100 g당 옥수수기름 1.8%를 첨가하였고, corn oil-perilla (CP)군과 corn oil-fish oil (CF)

Table 1. Composition of experimental diets (g/100 g diet)

Component/Diet	FC	CF	CP
Corn starch	59.7	59.7	59.7
Casein	20.0	20.0	20.0
α -cellulose	5.0	5.0	5.0
Vitamin mixture ^a	1.0	1.0	1.0
Mineral mixture ^b	4.0	4.0	4.0
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3
Beef Tallow	—	3.5	4.0
Corn oil	1.8	5.0	5.0
Perilla oil	—	—	1.0
Fish oil	8.2	1.5	—
α -Tocopherol	0.019	0.015	0.015

^a Nutritional Biochemicals. ICN Life Science Group. Cleveland, Ohio. Vitamin mixture is composed of; vit.A acetate (500,000 IU/g) 1.8 g, vit D conc. (850,000 IU/g) 0.125 g, α -tocopherol (250 IU/g) 22.0 g, ascorbic acid 45.0 g, inositol 5.9 g, choline chloride 75.0 g, menadione 2.25 g, p-aminobenzoic acid 5.0 g, niacin 4.25 g, riboflavin 1.0 g, pyridoxine hydrochloride 1.0 g, calcium pantothenic acid 3.0 g, biotin 0.02 g, folic acid 0.09 g, vit B12 0.00135 g, and dextrose to 1 kg

^b Composition of mineral mixture, g/kg mixture: Calcium phosphate dibasic 500 g, Sodium chloride 74 g, Potassium sulfate 52 g, potassium citrate monohydrate 220g, Magnesium oxide 24 g, manganese carbonate (43~48% Mn) 3.5 g, ferric citrate (16~17% Fe) 6.0 g, cupric carbonate (53~55% Cu) 0.3 g, Potassium iodate 0.01 g, chromium potassium sulfate 0.55 g, Sodium selenite 0.11 g, sucrose, finely powdered 118.0 g

Table 2. Fatty acid composition of diets (%)

	FC	CF	CP
Saturated fatty acid	31.5	28.3	26.1
Monounsaturated fatty acid	25.8	37.6	37.9
Polyunsaturated fatty acid	42.5	33.3	34.8
p/s ratio ^a	1.34	1.18	1.33
ω_6/ω_3 ratio ^b	0.40	4.23	4.00

FC, diet containing a fat mixture composed of fish oil and corn oil (8.2 : 1.8) ; CF, diet containing a fat mixture composed of corn oil, beef tallow and fish oil (5 : 3.5 : 1.5) ; CP, diet containing a fat mixture composed of corn oil, beef tallow and perilla oil (5 : 4 : 1)

^aTotal polyunsaturated fatty acid/total saturated fatty acids in experimental diet

^bTotal ω_6/ω_3 fatty acids in experimental diet

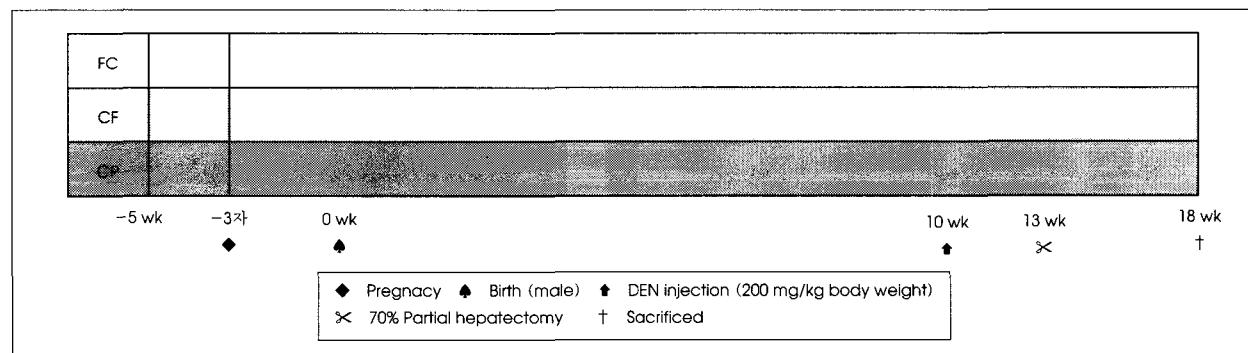


Fig. 1. Experimental Design.

군의 식이는 각각 들기름과 어유로 ω_3 지방산의 급원을 달리하였다. 공급받는 식이 중에 들어있는 지방의 자동산 폐를 방지하기 위해 α -tocopherol을 식이 지방의 0.2% (w/w) 수준이 되도록 첨가시켰다. 참치기름은 참치 안구에서 추출한 것으로 동원산업에서 기증받았다. 식이는 질소 충전하여 -20°C 냉장고에 보관하였으며 매일 공급해 주었다. 온도, 습도, 조명은 각각 $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $55 \pm 10\%$, 12시간(7 : 00~19 : 00)으로 조절해 주었다.

2. 실험설계

10주된 융성 Sprague Dawley 종 흰쥐에 Ito 등^[16]의 중기 발암 유도모델을 이용하여 강력한 개시제인 DEN (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO)을 0.9% 생리식염수에 녹여 체중 kg당 200 mg 수준으로 1회 복강주사하고, 3주 후에 2/3 간 부분 절제수술 (partial hepatectomy; PH)을 시행하여 암을 촉진시킨 후 5주 후에 희생시켰다 (Fig. 1).

3. 시료의 수집 및 전처리

실험동물을 단두하여 희생시킨 후 간을 적출하여 즉시 차가운 식염수로 세척한 다음 혈액, 지방질 및 결체 조직을 제거한 후 여과자로 여분의 수분을 제거하여 전체 간 무게를 측정하였다. 간의 일부는 면역조직학적 검사를 위해 면도칼 (razor blade)을 사용하여 2~3 mm 두께로 잘라 냉아세톤 (4°C)에 고정시킨 후 검사에 사용하였다. Total

glutathione 함량 측정을 위해 간을 적출한 즉시 0.5 g를 잘라 냉장고에 두었다가 3시간 후에 wet tissue 무게의 5배 부피의 1% picric acid 용액으로 균질화하여 $10,000 \times g$ 에서 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 취하여 4°C 에서 냉장하였다가 1시간 후에 분석하였다. 시료 분획을 위해 7 g의 간을 잘게 다진 후 균질용 용액 (50 mM phosphate buffers) 25 ml에 넣고 4°C 에서 균질화한 다음 고속 원심분리기에서 4°C , $10,000 \times g$ 의 조건 하에서 20분간 원심 분리하였다. 상층액을 다시 고속 원심분리기에서 4°C , $100,000 \times g$ 에서 1시간동안 원심분리를 하여 세포질 분획과 소포체 분획을 얻었다. 세포질 분획은 조심스럽게 뽑아내어 몇 개의 에펜드로프튜브에 넣어 액체질소로 급속냉동시키고, 소포체 분획은 균질용 용액 (20% glycerol 154 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA buffer, pH 7.4) 7 ml로 부유하여 에펜드로프튜브에 분주시켜 액체질소로 급속 냉동하여 세포질 분획과 함께 -70°C 에 냉동 보관하였다가 분석에 사용하였다.

4. 면역조직학적 검사

냉아세톤에 고정시킨 시료를 xylene으로 투명화시키고 파라핀으로 포매하여 $5 \mu\text{m}$ 두께로 절편하였다. 간 절편을 붙인 슬라이드 위의 파라핀을 xylene으로 녹여내고 농도하강순의 단계적 알콜 hydration과정을 거쳐 조직을 수

화시킨 다음 중류수와 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세척하였다. 간 조직내의 태반형 glutathione S-transferase positive foci (GST-P)의 분포와 크기를 확인하기 위해 avidin-biotin-peroxidase-complex (ABC) 방법²⁵⁾를 이용하여 면역조직화학적 염색을 하였다. 직경이 0.2 mm 이상인 GST-P 양성 병소의 면적과 수를 원색 화상분석기 (Cambridge Instruments, Quantiment 520)로 측정하였으며 단위 면적 (cm^2) 당 면적 (mm^2)과 갯수로 표시하여 비교하였다.

5. 생화학적 검사

1) 총 Glutathione 함량 측정

Griffith 방법²⁶⁾에 기초한 Anderson의 방법²⁷⁾에 따라 간 세포질 분획의 GSH 양을 측정하였다. 412 nm에서 DTNB로부터 형성된 TNB의 흡광도가 증가하는 속도를 측정하여 분당 변화된 흡광도를 산출하여 총 GSH 함량은 간 조직 g당 환원된 glutathione equivalents의 μmole 수로 표시하였다.

2) Glutathione S-transferase (GST) 활성도

Habig 등의 방법²⁸⁾에 따라 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB)와 환원형 glutathione (GSH)을 기질로 사용하여 세포질의 GST 활성도를 측정하였다. 25°C, 340 nm에서 1분간 흡광도 변화가 0.05이하로 되게 측정하였다. GST의 활성도는 CDNB의 분자흡광계수 $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 를 이용하여 효소활성도를 계산하여 단백질 mg당 1분동안 결합되는 CDNB의 nmole수로 표시하였다.

3) Glutathione peroxidase (GPx) 활성도

Tappel 등의 방법²⁹⁾에 따라 cumene hydroperoxide를 기질로 GPx의 활성도를 측정하였다. NADPH가 NADP⁺로 산화되는 정도를 340 nm에서 NADPH의 분자흡광계수 $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 를 이용하여 계산하였다. GPx활성도는 단백질 mg당 1분동안 산화되는 NADPH의 nmole수로 표시하였다.

4) Glutathione reductase (GR) 활성도

Carlberg와 Mannervick의 방법³⁰⁾에 따라 GR 활성도를 측정하였다. 산화형 glutathione과 NADPH를 시료에 첨가하여 NADPH가 산화되는 속도를 340 nm에서 측정하였다. GR 활성도는 단백질 mg당 1분동안 산화되는 NADPH의 nmole 수로 표시하였다.

5) Glucose 6-phosphatase (G6Pase) 활성도

Baginski 등의 방법³¹⁾에 따라 간 소포체 분획의 GPase

로부터 방출되어지는 무기인을 spectrophotometer로 700 nm에서 측정하였다. 1.5 mM phosphate용액을 표준용액으로 사용하고 효소 활성도는 1분간 생성시킨 반응산물의 mole 농도로 표시하였다.

6) 지질과산화물 측정

Buege 등의 방법³²⁾에 따라 간 소포체 분획의 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)의 양을 535 nm에서 흡광도로 측정하였다. Thiobarbituric acid와 반응한 lipid peroxidation의 생성물로 MDA를 측정하였으며 농도 계산은 malondialdehyde (MDA)의 분자흡광계수 $1.56 \times 105 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 를 이용하여 단백질 mg당 TBARS 농도를 표시하였다.

7) 단백질 함량 측정

세포질과 소포체의 단백질 함량은 Lowry 등의 방법³³⁾을 이용하여 측정하였고 표준용액으로 bovine serum albumin을 사용하였다.

6. 통계방법

실험결과는 SAS package 8.1를 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준오차를 계산하였고 duncan's multiple range test를 시행하여 각 군간의 평균값 차이를 검증하였으며 검정에 대한 유의확률은 $p < 0.05$ 일 때 의미가 있는 것으로 보았다.

결과 및 고찰

본 연구실의 선행연구에서 식이 지방산 p/s 비는 1.0로, ω_6/ω_3 비율은 4.06으로 고정하였을 때 전암성 병변의 면적과 수가 유의적으로 감소하였음을 보고하였다.²⁴⁾ 따라서 본 연구에서는 p/s 비율을 1.0으로 고정시키면서 ω_6/ω_3 비율을 0.4 또는 4.0으로 고정시키면서 ω_3 지방산 급원에 따른 전암성 병변과 glutathione 의존 효소계의 변화를 살펴보았다. 실험기간동안 쥐 무게와 사료 섭취량에서는 군간의 유의적 차이가 없었다.

1. 면역 조직학적 검사

간세포 암화과정에서 전암성 병변의 가장 효과적인 지표³⁴⁾라 불리우는 GST-P positive foci의 면적은 식이 지방에 의해 유의적인 차이가 있었다 (Fig. 2). Corn-fish oil (CF) 군이 가장 큰 억제효과를 보였으며, 그 다음으로는 fish oil (FC) 군이 corn-perilla oil (CP) 군에 비해 전암성 병변의 면적을 유의적으로 감소시켰다. GST-P positive foci의 수에 있어서는 CP군에 비해 FC군과 CF군이

유의적으로 큰 억제 효과를 보였으나 두 군간의 통계적 차이는 없었다(Fig. 2). Ogiso 등³⁵⁾은 본 연구에서 이용된 모델의 전암성 병변의 발현정도는 장기간 사육했을 때 발암의 발생과 직접적인 상관성이 높다고 보고하였다. 따라서 어유를 함유한 식이가 전암성 병변을 억제시킨 것은 어유가 간암의 발생을 억제시켰다고 할 수 있다. FC군과 CF군 모두 전암성 병변의 발현을 억제시켰으나 다량의 어유를 첨가한 FC군보다 소량의 어유를 첨가한 CF군에서 GST-P+ foci의 면적이 통계적으로 더 많이 감소되었다. Choi 등의 보고³⁶⁾에 의하면 다양한 식이 지방급원 간에 GST-P positive foci 면적과 수가 8주동안 섭취시켰을 때에는 큰 차이가 없었으나 22주 동안 섭취시켰을 때 참치기름군이 현저하게 감소되었음을 보고하였다.

2. Glutathione (GSH) 의존 효소계 활성도

총 glutathione 함량은 $\omega 3$ 지방산의 급원으로 어유를 포

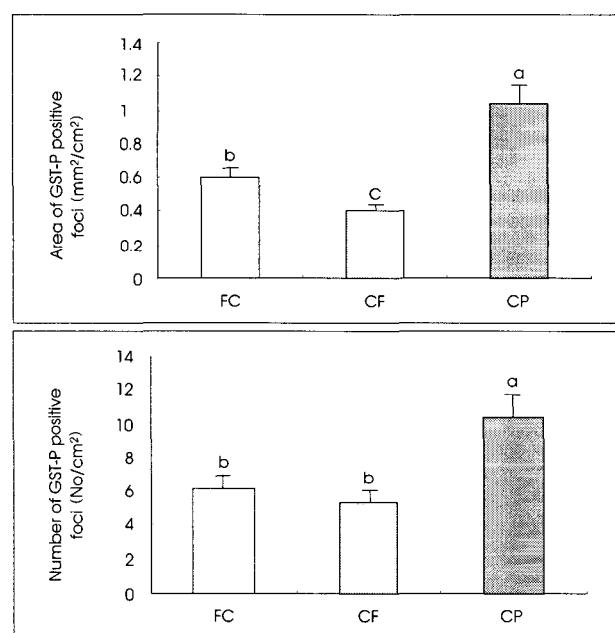


Fig. 2. Effect of dietary PUFA on the area and number of GST-P positive foci in rat hepatocarcinogenesis. FC, diet containing a fat mixture composed of fish oil and corn oil (8.2 : 1.8); CF, diet containing a fat mixture composed of corn oil, beef tallow and fish oil (5 : 3.5 : 1.5); CP, diet containing a fat mixture composed of corn oil, beef tallow and perilla oil (5 : 4 : 1). Values are mean \pm SE. Means with the same subscript are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

함한 FC군과 CF군에서 유의적으로 높았다 (Table 3). FC 군의 총 glutathione 함량이 가장 높았으나 CF군과 유의적인 차이는 없었다. GSH는 항산화기전이나 외부로부터 유입된 독성 물질제거 및 eicosanoid 대사과정, cell cycle 조절에 있어 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.³⁷⁾ $\omega 6/\omega 3$ 비율은 비슷해도 어유로 공급해 주었을 때 총 glutathione 함량이 더 증가되어서 간세포 암화과정에서 해독작용을 증가시키는 것으로 사료된다. 총 glutathione 함량 증가는 GR의 높은 활성과 관련이 있다.³⁸⁾ 총 glutathione 함량과 GST-P+ foci의 면적 ($r = -0.534$ $p < 0.05$) 과 수 ($r = -0.569$ $p < 0.05$)는 음의 상관관계를 보였다.

GPx 활성은 CP군에 비해 FC군과 CF군에서 유의적으로 높았다 (Table 3). GPx는 환원형 glutathione (GSH)를 기질로 지질과산화물을 해독화시켜 세포를 산화적 손상으로부터 보호한다.³⁹⁾ 식이지방의 불포화도를 살펴보면 FC 군이 1.34, CF군이 1.18으로 불포화도가 FC군과 CF군이 비슷하나 어유가 다량 함유된 FC군에서 GPx활성이 증가하였다. 어유를 소량 또는 다량 첨가한 군에서 총 glutathione 함량이 증가하였고 GPx의 활성 또한 높았다. GR는 GPx에 의해 생성된 산화형 glutathione (GSSG)를 NADPH을 사용하여 환원형 glutathione (GSH)로 환원시키는 역할을 담당한다.³⁸⁾ GR의 활성도는 어유로 $\omega 3$ 지방산을 공급한 FC군과 CF군에서 가장 높았고 (Table 3) 두 군간의 통계적 유의한 차이는 없었다. 증가된 GR의 활성이 GSH의 함량을 증가시키는데 기여했을 것으로 생각된다. GST의 활성도는 어유의 첨가로 증가하였는데 (Table 3), GST는 1단계 약물대사효소계에서 활성화된 친전자성 물질에 GSH를 결합시켜 수용성 물질로 배설시키는데에 관여하며 간세포 암화과정에서 그 활성이 증가된다고 한다. 어유를 첨가한 FC군과 CF군에서 세포내 산화물 제거를 위하여 GST의 활성이 더 증가되었을 것으로 사료된다. 본 연구에서는 GST 활성이 FC군보다 CF군에서 좀 더 높은 경향을 보였는데 이것은 CF군이 FC군보다 GST-P positive foci의 면적이 작았던 결과와 음의 상관성을 보인다 ($r = -0.722$, $p < 0.05$). Sasagawa 등³⁹⁾은 lard나 arachidonic-rich oil을 공급했을 때보다 10% EPA를 공급했을 때 GST-P positive foci의 면적이 50% 정도 유의적으로

Table 3. Effect of dietary PUFA on the total glutathione content (GSH), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione reductase (GR) activities in rat hepatocarcinogenesis

Group (Number of group)	GSH (μ mole reduced glutathione eq./g liver)	GPx (nmole NAD PH/mg protein/min)	GR (nmole NAD PH/mg protein/min)
FC (5)	8.21 ± 0.23^a	585.21 ± 23.30^a	78.67 ± 6.32^a
CF (5)	7.33 ± 0.16^{ab}	466.33 ± 22.61^b	69.58 ± 5.85^{ab}
CP (5)	5.54 ± 0.20^c	378.54 ± 19.27^c	45.34 ± 6.67^c

로 감소하였다고 보고하였다. 본 실험에 사용된 어유속에는 EPA가 6%, DHA가 28.5%로 다량 함유되어 있기에 본 실험에서도 효과적으로 GST-P positive foci의 면적을 감소시켰을 것이다.

3. Glucose-6 phosphatase 활성도와 지질과산화물 함량

G6Pase 활성도는 어유 첨가군인 CF군과 FC군이 유의적으로 높았다 (Table 4). CF군과 CP군의 결과를 살펴보면 ω_6/ω_3 비율을 4.0으로 고정하였을 때 ω_3 급원으로 어유나 들기름의 첨가에 따른 G6Pase의 활성의 변화는 없었다. Kim 등의 보고²⁴⁾에서도 간세포 암화과정에서 ω_6/ω_3 비율을 1.65로 고정했을 때 ω_3 급원으로 들기름과 참치기름간의 G6Pase 활성도 차이는 없었다. G6Pase는 막 부착효소로서 세포가 손상받게 되면 그 활성이 감소한다고 알려져 있어 막 안정도의 지표로 사용된다.^{24,40)} 또한 여러 연구에서 간 손상 및 간세포 암화과정동안 m-RNA 수준과 효소활성도가 감소한다고 알려져 왔으며^{31,41)} 양성증식 성결절은 조면소포체를 많이 가지고 있으나 G6Pase와 같은 효소의 활성도가 낮다고 하였다.⁴²⁾ G6Pase 활성도는 GST-P 양성병소의 면적 ($r = -0.736$, $p < 0.05$)과 수 ($r = -0.702$, $p < 0.05$)에 있어 각각 유의한 음의 상관관계를 보였다. G6Pase 활성이 GST-P 양성병소와 음의 상관관계를 보였던 Kang⁴³⁾과 Woo⁴⁴⁾의 보고와 일치하였다.

지질과산화물함량은 p/s의 비율이 비슷할 때 ω_3 지방산의 급원으로 어유를 다량 첨가하는 것은 지질과산화물의 함량을 약간 증가시키는 경향을 보였을 뿐 군간의 유의적 차이는 없었다 (Table 4). 불포화지방산의 섭취가 높을수록 지질과산화도가 높아지고, 단기 사육 모델에서 대조군에 비해 어유군의 지질과산화물의 생성률이 높았으나 장기간 섭취시킨 모델의 경우에는 지질과산화물 생성량은 비슷하였다.⁴⁵⁾ 본 연구의 기간도 오랜동안 PUFA를 섭취시킨 중·장기 모델에 해당하므로 불포화도가 높은 ω_3 을 장기간 섭취시켜도 지질과산화물 함량에는 크게 영향을 주지 않았을 것으로 생각된다. 또한 유지의 자동산폐를 막기위해 첨가된 비타민 E의 함량이 충분해서 비타민 E에 의한 항산화 작용에 의해 지질과산화물 방지되었을 수도 있었을 것이다. 본 실험과 같은 실험 식이와 실험설계로 연구보고

한 Kim과 Choi⁴⁶⁾는 ω_3 지방산의 급원으로 어유를 첨가한 군이 들기름을 첨가한 군에 비해 fatty acid synthase (FAS)와 glucose-6 phosphate dehydrogenase의 활성을 유의적으로 감소시켰다고 보고하였다. 즉, 어유가 체내에서 지방합성효소의 활성을 억제시키는 것도 체내 지질과산화물의 함량을 낮추는 데 도움을 줄 수 있었을 것이다. 최근 연구에 의하면 FAS 발현의 증가는 유방암, 자궁내막암, 대장암의 발생과 관련이 있으며, FAS inhibitor가 실제 암을 치료하는데 도움을 주었다고 보고되었다.^{47,48)}

이상의 결과를 토대로 어유를 첨가한 군의 GST-P positive foci의 면적과 수는 유의적으로 감소되었으며, GST-P positive foci의 면적과 수는 총 glutathione 함량 ($r = -0.534$ 과 $r = -0.569$, $p < 0.05$)과 GPx ($r = -0.688$ 과 $r = -0.757$, $p < 0.05$)와 GR ($r = -0.546$ 과 $r = -0.692$, $p < 0.05$) GST등의 활성도 ($r = -0.722$ 과 $r = -0.768$, $p < 0.05$)와는 음의 상관관계를 보였고, 어유의 섭취에 의해 G6Pase의 활성이 증가하였다. 따라서 어유의 항암효과는 어유의 glutathione 의존 효소계와 G6Pase의 활성을 증가시켜 전암성 병변의 발현을 억제시켰다고 사료된다. 어유의 함량에 따른 결과를 보면 어유를 다량 첨가하여 ω_6/ω_3 비율이 0.40인 군보다 4.23인 군이 통계적으로 유의하게 전암성 병변의 면적을 낮추었으나 전암성 병변의 수와 GPx를 제외한 glutathione 의존 효소계의 활성에는 유의적인 차이가 없었다.

요약 및 결론

본 연구는 태내와 이유기부터 일정한 비율 ($p/s = 1.0$, $\omega_6/\omega_3 = 0.4$ or 4.0)의 불포화 지방산들을 함유한 식이를 지속적으로 공급시키면서 생후 10주령에 DEN과 간 부분 절제수술로 발암을 유발하였을 때 ω_3 지방산의 급원에 따른 전암성 병변의 발현과 glutathione 의존 효소계의 활성에 미치는 영향을 규명하기 위해 수행되었다.

1) 전암성 병변의 면적과 수는 들기름을 첨가한 corn-perilla oil (CP)군보다 어유를 첨가한 FC군과 CF군에서 현저히 감소되었다. 어유를 다량 첨가하여 ω_6/ω_3 비율이

Table 4. Effect of dietary PUFA on glutathione S-transferase (GST) activity, glucose 6-phosphatase activity (G6Pase), and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in rat hepatocarcinogenesis

Group (Number of group)	GST (nmole CDNB conjugated/mg protein/min)	G6Pase (nmole Pi liberated/mg protein/min)	TBARS nmole/mg protein
FC (5)	1028.21 ± 43.45 ^{ab}	698.21 ± 16.43 ^{ab}	0.696 ± 0.05 ^{ns}
CF (5)	1237.33 ± 57.76 ^a	735.80 ± 18.34 ^a	0.515 ± 0.02
CP (5)	859.54 ± 34.19 ^c	543.57 ± 20.44 ^c	0.613 ± 0.04

0.40인 FC군보다 어유를 소량 첨가하여 $\omega 6/\omega 3$ 비율이 4.23인 CF군이 전암성 병변의 면적을 유의적으로 낮추었으나 수에 있어서는 유의적인 차이가 없었다.

2) 총 glutathione 함량은 perilla oil를 첨가한 군 (CP) 보다 fish oil를 첨가한 군 (FC와 CF)에서 유의적으로 높았으나 두 군간의 유의적인 차이는 없었다. GPx의 활성도는 FC군에서 가장 높았고 그 다음으로 CF군이 높았으며 CP군에서 가장 낮은 활성을 보였다. GR의 활성도는 FC군과 CF군에서 높았으며 두 군간의 유의적인 차이는 없었다. GST 활성도는 FC군과 CF군에서 높았으며 두 군간의 유의적 차이는 없었다.

3) G6Pase의 활성도는 CP군이 가장 낮았고 CF군에서 가장 높게 나타났으나 FC군과 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 지질과산화물의 함량은 FC군이 가장 높았으나 세 군간의 유의한 차이는 없었다.

본 실험의 결과를 보면, Ito 중기 간암 모델에서 p/s와 $\omega 6/\omega 3$ 비율을 고정시켰을 때 $\omega 3$ 지방산의 급원으로 들기름을 사용하는 것보다 어유를 첨가하는 것이 총 glutathione 의존 효소계를 활성화시키고 간 소포체막을 안정화 시켜 간 암화과정의 촉진과정을 억제하는데 기여했을 것이라 사료된다. 즉, EPA와 DHA가 풍부한 어유가 GST-P positive foci를 감소시켰으며 이러한 항암작용의 차이는 다른 급원의 PUFA에 의한 것으로 보여짐에 따라, 앞으로 이에 대한 연구 및 다른 항암기전에 관한 연구도 계속 수행되어져야 할 것이다.

Literature cited

- 1) Korea National Statistical Office: The cause of death statistics (1990-2000) in 2002
- 2) 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(6) : 1191-308, 1981
- 3) Ames NN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci* 92: 5258-5265, 1995
- 4) Kushi L, Giovannucci E. Dietary fat and cancer. *Am J Med Dec* 30: 63S-70S, 2002
- 5) Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther* 83(3) : 217-244, 1999
- 6) Woutersen RA, Appel MJ, van Garderen-Hoetmer A, Wijnands MV. Dietary fat and carcinogenesis. *Mutat Res* 443: 111-127, 1999
- 7) Bertone ER, Rosner BA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Speizer FE, Colditz GA, Willett WC, Hankinson SE. Dietary fat intake and ovarian cancer in a cohort of US women. *Am J Epidemiol* 156 (1) : 22-31, 2002
- 8) Cohen LA, Thompson DO, Maeura Y, Chois K, Blank ME, Rose DP. Dietary fat and mammary cancer. I. Promoting effects of different dietary fats on N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst* 77: 33-42, 1986
- 9) Wynder EL. Amount and type of fat/fiber in nutritional carcinogenesis. *Prev Med* 16(4) : 451-459, 1987
- 10) Howard PG, Travis L, Wendy SK and Henry CP. Effects of dietary fat on the initiation of hepatocarcinogenesis by diethylnitrosamine or 2-acetylaminofluorene in rats. *Carcinogenesis* 12: 991-995, 1991
- 11) Bartsch H, Nair J, Owen RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 20 (12) : 2209-2218, 1999
- 12) Solanas M, Hurtado A, Costa I, Moral R, Menendez JA, Colomer R, Escrich E. Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *Int J Oncol* 21 (4) : 745-753, 2002
- 13) Terry PD, Rohan TE, Wolk A. Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: a review of the epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr* 77 (3) : 532-543, 2003
- 14) Reddy BS, 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 (23) : 6642-6647, 1988
- 15) Bagga D, Anders KH, Wang HJ, Glaspy JA. Long-chain n-3-to-n-6 polyunsaturated fatty acid ratios in breast adipose tissue from women with and without breast cancer. *Nutr Cancer* 42 (2) : 180-185, 2002
- 16) Ito N, Tsuda H, Tatematsu M, Inoue T, Tagawa Y, Aoki T, Uwagawa S, Kagawa M, Ogiso T, Masui T, et al. Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats-an approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis* 9 (3) : 387-394, 1988
- 17) Rahman KM, Sugie S, Okamoto K, Watanabe T, Tanaka T, Mori H. Modulating effects of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids in initiation and postinitiation stages of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res* 90: 31-39, 1999
- 18) Lii CK, Ou CC, Liu KL, Liu JY, Lin WL, Chen HW. Suppression of altered hepatic foci development by a high fish oil diet compared with a high corn oil diet in rats. *Nutr Cancer* 38 (1) : 50-59, 2000
- 19) Ko YJ, Lii CK, Ou CC, Liu JY, Lin WL, Chen HW. Comparison of the effect of fish oil and corn oil on chemical-induced hepatic enzyme-altered foci in rats. *J Agric Food Chem* 48 (9) : 4144-4150, 2000
- 20) Sugie S, Okamoto K, Tanaka T, Mori H, Reddy BS, Satoh K. Effect of fish oil on the development of AOM-induced glutathione S-transferase placental form positive hepatocellular foci in male F344 rats. *Nutr Cancer* 24 (2) : 187-195, 1995
- 21) Shao Y, Pardini L, Pardini RS. Intervention of transplantable human mammary carcinoma MX-1 chemotherapy with dietary menhaden oil in athymic mice: increased therapeutic effects and decreased toxicity of cyclophosphamide. *Nutr Cancer* 28 (1) :

- 63-73, 1997
- 22) Hardman WE. Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy. *J Nutr* 132(11 Suppl) : 3508S-3512S, 2002
 - 23) Choi H. 21st Nutrition, In: lipid, pp.77-82. Kyoymunsa, Seoul, 2000
 - 24) Kim Y, Ji SK, Choi H. Modulation of liver microsomal monooxygenase system by dietary n-6/n-3 ratio in rat hepatocarcinogenesis. *Nutr Cancer* 37(1) : 65-72, 2000
 - 25) Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochim Cytochem* 29 (4) : 577-580, 1981
 - 26) Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106(1) : 207-212, 1980
 - 27) Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 113: 548-555, 1985
 - 28) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249 (22) : 7130-7139, 1974
 - 29) Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods Enzymol* 52: 506-513 1978
 - 30) Carlberg I and Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113: 484-490, 1985
 - 31) Baginski ES, Foa PP, Zak B. Glucose 6-phosphatase. *Methods in Enzymatic Anal* 2: 876-880, 1983
 - 32) Buege JA and Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52: 302-310 1978
 - 33) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
 - 34) Sato K. Glutathione transferases as markers of preneoplasia and neoplasia. *Adv Cancer Res* 52: 205-255, 1989
 - 35) Ogiso T, Tatematsu M, Tamano S, Hasegawa R, Ito N. Correlation between medium term liver bioassay system data and results of long term testing in rats. *Carcinogenesis* 11: 561-566, 1990
 - 36) Choi H, Woo J, Kim KT. Effects of w3 fatty Acids on the preneoplastic lesions and drug-metabolizing enzyme activities in hepatocarcinogenesis. Proceedings of the international symposium on natural antioxidants: Molecular mechanisms and health effects. AOCS Press, Illinois, Chapter 64: 633-643, 1996
 - 37) Dickinson DA and Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64 (5-6) : 1019-1026, 2002
 - 38) Rahman Q, Abidi P, Afaq F, Schiffmann D, Mossman BT, Kamp DW, Athar M. Glutathione redox system in oxidative lung injury. *Crit Rev Toxicol* 29 (6) : 543-568, 1999
 - 39) Sasagawa T, Kosai K, Ota Y, Mori M, Okita M. Influences of a dietary fatty acid composition on the emergence of glutathione S-transferase-P (GST-P) positive foci in the liver of carcinogen-treated rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 67 (5) : 327-332, 2002
 - 40) You JS and Chang KJ. Taurine protects the liver against lipid peroxidation and membrane disintegration during rat hepatocarcinogenesis. *Adv Exp Med Biol* 442: 105-112, 1998
 - 41) Dragan YP, Rizvi T, Xu YH, Hully JR, Bawa N, Campbell HA, Maronpot RR, Pitot HC. An initiation-promotion assay in rat liver as a potential complement to the 2-year carcinogenesis bioassay. *Fundam Appl Toxicol* 16 (3) : 525-547, 1991
 - 42) Karnik AB, Thakore KN, Nigam SK, Babu KA, Lakkad BC, Bhatt DK, Kashyap SK, Chatterjee SK. Studies on glucose-6-phosphatase, fructose-1,6-diphosphatase activity, glycogen distribution and endoplasmic reticulum changes during hexachlorocyclohexane induced hepatocarcinogenesis in pure inbred Swiss mice. *Neoplasma* 28 (5) : 575-584, 1981
 - 43) Kang S. Effects of corn oil and tuna oil levels on preneoplastic foci and glutathione-dependent detoxifying enzymes in rat hepatocellular carcinogenesis. Seoul National University, Graduate school, 1996
 - 44) Woo JS. Effects of dietary garlic powder on preneoplastic foci and glutathione-dependent detoxifying enzymes in rat hepatocellular carcinogenesis. Seoul National University, Graduate school, 1994
 - 45) Lokesh BR, Mathur SN, Spector AA. Effect of fatty acid saturation on NADPH-dependent lipid peroxidation in rat liver microsomes. *J Lipid Res* 22 (6) : 905-915, 1981
 - 46) Kim HK and Choi H. Suppression of hepatic lipogenic enzyme by dietary fish oil in rat hepatocarcinogenesis. *J Toxicol Pub Health* 14 (3) : 285-291, 1998
 - 47) Alo PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, and Tondo UD. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer* 77: 474-482, 1996
 - 48) Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgram LZ, Zahurak M., Pasterнак GK, Kuhajda FP, and Hamilton SR. Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 150 (1) : 201-208, 1997