

간암세포 (HepG2 Cell)에서의 식이성 CLA (Conjugated Linoleic Acid)가 항동맥경화성 인자에 미치는 영향*

오현희 · 문희정 · 이명숙[§]

성신여자대학교 식품영양학과

Effect of CLA (Conjugated Linoleic Acid) on the Anti-Atherosclerotic Factors in Human Hepatoma HepG2 Cells*

Oh, Hyunhee · Mun, Hejung · Lee, Myoungsook[§]

Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Korea

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) is the mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid (LA), which is found abundantly in dairy products and meats. This study was performed to investigate the anticarcinogenic effect of CLA in HepG2 hepatoma cells. HepG2 cell were treated with LA and CLA at the various concentrations of 10, 20, 40, 80 uM each at different incubation times. After each incubation times, cell proliferation, fatty acids incorporation into cell, peroxidation and postaglandin E₂ (PGE₂) and thromboxane A₂ (TXA₂) for the eicosanoid metabolism were measured. LA treated HepG2 cells were increased cell growth 6 - 70% of control whereas CLA increased cell death the half of those in LA group (p < 0.001). LA and CLA were incorporated very well into the cellular membranes four times higher than in control according to concentration and longer incubation times. Moreover, LA synthesized significantly arachidonic acids corresponding with LA concentration compared to CLA supplementation. The supplementation with LA increased intracellular lipid peroxides concentration corresponding with LA concentration and five times higher than those in CLA significantly at any incubation times (p < 0.001). PGE₂ and TXA₂ levels were three to twenty times lower in condition of CLA treatments than LA, respectively. Overall, the dietary CLA might change the HepG2 cell growth by the changes of cell composition, production of lipid peroxide. Since CLA have not changed the levels of arachidonic acid of cell membrane, which was sources of eicosanoids, eicosanoid synthesis was not increased in CLA compared to LA. Our results was suggest CLA has a possibility to protect the progress of atherosclerosis because CLA does not produce lipid production and endothelial contraction factors in liver. (*Korean J Nutrition* 37(3): 182~192, 2004)

KEY WORDS : conjugated linoleic acid (CLA), HepG2 cell, lipid peroxidation, prostaglandin E₂ (PGE₂), thromboxane A₂ (TXA₂).

서 론

현재 우리 나라에서는 환경공해, 인구의 노령화, 의료수준의 향상과 운동부족, 식이 섭취의 서구화된 식생활로 인하여 선진국과 같이 관상동맥질환자 및 암 환자의 발생이 증가하고 있다. 98년 통계청의 사망 원인 분석 결과에 의하면 뇌혈관 질환과 심장 질환과 같이 순환계 질환 사망률

이 1, 2위를 기록하고 있고 그 뒤를 이어 악성 신생물 질환으로 인구 10만명 당 70.9명을 기록하고 있다. 이들 질환은 생활습관 및 주변 환경에 큰 변화가 없는 한 사망률의 증가는 계속될 것으로 추정되고 있으며 이미 관상동맥 질환은 많은 임상연구를 통해 직접적인 관련성이 증명되고 있다.^{1,2)}

인체에게 있어서 식이성 불포화지방산 (polyunsaturated fatty acids: PUFA)의 섭취는 동맥경화증의 완화와 더불어 심혈관질환 (cardiovascular heart diseases: CHD)의 발병률을 감소시키며, 특히 유지의 linoleic acid (LA), linoleic acid (LNA) 섭취는 CHD 위험을 감소시키고 관상동맥질환을 보호할 수 있다는 연구가 발표되었다.³⁻⁶⁾ LA는

접수일 : 2004년 1월 12일

채택일 : 2004년 4월 13일

*This research was supported by the Shin-II foundation.

[§]To whom correspondence should be addressed.

LDL농도를 저하시키는데 간의 콜레스테롤 생합성을 조절하고 LDL 수용체 합성을 하향 조절하는 기전이 규명되기도 하였다. 또한 산화된 LDL은 fatty streak 형성에 중요한 단계로 LDL의 산화 역시 동맥경화증에 있어서 매우 중요하다.⁷⁾ 그러나, LA는 혈중 LDL 농도는 감소시키지만 생체 내에서는 LDL의 산화를 촉진시키는 부작용을 지니고 있어서 이의 식이성 대체물질이 시급하게 요구되었다. 최근, 필수 지방산인 LA의 이성체인 conjugated linoleic acid (CLA)가 동물의 피부, 전위 및 유방암 발생 실험에서 강한 항암물질임이 증명되어 새로운 천연 항암물질로 분류되고 항암기작에 대해 많은 연구가 진행되고 있는 중이다.⁷⁻¹⁰⁾ 뿐만 아니라 CLA는 체지방감소, 혈중 cholesterol 감소, 면역 증진효과 등 여러 가지 생리적인 효과를 가진다는 보고도 있다.¹¹⁾

CLA는 1987년 M. Pariza가 구운 쇠고기에서 분리, 동정한 동물성 지방산으로 육류, 낙농제품, 해산물 및 식물류 등 자연식품에도 존재한다.¹²⁾ CLA는 LA의 9, 11번 또는 10, 12번 탄소 위치에 공액 이중결합을 지닌 위치 이성체 및 기하 (*cis*-, *trans*-) 이성체를 통칭한 것으로 동물조직의 인지질과 결합력이 높은 *cis*-9, *trans*-11 CLA가 생물학적 활성이 가장 크다.^{12,13)} LA가 실험동물에서 암 형성을 촉진하는 반면 CLA는 랫드의 유방암, 대장암 마우스의 전위종양과 피부암 발생의 예방인자로서 부각되고 있고 사실상 1990년대 대부분의 CLA 연구는 항암작용에 관한 연구가 주류를 이룬다.¹²⁻¹⁵⁾ CLA 항암효과의 기전으로는 항산화 효과와 에이코사노이드 (eicosanoid)에서의 변화에 의한 것으로 집약되고 있다.¹⁵⁾ 다른 항산화 작용을 갖는 많은 물질들이 암예방 효과와 연관성이 있는 것으로 보아서 기전적 설명이 우선되고 있다. 그러나, CLA 농도가 낮을수록 과산화물 생성을 낮춘다는 보고¹⁶⁾와 CLA와 그 대사산물이 PUFA처럼 산화적 스트레스 조건하에서 반응하는 것은 유사하나 과산화지질 생성을 저해하지 않는다는 상반된 연구보고도 있다.¹⁷⁾ 다른 가설로는 prostaglandin 생합성과 연관된 것으로 Cyclooxygenase 2 (COX-2) 효소에 의해서 생성되는 prostaglandin 류가 염증반응, 면역반응 그리고 암발생에도 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다.^{18,19)} 반면 COX-1은 체내에 널리 분포하면서 일반적 생리 현상의 조절인자로서 역할을 담당하고 있으나, COX-2는 염증 등의 외부의 영향으로 세포내에서 유도되는 것으로 알려져 있다. CLA는 LA와 같이 사슬연장과 불포화도 증가 과정에 따라서 에이코사노이드합성에 관여한다. 그러나 conjugated diene구조에는 영향을 주지 않으며 단지 아라키돈산 (C20 : 4) 합성이 미비하여 간접적인 항염증성, 항동맥경화성 및

항암 효과를 나타낸다고 한다.²⁰⁾ LA 또는 CLA를 세포에 투여하면 모든 세포주에서 세포증식의 증감을 보여주었는데 이는 LA와 CLA가 Δ6- 혹은 Δ5-desaturase의 유사 기질로써 아라키돈산으로 전환되는 과정에서 서로 방해 또는 간섭을 일으키기 때문이라 생각된다.

CLA의 항동맥경화에 관한 연구로는 햄스터에 CLA와 LA를 투여한 결과 총콜레스테롤이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으나 HDL은 변화가 없었고, fatty streak의 생성이 유의적으로 감소한 결과를 발표하였다.^{21,22)} Lee 등은 CLA 투여군 (0.5 g CLA/kg)에서 대조군 (0.5 g coconut oil/kg)에 비해 LDL과 중성지방은 감소하나 fatty streak는 유의적인 차이가 없었다.²³⁾ 또한 CLA가 HepG2 cell에서 apolipoprotein B의 분비를 감소시킨다는 연구결과도 발표되었다. 반면 Munday 등은 C57BL/6 마우스의 경우 CLA를 투여한 결과 HDL이나 총콜레스테롤의 농도에는 변화가 없지만 HDL/TC의 비율과 fatty streak area는 유의적으로 증가했다.²⁴⁾ 결과적으로 CLA는 간의 지질대사에 영향을 주어 지단백질이나 중성지방 합성과 체지방의 증감의 효과로 인해 fatty streak의 형성에 영향을 주는 것으로 생각되어지고 있다.

이와 같이 CLA에 대한 항암성, 체지방 변화 및 면역기능 등을 향상시킨다는 연구결과에 비하여 동맥경화에 관한 논문은 CLA에 의한 혈중지질 농도의 변화를 간의 지질대사와 연관되어 설명하고 있는 것과 fatty streak를 분석한 것에 불과하며 아울러 HepG2 세포를 이용한 연구는 매우 부족하다.¹³⁾ 따라서, 본 연구에서는 인체 간의 지질대사 변화를 관찰하기 위하여 HepG2 간암세포를 이용하여 LA를 대조로 CLA를 투여한 다음 세포 증식과 세포막의 지방산 조성변화, OxLDL의 과산화물 생성 억제 효과 및 PGE₂와 TXA₂를 포함한 에이코사노이드 합성 등에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. HepG2 간암세포를 선정한 것은 일반 hepatocyte의 기능을 모두 가지고 있고 증식률이 빠르기 때문에 간 대사 연구자가 매우 선호하는 세포이며 본 연구의 목표인 항 동맥경화 기전이 항산화와 eicosanoid 대사로 접근하였기 때문이다. 특히, CLA의 항암기작으로 알려진 항산화 기작에 관한 다양한 연구를 바탕으로 CLA의 항동맥경화 효과를 밝힘으로써 간 조직의 손상 예방인자로서 CLA의 이용가능성도 알리고자 한다.

재료 및 방법

1. 간암세포의 배양 및 지방산 처리

간암 세포는 RPMI Media에 antibiotics와 fetal calf

serum을 첨가하였다. 세포는 일정한 습도를 유지하는 37°C incubator에서 공기 (95%)와 CO₂ (5%)의 혼합기체를 계속 공급하면서 배양시키고 3~4일 마다 계대배양하며 trypan blue를 이용한 생존율측정도 실시하였다. 지방산 투여는 Van Grembrock 방법을 수정하여 처치하되 산화물이 생성되지 않도록 주의하였다.²⁵⁾ 처리농도와 배양시간은 사전 실험에서 얻은 결과를 바탕으로 LA와 CLA를 각각 10, 20, 40 µM으로 배양 시간 (0, 24, 48, 72시간)에 따라 CLA의 항염증성 및 항동맥경화성 또는 항산화 정도의 효과를 살펴보고자 하였다.

2. 세포증식측정

세포의 증식율은 hemacytometer를 이용한 cell counting 법과 MTT를 수정한 XTT법을 병행 측정하였으나, Paull과 Scudiero 등에 의해 처음으로 고안된 비방사능법인 XTT법에 의한 결과를 제시하였다.²⁶⁾ 측정원리는 XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salts)가 생존하는 세포의 미토콘드리아내의 탈수소효소 활성에 의하여 분해됨으로써 염색 생성하는 성질을 이용하여 생존하는 세포의 수를 ELISA reader로 490 nm 흡광도에서 측정하였다. 이는 기존의 MTT 방법보다 민감도가 높기 때문에 세포수가 적을 경우에도 측정이 가능하다. 또한 XTT의 data 안정성을 위하여 well plate의 세포 수와 XTT activity의 상관관계를 살펴본 결과 세포가 well plate 내에 10⁵ 이상 존재시 투여군 간의 비교분석이 용이함을 알 수 있었다. 그러므로 HepG2 세포의 doubling time을 고려하여 cell seeding을 1 × 10⁵으로 정할 수 있었다.

3. 세포내의 지방산 분석

간암 세포를 분쇄하여 Folch의 방법²⁷⁾에 의해 지질을 추출하였다. Chloroform : methanol : NaCl (3 : 47 : 48)의 복합용액, methylation시약 (BF₃-methanol : methanol : benzen, 25 : 55 : 20)과 internal standard를 넣고, heating block에서 100°C에서 90분간 반응시켜 메틸에스터를 생성시켰다. GC (HP 5890 II plus)로 지방산을 분리하고 표준지방산과 비교하여 지방산 분리를 확인하여 정량하였다.

4. OxLDL 분리와 지질과산화물의 분석 (TBARS)

4~15% gradient gel (PhastGel system, Pharmacia)와 native buffer strips를 이용하여 전기영동을 하여 전개가 끝난 gel은 coomassie blue로 염색하였다.²⁸⁾ 일반적으로 산화된 LDL은 (-) charge가 증가한다. 지질과산화물

함량의 측정을 위하여 Packer와 Smith법을 수정한 thio-barbituric acid (TBA) 방법으로 세포의 지질과산화물을 생성된 malondialdehyde (MDA) 함량으로 정량 하였다.²⁹⁾ 표준 시약으로 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하여 1 mg protein의 양에 따라 생성된 TBARS 값으로 처리군 간 비교하였다.

5. Prostaglandin E₂ (PGE₂)와 thromboxane A₂ (TXA₂) 측정

본 연구에서는 여러 종류의 에이코사노이드 중에서 암세포 증식과 관련된 PGE₂와 이와 동일 계열인 TXA₂를 분석하였고 세포 분쇄액에서 방사 면역법 (RIA)에 의한 kit를 이용하여 PGE₂ (Amersham, RPA)와 TXA₂를 측정하였다.^{30,31)} TXA₂는 매우 불안정하므로 thromboxane B₂ (TXB₂)용 RIA kit (Amersham)를 사용하여 TXB₂의 양을 측정하였고 TXA₂의 지표로 삼았다.

6. Protein 정량

단백질 정량은 Bradford법에 따라 측정하였다.³²⁾ 95% ethanol에 coomassie blue 100 mg을 넣은 다음 85% phosphoric acid 10 ml을 넣어 증류수를 1 l 채워 발색시약으로 사용하였다. 표준 품으로 Bovine serum albumin을 사용한다. TBARS, PGE₂ TXA₂ 수준을 1 mg 단백질량으로 표기하여 비교하였다.

7. 통계처리

본 연구에서 얻은 모든 결과는 Minitab을 이용하여 통계처리를 하였으며 각 실험군마다 평균과 표준편차를 구하였다. p < 0.05, p < 0.01 또는 p < 0.001 수준에서 ANOVA test를 이용하여 군간 유의성을 검증하였으며, 시간에 따른 유의성을 검증할 때는 t-test로 두 군간의 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 세포 증식율 (Cell proliferation)

일반적으로 항암효과로써의 지방산 투여량이 암세포 종류에 따라 다양하여 지방산이 주로 관여하는 대장암 및 유방암에 투여하는 양을 기준으로 LA를 0.5, 1, 3, 5 µM 투여하여 24 hr 경과한 후 cell counting한 1차 실험에서는 HepG2에서의 증식 효과가 없었다. 본 실험에서는 2차 실험으로 1, 3, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µM로 다양하게 투여하되 ethanol양이 배지의 1%가 되도록 시도하였다. 지방산 처리후 시간이 경과할수록 농도가 높아질수록 cell death가 증가하였다 (Fig. 1). LA의 경우 24시간 배양 시

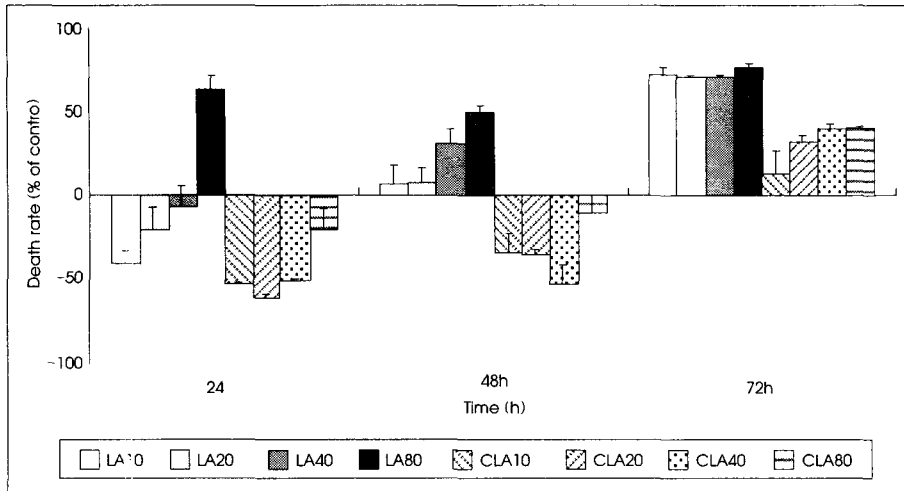


Fig. 1. Relative changes of death rates in HepG2 cell treated by LA or CLA with various concentration at 24, 48 and 72h compared to control. Significant differences among the level of concentration were found and accompanied with the incubation time.

에는 80 uM를 제외하고 10~40 uM로 농도를 증가시킬수록 대조군에 비하여 cell death가 6~40% 까지 감소하다가 48시간에는 농도가 증가할수록 ($p < 0.0001$) cell death가 증가하였으며 72시간에는 농도에 관계없이 70%이상의 세포가 죽었다. 이는 같은 농도로 투여할 경우 배양시간이 경과하여도 같은 효과를 보였다 ($p < 0.0001$). 반면, CLA는 10~80 uM로 농도를 증가하여도 대조군에 비하여 cell death가 24시간에는 20~50%, 48시간에는 10~30%로 감소하여 세포 독성효과가 적었다 ($p < 0.0001$). 그러나, 72시간 배양 시에는 10에서 80 uM로 농도를 증가시켰을 때 10~40%로 유의적인 cell death를 유발시켰다. ($p < 0.0001$) 따라서 LA와 CLA의 처치에 따른 세포증식률은 각각의 배양시간에 따라 CLA가 LA보다 세포 death율을 현저히 감소시키는 결과를 보였다 ($p < 0.0001$).

CLA는 항암 효과와 죽상동맥경화증을 감소시키는 효과가 있는 것이 알려져 이에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.^{22,23)} 사료에 1% 내외의 CLA를 첨가하여 사육한 쥐에서 지방암이 저해되었으며,²⁴⁾ CLA가 함유된 식이를 준 쥐에게 dimethyl benz[a]anthracene을 장기간 투여시 지방 종양 발생이 저지되었다.³¹⁾ HepG2 cell을 이용한 Miyazawa 등의 연구³²⁾에서는 CLA 20~40 uM에서 72시간 배양시 농도가 증가할수록 대조군인 LA군에 비하여 증식률이 유의적으로 감소하여서 본 연구의 결과와 다르게 나타났다. 그러나, Miyazawa 연구에서는 LA와 CLA 처치군에서 세포 형태학적인 차이는 없었다고 하지만 이는 LA군을 대조로 하였기 때문으로 본다.

2. 세포내의 지방산 분석

CLA를 HepG2에 투여할 경우 농도 의존적으로 세포막에 유입되는 것으로 나타났다. 10, 20, 40 uM로 CLA농도

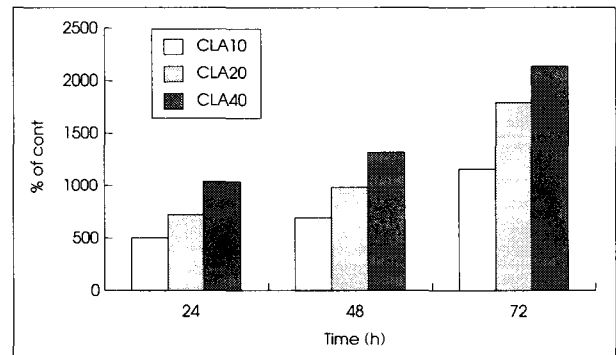


Fig. 2. The dose-dependent incorporation effect of CLA into the membrane of HepG2 cells compared to control (% of control) at the each incubation times. The statistic significances could not be analyzed because cell lysates should be collected by 2 ml of volumes. However, we found CLA was well incorporated dose dependently in HepG2 cells.

를 증가할수록 배양시간에 따라 1.5배씩 증가하였다. LA 투여에 따른 세포막의 CLA 유입은 찾을 수 없었다 (Fig. 2). 반대로 LA투여에 따른 세포막의 LA유입은 농도 의존적으로 세포막에서 증가하였다. 즉 24시간 배양 시에는 LA 20 혹은 40 uM가 대조군의 2배로 증가하였고 48시간 72시간 배양 시에는 40 uM LA투여가 대조군의 4배까지 증가하였다. CLA투여에 따른 세포막의 LA는 대조군과 유사하여 큰 차이가 없었다. 기타 16 : 0, 18 : 0 등의 포화지방산은 LA 투여군에서는 증가된 LA량만큼 감소하였는데 40 uM농도로 72시간 투여 시 큰 감소를 보였으나 CLA는 큰 차이가 없다. 18 : 1은 LA투여시 투여 농도가 증가할수록 감소하고 CLA투여에는 관련이 없었다. LA투여에서 HepG2 세포막에서 가장 뚜렷이 나타나는 현상은 LA투여농도가 10에서 40 uM로 증가할수록 arachidonic acids (20 : 4)의 합성이 2~3배로 증가한 것이다. CLA투여 시에는 20 : 4합성이 3배 이상 감소하였고 이는 LA군과는 유의적인 차

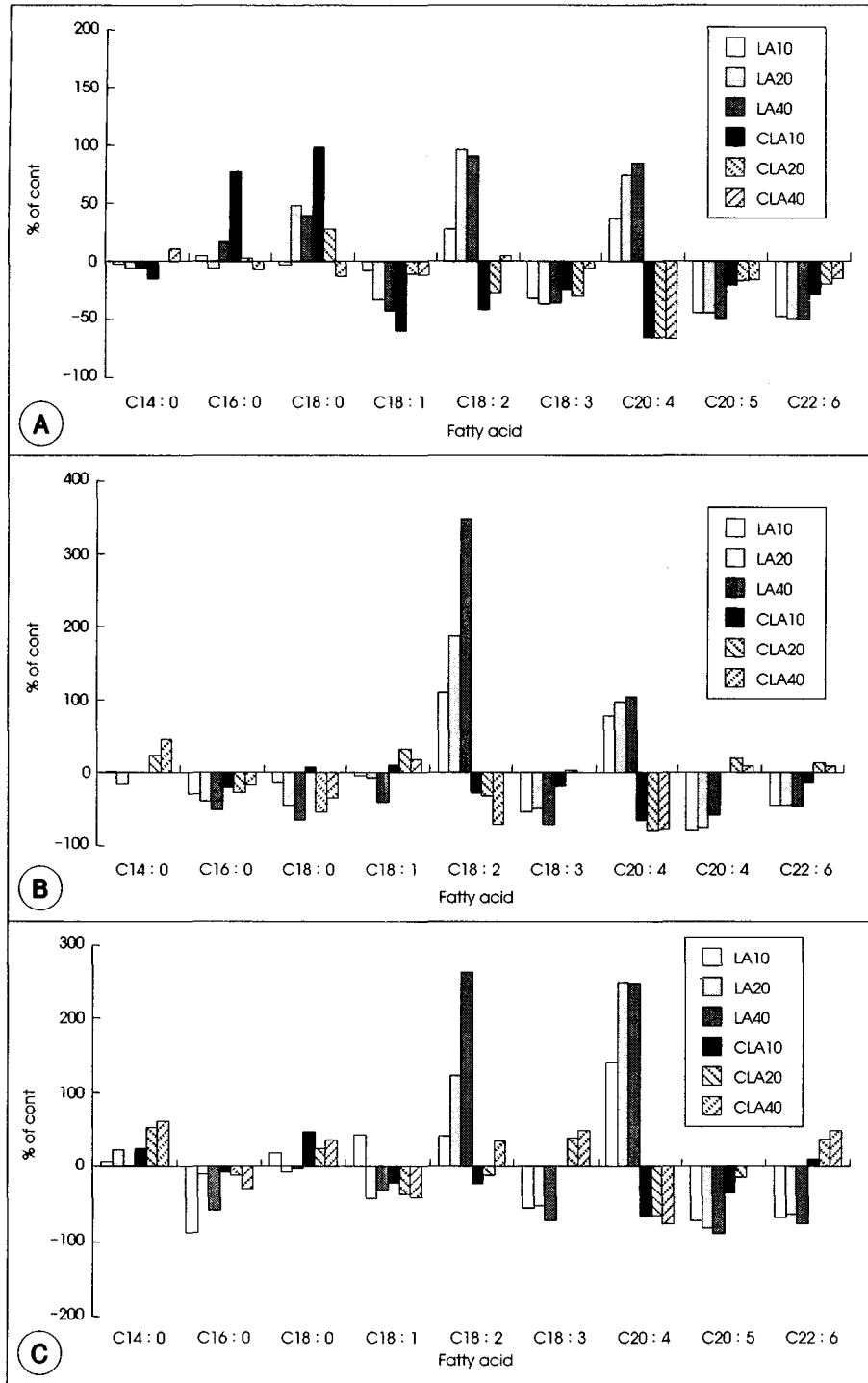


Fig. 3. Dose-dependent effects of LA or CLA on the fatty acids composition of membrane in HepG2 cells at different incubation times: 24 (A), 48 (B), 72h (C).

이로 나타났다. 따라서 LA와 LA의 conjugated 형이 간암 세포막에서 C20:4의 합성이 차이를 보인 것은 에이코사노이드 생성에 직접적인 역할을 할 것으로 여겨진다 (Fig. 3).

3. 과산화물 생성

LA와 CLA투여에 따른 HepG2 세포의 과산화물 MDA

생성은 LA가 CLA보다 모든 배양시간에서 2.5배 이상 증가하는 현상을 보였다. LA 40 uM 72시간 배양은 대조군의 3배 가량 증가하였고 LA 10, 20 uM의 24, 48시간 배양은 과산화물을 2배 이상 증가시켰다 (Table 1, Fig. 4). 반면 CLA는 40 uM 72시간투여가 대조군의 1.5배 가량

Table 1. The dose-dependent effects of LA and CLA treatment on TBARS of the HepG2 cell lysates according to incubation time (Mean ± SD) MDA (μM/mg protein)

Time		Control	10 μM	20 μM	40 μM	p-value ²⁾
24	Control	1.73 ± 0.14	^x 1.73 ± 0.14	^x 1.73 ± 0.14	^x 1.73 ± 0.14	
	LA	1.73 ± 0.14 ^a	^y 3.35 ± 0.55 ^b	^y 3.15 ± 0.05 ^b	^z 4.00 ± 0.02 ^c	<0.0001
	CLA	1.73 ± 0.14 ^a	^y 2.11 ± 0.02 ^b	^y 2.13 ± 0.16 ^b	^z 2.55 ± 0.05 ^c	<0.0001
	p-value ¹⁾		0.002	<0.0001	<0.0001	
48	Control	2.24 ± 0.19	^x 2.24 ± 0.19	^x 2.24 ± 0.19	^x 2.24 ± 0.19	
	LA	2.24 ± 0.19 ^a	^y 3.45 ± 0.05 ^b	^y 3.94 ± 0.21 ^c	^z 4.12 ± 0.08 ^c	<0.0001
	CLA	2.24 ± 0.19 ^a	^y 2.48 ± 0.06 ^b	^y 2.63 ± 0.03 ^{bc}	^z 2.73 ± 0.16 ^c	0.004
	p-value ¹⁾		<0.0001	<0.0001	<0.0001	
72	Control	2.61 ± 0.34	^x 2.61 ± 0.34	^x 2.61 ± 0.34	^x 2.61 ± 0.34	
	LA	2.61 ± 0.34 ^a	^y 4.00 ± 0.01 ^b	^y 4.72 ± 0.24 ^c	^z 6.93 ± 0.55 ^d	<0.0001
	CLA	2.61 ± 0.34 ^a	^y 2.66 ± 0.28 ^a	^y 2.69 ± 0.20 ^a	^z 3.17 ± 0.12 ^b	N.S
	p-value ¹⁾		<0.0001	<0.0001	<0.0001	

a, b, c values within the treated concentration of fatty acid groups with different superscripts are significant at p < 0.05

x, y, z values within the treated type of fatty acid groups with different superscripts are significant at p < 0.05

1) p-values for the significance among the treatment concentrations in the different types of fatty acid

2) p-values for the significance among the types of fatty acids according to the various concentration of fatty acid treatment

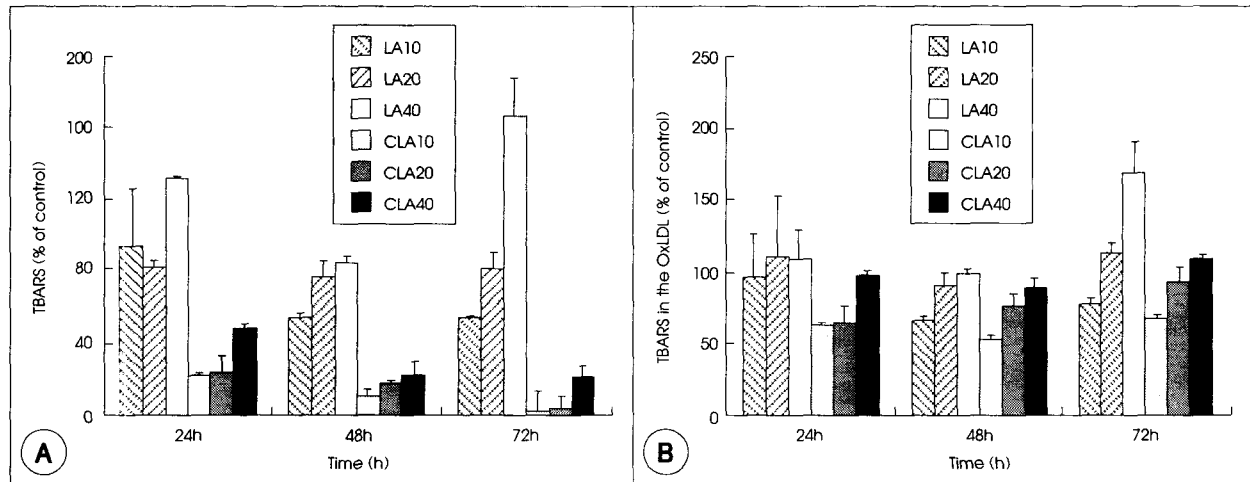


Fig. 4. Time and dose-dependent differences of LA or CLA treatment on the relative concentration of MDA production (TBAR) in whole cells of HepG2 cell lysates (A) and OxLDL particles (B) compared to control.

증가한 것을 제외하고 10, 20, 40 μM 농도의 24 혹은 48 시간 배양시 농도 의존적인 경향을 보이지만 72시간에는 거의 생성되지 않았다. OxLDL에서의 과산화물생성도 세포 전체의 과산화물 생성결과와 매우 유사하였다. 단, 세포 전체의 과산화물 생성결과와 달리 OxLDL에서는 CLA도 대조군보다 과산화물 생성이 2배 가량 증가하여서 지방산 처리에 따른 OxLDL에서의 과산화물 생성은 LA 40 μM의 72시간 배양 시 3배로 증가한 경우를 제외하고 CLA와 크게 다르지 않다는 것을 알 수 있다 (Table 2). 대조군에 대한 비율로 나타낸 Fig. 4에서는 이 같은 현상을 더욱 확실히 볼 수가 있다. 따라서 위의 결과를 종합하면 LA가 CLA보다 과산화물생성이 증가하였고 특히 고농도 장시간 배양시 증가하였다. 그러나 OxLDL에서의 MDA 생

성은 LA와 CLA군 모두가 농도 의존적으로 증가하는 경향이 있었다. 세포 전체와 OxLDL의 결과가 다른 것은 지방산 투여에 따라 산화된 LDL에 존재하는 대부분의 과산화물이 MDA임을 제안한 것이다.

CLA투여군에서 과산화물 생성이 적은 것은 CLA자체가 항산화역할을 하기 때문이라는 연구가 있는데 이는 CLA의 항암효과의 기전으로 제안되기도 한다. CLA의 항산화 기작은 아주 복잡하여 정확하게 알려져 있지 않지만, CLA 분자내 이중결합을 중심으로 일어난 산화물질인 ‘β-hydroxy acroline’ CLA 유도체가 주요한 항산화 활성을 나타내는 물질로 알려졌다.^{31,32)} β-hydroxy acroline 유도체는 enolization에 의해 항산화성을 나타낼 뿐만 아니라, 유도체가 두 분자로 존재 시에는 한 분자의 transition metal

Table 2. Effects of various concentrations of LA and CLA on the TBARS in oxidized LDL (Ox LDL) particles of HepG2 cell according to incubation time (Mean \pm SD) MDA (μ M/mg protein)

Time		Control	10 μ M	20 μ M	40 μ M	p-value ²⁾
24	Control	0.86 \pm 0.07	^x 0.86 \pm 0.07	^x 0.86 \pm 0.07	^x 0.86 \pm 0.07	
	LA	0.86 \pm 0.07 ^a	^y 1.68 \pm 0.27 ^b	^y 1.81 \pm 0.38 ^b	^y 1.80 \pm 0.17 ^b	0.004
	CLA	0.86 \pm 0.07 ^a	^y 1.41 \pm 0.01 ^b	^y 1.42 \pm 0.10 ^b	^y 1.70 \pm 0.03 ^c	<0.0001
	p-value ¹⁾		0.002	0.007	<0.0001	
48	Control	1.38 \pm 0.26	^x 1.38 \pm 0.26	^x 1.38 \pm 0.26	^x 1.38 \pm 0.26	
	LA	1.38 \pm 0.26 ^a	^y 2.30 \pm 0.03 ^b	^y 2.62 \pm 0.14 ^c	^y 2.74 \pm 0.05 ^c	<0.0001
	CLA	1.38 \pm 0.26 ^a	^y 2.12 \pm 0.03 ^b	^y 2.44 \pm 0.12 ^c	^y 2.61 \pm 0.09 ^c	<0.0001
	p-value ¹⁾		0.001	<0.0001	<0.0001	
72	Control	1.29 \pm 0.20	^x 1.29 \pm 0.20	^x 1.29 \pm 0.20	^x 1.29 \pm 0.20	
	LA	1.29 \pm 0.20 ^a	^y 2.30 \pm 0.05 ^b	^y 2.75 \pm 0.10 ^c	^z 3.47 \pm 0.28 ^d	<0.0001
	CLA	1.29 \pm 0.20 ^a	^y 2.17 \pm 0.03 ^b	^y 2.50 \pm 0.13 ^c	^y 2.70 \pm 0.04 ^c	<0.0001
	p-value ¹⁾		N.S.	0.005	<0.0001	

a, b, c values within the treated concentration of fatty acid groups with different superscripts are significant at $p < 0.05$

x, y, z values within the treated type of fatty acid groups with different superscripts are significant at $p < 0.05$

1) p-values for the significance among the treatment concentrations in the different types of fatty acid

2) p-values for the significance among the types of fatty acids according to the various concentration of fatty acid treatment

Table 3. Effects of various concentrations of LA and CLA on Prostaglandin E₂ (PGE₂) of HepG2 cell according to incubation time (Mean \pm SD)

Time		Control	10 μ M	20 μ M	40 μ M	p-value ²⁾
24	Control	18.45 \pm 0.22	^x 18.45 \pm 0.22	^x 18.45 \pm 0.22	^x 18.45 \pm 0.22	
	LA	18.45 \pm 0.22 ^a	^y 21.11 \pm 0.22 ^b	^z 34.87 \pm 1.43 ^c	^z 41.56 \pm 1.53 ^d	0.0001
	CLA	18.45 \pm 0.22 ^a	^y 23.09 \pm 2.03 ^b	^y 24.52 \pm 1.86 ^b	^y 26.20 \pm 2.52 ^b	0.005
	p-value ¹⁾		0.009	0.0001	0.0001	
48	Control	30.44 \pm 0.70	^x 30.44 \pm 0.70	^x 30.44 \pm 0.70	^x 30.44 \pm 0.70	
	LA	30.44 \pm 0.70 ^a	^y 41.82 \pm 1.47 ^b	^y 53.61 \pm 4.41 ^c	^y 76.01 \pm 4.74 ^d	0.0001
	CLA	30.44 \pm 0.70 ^a	^y 31.51 \pm 1.07 ^b	^y 30.90 \pm 2.08 ^b	^y 26.87 \pm 2.53 ^a	0.046
	p-value ¹⁾		0.0001	0.0001	0.0001	
72	Control	55.33 \pm 0.61	^x 55.33 \pm 0.61	^x 55.33 \pm 0.61	^x 55.33 \pm 0.61	
	LA	55.33 \pm 0.61 ^a	^y 74.55 \pm 1.28 ^b	^y 76.84 \pm 1.17 ^c	^y 76.14 \pm 1.00 ^c	0.0001
	CLA	55.33 \pm 0.61 ^a	^y 37.36 \pm 1.49 ^c	^y 22.79 \pm 2.52 ^b	^y 19.73 \pm 0.47 ^a	0.0001
	p-value ¹⁾		0.0001	0.0001	0.0001	

a, b, c values within the treated concentration of fatty acid groups with different superscripts are significant at $p < 0.05$

x, y, z values within the treated type of fatty acid groups with different superscripts are significant at $p < 0.05$

1) N.S.: Values are not significantly different between groups

2) p-values for the significance among the treatment concentrations in the different types of fatty acid

3) p-values for the significance among the types of fatty acids according to the various concentration of fatty acid treatment

이온을 흡착 함으로서 항산화 효과를 나타내기도 한다. CLA 분자내의 공유 이중결합자체도 철분과 같은 이동성 금속 등을 chelation하기 때문에 ferrous iron (Fe + 2)으로 유리라디칼을 생성하는 체체일 경우 항산화 효과가 아주 크다고 한다. Van Den Berg 등은 α -tocopherol 및 butylated hydroxytoluene (BHT)과 비교하여 CLA가 산화적 변형으로부터 1-palmitoyl-2-lineoyl phosphatidylcholine (PLPC)를 포함한 세포막을 보호한다는 것을 밝혀냈다.³³⁾ 현재까지는 정상 endothelial 세포와 유방암 세포에 CLA를 첨가하였을 때 과산화물이 감소되는 결과가

나타내지 않는 반면, LA는 지질과산화물 농도를 증가시켰기 때문에 *in vitro* 실험의 결과에서는 CLA가 효과적인 항산화제로써의 기능을 하지 못하였다. 그러나 발암기전에 대한 분자생물학적 이해가 증진되면서 산화적 스트레스가 발암과정에 관여되고 있는 것이 보고되고 있으므로 간암세포에서는 본 연구의 결과는 매우 의미가 있겠다.^{32,34)}

4. PGE₂ and TXA₂

PGE₂ 생성은 LA가 CLA보다 농도와 배양시간에 비례하여 유의 적으로 증가하였다 ($p < 0.001$). 즉, 24시간 배양

시 LA군은 대조군에 비하여 농도가 증가할수록 1.2, 1.8, 2.2배로 증가하였고 48시간 배양 시에는 1.4, 1.8, 2.5배로 증가하다가 72시간 배양 시에는 농도에 관계없이 대조군보다 1.5배 가량 증가하였다. 반면, CLA군에서는 24시간 배양시 10~40 μ M로 농도를 증가시키면 대조군보다 1.3~1.5배로 증가하였으나 48시간 배양 시에는 대조군보다 10% 감소하였다. 72시간 배양 시에는 농도가 증가할수록 30%에서 67%로 감소하였다 (Table 3) (Fig. 5A). 즉, CLA는 LA군보다 PGE₂를 유의적으로 감소시켰으며 이는 LA군에서 합성된 20 : 4의 생성이 CLA에서는 대조군의 1/3에서 1/20으로 감소한 것이 원인으로 보아진다. TXA₂생성 또한 모든 배양시간에서 농도가 증가할수록 2배까지 증가한 반면 CLA는 농도가 증가할수록 50% 이상 감소하는 경향이 뚜렷하여 CLA는 TXA₂ 또한 유의적으로 감소시켰다 (Table 4) (Fig. 5B). 따라서 PGE₂/TXA₂ 비율은 LA군은 대조군과 큰 차이가 없으나 CLA군에서는 유의적으로 증가한 반면 72시간에서는 LA군에는 농도가 증가할수록 감소하였으나 CLA군에서는 차이가 없었다. (Table 5) 따라서 LA군은 농도와 배양시간에 의존적으로

TXA₂의 생성이 PGE₂생성보다 증가하는 경향이 있었다.

에이코사노이드는 여러 가지 생화학적 반응에 중요하고도 효과적인 매개물질이며, 세포 사이의 생리적인 상호작용을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 한다.³⁵⁾ 아라키돈산으로부터 유도된 에이코사노이드 중에서 PGE₂와 TXA₂는 최종 산물이 아닌 중간 대사산물로 세포 내에서 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. Sebedio 등은 CLA가 탄소사슬연장과 불포화도 증가에 관여하는 cyclooxygenase 효소에 대한 아라키돈산과의 경쟁적 작용으로 다른 n-3계 지방산과 유사하게 PGE₂ 생성을 감소시킨다고 하였다.³⁶⁾ Kai-Li 등의 연구에서도 식이성 CLA가 아라키돈산에서 유도되는 PGE₂ 합성을 유의적으로 감소시키는데 이것이 CLA의 항암성 기전이라고 보고하였다.³⁷⁾ Truitt 등의 연구에서는 CLA가 cyclooxygenase에 의하여 생성되는 TXA₂ 형성도 억제시킨다고 보고하고 이를 항혈전성 효과로 설명하였다.³⁸⁾ Abou-El-Ela 등은 n-6계 지방산인 LA는 에이코사노이드의 생성을 증가시켜 종양 성장을 촉진시키는 반면에, n-3 계열은 종양 성장을 억제한다고 하였다.³⁹⁾ CLA의 경우 n-3계 지방산과 유사하게 PGE₂의

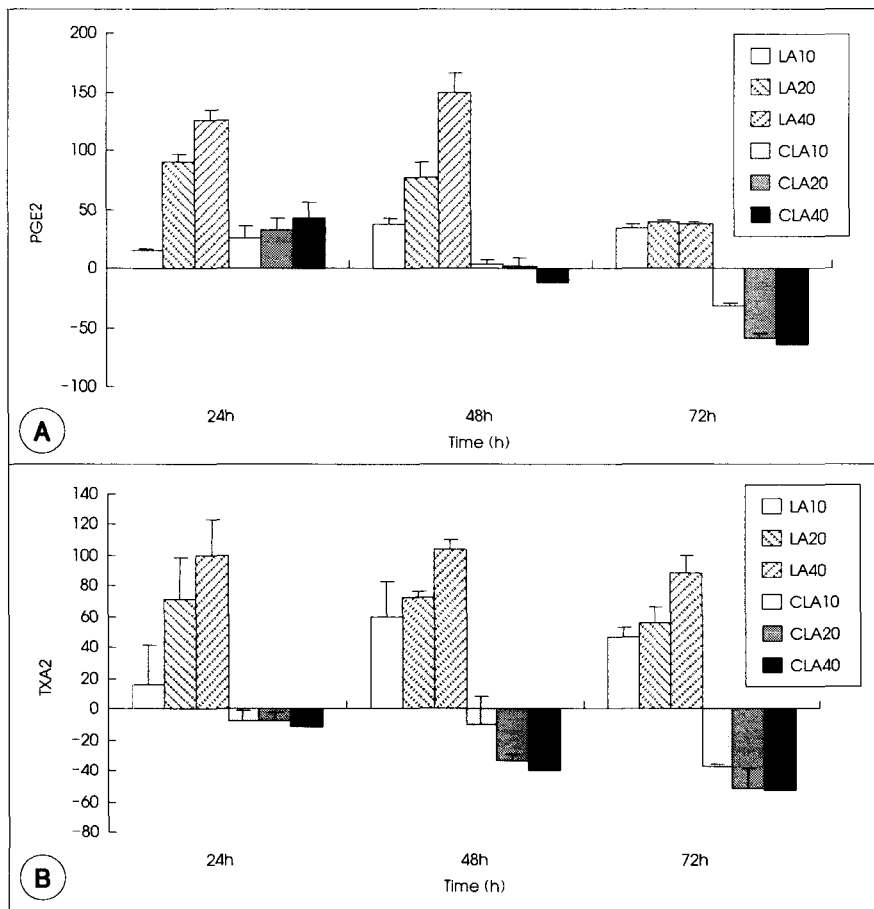


Fig. 5. Relative changes of prostaglandin (PGE₂: A) and thromboxane (TXA₂: B) in HepG2 cell treated by LA or CLA with various concentration at 24, 48 and 72h compared to the control.

Table 4. Effects of various concentrations of LA and CLA on thromboxane A₂ (TXA₂) of HepG2 cell according to incubation time (Mean ± SD)

Time		Control	10 uM	20 uM	40 uM	p-value ²⁾
24	Control	11.51 ± 1.02	11.51 ± 1.02	^x 11.51 ± 1.02	^x 11.51 ± 1.02	
	LA	11.51 ± 1.02 ^o	13.37 ± 2.87 ^o	^y 19.80 ± 3.01 ^b	^y 23.00 ± 2.69 ^b	0.002
	CLA	11.51 ± 1.02	10.67 ± 0.72	^x 10.60 ± 0.69	^x 10.20 ± 0.36	N.S.
	p-value ¹⁾		N.S.	0.002	0.000	
48	Control	14.95 ± 2.17	^x 14.95 ± 2.17	^y 14.95 ± 2.17	^y 14.95 ± 2.17	
	LA	14.95 ± 2.17 ^o	^y 23.93 ± 3.35 ^b	^z 25.73 ± 0.70 ^b	^z 30.47 ± 0.91 ^c	0.000
	CLA	14.95 ± 2.17 ^b	^x 13.37 ± 2.73 ^b	^y 9.97 ± 0.57 ^o	^x 8.97 ± 0.72 ^o	0.011
	p-value ¹⁾		0.007	0.000	0.000	
72	Control	16.67 ± 3.02	^y 16.67 ± 3.02	^y 16.67 ± 3.02	^y 16.67 ± 3.02	
	LA	16.67 ± 3.02 ^o	^z 24.50 ± 1.05 ^b	^z 26.00 ± 1.64 ^b	^z 31.40 ± 1.85 ^c	0.000
	CLA	16.67 ± 3.02 ^b	^x 10.37 ± 0.15 ^o	^x 8.03 ± 2.25 ^o	^x 7.77 ± 0.93 ^o	0.002
	p-value ¹⁾		0.000	0.000	0.000	

a, b, c values within the treated concentration of fatty acid groups with different superscripts are significant at p < 0.05

x, y, z values within the treated type of fatty acid groups with different superscripts are significant at p < 0.05

1) N.S.: Values are not significantly different between groups

2) p-values for the significance among the treatment concentrations in the different types of fatty acid

3) p-values for the significance among the types of fatty acids according to the various concentration of fatty acid treatment

Table 5. Effects of various concentrations of LA and CLA on the ratio of PGE₂/TXA₂ of HepG2 cell according to incubation time (Mean ± SD)

Time		Control	10 uM	20 uM	40 uM	p-value ²⁾
24	Control	1.61 ± 0.66	1.61 ± 0.66	^x 1.61 ± 0.66	^x 1.61 ± 0.66	
	LA	1.61 ± 0.66	1.64 ± 0.38	^x 1.79 ± 0.25	^x 1.82 ± 0.19	N.S.
	CLA	1.61 ± 0.66 ^o	2.17 ± 0.24 ^b	^y 2.31 ± 0.05 ^{bc}	^y 2.56 ± 0.17 ^c	0.001
	p-value ¹⁾		N.S.	0.006	0.001	
48	Control	2.07 ± 0.30	^y 2.07 ± 0.30	^x 2.07 ± 0.30	^x 2.07 ± 0.30	
	LA	2.07 ± 0.30 ^o	^x 1.77 ± 0.20 ^o	^x 2.08 ± 0.14 ^o	^y 2.50 ± 0.15 ^b	0.017
	CLA	2.07 ± 0.30 ^o	^y 2.41 ± 0.40 ^{ob}	^y 3.10 ± 0.09 ^c	^y 3.02 ± 0.48 ^{bc}	0.019
	p-value ¹⁾		N.S.	0.001	0.021	
72	Control	3.39 ± 0.60	3.39 ± 0.60	3.39 ± 0.60	^y 3.39 ± 0.60	
	LA	3.39 ± 0.60 ^b	3.05 ± 0.08 ^{ob}	2.96 ± 0.20 ^{ob}	^x 2.43 ± 0.15 ^o	0.042
	CLA	3.39 ± 0.60	3.60 ± 0.19	3.03 ± 1.09	^x 2.56 ± 0.28	0.284
	p-value ¹⁾		N.S.	N.S.	0.047	

a, b, c values within the treated concentration of fatty acid groups with different superscripts are significant at p < 0.05

x, y, z values within the treated type of fatty acid groups with different superscripts are significant at p < 0.05

1) N.S.: Values are not significantly different between groups

2) p-values for the significance among the treatment concentrations in the different types of fatty acid

3) p-values for the significance among the types of fatty acids according to the various concentration of fatty acid treatment

생성을 억제하여 최종적으로 중양 성장을 억제한다고 하였고 전반적으로 본 연구의 결과와 유사하였다.

CLA 또한 LA와 같이 elongation과 desaturation과정에 따라서 에이코사노이드 합성에 관여하지만 이 때 conjugated diene 구조에는 영향을 받지 않으며 arachidonic acid (C20 : 4) 합성은 미비하여 간접적인 anti-inflammatory, antiatherogenic 및 anticarcinogenic 효과로 보인다.³²⁾ Kavanaugh 등은 LA를 첨가하면 MCF-10A의 성장은 늘어났지만, MCF-7의 성장은 자극하지 않음을 볼 수 있는데 이는 Δ_6 와 Δ_5 desaturase가 부족하기 때문이며, 그

결과 LA로부터 arachidonic acid의 형성이 일어나지 않기 때문이다. 더욱이, 이러한 발견은 LA 또는 CLA를 세포에 공급하므로 모든 cell line에서 세포증식의 증감을 각각 보여주며, 이것은 LA와 CLA가 Δ_6 와 Δ_5 desaturase와 유사한 것과 arachidonic acid로 전환되는 것에 의해 서로 존재하면서 방해 또는 간섭을 통해 일어난다고 보았다.³⁷⁾

CLA의 항동맥경화기전 연구를 바탕으로 향후 연구로써 CLA에 관한 생체의 과산화물 생성기전, 지질 과산화물의 발암촉진 기전, 항산화제로써의 CLA의 상대적인 능력 등에 관한 연구가 진행된다면 구체적인 섭취 권장량을 제시

할 수 있는 과학적인 근거자료로 쓰일 것이다.

요약 및 결론

기존의 CLA는 항암성 연구에 집중되었고 지질대사에 관한 연구는 미비하여 HepG2 간암세포를 이용하여 LA를 대조로 CLA의 기초적인 지질대사, 항산화 기작에 따른 항동맥경화성 인자에 미치는 역할 및 간 조직의 손상 예방인자로써 이용가치를 알리고자 한다. 이에 세포 증식과 세포막의 지방산 조성변화, OxLDL의 과산화물 생성 억제 효과 및 PGE₂와 TXA₂를 포함한 에이코사노이드s대사에 미치는 영향을 살펴보고자 한다.

CLA는 10 uM에서 80 uM로 농도를 증가하거나 48시간까지 배양시간을 증가하여도 대조군 및 LA군에 비하여 세포 독성효과가 적었다 (p < 0.0001). LA 및 CLA 각각이 농도 의존적으로 세포내로의 유입이 비례하여 기타 분석내용 등이 순수한 투여효과로 설명할 수 있었다. 단, LA 투여농도가 10에서 40 uM로 증가할수록 arachidonic acids (AA: 20 : 4)의 합성이 2~3배로 증가하였으나 CLA 투여 시에는 AA합성이 3배 이상 감소한 것이 뚜렷한 차이점이었다. LA와 CLA투여에 따른 HepG2 세포의 과산화물 MDA 생성은 LA가 CLA보다 모든 배양시간에서 2.5 배 이상 증가하였고 이는 OxLDL에서도 유사하였다. PGE₂ 및 TXA₂생성은 LA가 CLA보다 농도와 배양시간에 비례하여 유의 적으로 증가하였으나 CLA는 농도가 증가할수록 감소하는 경향이 뚜렷하였다. 따라서 PGE₂/TXA₂ 비율에 의하면 LA군은 농도와 배양시간에 의존적으로 TXA₂의 생성이 PGE₂생성보다 증가하는 경향이 있었다.

결론적으로 본 연구에서 CLA가 과산화물을 억제하는 항산화능과 PGE₂ 및 TXA₂생성을 억제 하는 항염증성으로 인한 항 동맥경화성 반응으로 세포의 증식에 영향을 준다는 것을 일관성있게 증명하였다. 식이인자는 반드시 간 대사를 거쳐서 신체 조직 특히 순환계조직에 영향을 주므로 본 연구의 결과와 항 동맥경화성 인자는 서로 무관하지 않다. 따라서 본 연구는 인체 혈관내피세포 (HUVEC)를 이용한 CLA에 관한 생체의 과산화물 생성기전, 지질 과산화물의 발암촉진 기전, 항산화제로써의 CLA의 상대적인 능력 등에 관한 향후 계속 과제에 기초가 될 것이다.

Literature cited

1) Park SC, Oh SI, Lee MS. Korean status of alcoholics and alcohol related health problems. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 170S-172S, 1998

2) National Statistical Office. *Causes of death statistics yearbook*, 1998

3) Wolfe MS, Sawyer JK, Morgan TM, Bullock BD, Rudel LL. Dietary polyunsaturated fat decreases coronary artery atherosclerosis in a pediatric-aged population of African green monkeys. *Arterioscler Thromb* 14(4) : 587-597, 1994

4) Rudel LL, Johnson FL, Sawyer JK, Wilson MS, Parks JS. Dietary polyunsaturated fat modifies low-density lipoproteins and reduces atherosclerosis of non human primates with high and low diet responsiveness. *Am J Clin Nutr* 62(2) : 463S-470S, 1995

5) Morris JN, Marr JW, Clayton DG. Diet and heart: a postscript. *Br Med J* 2(6098) : 1307-1314, 1977

6) Rudel LL, Kelley K, Sawyer JK, Shah R, Wilson Md. Dietary monounsaturated fatty acid promote aortic atherosclerosis in LDL receptor-null, human ApoB100-overexpressing transgenic mice. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 18(11) : 1818-1827, 1998

7) Rudel LL, Haines J, Sawyer JK, Shah R, Wilson MS, Carr TP. Hepatic origin or cholesteryl oleate in coronary artery atherosclerosis in African green monkeys. Enrichment by dietary monounsaturated fat. *J Clin Invest* 100(1) : 74-83, 1997

8) Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Steinberg D, Witztum JL. Effect of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest* 91(2) : 668-676, 1993

9) Thomas MJ, Thoruburg T, Manning J, Hooper K, Rudel LL. Fatty acid composition of low-density lipoprotein influences its susceptibility to autoxidation. *Biochemistry* 33(7) : 1828-1834, 1994

10) Ha YL, Pariza MW. Anticarcinogenic conjugated derivatives of linoleic acid found in grilled ground beef: isolation, identification, and mechanism of action. In "First Korean Conference on Science and Technology." Korean FED Sci Assoc. Seoul, Korea, pp.442, 1990

11) Ip C, Carter CA, Ip MM. Requirement of essential fatty acid for mammary tumorigenesis in the rat. *Cancer Res* 45: 1999-2001, 1985.

12) Pariza MW. Dietary fat and cancer risk: evidence and research needs. *Annu Rev Nutr* 8: 167-183, 1988

13) Durgam VR, Fernandes G. The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is released to estrogen response system. *Cancer Lett* 116(2) : 121-130, 1997

14) Cunningham DC, Harrison LY, Shultz TD. Proliferative responses of normal human mammary and MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid, conjugated linoleic acid and eicosanoid synthesis inhibitors in culture. *Anticancer Res* 17(1A) : 197-203, 1997

15) Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8(12) : 1881-1887, 1987

16) Van den Berg JJ, Cook NE, Tribble DL. Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipid* 30(7) : 599-605, 1995

17) Banni S, Angioni E, Contini MS, Carta G, Casu V, Iengo GA, Melis MP, Diana M, Dessi MA, Corongiu FP. Conjugated linoleic

- acid and oxidative stress. *J Am Oil Chem Soc* 75: 261-267, 1998
- 18) Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bailey DB, Croxtall J, Willoughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (6): 2046-2050, 1994
 - 19) Kai-Li Liu, Martha A, Belury. Conjugated linoleic acid reduces arachidonic acid content and PGE2 synthesis in murine keratinocytes. *Cancer Letters* 127: 15-22, 1998
 - 20) Lee MS. *Apolipoprotein Metabolism*. Hyoil, pp.265-295, 2000
 - 21) Nicolosi RJ, Rogers EJ, Kritchevsky D, Scimeca JA, Huth PJ. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery* 22(5): 266-277, 1997
 - 22) Lee KN, Kritchevsky D, Pariza MW. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108(1): 19-25, 1994
 - 23) Munday JS, Thompson KG, James KA. Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Br J Nutr* 81 (3): 251-255, 1999
 - 24) van Greevenbroek MM, Voorhout WF, Erkelens DW, van Meer G, de Bruin TW. Palmitic acid and linoleic acid metabolism in Caco-2 cells: different triglyceride synthesis and lipoprotein secretion. *J Lipid Res* 36(1): 13-24, 1995
 - 25) Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48(17): 4827-4833, 1988
 - 26) Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1): 497-509, 1957
 - 27) Katharina G, Elizabeth AHH. Detection of Oxidized Low-Density Lipoproteins Using Surface Plasmon Responce. *Anal Chem* 71: 2459-2467, 1999
 - 28) Kim WK. Effect of different sources of dietary n-3 fatty acids on immune response and eicosanoids production. *J Korean Soc Fooc Sci Nutr* 26(4): 697-703, 1997
 - 29) Yang JA, Kim SO, Choi JH, Kwag OG, Rhee SJ, Chang HW. Activities of phospholipase A2 and cyclooxygenase, and syntheses of thromboxane and prostacyclin in streptozotocin induced diabetic rats. *J Korean Soc Fooc Sci Nutr* 27(1): 175-181, 1998
 - 30) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
 - 31) 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
 - 32) Igrashi M, Miyazawa T. The Growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on a human hepatoma cell line, HepG2, is induced by a change in fatty acid metabolism, but not the facilitation of lipid peroxidation in the cells. *Biochim Biophys Acta* 1530: 162-171, 2001
 - 33) van den Berg JJ, Cook NE, Tribble DL. Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids* 30: 599-605, 1995
 - 34) Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 32A: 30-38, 1996
 - 35) Ekhar EZ, LJ Filer Jr. *Present knowledge in nutrition*. 7th Edition ILSI, 1996
 - 36) 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
 - 37) Kavanaugh CJ, Liu KL, Belury MA. Effect of dietary conjugated linoleic acid on phorbol ester-induced PGE2 production and hyperplasia in mouse epidermis. *Nutrition and Cancer* 33(2): 132-138, 1999
 - 38) Truitt A, McNeil G, Vanderhoek JY. Antiplatelet effects of conjugated linoleic acid isomers. *Biochim Biophys Acta* 1438(2): 239-246, 1999
 - 39) Abou-El-Ela SH, Prasse KW, Carroll R, Wade AE, Dharwadkar S, Bounce OR. Eicosanoid synthesis in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary adenocarcinomas in Sprague-Dawley rats fed primrose oil, menhaden oil or corn oil diet. *Lipid* 23: 948-954, 1988