

# 식이의 Conjugated Linoleic Acid (CLA) Isomer가 DMH로 처리한 쥐에서 대장점막의 종양발생과 Cyclooxygenase-2 및 Protein Kinase C 단백질 발현에 미치는 영향\*

박현서\*\*§ · 전창수\*\* · 윤정한\*\*\*

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

## Effect of Dietary Conjugated Linoleic Acid (CLA) Isomers on Tumor Incidence and the Protein Expression of Cyclooxygenase-2 and Protein Kinase C in Colonic Mucosa of DMH-Treated Rats\*

Park, Hyun-Suh\*\*§ · Chun, Chang-Soo\*\* · Jung Han Yoon Park\*\*\*

Department of Food and Nutrition, \* Kyung Hee University, Seoul,  
Division of Life Sciences, \*\* Hallym University, Chunchon, Korea

### ABSTRACT

This study was designed to compare the anti-carcinogenic effect of conjugated linoleic acid isomers on tumor incidence, cell proliferation and the levels of thromboxane (TX)<sub>2</sub>, prostaglandin (PG)<sub>E2</sub> and 1,2-diacylglycerol (DAG), and the related enzyme expression of cyclooxygenase (COX)-2 and protein kinase C (PKC) in colonic mucosa of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-treated rats. One hundred eight male Sprague Dawley rats were randomly divided into 3 groups depending on the types of CLA isomers, i.e. control group (no CLA contained), c9t11 group (cis-9, trans-11 CLA contained), and t10c12 group (trans-10, cis-12 CLA contained). The experimental diet was composed of protein at 20%, carbohydrate at 56.2%, and fat at 14.5% including 1.0% CLA isomers by weight. The experimental diet was fed for 30 weeks with the initiation of intramuscular injection of DMH, which was injected twice a week for 6 weeks to give total dose of 180 mg per kg body weight. Two CLA isomers (c9, t11; t10, c12) significantly reduced tumor incidence and cell proliferation by reducing the protein expression of COX-2 and PKC, and the level of TXB<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, and DAG in colonic mucosa. However, there was no significant difference in anti-carcinogenic effect between c9t11-CLA and t10c12-CLA. (*Korean J Nutrition* 37(9) : 763~770, 2004)

**KEY WORDS** : colon cancer, CLA isomers, cell proliferation, cyclooxygenase-2, protein kinase C.

### 서 론

CLA는 필수지방산인 linoleic acid (LA)의 탄소 위치가 다른 기하학적 이성체를 통칭하는 것으로 8번과 10번, 9번과 11번, 10번과 12번 11번과 13번의 탄소 원자에 이중 결합을 가지고 있으며 cis형과 trans형의 이성체를 포함하여 존재한다. 이 중에서 cis-9, trans-11 (c9t11)과 trans-

10, cis-12 (t10c12) isomer가 생리적으로 가장 활성이 높은 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> CLA의 생리적인 효과중 항암효과에 대한 보고 중에 유방암<sup>2,3)</sup>에 관한 연구가 많이 이루어지고 있으며 전립선암,<sup>4,5)</sup> 대장암,<sup>5-7)</sup> 피부암 등<sup>8)</sup>에 관한 항암연구가 보고되어 있다. Kim과 Park<sup>6)</sup>의 보고에 의하면 CLA isomer 혼합물을 식이에 1.0% 첨가한 식이로 사육하였을 때 대장의 종양발생율을 쇠기름에 비해 약 43% 더 감소시켰다. 그러나 CLA isomers (c9t11와 t10c12)가 각각 대장의 종양발생에 미치는 영향을 비교한 연구는 부족한 실정이다.

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid (AA)가 eicosanoids로 대사되는 과정을 촉매하는 rate-limiting enzyme이다.<sup>9)</sup> COX의 isoenzymes 중 COX-2는 AA로부터 PGE<sub>2</sub>와 TXA<sub>2</sub>를 유도하여 세포증식에 관여한다고 알려져 있

접수일 : 2004년 8월 30일

채택일 : 2004년 11월 10일

\*Supported by grant No. R01-1999-000-00166-0 (2003) from the Basic Research Program of the Korea Science & Engineering Foundation.

§ To whom correspondence should be addressed.

다.<sup>9)</sup> CLA는 세포막 인지질의 지방산 조성을 변화시켜 eicosanoid 합성을 조절하여 세포증식을 감소시켜 항암효과를 가진다고 보고되었으며,<sup>3,10)</sup> 또한 COX-2의 선택적 억제제인 NS-398을 이용하여 COX-2 활성을 억제시킨 결과 PGE<sub>2</sub> 합성이 감소되고 세포증식이 감소되었다고 하였다.<sup>11)</sup> 이와 같이 COX-2 발현이 대장의 암화과정에 매우 중요한 인자로 대두되었다.

한편 Miller 등<sup>12)</sup>은 in vitro의 연구에서 t10c12-CLA가 c9t11-CLA에 비해 colon tumor cell (SW-480)의 세포증식을 감소시켰다고 보고하였으나, Liu 등<sup>13)</sup>은 c9t11-CLA가 human gastric cancer cell (SGC-7901)의 세포증식을 억제시키고, apoptosis를 유도했다고 보고하였다. 또한 Park 등<sup>14)</sup>의 연구에서는 c9t11-CLA와 t10c12-CLA가 차이 없이 세포증식을 감소시키고 apoptosis를 증가시켜 암 예방효과가 있는 것으로 보고하였다. 그러나 아직 CLA isomer는 각각 대장의 종양발생을 어느 정도 억제하였으며 그 항암효과에 관한 생화학적 기전을 비교한 연구가 부족하다고 사료된다.

그러므로 본 연구에서는 CLA 중에서 생리활성이 높은 c9t11 isomer와 t10c12 isomer가 대장의 종양발생과 대장점막의 세포증식에 미치는 영향을 관찰하고, 이와 관련해서 AA에서 대사되어 생성되는 PGE<sub>2</sub>와 TXB<sub>2</sub> 합량과 COX-2 단백질 발현, 1,2-DAG 합량과 PKC 단백질 발현에 미치는 영향을 비교하고자 한다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 동물사육

체중이 180~200 g인 6주령의 Sprague Dawley 중 수컷 쥐 (Daehan Biolink, Korea)를 1주간 일반사료로 사육한 다음 체중에 따라 난괴법에 의해 3군으로 분류하였다. 실험군은 식이 지방의 종류에 따라 대조군으로 쇠기름 (beef tallow, Control) 군, CLA isomer 첨가군으로 cis-9, trans-11 (c9t11) isomer군과 trans-10, cis-12 (t10c12) isomer군으로 나누어 실험식이로 30주 동안 사육하였다. 화학적 발암원으로 1,2-dimethylhydrazine (DMH, 99% Acros Organics)를 사용하여 실험식이 공급과 동시에 모든 쥐에게 DMH를 타 보고<sup>7)</sup>에서와 같게 준비하여 주 2회씩 체중 kg당 15 mg을 6주간 좌, 우 대퇴근에 교대로 근육주사 하여 총 투여량이 180 mg/kg이 되도록 하였다.

### 2. 실험식이

실험식은 식이무게중 단백질이 18%, 당질이 58.2%,

**Table 1.** Diet composition of experimental groups

Ingredients (g)	Experimental groups		
	Control <sup>1)</sup>	c9t11 <sup>2)</sup>	t10c12 <sup>3)</sup>
	g/100 g diet		
Corn starch	58.23	58.23	58.23
Casein	18.00	18.00	18.00
L-methionine	0.27	0.27	0.27
$\alpha$ -cellulose	3.70	3.70	3.70
Beef tallow	11.59	10.20	10.19
Corn oil	2.91	2.92	2.96
c9t11-rich oil <sup>4)</sup>	-	1.38	-
t10c12-rich oil <sup>5)</sup>	-	-	1.35
AIN97-mineral mixtures	4.00	4.00	4.00
AIN97-vitamin mixtures	1.00	1.00	1.00
Choline bitartrate	0.30	0.30	0.30
Total	100.00	100.00	100.00

<sup>1)</sup> Control group contains no CLA isomer in diet

<sup>2)</sup> c9t11 group contains 1.0% (w/w) c9t11-isomer in diet

<sup>3)</sup> t10c12 group contains 1.0% (w/w) t10c12-isomer in diet

<sup>4)</sup> c9t11-rich oil contains 72.50% c9t11-isomer

<sup>5)</sup> t10c12-rich oil contains 74% t10c12-isomer

**Table 2.** Major fatty acid content in experimental groups

Major fatty acids	Experimental groups		
	Control	c9t11	t10c12
	g/100 g diet		
Linoleic acid	1.88	1.90	1.88
c9t11-isomer	-	1.00	0.15
t10c12-isomer	-	0.19	1.00

지방이 14.5% (CLA isomer 포함)가 되도록 구성하였으며, 다른 성분의 양은 동일하게 하였다 (Table 1). 식이지방으로 쇠기름 (beef tallow)과 옥수수유 (corn oil)을 사용하였으며 CLA isomers는 safflower oil을 이용하여 경상대학교 농화학 실험실에서 제조하였다.<sup>15)</sup> CLA isomer는 식이 중 1.0% (w/w)가 되도록 첨가하였고, 각 실험식이의 linoleic acid 함량은 약 1.88~1.90% (w/w)가 되도록 옥수수유를 사용하여 조절하였다 (Table 2). 실험식은 2주일에 한번씩 제조하여 -30°C에 보관하고 사용하였으며, 동물은 12 hr dark-light cycle로 조절되었고 물과 식이는 자유롭게 먹을 수 있도록 하였고 체중은 주 1회 같은 시간에 측정하였다.

### 3. 시료채취

30주간의 실험기간이 끝나는 날 공복상태에서 세포증식 측정에 사용할 쥐는 정확하게 해부하기 1시간 전에 BrdU (5'-bromo-2'-deoxyuridine, Sigma, #B-9285)를 체중 1 kg당 5 mg씩 복강주사 하였다. 쥐를 ethyl ether로 마취시킨 후, 대장을 절개하여 길기로 열어 내용물을 제거

하고 차가운 PBS buffer로 행군 후 탈지면을 사용해서 대장을 세척한다. 조직은 대장의 항문 부위 끝에서부터 1.5 cm 위에서 약 1 cm씩 잘라서 여과지에 붙여 70% ethanol에 고정시켜 냉장 보관하였다. 또한 대장점막만을 취해 PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, 1,2-DAG 함량과 COX-2와 PKC protein을 추출하는데 사용하기 위하여 -70°C에 저장하였다.

#### 4. 대장상피세포의 cell proliferation 측정

대장 상피조직의 세포증식 측정에 사용할 쥐를 위에서 언급된 것처럼 준비하여 Gavrieli 등<sup>16)</sup>의 방법을 이용해 distal 끝부분으로부터 1.5 cm 위쪽의 조직을 1 cm 채취하여 여과지에 붙여서 70% ethanol (4°C)에 고정시켜 대장 보관하였다가 paraffin block을 만든 뒤 조직을 4 μm 두께로 절편한 후 ion coated slide에 고정하였다. BrdU staining kit (Zymed, #93-3943, USA)을 이용하여 BrdU가 DNA에 결합한 정도를 관찰하여 세포증식 정도를 비교하였다. 이때 각 마리당 온전한 10개의 crypt를 선택하여 염색된 세포를 세어서 한 군의 평균을 계산하였다. 이때 crypt height는 crypt의 하단부터 상단까지 이르는 총 세포수를 세워서 10개 crypt의 평균값을 계산한 것이다. Labeling index (LI)는 세포증식이 일어난 세포의 DNA에 BrdU가 유입되며 이를 대조 염색하여 염색된 세포를 labeled cell이라 하며, LI는 한 crypt 세포 중 labeled cell의 수효를 백분율로 나타낸 것으로 LI 수치가 높을수록 세포증식이 증가했음을 나타낸다. Proliferative zone이란 한 crypt의 총 세포 중 labeled 된 세포가 어느 정도로 진행되어 crypt 끝을 향해서 올라갔는지 그 범위를 나타내는 수치로서 가장 높게 있는 labeled 된 세포수치가 증가 할수록 세포증식이 증가했다는 것을 의미한다.

#### 5. Thromboxane (TX)B<sub>2</sub>과 prostaglandin (PG)E<sub>2</sub> 함량 측정

TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 분석<sup>17)</sup>을 위해 대장 점막 50 mg을 indomethacin을 첨가한 0.05 M Tris buffer (pH 8.0, 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA) 2 ml을 넣어 균질화 하였다. 균질액을 37°C water bath에 30분간 incubation 하고 0.35 ml ice cold ethanol (총 volumn의 15%)을 첨가한 후 1 M citric acid를 첨가하여 산성상태 (pH 3-3.5)로 만들어 4°C, 4,000 × g에서 15분간 원심분리였다. 상층액을 취하여 전처리한 Amprep C2 column (1 ml/100 mg column, Armersharm Phamacia Biotech, #RPN 1903, UK, TXB<sub>2</sub> 분석에 사용)과 Amprep C18 column (Armersharm Phamacia biotech, #RPN 1900, UK, PGE<sub>2</sub> 분석에 사용)에 각각 loading 한 후 methylformate를 통과시켜 얻은 용출액을 질소가스로 건조시킨 후 assay buffer로 2000~5000

배로 희석하여 TXB<sub>2</sub>분석에는 enzyme immunoassay (EIA) kit (Armersharm Phamacia biotech, #RPN 220, UK)와 PGE<sub>2</sub> 분석에는 EIA kit (Armersharm Phamacia Biotech, #RPN 222, UK)를 각각 사용해 통상적인 방법으로 측정하였다.

#### 6. 1,2-Diacylglycerol (DAG) 함량 측정

대장 점막 50 mg을 취하여 Bligh & Dyer<sup>18)</sup>의 방법으로 지질을 추출하였다. 이 과정에서 지방산 분해를 막기 위해 추출액에 butylated hydroxy toluene을 0.005% 첨가하였다. 지질 추출액을 질소가스로 건조시킨 후 다시 일정량의 chloroform에 녹여 silica gel thin layer chromatography plate (25 TLC plate 20 × 20 cm Silica gel F<sub>254</sub>, Merck KGaA, Germany)를 이용하여 Duncan과 Lloyd<sup>19)</sup>의 방법으로 전개시켰다. 1,2-DAG에 해당하는 부위를 긁어서 chloroform에 녹인 후 원심분리하고 일정량의 상층액을 취해 Fletcher<sup>20)</sup>의 방법에 따라 DAG 함량을 측정하였다. 이때 중성지방 분석에 표준으로 사용한 triolein 대신 diacylglycerol을 표준으로 사용하였다.

#### 7. 대장점막의 COX-2와 PKC 단백질 발현

Western blot analysis에 의해서 대장점막의 COX-2와 PKC 단백질 발현을 측정하기 위해 대장 점막조직 50~100 mg을 취해 lysis buffer인 IP<sup>+</sup> buffer (10 mM Hepes 10 ml, 1% Triton X-100 25 ml, 150 mM NaCl 15 ml, 1 mM EDTA 1 ml, 1 mM EGTA 2 ml, 100 mM NaF 100 ml, 10 mM sodium pyrophosphate 25 ml, 0.2 M sodium orthovanadate 0.05 ml, 0.1 M PMSF 0.02 ml, antiprotease cocktail AP-1 0.02 ml) 1 ml에 넣고 균질화 하였다. 12,000 × g에서 원심분리한 후 Bradford 방법<sup>21)</sup>에 의한 BCA protein assay reagent kit (Pierce, #23227)로 단백질을 정량하였다. 추출한 단백질 100 μg을 취해 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 실행하였고 transfer 과정을 거쳐 nitrocellulose membrane에 단백질을 이동시킨 뒤 원하는 단백질에 맞는 각각의 일차항체와 이차항체를 붙이고 감광하여 원하는 단백질의 발현량을 관찰하였다.

#### 8. 통계분석

모든 실험결과는 Statistic Analysis System (SAS) program (ver. 8.0)을 이용하여 two Way-ANOVA로 분석하고 평균 ± 표준편차로 표시하였다. General linear model (GLM)을 이용하여 Duncan's multiple test로 비교했으며 p < 0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### 1. 식이 섭취량과 체중 증가량

실험 시작 후 3주째까지는 사료 섭취량이 급속하게 증가하였고 그 이후에는 약 35~40 g/day 정도로 모든 군에서 비슷하게 일정한 수준으로 섭취하였다 (자료 제시하지 않았음). 체중은 실험 시작 후 약 6~7주까지 서서히 직선적으로 계속 증가하는 추세였으며 그 이후에는 꾸준하게 완만하게 약간의 증가하는 모습을 보였으나 약 20주를 지나서는 거의 비슷한 수준을 유지하였고 마지막 체중 증가는 약 326~333 g 범위 내에서 모든 군에서 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 3).

### 2. 대장상피세포의 종양 발현

대장 종양 발생률은 3군에서 95~100%로써 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 각 군당 발생한 총 종양 수는 대조군이 t10c12군과 c9t11군 보다 많이 발생하였다. 마리

당 평균 종양 수는 대조군 (3.86)이 t10c12군 (2.91)군과 c9t11군 (2.78)에 비해 유의하게 많았으며, 종양의 크기는 대조군이 t10c12군과 c9t11군에 비해 큰 경향을 보였으나 유의하지는 않았다 (Table 4).

대장을 proximal과 distal로 나누어 비교한 결과 proximal colon에서 발생한 종양 수는 대조군에 비해 두개의 CLA isomer군에서 더 적게 발생하여 한 마리당 평균 종양 수는 대조군 (2.11)에 비해 t10, c12군 (1.56)과 c9, t11군 (1.27)에서 유의하게 더 적었다. 또한 종양의 크기도 대조군 (4.88 mm)에 비해 두개의 CLA isomer군 (4.00 mm, 3.09 mm)에서 유의하게 더 적었다 (Table 5). Distal colon에서 종양 수는 대조군, c9, t11군, t10, c12군 순으로 약 46~66개 정도 발생하였으며, 한 마리당 평균 종양 수도 각 군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 5). 종양의 크기도 약 6.87~7.79 mm로서 군 간에 차이를 보이지 않았으며 proximal colon의 종양 (3.09~4.88 mm)보다 더 컸다.

### 3. 대장상피세포의 cell kinetic indices

대장 상피세포의 circumference 세포수는 대조군에 비해 t10c12군에서 유의하게 감소하였으며, crypt height는 대조군에 비해 t10c12군과 c9t11군에서 유의하게 감소하였다. 그러나 두 CLA isomer 간에는 차이가 없었다. LI 값은 각 군 간에 유의한 차이를 보이지 않았으며, proliferative zone 값은 대조군과 t10c12에 비해 c9t11군에서 유의하게 감소하였다 (Table 6).

**Table 3.** Feed intake and body weight gain in rats during experimental periods

Groups	Feed intake g/day	Initial body weight g	Final body weight g	Total weight gain g
Control	35.1 ± 7.4	183.9 ± 12.6	511.5 ± 36.6	326.3 ± 38.4
c9t11	35.0 ± 6.9	180.1 ± 10.9	512.4 ± 41.1	332.6 ± 38.6
t10c12	34.9 ± 6.5	183.4 ± 8.3	512.5 ± 31.2	330.0 ± 30.2
p-value	0.9916	0.2571	0.9925	0.7606

Values are mean ± SD

**Table 4.** Effect of CLA isomers on tumor incidence in colonic mucosa

Groups	Tumor bearing rats	Tumor incidence (%)	Total tumors	Mean tumor number per rat
Control	37	100	144	3.86 ± 1.62 <sup>a</sup>
c9t11	35	94.6	103	2.78 ± 1.40 <sup>p</sup>
t10c12	33	97.1	99	2.91 ± 1.14 <sup>p</sup>
p-value				0.002

Number of rats: 34 - 37

Values are mean ± SD

Values with different superscript were significantly different at p < 0.05

**Table 5.** Comparison of mean tumor number and tumor size between proximal and distal colon of DMH-treated rats

Groups	Proximal colon		Distal colon	
	Mean tumor number per rat	Mean tumor size per rat (mm)	Mean tumor number per rat	Mean tumor size per rat (mm)
Control	2.11 ± 1.24 <sup>a</sup>	4.88 ± 3.16 <sup>a</sup>	1.78 ± 1.20	7.39 ± 3.54
c9t11	1.27 ± 0.87 <sup>b</sup>	3.09 ± 2.83 <sup>b</sup>	1.51 ± 0.93	6.87 ± 4.05
t10c12	1.56 ± 0.86 <sup>b</sup>	4.00 ± 3.26 <sup>b</sup>	1.35 ± 0.69	7.79 ± 4.75
p-value	0.002	0.005	0.115	0.251

Number of rats: 34 - 37

Values are mean ± SD

Values with different superscript were significantly different at p < 0.05 within a column

**Table 6.** Effect of CLA isomers on cell kinetic indices in colonic mucosa of DMH-treated rats

Groups	Circumference	Crypt height <sup>1)</sup>	Labeling index <sup>2)</sup>	Proliferative zone <sup>3)</sup>
	No. of cells	No. of cells	%	%
Control	33.37 ± 2.24 <sup>a</sup>	34.13 ± 1.99 <sup>a</sup>	10.67 ± 2.31 <sup>a</sup>	56.90 ± 14.02 <sup>a</sup>
c9t11	32.15 ± 1.46 <sup>ab</sup>	32.28 ± 1.54 <sup>b</sup>	7.96 ± 2.56 <sup>a</sup>	37.75 ± 8.18 <sup>b</sup>
t10c12	30.93 ± 1.57 <sup>b</sup>	31.34 ± 1.39 <sup>b</sup>	9.11 ± 3.02 <sup>a</sup>	50.34 ± 8.16 <sup>a</sup>
p-value	0.047	0.010	0.124	0.005

Values are mean ± SD

Values with different superscripts were significantly different at p < 0.05 within a column

<sup>1)</sup> Crypt height = total number of cells in each crypt

<sup>2)</sup> Labeling index = (total number of labeled cells/crypt height) × 100

<sup>3)</sup> Proliferative zone = (position of highest labeled cell/crypt height) × 100

**Table 7.** Effects of CLA isomers on colonic mucosal levels of TXB<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> and DAG in DMH treated rats

Groups	TXB <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub>	DAG
	ng/mg mucosa		μg/mg mucosa
Control	3.25 ± 0.48 <sup>a</sup>	12.23 ± 3.10 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.10 <sup>a</sup>
c9t11	1.83 ± 1.04 <sup>b</sup>	9.17 ± 3.00 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.05 <sup>a</sup>
t10c12	1.73 ± 0.65 <sup>b</sup>	11.96 ± 2.31 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.08 <sup>b</sup>
p-value	0.0003	0.046	0.023

Values are mean ± SD

Values with different superscript were significantly different at p < 0.05 within a column

#### 4. 대장점막의 PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>와 DAG 함량

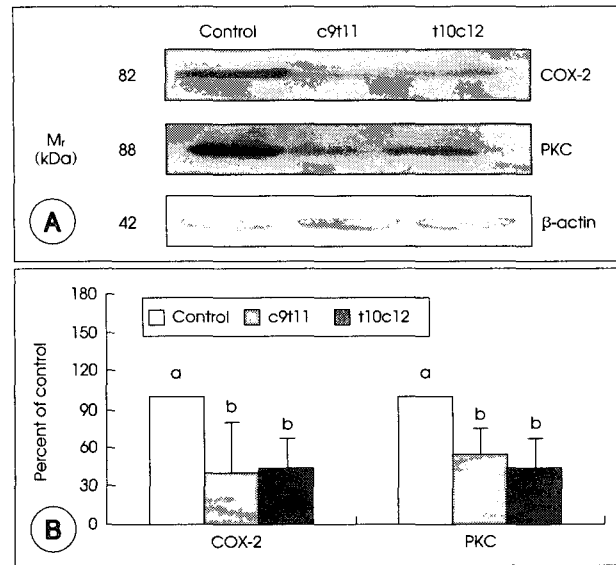
대장 점막의 TXB<sub>2</sub> 함량은 대조군에 비해 두개의 CLA isomers (c9t11, t10c12)군에서 유의하게 감소하였으며, PGE<sub>2</sub> 함량은 대조군과 t10c12군은 차이가 없었으나 c9t11군에서 유의하게 감소하였다 (Table 7). DAG 함량은 대조군과 c9t11군에 비해서 t10c12군에서 유의하게 감소하였으며, 대조군과 c9t11군은 유의한 차이가 없었다 (Table 7).

#### 5. 대장점막의 COX-2와 PKC 단백질 함량

Western blot analysis에 의해서 COX-2와 PKC 단백질을 분석하였을 때 대조군에 비해 두개의 CLA isomer 군에서 COX-2와 PKC 단백질 발현이 더 낮았다 (Fig. 1). 각 군에서 개체간의 표준편차가 커서 대조군의 값을 100%로 표현하였을 때 c9t11군과 t10c12군의 COX-2 단백질 발현은 40~43.5%수준이었고, PKC는 43~45%수준으로 유의하게 더 감소하였다.

### 고 찰

식이지방이 대장암 발현에 중요한 인자로 작용한다는 연구는 많이 보고되었으며,<sup>22,23)</sup> 또한 식이지방 종류에 따라서 미치는 작용이 다르게 나타났다. N-6 지방산 함량이 높은 옥수수유나 포화지방산을 높게 함유한 고지방식에 의해서 암발생률이 더 높았다.<sup>24)</sup> 한편, 어유에 많은 n-3 지방산인 EPA나 DHA는 linoleic acid (LA)와 포화지방산에 비



**Fig. 1.** Effect of conjugated linoleic acid isomer on the protein expression of COX-2 and PKC in the colonic mucosa of DMH-treated rats. Mucosal lysates were subjected to immunoblotting with an antibody against COX-2, PKC or β-actin. A: photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of 6 different rats, are shown. B: quantitative analysis of immunoblots. Each bar represents the mean ± SD (n = 6).

해 대장암 발생을 억제 시킨다고 보고되었다.<sup>25)</sup> LA의 이성체인 CLA는 오히려 항암효과가 있는 것으로 알려졌다. Ha 등<sup>26)</sup>의 보고에 의하면 LA에 비해 CLA로 처리한 쥐에서 대장의 종양발생률이 15% 낮았다고 하였다. Kim과 Park<sup>6)</sup>의 보고에서도 식이지방에 첨가한 1.0% CLA는 대장의 종양발생률이 대조군의 40% 발생률에 비해 23%로서 약 43%를 더 감소시켰다. 그러나 본 연구에서는 두개의 CLA isomers (c9t11; t10c12)는 대조군에 비해 유의하게 종양발생률을 억제하지는 않았으나 다만 마리당 평균 종양 수를 비교했을 때 대조군에 비해 c9t11군과 t10c12군에서 유의하게 더 낮았으며, 두개의 isomer 간에는 차이가 없었다. 지금까지 보고된 바<sup>6,27)</sup>에 의하면 식이지방에 의해서 대장의 종양발생은 주로 distal colon에서부터 진행되는 데 본 연구에서는 실험기간이 길어지면서 종양발생률이 95~100%

가 되었고, distal colon에서 종양발생이 이미 많이 진행되어 발생한 종양은 size가 더 커지고 proximal colon 부위에 까지 종양의 분포가 넓어져서 distal 부위에서는 3군 간에 유의한 차이를 나타내지 않았을 것으로 사료된다. 반면, proximal colon에서는 CLA isomer를 첨가한 두개의 군에서는 대조군보다 유의하게 한 마리당 종양의 수효와 종양의 크기가 적었다. 두개의 CLA isomer는 종양발생을 억제하는 효과가 있었지만 c9t11 isomer와 t10c12 isomer 간에는 차이가 없었다.

암화 과정의 촉진 및 진행단계에서 필수적으로 일어나는 현상인 세포증식을 촉진시키는 요인은 대장암 발생을 촉진하는 인자로 간주할 수 있다.<sup>28)</sup> 세포증식이 촉진되었을 경우 생성되는 세포수가 탈락하는 세포수보다 더 많아짐으로 crypt size가 넓어지고 길어지게 되어 대장암의 발생위험이 증가되었으며, 정상에서보다 labeling index와 proliferation 정도가 유의하게 높았다고 하였다.<sup>29)</sup> 본 연구에서는 c9t11 isomer와 t10c12 isomer 각각 세포증식을 감소시켰으나 두 개의 isomer간의 차이는 볼 수 없었다.

Palombo 등<sup>5)</sup> 연구에 의하면 대장암 세포에서 t10c12 isomer가 세포증식을 감소시켰으며, 전립선암 세포에서는 c9t11 isomer와 t10c12 isomer 모두 세포증식을 감소시키는 것으로 보고되었고, Miller 등<sup>12)</sup>의 연구에서는 대장암 세포에서 t10c12 isomer가 c9t11 isomer에 비해 세포증식을 감소하였다고 보고하였다. 또한 Park 등<sup>14)</sup>의 동물 연구에서는 c9t11 isomer와 t10c12 isomer가 차이 없이 두 isomer가 세포증식을 감소시켰다. 본 연구에서도 c9t11 isomer와 t10c12 isomers에 의해서 세포증식이 감소되었으나 두개 isomer 간에는 억제효과에 차이가 없었다.

Tumor promotor와 같은 외부에 자극에 의해 phospholipase A<sub>2</sub>가 활성화되고 세포 이중막을 구성하는 인지질로부터 arachidonic acid (AA)가 유리되어 cyclooxygenase (COX) pathway를 거쳐 prostaglandin (PG), thromboxane (TX), prostacyclin 등의 eicosanoids로 대사된다. Iwakiri 등<sup>10)</sup>은 CLA가 COX-2의 활성도를 감소시켜 eicosanoid의 합성을 억제하여 항암효과를 가진다고 하였다.

또한 Nakanishi 등<sup>30)</sup>과 Hubbard 등<sup>3)</sup>의 연구에 의하면 CLA를 투여한 쥐에서는 PGE<sub>2</sub>이 감소되었고, PGE<sub>2</sub>의 전구체인 AA 함량이 감소되어 eicosanoid 대사가 변화되고 종양의 전이가 감소되었다고 하였다. Kim과 Park 등<sup>6)</sup>의 연구에서는 CLA에 의해서 대장의 종양발생률이 감소되었고, 대장점막의 인지질 지방산 조성 중 CLA가 유입되는 동시에 AA의 분포량이 유의하게 감소되었으며 이에 비례하게 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 함량이 감소되었다. 본 연구에서는 두개

의 c9t11 isomer와 t10c12 isomer를 첨가한 군에서 대조군 (100%)에 비해서 COX-2 단백질 발현이 40~43.5% 수준으로 유의하게 감소되었으며 (Fig. 1), 이와 같은 경향으로 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 함량도 감소되었다. Eder 등<sup>31)</sup>의 in vitro 연구에서도 c9t11 isomer와 t10c12 isomer를 50 μM의 농도로 처리하였을 때 두 isomer는 서로차이 없이 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 함량을 감소시켰으며, Park 등<sup>14)</sup>의 동물연구에서도 c9t11 isomer와 t10c12 isomer는 차이 없이 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 함량이 감소하였다.

세포막의 receptor에 hormone, 또는 neurotransmitter 등이 결합하면 세포내에서 신호를 전달하는 cAMP와 같은 2차 전령 (second messenger)이 생성된다. 1,2-diacylglycerol (DAG)은 대장 상피세포의 성장 프로그램을 조절하는 protein kinase C (PKC)의 활성제로 알려져 있으며 종양 촉진과 관련된 signal transduction에서 중요하다.<sup>32)</sup> Phospholipase C (PLC)는 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)에 작용하여 1,2-DAG와 inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>)를 형성하는데 이 때 1,2-DAG는 PKC를 활성화하여 protein phosphorylation을 촉진함으로 세포의 신호전달 체계에 변화를 주어 세포증식에 관여한다.<sup>33)</sup> Farquharson 등<sup>34)</sup>의 보고에서는 전립선 암세포 배양액에 CLA를 첨가하였을 때 DAG 함량이 50% 감소하였고, DMH로 대장암을 유발시킨 쥐에서 식이에 CLA mixture를 첨가했을 때 1,2-DAG 함량이 유의하게 감소하였고,<sup>7)</sup> 또한 동물연구에서 c9t11 isomer와 t10c12 isomer를 각각 식이의 0.8% 수준으로 먹었을 때 isomer 간의 차이 없이 1,2-DAG 함량이 감소하였다.<sup>14)</sup> 본 연구에서는 t10c12 isomer에 의해서 1,2-DAG 함량이 유의하게 감소하였으며, 이에 의해 활성화되는 효소인 PKC 단백질 발현은 두개의 isomers에 의해서 유의하게 감소하였다 (Fig. 1). 또한 식이에 첨가한 두개의 isomers에 의해서 COX-2 단백질 발현이 억제되어 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 생성이 감소되었으며, 1,2-DAG 함량도 감소되어 PKC 단백질 발현도 감소되었으며 이에 따라 protein phosphorylation이 감소하여 결과적으로 cell proliferation이 억제되고 종양발생이 적었을 것이라고 사료된다.

## 요약 및 결론

본 연구에서는 DMH로 대장암을 유발시킨 Sprague Dawley 중 수컷 쥐를 식이에 두가지 CLA isomers (c9t11, t10c12)를 첨가한 실험식으로 30주 동안 사육하여 두개의 isomers가 대장의 종양발생과 암화과정에 미치는 생화학적

기전을 비교하고자 하였다. 대장 암화과정의 biomarker로 대장점막의 COX-2와 PKC 단백질 발현을 Western blot analysis로 검토하고, PGE<sub>2</sub>와 TXA<sub>2</sub>의 함량과 1,2-DAG 함량을 각각 측정하였으며, 대장상피세포의 세포증식을 BrdU 방법으로 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 대장의 종양발생율은 CLA isomer (c9t11, t10c12)에 의해서 유의하게 낮았으나 두개의 isomer군에는 차이가 없었다.

2) 대장 상피세포의 세포증식도 CLA isomers (c9t11, t10c12)에 의해서 유의하게 억제되었으나 두개의 isomer 간에는 차이가 없었다.

3) 대장 점막의 COX-2 단백질 발현은 CLA isomers (c9t11, t10c12)에 의해 유의하게 감소하였으며, TXB<sub>2</sub>의 함량은 CLA isomers (c9t11, t10c12)에 의해 감소하였고, PGE<sub>2</sub>는 c9t11-isomer에 의해서만 감소하였다.

4) 대장 점막의 1,2-DAG 함량은 t10c12 isomer에 의해서 유의하게 낮았으나 PKC 단백질 발현은 두개의 isomers (c9t11, t10c12)에 의해서 유의하게 감소되었다.

전체적으로, CLA isomers (c9t11, t10c12)는 대장점막의 COX-2 단백질 발현을 억제하여 eicosanoid 함량이 감소되었고, 또한 1,2-DAG 함량이 감소되어 PKC 단백질 발현이 억제되어 대장점막의 세포증식이 감소되었을 것이며, 이에 따라 대장의 종양발생율도 감소되었을 것이라고 사료된다. 그러나 CLA isomer 중 c9t11 isomer와 t10c12 isomer의 종양 발생억제 효과는 유의한 차이를 보이지 않았다.

#### Literature cited

- 1) Pariza MW, Park YH, Cook ME. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res* 40: 283-298, 2001
- 2) Hubbard NE, Lim D, Erickson KL. Effect of separate conjugated linoleic acid isomers on murine mammary tumorigenesis. *Cancer Letters* 190: 13-19, 2003
- 3) Hubbard NE, Lim D, Summers L, Erickson KL. Reduction of murine mammary tumor metastasis by conjugated linoleic acid. *Cancer Letters* 150: 93-100, 2000
- 4) Cesano A, Visonneau S, Scimeca JA, Kritchevsky D, Santoli D. Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res* 18: 1429-1434, 1998
- 5) Palombo JD, Ganguly A, Bistran BR, Menard MP. The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Letters* 177: 163-172, 2002
- 6) Kim KH, Park HS. Dietary supplementation of conjugated linoleic acid reduces colon tumor incidence in DMH-treated rats by increasing apoptosis with modulation of biomarkers. *Nutrition* 19: 772-777, 2003
- 7) Park HS, Ryu JH, Ha YL, Park JH. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br J Nutr* 86: 549-555, 2001
- 8) Kritchevsky D. Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. *Br J Nutr* 83: 459-465, 2000
- 9) Williams CS, Dubois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? *Am J Physiol* 270: G393-G400, 1996
- 10) Iwakiri Y, Sampson DA, Allen KG. Suppression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by conjugated linoleic acid in murine macrophages. *Prostaglandins Leukot Essential Fatty Acids* 67 (6) : 435-443, 2002
- 11) Sumitani K, Kamijo R, Toyoshima T, Nakanishi Y, Takizawa K, Hatori M, Nagumo M. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 results in inhibition of proliferation of oral cancer cell lines via suppression of prostaglandin E2 production. *J Oral Pathol Med* 30: 41-47, 2001
- 12) Miller A, Stanton C, Devery R. Cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultured SW480 cells. *Anticancer Res* 22: 3879-3887, 2002
- 13) Liu JR, Chen BQ, Yang YM, Wang XL, Xue YB, Zheng YM, Liu RH. Effect of apoptosis on gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 induced by cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid. *World J Gastroenterol* 8: 999-1004, 2002
- 14) Park HS, Kwon PS, Park Jung HY, Ha YL. Effects of dietary CLA isomers on apoptosis and cell proliferation in colonic mucosa of DMH-treated rats. *J Korean Nutr* 36 (7) : 661-666, 2003
- 15) Kim YR, Lee YH, Park KA, Kim JO, Ha YL. A simple method for the preparation of highly pure conjugated linoleic acid (CLA) synthesized from safflower seed oil. *J Food Sciences Nutr* 5: 10, 2000
- 16) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992
- 17) Granstron E, Samuelson B. In: *Advances in prostaglandin and thromboxane research*. JC Frolich, ed. Raven Press, New York, pp.1-13, 1981
- 18) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917, 1957
- 19) 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
- 20) Fletcher MJ. A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin Chim Acta* 22: 393-397, 1968
- 21) 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
- 22) Wynder EL, Kajitani T, Ishikawa S, Dodo H, Takano A. Environmental factors of the colon and rectum. II. Japanese epidemiological data. *Cancer* 23: 1210-1229, 1969
- 23) Levi F, Pasche C, Lucchini F, La Vecchia C. Macronutrients and colorectal cancer: a Swiss case-control study. *Ann Oncol* 13: 369-373, 2002
- 24) Reddy BS, Maelura Y. Tumor promotion by dietary fat in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in female F344 rats: In-

- fluence of amount and source of dietary fat. *J Natl Cancer Inst* 72: 745-750, 1984
- 25) Minoura T, Takata T, Sakaguchi M, Yamamura M, Hioki K, Yamamoto M. Effect of dietary eicosapentaenoic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Cancer Res* 46: 4790-4794, 1988
- 26) Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881-1887, 1987
- 27) Ma QY, Williamson KE, Rowlands BJ. Variability of cell proliferation in the proximal and distal colon of normal rats and rats with dimethylhydrazine induced carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 8: 847-852, 2002
- 28) Butterworth BE, Goldsworthy TL. The role of cell proliferation in multistage carcinogenesis. *Cell Proliferation* 37: 683-687, 1991
- 29) Wilson RG, Smith AN, Bird CC. Immunohistochemical detection of abnormal cell proliferation in colonic mucosa of subjects with polyps. *J Clin Pathol* 43 (9): 744-747, 1990
- 30) Nakanishi T, Koutoku T, Kawahara S, Murai A, Furuse M. Dietary conjugated linoleic acid reduces cerebral prostaglandin E (2) in mice. *Neurosci Letters* 341: 135-138, 2003
- 31) Eder K, Schleser S, Becker K, Korting R. Conjugated linoleic acids lower the release of eicosanoids and nitric oxide from human aortic endothelial cells. *J Nutr* 133 (12): 4083-4089, 2003
- 32) Pickering JS, Lupton JR, Chapkin RS. Dietary fat, fiber and carcinogen alter fecal diacylglycerol composition and mass. *Cancer Res* 55 (11): 2293-2298, 1995
- 33) Berridge MJ. Inositol triphosphate and diacylglycerol interacting second messenger. *Ann Rev Biochem* 56: 193-215, 1987
- 34) Farquharson A, Wu HCL, Grant I, Graf B, Choung JJ, Eremin O, Heys S, Wahle K. Possible mechanism for the putative antiatherogenic and antitumorogenic effects of conjugated polyenoic fatty acid. *Lipids* 34: S343, 1999