

비타민 E와 Dehydroepiandrosterone이 화학적 발암원으로 유도한 쥐간의 전암성 병변에 미치는 영향

김 숙 희* · 최 혜 미**

혜전대학 호텔조리계열, * 서울대학교 생활과학대학 식품영양학과**

Effects of Vitamin E and Dehydroepiandrosterone on the Formation of Preneoplastic Lesions in Rat Hepatocellular Carcinogenesis

Kim, Sookhee* · Choi, Haymie**

Division of Hotel Culinary Arts, * Hyejeon College, Hongseung 350-702, Korea

Department of Food and Nutrition, ** College of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT

This study is designed to examine the effects of dietary supplementation with vitamin E and dehydroepiandrosterone (DHEA) on the formation of preneoplastic lesions in diethylnitrosamine (DEN) induced rat hepatocarcinogenesis. All Weaning male Sprague-Dawley rats were initiated by a single dose of DEN (200 mg/kg body weight), subjected to two-thirds partial hepatectomy 3 weeks later and were sacrificed 8 weeks after DEN initiation. Two weeks after initiation, rats were fed Purina purified rodent diet 5053 (Ralston Purina Rat chow, USA) with 1.5% (15,000 IU/kg diet) vitamin E, 0.5% DHEA and both of those supplemented diet for 6 weeks. Placental glutathione S-transferase (GST-P) positive foci, the activities of catalase, total-glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) contents were decreased significantly by vitamin E supplement. On the other hand GST-P positive foci number, Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) and glucose 6-phosphatase (G6Pase) activities weren't changed by vitamin E supplement. It might suggest that protective effect of vitamin E against hepatocarcinogens is not involved in the formation of the GST-P positive foci but related to the expansion of that. It seemed that vitamin E supplement helped endogenous defense system in carcinogenesis by decreasing TBARS contents, H₂O₂, organic peroxides. Therefore, vitamin E seemed to protect cell from free radical damage in carcinogenesis. By DHEA supplement liver weight and liver/body ratio were increased, the area and number of GST-P positive foci, the activities of catalase, GR, total GPx, GST and the TBARS contents were decreased significantly. On the other hand Cu/Zn-SOD and G6Pase activities weren't changed by DHEA supplement. In hepatocarcinogenesis the activities of antioxidant enzymes weren't increased by DHEA supplement. DHEA did not increase the oxidative stress, while DHEA seems to have anticarcinogenic effect in rats hepatocarcinogenesis. (*Korean J Nutrition* 38(5): 364~372, 2005)

KEY WORDS : hepatocarcinogenesis, vitamin E, dehydroepiandrosterone, GST-P positive foci, antioxidant enzymes.

서론

암은 다단계 과정으로¹⁾ 지난 수년간 암 원인 물질, 암 생성 기전 및 암 세포 활동에 대한 오랜 연구 결과 많은 중앙 개시제와 촉진제가 환경 및 음식물에서 확인되었다.²⁾ 인간에게 생기는 모든 암의 약 80~90%가 환경에 의해 유발되

며 이중 약 20~40%가 음식물과 관련된 것으로 추정되고 있다.³⁾ 많은 암의 개시 및 촉진과정에 유리라디칼에 의한 생체내 주요 단백질, 지질, 핵산의 손상이 관여하는 것으로 생각되며⁴⁾ 몇몇 효소와 항산화제인 비타민 E, 비타민 A, 및 비타민 C와 베타 카로틴이 유리라디칼 손상으로부터 세포를 보호해 준다.⁵⁾ 비타민 E는 과산화로 인해 세포막이 손상되는것을 막아주는 1차 방어선으로서 유리라디칼을 제거해 주며 연쇄 반응을 종식시키고 세포막의 제한된 부위에 손상을 한정시켜 주는 역할을 한다.⁶⁾ 또한 비타민 E가 protein kinase C 활성을 감소시켜 세포 성장을 억제한다고 보고되었다.⁷⁾ 그러나 10, 50, 250 mg/kg 비타민 E는 polychlo-

접수일 : 2005년 4월 30일

채택일 : 2005년 6월 17일

*To whom correspondence should be addressed.

E-mail : sookhee@hyejeon.ac.kr

minated biphenyls (PCB)을 투여한 암쥐의 GST-P 양성 병소 증식을 억제하지 못하였다.⁸⁾

Dehydroepiandrosterone (DHEA)은 cholesterol이 pregnenolone으로 전환된 후 hydroxylation되어 생성된 17 α -hydroxypregnenolone의 대사산물이며, testosterone과 estrogen의 전구물질이며, dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEAS)와 함께 인간 순환계 중에 가장 많은 양으로 존재하는 부신 피질 호르몬이다. 암, 동맥경화, 알츠하이머 병 등을 가진 환자들에게서 DHEA의 일차배설 산물인 androsterone과 eticholanolone의 혈액농도가 비정상적으로 낮았고, 노화될수록 농도가 낮아진다고 보고되었다.⁹⁾ DHEA의 생물학적 역할은 분명치 않지만 비경쟁으로 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)의 억제제로 NADPH를 낮추고 NADPH-의존성 산소라디칼의 생성을 억제하는데, 이러한 기작을 통하여 염증반응과 세포분열을 낮추어 암과 동맥경화를 억제하는 것으로 보고되었다.¹⁰⁾ 또한 DHEA는 음식절제없이 체중감소를 유발시켜 비만을 억제시키고,¹¹⁾ 선천성 당뇨병을 완화시키며,¹²⁾ 자가면역 질환 및 동맥경화증¹³⁾을 감소시키는 효과가 있다고 알려져 있다. 그러나 DHEA의 효과에 대해서는 아직도 상반된 결과들이 보고되고 있는데,¹⁴⁾ DHEA투여가 간암을 억제하는지 촉진하는지는 실험동물의 종, 투여량, 투여시기와 기간 등에 따른다. 시넵토솜에서 3-nitropropionic acid에 의해 유도된 산화적 손상을 DHEA가 억제하였으며,¹⁵⁾ DHEA는 발암원을 활성화시키는 효소인 간 cytochrome P450 1A1, cytochrome P450 1A2의 발현을 유의적으로 감소시켰다.¹⁶⁾ 인간의 혈관 내피세포에 apoptosis를 일으켜 세포성장을 억제시켰으며, 이를 통해 중앙조직을 억제하는 것으로도 보고되었다.¹⁷⁾ 한편, DHEA는 peroxisome 증식제이며 간, 신장, 심장 등의 미토콘드리아에서 NADPH-의존성 지질과산화물을 유발하는 작용을 할 수 있는데,¹⁸⁾ DHEA에 의해 유도되는 소포체 단백질의 카보닐기 생성을 비타민 E가 방어하였다.¹⁹⁾ 비타민 E는 DHEA에 의해 증가한 항산화 효소활성도를 낮추어 DHEA에 의한 산화적 손상을 낮출 수 있을 것으로 보고된 바 있다.²⁰⁾ 반면, 비타민 E 결핍식을 먹인 쥐에게 DHEA 50, 100 mg/kg 복강주사를 했을 때 DHEA는 간의 비타민 E 양에는 변화를 주지 않았으나, 체중과 지질과산화물 생성을 감소시키고, 간의 sulfhydryl (SH)기와 glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD)를 증가시키고, GST 활성은 감소시키는 항산화 효과를 보였다.²¹⁾ 그러나 15주령된 쥐에게 비타민 E없이 DHEA 식이를 주었을 때는 간암이 유발되었다.²²⁾

이를 볼 때, 비타민 E와 DHEA가 간 세포 암화과정에 미

치는 영향과 그 가능한 기전에 대해 살펴볼 필요가 있다. 또한 DHEA가 쥐 간 세포암화과정에서 항산화제로 작용하는지, 산화손상 유도제로 역할하는지 규명할 필요가 있다. 이에 본 연구는 생체 고유의 항산화 물질인 비타민 E와 인간 순환계중에 가장 많은 양으로 존재하는 부신 피질 호르몬인 DHEA가 쥐 간의 암화과정에 미치는 영향과 그 기전으로 항산화 효과가 관여하는지를 알아보고자 하였다. 이를 위해 본 실험에서 사용한 간세포암 유도모델인 Ito 모델²³⁾은 실험기간이 8주로 짧으나 장기간의 실험결과와 일치하며 화학물질의 발암성 유무를 검색하는데 매우 유용한 방법으로 인정되고 있다. 비타민 E는 부작용을 일으키지 않는다고 보고된 범위내인 식이 kg 당 15,000 IU로 보강하였고,²⁴⁾ Purina rat chow 5053 (5% w/w fat, 100 IU/kg diet)을 기본 사료로 사용하였다. 또한 발암원 활성화 효소 발현을 억제한 DHEA¹⁶⁾양을 식이수준으로 환산한 0.5%로 잡아 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

서울대학교 동물사육장으로부터 이유한 Sprague-Dawley종 숫쥐 중에서 45~80 g된 것을 공급받아 사육실의 환경에 순응시킨 후 200 g 정도의 무게가 되었을 때 실험에 사용하였다. 정상 조건 하에서 각군 당 10마리씩, 대조군은 8마리로 나누어 후 실험식이를 8주간 공급하였다.

2. 실험식이 및 저지

실험식은 Purina purified rodent diet 5053 (Ralston Purina rat chow, 5% w/w fat, 100 IU/kg diet, USA)을 곱게 갈아 사용하였고 비타민 E는 1.5% (15,000 IU/kg diet), DHEA 0.5% 식이수준으로 사용하였다. 실험식은 매번 질소가스로 충전시킨 다음 냉동고에 보관하였다가 사용하였다. 모든 쥐들은 기본 사료로 사육하여 200 g 정도의 무게가 되었을 때 5개 실험군으로 나누어 실험에 사용하였고 쥐 간 세포암 유도를 위하여 8주간의 Ito 모델²³⁾을 실시하였다 (Fig. 1).

3. 시료의 수집 및 전처리

실험 동물을 희생시킨 후 간을 절제하여 즉시 차가운 식염수로 세척한 다음 여과지에 놓아 물을 흡수시켜 간 전체 무게를 재고 약 5 g의 간을 떼내어 잘게 다졌다. 그 다음 얼음처럼 차가운 균질용 용액 (154 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA buffer, pH 7.4) 약 25 ml에 넣고 얼음에 꽂아 4℃에서 균질화한 후 고속 원심분리기에서 4℃,

1,000 × g의 조건하에 10분간 원심분리하였다. 다음 윗부분의 세포 조각들과 지방층이 섞이지 않도록 조심스럽게 중간층을 뽑아내어 4℃, 10,000 × g의 조건 하에서 20분간 원심분리하였다. 아래층 (mitochondria, lysosome과 peroxisome층)은 따로 부유하여 -70℃에 보관하였고, 위층은 실험에 사용하기 위해 약간 떼어내어 보관하였다. 이어 위층을 다시 초고속 원심분리기에서 4℃, 100,000 × g의 조건하에 1시간 동안 원심분리하여 세포질 분획 (상층액)과 소포체 분획 (아래 깔린 부분, 즉 pellet)으로 분리했다. 소포체 분획은 균질용 용액으로 부유시켜 몇 개의 에펜도르프 튜브에 나누어 -70℃에서 냉동 보관하였다가 분석에 사용했다. 간 중 일부는 적당한 크기로 잘라 면역 조직화학적 검사와 조직학적 검사를 위해 냉아세톤과 10% phosphate buffered formalin 용액에 고정시켰다.

4. 면역 조직화학적 염색 및 광학 현미경적 관찰

냉아세톤으로 고정시킨 간 조직의 GST-P 양성 증식성 결절을 확인하기 위해 avidin biotin peroxidase complex (ABC)법을 이용하여 면역 조직화학적 염색을 하였다.²⁵⁾ GST-P 양성 증식성 결절의 수와 면적은 칼라 화상분석기 (Cambridge Instruments, Quantinet 520)를 이용하여 측정하였다. 10% phosphate buffered formalin 액에 고정된 간은 H & E 염색에 사용하였다.

5. 생화학적 검사

Cu/Zn-SOD 활성도는 10,000 × g 부유층에서 Misra와

Fridovich법²⁶⁾에 의해 측정하였다. Catalase 활성도는 10,000 × g pellet에서 Abei법²⁷⁾으로, 세포질분획에서 glutathione reductase (GR)의 활성도는 Carlberg와 Mannervick법²⁸⁾으로, total Glutathione peroxidase (총 GPx) 활성도는 Paglia와 Valentina (1967)의 방법을 개선한 Tappel의 방법²⁹⁾을 이용하여 측정하였다. 세포질분획에서 Glutathione S-transferase (GST) 활성도는 Habig 등의 방법³⁰⁾으로, 소포체분획에서 glucose-6-phosphatase (G6Pase) 활성도는 Baginskie 등의 방법³¹⁾으로, 지질 과산화물 함량 측정 은 thiobarbituric acid (TBA) 방법³²⁾을 이용하여 TBARS 함량을 측정했다. 단백질 함량은 bovine serum albumine 을 표준용액으로 사용하여 Lowry 등의 방법³³⁾을 이용하여 측정하였다.

6. 통계 처리

실험결과는 SAS를 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준 편차를 계산하였다. p < 0.05 수준에서 ANOVA test 후 Duncan's multiple range test에 의해 각 처리(발암원 처리, 비타민 E, DHEA)에 의한 유의차를 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 체중 및 간 무게의 변화

체중은 실험을 시작할 때에는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 2-AAF 투여와 간 부분절제술을 거치면서 2-AAF 음성대조군 (CON)을 제외하고는 모든 2-AAF 처리군에서 감소 경향을 보였다. 4주째가 되면서 모든 군에서 급격히 체중이 증가하였고 최종 무게는 2-AAF 음성대조군이 유의적으로 많았다. DHEA를 준 군들이 2-AAF 양성대조군 (TON)보다 적은 체중 증가량을 보이긴 하였으나 유의적이지는 않았다 (Table 1). 최종 간 무게는 2-AAF 음성대조

Table 1. Effects of vitamin E and DHEA on liver weight, body weight and liver/body weight ratio in rats fed 2-AAF and treated DEN and partial hepatectomy

Group	Liver weight (g)	Body weight (g)	Liver/Body weight ratio (%)
CON	7.67 ± 1.08 ^b	366.67 ± 44.46 ^a	2.11 ± 0.37 ^c
TON	9.09 ± 1.37 ^b	299.29 ± 25.89 ^b	3.03 ± 0.28 ^b
TEN	8.43 ± 2.76 ^b	288.33 ± 30.72 ^b	2.87 ± 0.63 ^b
TOD	11.26 ± 1.63 ^a	267.14 ± 33.15 ^b	4.21 ± 0.28 ^a
TED	11.45 ± 1.72 ^a	263.57 ± 19.73 ^b	4.34 ± 0.51 ^a

CON: Control diet (Purina diet), TON: 2-AAF treated diet, TEN: 2-AAF treated diet with 1.5% (15,000 IU/kg diet) vitamin E, TOD: 2-AAF treated diet with 0.5% DHEA, TED: 2-AAF treated diet with 1.5% (15,000 IU/kg diet) vitamin E and 0.5% DHEA.

Values are mean ± SD.

^{a,b,c}Means with different subscripts are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test.

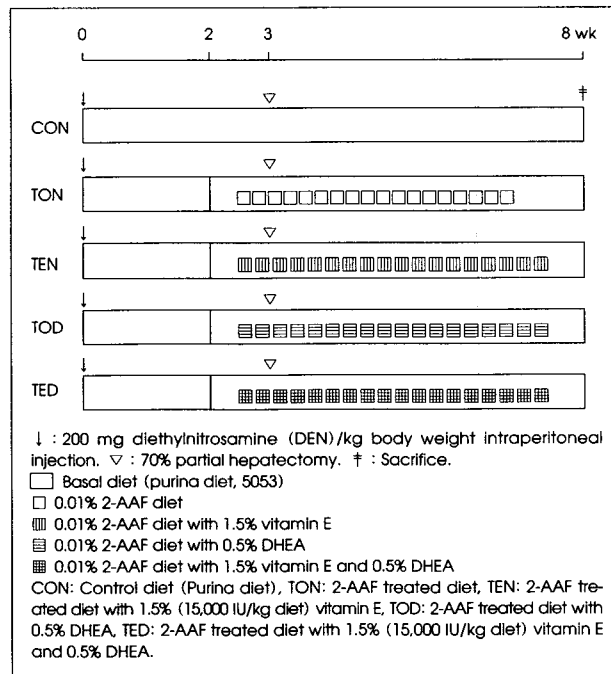


Fig. 1. Experimental design.

군 (CON)이 2-AAF 양성대조군 (TON)에 비해 약간 적었으나, 유의적이지 않았고, 비타민 E를 보충한 TEN군은 대조군 (TON)과 별차이가 없는 간 무게를 보였다. 그러나 DHEA를 준 TOD군과, 비타민 E, DHEA를 함께 준 TED군은 대조군 (TON)에 비해 유의적으로 간 무게가 증가하

였다. Cleary³⁴⁾도 DHEA에 의해 간무게가 증가하고 미토콘드리아 호흡이 상승하며 지질과 탄수화물 대사에 관련된 간 효소활성에 변화가 생겨 이로 인해 비만방지 효과가 있을 것이라고 하였다. 또한 DHEA가 식이 섭취량에 상관없이 체중증가량을 감소시켜 비만방지 효과가 있다고 하였다.³⁵⁾ 체

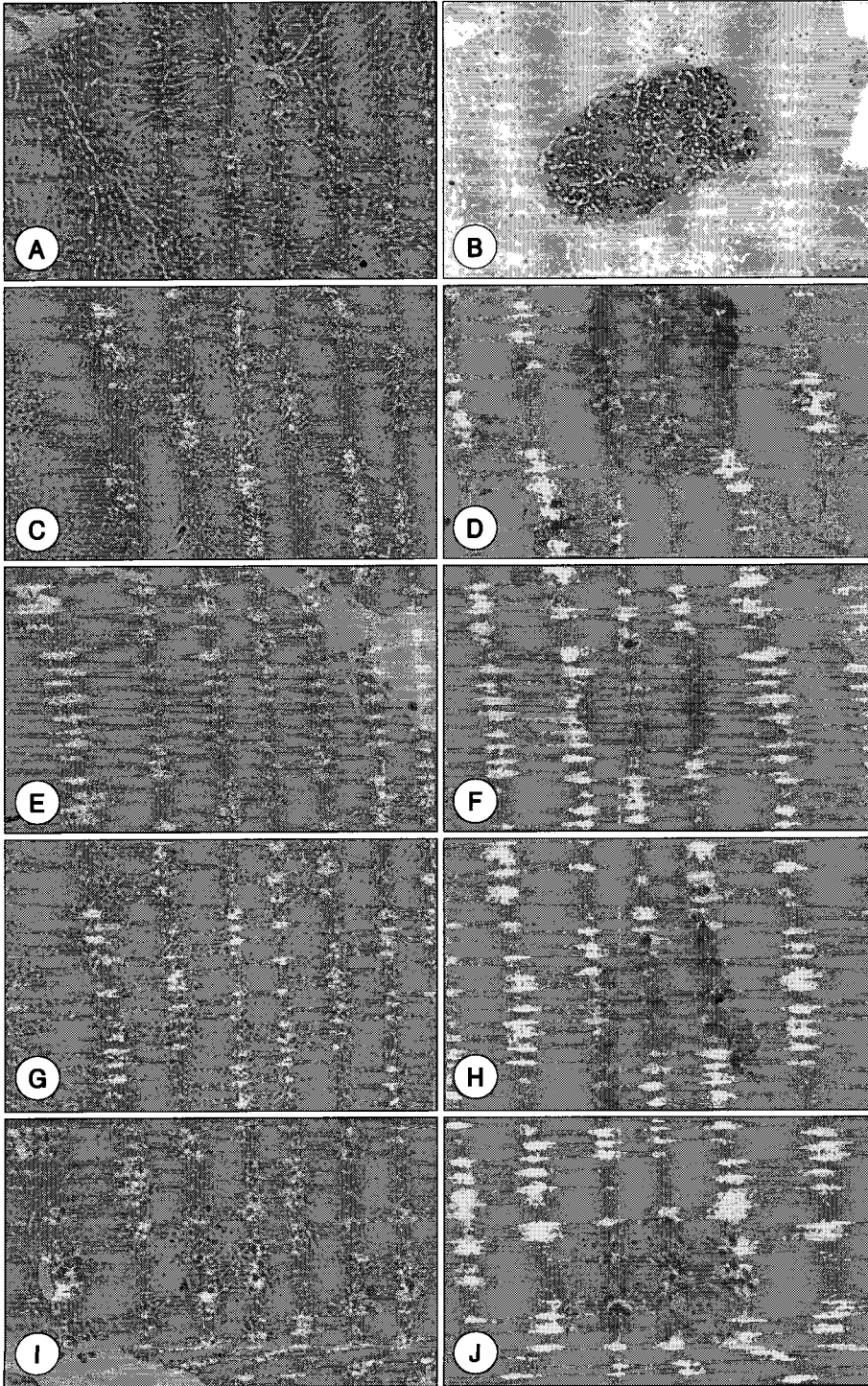


Fig. 2. H&E staining (A, C, E, G, I) and immunohistochemical staining of GST-P positive foci (B, D, F, H, J) in livers from rats fed purina diet (A, B, $\times 100$) with 0.01% 2-AAF (C, D, $\times 40$), 0.01% 2-AAF diet with 1.5% vitamin E (E, F, $\times 40$), 0.01% 2-AAF diet with 0.5% DHEA (G, H, $\times 100$), 0.01% 2-AAF diet with 1.5% vitamin E and 0.5% DHEA (I, J, $\times 100$) and treated with DEN and partial hepatectomy.

중당 간 무게 비 (L/B)는 2-AAF 음성대조군 (CON)에 비해 모든 2-AAF 처리군에서 유의적으로 높았다. 비타민 E에 의해서는 약간 감소하는 경향만을 보였는데, DHEA를 준, TOD군과 TED군은 2-AAF 양성대조군 (TON)보다 유의적으로 높은 체중당 간 무게비를 보였다. 이는 DHEA를 먹인 군들의 체중 증가량이 적었던 반면, 간 무게 증가량은 컸기 때문으로 보인다.

2. 면역조직화학적 검사

실험군 모두 DEN과 간부분절제술을 시행했으므로, 5군 모두에서 태반형 glutathione S-transferase (GST-P) 양성증식성 결절이 관찰되었다 (Fig. 2). 2-AAF 양성 대조군 (TON)이 2-AAF음성 대조군 (CON)에 비해 GST-P 양성증식성 결절면적이 유의적으로 많이 관찰되었다 (Table 2). 2-AAF와 함께 식이에 보강해준 1.5% 비타민 E (TEN군)와 0.5% DHEA (TOD군)는 모두 GST-P 양성증식성 결절면적을 유의적으로 감소시켰다. DHEA가 비타민 E보다 GST-P 양성증식성 결절형성 억제효과가 크게 나타났다. 특히 DHEA는 2-AAF를 투여하지 않은 CON군과 같은 수준으로까지 GST-P 양성증식성 결절면적을 감소시켰다. 2-AAF를 투여하면서, 비타민 E와 DHEA를 함께 준 TED군도 CON군과 같은 수준으로까지 GST-P 양성증식성결절면적이 적어졌다. 그런데 DHEA와 함께 비타민 E를 함께 준 TED군의 경우 DHEA만을 주었을 때 보다 약간 GST-P 양성증식성 결절면적이 감소하였으나, 유의적이지 않았다. 그리고, DHEA는 GST-P 양성증식성 결절수도 면적에서와 같이 크게 감소시켰으나 비타민 E는 결절수를 감소시키지 못했다. 아마도 DHEA는 GST-P 양성증식성 결절의 형성과 성장을 모두 억제할 수 있는 효과를 가진 것으로 생각되며 이에 비해 비타민 E는 GST-P 양성증식성 결절의 형성

Table 2. Effects of vitamin E and DHEA on the area and number of GST-positive foci in rats fed 2-AAF and treated DEN and partial hepatectomy

Group	GST-P positive foci	
	Area (mm ² /cm ²)	No/cm ²
CON	0.77 ± 0.37 ^c	24.57 ± 6.53 ^b
TON	10.99 ± 2.77 ^a	87.99 ± 18.20 ^a
TEN	6.53 ± 2.31 ^b	86.97 ± 33.59 ^a
TOD	0.69 ± 0.40 ^c	12.85 ± 6.40 ^b
TED	0.42 ± 0.16 ^c	10.64 ± 4.09 ^b

CON: Control diet, TON: Carcinogen treated diet, TEN: Carcinogen treated diet with 1.5% vitamin E, TOD: Carcinogen treated diet with 0.5% DHEA, TED: Carcinogen treated diet with 1.5% vitamin E and 0.5% DHEA.

Values are mean ± SD

^{abc}Means with different subscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

자체는 억제할 수 없었으나 성장은 억제할 수 있는 것이라 생각된다. 비타민 E와 DHEA는 모두 GST-P 양성증식성 결절면적을 억제하였으며, 특히 DHEA는 결절의 형성까지도 억제하였을 것으로 생각된다. 그리고 DHEA는 그 억제효과가 아주 커서, 2-AAF를 주지 않은 군과 같은 수준으로까지 양성증식성 결절면적과 수를 감소시켰다.

3. 생화학적 검사

1) Cu/Zn-Superoxide dismutase(SOD) 활성도

Cu/Zn SOD 활성도는 2-AAF 투여에 의해 감소하였으며, 비타민 E와 DHEA에 의한 영향을 별로 받지 않았는데 이는 이전 실험결과^{36,37)}에서와 같은 경향이였다 (Table 3). 대부분의 간암 세포에서 활성산소인 O₂⁻ 생성과 SOD 활성이 감소되며, Mn-SOD는 거의 소실된다고 하였고³⁸⁾ 간 질환 상태에서도 Cu/Zn-SOD 활성이 감소되어 활성 산소에 의한 유리라디칼 손상이 더 쉬워질 것이라고 하였다.³⁹⁾ CON군의 Cu/Zn-SOD 활성이 높은 것을 볼 때, DEN 처리와 간 부분절제술에 의해 생성된 O₂⁻을 효과적으로 제거해주었을 것으로 생각되며 2-AAF를 식이에 첨가해준 나머지 군들의 Cu/Zn-SOD 활성이 낮아져 O₂⁻을 효과적으로 제거하지 못하였을 것으로 보인다. 그러나 DHEA와 비타민 E가 GST-P 양성증식성 결절면적을 유의적으로 낮추면서 Cu/Zn-SOD 활성도에 별 영향을 주지 않는 것으로 나타난 것은 위 두 물질이 암화과정을 억제하는 기작은 Cu/Zn-SOD의 기질과는 직접적 상관이 없는 것으로 생각된다.

2) Catalase 활성도

2-AAF처리에 의해 catalase 활성도는 유의적으로 증가

Table 3. Effects of vitamin E and DHEA on the Cu/Zn-SOD, catalase, glutathione reductase in rats fed 2-AAF and treated DEN and partial hepatectomy

Group	Cu/Zn-SOD nunit/mg protein	Catalase μunit/mg protein/min	Glutathione reductase nmole NADPH oxidized/mg protein/min
CON	130.11 ± 16.99 ^a	182.44 ± 58.84 ^b	94.79 ± 16.71 ^{cd}
TON	83.87 ± 12.21 ^b	335.82 ± 127.08 ^a	141.15 ± 11.75 ^a
TEN	88.84 ± 14.19 ^b	231.33 ± 76.52 ^b	123.53 ± 13.99 ^b
TOD	79.64 ± 7.40 ^b	155.43 ± 43.73 ^b	83.75 ± 14.33 ^d
TED	88.71 ± 11.70 ^b	142.90 ± 59.04 ^b	107.30 ± 5.74 ^{cd}

CON: Control diet (Purina diet), TON: 2-AAF treated diet, TEN: 2-AAF treated diet with 1.5% (15,000 IU/kg diet) vitamin E, TOD: 2-AAF treated diet with 0.5% DHEA, TED: 2-AAF treated diet with 1.5% (15,000 IU/kg diet) vitamin E and 0.5% DHEA.

Values are mean ± SD.

^{abcd}Means with different subscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

하였고, 비타민 E와 DHEA는 catalase 활성도를 유의적으로 감소시켰다. 비타민 E와 DHEA를 함께 투여한 경우, 각각을 따로 주었을 때보다 catalase 활성도를 약간 감소시켰으나, 유의적이지는 않았다 (Table 3). DHEA가 peroxisome 증식제 역할을 했다면, peroxisome의 지표효소인 catalase 활성도를 유도했을텐데, 본 실험에서는 오히려 catalase 활성도를 유의적으로 감소시켰는데 이는 주목할 만하다. Peroxisome 증식제가 간의 무게를 증가시키는 mitogenic activity를 갖는 기전에 대한 연구에서 β -oxidation에 의해 peroxisome에서 생성되는 H₂O₂와 이에 따라 증가된 활성산소의 독성에 의해 간세포의 증식능이 유도된다고 하였기⁴⁰⁾ 때문이다. 본 실험은 전암성 단계에서 발암원 투여로 많이 생성된 H₂O₂에 의해 간세포 증식능이 유도되고, 비타민 E가 H₂O₂를 제거해 줌으로써 세포증식능을 억제하였을 것이라는 보고^{36,37)}와 같은 결과를 보였다. 그런데 McIntosh 등²⁰⁾은 DHEA가 catalase 활성도 뿐 아니라 다른 항산화 효소의 활성을 증가시켰다고 보고하였으나 암화과정을 유도하는 동안의 DHEA 효과를 살펴본 본실험결과에서 DHEA는 Cu/Zn-SOD를 제외한 다른 항산화 효소 활성들을 감소시키는 것으로 나타났다. Aragno 등⁴¹⁾도 DHEA가 streptozotocin을 처치한 랫드를 산화적 손상으로부터 보호하는 효과가 있다고 하였다.

3) Glutathione reductase(GR) 활성도

Glutathione reductase (GR)은 산화된 glutathione (GS-SG)을 환원시켜 환원형 glutathione (GSH)의 세포내 수준을 유지시키는데 중요하며²⁸⁾ GSH는 지질 과산화 반응으로부터 세포막을 보호하는데도 중요하다.⁴²⁾ GR활성도는 2-AAF에 의해 유의적으로 증가하였고, 비타민 E와 DHEA에 의해서 유의적으로 감소하였다 (Table 3). GR활성이 증가되어 있다는 것은 세포가 산화적 스트레스하에 있다는 의미로 비타민 E와 DHEA에 의해 GR활성이 감소된 것은 비타민 E와 DHEA에 의해 산화적 손상이 감소됨으로 GSH의

수요가 감소하였기 때문으로 생각된다. Kim⁴⁰⁾은 비타민 E가 산화물 자체를 감소시키는 작용을 하는데 비해 DHEA는 NADPH를 생성하는 malic enzyme 등을 유도하여 세포를 산화적 손상으로 부터 보호해 줄 수 있을 것이라고 보고하였다. 비타민 E보충보다 DHEA에 의해 GR활성도가 더 유의적으로 감소되었는데, 앞에 기술한 여러 항산화효소들의 결과와 마찬가지로 DHEA는 peroxisome 증식제로 항산화 효소를 유도하기는 커녕, 오히려 항산화효소 활성도를 감소시켰으며, 그 효과는 비타민 E에 의한 것보다 더 컸다.

4) Total glutathione peroxidase(총 GPx) 활성도

총 GPx 활성도는 2-AAF에 의해 유도되는 경향을 보였으나, 유의적이지는 않았다. 비타민 E와 DHEA 모두 대조군 (TON)보다 총 GPx 활성도를 감소시켰는데, DHEA에 의한 감소효과가 더 큰 경향을 보였다 (Table 4). Kitahara 등⁴³⁾의 보고에 의하면 DEN에 의한 화학적 간 세포암이 유도되면서 총 GPx 활성이 증가하였는데 본 실험에서도 2-AAF를 처치해 주면서 증가 경향을 보인 총 GPx 활성이 비타민 E와 DHEA에 의해 감소된 것은 비타민 E와 DHEA가 간 세포암화과정을 억제한 결과라고 생각할 수 있다. 그러나 비타민 E와 DHEA를 함께 준 경우 상승효과를 보이지는 않았다.

5) Glutathione S-transferase(GST) 활성도

간 cytosol에서 GST 활성도를 측정된 결과, 2-AAF 처리에 의해 활성도가 증가하였으며, 비타민 E와 DHEA에 의해 활성도가 유의적으로 감소하였다. DHEA에 의한 감소 정도가 더 커, 2-AAF 음성대조군인 CON군에 비해서도 낮은 활성도를 보였다. 비타민 E와 DHEA를 함께 준 경우에도 활성도는 감소하였으나, DHEA만을 주었을 때보다는 약간 높은 값을 보였다 (Table 4). DHEA와 비타민 E의 암화촉진과정에 대한 억제효과는 GST의 기질과 상관있거나, 억제효과의 결과로서 GST 활성도가 감소한 것이라 생각할

Table 4. Effects of vitamin E and DHEA on the total GPx, GST, G6Pase activities and TBARS contents in rats fed 2-AAF and treated DEN and partial hepatectomy

Group	Total GPx nmole NADPH oxidized /mg protein/min	GST nmole CDNB conjugated /mg protein/min	G6Pase μ mole Pi liberated /mg protein/min	TBARS nmole TBARS /mg protein
CON	241.93 \pm 20.95 ^{ab}	603.74 \pm 86.46 ^c	9.86 \pm 1.68 ^a	2.25 \pm 0.23 ^b
TON	265.72 \pm 28.72 ^a	886.49 \pm 125.69 ^a	6.76 \pm 0.75 ^{bc}	3.10 \pm 0.97 ^a
TEN	211.45 \pm 32.13 ^c	730.81 \pm 47.61 ^b	7.03 \pm 0.46 ^{bc}	0.94 \pm 0.23 ^c
TOD	200.93 \pm 9.05 ^c	468.43 \pm 54.85 ^d	8.11 \pm 1.49 ^b	2.10 \pm 0.72 ^b
TED	223.75 \pm 23.71 ^{bc}	503.36 \pm 58.24 ^c	6.24 \pm 0.38 ^c	1.22 \pm 0.40 ^c

CON: Control diet (Purina diet), TON: 2-AAF treated diet, TEN: 2-AAF treated diet with 1.5% (15,000 IU/kg diet) vitamin E, TOD: 2-AAF treated diet with 0.5% DHEA, TED: 2-AAF treated diet with 1.5% (15,000 IU/kg diet) vitamin E and 0.5% DHEA.

Values are mean \pm SD.

^{abc}Means with different subscripts are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

수 있다. 다른 항산화 효소들의 결과와 마찬가지로 DHEA는 오히려 비타민 E보다 더 GST 활성도를 낮춘 것으로 나타났다. 그리고, GST 활성도에 대한 효과에서도 비타민 E와 DHEA의 상승효과는 나타나지 않았다.

6) Glucose-6-phosphatase(G6Pase) 활성도

Glucose 6-phosphatase (G6Pase)는 막 부착 효소로서 주로 간과 신장에 분포하고 있으며,⁴⁴⁾ 간세포가 손상되거나 종양생성시 활성도가 감소한다고 알려져 있어⁴⁵⁾ 세포막의 안정도를 나타내는 지표로 사용된다. G6Pase 활성도는 2-AAF처리에 의해 유의적으로 낮아졌고, 비타민 E와 DHEA에 의해 유의적이지는 않았으나, 대조군 (TON)에 비해 높은 경향을 보였다. Choi 등³⁶⁾의 실험과 같이 비타민 E는 2-AAF처리에 의해 손상받은 소포체막의 안정도를 회복시키는데 효과적이었다.

7) Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 함량

간 소포체막의 지질과산화 정도를 알기 위해 측정된 TBARS 함량은 2-AAF에 의해 유의적으로 증가하였으며, 비타민 E와 DHEA에 의해 유의적으로 감소되었다. 비타민 E가 DHEA보다 지질과산화물 생성량을 억제시키는 폭이 더 컸다 (Table 4). Choi 등³⁶⁾과 Kim 등³⁷⁾의 실험에서와 같이 비타민 E는 지질과산화물 생성을 효과적으로 막아주었다. 그리고 DHEA 역시 지질과산화물 생성을 억제하는 항산화 효과를 보였다.

요약 및 결론

본 연구는 생체 고유의 항산화 물질인 비타민 E와 인간 순환계중에 가장 많은 양으로 존재하는 부신 피질 호르몬인 DHEA가 쥐간의 암화과정에 미치는 영향과 그 기전을 밝히고자 하였다. Ito 모델을 이용하여 간 세포암을 유도하면서 비타민 E와 DHEA가 전암성 병변에 미치는 영향의 가능한 기전으로서 항산화 효과가 관여하는지를 알아보려고 하였다. 실험시작일에 개시제로 diethylnitrosamine (DEN)을 복강주사하고 촉진제로 0.01% 2-AAF와 간부분절제술을 처리하였다. 실험식은 기본 식이인 Purina purified rat chow에 1.5% (15,000 IU/kg diet) vitamin E와 0.5% DHEA를 첨가하여 비타민 E 보충식이와 DHEA 보충식이, 그리고 두가지를 모두 보충한 식이를 6주간 먹여 사육 8주 후에 희생시켰다. 2-AAF 처리는 간 무게를 증가시키는 경향을 보였으며 체중을 유의적으로 감소시켜 체중당 간 무게비를 유의적으로 증가시켰다. 또한 GST-P 양성증식성 결절 면적과 수를 유의적으로 증가시켜 간 세포암화과정을

효과적으로 유도하였다. 2-AAF는 Cu/Zn-SOD와 소포체막 안정도의 척도인 G6Pase 활성도를 유의적으로 감소시켰으며, 총 GPx 활성도를 증가시키는 경향을, catalase, GR, GST 활성도와 지질과산화물 생성량을 유의적으로 증가시켰다. 비타민 E 보충 효과를 2-AAF 양성대조군 (TON)에 비해 살펴보았을 때, 간 무게, 체중, 체중당 간 무게비에서 큰 차이를 보이지 않았다. 비타민 E 보충은 GST-P 양성증식성 결절면적을 유의적으로 감소시켰으나 결절수에서는 별 영향을 주지 않았다. 이를 볼때 비타민 E는 GST-P 양성증식성 결절의 생성을 억제할 수 없으나 성장은 억제할 수 있는 것으로 생각된다. 또한 비타민 E는 Cu/Zn-SOD와 G6Pase 활성도에는 별 영향을 끼치지 않았고, 총 GPx, GST, catalase, GR 활성도와 지질과산화물 생성량을 유의적으로 감소시켰으며 특히 지질과산화물 생성량을 크게 감소시켰다. DHEA 보충 효과를 2-AAF 양성대조군 (TON)에 비해 살펴보았을 때, 간 무게를 유의적으로 증가시켰으며 체중에서는 별 영향을 주지 않았으나 체중당 간 무게비는 유의적으로 증가시켰다. 그리고 GST-P 양성증식성 결절면적과 수를 유의적으로 감소시켰다. 이를 볼때 DHEA는 GST-P 양성증식성 결절의 생성과 성장을 동시에 억제하는 것으로 생각된다. 또한 DHEA는 Cu/Zn-SOD와 G6Pase 활성도에서는 별 영향을 주지 못하였으며 catalase, GR, 총 GPx, GST 활성도와 지질과산화물 생성량을 유의적으로 감소시켰는데 GR과 GST 활성도는 큰 폭으로 감소시켰다. DHEA는 발암원에 의해 활성화되는 효소의 발현을 조절하는 것으로 보이는데,¹⁶⁾ DHEA의 효과기전으로 G6PD 활성을 억제하여 암의 개시, 촉진을 억제하는 것, 피옥시좀과 그 연관효소들의 유도, 식이절제의 항암효과와 유사한 방식, 항글루코코르티코이드 기작 등을 통해서라고 보고된 바 있다.⁴⁶⁾ 본 실험에서도 암화과정을 유도하는 동안 DHEA에 의해 항산화 효소 활성도는 유도되지 않았으며 오히려 Cu/Zn-SOD를 제외한 여러 항산화 효소 활성도와 지질과산화물 생성량이 유의적으로 감소되었다. 이상의 결과로부터 화학적 발암원으로 유도한 쥐간세포의 암화과정에서 비타민 E와 DHEA는 전암성 병변 지표인 GST-P 양성증식성 결절면적을 유의적으로 감소시켰으며, 특히 DHEA는 결절수까지 감소시키는 것으로 나타나, 결절생성과 성장을 동시에 억제시키는 것으로 생각된다. 또한 비타민 E와 DHEA는 지질과산화물 함량과 생체내 방어효소인 GR, catalase, 총 GPx, GST 활성도를 유의적으로 감소시켰는데 이는 암화과정이 유도되는 동안 생체내 산화적 손상을 감소시킨 결과라고 생각된다. 그리고 peroxisome 증식제로 알려진 DHEA는 암화과정이 유도되는 동안 catalase 활성도 증가 등을 통해

세포내 산화적 손상을 증가시키지 않았고 오히려 이를 감소시키는 것으로 나타나, DHEA가 항산화 효과를 가지고 있음을 보여주었다.

Literature cited

- 1) Valko M, Kzakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266 (1-2): 37-56, 2004
- 2) Ames BN. Dietary carcinogenesis and anticarcinogens. *Science* 221: 1256-1264, 1995
- 3) Watson RR, Leonard TK. Selenium and vitamin A, E and C: Nutrients with cancer prevention properties. *J Am Diet Assoc* 86: 505-510, 1986
- 4) Harman D. Free radical theory of aging. In: *the "Free radical" disease Age 7*: 111-131, 1984
- 5) Krishnamurthy S. The intriguing biological role of vitamin E. *J Chem Ed* 60: 456-467, 1983
- 6) Watson RR, Leonard TK. Selenium and vitamin A, E and C: Nutrients with cancer prevention properties. *J Am Diet Assoc* 86: 505-510, 1986
- 7) Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A. Inhibition of cell proliferation by α -tocopherol. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 266: 6188-6194, 1991
- 8) Glauert HP, Lu Z, Kumar A, Bunaciu RP, Patel S, Tharappel JC, Stemm DN, Lehmler HJ, Lee EY, Robertson LW, Spear BT. Dietary vitamin E does not inhibit the promotion of liver carcinogenesis by polychlorinated biphenyls in rats. *J Nutr* 135 (2): 283-286, 2005
- 9) Shealy CN. A review of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Integr Physiol Behav Sci Sep-Dec* 30 (4): 308-313, 1995
- 10) Schwartz AG, Pashko LL. Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase and longevity. *Aging Res Rev* 3 (2): 171-187, 2004
- 11) Yen TY, Alan JA, Pearson DV, Acton JM. Prevention of obesity in Avy/a mice by dehydroepiandrosterone. *Lipids* 12: 409-413, 1977
- 12) Coleman DL, Leiter EH, Schwizer RW. Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone in diabetic mice. *Diabetes* 21: 830-833, 1982
- 13) Gordon GB, Shantz LM, Talalay. Moderation of growth, differentiation and carcinogenesis by dehydroepiandrosterone. *Adv Enzyme Reg* 26: 355-382, 1987
- 14) Mayer D, Forstner K. Impact of dehydroepiandrosterone on hepatocarcinogenesis in the rats. *Int J Oncol* 25 (4): 1021-1030, 2004
- 15) Tunez I, Munoz MC, Montilla P. Treatment with Dehydroepiandrosterone prevents oxidative stress induced by 3-nitropropionic acid in synaptosomes. *Pharmacology* 74 (3): 106-111, 2005
- 16) Cioline H, MacDonald C, Memon O, Dankwah M, Yeh GC. Dehydroepiandrosterone inhibits the expression of carcinogens-activation enzymes in vivo. *Cancer* 105 (3): 321-325, 2003
- 17) Hinson JP, Khan M. Dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) inhibits growth of human vascular endothelial cells. *Endocr Res* 30 (4): 667-671, 2004
- 18) Swierczynski J, Mayer D. Dehydroepiandrosterone-induced lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *J Steroid Biochem Mol Biol Aug* 58 (5-6): 599-603, 1996
- 19) Swierczynski J, Mayer D. Vitamin E prevents induction of carbonyl group formation in microsomal protein by dehydroepiandrosterone. *Cancer* 32 (2): 101-106, 1998
- 20) McIntosh MK, Goldfarb AH, Curtis LN, Cote PS. Vitamin E alters hepatic antioxidant enzymes in rats treated with dehydroepiandrosterone. *J of Nutr* 123: 216-224, 1993
- 21) Ng HP, Wang YF, Lee CY, Hu ML. Toxicological and antioxidant effects of short-term dehydroepiandrosterone injection in young rats fed diets deficient or adequate in vitamin E. *Food Chem Toxicol* 37 (5): 503-508, 1999
- 22) Rao MS, Subbarao V. Sex differences in dehydroepiandrosterone-induced hepatocarcinogenesis in the rat. *Cancer Lett* 13: 125 (1-1): 111-116, 1998
- 23) Ito N, Tsuda H, Tatematsu M, Inoue T, Tagawa Y, Aoki T, Uwagawa S, Kagawa M, Ogiso T, Masui T. Enhancing effect of various hepatocarcinogenesis 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
- 24) Krassavage WJ, Terhaar CJ. D-alpha tocopheryl poly (ethylene glycol) 1000 succinate acute toxicity, subchronic feeding, reproduction and teratologic studies in the rats. *J Agric Food Chem* 25: 273-278, 1977
- 25) Osigo T, Tatematsu M, Tamano S, Tsuda H, Ito N. Comparative effects of carcinogenesis on the induction of placental glutathione S-transferase positive liver nodules in a short-term assay and of hepatocellular carcinogenesis in a long-term assay. *Toxicol Pathol* 13: 257-265, 1985
- 26) Misra HP, Fridovich I. Superoxide dismutase: a photochemical augmentation assay. *Arch Biochem Biophys* 181: 308, 1977
- 27) Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126, 1984
- 28) Carlberg I, Mannervick B. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology* 113: 484-499, 1985
- 29) Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Method Enzymology* 52: 506-513, 1978
- 30) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 249: 7130-7139, 1974
- 31) Baginski ES, Foa PP, Zak B. Glucose 6-phosphatase. *Method of Enzymatic Analysis* 2: 876-880, 1983
- 32) Vaca CE, Harms-Ringdahl M. Lipid peroxidation on the rat liver S9 fraction: Influence of membrane lipid composition. *Mutation Res* 162: 21-32, 1986
- 33) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- 34) Cleary MP. Effect of dehydroepiandrosterone treatment on liver metabolism in rats. *Int J Biochem* 22 (3): 205-210, 1990
- 35) Cleary MP. The antiobesity effect of dehydroepiandrosterone in rats. *Proc Soc Exp Biol Med Jan* 196 (1): 8-16, 1991
- 36) Choi H, Kim J, Kim S. Suppressive effects of Vitamin E on the induction of placental Glutathione S-transferase (GST-P) positive foci and antioxidant enzyme activity in rat hepatocarcinogenesis.

- Korean J of Nutr* 30(7): 803-8121, 1997
- 37) Kim S, Kang S, Kim Y, Choi H. High Vitamin E Supplement is Needed to Have an Anticarcinogenic Effect of fish oil. *Korean J Nutrition* 31(6): 1014-1023, 1998
- 38) Oberley LW, Buettner GR. Role of superoxide dismutase in cancer: A review. *Cancer Res* 39: 1141-1149, 1979
- 39) Togashi H, Shinzawa H, Wakabayoshi H, Nakamura T, Yamada N, Takahashi T, Ishikawa M. Activities of free oxygen radical scavenger enzymes in human liver. *J Hepatol* 11: 200-205, 1990
- 40) Kim KT, Park SC, Choi H. Induction of hepatomegaly and peroxisome activities by fish oil. *Korean J of Lipidology* 5(2): 131-139, 1995
- 41) Aragno M, Tamagno E, Gatto V, Brignardello E, Parola S, Danni O, Boccuzzi G. Dehydroepiandrosterone protects tissues of Streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* Jun 26(11-12): 1467-1474, 1999
- 42) Bast A, Haenen Guido RMM. Cytochrome P-450 and vitamin E free radical reductase: formation of and protection against free radicals. In: *Free radicals, Lipoproteins, and Membrane Lipids* (Crastes de Paulet et al, eds), pp359-370. Plenum Press, NY, 1990
- 43) Kitahara A, Yamazaki T, Ishikawa T, Camba EA, Kiyomi S. Changes in activities of glutathione peroxidase and glutathione reductase during chemical hepatocarcinogenesis in the rats. *Jpn J Cancer Res* 74: 649-655, 1983
- 44) Salgado MC, Meton I, Egea M, Baanante IV. Transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit promoter by insulin and glucose in the carnivorous fish, *Sparus aurata*. *J Molecular Endocrinology* 33: 783-795, 2004
- 45) Emmanuel F. Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: G.H.A. Clows Memorial Lecture. *Cancer Res* 44: 5463-5474, 1984
- 46) Williams JR. The effects of dehydroepiandrosterone on carcinogenesis, obesity, the immune system, and aging. *Lipids* 35(3): 325-331, 2000