

옥수수유, 들깨유, 정어리유의 급여가 발암물질의 투여한 쥐 간의 Glutathione S-transferase(GST-P) 양성결절과 Glutathione 관련 효소계에 미치는 영향

†김 경 민

배화여자대학 식품영양과

Effects of Corn Oil, Perilla Oil, Sardine Oil Diet on the Hepatic Glutathione S-transferase(GST-P) Positive Foci and Glutathione Related Enzyme System in Carcinogen Treated Rats

†Kyungmin Kim

Dept. of Food and Nutrition, Baewha Women's College, Seoul 110-735, Korea

Abstract

The effects of different dietary fatty acids on the hepatic glutathione S-transferase(GST-P) positive foci and glutathione related enzyme system were investigated in carcinogen treated rats. Weaning male Sprague Dawley rats were divided into three groups and fed the diets of 15% corn(CO), perilla(PO), and sardine oil(SO), respectively. Hepatocellular carcinogenesis was initiated with diethylnitrosamine(DEN) and then fed the diet containing 0.02% 2-acetylaminofluorene(2-AAF) followed by 0.05% phenobarbital for 10 weeks. The hepatic tissues were homogenized and centrifugated to prepare microsomal and cytosolic fractions. The enzyme activities of hepatic glutathione S-transferase(GST), glutathione reductase(GR), and glutathione peroxidase(GPx) were determined from cytosolic fractions. The number of GST-P hyperplastic nodules was the highest in corn oil group at 6th week, the early stage of hyperplastic nodule formation. GST activities were increased significantly by carcinogens in all dietary groups after 6th wk. GR activities followed the same trend as GST activities. GPx activities were decreased by carcinogens in all dietary groups at 10th week. In this experiment, corn oil diet may have promotive effect on hyperplastic nodule formation during the early promotional stages of chemical carcinogenesis.

Key words: hepatocarcinogenesis, corn oil, perilla oil, sardine oil, GST-P positive foci, glutathione related enzyme system.

서 론

식이지방은 질병과 관련되어 양적인 측면과 더불어 지방산 비율에 대한 질적인 측면에서도 영향을 미친다(Bersot & Mahley 1983; L'Abbe 등 1991; Rahman 등 2001). 많은 양의 동물성 포화지방산의 섭취는 관상심장계 질환(coronary heart disease), 혈전증, 동맥경화의 위험요소로 보고되었고(Perkin 1983), 포화지방산에 대한 거부현상으로 불포화지방산이 극도로 선호되는 경향도 나타나고 있다. 그러나 동물실험 결과 많은 양의

불포화지방산 섭취는 포화지방산에 비하여 암세포의 성장을 촉진시키는 것으로 보고되었는데(Hillyard & Abraham 1979; Hopkins 등 1981; Rahman 등 2001), 식이 지방산의 종류에 따라 막 인지질의 변화를 초래하게 되고, 이것이 식이지방산의 종양 촉진 효과와 연관될 것으로 생각되고 있다. 특히 간의 소포체(endoplasmic reticulum)는 여러 약물과 발암물질의 대사과정이 일어나는 곳으로 이들의 대사가 정상적으로 일어나기 위해서는 소포체막의 안정성이 필수적이다. 간 소포체에서 막의 투과성과 안정성은 그것을 구성하고 있는 지방산

† Corresponding author: Kyungmin Kim, Dept. of Food and Nutrition, Baewha Women's College, 12, Piloong-dong, Jongno-gu, Seoul 110-735, Korea. Tel: +82-2-399-0884, Fax: +82-2-737-7260, E-mail: kyungmkim@baewha.ac.kr

의 영향을 크게 받아, 많은 양의 불포화지방산 섭취는 생체막의 유동성을 증가시키고(Shinitzky & Barenholz 1978; Burns & Spector 1990), 막 수송체거나 막 부착효소, 수용체 등의 활성도를 변화시키며(Hammer & Wills 1979; Lai 등 1980; Yamaoka 등 1988), 한편으로는 지질과산화반응을 증가시켜(Sevanian & Hochstein 1985) 종양세포의 성장에 영향을 미치는 것으로 생각되어지고 있다. 그러나 같은 불포화지방산 중에도 n-3 계열의 지방산은 n-6 계열의 불포화지방산에 비하여 관상심장계 질환(coronary heart disease), 혈전증, 동맥경화를 예방하는 효과가 크다고 알려져 왔는데, 그 가능한 기전으로는 prostaglandin (PG)과 연관되어 설명되고 있다. Linoleic acid(n-6, LA)로부터는 혈소판 응집을 촉진시키는 thromboxane(TXA₂)과 항 혈소판 응집작용을 나타내는 prostacyclin(PGI₂)이 합성되고, 어유 등에 많이 포함된 n-3 계열의 지방산으로부터는 eicosanoids의 3번째 계열인 PGI₃와 TXA₃가 합성되는데, 이들은 인지질로부터 arachidonate(AA)가 분해되어 나오는 것과 생성되는 것을 저해하고 활성의 균형이 혈소판 응집을 감소시키는 방향으로 전환시키게 된다(Hennekens 등 1990). N-3 계열의 지방산이 풍부한 들깨유나 어유는 그 구성되어 있는 지방산이고도의 불포화지방산임에도 불구하고 종양발생율을 오히려 억제하는 것으로 보고되고 있어(Karmall 등 1981; Narisawa 등 1991; Lee 등 2002; Williams 등 2007; Dimri 등 2010) n-3 계열 지방산의 관상심장계 질환에 대한 예방효과와 함께 암세포의 증식을 억제하는 효과에 대하여 관심이 모아지고 있다.

간 세포암에 대한 초기연구는 식품 중의 aflatoxin 오염으로 인해 Africa 지역에서 간암이 많이 발생하였고, 간염 virus에 대한 항체가 많이 존재하는 지역주민에게 간암의 발생율이 높게 나타나, 이에 관한 보고로부터 시작되었다(Wogan 1975; Harris & Sun 1984). 식이 지방이 간세포의 암화과정에 미치는 영향에 관하여는 이제까지 많은 연구가 이루어지지 않았으나, 간은 지방산의 elongation과 desaturation 과정의 중요한 역할을 담당하고 있으며, 약물 및 발암물질의 대사가 일어나는 곳으로 식이 지방의 영향을 연구하는데 있어 간세포의 암화과정이 적합한 모델로 응용될 수 있다고 생각된다. 이 실험에서는 Solt와 Farber의 모델(Solt & Farber 1976)을 변형한 단기간의 간세포암 유도모델을 설정한 다음 암화과정에서 저해효과가 있다고 알려진 n-3계 지방산이 풍부한 식이(Karmall 등 1981; Jurkowski & Cave 1985; Lee 등 2002)가 GST-P 양성 증식성 결절 형성과 glutathione 관련 효소계 중 glutathione S-transferase(GST), glutathione reductase(GR), glutathione peroxidase(GPx)의 활성도에 미치는 영향을 조사하였다. 특히 같은 n-3 계열의 지방산인 linolenic acid가 풍부한 들깨유가 정어리유와 비교하여 어떤 차이를 보이는지 살펴보고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물

이유한 Sprague-Dawley 중 숫쥐 40~80 g된 것을 서울대학교 실험동물 사육장에서 공급받아 24마리씩 6군으로 나누는 다음 정상조건 하에서 식이지방의 급원을 달리한 실험식으로 생후 3주부터 식이를 공급하여 12주 동안 사육하였다. 이 때 온도, 습도, 채광은 각각 20±1°C, 55±1%, 7:00~19:00로 조절하였으며, 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하고, 쥐의 체중은 1주일에 한번 측정하였다.

2. 실험식이 및 처치

실험식이의 지방 수준은 식이의 15%(w/w)로 하였고, 식이 지방의 급원으로는 n-6계 불포화 지방산의 급원으로 옥수수유, 식물성 n-3계 불포화 지방산의 급원으로 들깨유를, 동물성 n-3계 지방산의 급원으로 정어리유를 넣은 실험식을 만들어 질소 가스로 충전시킨 다음 냉동고에 보관하였다가 매

Table 1. Composition of experimental diets

Component/diet	(g/100 g diet)		
	Corn oil	Perilla oil	Sardine oil
Corn starch	54.7	54.7	54.7
Casein	20.0	20.0	20.0
α -Cellulose	5.0	5.0	5.0
Vitamin mixture ¹⁾	1.0	1.0	1.0
Salt mixture ²⁾	4.0	4.0	4.0
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3
Corn oil	15.0	-	-
Perilla oil	-	15.0	-
Sardine oil	-	-	15.0
α -Tocopherol	-	0.015	0.015

¹⁾ 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, Vitamin B₁₂ 0.00135 g, and Dextrose to 1 kg.

²⁾ Composition of salt mixture, g/kg mixture: CaHPO₄ 500 g, NaCl 74 g, K₂SO₄ 52 g, Potassium citrate monohydrate 220 g, MgO 240 g, Manganase carbonate(43~48% Mn) 3.5 g, Ferric citrate(16~17% Fe) 6.0 g, Zinc carbonate 1.6 g, Cupric carbonate(53~55% Cu) 0.3 g, KIO₃ 0.01 g, Chromium Potassium sulfate 0.55 g, Na₂SeO₃ · 5H₂O 0.01 g, Sucrose, finely powdered 118.0 g.

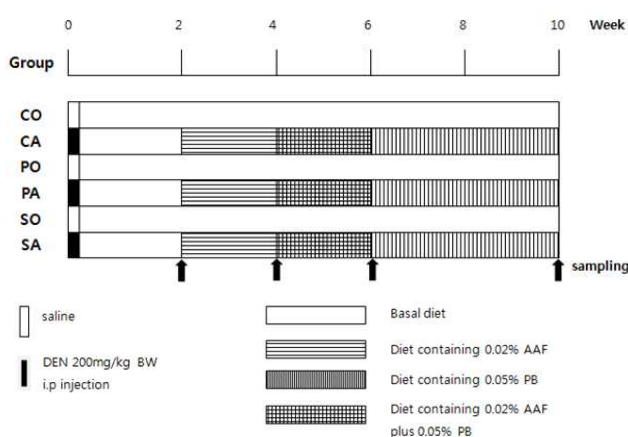


Fig. 1. Experimental design.

일 식이와 물을 공급하였다(Table 1). 실험식이를 만들 때 들깨유와 정어리유의 자동산화막기 위하여 옥수수유와 같은 수준 정도의 tocopherol 양인 1 ml당 1 mg의 α -tocopherol을 첨가하였다. 옥수수유는 하인즈, 들깨유는 풀무원에서 one-batch type을 기증 받았으며, 정어리유는 이화유지에서 신선한 정어리유를 tocopherol free 상태로 공급받았다. Casein, α -cellulose, DL-methionine과 tocopherol은 Sigma 제품을, vitamin mixture는 ICN 제품을 사용하였고, 모든 식이재료는 냉장 보관하였으며, 정어리유는 받는 즉시 500 ml 플라스틱 병에 나누어 넣고 질소 가스로 충전시킨 후 밀봉하여 냉동 저장하였다가 사용하였다. 개시재료는 한번의 주사에 의해 강력한 효과를 가진 것으로 알려진 diethylnitrosamine(DEN)을 사용하였으며, 촉진재료는 2-acetylaminofluorene(2-AAF)과 phenobarbital(PB)을 함께 사용하였다.

각 집단을 식이군에 따라 처치군과 대조군으로 나누어 처치군에는 사육 후 2주째에 DEN을 생리식염수에 녹여 몸무게(kg)당 200 mg 수준으로 복강에 주사하였고, 대조군에는 생리식염수를 같은 수준으로 복강 주사하였다. DEN을 주사한 후 2주째부터 6주째까지 2-AAF를 실험식이 무게당 0.02% 수준으로 섭취시켰으며, 4주부터 PB를 식이 무게당 0.05% 수준으로 섭취시키면서 2주, 4주, 6주, 10주째에 각각 4회 희생시켰다(Fig. 1).

3. 시료의 수집 및 전처리

DEN을 주사한지 2주째와 4주째, 6주째와 10주째에 각각 희생시킨 후 간을 절제하고 즉시 차가운 식염수로 세척한 다음 여과지에 놓아 물을 흡수시키고 액체 질소로 급속 냉동시킨 후 보관하였다가 실험에 사용하였다. 약 5 g의 간을 잘게 다진 후 ice-cold homogenizing media(154 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA buffer, pH 4) 25 ml를 넣고 4°C에서

균질화 한 다음 4°C, 12,000×g에서 20분간 원심분리하였다. 윗부분의 세포 조각들(cell debris)을 제거하고 중간층의 지방이 들어가지 않도록 주의하여 microsome 분획을 모아 다시 4°C, 105,000×g에서 60분 동안 원심분리하여 cytosol(상층액)과 microsome(pellet) 분획을 분리하고, 다시 microsome 분획은 5 ml의 homogenizing media로 부유시켜 몇 개의 에펜도르프 튜브에 나누어 -40°C에서 냉동 보관하였다가 분석에 사용하였다.

4. 면역조직학적 검사

간 중 일부는 적당한 크기로 잘라 면역조직학적 검사를 위해 10% formalin 용액에 고정시킨 후 사용하였다. 파라핀을 입힌 시료를 4 μ m 두께로 얇게 자른 후 xylene과 ethanol을 통과시켜 탈수처리하고 증류수와 phosphate buffered saline, pH 7.4(PBS) 용액으로 5분간 두번 세척하였다. 이후 goat serum으로 30분 처리 후 GST-P 항체(1:500)로 1시간 반응시킨 다음 PBS로 세척하였다. 이후 immunogold silver staining 시약(Auro Probe™ LM GAR)으로 처리한 다음 냉장실에서 15시간 경과 후 PBS로 세척하였으며, glutaraldehyde 용액(2% in PBS)로 고정시키고 증류수로 씻었다. 다시 표본을 발색시약(IntenSE M kit, Amersham International plc)으로 처리 후 증류수로 세척하고 ethanol과 xylene을 통과시켜 수화과정을 거친 다음 canadian balsam으로 봉입하여 현미경으로 관찰하였다. 간 GST-P 양성 증식성 결절은 표본의 평방 cm 당 결절의 갯수 및 면적을 영상분석장치(Image analyzer)를 사용하여 측정하였다.

5. Glutathione S-transferase(GST)의 활성도 측정

Cytosol의 GST의 활성도는 chlorodinitrobenzene(CDNB)와 GSH를 기질로 사용하는 Habig 등(1974)의 방법을 사용하여 측정하였다. Cytosol을 1.5 mg protein/ml 정도가 되도록 0.1 M phosphate buffer(pH 6.5)로 희석한 후 희석액 0.5 ml에 1 mM 환원형 glutathione(GSH) 1 ml와 1 mM CDNB 1 ml를 가하여 340 nm에서 2분간 흡광도의 변화를 측정하였다. GST의 활성도는 340 nm에서 CDNB의 molar extinction coefficient를 9.6 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 로 계산하여 단백질 mg 당 1분 동안 conjugate되는 CDNB의 nmol 수로 표시하였다.

6. Glutathione Reductase(GR)의 활성도 측정

Cytosol의 glutathione reductase 활성도는 Carlberg와 Mannervik(1985)의 방법으로 측정하였다. EDTA-potassium phosphate(2 mM/0.2 M) 완충용액(pH 7.0) 0.5 ml, NADPH 0.05 ml, 20 mM 산화형 glutathione 0.05 ml, 3차 증류수 0.4 ml를 1 ml cuvette에 넣은 후 30°C에서 cytosol 시료를 첨가하여 반응을 시작시켜 340 nm에서 NADPH의 흡과도가 감소되는 속도를 측정하여

였다. Glutathione reductase의 활성도는 단백질 mg 당 1분 동안 산화되는 NADPH의 nmol 수로 표시하였다.

7. Glutathione Peroxidase(GPx)의 활성도 측정

Cytosol의 glutathione peroxidase 활성도는 Tappel(1978)의 방법을 이용하여 기질로는 cumene-hydroperoxide(cumene-OOH)를 사용하였다. Glutathione은 glutathione peroxidase에 의해 산화형 glutathione(GSSG)으로 산화되고 이것이 다시 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원형 glutathione(GSH)으로 환원될 때 NADPH가 산화되는데, 이 때 NADPH가 NADP로 산화되는 정도를 340 nm에서 NADPH의 분자흡광계수 $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 를 이용하여 측정하였다. Cytosol의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준용액으로 사용하여 Lowry 등(1951)의 방법을 이용하여 측정하였다.

8. 통계처리

실험결과는 SPSS를 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준편차 또는 표준오차를 계산하였고, $p < 0.05$ 수준에서 ANOVA test 후 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 간의 유의차를 검증하였다(송 1990).

결과 및 고찰

1. 체중 및 간 무게의 변화

발암물질투여군은 발암물질을 투여하지 않은 대조군에 비하여 체중이 작은 경향을 보였고, 식이지방간의 차이는 보이지 않았다. 간 무게는 발암물질을 투여한 경우 6주째부터 증가하여 체중에 대한 상대적인 간무게(간무게/체중 $\times 100$)가 대조군에 비하여 유의적인 증가를 나타냈다(Table 2). 즉, 발암과정이 진행되면서 6주와 10주째 간세포가 증식되는 것으로 생각되며, 식이지방에 의한 상대적인 간무게의 차이는 보이지 않았다.

2. 면역조직화학적 검사

태반형 GST-P 양성증식성 결절은 간세포 암화과정 중 전 암성병변에서 현저히 발현되어 간세포 암화과정의 지표로 이용되고 있다(Sato 등 1984). 이 실험에서 GST-P 항체를 이용한 면역조직화학적 연구결과, 대조군에서는 식이의 종류에 관계없이 GST-P 양성증식성 결절이 관찰되지 않았고, 6주와 10주째 발암원처리 시 모든 식이군에서 관찰되었다. 6주째는 옥수수유식이군에서 다른 식이군보다 GST-P 양성증식성 결절의 면적이 넓게 나타나는 경향을 보였으며, 10주에서는 모든 식이군에서 8주에 나타난 면적보다 증가하는 경향을 보였으나, 식이군 간에는 차이를 보이지 않았다. 또한 단위면적

Table 2. Effect of different fats on the body and liver weights of the rats treated with DEN followed by AAF and PB

Group	Body wt. (g)	Liver wt. (g)	Liver/Body wt. (%)	
2 wk	CO	187.5 \pm 10.37	6.22 \pm 0.54	3.32 \pm 0.26 ^b
	CA	180.0 \pm 37.05	5.77 \pm 1.20	3.20 \pm 0.16 ^{ab}
	PO	217.5 \pm 6.89	6.24 \pm 0.43	2.87 \pm 0.20 ^{ab}
	PA	172.5 \pm 11.73	4.88 \pm 0.93	2.83 \pm 0.51 ^a
	SO	183.3 \pm 29.27	7.09 \pm 1.13	3.89 \pm 0.46 ^c
	SA	158.3 \pm 20.41	6.43 \pm 0.74	4.09 \pm 0.52 ^c
4 wk	CO	260.0 \pm 20.00	7.31 \pm 0.34	2.82 \pm 0.20 ^{ab}
	CA	236.7 \pm 25.03	6.92 \pm 1.09	2.91 \pm 0.15 ^{ab}
	PO	290.0 \pm 36.33	7.88 \pm 1.07	2.72 \pm 0.09 ^a
	PA	198.3 \pm 23.81	6.33 \pm 0.84	3.20 \pm 0.29 ^c
	SO	267.5 \pm 26.79	8.07 \pm 1.12	3.01 \pm 0.15 ^{bc}
	SA	220.0 \pm 20.25	7.52 \pm 0.59	3.42 \pm 0.08 ^d
6 wk	CO	315.0 \pm 39.88	8.85 \pm 1.49	2.80 \pm 0.15 ^a
	CA	258.3 \pm 27.87	12.14 \pm 1.26	4.70 \pm 0.15 ^b
	PO	328.3 \pm 35.45	8.96 \pm 1.12	2.75 \pm 0.47 ^a
	PA	255.0 \pm 20.74	11.39 \pm 2.08	4.46 \pm 0.71 ^b
	SO	330.0 \pm 42.43	10.14 \pm 1.43	3.08 \pm 0.24 ^a
	SA	276.7 \pm 17.51	12.78 \pm 1.42	4.61 \pm 0.28 ^b
10 wk	CO	409.2 \pm 36.11	10.26 \pm 1.08	2.50 \pm 0.06 ^a
	CA	341.7 \pm 41.19	12.98 \pm 3.60	3.75 \pm 0.64 ^{bc}
	PO	427.0 \pm 47.09	9.84 \pm 1.20	2.30 \pm 0.15 ^a
	PA	367.0 \pm 33.47	12.81 \pm 1.48	3.50 \pm 0.39 ^b
	SO	462.5 \pm 32.52	12.04 \pm 1.40	2.60 \pm 0.22 ^a
	SA	377.5 \pm 46.02	15.08 \pm 1.61	4.01 \pm 0.19 ^c

CO: Corn oil diet, CA: Corn oil diet+carcinogen treatment, PO: Perilla oil diet, PA: Perilla oil diet+carcinogen treatment, SO: Sardine oil diet, SA: Sardine oil diet+carcinogen treatment
Values are mean \pm S.D.

Means with the same letter are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test in the same week.

당 GST-P 양성증식성 결절의 갯수도 면적과 같은 경향으로 나타났는데, 6주째 옥수수유식이군에서 다른 두 식이군에 비해 유의적으로 많은 갯수를 관찰할 수 있었다(Table 3).

팍(1991)은 쇠기름, 옥수수유, 들깨유를 식이의 15%로 공급하고 2-AAF를 3회 복강주사하였을 때 쇠기름 식이군에서 가장 크게 조직학적 퇴행성 변화가 있었고, 옥수수유군이 그 다음이었으며, 들깨유식이군의 변화가 가장 작았다고 보고하여 본 실험의 6주째 옥수수유 식이군에서 들깨유 식이군에 비해 GST-P 양성증식성 결절의 갯수가 많이 나타난 것과 유

Table 3. Effect of different fats on the area and number of placental glutathione S-transferase hyperplastic nodules in hepatocellular carcinogenic rats

Group	Placental glutathione S-transferase positive foci			
	Area(mm ² /cm ²)		No/cm ²	
	6 wk	10 wk	6 wk	10 wk
CA	4.51±2.69	6.55±3.23	28.82±3.94 ^b	29.55±11.21
PA	1.52±0.45	6.39±3.11	10.38±2.42 ^a	17.33± 3.19
SA	2.02±0.89	6.33±3.24	14.07±4.24 ^a	29.38±13.43

CA: Corn oil diet+carcinogen treatment

PA: Perilla oil diet+carcinogen treatment

SA: Sardine oil diet+carcinogen treatment

Values are mean±S.E.

Means with the same letter are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test in the same column.

사한 경향을 보였다.

Misslbeck 등(1984)은 aflatoxin B1(AFB)을 투여한 후 식이의 옥수수유 함량이 증가할수록 GGT 양성증식성 결절의 면적과 갯수가 증가했다고 보고하였으며, Newberne 등(1979)은 AFB를 투여하는 동안과 투여 후에 식이 중의 옥수수유의 양을 증가시킨 경우 간세포의 발암율이 증가하였으나, AFB 투여 후에만 실험식을 공급한 경우엔 발암율이 증가되지 않았다. Baldwin & Parker(1987)도 AFB를 투여하기 전과 투여하는 동안 식이 중 옥수수유의 양을 증가시켰을 때 GGT 양성증식성 결절의 수와 면적이 증가했다고 보고하여 간세포 암화과정에서 식이지방의 영향은 개시단계와 초기의 촉진단계에서 영향을 받는 것으로 생각된다. Kim 등(2005)은 식이지방을 달리하여 식이의 25%를 공급하고 간세포암을 유도하였을 때 참치기름군이 옥수수기름군보다 유의적으로 GST-P

양성 증식성 결절의 면적이 좁았다고 보고하였다. 또한 Xia 등(2005)은 식이의 n-6/n-3 비율을 낮춤으로서 침윤과 관련된 유전자 발현에 영향을 주어 폐종양세포의 침윤성이 감소되었다고 보고하였고, 이러한 결과로 미루어 식이의 지방산 조성이 암세포의 성장에 영향을 미칠 수 있는 것으로 추측된다. 본 실험에서 GST-P 양성증식성 결절의 갯수가 6주째 옥수수유식이군에서 다른 식이군에 비하여 유의적으로 많은 수를 나타낸 것은 n-6계 지방산이 풍부한 옥수수유 식이가 n-3계 지방산이 풍부한 들깨유나 정어리유식이에 비하여 간의 퇴행성 병변에 촉진적인 효과가 있는 것으로 생각된다.

3. Glutathione S-transferase의 활성화도

간 cytosol 분획의 glutathione S-transferase(GST)의 활성도를 측정한 결과, 6주째부터 발암물질을 투여한 군에서 대조군에 비하여 활성화도가 높게 나타났다. 발암물질을 투여했을 때 양성증식성 결절이 생성되기 시작한 6주째에서 정어리유군(SA)이 다른 유지군(CA, PA)에 비하여 유의적으로 활성화도가 낮았다. 발암물질을 투여하지 않은 대조군에서 4주째 정어리유군(SO)이 다른 식이군(CO, PO)에 비하여 활성화도가 유의적으로 높게 나타났고, 6주째에도 유의적인 차이는 아니나 정어리유군에서 효소활성도가 높은 경향을 나타내었다. 따라서 대조군에 비하여 발암물질을 투여한 후의 증가율은 상대적으로 정어리유군이 가장 낮게 나타나, 식이지방만으로 효소활성도가 변화될 수 있으며, 발암물질과 같은 stress가 주어졌을 때 식이지방에 따라 다르게 반응할 수 있다고 생각된다. 양성증식성 결절이 증가한 10주째에는 6주에서 보다 활성화도가 낮아졌으며, 식이지방에 따라 차이를 보이지 않았다(Table 4).

GST는 1단계 약물대사효소계에서 활성화된 친전자성 물질에 glutathione을 conjugation시켜 수용성 물질로 배설시키는 데 관여하는 효소로서 발암물질의 투여에 의한 발암과정

Table 4. Effect of dietary fats and DEN, AAF, PB on the hepatic cytosolic glutathione S-transferase activity

(nmoles/mg protein)

	2 wk	4 wk	6 wk	10 wk
CO	108.15±5.30 ^a _x	110.15± 4.43 ^a _x	110.90±13.25 ^a _x	143.11± 7.92 ^a _x
CA	121.50±4.36 ^a _x	106.22± 4.12 ^a _x	477.18±23.93 ^c _z	355.08±35.39 ^b _y
PO	125.12±5.68 ^a _x	89.52± 4.36 ^a _x	99.15±12.35 ^a _x	129.15± 8.25 ^a _x
PA	130.08±9.04 ^a _x	166.67±18.97 ^b _x	465.93±26.09 ^c _z	331.40±13.61 ^b _y
SO	129.67±8.57 ^a _x	170.60±21.45 ^b _x	141.63± 9.80 ^a _x	143.64± 7.68 ^a _x
SA	141.63±7.25 ^a _x	141.63± 7.25 ^a _x	374.70±16.30 ^b _z	322.30±56.14 ^b _z

CO: Corn oil diet, CA: Corn oil diet+carcinogen treatment, PO: Perilla oil diet, PA: Perilla oil diet+carcinogen treatment

SO: Sardine oil diet, SA: Sardine oil diet+carcinogen treatment, Values are mean±S.E.

^{a-c} Means with the same letter are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test in the same column.

_{x-z} Means with the same letter are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test in the same row.

서도 GST 활성도가 증가된다고 보고되었다(Kitahara 등 1984). 이 실험에서도 GST 활성도는 6주째부터 세 식이군 모두 발암물질 투여에 의해 증가하였고, 이 결과는 발암물질의 해독과 막의 지질과산화물을 제거하는 데 효과적으로 작용하였을 것이다. 특히 6주째 옥수수유식이군에서는 대조군에 비하여 발암원투여군에서의 GST 활성도의 증가율(대조군의 430%)이 들깨유식이군(328%), 정어리유식이군(265%)에 비하여 매우 높게 나타나, 증식성결절이 생성되는 초기에 옥수수유군이 발암물질의 투여에 가장 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 세포막의 지방산 조성은 식이의 지방산 조성을 반영하는 것으로 알려져 왔으며, 식이내 함유된 고도의 불포화지방산은 유리기(free radical)의 공격을 받기 쉬워지므로 세포막의 손상을 방지하기 위해서는 항산화체계가 증가되어야 할 것이다. 본 실험에서는 6주째에서 정어리식이군이 대조군에서도 다른 식이군에 비하여 유의적으로 GST 활성도가 높게 나타났고, 식이지방산체만으로 높아진 항산화체계를 유지하던 정어리유식이군이 발암물질을 투여했을 때 해독화가 용이해질 것으로 추측할 수 있다.

4. Glutathione Reductase의 활성도

Glutathione reductase(GR)는 glutathione peroxidase에 의해 생성된 산화형 glutathione(GSSG)을 NADPH를 사용하여 환원형 glutathione(GSH)으로 환원시키는 역할을 담당한다(Carlberg & Mammervick 1985). 간 cytosol 분획의 glutathione reductase (GR)의 활성도를 측정된 결과, 4주째부터 대조군에 비하여 발암물질을 투여했을 때 증가하는 경향을 보였으나, 들깨유군이외에는 유의적이지 않았고 양성증식성 결절이 형성되는 6주째부터는 발암물질 투여군이 모든 식이군에서 유의적으로 활성도가 증가하였다. 6주째 GST의 활성도 변화와 매우 유사하게 정어리유군(SA)이 다른 유지군에 비하여 활성도가 낮게

나타났으나, 유의적인 차이를 보이지는 않았다. Lee 등(2003)은 식이지방의 p/s 비율을 고정하고, 식이지방산의 급원을 조절하여 간암 억제 효과를 관찰하였을 때 GR의 활성도는 어유를 공급한 군에서 가장 높게 나타났다고 보고하였으나, 본 실험에서 GR 활성도는 대조군 또는 발암물질 투여군에서 식이지방의 차이를 유의적으로 관찰할 수 없었다(Table 5).

5. Glutathione Peroxidase의 활성도

간 cytosol 분획의 glutathione peroxidase(GPx)의 활성도를 측정된 결과, 4주와 6주째에는 발암물질의 투여나 식이지방의 차이에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다. GPx 활성도는 양성증식성 결절의 생성이 진행되면서 10주째가 되어서는 발암물질을 투여했을 때 모든 식이군에서 유의적으로 효소활성도가 감소하는 경향을 보였다. 특히 발암물질을 투여하지 않은 대조군 중 정어리유군(SO)이 다른 유지군에 비하여 GPx 활성도가 낮아 발암물질을 투여하였을 때 감소하는 비율이 가장 낮게 나타났다(Table 6). GPx 활성도가 10주째 대조군의 정어리유군(SO)에서 다른 식이군(CO, PO)에 비하여 낮게 나타나, 식이지방의 종류만으로도 GPx 효소활성도가 다르게 나타날 수 있음을 시사한다.

이 결과는 간세포암화과정의 초기단계에 GPx의 활성이 저하된다는 보고(Kitahara 등 1983)와 일치하는 것으로 특히 발암물질을 투여하지 않은 대조군 중 정어리유군(SO)이 다른 유지군에 비하여 GPx 활성도가 낮아 발암물질을 투여하였을 때 유의적으로 감소하지 않았다. 그러나 Kitahara 등(1983)은 DEN을 복강주사하고 2주 후 2-AAF를 식이의 0.02%로 섭취시킨 결과, 쥐간에서 γ -glutamyltransferase(GGT) 양성증식성 결절이 형성된 다음부터는 cumene hydroperoxide에 대한 glutathione peroxidase의 활성이 점차적으로 증가하였는데, 이러한 현상은 glutathione S-transferase B 형태의 GPx 활성이 증가

Table 5. Effect of dietary fats and DEN, AAF, PB on the hepatic cytosolic glutathione reductase activity

	(nmoles/mg protein)			
	2 wk	4 wk	6 wk	10 wk
CO	28.33±4.92 ^a _x	30.86±2.51 ^a _x	31.45±1.81 ^a _x	26.81±3.75 ^a _x
CA	33.38±4.03 ^a _x	30.05±5.71 ^{ab} _x	81.93±7.17 ^b _z	65.33±7.60 ^b _y
PO	32.40±4.94 ^a _x	32.17±2.68 ^a _x	27.14±1.93 ^a _x	27.49±2.29 ^a _x
PA	30.86±3.10 ^a _x	49.52±4.44 ^b _y	95.31±5.56 ^c _z	61.13±6.49 ^b _y
SO	24.99±4.30 ^a _x	34.03±4.50 ^a _x	22.20±2.87 ^a _x	33.13±4.64 ^a _x
SA	36.00±3.97 ^a _x	41.42±4.84 ^{ab} _x	72.99±3.64 ^b _y	73.45±9.47 ^b _y

CO: Corn oil diet, CA: Corn oil diet+carcinogen treatment, PO: Perilla oil diet, PA: Perilla oil diet+carcinogen treatment

SO: Sardine oil diet, SA: Sardine oil diet+carcinogen treatment, Values are mean±S.E.

^{a-c} Means with the same letter are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test in the same column.

_{x-z} Means with the same letter are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test in the same row.

Table 6. Effect of dietary fats and DEN, AAF, PB on the hepatic cytosolic glutathione peroxidase activity
(nmoles/mg protein)

	2 wk	4 wk	6 wk	10 wk
CO	305.93±21.68 ^{bc} _x	363.84±25.64 ^a _{xy}	359.90±23.28 ^a _{xy}	409.00±48.11 ^c _y
CA	276.72±24.33 ^{abc} _y	383.93±49.69 ^a _z	302.38±36.71 ^a _{yz}	178.20±13.04 ^a _x
PO	294.91±11.93 ^{bc} _x	355.37±24.14 ^a _{xy}	400.86±31.46 ^a _{xy}	427.36±42.08 ^c _y
PA	340.06±33.04 ^c _y	330.68±34.08 ^a _y	384.30±34.95 ^a _y	198.86±12.05 ^a _x
SO	236.17±23.22 ^{ab} _x	328.60±19.34 ^a _x	317.23±22.40 ^a _x	307.29±30.50 ^b _x
SA	191.39±20.36 ^a _x	327.25±20.42 ^a _y	313.73±30.28 ^a _y	205.65±20.56 ^a _x

CO: Corn oil diet, CA: Corn oil diet+carcinogen treatment, PO: Perilla oil diet, PA: Perilla oil diet+carcinogen treatment.

SO: Sardine oil diet, SA: Sardine oil diet+carcinogen treatment, Values are mean±S.E.

^{a~c} Means with the same letter are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test in the same column.

_{x~z} Means with the same letter are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test in the same row.

하기 때문에 설명하였다. Carlberg 등(1981)은 phenobarbital, 3-methylcholanthrene으로 쥐간의 약물대사효소계를 유도하였을 때 GST, GR 활성도는 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으나, GPx의 활성도는 증가되지 않았다고 보고하였다. 쥐간의 GPx의 활성도는 암화과정의 단계에 따라 일관된 양상을 보이지는 않아 단계에 따른 활성도의 변화는 더욱 연구가 필요한 부분으로 생각된다. 본 실험에서는 발암 초기단계에서 측정된 효소활성도이므로 암화과정이 진행되면서 병소(foci)나 결절(nodule)이 더욱 증가하면 간의 병변 정도에 따라 GPx 활성이 다르게 나타날 수 있을 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 n-3, n-6 식이지방산이 화학적으로 유도된 쥐 간세포의 암화과정에 미치는 영향을 알아보고자 발암물질을 투여한 후 GST-P 양성증식성 결절 형성 정도와 glutathione S-transferase(GST), glutathione reductase(GR), glutathione peroxidase(GPx)의 활성도를 측정하였다. 실험식이의 지방 수준은 식이의 15%(w/w)로 하였고, n-6계 불포화 지방산의 급원으로 옥수수유, 식물성 n-3계 불포화 지방산의 급원으로 들깨유, 동물성 n-3지방산의 급원으로 정어리유를 넣은 실험식이를 각각 공급하였다.

발암물질을 투여한 6주째 정어리유식이군과 들깨유식이군은 옥수수유식이군에 비하여 암화과정의 지표인 GST-P 양성증식성 결절의 형성 정도가 낮은 경향을 나타내었다. 이 시기에 GST-P 양성증식성 결절의 갯수는 옥수수유식이군에서 유의적으로 많이 관찰되었다.

간 cytosol 분획의 glutathione S-transferase(GST)의 활성도를 측정된 결과, 6주째부터 발암물질을 투여한 군이 모든 식이군에서 대조군에 비해 활성도가 높게 나타났으며, 6주째

발암물질을 투여했을 때 정어리유식이군(SA)이 다른 유지군(CA, PA)에 비하여 유의적으로 활성도가 낮았다. 4주째는 대조군에서 정어리유식의 효소활성도가 다른 식이군에 비하여 높게 나타났다. 10주째까지 시간이 경과되면서 GST-P 양성증식성 결절의 형성 정도는 증가하는 경향을 보였으나, cytosol의 GST 활성도는 촉진초기 단계인 6주째 가장 높은 경향을 나타냈다.

Glutathione reductase(GR)의 활성도는 GST의 활성도 변화와 매우 유사한 경향을 보였으며, glutathione peroxidase(GPx)의 활성도는 암화과정이 진행되면서 GST, GR 활성도와는 달리 모든 식이군에서 유의적으로 감소하는 경향을 보였다. 특히 발암물질을 투여하지 않은 대조군 중 정어리유식이군(SO)이 다른 유지군에 비하여 GPx 활성도가 낮아 발암물질을 투여하였을 때 대조군과 크게 차이를 보이지 않았다.

이상의 결과 식이지방의 종류를 옥수수유, 들깨유, 정어리유로 달리하여 식이를 섭취시켰을 때 간세포의 암화과정의 초기단계인 6주째 들깨유, 정어리유식이군에 비해 옥수수유식이군에서 GST-P 양성증식성 결절의 갯수가 가장 많이 관찰되었다. 대조군에 비하여 발암물질을 투여한 후의 glutathione S-transferase(GST)의 활성도 증가율은 상대적으로 정어리유식이군이 가장 낮게 나타나, 식이지방만으로 효소활성도가 변화될 수 있으며, 발암물질과 같은 stress가 주어졌을 때 식이지방에 따라 다르게 반응할 수 있다고 생각된다. 특히 식물성 식품에 풍부한 linolenic acid의 역할에 대한 연구가 식이지방산의 n-3/n-6의 적정비율을 규정하기 위하여 더욱 필요하다고 생각된다.

참고문헌

곽충실. 1991. 식이지방이 2-acetylaminofluorene을 투여한 쥐

- 간에서 지질과산화물, 약물대사효소 및 eicosanoid 생성에 미치는 영향. 서울대학교 대학원 이학박사학위논문 송일성. 1990. SPSS/PC+ 기초통계분석. 자유아카데미
- Baldwin S, Parker RS. 1987. Influence of dietary fat and selenium in initiation and promotion of aflatoxin B₁-induced preneoplastic foci in rat liver. *Carcinogenesis* 8:101-108
- Bersot TP, Mahley RW. 1983. Mechanisms of atherogenesis in diet-induced hyperlipidemia. In: Perkins, EG, Visek, WJ, ed. *Dietary Fats and Health*. pp. 550-56. Am Oil Chemists Soc
- Burk RF, Trumble MJ, Lawrence RA. 1980. Rat hepatic cytosolic glutathione-dependent enzyme protection against lipid peroxidation in the NADPH-microsomal lipid peroxidation system. *Biochim Biophys Acta* 618:35-41
- Burns CP, Spector AA. 1990. Effect of lipids on cancer therapy. *Nutr Rev* 48:233-240
- Carlberg I, Depierre JW, Mannervik B. 1981. Effect of inducers of drug-metabolizing enzymes on glutathione reductase and glutathione peroxidase in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 677:140-145
- Carlberg I, Mannervik B. 1985. Glutathione reductase, in *Methods in Enzymology*. Fleisher S and Packer L ed. 113:484-499
- Choi HM, Kim JW, Kim SH. 1997. 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 Nutr* 30:803-812
- Dimri M, Bommi PV, Sahasrabudhe AA, Khandekar JD, Dimri GP. 2010. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 31:489-495
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 249:7130-7139
- Hammer CT, Wills ED. 1979. The effect of dietary fats on the composition of the liver endoplasmic reticulum and oxidative drug metabolism. *Br Nutr* 41:465-475
- Harris CC, Sun TT. 1984. Multifactorial etiology of human liver cancer. *Carcinogenesis* 5:697-701
- Hennekens CH, Buring JE, Mayrent SL. 1990. Clinical and epidemiological data on the effect of fish oil in cardiovascular disease In: Lees RS, Karel M, ed. *Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease* pp.71-86. Marcel Dekker New York and Basel
- Hillyard LA, Abraham S. 1979. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on growth of mammary adenocarcinomas in mice and rats. *Cancer Res* 39:4430-4437
- Hirose M, Masuda A, Ito N, Kanano K, Okuyama H. 1990. Effects of dietary perilla oil, soybean oil and safflower oil on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene(DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine-induced mammary gland and colon carcinogenesis in female SD rats. *Carcinogenesis* 11:731-735
- Hopkins GJ, Kennedy TG, Carrol KK. 1981. Polyunsaturated fatty acids as promoters of mammary carcinogenesis induced in Sprague-Dawley rats by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *J Natl Cancer Inst* 66:517-522
- Jurkowski JJ, Cave WT. 1985. Dietary effects of menhaden oil on the growth and membrane lipid composition of rat mammary tumors. *J Natl Cancer Inst* 74:1145-1150
- Karmall RA, Marsh J, Fuchs C. 1981. Effect of omega-3 fatty acids on growth of a rat mammary tumor. *J Natl Cancer Inst* 73:457-461
- Kim SH, Kang SK, Choi HM. 2005. Effects of dietary levels of corn and tuna oils on the formation of preneoplastic lesions in rat hepatocellular carcinogenesis. *Korean J Nutr* 38:20-29
- Kitahara A, Yamazaki T, Ishikawa T, Camba EA, Kiyomi S. 1983. Changes in activities of glutathione peroxidase and glutathione reductase during chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Jpn J Cancer Res* 74:649-655
- L'Abbe MR, Trick KD, Beare-Rogers JL. 1991. Dietary n-3 fatty acids affect rat heart, liver and aorta protective enzyme activities and lipid peroxidation. *J Nutr* 121:1331-1340
- Lai CS, Hopwood LE, Swartz HM. 1980. Electron spin resonance studies of changes in membrane fluidity of Chinese hamster ovary cells during the cell cycle. *Biochim Biophys Acta* 602:117-126
- Lee HJ, Kim HG, Choe HM. 2003. Different sources of ω 3 fatty acids at the fixed ratio of p/s affect glutathione dependent enzymes in rat hepatocarcinogenesis. *Korean J Nutr* 36:785-792
- Lee SO, Liu H, Cunnick JE, Murphy PA, Hendrich S. 2002. Menhaden oil inhibited gamma-glutamyltransferase-positive altered hepatic foci in female Sprague-Dawley rats. *Nutr Cancer* 44:71-79
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Misslbeck NG, Campbell TC, Roe DA. 1984. Effect of ethanol consumed in combination with high or low fat diets on post initiation phase of hepatocarcinogenesis. *J Nutr* 114:2311-

2317

- Narisawa T, Takahashi M, Kotanagi H, Kusaka H, Yamazaki Y, Koyama H, Fukaura Y, Nishizawa Y, Kotsugai M, Isoda Y, Hirano J, Tanida N. 1991. Inhibitory effect of dietary perilla oil rich in the n-3 polyunsaturated fatty acid α -linolenic acid on colon carcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res* 82:1089-1096
- Newberne PM, Weigert J, Kula N. 1979. Effect of dietary lipid ingestion on the induction of drug metabolizing enzymes by phenobarbital. *Biochem Pharmacol* 22:432-436
- Perkin EG. 1983. Dietary Fats and Health. Amer Oil Chemists Society
- Rahman KM, Sugie S, Tanaka T, Mori H, Reddy BS. 2001. Effect of types and amount of dietary fat during the initiation phase of hepatocarcinogenesis. *Nutr Cancer* 39:220-225
- Sato K, Kitahara A, Satoh K, Ishikawa T, Tatematsu M, Ito N. 1984. The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 75:199-202
- Sevanian A, Hochstein P. 1985. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann Rev Nutr* 5:365-390
- Shinitzky M, Barenholz. 1978. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim Biophys Acta* 515:367-394
- Solt D, Farber E. 1976. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 263:701-703
- Tappel AL. 1978. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Meth Enzymol* 52:506-513
- Williams D, Verghese M, Walker LT, Boateng J, Shackelford L, Chawan CB. 2007. Flax seed oil and flax seed meal reduce the formation of aberrant crypt foci(ACF) in azoxymethane-induced colon cancer in Fisher 344 male rats. *Food Chem Toxicol* 45:153-159
- Wogan GN. 1975. Dietary factors and special epidemiological situations of liver cancer in Thailand and Africa. *Cancer Res* 35:3499-3502
- Xia SH, Wang J, Kang JX. 2005. Decreased n-6/n-3 fatty acid ratio reduces the invasive potential of human lung cancer cells by down regulation of cell adhesion/invasion-related genes. *Carcinogenesis* 26:779-784
- Yamaoka S, Urade R, Kito M. 1988. Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil. *J Nutr* 118:290-296

(2010년 5월 15일 접수; 2010년 6월 9일 채택)