

어유와 비타민 E 보강 수준이 쥐간의 전암성 병변에 미치는 영향

김숙희* · 강상경 · 김유미 · 최혜미

서울대학교 식품영양학과, 혜전대학 호텔조리과*

High Vitamin E Supplement is Needed to Have an Anticarcinogenic Effect of Fish Oil

Kim, Sookhee* · Kang, Sangkyung · Kim, Yoomie · Choi, Haymie

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

Department of Hotel Cooking,* Hyejeon College, Hongsung 350-800, Korea

ABSTRACT

The influences of fish oil and different levels of vitamin E supplement on hepatocellular chemical carcinogenesis have been studied. Male Sprague-Dawley rats received diethylnitrosamine (DEN)(200mg/kg body weight) and were subjected to two-thirds partial hepatectomy to induce murine chemical hepatocarcinogenic procedure. Placental glutathione S-transferase(GST-P) positive foci area, antioxidant enzymes(Cu/Zn-superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione reductase (GR), total-glutathione peroxidase(TGPx), glutathione S-transferase(GST)), glucose 6-phosphatase (G6Pase) activities, and lipid peroxidation of microsomes(thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)) were measured. Experimental animals were fed 15% corn or fish oil with 0, 40, 1, 000, 10,000IU vitamin E /kg diet for 8 weeks. Vitamin E supplements decreased the area of GST-P positive foci in both groups. The higher the vitamin E levels, the smaller the area of GST-P positive foci were noticed. Compared to 0 IU vitamin E, 40 IU in corn oil and 1,000 IU in fish oil groups were effective in decreasing GST-P positive foci area. Fish oil groups tended to have smaller area of GST-P positive foci. Fish oil groups showed lower body weight, lower activities of Cu/Zn-SOD and TGPx, higher TBARS contents, higher activities of GST, catalase, G6Pase, GR and higher liver/body ratio than corn oil groups. As the level of vitamin E increased, GST-P positive foci count, catalase activities, and TBARS tended to decrease. G 6Pase activities tended to increase in both groups. At higher vitamin E levels, GST activities tended to decrease in fish oil groups. These results suggest that vitamin E has suppressive effects on hepatocellular chemical carcinogenesis probably through antioxidant effects decreasing TBARS contents, H₂O₂, and organic peroxides. Fish oil tended to have greater suppressive effects than corn oil on hepatocellular carcinogenesis. (*Korean J Nutrition* 31(6) : 1014~1023, 1998)

KEY WORDS : hepatocarcinogenesis · vitamin E · fish oil · corn oil · GST-P positive foci.

서 론

인간에게 생기는 모든 암의 약 75~80%가 환경에 의
채택일 : 1998년 7월 3일

해 유발되며 이중 약 30~40%가 음식물에 의한 것으로 추정되고 있다". 암의 개시 및 촉진과정은 유리라디칼에 의한 생체내 주요 단백질, 지질, 핵산의 손상과 관련이 있는 것으로 생각되며 몇몇 효소와 항산화제 비타민인 비타민 E, A 및 C와 베타 카로틴등이 유리라디칼

손상으로부터 세포를 보호해 준다²⁾. 비타민 E는 과산화로 인한 세포막 손상을 막아 주는 1차 방어선으로서 유리라디칼을 제거해 주며 연쇄 반응을 종식시키고 세포막의 제한된 부위에 손상을 한정시켜 주는 역할을 한다³⁾. 또한 비타민 E는 protein kinase C 활성을 감소시켜 세포 성장을 억제한다고 보고되었다⁴⁾. 비타민 E는 dehydroepiandrosterone(DHEA)을 투여했을 때 증가되었던 항산화효소 활성도를 감소시켜 세포내 oxidative stress를 감소시켰으며⁵⁾, 암화과정 초기에 과량의 비타민 E(15,000IU/kg diet)를 보강하였을 때 전암성 병변이 감소되었다^{6,7)}. 그러나 생쥐에게 더 높은 용량의 비타민 E(사료량의 4%)를 투여한 경우 디메틸하이드라진의 중앙생성을 촉진시켰다⁸⁾. 한편, 어유는 glutathione reductase 활성을 증가시켜 free radical 공격에 대처할 수 있는 환원형의 glutathione 생성을 촉진시키고, glucose 6-phosphatase 활성을 높게 유지시켜 세포막 안정도를 유지시키는 간세포 보호효과를 보였다. 그리고 과량의 어유(사료의 25%)는 옥수수유에 비해 전암성 병변을 억제시켰다⁹⁾. 그러나 다가 불포화지방산의 섭취가 증가하면 세포막에서의 지질 과산화 방지와 정상적인 생리 기능을 유지하기 위하여 비타민 E의 요구량이 증대되어야 한다^{9,10)}. 또한 불포화 지방산의 양뿐만 아니라 불포화 지방산의 불포화 정도가 높을수록 과산화의 정도도 증가하였다고 한다¹²⁾. 불포화도가 높고 비타민 E의 함량이 낮은 어유를 많이 소비하는 경우에 신체 조직 내의 다가 불포화 지방산의 농도를 증가시킬 수 있으므로 비타민 E의 공급도 이와 더불어 충분히 공급되지 않으면 세포막의 과산화가 쉽게 일어날 수 있다¹³⁾. 따라서, 불포화도가 다른 식이지방에 여러 수준의 비타민 E를 보강하여 비타민 E 결핍군과 비교하여 암화과정 에 미치는 영향을 살펴볼 필요가 있다. 이에 본 실험에서는 다가 불포화 지방산인 docosahexaenoic acid (22 : 6, n-3)를 30% 함유한 어유(참치 안구 농축유)와 linoleic acid(18 : 2, n-6)를 57% 함유한 옥수수유를 식이 지방급원으로 사용하고 비타민 E를 0, 40, 1,000, 10,000IU/kg diet로 중독증상이 보고되지 않은 수준범위¹⁶⁾에서 보강시켰을 때 전암성 병변형성에 미치는 영향을 살펴보고, 그 가능한 기전으로서 비타민 E의 항산화 효과가 관여하는지를 알아보려 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

이유한 Sprague-Dawley종 숫쥐 중에서 45~80g된 것을 서울대학교 동물사육장으로부터 공급받아 사육실

의 환경에 순응시킨 후 200g 정도의 무게가 되었을 때 실험에 사용하였다. 정상 조건 하에서 각군 당 10마리로 나누어 후 실험식이를 8주간 공급하였다. 이때 온도, 습도, 채광은 각각 20±1℃, 55±1%, 7 : 00~19 : 00으로 조절하였으며, 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 실험식이 및 저지

실험식이는 지방함량을 15% 수준으로 사용하였고, 비타민 E는 0, 40, 1,000, 10,000IU 수준으로 사용하였다(Table 1). 실험식이는 질소가스로 충전시켜 냉동고에 보관하였다가 사용하였다. 쥐 간세포암 유도는 diethylnitrosamine(DEN)으로 개시하고 3주후 간부분 절제술(partial hepatectomy(PH))을 하였다¹⁷⁾. 모든 쥐들은 기본 사료로 사육하여 200g 정도의 무게가 되었을때 각각의 지방급원 식이에 비타민 E 수준을 0, 40, 1,000, 10,000IU/kg으로 한 식이를 공급하였다. 실험식이를 공급하는 첫날 모든 군에게 생리 식염수에 녹인 DEN을 200mg/몸무게(kg) 수준으로 복강주사하여 간세포암을 유도하였다. DEN을 주사하고 3주일 경과 후 실험군 모든 쥐들을 ketamine hydrochloride로 마취시키고 중앙엽과 좌측엽을 절제하는 70% 간 부분

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

Ingredient	
Corn starch	54.7
Vitamin-free casein	20.0
Cellulose	5.0
Salt mixture(1)	4.0
Vitamin mixture(2)	1.0
DL-Methionine	0.3
Stripped corn oil or fish oil	15.0
α-tocopherol acetate(3)	0, 0.004, 0.1, 1

(1) Composition of salt mixture, g/kg mixture : CaHPO4 500g, NaCl 74g, K2SO4 52g, Potassium Citrate Monohydrate 220g, MgO 24g, Manganous Carbonate(43-48 Mn) 3.5g, Ferric Citrate(16-17% Fe) 6.0g, Zinc Carbonate 1.6g, Cupric Carbonate(53-55% Cu) 0.3g, KIO3 0.01g, Chromium Potassium Sulfate 0.55g, Na2SeO3. 5H2O 0.01g, Sucrose finely powdered 118.0g

(2) Nutritional Biochemicals, ICN Life Science Group, Cleveland, Ohio. Vitamin E free Vitamin mixture is composed of : Vit. A Acetate(500,000IU per g) 0.125, Ascorbic acid 45.0g, Inositol 5.0g, Choline Chloride 75.0g, Menadione 2.25g, p-Aminobenzoic acid 5.0g, Niacin 4.25g, Riboflavin 1.0g, pyridoxine hydrochloride 1.0g, Calcium Pantothenate 3.0g, Biotin 0.02g, Folic acid 0.09g, Vit.B12 0.00135g and Dextrose to 1kg

(3) Sigma No. T 3376 DL-α-Tocopherol acetate. 0, 40, 1,000, 10,000IU/kg diet

절제수술(PH)을 시행하였으며¹⁷⁾, 실험시작 8주후에 희생시켰다(Fig. 1).

3. 시료의 수집 및 전처리

실험 동물을 희생시킨 후 간을 절제하여 전체 무게를 재고 약 5g의 간을 떼내어 잘게 다졌다. 그 다음 차가운 균질용 용액(154mM KCl, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA buffer, pH 7.4) 약 25ml에 넣고 4℃에서 균질화한 후 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(mi-

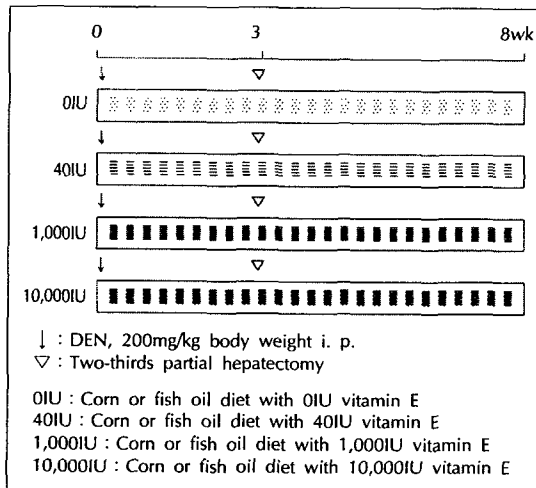


Fig. 1. Experimental Design.

Table 2. Effects of corn or fish oil with different levels of vitamin E on final liver weight, body weight and liver/body weight ratio

Group	Liver weight(g)	Body weight(g)	Liver/Body weight ratio(%)
C-0	11.0±1.7 ^{ab}	447.0±42.8 ^a	2.5±0.3 ^a
C-40	10.7±1.1 ^b	456.4±35.3 ^a	2.3±0.2 ^a
C-1,000	12.1±1.9 ^{ab}	472.1±22.7 ^a	2.6±0.4 ^a
C-10,000	13.1±3.2 ^a	495.6±70.6 ^a	2.6±0.3 ^a
Total corn oil groups	11.7±2.2	466.9±47.9	2.5±0.3
F-0	12.2±1.5 ^a	415.7±20.7 ^a	3.0±0.2 ^{ab*}
F-40	12.0±1.5 ^a	423.6±47.5 ^a	2.8±0.2 ^{ab*}
F-1,000	13.4±2.2 ^a	433.3±46.2 ^a	3.1±0.2 ^a
F-10,000	12.7±1.1 ^a	458.3±36.2 ^a	2.8±0.2 ^b
Total fish oil groups	12.4±1.4	431.5±39.0 ^b	2.9±0.2 ^b

C-0, F-0 : Corn or fish oil diet with 0IU vitamin E
 C-40, F-40 : Corn or fish oil diet with 40IU vitamin E
 C-1,000, F-1,000 : Corn or fish oil diet with 1,000IU vitamin E
 C-10,000, F-10,000 : Corn or fish oil diet with 10,000IU vitamin E

Values are mean±SD

Means within the same oil groups sharing a common letter are not significantly different(p<0.05) as determined by Duncan's multiple range test

Means with * are significantly different from the same vitamin E level of corn oil group at p<0.05 by T-test

Means with ^b are significantly different from the Total corn oil groups at p<0.05 by T-test

tochodria, lysosome과 peroxisome층)은 따로 부유하여 -70℃에 보관하였고, 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 보관한후 분석에 사용하였다. 간 중 일부는 적당한 크기로 잘라 면역 조직화학적 검사와 조직학적 검사를 위해 냉아세톤과 10% phosphate buffered formalin용액에 고정시켰다.

4. 면역 조직화학적 염색 및 광학 현미경적 관찰

냉아세톤으로 고정시킨 간 조직의 태반형 glutathione S-transferase(GST-P) 양성 증식성 결절을 확인하기 위해 avidin biotin peroxidase complex(ABC)법을 이용하여 면역 조직화학적 염색을 하였다¹⁸⁾. GST-P 양성 증식성 결절의 수와 면적은 칼라 화학분석기(Cambridge Instruments, Quantinet 520)를 이용하여 측정하였다. H&E 염색은 10% phosphate buffered formalin액에 고정된 간을 사용하였다.

5. 생화학적 검사

Cu/Zn-superoxide dismutase(SOD) 활성도는 10,000×g 부유층에서 Misra와 Fridovich법¹⁹⁾에 의해 측정하였다. Catalase 활성도는 10,000×g pellet에서 Abei 법²⁰⁾으로, 세포질분획에서 glutathione reductase의 활성도는 Carlberg와 Mannervick법²¹⁾으로, total glutathione peroxidase(총 GPx) 활성도는 Paglia와 Val-

entina(1967)의 방법을 개선한 Tappel(1978)의 방법²²⁾으로, Glutathione S-transferase(GST) 활성도는 Habis 등²³⁾의 방법으로 측정하였다. 소포체분획에서 glucose-6-phosphatase(G6Pase) 활성도는 Baginskie 등²⁴⁾의 방법으로, 지질 과산화물 함량 측정은 thiobarbituric acid(TBA) 방법을 이용하여 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 함량을 측정했다²⁵⁾. 단백질 함량은 bovine serum albumine을 표준용

액으로 사용하여 Lowry 등의 방법²⁶⁾을 이용하여 측정하였다.

6. 통계처리

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

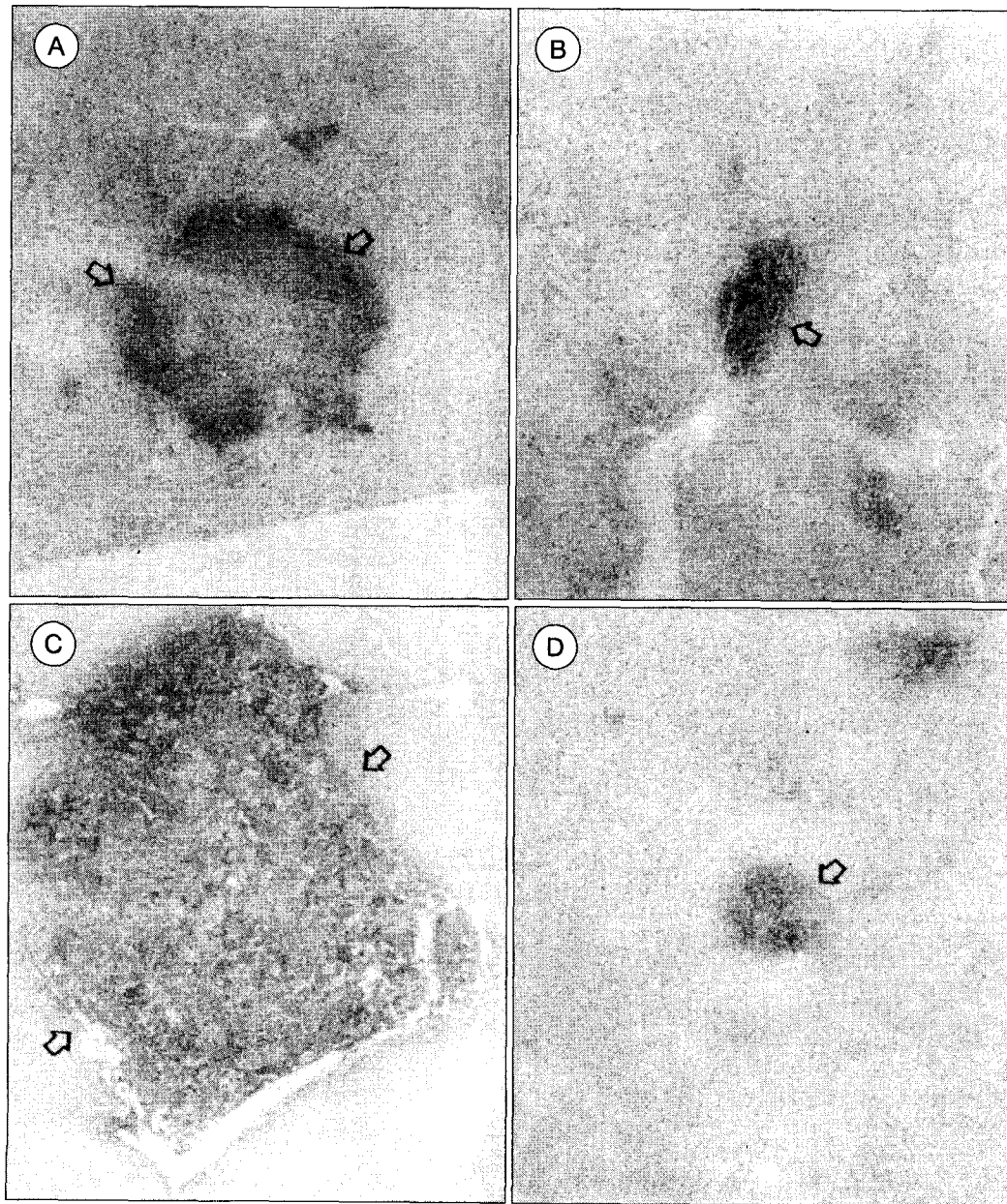


Fig. 2. GST-P positive foci in the DEN treated and partial hepatectomized rats.
A : C-0, B : C-10,000, C : F-0, D : F-10,000

다. 그리고 각 대조군과의 t-test를 한 후, 각 지표간의 상관관계를 알아보았다.

실험결과

1. 체중 및 간 무게의 변화

실험동물의 체중은 옥수수유군, 어유군 모두에서 비타민 E에 의해 유의적인 차이를 나타내지는 않았지만, 옥수수유군과 어유군 전체를 비교했을때 옥수수유군이 어유군에 비해 체중이 무거웠고, 체중당 간무게비는 어유군에서 높았다(Table 2). 간무게는 옥수수유군중 40 IU의 비타민 E를 첨가시킨 군이 10,000IU를 보충한 군에 비해 낮았지만, 체중당 간 무게비에는 유의적 차이가 없었다. Kim 등²⁷⁾은 식이에 높은 비율의 어유를 첨가하면 이것이 간 비대와 원인이 되는 peroxisome 증식제로 작용할 수 있다고 하였다. 이러한 peroxisome 증식제가 간의 무게를 증가시키는 mitogenic activity를 갖는 것은 아직 정확한 기전이 알려져 있지 않다. 다만 β -oxidation에 의해 peroxisome에서 생성되는 H₂O₂와 이로써 증가하는 reactive oxygen species(ROS) 독성에 의하여 간세포의 증식이 유도된다고 한다²⁸⁻³⁰⁾.

2. 면역조직학적 검사

실험군 모두에게 DEN 처치와 간 부분 절제술을 시행하였기에, GST-P 양성 증식성 결절이 관찰되었다(Fig. 2, 3). 옥수수유군과 어유군 모두에서 GST-P 양성 증식성 결절 면적은 비타민 E 결핍군에서 가장 넓었다. 옥수수유군과 어유군 모두에서 비타민 E 보강수준이 높아질수록 GST-P 양성 증식성 결절면적이 작아지는 경향을 보였는데 옥수수유군의 경우 비타민 E의 수준이 40IU 이상에서 어유군에서는 1,000IU 이상의 비타민 E 보강군이 비타민 E 결핍군에 비해 유의적으로 면적이 작았다. GST-P 양성 증식성 결절수도 결절면적과 유사하여 비타민 E의 보강은 결절수를 결절군에 비해 유의적으로 감소시켰다. 특히 어유군의 10,000IU 군은 같은 농도의 비타민 E를 보강한 옥수수유군보다도 결절수가 유의적으로 적었다.

3. 생화학적 검사

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

전체 식이지방군 비교시, Cu/Zn-SOD 활성도는 옥수수유군이 어유군에 비하여 높았으며, 같은 비타민 E 수준끼리를 비교했을 때는 0, 1,000, 10,000IU에서 옥수수유군이 어유군보다 유의적으로 높은 활성을 보

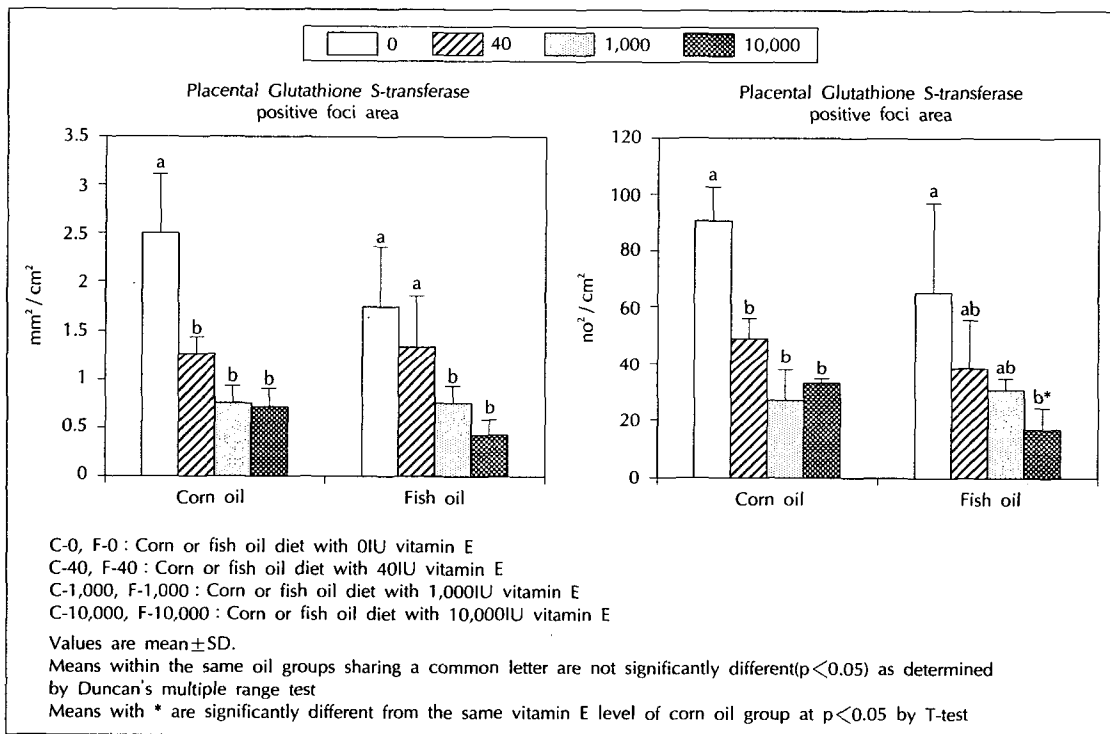


Fig. 3. Effect of corn or fish oil, with different levels of vitamin E on the area and number of placental glutathione S-transferase positive foci in the DEN treated and partial hepatectomized rats.

였다(Table 3). 옥수수유군에서는 비타민 E 수준에 따라 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나 어유군의 경우 사료의 비타민 E수준이 40IU일 때보다 1,000IU일 때 Cu/Zn-SOD 활성도가 유의적으로 낮았다.

2) Catalase 활성도

전체 식이지방군을 비교했을때, 어유군이 옥수수유군에 비해 catalase 활성이 높았는데, 같은 비타민 E 수준일때 옥수수유군에 비해 어유군의 catalase 활성도가 유의적으로 높았던 군은 비타민 E 수준이 0, 40 IU일 때였다. 옥수수유군과 어유군 모두 비타민 E 수준이 10,000IU로 증가되었을때 catalase 활성은 감소하였다(Table 3). 어유군은 옥수수유군에 비해 catalase 활성이 높았으나 이러한 영향은 과량의 비타민 E 보강으로 상쇄되었다.

3) Glutathione reductase 활성도

Glutathione reductase 활성도는 전체 식이지방군간의 비교에서, 어유군이 옥수수유군에 비해 높았는데, 특히 비타민 E 수준이 1,000IU 수준일때 어유군의 활성이 옥수수유군에 비해 유의적으로 높았다(Table 3). 한편 어유군과 옥수수유군 모두 비타민 E 수준에 따른 뚜렷한 변화는 없었다.

4) 총 glutathione peroxidase(총 GPx) 활성도

전체 식이지방군끼리를 비교했을때, 총 GPx 활성도

는 옥수수유군이 어유군보다 높았다. 그리고, 비타민 E 40IU수준에서 옥수수유군이 어유군에 비해 총 GPx 활성도가 유의적으로 높았다(Table 4). 옥수수유군에서 비타민 E를 1,000, 10,000IU로 보강해 주었을때 40IU인 군에 비해 총 GPx 활성도가 유의적으로 감소하였다.

5) Glutathione S-transferase(GST) 활성도

전체 식이지방군끼리의 비교시, 어유군이 옥수수유군에 비해 GST 활성도가 높았다. 비타민 E 0IU 수준에서 어유군이 옥수수유군에 비해 유의적으로 높은 GST 활성도를 가졌다(Table 4).

6) Glucose-6-phosphatase(G6Pase) 활성도

소포체막 안정도의 척도인 G6Pase 활성도는 전체 식이지방군간의 비교시, 옥수수유군에 비해 어유군에서 높았다. 사료의 비타민 E 수준이 40IU일 때 어유군의 G6Pase 활성도가 옥수수유군에 비해 유의적으로 높았다(Table 4). 옥수수유군에서 10,000IU로 비타민 E 보강수준이 커질 때 G6Pase 활성도는 유의적으로 높았다. 소포체막 안정도를 유지하는 비타민 E 보강 효과는 옥수수유군이 어유군에 비해 뚜렷하며, 사료의 비타민 E 수준이 10,000IU일 때 옥수수유군에서 유의적으로 소포체막 안정도를 높이는 것으로 나타났다. GST-P 양성 증식성 결절면적과 관련시켜 볼 때, 아마도 비타민 E 보강이 소포체막 안정도를 높여, 암화과정을 억제하는데 기여하였을 것으로 생각된다.

Table 3. Effects of corn or fish oil with different levels of vitamin E supplement on the Cu/Zn-superoxide dismutase(Cu/Zn-SOD), catalase and glutathione reductase activities

Group	Cu/Zn-SOD n unit/mg protein	Catalase μunit/mg protein	Glutathione reductase nmole NADPH oxidation μ/mg protein/min
C-0	68.1±5.3 ^a	728.3±67.3 ^a	68.1±9.6
C-40	67.1±8.0 ^a	721.2±61.1 ^a	68.7±8.2
C-1,000	67.2±4.5 ^a	722.4±86.7 ^a	57.9±6.7
C-10,000	63.8±5.3 ^a	606.1±46.5 ^b	63.1±4.0
Total corn oil groups	66.7±5.8	702.2±77.6	65.5±8.5
F-0	52.4±4.4 ^{ab*}	1108.6±281.1 ^{a*}	76.4±9.7
F-40	59.0±8.8 ^a	924.7±33.2 ^{ab*}	67.2±3.4
F-1,000	47.1±11.7 ^{b*}	811.0±117.3 ^{ab}	70.7±6.0*
F-10,000	48.7±2.4 ^{ab*}	678.2±92.2 ^b	69.4±5.9
Total fish oil groups	52.5±8.1 [§]	913.2±240.4 [§]	70.9±7.0 [§]

C-0, F-0 : Corn or fish oil diet with 0IU vitamin E
 C-40, F-40 : Corn or fish oil diet with 40IU vitamin E
 C-1,000, F-1,000 : Corn or fish oil diet with 1,000IU vitamin E
 C-10,000, F-10,000 : Corn or fish oil diet with 10,000 IU vitamin E
 Values are mean±SD.

Means within the same oil groups sharing a common letter are not significantly different(p<0.05) as determined by Duncan's multiple range test

Means with * are significantly different from the same vitamin E level of corn oil group at p<0.05 by T-test

Means with § are significantly different from the total corn oil groups at p<0.05 by T-test

Table 4. Effects of corn or fish oil with different levels of vitamin E supplement on the total glutathione peroxidase(TGPx), glutathione S-transferase(GST), glucose 6-phosphatase(G6Pase) activities and thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) contents

Group	TGPx	GST	G6Pase	TBARS
	nmole NADPH oxidized /mg protein/min	nmole CDNB conjugate /mg protein/min	mmole Pi liberated /mg protein/min	nmole TBARS /mg protein
C-0	555.9±58.1 ^{ab}	302.3±15.2	1458.0±306.4 ^b	413.4±67.5 ^a
C-40	621.7±52.2 ^a	313.2±20.1	1455.9±261.0 ^b	333.0±4.6 ^b
C-1,000	533.1±70.8 ^b	289.5±23.5	1592.7±377.2 ^b	200.2±17.7 ^c
C-10,000	503.2±54.8 ^b	312.9±42.3	2053.8±268.4 ^a	165.4±13.2 ^c
Total corn oil groups	557.1±70.6	305.2±26.3	1621.9±375.5	294.4±105.3
F-0	489.7±65.8 ^a	341.6±33.1 [*]	1858.1±628.5 ^a	596.4±181.2 ^a
F-40	476.2±80.7 ^{a*}	335.6±21.4	1961.7±358.7 ^{**}	486.9±77.5 ^{ab}
F-1,000	470.9±106.5 ^a	313.2±43.4	1727.1±155.6 ^a	230.0±30.3 ^b
F-10,000	467.7±46.1 ^a	305.4±36.9	2017.7±154.1 ^a	213.4±53.1 ^b
Total fish oil groups	477.2±67.9 [§]	326.3±33.5 [§]	1909.4±394.2 [§]	428.8±204.3

C-0, F-0 : Corn or fish oil diet with 0IU vitamin E

C-40, F-40 : Corn or fish oil diet with 40IU vitamin E

C-1,000, F-1,000 : Corn or fish oil diet with 1,000IU vitamin E

C-10,000, F-10,000 : Corn or fish oil diet with 10,000IU vitamin E

Values are mean±SD

Means within the same oil groups sharing a common letter are not significantly different($p < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range testMeans with * are significantly different from the same vitamin E level of corn oil group at $p < 0.05$ by T-testMeans with § are significantly different from the total corn oil groups at $p < 0.05$ by T-test

7) 지질 과산화물 생성량

지질 과산화물은 옥수수유군보다 어유군에서 더 많이 유도되는 경향을 보였고($p < 0.07$), 옥수수유군과 어유군 모두 사료의 비타민 E 수준이 높아질수록 지질 과산화물 생성정도가 감소하였다(Table 4). 어유군에서 지질과산화물 생성은 사료의 비타민 E수준이 0IU일 때보다 1,000, 10,000IU일때 유의적으로 감소되었다. 옥수수유군의 경우 사료의 비타민 E 수준이 0IU일 때보다 40, 1,000, 10,000IU에서 유의적으로 지질 과산화물생성이 낮았다.

고 찰

암화과정을 유도하면서 보강해준 비타민 E가 항산화 효소들에 미치는 영향은 지방의 종류(어유, 옥수수유)에 따라 차이가 있었으며, 이는 이전 실험(5% 지방수준인 Purina diet를 기본 사료로 사용)⁷⁾ 결과에서 보인 비타민 E의 항산화 효과와도 다소 차이가 있었다. 두 식이지방군 모두 비타민 E 결핍군에서 가장 넓은 GST-P 양성 증식성 결절면적을 보였다. 결핍군에 비해 GST-P 양성 증식성 결절면적을 유의적으로 감소시킨 군은 옥수수유군의 경우 40IU/kg diet(쥐의 비타민 E 권장량)를 준 군이었고, 어유군의 경우 1,000IU를 보강해준 군이었다. 이는 옥수수유군에 비해 상당히 많

은 양이었다. 한편 10,000IU로 비타민 E를 다량 보강해 준 경우 GST-P 양성 증식성 결절이 더 유의적으로 감소하지는 않았다. 즉 1,000IU 이상의 비타민 E 보충에 의한 GST-P 양성 증식성 결절 면적의 감소폭은 40과 1,000IU 사이의 감소폭보다 상대적으로 작았다. 옥수수유군의 경우에도 0IU에 비해 40IU에서 큰 폭으로 결절 면적을 감소시킨 후 그 이상의 비타민 E 보강에서는 결절 면적의 감소폭이 상대적으로 작았다. GST-P 양성 증식성 결절 면적은 옥수수유군의 경우 지질 과산화물 함량($r=0.90$, $p < 0.05$)과, Cu/Zn-SOD 활성도($r=0.632$, $p < 0.05$)에 대하여 양의 상관관계를 보인데 비해 어유군의 경우 catalase 활성도($r=0.57$, $p < 0.08$)와 지질 과산화물함량($r=0.92$, $p < 0.05$)에 대하여 양의 상관관계를 보였다. 두 식이지방군 모두 지질 과산화물 함량과 GST-P 양성 증식성 결절면적사이에 강한 양의 상관 관계를 보인 것을 볼 때, 지질 과산화물이 전암성 병변의 형성을 촉진시키는 것으로 생각된다. 즉, 비타민 E 수준이 높아질수록 지질 과산화물 생성이 감소하였고, 이로 인하여 GST-P 양성 증식성 결절 면적의 크기를 감소시켰을 것이다. 본 실험에서 비타민 E보강 수준을 높일수록 지질 과산화물 생성을 감소시키고, 세포내의 산화물질들을 제거하여 세포내 항산화계를 보강하여 항산화 효소 활성들이 감소하였는데, 두 식이 지방간의 이러한 양상에는 약간씩의 차이가 있었다. 비

타민 E를 옥수수유군에 보강시켰을 때 catalase 활성도가 10,000IU 수준에서 다른 수준에 비하여 유의적인 감소를 보였으며, 총 GPx 활성도는 40에서 1,000IU로 비타민 E 수준을 높일 때 유의적으로 감소하였다. 그리고 소포체막 안정도는 10,000IU를 주었을 때 유의적으로 높아졌다. 어유군의 경우 Cu/Zn-SOD 활성도는 40에서 1,000IU로 비타민 E 수준이 높아질 때, catalase 활성도는 10,000IU 비타민 E 수준일 때 다른 수준에 비하여 유의적으로 낮았다. 다른 실험 결과에서도, 20% menhaden oil 군이 라아드/옥수수유군 보다 지질 과산화물이 증가하였고, Cu/Zn-SOD 활성은 감소하였다³¹⁾. 또한 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)에 단기간 노출될 때 유리라디칼과 활성 산소가 생성되면서 동시에 Cu/Zn-SOD 활성을 낮추었다³²⁾³³⁾. 어유에 의해 생성된 지질 과산화물이 cytotoxic, cytostatic하여 성장 속도를 제한하거나, 저해하는 작용을 할 것이라고 한 Gonzalez등³⁴⁾의 제안과 같이 활성 산소에 의한 유리라디칼 생성은 전암성 병변의 성장을 억제하는데 기여하였을 수도 있을 것이다. 전체 식이지방군간의 비교에서 어유군의 catalase 활성도가 옥수수유군에 비해 높게 나타났으며, 비타민 E 보강에 의한 catalase 활성도 감소를 0IU군 대비 10,000IU군을 비교했을 때 어유군은 61%, 옥수수유군은 83%로 어유군에서의 감소폭이 더 컸다. 즉, 어유군은 옥수수유군에 비해 peroxisome을 유도하였으나, 이러한 효과는 비타민 E 보강에 의해 진정될 수 있었다. 소포체막의 다가 불포화지방산은 지질 과산화 반응의 기질이 되며, 지질 과산화 반응은 발암원 자체 혹은 발암원을 대사시키는 과정에 관여하는 효소에 의해 일어날 수 있다³⁵⁾. 지질 과산화물은 membrane integrity를 저하시켜 막 부착 효소인 G6Pase와 약물대사 효소에 자체에도 영향을 주어³⁶⁾ 간 세포 손상을 유발하며 암화 촉진과정과도 관련이 있는 것으로 보고되고 있다³⁷⁾³⁸⁾. Kang⁹⁾도 25% 어유군이 옥수수유군에 비해 지질 과산화물 생성이 많았으나, GST-P 양성 증식성 결절 면적은 오히려 작아졌다고 하였는데, 이는 지질 과산화물의 역할에 양면성이 있음을 보여준다. 식이지방간의 상당한 이중결합수 차이(이중결합수비(어유/옥수수유=2.23))에도 불구하고 비타민 E 수준이 같을 경우 어유군과 옥수수유군의 지질 과산화물 생성량에 유의적인 차이는 없었다. 전체 식이지방군을 비교했을때, 어유군은 옥수수유군에 비하여 체중당 간 무게비, GST, catalase, glutathione reductase, G6Pase 활성이 높았고(p<0.05), 지질 과산화물 생성이 많은 경향(p<0.07)을 보인데 비해 체중, Cu/Zn-SOD, 총 GPx 활성이 낮았다.

특이할 점은 어유군에서 옥수수유군에 비해 지질 과산화물이 더 생성되었는데도 불구하고 소포체막 안정도는 더 컸다. 그리고 어유에 의해 catalase 활성이 증가한 것을 볼 때, 어유에 의하여 peroxisome이 유도되어 체중당 간 무게비가 높아졌을 가능성이 있다. 만일 그렇다면 이는 세포수의 증가가 아니라 peroxisome 유도로 인한 세포크기 증가에 의한 것일 것이라고 생각된다. 또한 어유에 의해 높은 활성을 보인 glutathione reductase는 환원형 GSH를 효과적으로 공급하여 세포내 산화물 제거를 용이하게 하였을 것으로 본다.

결론

본 실험은 생체 고유의 항산화 물질인 비타민 E를 옥수수유나 어유와 같은 식이지방에 여러 수준으로 보강시켰을 때 간 세포 암화과정에 미치는 영향을 알아보고자 수행되었다.

사료의 비타민 E 수준이 0IU일 때 어유군과 옥수수유군 모두 가장 넓은 GST-P 양성 증식성 결절을 보였고 비타민 E 수준이 높아질수록 GST-P 양성 증식성 결절 면적이 감소하였다. 비타민 E 수준이 0IU일 때보다 GST-P 양성 증식성 결절 면적을 유의적으로 낮춘 군은 옥수수유군의 경우 40IU 이상의 비타민 E를 보강한 군들이었고, 어유군의 경우 1,000IU 이상의 비타민 E를 보강한 군들이었다. 즉 이중결합수가 더 많은 어유가 옥수수유에 비하여 암화과정시 비타민 E 요구량이 더 많았다. 비타민 E 수준이 0IU일 때, 어유군은 옥수수유군에 비해 GST-P 양성 증식성 결절면적이 작은 경향을 보였는데, 아마도 사료의 비타민 E를 0IU로 하는 극한 상황에서, 어유가 옥수수유에 비해 항암효과를 보이는 것으로 생각된다. GST-P 양성 증식성 결절수도 결절면적과 유사한 결과를 보였는데 특히 10,000 IU 수준에서는 어유군이 옥수수유군보다 결절수가 유의적으로 적었다. Cu/Zn-SOD 활성도는 어유군의 경우 40IU에 비해 1,000, 10,000IU 수준에서 유의적으로 낮은 값을 보였으며, 총 GPx 활성도는 비타민 E 보강에 따라 약간 낮아지는 경향을 보였다. 지질 과산화물 생성은 비타민 E 보강 수준이 증가할수록 낮았다. 전체 식이지방군간의 비교에서 어유군이 옥수수유군보다 catalase, glutathione reductase, G6Pase 활성과 지질 과산화물 함량은 높았고, Cu/Zn-SOD와 총 GPx 활성도는 낮았다. 이는 어유군이 환원형의 GSH 공급을 위한 glutathione reductase 활성도를 높이고 GST 활성을 증가시켜 세포내 산화물들을 효과적으로 제거하고 소포체막 안정도를 높이면서 총 GPx나 Cu/

Zn-SOD 활성을 낮게 한 것에 기인한 것으로 생각된다. 어유군이 옥수수유군에 비해 높게 나타났던 catalase 활성도는 비타민 E 보강에 의해 감소하였는데 그 감소폭도 옥수수유군에 비해 컸다. 즉 어유군은 옥수수유군에 비해 peroxisome 유도 효과를 보였으나 이러한 효과는 비타민 E 보강에 의해 진정될 수 있었다. 또한 어유군이 옥수수유군보다 지질과산화물이 더 생성되었는데도 불구하고 소포체막 안정도는 더 컸다. 전체적으로 볼때, 비타민 E 수준이 높아질수록 GST-P 양성 증식성 결절의 면적과 수, catalase 활성도, 지질과산화물생성이 작아졌고, 소포체막 안정도의 척도인 G6Pase 활성도는 증가하는 경향을 보였으며, 비타민 E 수준이 높아질수록 어유군에서는 GST 활성이 감소하는 경향을 보였다. 이상의 결과 비타민 E 보강수준이 높아질수록 쥐 간의 암화과정이 억제되었으며, 옥수수유군에 비해 어유군은 암화과정을 억제하는 경향을 보였다.

■ 감사의 글

This research was supported by Nondirected Research Fund, Korea Research Foundation. The authors gratefully acknowledge Dr. Lee, Youngsoon for the help of immunohistochemical study.

Literature cited

- 1) Watson RR, Leonard TK. Selenium and vitamin A, E and C : Nutrients with cancer prevention properties. *J Am Diet Assoc* 86 : 505-510, 1986
- 2) Krishnamurthy S. The intriguing biological role of vitamin E. *J Chem Ed* 60 : 456-467, 1983
- 3) Kim S, Choi H. Effect of N-6, N-3 Fatty acids and Vitamin E supplement on the induction of preneoplastic lesion in murine hepatocarcinogenesis model. *Korean Biochem J* 27(2) : 125-131, 1994
- 4) Boscoboinik D, Szweczyk A, Hensey C, Azzi A. Inhibition of cell proliferation by α -tocopherol. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 266 : 6188-6194, 1991
- 5) McIntosh MK, Goldfarb AH, Curtis LN, Cote PS. Vitamin E alters hepatic antioxidant enzymes in rat treated with dehydroepiandrosterone(DHEA). *J Nutr* 123(2) : 216-224, 1993
- 6) Ura H, Denda A, Yokose Y, Tsutsumi M, Konishi Y. Effect of vitamin E on the induction and evolution of enzyme-altered foci in the liver of rats treated with diethylnitrosamine(DEN) 8(11) : 1595-1600, 1987
- 7) 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) : 803-812, 1997
- 8) Cook MG, Mcnamara P. Effect of dietary vitamin E on the dimethylhydrazine-induced colonic tumors in mice. *Cancer Res* 40 : 1329-1331, 1980
- 9) Kang S. Effects of dietary levels of corn and tuna oils on preneoplastic lesions in diethylnitrosamine-induced rat hepatocellular carcinogenesis. *Seoul National University thesis*, 1996
- 10) Horvitt MK. Interpretation of requirements for thiamin, riboflavin, niacin-tryptophan and vitamin E plus comments on balance studies and vitamin B₆. *Am J Clin Nutr* 44 : 973-985, 1986
- 11) Lee YC, Kim HY, Cho HY, Kim CS, Han SS. Effects of dietary polyunsaturated fat and Se on levels of serum vitamin E and creatine phosphokinase and morphology of rat hepatocytes. *Korean J Nutr* 17(3) : 224-234, 1984
- 12) NRC(Nutritional Research Council). Recommended dietary allowances 9th ed National Academy Press, 1989
- 13) Cho SH, Im JG, Choi YS. Periodic changes in vitamin E, A and glutathione status in rats fed fish oil diet with different levels of vitamin E. *Korean J Nutr* 25(7) : 586-596, 1992
- 14) Kim YK, Joo KJ. EPA, DHA and tocopherols contents in fish oil products and fishes. *J Korean Soc Food Nutr* 23(1) : 68-72, 1994
- 15) Hwang HJ, Chung EJ, Lee JH, Chee KM, Lee YC. Effects of ω 3 and ω 6 polyunsaturated fatty acid diets on fatty acid composition and vitamin E levels in milk and serum of the rat. *Korean J Nutrition* 27(2) : 141-152, 1994
- 16) Krasavage WJ, Terhaar CJ. D-alpha tocopheryl poly(ethylene glycol) 1000 succinate, acute toxicity, subchronic feeding, reproduction and teratologic studies in the rat. *J Agric Food Chem* 25 : 273-278, 1977
- 17) Ito N, Imaida K, Hasengawa R, Tsuda H. Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. *CRC Critical Review in Toxicology* 19(4), 1989
- 18) 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
- 19) Misra HP, Fridovich I. Superoxide dismutase : A photochemical augmentation assay. *Arch Biochem Biophys* 181 : 308, 1977
- 20) Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105 : 121-126, 1984
- 21) Carlberg I, Mannervick B. Glutathione reductase. *Meth-*

- ods in Enzymology* 113 : 484-499, 1985
- 22) Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Method enzymology* 52 : 506-513, 1978
 - 23) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 249 : 7130-7139, 1974
 - 24) Baginski ES, Foa PP, Zak B. Glucose 6-phosphatase. *Method of Enzymatic Analysis* 2 : 876-880, 1983
 - 25) Vaca CE, Harms-Ringdahl M. Lipid peroxidation on the rat liver S9 fraction : Influence of membrane lipid composition. *Mutation Res* 162 : 21-32, 1986
 - 26) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
 - 27) Kim KT, Park SC, Choi H. Induction of hepatomegaly and peroxisome activities by fish oil. *Korean J of Lipidology* 5(2) : 131-139, 1995
 - 28) Kvannes J, Ekihom TS, Flatmark T. On the mechanism of stimulation of peroxisomal β -oxidation in rat heart by partially hydrogenated fish oil. *BBA* 1255 : 39-49, 1995
 - 29) Chen H, Huang C, Wilson MW, Lay LT, Robertson LW, Chow CK, Glauert HP. Effect of peroxisome proliferators ciprofibrate and perfluorodecanoic acid on hepatic cell proliferation and toxicity in Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 15 : 2847-2850, 1994
 - 30) Ashby J, Brady A, Elcombe CR, Elliot BM, Ishmael J, Odum J, Tugwood JD, Kettle S, Purchase IFH. Mechanistically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator induced hepatocarcinogenesis. *Human & Experimental Toxicology* 13(S2) : S1-S117, 1995
 - 31) L'Abbe MR, Trick KD, Bearerogers JL. Dietary(n-3) fatty acids affect rat heart, liver and aorta protective enzyme activities and lipid peroxidation. *J Nutr* 121 : 1331-1340, 1991
 - 32) Solanki V, Rana RS, Slaga TJ. Diminution of mouse epidermal superoxide dismutase and catalase activities by tumor promoters. *Carcinogenesis* 2 : 1141-1146, 1981
 - 33) Kinsella AR, Gainer HSC, Bulter J. Investigation of a possible role for superoxide anion production in tumor promotion. *Carcinogenesis* 4 : 717-719, 1983
 - 34) Gonzalez MJ, Schemmel RA, Gray JI, Dugan L, Sheffield LS, Welsch CW. Effect of dietary fat on growth of MCF-7 and MDA-NB231 human breast carcinomas in athymic nude mice : Relationship between carcinoma growth and lipid peroxidation product levels. *Carcinogenesis* 12 : 1231-1235, 1991
 - 35) Kawase T, Kato S, Lieber GS. Lipid peroxidation and antioxidant defense system on rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology* 10 : 815-821, 1989
 - 36) Lucy R, Wills ED. The effect of dietary lipids and vitamin E on lipid peroxide formation, cytochrome P-450 and oxidative demethylation in the endoplasmic reticulum. *Biochem Pathol* 25 : 175-179, 1979
 - 37) Slaga TJ, Klein-Szanto AJP, Triplett LL, Yotti LP, Troko JE. Skin tumor-promoting activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical-generating compound. *Science* 213 : 1023-1025, 1981
 - 38) Bull AW, Soullier BK, Wilson PS, Hayden MT, Nigro ND. Promotion of azoxymethane-induced intestinal cancer by high-fat diet in rats. *Cancer Res* 39 : 4956-4956, 1979