

식이 단백질의 종류 및 Inositol Hexaphosphate가 간세포 암화과정에서 전암성 병변의 지표 및 항산화 효소계에 미치는 영향*

김 현 덕[†] · 최 혜 미^{**}

서울대학교 생활과학대학 식품영양학과, ** 전주기전여자대학 식품영양과

Effects of Dietary Proteins and Inositol Hexaphosphate on the Preneoplastic Lesions and Antioxidant Enzymes of Hepatocellular Carcinogenesis in Rats

Hyeon Duck Kim,[†] Haymie Choi^{**}

Department of Food and Nutrition, ** Seoul National University, Seoul, Korea
Department of Food and Nutrition, Chunju Kijeon Women's Junior College, Chunju, Korea

ABSTRACT

Six-week-old Sprague Dawley rats were fed the diets of 20% casein or soy protein. Two weeks after the feeding, hepatocellular chemical carcinogenesis was initiated by diethylnitrosamine(DEN), and promoted by the diet containing 0.01% 2-acetylaminofluorene(AAF) and two-thirds partial hepatectomy(PH). The animals were sacrificed at 8 weeks after the DEN injection. The area of placental glutathione S-transferase(GST-P) positive foci, the activities of several enzymes in cellular antioxidant enzyme systems and glucose 6-phosphatase were determined to investigate the mechanism of the anticarcinogenic effect by the dietary proteins. In another set of experiments, the drinking water of rats fed casein was supplemented with 1.5% inositol hexaphosphate (InsP₆) to elucidate whether it has the comparable anticancer action of soy protein. The area and number of GST-P positive foci in the soy protein group were significantly ($p < 0.05$) lower than those in the casein group. The livers of rats fed casein showed moderate fatty degeneration and larger hyperplastic nodules than those of rats fed soy protein. In another set of experiments, the area and number of GST-P positive foci in the rats fed casein supplemented with InsP₆ were not significantly different from those in the rats fed casein or soy protein. The lipid peroxidation of rats fed different protein sources showed no significant difference. Glutathione S-transferase(GST) activities were increased significantly ($p < 0.05$) by carcinogen treatment in all dietary groups. Glucose 6-phosphatase(G6Pase) activities were decreased by carcinogen treatment, and hence showed a reverse relationship ($r = -0.695$, $p < 0.01$) to the GST-P positive foci. Therefore, the activities in the rats fed casein were lower than those in the rats fed soy protein. These results suggest that the soy protein seems to be more anti-carcinogenic than casein by decreasing the preneoplastic lesion and by increasing the membrane stability but inositol hexaphosphate, a component of soy protein, may not be protective against hepatocarcinogenesis. (Korean J Community Nutrition 4(2) : 239~247, 1999)

KEY WORDS : placental glutathione S-transferase positive foci · lipid peroxidation · glucose 6-phosphatase · glutathione S-transferase · inositol hexaphosphate.

서론

최근 과학이 발달함에 따라 환경적 요인에 의한 인체의 발암이 80~90%에 이르렀으며(Willet & MacMahon 1984)

그 중 30~40%가 식품에 의한 것으로 추정되고 있다. 예를 들면 역학조사 및 동물실험에서 식이 지방의 종류와 양에 따라 발암정도가 달리 나타나며, 동물성 단백질과 붉은색 고기가 폐경기전 여성의 유방암 발생을 증가시켰으나, 콩 단백질 및 콩제품들의 섭취 증가와 더불어 위험도가 감소되

*본 연구는 1997년도 학술진흥재단 연구기반 조성비의 지원(자유공모과제)으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

[†]Corresponding author : Hyeon Duck Kim, Department of Food and Nutrition, Chunju Kijeon Women's Junior College, #177-1 Chunghwasan-dong, Chunju 560-701, Korea Tel : 0652) 280-5215, Fax : 0652) 231-6412, E-mail : hdkim@kns.kijeon-c.ac.kr

었다고 한다(Lee 등 1991). 특히 콩 및 콩제품들은 *in vitro* 및 *in vivo* 실험 중 65%가 항암효과를 나타내었다고 보고하였다(Messina 등 1994). 대두식품들은 동양권식이의 중요한 부분을 차지하고 있으며, 특히 한국이나 일본의 경우 1인당 총 섭취 단백질의 10%이상을 차지하고 있고(Wang 등 1983), 크게 발효식품(된장, 간장등) 과 비발효 식품(두부, 두유, 콩단백 농축제, 콩가루등)으로 나눌 수 있다. 콩제품의 성분 중에서 genistein, didzeine 등의 isoflavones, Bowman Birk inhibitor(BBI) 등의 protease inhibitor(Kennedy 1995), saponin(Rao & Sung 1995) 및 inositol hexaphosphate(Shamsuddin 1995) 등이 여러 조직에서 암의 억제와 관련이 있는 것으로 보여진다.

Inositol hexaphosphate(phytic acid, InsP₆)는 식물에서 발견되며, 주로 두류나 곡류에 상당량(0.4~6.4%)이 함유되어 있으며 1가 또는 2가 양이온들과 염의 형태로서 존재한다. 또한 완숙한 대두에는 2.58 %까지 함유되어 있고 가공에 의해 손실된다(Harland & Oberleas 1987). InsP₆는 발아하는 종자에 있어 인의 주요 저장형태이며, 최근에는 2가 양이온들과 배위결합을 형성할 수 있는 성질 때문에 항산화적인 기능을 할 수 있다는 데 흥미를 끌고 있다(Rao 등 1991). 현대사회가 점점 육류 또는 감자류의 섭취 형태(meat-and potato-type diet)에서 섬유소와 InsP₆가 많은 식물성 식이로 전환해가고 이와 더불어 대두를 이용하여 절감, 냄새 뿐 아니라 육류와 같은 맛이 나는 식품의 제조가 증가하기 때문에 InsP₆ 에 새로운 흥미를 가질 수 있을 것이다. 한편 Shamsuddin은 대장암, 유방암등에서 InsP₆의 항암효과를 보고하였으며, 치료제로서의 가능성도 제시한바 있으나(Shamsuddin 1995), 그 외의 장기에선 많은 연구가 되어있지않고 이들 조직에서도 그 기전을 이해하고 세포내 기능을 알기위해 더 많은 연구를 필요로 하는 실정이다.

간은 많은 약물 및 발암물질과 steroid성 호르몬등 외부 물질이 활성화 또는 해독되는 장소이므로 식이 보충인자가 약물대사나 해독과정에 미치는 영향을 연구하는데 적합한 장기이다. 또한 여러 영양소 및 식물성미량원소(phytochemicals)들이 가지는 항암기전의 하나로서 약물대사효소계 및 항산화효소계에 미치는 영향에 관한 연구도 많이 진행되고 있다.

Ito모델은 강력한 간세포암 개시물질인 diethylnitrosamine(DEN), 강력한 성장억제물질인 2-acetylaminofluorene(AAF)와 성장 촉진 자극인 70% 부분 간절제수술(partial hepatectomy, PH)등으로 이루어져있으며(Ito 등 1988), 실험기간이 8주로 짧으나 장기간의 실험결과와 일치하여 화학 물질의 발암성 유무를 검색하는데 매우 유용한

방법으로 인정되고 있다(Ogiso 등 1985). 한편, glutathione-S-transferase(GST)의 산성 동종효소인 태반형 GST(GST-P)는 쥐의 화학적 간 세포암 유도과정에서 정상 간 조직에서는 발현되지 않고 간 세포암의 전암성 병소에서 현저히 높게 발현되는 것으로 알려져 전암성 병소의 지표로서 유용하게 쓰여지고 있다(Rushmore 등 1987).

본 실험은 Ito 모델을 이용한 간세포암화과정에서 대두단백질 및 그 성분 중의 하나인 inositol hexaphosphate가 전암성 병변의 지표인 GST-P에 미치는 영향을 살펴보고 그 기전으로서 약물대사효소 및 항산화효소계에 미치는 영향을 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 사육환경

6주령의 수컷 Sprague-Dawley 랫드(180~210g)를 공급받아(화학연구소, 대전) 실험에 사용하였다. 실험식은 식이 단백질의 급원을 달리하여 제조한 분말사료를, 물은 상수도물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 동물은 온도 20±1℃, 상대습도 55±1%, 조명시간 12시간(7:00~19:00)으로 설정된 실험실에서, 자동 세척이 이루어지는 위 및 아래가 철망인 cage에서 사육되었다. 식이 섭취량은 이틀에 한번 측정하였고, 체중은 1주일에 한 번씩 측정하였다.

2. 실험설계 및 실험식이의 조성

실험 I에서는 단백질의 급원이 간 암화과정에서 전암성 병변의 지표인 GST-P 양성병소 및 그 기전으로서 항산화효소계에 미치는 영향에 관하여 알아보았고, 실험 II에서는 soy protein의 한 성분인 inositol hexaphosphate가 항암작용에 관여하는지를 GST-P 양성병소의 형성 정도를 관찰하여 알아보았다.

실험 I에서는 단백질의 급원으로 casein과 soy protein군으로 나누고 이를 다시 대조군과 발암원처리군으로 6~10마리씩 나누었으며, 발암원 처리군에는 식이 섭취 후 2주째 강력한 개시제인 diethylnitrosamine(DEN)을 생리적 식염수에 녹여 몸무게(kg)당 200mg 수준으로 복강에 주사하였다. 2주 후에, 각 식이에 0.01%수준으로 2-acetylaminofluorene(AAF)을 섞어 1주 동안 먹이고 중앙엽과 좌측엽을 절제하는 70% 부분 간 절제수술(partial hepatectomy)을 시행하였다. 이 후 계속하여 AAF를 혼합한 식이로 1주간을 더 사육하고 4주간은 실험식이만을 먹인 후 DEN투여 후 8주째 희생시켰다. 대조군은 DEN 대신 생리식염수를 같은 수준으로 복강주사였고, 70% 부분 간 절제

수술 대신 가상 수술(sham operation)을 실시하였다. 실험 II는 casein, casein +1.5% inositol hexaphosphate(수용액, pH 7.4), soy protein 3군으로 나누었고, 모든군에 발암원을 처리하였다. 실험설계는 Fig. 1에 나타내었다.

실험식이의 조성은 Table 1에 따랐다. 식이 단백질은 식이의 20% 수준으로 계산하여 공급하였고, 모든 실험 식이는 2~3주일 단위로 제조하였고, 제조 즉시 질소로 충전시켜 밀봉하고 냉동고에 보관하였다가 공급하였으며, 1.5%

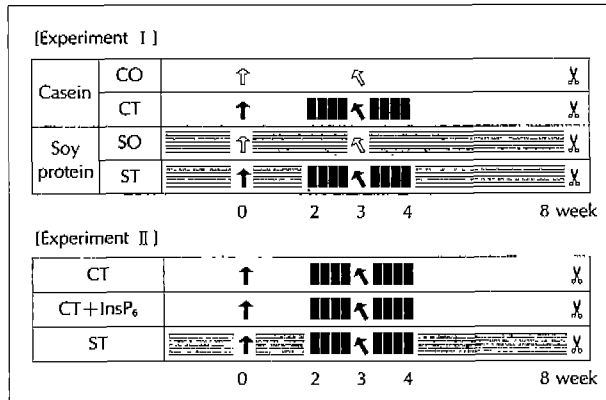


Fig. 1. Designs for Experiment I & II. In experiment I, six week-old Sprague Dawley rats were fed casein(□) or soy protein(■) diets and were treated with saline(↑) and sham operation(✂) or with diethylnitrosamine(200mg DEN/kg body weight ; ↑) followed by 2-acetylaminofluorene(diet plus 0.01% AAF ; ■) and partial hepatectomy(✂), and sacrificed(↓) at 8 weeks after DEN injection. In experiment II, the rats were fed casein, casein plus 1.5% inositol hexaphosphate(InsP₆) in drinking water, or soy protein diets.

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

Group component	Casein	Soy protein
Corn starch	52.5	52.95
Casein	22.2	-
Soy protein isolate	-	21.74
Corn oil	15.0	15.0
α-Cellulose	5.0	5.0
Vitamin mixture*	1.0	1.0
Salt mixture**	4.0	4.0
DL-Methionine	0.3	0.3

*Nutritional Biochemicals, ICN Life Science Group, Cleveland, Ohio. Vitamin mixture is composed of : Vit. A(500,000IU/g) 1.8g, Vit. D conc.(850,000IU/g) 0.125g, α-Tocopherol(250IU/g) 22.0g, Ascorbic acid 45.0g, Inositol 5.9g, Choline chloride 75.0g, Menadione 2.25g, p-Aminobenzolic acid 5.0g, Niacin 4.25g, Riboflavin 1.0g, Pyridoxine hydrochloride 1.0g, Calcium pantothenic acid 3.0g, Biotin 0.02g, Folic acid 0.09g, Vit. B₁₂ 0.00135g, and Dextrose to 1kg.

**Composition of salt mixture, g/kg mixture : CaHPO₄ 500g, NaCl 74g, K₂SO₄ 52g, Potassium citrate monohydrate 220g, MgO 240g, Magnanase carbonate(43-48% Mn) 3.5g, Ferric citrate(16-17% Cu) 0.3 g, KIO₃ 0.01g, Chromium potassium sulfate 0.55g, Na₂SeO₃ · 5H₂O 0.01g, finely powdered Sucrose 118.0g

inositol hexaphosphate 수용액은 2~3일 간격으로 제조하여 냉장보관 하였다가 물 대신 제공하였다.

Casein(약 90% protein), α-cellulose, DL-methionine, Na-inositol hexaphosphate은 Sigma 제품을, soy protein isolate(약 92% protein), vitamin mixture, salt mixture는 ICN제품을, 옥수수유는 (주)롯데삼강에서 single-batch type을 받아 사용하였다.

3. 시료의 수집 및 전처리

실험동물을 단두하여 희생시킨 후, 즉시 개복해서 간을 적출하였다. 적출된 간은 차가운 식염수로 세척하고 혈액, 지방질 및 결체 조직을 제거한 다음, 여과지로 여분의 수분을 제거하고 전체 간무게를 측정하였다.

또한 간의 중앙엽과 좌측엽으로 부터 각각 2~3mm 두께의 조직편을 2회 채취하여, 조직학적 및 면역조직학적 검사를 위해서 냉아세톤에 2주동안 고정시켰다.

시료 분획을 위해서는 약 7g 무게의 간을 떼어 내어, 잘게 다진 후 차가운 균질용 용액(154mM KCl, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA buffer, pH 7.4) 약 25ml를 넣고 균질화한 다음, 4°C, 12,000×g에서 20분간 원심분리하였다. 윗부분의 세포 조각들(cell debris)과 지방층이 섞이지 않도록 조심스럽게 상층액을 취하여, 4°C, 105,000×g 에서 60분간 다시 원심분리하여 세포질 분획(상층액)과 microsomal fraction(pellet)으로 분리하였다. 세포질과 7ml의 차가운 균질용액으로 부유시킨 microsomal fraction은 몇 개의 에펜도르프 튜브에 나누어 담아 액체질소로 급속 냉동시킨 다음 -70°C에서 보관하였다가 분석에 사용하였다.

4. 조직학적 검사

냉아세톤에 고정시킨 시료를 xylene으로 투명화하고, 파라핀에 포매한 후 4~5μm 두께로 절편하였다. 일반적인 조직 처리 방법에 따라 xylene으로 paraffin을 제거하고 농도 하강순의 단계적 알콜함수과정을 거쳐 조직을 수화시킨 다음, 10분간 흐르는 물로 세척하였다. 이것을 Harris-hematoxylin에 담구었다가 흐르는 물로 헹구고, 다시 1% HCl alcohol 용액에 침적한 다음 즉시 수돗물로 헹군 후 eosin 용액에 1~2분간 염색하였다. 이후 70, 80, 90, 100% 순의 알코올로 탈수시키고, xylene으로 투명화한 다음 canada balsam으로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

5. 면역조직학적검사(태반형 Glutathione S-transferase)

간 조직내의 태반형 glutathione S-transferase(GST-P) 양성 병소의 분포를 확인하기 위해 avidin biotin peroxidase complex(ABC)법을 이용하여 면역조직화학적

염색을 하였다(Ogiso 등 1985).

Xylene으로 paraffin을 녹여내고 농도하강순의 단계적 알코올함수과정을 거쳐 조직을 수화시킨 다음 증류수와 0.01 M phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 세척하였다. 비특이적 반응을 줄이기 위해 moisture chamber내에서 정상 산양 혈청을(0.01M PBS에 1 : 5로 희석, pH 7.4) 처리하였다. 과잉의 수분을 제거한 후, 1차 항체인 rabbit anti-GST-P antibody(Medical & Biological Laboratories Co. Ltd., Japan)를 0.01M PBS에 1 : 2500으로 희석하여 사용하였고, H₂O₂-methanol 혼합액을 처리하여 내재성 과산화효소의 활성을 제거하고 0.01M PBS로 세척하였다. 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG와 avidin-biotin-peroxidase-complex(Vectastain Elite ABC kit, Vecta Laboratories, Inc., U.S.A.)순으로 moisture chamber에서 반응시켰다. Diaminobenzidine(DAB) 용액(0.22% w/v, 0.2M Tris buffer, pH 7.6)에 H₂O₂를 첨가하여 정색반응을 일으키고 harris hematoxylin으로 대조염색을 하였다. 다시 일반적인 탈수과정을 거치고 xylene으로 투명화하였고, canada balsam으로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. GST-P양성 병소의 수와 면적은 직경이 0.2mm이상인 것만을 칼라 화상분석기(Image pro)를 이용하여 측정하였으며, 간 단위 면적 cm²당 수와 면적(mm²)으로 표시하여 비교하였다.

6. 생화학적 검사

1) 간세포의 Cytochrome p-450 함량 측정

Omura & Sato(1964) 및 Guengerich(1994)의 방법에 따라 신선한 간 microsome 분획을 10mM phosphate buffer(pH 7.4)로 희석하여 약 1mg/ml의 단백질농도로 만든 다음, 몇 mg의 sodium dithionite를 넣은 후 이것을 CO gas로 bubbling 하여 reduced carbon monoxide complex를 450nm와 490nm에서 측정하였다.

2) 간 세포체의 Glucose 6-phosphatase 활성도 측정

Baginski 등(1983)의 방법에 따라 간 microsomal fraction에서 glucose 6-phosphatase(G6Pase) 활성도를 측정하였다. 0.1ml의 sucrose/EDTA용액(0.25M/lmM), 0.1ml의 glucose 6-phosphate(0.1M), 0.1ml의 cacodylate buffer(0.1M, pH 6.5)를 차례로 섞은 후, 적당히 희석시킨 microsomal suspension을 0.1ml 넣고 37℃ 수조에서 정확히 8분간 활성화시켰다. Ascorbic acid/trichloroacetic acid 용액(2%/10% w/v) 2.0ml를 첨가하여 3,000×g에서 3분간 원심분리한 후 상층액 1.0ml에 am-

monium molybdate(1.0% w/v) 0.5ml과 arsenite/citrate 용액(each 2% w/v) 1.0ml을 차례로 첨가하여 15분간 방치한 다음 700nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

3) 간 소포체에서의 지질과산화물 함량 측정

Buege & Aust (1978)의 방법에 따라 간 소포체의 지질과산화물 함량을 측정하였다. 0.1~0.2mg/ml의 protein을 함유한 microsomal suspension을 1.0ml취하여 2.0ml TCA-TBA-HCl reagent(15% w/v trichloroacetic acid, 0.375% w/v thiobarbituric acid, 0.25N hydrochloric acid)와 잘 섞은 후 15분간 끓는 수조에서 반응시켰다. 상온으로 식힌 후 1,000×g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 535nm에서 흡광도를 측정하였고, $1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 의 분자흡광계수를 사용하여 지질과산화물의 함량을 계산하였다.

4) 간 세포질의 Glutathione S-transferase 활성도 측정

1-Chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)와 환원형 glutathione(GSH)을 기질로 사용하는 Habig 등(1974)의 방법에 따라 세포질의 glutathione S-transferase(GST)의 활성도를 측정하였다. Assay mixture 내에서 potassium phosphate buffer(pH 6.5), GSH, CDNB의 농도가 각각 0.1M, 1.0mM, 1.0mM이 되고 시료의 단백질 농도가 5~6µg/ml이 되도록 하여 25℃, 340nm에서 1분간 흡광도 변화를 측정하였고, 이때 흡광도 변화가 분당 0.05이하가 되도록 하였다. GST의 활성도는 CDNB의 분자흡광계수 9.6 mM⁻¹cm⁻¹를 사용하여 계산하였고 mg protein당 1분 동안 conjugate되는 CDNB의 nmole수로 표시하였다.

5) 간 세포질의 Glutathione reductase(GR) 활성도 측정

Carlberg & Mannervik(1985)의 방법을 이용하여 측정하였다. EDTA/potassium phosphate buffer(2mM/0.2M, pH 7.0) 0.5ml, 2mM NADPH(in 10mM Tris-HCl(pH 7.0)) 50µl, 20mM GSSG 50µl, 2차 증류수 0.3 ml을 1ml cuvette에 넣은 후 30℃에서 시료를 첨가하여 반응을 시작시키고, NADPH의 흡광도가 감소하는 속도를 340nm에서 측정하였다.

6) 간 세포질의 Total glutathione peroxidase(GPx) 활성도 측정

Tappel(1978)의 방법으로 기질은 cumene hydroperoxide를 사용하여 GR과 NADPH에 의해 GSH로 환원될 때 NADPH가 NADP⁺로 산화되는 정도를 340nm에서 NADPH의 분자 흡광계수 6.22mM⁻¹cm⁻¹이용하여 측정

Table 2. The relative liver weights, lipid peroxide contents, and cytochrome p 450 contents of rats fed casein or soy protein in hepatocellular carcinogenesis

Group	Relative liver weight(Liver wt/Body wt(%))	TBARS(nmole/mg protein)	Cytochrome P ₄₅₀ (nmole/mg protein)
CO	2.59±0.05 ^a	0.69±0.03 ^{ns}	0.58±0.04 ^{ns}
CT	2.47±0.06 ^{ab}	0.72±0.10	0.57±0.03
SO	2.28±0.04 ^b	0.69±0.02	0.57±0.06
ST	2.36±0.08 ^b	0.72±0.06	0.63±0.03

Six-week-old Sprague Dawley rats were fed casein(CO, CT) or soy protein(SO, ST) diets for 10 weeks. The rats were treated with saline and sham operation(CO, SO) or with DEN followed by AAF and partial hepatectomy(CT, ST), and were sacrificed at 8 weeks after DEN injection. Values are mean±SE and values with the different superscript within the same column(a, b) are significantly different and "ns" is not significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

하였다. Total GPx의 활성도는 mg protein당 1분 동안 산화되는 NADPH의 nmole 수로 표시하였다.

7) 단백질 함량 측정

Cytosol과 microsome의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry 등(1951)의 방법을 이용하여 측정하였다.

8) 통계처리

실험 결과는 SPSS win95용 version 7.5를 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준편차를 구하였고 p<0.05 수준에서 ANOVA test 후 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 간의 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

체중에 대한 상대적 간 무게는 단백질 급원간의 차이를 보이지 않았다(Table 2). H & E로 간세포를 염색하여 지방변성 및 증식성 결절(hyperplastic nodule)의 형성을 관찰하여보았다. 대조군에서는 조직학적 병변을 관찰할 수 없었으며, 발암원을 처리했을 때 casein군에서는 증등도의 지방변성이 나타났으나 soy protein군에서는 거의 지방변성이 나타나지 않았다. 또한 soy protein군은 증식성결절이 매우 작았으나 casein 군에서는 이웃세포들이 잠식된 커다란 증식성 결절들이 나타났다. 대체적으로 간세포의 암화과정에서 간세포의 지방변성이 일어나고 이에 따라 간세포의 괴사가 초래되어 이를 보상하기위한 활발한 세포분열이 유도되는데, 이때 괴사된 세포 이상으로 세포분열이 발생하면 간세포의 증식이 초래된다고 한다. 태반형 Glutathione S-transferase(GST-P)는 쥐의 정상 간조직에서는 발현되지않고 간세포 암화과정 중 전암성병변에서 현저히 발현되어 간세포암화과정의 지표로 이용되고 있다(Sato 1988). 또한 GST-P의 발현은 발암물질, 항암제와 같은 약물의 유입에 저항성을 갖게한다고 알려져있다(Burt 등 1988 ; Sato 1988). 본 실험 I에서 대조군의 경우 GST-P

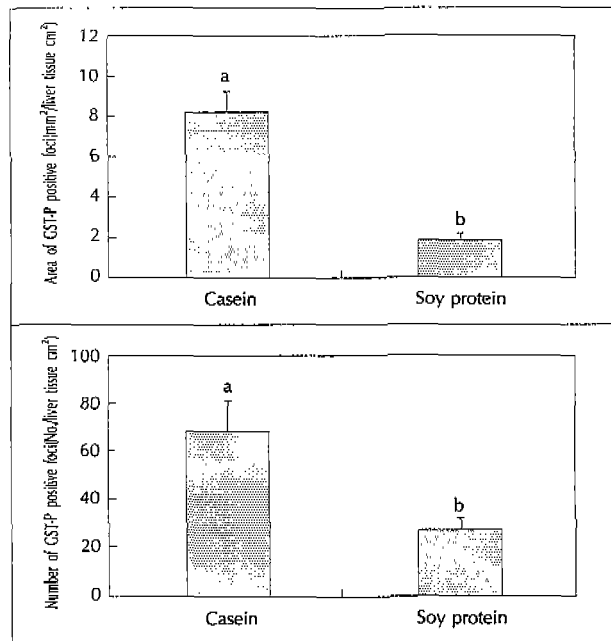


Fig. 2. The area and number of placental glutathione S-transferase positive(GST-P⁺) foci in the rats fed casein or soy protein. The rats were treated with DEN followed by AAF and partial hepatectomy. None of the rats treated with saline and sham operation developed GST-P⁺ foci. Values are mean±S.E. and means with the different letter(a, b) are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

양성증식성 결절이 관찰되지 않았으며, 발암원처리를 했을 때는 casein군이 soy protein 군보다 그 수와 면적에 있어 유의적(p<0.05)으로 높은 것을 볼 수 있었다(Fig. 2). 따라서 간세포 암화과정에서 soy protein을 섭취시킬 때 전 암성병변으로의 진행이 늦어질 것으로 생각되어진다. 이는 대장, 유방, 췌장등의 장기에서도 비슷한 결과를 보였으며, 콩 속의 아미노산 조성, isoflavones, Bowman birk inhibitor, inositol hexaphosphate등의 물질에서 기인 하는 것이라고 보고 되어졌다(Messina 등 1994). 따라서 본 실험II에서는 casein에 콩의 한 성분인 inositol hexaphosphate를 첨가하여 GST-P의 양성증식성결절의 수 및 면적을 관찰하여 본 결과 casein군과 유의적인 차이가 없이 전

Table 3. The glutathione S-transferase, glutathione reductase, and glutathione peroxidase activities of rats fed casein or soy protein in hepatocellular carcinogenesis

Group	Glutathione S-transferase (nmole CDNB conjugated/min/mg protein)	Glutathione reductase (nmole NADPH oxidized/min/mg proein)	Glutathione peroxidase (nmole NADPH oxidized/min/mg protein)
CO	489.43±57.02 ^b	41.53±1.86 ^{ab}	170.25±11.15 ^a
CT	623.80±78.04 ^{ab}	45.02±1.24 ^a	173.12± 7.40 ^a
SO	562.56±57.50 ^b	37.57±1.27 ^b	140.46± 9.03 ^b
ST	755.84±57.27 ^a	42.12±2.01 ^{ab}	159.49± 6.74 ^{ab}

Six-week-old Sprague Dawley rats were fed casein(CO, CT) or soy protein(SO, ST) diets for 10 weeks. The rats were treated with saline and sham operation(CO, SO) or with DEN followed by AAF and partial hepatectomy(CT, ST), and were sacrificed at 8 weeks after DEN injection. Values are mean±SE and values with the different superscript within the same column(a, b) are significantly different and "ns" is not significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 4. The area and number of placental glutathione S-transferase positive(GST-P⁺) foci of the rats fed casein, casein+inositol hexaphosphate, or soy protein in hepatocarcinogenesis

Group	Area (mm ² /liver tissue cm ²)	Number (No./liver tissue cm ²)
CT	8.25±1.38 ^a	77.16±9.79 ^a
CT+InsP ₆	11.90±4.4 ^a	50.24±7.76 ^{ab}
ST	1.85±0.3 ^b	26.72±4.47 ^b

Six-week-old Sprague Dawley rats were fed casein(CT), casein+1.5% inositol hexaphosphate(CT+InsP₆) or soy protein(ST) diets for 10 weeks. The rats were treated with DEN followed by AAF and partial hepatectomy. Values are mean±S.E. and means with the different letter(a, b) are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test

암성병변이 큰 것을 알 수 있었다(Table 4). Shamsuddin(Shamsuddin, 1995)은 대장, 유방등에서 inositol hexaphosphate가 항암효과가 있음을 보고하였고, 이를 항암 치료제로서의 개발을 제안하였다. 그러나 본 실험의 결과에서 보면 뚜렷한 독성은 보이지 않으나 부분적으로 간 전암성병변을 더욱 진행시킬 수 있다는 위험성을 배제 할 수 없으므로 더욱 더 많은 실험이 행해져야 한다고 생각한다.

발암물질의 대사에 관여하는 cytochrome P-450의 함량은 연령, 발암물질의 종류 및 투여 후 기간, 간의 손상정도 및 막의 구조 변화등에 의해서도 영향을 받을 수 있다고 한다. 그러나 본 실험의 결과에서 cytochrome P-450 함량은 대조군과 발암원 처리군간의 차이가 없었다(Table 2). 이러한 결과는 발암물질의 투여에 따라 유도되었으나 시간이 경과함에 따라 cytochrome P-450의 변화가 극복되었을 것으로 추측되어지며, 한편으로는 총 양의 변화보다는 cytochrome p-450의 isozymes들의 유도가 달리 일어날 수도 있을 것으로 보여 이 부분의 연구가 더 이루어져야 할 것으로 보인다.

암, 동맥경화, 노화등의 원인이 되기도 하는 지질과산화반응은 세포손상 기작의 하나로 생각되어지고 있다(Hallwell 등 1992; Horton & Fairhust 1987; Kensler & Trush 1984). 본 실험에서는 지질과산화물의 함량이 대조

군과 발암원처리군 사이에 차이가 없었으며, 단백질의 급원에 따라서도 차이가 나지 않았다(Table 2).

본 실험에서 종양세포의 형성은 관찰할 수 없었으나 여러 연구에서(Dodd & Swartz 1984; Lankin 등 1979; P-layer 1982) 종양세포에서 지질과산화물이 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, 지질과산화물이 감소하는 것은 종양부위의 산소결핍, 총인지질과 특정 과불포화지방산의 함량저하로 인한 지질과산화물의 기질부족, 지질과산화의 원인이 되는 NADPH-의존성 지질과산화반응의 감소(Lankin 등 1979; Player 1982). 종양세포내의 효소체계의 변화로 인한 저항성 획득(Burt 등 1988; Sato 1988)등을 들 수 있다. 본 실험에서도 GST-P를 비롯한 GST족 효소활성도의 증가로, 특히 GST-P는 Se-비의존성 peroxidase 활성도를 가지므로 (Ketterer 1988; Sato 1988), 증가된 GST-P가 지질과산화물을 효과적으로 처리하였기 때문에 발암원처리 시 대조군과 차이가 없는 것으로 추측되어지며, 이는 (서정민 1997; Choi 등 1996)등의 실험과 일치한다. 특히 Choi 등(1996)의 실험에선 tuna oil을 먹었을 때는 암화과정 초기에는 지질과산화물 함량이 증가하나 8주 또는 그 이상에서는 감소하여 대조군과 차이가 없는 것으로 보여져, 발암물질투여 후 또는 발암과정 중 어떤 시점에서 지질과산화물이 증가 또는 감소하여 발암과정에 영향을 주는지 더 많은 연구가 필요하리라고 생각된다.

간 cytosol 분획의 glutathione S-transferase(GST), glutathione reductase(GR), glutathione peroxidase(GPx)의 활성도를 측정한 결과는 Table 3에 나타내었다. GST는 soy protein 군에서 대조군에 비하여 발암원처리군에서 유의적(p<0.05)으로 높았으나 단백질급원에 따른 유의적 차이는 보이지 않았다. GST는 1단계 약물대사효소계에서 활성화된 친전자성 물질에 glutathione을 conjugation 시켜 수용성물질로 배설시키는데 관여하는 효소로서, 발암물질의 투여에 의한 발암과정에서도 활성도가 증가된다고 보고되었으며(곽충실·최혜미 1992; 김경민·최혜

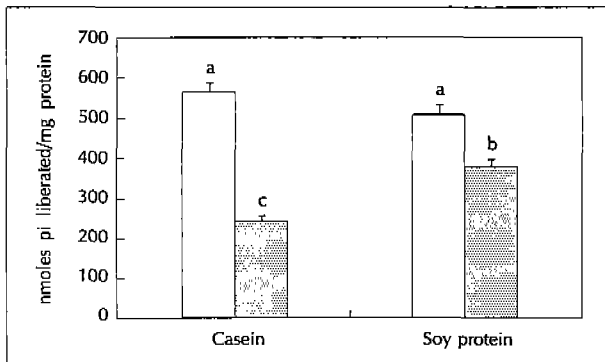


Fig. 3. Glucose 6-phosphatase activities of rats fed casein or soy protein in hepatocarcinogenesis. Six-week-old Sprague Dawley rats were fed 20% casein or soy protein diets for 10 weeks. The rats were treated with saline and sham operation (□) or with DEN followed by AAF and partial hepatectomy (▨), and were sacrificed at 8 weeks after DEN injection. Values are mean \pm SE and means with the different letter (a, b, c) are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

미 1992; 김숙희 · 최혜미 1994; 김현아 · 최혜미 1990; Kitahara 등 1984), 본 실험에서도 증가되었다.

GR은 GPx에 의해 생성된 산화형 glutathione(GSSG)을 NADPH를 사용하여 환원형 glutathione(GSH)로 환원시키는 역할을 담당한다. 본 실험에서는 발암원을 처리하였을 때 약간 높아지는 경향을 보였으나 유의적이지 않았고, 단백질의 급원에 따른 차이도 보이지 않았다.

GPx는 대조군과 발암물질 투여군 사이에 유의적인 차이를 보이지 않아 발암물질 투여시 증가되었다는 보고(김현아 · 최혜미 1990; 유정순 등 1994) 및 감소되었다는 보고(Kitahara 등 1983)들과 일치하지 않으며, 대조군 및 발암원처리군 모두에서 soy protein을 섭취시켰을 때 유의적으로 감소된 것을 알 수 있었다.

Glucose 6-phosphatase(G6pase) 활성도는 대조군에 비하여 발암원처리시 유의적으로($p < 0.05$) 감소하였고, 발암원을 처리하였을 때는 casein군이 soy protein군보다 유의적으로($p < 0.05$) 감소하였다(Fig. 3). G6pase는 주로 간과 신장에 분포하고 있는 막부착 효소로서 탄수화물대사에 관계하는데 소포체막 안정도의 척도 및 전암성 병변으로의 전환을 의미하는 지표로도 고려되었다(Farber 1980). 또한 여러 연구에서 간 손상 및 간세포암화과정 동안 활성도가 감소한다고 알려져있으며(김숙희 · 최혜미 1994; Barginski 등 1983), 분화되는 세포나 양성증식성결절은 조면소포체를 많이 가지고 있으나 G6Pase같은 효소의 활성도가 낮다고 하였다. 반면 식이지방의 수준이 높을 경우 간 소포체 막의 불포화지방산이 과산화반응을 거치면서 생성된 지질과산화물에 의해 G6Pase가 불활성화된다는 보고들(Benedetti 등 1980; Horton & Fairhurst 1987)도 있다.

본 실험 I에서도 발암원처리시 GST-P양성증식성 결절과 증식소 면적이 낮을수록 G6Pase 활성도는 낮은 것으로 나타났다($r = -0.695, p < 0.01$). 간 소포체 분획의 지질과산화물 함량과 G6Pase활성도 사이의 유의적인 상관관계는 없었으므로, 발암원 투여에 의한 전암성 병소의 생성이 G6Pase의 활성을 낮추는 직접적인 원인으로 생각된다. 특히 soy protein군이 casein군보다 높은 활성도를 보여, 지질과산화반응에 의한 기전보다는 지방변성을 억제시키고 막의 안정도를 유지시킬 수 있는 soy protein의 다른 기전들에 관한 연구가 되어져야할 것으로 보인다.

요약 및 결론

본 연구에서는 단백질의 급원 및 soy protein의 한 성분인 inositol hexaphosphate가 화학적 발암원으로 유도된 랫드의 간세포암화과정에 미치는 영향을 알아보고자 간세포의 조직학적변화와 전암성병변의 지표인 GST-P 양성병소 형성정도를 살펴보고, soy protein의 함양기전으로서 glucose 6-phosphatase 및 항산화효소계를 측정하여 살펴 보았다. 간세포암의 유도모델은 개시제로 DEN을 촉진제로 AAF 및 70% 부분간절제수술을 실시하는 Ito 모델을 변형하여 사용하였다. 본 연구의 결론은 다음과 같다.

- 1) Casein군이 soy protein군보다 지방변성이 심하게 나타났으며, 더 크고 많은 증식성 결절이 나타났다.
 - 2) GST-P 양성병소의 수와 면적은 soy protein군이 casein군보다 유의적으로($p < 0.05$) 낮았으며, casein에 inositol hexaphosphate를 첨가하였을 때는 soy protein군 만큼 유의적으로 낮아지지 않았다.
 - 3) 지질과산화물의 함량은 단백질 급원에 따른 차이가 나지 않았다.
 - 4) Glutathione S-transferase 활성도는 soy protein군에서 대조군에 비해 발암원 처리군이 유의적으로($p < 0.05$) 높았으나, 단백질급원에 따른 차이는 나타나지 않았다. Glutathione peroxidase 활성도는 발암원처리 및 단백질 급원에 따른 차이를 보이지 않았으며, glutathione peroxidase 활성도는 soy protein군이 casein 군에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 낮았다.
 - 5) 간 소포체막의 안정도의 지표인 G6Pase는 GST-P와 음의 상관관계($r = -0.695, p < 0.01$)를 보였으며 soy protein 군이 casein 군보다 유의적으로($p < 0.05$) 높았다.
- 이상의 결과로서 간세포암화과정에서 soy protein이 casein보다 암화억제기능이 큰 것으로 보여지나, 그 성분으로서 inositol hexaphosphate는 크게 영향을 미치지 않는 것

으로 보인다. 또한 soy protein의 암화억제기능은 항산화효소계를 통해서라기보다는 지방변성을 억제시키고 간세포막의 안정도를 증가시킴으로써 이루어질 수 있다고 추측되어진다.

참고문헌

- 곽충실 · 최혜미(1992) : 들기름, 옥수수기름의 섭취와 2-acetylaminofluorene투여가 지질과산화물 및 PGE₂, TXB₂생성에 미치는 영향. *한국영양학회지* 25 : 351-359
- 김경민 · 최혜미(1992) : 들깨유, 옥수수유의 섭취가 2-acetylaminofluorene을 투여한 쥐간의 소포체막의 지방산 조성과 cytochrome P-450함량, glutathione S-transferase에 미치는 영향. *한국영양학회지* 25 : 3-11
- 김숙희 · 최혜미(1994) : N-6, N-3 지방산과 비타민 E 보강식이 가 전암성병변에 미치는 영향. *한국생화학학회지* 27(2) : 125-131
- 김현아 · 최혜미(1990) : 2-Acetylaminofluorene과 choline결핍이 서로 다른 지방을 섭취한 쥐간의 지질과산화반응 및 glucose 6-phosphatase, glutathione S-transferase활성도에 미치는 영향. *한국영양학회지* 23 : 418-426
- 서정민(1997) : 식이 중 마늘의 섭취량이 쥐 간세포암화과정에서 전암성 병변과 glutathione 의존성해독화 효소계에 미치는 영향. 서울대학교 석사학위논문
- 유정순 · 김초일 · 장경자(1994) : 쥐에서 2-acetylaminofluorene의 투여시기에 따라 식이 지방이 간의 지질과산화물 대사 및 cytochrome P450함량에 미치는 영향. *한국영양학회지* 27(50) : 442-450
- Baginski ES, Foa PP, Zak B(1983) : Glucose 6-phosphatase. In : *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol 2 Bergmeyer ed, pp.876-880
- Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H(1980) : Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim Biophys Acta* 620 : 281-296
- Buege JA, Aust SD(1978) : In *Methods in enzymology*, Vol 52, Sidney F and Kester P(eds.), academic press, pp.302-310
- Burt RK, Garfield S, Johnson K, Thorgeirsson SS(1988) : Transformation of rat liver epithelial cells with V-H-ras or V-raf causes expression of MDR-1, glutathione S-transferase-P and increased resistance to cytotoxic chemicals. *Carcinogenesis* 9 : 2329-2332
- Carlberg I, Mannervik B(1985) : Glutathione reductase. In : *Methods in enzymology*. Vol 113, Academic press, New York, pp.484-490
- Choi H, Woo J, Kim KT(1996) : Effects of ω -3 fatty acids on the preneoplastic lesions and drug-metabolizing enzyme activities in hepatocarcinogenesis. American Oil Chemists Society, pp.633-643
- Dodd NJF, Swartz HM(1984) : The nature of ESR signal in lyophilized tissue and its relevance to malignancy. *Br J Cancer* 49 : 45-71
- Farber E(1980) : The sequential analysis of liver cancer induction. *Biochim Biophys Acta* 605 : 149-166
- Guengerich FP(1994) : Analysis and characterization of enzymes. Principles and methods of toxicology, 3rd ed, Raven Press, Ltd, New York
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB(1974) : Glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 249 : 7130-7139
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE(1992) : Free radicals, antioxidants and human disease : Where are we now? *J Lab Clin Med* 119 : 598-620
- Harland BF, Oberleas D(1987) : Phytate in foods. *Wld Rev Nutr Diet* 52 : 235-259
- Horton AA, Fairhurst S(1987) : Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *CRC Critical Rev Toxicol* 18 : 27-79
- Ito N, Tsuda H, Tatenatsu M, Inoue T, Tagawa Y, Aoki T, Uwagawa S, Kagawa M, Ogiso T, Masui T, Imaida K, Fukushima S, Asamoto M(1988) : Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats-an approach for a new medium term bioassay system. *Carcinogenesis* 9 : 387-394
- Kennedy AR(1995) : The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *J Nutr* 125 : 733S-744S
- Kensler TW, Trush AA(1984) : Role of oxygen radicals in tumor promotion. *Environ Mutagenesis* 6 : 593-616
- Ketterer B(1988) : Protective role of glutathione and glutathione S-transferase in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res* 202 : 343-361
- Kitahara A, Satoh K, Nishimura K, Ishikawa T, Ruike K, Sato K, Tsuda H, Ito N(1984) : Changes in molecular forms of rat hepatic glutathione S-transferase during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 44 : 2698-2703
- 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
- Lankin VZ, Polyakov VM, Aakhangel SAV, Gurevich SM(1979) : Metabolism of lipid peroxides during chemical carcinogenesis. *Bull Eksp Biol Med* 87 : 270-273
- Lee HP, Gourley L, Duffy SW, Esteve J, Lee J, Day NE(1991) : Dietary effect on breast cancer risk in singapore. *Lancet* 337 : 1197-1200
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ(1951) : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275
- Messina MJ, Persky VP, Setchell KDR, Barnes S(1994) : Soy intake and cancer risk : a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer* 21 : 113-131
- Ogiso T, Tatematsu M, Tamano S, Tsuda H, Ito N(1985) : Comparative effects of carcinogenesis on the induction of placental glutathione S-transferase positive foci liver nodules in a short-term assay and of hepatocellular carcinogenesis in a long-term assay. *Toxicol Pathol* 13 : 257-265
- Omura T, Sato R(1964) : The carbon monoxide-building pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* 239 : 2379-2388
- Player TJ(1982) : Lipid peroxidation in rat liver, hepatomas and regenerating liver. In : *Free Radicals, lipid peroxidation and cancer*. Ed McBrien DCH and Slater TF, Academic Press, pp. 173-195
- Rao AV, Sung MK(1995) : Saponins as Anticarcinogens. *J Nutr* 125 : 717S-724S
- Rao XK, Das DK, Weinstein GS, Tyras DH(1991) : Protection of is-

- chemic heart from reperfusion injury by myo-inositol hexaphosphate, a natural antioxidant. *Ann Thorac Surg* 52 : 908-912
- Rushmore TH, Sharma RNS, Roomi MW, Harris L, Satoh K, Sato K, Murray RK, Farber E(1987) : Identification of characteristic cytosolic polypeptide of rat preneoplastic hepatocyte nodules as placental glutathione S-transferase. *Biochem Biophys Res Commun* 143 : 98-103
- Sato K(1988) : Glutathione S-transferase and hepatocarcinogenesis. *Jpn J Cancer Res(Gann)* 79 : 556-572
- Shamsuddin AM(1995) : Inositol hexaphosphates have novel anticancer function. *J Nutr* 125 : 725S-732S
- Tappel AL(1978) : Glutathione peroxidase and hydroperoxides. In : *Methods in enzymology*. Vol 52. Academic press, New York, pp.506-513
- Wang MF, Kishi K, Takahashi T, Komatsu T, Ohnaka M Inoue G (1983) : Efficiency of utilization of soy protein isolate in Japanese young men. *J Nutr Sci Vitaminol* 29 : 201-216
- Willet WC, MacMahon B(1984) : Diet and cancer-an overview. *New Eng J Med* 310 : 633-638, 697-703