

식이성 Conjugated Linoleic Acid (CLA)가 유선암 세포(MCF-7)에서의 항암효과에 미치는 영향

문희정 · 이순재* · 박수정 · 장유진 · 이명숙†

성신여자대학교 식품영양학과

*대구가톨릭대학교 식품영양학과

Anticarcinogenic Responses of MCF-7 Breast Cancer Cells to Conjugated Linoleic Acid (CLA)

Heejung Moon, Soon-Jae Rhee*, Soojong Park, Eugene Chang and Myoungsook Lee†

Dept. of Food and Nutrition, Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Korea

*Dept. of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Gyungsan 712-702, Korea

Abstract

Conjugated linoleic acid (CLA) is the mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid (LA, C18:2 ω 6), which is found abundantly in dairy products and meats. This study was performed to investigate the anticarcinogenic effect of CLA in MCF-7 breast cancer cells. MCF-7 cell were treated with LA and CLA at the various concentrations of 15, 30, 60, 120 μ M each. After incubation for 48 and 72 hours, cell proliferation, fatty acids incorporation into cell, peroxidation and activities of antioxidant enzymes were measured. Prostaglandin E₂ (PGE₂) and thromboxane A₂ (TXA₂) were measured for the eicosanoids metabolism. There was no cell growth differences in both of LA and CLA treated MCF-7 cells at 48 hr incubation. Compared to LA, cell growth was decreased by CLA treatment according to increasing concentration at longer incubation times, respectively ($p < 0.05$). Both of LA and CLA was incorporated into the cellular lipids 22~54% higher than in control but LA incorporation was not so linear as CLA according to concentration. Arachidonic acid (C20:4, ω 6) was synthesized after treatment of LA but did not in CLA, respectively. The lipid peroxide concentration in LA 120 μ M group increased as 1.7 times as that in CLA 120 μ M treated. The activities of antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase and glutathione reductase were increased by the supplementation with CLA 120 μ M at 72 hr incubation ($p < 0.001$) compared to LA, otherwise activity of superoxide dismutase was not different in both. PGE₂ and TXA₂ levels were lower in condition of CLA treatments according to lower levels of arachidonic acids than those in LA treated group, respectively. Overall, the dietary CLA might change the MCF-7 cell growth by the changes of cell composition, production of lipid peroxide, activities of antioxidant enzymes and eicosanoid synthesis compared to dietary LA.

Key words: conjugated linoleic acid (CLA), MCF-7 breast cancer cell, lipid peroxidation, antioxidant enzyme, prostaglandin E₂ (PGE₂), thromboxane A₂ (TXA₂)

서론

최근 미국, 일본, 유럽 등 선진국에서는 전체 사망 인구 중 암으로 인한 사망률이 수위를 차지하고 있다. 우리나라에서의 유방암 발병률이 1996년 한 해 3801명이었으며 1999년 이후 사망원인 통계에 의하면 여성의 유방암에 의한 사망률이 점차 증가하는 추세에 있다(1). 유방암의 발생 원인으로써 폐경 연령, 자녀수, 초산 연령뿐만 아니라 비만형의 여성에서도 그 위험도가 높게 나타나고 있다. 특히 20~30대의 비율은 미국의 수치에 비해 오히려 높은 것은 생활의 서구화에 따른 고지방 식의 섭취, 환경오염 물질의 증가, 음주 섭취량의 증가 등으로 인한 것이 주를 이루고 있으므로 식이성 지질 섭취량 및 형태

에 관한 연구가 절실히 필요하겠다(2).

과산화물에 의하여 촉진되는 암화 과정은 개시(initiation), 촉진(promotion) 및 진행(progression)과정의 어느 부분에 관여하는지 명확하지 않지만 여러 가지 형태의 항산화 물질들에 의해 이 과정들이 억제된다는 것은 잘 알려져 있다(3). 따라서 발암발생 물질에 노출되었을 때 이들의 발암성을 경감시킬 수 있는 항암제에 대한 연구가 암 예방차원에서 많은 관심을 모으고 있다(4-6). 최근, 필수 지방산인 linoleic acid(LA)의 이성체인 conjugated linoleic acid(CLA)가 동물의 피부, 전위 및 유방암 발생 실험에서 강한 항암물질임이 증명되어 새로운 천연 항암물질로 분류되고 항암기작에 대해 많은 연구가 진행되고 있는 중이다(7-10). 뿐만 아니라 CLA는 체지방감소, 혈

†Corresponding author. E-mail: mlee@cc.sungshin.ac.kr
Phone: 82-2-920-7211. Fax: 82-2-926-3574

중 cholesterol 감소, 면역 증진효과 등 여러 가지 생리적인 효과를 가진다는 보고도 있다(11).

CLA는 1987년 Pariza가 구운 쇠고기에서 분리, 동정한 동물성 지방산으로 육류, 낙농제품, 해산물 및 식물유 등 자연식품에도 존재한다(4,7). CLA는 LA의 9, 11번 또는 10, 12번 탄소 위치에 공액 이중결합을 지닌 위치 이성체 및 기하(*cis*-, *trans*-) 이성체를 통칭한 것으로 동물조직의 인지질과 결합력이 높은 *cis*-9, *trans*-11 CLA가 생물학적 활성이 가장 크다(4, 7). LA가 실험동물에서 암 형성을 촉진하는 반면 CLA는 쥐의 유방암, 대장암 마우스의 전위종양과 피부암 발생의 예방인자로서 부각되고 있고 사실상 1990년대 대부분의 CLA 연구는 항암작용에 관한 연구가 주류를 이룬다(12-15). 일반 동물사료에 1% 내외의 CLA를 첨가하여 사육한 쥐에서 유방암이 억제되었으며(12), dimethyl benz[*a*]anthracene을 장기간 투여 시에도 CLA가 함유된 식이를 준 쥐에게는 유방종양 발생이 저지되었다(8,12). 또한 1%의 CLA가 함유된 식사를 한 인체실험에서도 암세포의 성장이 억제되었다고 보고한 연구에서는 CLA가 antiinhibitor와 antipromotor를 겸비한 항암제인 것으로도 알려졌으며 유방암세포에서도 이를 규명하였다(16-19). CLA 항암효과의 기전으로는 항산화 효과와 eicosanoid 대사에서의 변화에 의한 것으로 집약되고 있다(20,21). 다른 항산화 작용을 갖는 많은 물질들이 암예방 효과와 연관성이 있는 것으로 보아서 기전적 설명이 우선되고 있다. 그러나, CLA 농도가 낮을수록 과산화물생성을 낮춘다는 보고(7,22)와 CLA와 그 대사산물이 고도불포화 지방산(poly-unsaturated fatty acid; PUFA)처럼 산화적 스트레스 조건하에서 반응하는 것은 유사하며 과산화지질 생성을 저해하지 않는다는 상반된 연구 보고도 있다(21,22). 항산화체계로는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase(GPx) 및 glutathione reductase(GR)을 제시할 수 있는데 SOD는 superoxide radical을 hydrogen peroxide와 물로 분해되는 항산화 방어의 첫 번째 단계를 의미하며 CLA를 투여하였을 때 증가한다는 보고가 있다(21). GPx는 조직에서 hydrogen peroxide 형태의 자유 라디칼을 H₂O로 무독화시켜서 산화적 손상을 예방하는데 관여한다. 즉 GPx는 포유동물의 주요한 peroxidase로서 SOD에 의해 생성된 H₂O₂을 H₂O로 촉매해 주는 셀레늄이 조인자로 작용하는 효소이며 GR은 glutathione 환원 사슬의 turn-over에 관여하여 효과적인 항산화 기작을 수행하게 되는 것이다(23).

다른 가설로는 prostaglandin 생합성과 연관된 것으로 cyclooxygenase 2(COX-2) 효소에 의해서 생성되는 prostaglandin류가 염증반응, 면역반응 그리고 암발생에도 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다(24,25). 반면 COX-1은 체내에 널리 분포하면서 일반적 생리 현상의 조절인자로서 역할을 담당하고 있으나, COX-2는 염증 등의 외부의 영향으로 세포내에서 유도되는 것으로 알려져 있다. CLA는 LA와 같이 사슬연장과 불포화도 증가 과정에 따라서 에이코사노이드(eicosanoid) 합성에 관여한다. 그러나 conjugated diene 구조에는 영향을 주지

않으며 단지 아라키돈산(C20:4) 합성이 미비하여 간접적인 항염증성, 항동맥경화성 및 항암 효과를 나타낸다고 한다(25). 또한 MCF-10A(비종양성 인체 유선 내피 배양세포)에 LA를 첨가하면 성장이 증가하지만 MCF-7의 성장은 증가되지 않았다는 보고도 있다(26). LA 또는 CLA를 세포에 투여하면 모든 세포주에서 세포증식의 증감을 보여주었는데 이는 LA와 CLA가 Δ6- 혹은 Δ5-desaturase의 유사 기질로써 아라키돈산으로 전환되는 과정에서 서로 방해 또는 간섭을 일으키기 때문이라 생각된다.

따라서 본 연구의 목적은 인체 유선암 세포(MCF-7)에 CLA를 투여한 다음 유선암 세포 증식과 세포의 지질조성 변화, 항산화 효소활성 및 PGE₂와 TXA₂를 포함한 eicosanoids 합성 등에 미치는 영향을 LA와 비교하고자 하였다. 따라서 식이 CLA의 항암효과 기전을 밝힘으로써 유사 불포화지방산의 항암기전 연구에 기여하고 국민건강차원에서 항암 예방인자로서의 CLA의 이용가능성을 알리고자 한다.

재료 및 방법

세포 배양(MCF-7 cell) 및 처리

MCF-7 인체 유선암세포는 한국 세포주은행(Korean cell line bank: KCLB)에서 분양받아 10% FBS와 항생제(penicillin-streptomycin, 10 mL/L)를 첨가한 DMEM 배지로 배양하였다. 80%정도 세포가 자라면 0.25% trypsin을 처리하여 계대 배양하여 세포주를 유지시켰고 지방산 투여는 Van Grembrock 등의 방법을 수정하여 처리하였다(27). 처리농도와 배양시간은 사전실험에서 얻은 결과를 바탕으로 LA와 CLA를 각각 15, 30, 60, 120 μM로 48과 72시간 배양한 후 항산화능을 살펴보았다.

세포의 성장측정

세포의 증식율은 Scudiero 등(26)에 의해 처음으로 고안된 비방사능법인 XTT법을 이용하였는데 측정 원리는 XTT(2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium μM-5-carboxanilide inner salts)가 생존하는 세포의 미토콘드리아내의 탈수소효소 활성에 의하여 분해됨으로써 염을 생성하는 성질을 이용하여 생존하는 세포의 수를 ELISA reader로 490 nm 흡광도에서 측정하였다. 이는 기존의 MTT방법보다 민감도가 높기 때문에 세포수가 적을 경우에도 측정이 가능하다.

유방암 세포내의 지방산 분석

유방암 세포를 분쇄하여 Folch의 방법(28)에 의해 지질을 추출하였다. Chloroform : methanol : NaCl(3:47:48)의 복합용액, methylation시약(BF₃-methanol : methanol : benzen, 25:55:20)과 internal standard를 넣고, heating block에서 100°C에서 90분간 반응시켜 메틸에스터를 생성시켰다. GC(HP 5890 II plus)로 지방산을 분리하고 표준지방산과 비교하여 지방산 분

리를 확인하여 정량하였다.

지질 과산화물의 분석(TBARS)

지질 과산화물 함량의 측정을 위하여 Packer와 Smith법(29)을 수정한 thiobarbituric acid(TBA)방법으로 세포의 지질 과산화물을 생성된 malondialdehyde(MDA) 함량으로 정량하는 것이다. 표준 시약으로 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하여 1 mg protein의 양에 따라 생성된 TBARS 값으로 처리군 간 비교하였다.

항산화 효소의 분석

Glutathione peroxidase(GPx)과 glutathione reductase (GR) 활성 동시측정: GPx 활성은 Cavanagh 등의 방법(30)을 사용하였고 GR 활성 측정은 Carlberg와 Mennervick의 방법(31)으로 측정하였다. 환원형 glutathione(GSH)은 GPx에 의해 산화형 glutathione(GSSG)으로 산화되는데 이때 NADPH가 NADP로 산화되는 정도를 340 nm에서 NADPH의 분자흡광계수 $6.22 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 을 이용하여 측정하였다. 50 mM의 인산염 완충용액(pH 7.0)과 8.4 mM NADPH, 1 unit의 GR, 1.125 M NaN_3 , 150 mM GSH를 넣은 후 시료를 첨가하고 2.2 mM H_2O_2 를 첨가하여 반응을 시작시켜 340 nm에서 3분 동안 흡광도계로 측정하였다. GPx의 활성도는 1분 동안 NADPH 1 mol이 산화되는 양을 1 unit으로 하여 mg protein당 unit으로 표시하였다. GR은 시료에 100 mM 인산염 완충용액(pH 7.3)과 기질로 0.5 mM의 산화형(GSSG)과 0.17 mM NADPH를 첨가하여 반응을 시작시켜 340 nm에서 NADPH의 흡광도 변화를 측정하였다. GR의 활성도는 1분 동안 단백질 1 mg당 산화되는 NADPH의 nM수로 표시하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 활성: SOD활성도 측정은 McCord와 Fridovich의 방법(32)으로 측정하였다. Xanthine이 xanthine oxidase의 작용을 받아 superoxide(O_2^-)를 생성하고, 이 superoxide가 ferrous cytochrome c(Fe^{2+})를 ferrous cytochrome c(Fe^{3+})로 환원시키는데 이 때 SOD가 존재하면 이 반응이 저해되기 때문에 저해 정도를 흡광도계 550 nm에서 측정하였으며, cytochrome c의 환원을 50% 저해하는 SOD량을 1 unit으로 하여 분당 활성정도를 단백질 1 mg 단위로 나타내었다.

Prostaglandin E_2 (PGE_2)와 thromboxane A_2 (TXA_2) 측정

본 연구에서는 여러 종류의 eicosanoid 중에서 암세포 증식과 관련된 PGE_2 와 이와동일 계열인 TXA_2 를 분석하였고 세포 분쇄액에서 방사면역법(RIA)법에 의한 kit를 이용하여 PGE_2 (33)(Amersham, RPA530)와 TXA_2 (34)를 측정하였다. TXA_2 는 매우 불안정하므로 thromboxane B_2 (TXB_2)용 RIA kit (Amersham)를 사용하여 TXB_2 의 양을 측정하였고 TXA_2 의 지표로 삼았다.

단백질 정량

단백질 정량은 Bradford법(35)에 따라 측정하였고 표준 시

약으로 BSA를 사용하였다. TBARS, GPx, GR 및 SOD 농도를 1 mg 단백질량으로 표기하여 비교하였다.

통계처리

본 연구에서 얻은 모든 결과는 Minitab을 이용하여 통계처리를 하였으며 각 실험군마다 평균과 표준편차를 구하였다. $p < 0.05$, $p < 0.01$ 또는 $p < 0.001$ 수준에서 ANOVA test를 이용하여 군간 유의성을 검증하였으며, 시간에 따른 유의성을 검증할 때는 t-test로 두 군간의 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

세포 증식율(cell proliferation)

지방산 종류에 따른 증식율을 살펴보면, 48시간 배양시 LA 투여군에 비하여 CLA투여군에서 농도가 증가할수록 세포증식이 증가하는 경향이었으나 LA군과 CLA군간의 차이는 없었다(Table 1). 처치 농도별로 살펴보면 LA에 비하여 72시간 배양에서 CLA 농도가 15 μM 에서 60 μM 로 증가할수록 LA투여군에 비하여 증식이 감소하였고 120 μM 에서는 차이가 없었다. Diane 등(16)의 연구에서 MCF-7세포 배양시 LA를 첨가하였을 때 세포 성장이 증가된 반면에 CLA를 첨가하였을 때에는 세포 성장이 유의적으로 감소되었다. 이러한 결과는 LA가 MCF-7 세포 성장을 자극하는 반면에 CLA는 세포 성장 억제와 관련이 있기 때문이다. 그 외에도 Rose 등(36)의 연구에서는 MCF-7 세포 성장이 LA에 의해 자극되는 것으로 알려져 있으며, 3종류의 인체폐암 배양세포(A-427, SK-LU-1, A549)에서도 CLA의 첨가는 세포 증식을 억제하였다고 보고되었다. 즉, LA를 유방암세포에 투여했을 때 배양 시간이 길어질수록 세포 증식이 증가한 반면에, CLA는 감소시킨다고 보고되었다.

세포내 지방산 조성의 변화

세포내로의 지방산 유입 효과를 살펴보면 48시간 배양시 LA투여군은 대조군에 비하여 지방산 투여량이 증가할수록 LA의 세포내 유입이 증가하였다(Fig. 1-a). LA 15~60 μM 투여시 대조군보다 LA의 유입율이 4배로 증가하였고 120 μM 에서는 8배로 증가하였으나 세포 증식에서는 15~60 μM 과 120 μM 가 차이가 없었기 때문에 60 μM 이상의 농도 투여는 MCF-7 세포를 48시간 배양시 세포내 LA 이용율의 증가와 증식이 일치한 것으로 해석된다. 이는 LA 투여군에서 세포내 arachidonic acid(AA)농도가 증가함으로써 이를 증명할 수 있으며 CLA 투여군에는 세포내 AA의 변화가 없는 것도 같은 결과의 형태로 본다(Fig. 1-c). LA투여군에서 기대하였던 것과 같이 불포화지방산과 포화지방산의 비율(P/S) 뿐만 아니라 n-6/n-3 비율도 농도에 따라 증가하였다(Fig. 1-d,e). CLA의 경우에는 세포내 LA농도에는 변화가 없으나 total CLA유입율은 15~120 μM 에 따라 증가하였다(Fig. 1-b). 이에 따라 P/S도 CLA투여에 따라 증가하였으나 n-6/n-3의 비율은 대조군

Table 1. Growth effects of various concentrations of LA and CLA in the MCF-7 breast cancer cell with different incubation time

Incubation time	Concentration (μM)						p-value vs conc. ³⁾
	0	15	30	60	120		
48 hr	Control	0.46 ± 0.04 ¹⁾	0.46 ± 0.04	^x 0.46 ± 0.04	0.46 ± 0.04	^x 0.46 ± 0.04	NS ²⁾ 0.002
	LA	0.46 ± 0.04	0.63 ± 0.18 ^b	^y 0.66 ± 0.02 ^b	0.65 ± 0.28 ^b	^y 0.63 ± 0.01 ^b	
	CLA	0.46 ± 0.04 ^a	0.55 ± 0.00 ^{ab}	^{xy} 0.60 ± 0.08 ^b	0.69 ± 0.05 ^b	^y 0.70 ± 0.03 ^b	
	p-value vs treat. ⁴⁾		NS	0.022	NS	0.003	
72 hr	Control	0.61 ± 0.03	^x 0.61 ± 0.03	^{xy} 0.61 ± 0.03	^{xy} 0.61 ± 0.03	^x 0.61 ± 0.03	NS 0.001
	LA	0.61 ± 0.03	^y 0.73 ± 0.03	^y 0.68 ± 0.02	^y 0.71 ± 0.05	^{xy} 0.71 ± 0.05	
	CLA	0.61 ± 0.03 ^a	^x 0.66 ± 0.01 ^a	^x 0.56 ± 0.04 ^a	^x 0.60 ± 0.01 ^a	^y 0.73 ± 0.04 ^b	
	p-value vs treat. ⁴⁾		0.005	0.033	0.035	0.025	

¹⁾ Mean ± SD.

²⁾ NS: Values are not significantly different between groups.

³⁾ a,b,c: P-values for the significance among the treated concentrations within LA and CLA at p>0.05.

⁴⁾ x,y,z: P-values for the significance among the types of fatty acids with the various concentration of fatty acid treatment at p>0.05.

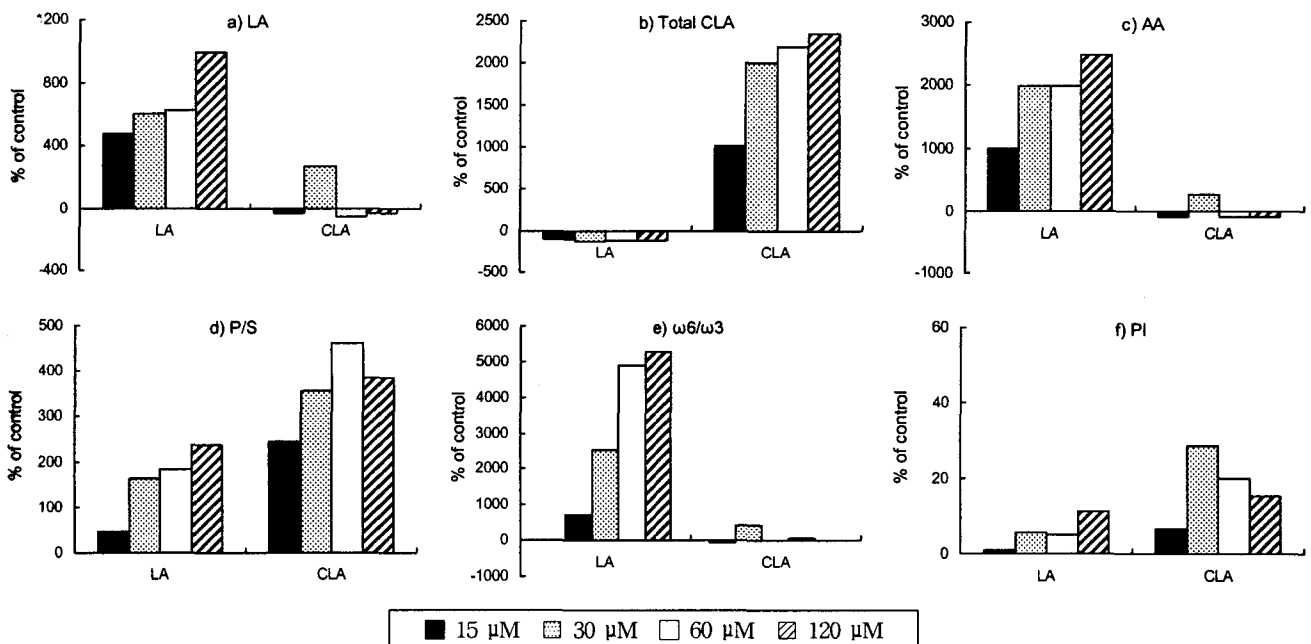


Fig. 1. Effect of LA and CLA treatment on the changes of lipid composition in MCF-7 cell according to different concentration at 48 hr incubation times.

LA: linoleic acid, AA: arachidonic acid, P/S: ratio of PUFA and SFA, ω6 fatty acids include C18:2, C18:3, C20:3 and C20:4, ω3 fatty acids include C18:3, C20:3, C20:5 and C22:6, PI means peroxidizability index.

과 거의 차이가 나타나지 않았다(Fig. 1-d,e).

지방산 농도에 따라 72시간 배양시 MCF-7 세포의 지방산 분포도를 살펴본 바로는 LA투여군의 경우 세포내 LA 유입률이 120 μM의 경우를 제외하고 낮은 농도의 투여는 48시간보다 2배에 이르렀다(Fig. 2-a). 그러나, LA 투여군의 세포내 AA양상은 48시간에 비하여 72시간 배양시 AA 합성이 저하되어 정상세포수준에 이르는 것을 보여준다(Fig. 2-c). 이 같은 현상은 PS 및 n-6/n-3에서도 같은 경향으로 농도가 증가할수록 감소하여 다른 지방산 대사로 전이되었음을 보여준다(Fig. 2-d,e). CLA의 경우 세포내 CLA농도와 n-6/n-3 비율

과 P/S 비율이 120 μM을 투여한 경우를 제외하고 48시간 배양시의 경향과 큰 차이가 없었다. 그러나 CLA투여군의 세포내 AA합성은 48시간 배양에 비하여 대조군 및 LA투여군보다 감소하였다(Fig. 2-c,d,e).

Martha와 Anna(37)는 마우스에게 CLA를 식이 공급했을 때, 식이 CLA 투여량이 높아질수록 oleic acid(OA, C18:1)의 양은 증가되고 arachidonic acid(AA, C20:4)의 양이 감소함을 관찰하여 본 연구와 일치한 결과를 보였다. Cook 등(38)의 연구에서도 식이 CLA양이 증가할수록 LA와 AA양이 감소하였으며 CLA의 농도가 증가할수록 이러한 현상이 현저하였다.

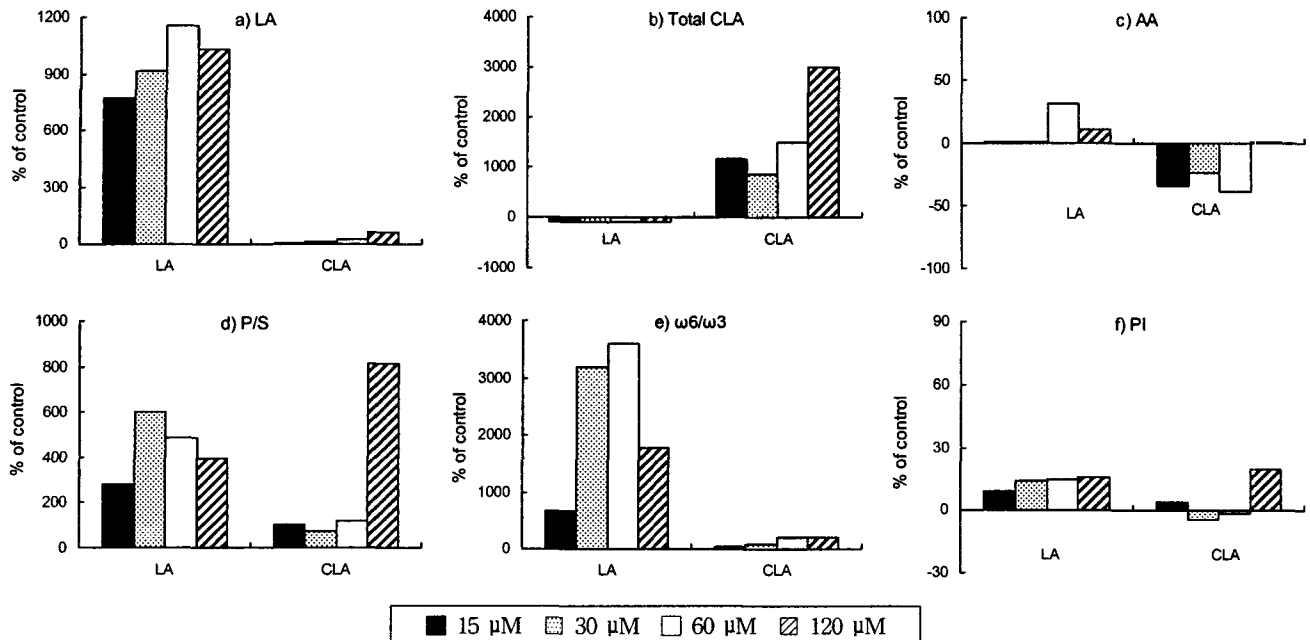


Fig. 2. Effect of LA and CLA treatment on the changes of lipid composition in MCF-7 cells according to different concentration at 72hr incubation times.

LA: linoleic acid, AA: arachidonic acid, P/S: ratio of PUFA and SFA, $\omega 6$ fatty acids include C18:2, C18:3, C20:3 and C20:4, $\omega 3$ fatty acids include C18:3, C20:3, C20:5 and C22:6, PI means peroxidizability index.

이는 CLA가 LA(C18:2)로부터의 AA 합성을 억제한 결과이며 $\Delta 6$ desaturase가 eicosanoid 합성의 조절단계에서 서로 경쟁하기 때문이다. 결국 투여된 CLA는 세포막의 인지질이나 세포내 지질로 급속히 유입되며 CLA는 LA로부터 생성된 eicosanoid의 전구체인 AA(C20:4)와 세포막에서 LA와 경쟁적으로 작용하므로 eicosanoid 대사에 영향을 미치게 되며 이러한 eicosanoid 대사의 변화는 암세포내 암화억제와 항혈전 효과를 나타내게 된다(39,40).

결론적으로 세포내 지방산 조성중에서 LA, CLA 투여군은 각각 투여한 지방산의 세포내 유입률이 그 투여량에 비례하였고 이에 따라 세포내 지방산의 분포가 변화하게 되었다. 특히 CLA 투여군에서는 투여 농도가 증가할수록 LA로부터의 AA합성이 감소하여 에이코사노이드 대사의 변화를 예상할 수 있었다.

지질과산화물 함량의 변화

지질 과산화물은 암화과정에서 유리기를 생성하여 DNA의 single-strand 분절을 일으키고 DNA와 단백질과의 상호 결합도 촉진한다. 암 촉진단계 동안 이런 유전적 손상 부위가 늘어나고 유전적으로 불안정한 상태가 지속되면 악성암으로의 전환 확률은 높아진다고 보고되고 있다(41).

투여된 지방산 종류에 따른 MDA 생성결과를 살펴보면, 48시간 배양시 대조군과 비교하였을때 LA와 CLA투여군의 MDA 생성이 50~130% 증가하였다. 72시간 배양했을 때 대조군과의 비교시 LA와 CLA투여군의 MDA 생성은 0~220% 증가하였다. 또한 48시간에서와 같이 투여량이 증가할수록 MDA의 생성이 모두 증가하였으나 30 μ M까지는 두 군 모두

에서 15 μ M 투여군보다 MDA생성이 감소하다가 60 μ M부터 증가하였다. 72시간 배양시 CLA와 LA의 투여군간의 차이는 15 μ M과 30 μ M에서는 차이가 없었으나 30 μ M에서는 대조군과 같은 수준으로 감소하였고 120 μ M에서는 LA투여군의 과산화물 생성이 CLA투여군보다 1.7배가량 증가하였다(Table 2).

Ha 등(7)은 *in vitro*에서 CLA 처리군에서 지질 과산화물의 농도가 감소됨을 관찰하였고, Ip 등(12,13)의 연구에서 쥐에서 1개월간 CLA를 급여했을 때 간에서의 지질 과산화물 생성량에는 영향을 주지 않았으나, 유선 조직에서는 CLA를 처리한 모든 군에서 TBAR 생성량이 유의적으로 감소하였다. Diane 등(16)의 연구에 따르면 LA를 첨가한 정상 인체 유선세포(HMEC)와 유선암 세포(MCF-7)에서는 세포내 지질 과산화물의 농도가 증가되는 반면에 CLA는 지질 과산화물 생성을 낮추었다. 1%의 CLA를 첨가한 식이를 두 달간 먹인 쥐를 이용한 Ip 등(40)의 실험연구에서 CLA 투여군이 대조군보다 MDA의 생성이 적었으며, CLA의 양이 증가할수록 유선암 억제율은 증가되었다고 보고되었다. 즉, MCF-7 세포에서 LA를 투여하면 세포내 과산화물 생성이 투여량에 비례적으로 증가하였으나 CLA를 투여한 경우에는 세포내 과산화물 생성이 감소되었다. 특히 CLA 낮은 농도(15와 30 μ M)에서 과산화물 생성이 감소하였으며, CLA 30 μ M의 경우 LA와 비교하였을 때 과산화물 생성이 크게 감소하였다고 보고되었다.

지방산 처리에 따른 항산화 효소의 활성 변화

LA와 CLA를 투여한 MCF-7 세포에서의 GPx 활성은 60 μ M 48시간 CLA투여군이 LA투여군보다 유의적으로 GPx를 감소시켰다($p < 0.001$). 이것은 60 μ M CLA 투여군에서 CLA

Table 2. TBARS of MCF-7 breast cancer cell treated with different types of fatty acids and various concentrations according to different incubation time

		MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protein)					
	μM	0	15	30	60	120	p-value vs conc. ³⁾
48 hr	Control	16.51 \pm 5.90 ^a	^x 16.51 \pm 5.90 ¹⁾	^x 16.51 \pm 5.90	^x 16.51 \pm 5.90	^x 16.51 \pm 5.90	
	LA	16.51 \pm 5.90 ^a	^y 30.87 \pm 4.62 ^b	^y 26.68 \pm 8.60 ^{ab}	^y 32.86 \pm 5.34 ^b	^y 38.36 \pm 5.52 ^b	<0.0001
	CLA	16.51 \pm 5.90 ^a	^y 28.35 \pm 7.18 ^{ab}	^{xy} 24.60 \pm 3.41 ^{ab}	^y 31.80 \pm 5.71 ^b	^y 34.33 \pm 5.91 ^b	<0.0001
	p-value vs treat. ⁴⁾		0.002	0.033	<0.0001	<0.0001	
72 hr	Control	17.30 \pm 9.23 ^a	17.30 \pm 9.23	17.30 \pm 9.23	^x 17.30 \pm 9.23	^x 17.30 \pm 9.23	
	LA	17.30 \pm 9.23 ^a	28.28 \pm 8.93 ^a	26.43 \pm 15.06 ^a	^y 31.16 \pm 9.48 ^{ab}	^y 54.38 \pm 27.45 ^b	0.006
	CLA	17.30 \pm 9.23 ^a	24.79 \pm 10.55 ^{ab}	17.21 \pm 6.06 ^a	^y 30.94 \pm 5.35 ^b	^{xy} 30.68 \pm 9.42 ^b	0.013
	p-value vs treat. ⁴⁾		NS	NS	0.015	0.008	

¹⁾ Values are expressed as mean \pm SD.

²⁾ NS: Values are not significantly different between groups.

³⁾ P-values for the significance among the treatment concentrations in the different types of fatty acid.

⁴⁾ P-values for the significance among the types of fatty acids with the various concentration of fatty acid treatment.

a,b,c: Values within the treated concentration of fatty acids groups with different superscripts are significant at $p < 0.05$.

x,y,z: Values within the treated types of fatty acids groups with different superscripts are significant at $p < 0.05$.

자체가 항산화 역할을 하였다고 볼 수도 있다. CLA를 처리하여 72시간 배양한 세포에서는 GPx 활성이 대조군과 LA투여군에 대하여 유의적으로 증가하였고 이때도 120 μM 의 CLA투여군만 같은 농도의 LA투여군보다 증가하는 차이를 나타냈다 ($p < 0.01$) (Table 3). GR 활성결과는 48시간 배양시 농도에 따라 LA 투여군이 대조군보다 5~25% 정도 증가하였으나 유의적인 결과가 아니었으며 CLA 투여군도 농도에 따른 차이가 없었다. 전반적으로 LA투여군보다 CLA투여군의 GR활성이 대조군보다 감소하는 경향이었으나 유의적이지 않았으며 60 μM 투여시에만 GPx의 결과와 같이 CLA투여군에서 LA투여군보다 감소하였다($p < 0.001$). 72시간 배양시 LA투여군에서는 농도에 따른 차이가 없었으나 CLA투여군에서는 대조군과 비교해보면 GR 활성은 15 μM 에서 120 μM 로 농도가 증가할수록 유의적인 증가를 나타냈다($p < 0.01$). 그러나 GPx와 같이 120 μM 에서만 LA투여군과 차이를 보였다($p < 0.01$). SOD 활성은 48시간 배양한 CLA투여군에서 대조군과 비교하여 10~20% 정도 증가하였으나 유의적인 차이가 없었다. 72시간 배양시에도 LA투여군에서 대조군보다 SOD 활성이 10~22% 정도 증가하였으나 유의적이지 않았다. SOD 활성에서는 배양시간과 농도에 따른 차이가 LA와 CLA투여군간의 차이는 전혀 나타나지 않았다.

본 연구에서는 LA와 CLA의 투여농도를 증가시켰을 때 MCF-7 세포에서의 과산화물 생성이 증가하는 경향을 보였고 LA투여군보다 CLA투여군에서 30 μM 에서 대조군 수준으로 감소한 것과 120 μM CLA투여군에서 과산화물 생성이 LA투여군의 45%정도만 생성된 것을 농도와 배양시간에 따른 항산화 시스템으로 설명하고자 하였다. 비록 CLA첨가에 따른 항산화 효소체계의 반응이 일정한 양상을 보이지 않았으나 120 μM CLA군을 72시간 배양시 GPx와 GR활성만 LA투여군과 유의적인 차이로 증가하여서 이를 설명할 수 있겠다. 타당한 이유로

는 항산화 효소 작용에는 무기질 등 다른 많은 인자들의 공동 작용에 의해 이루어지는데 다양한 인자들의 상호작용이 결핍된 것을 배제할 수 없다고 생각된다(42). Kwon과 Lee(43)의 연구에서는 흰쥐에서 CLA를 2.0% 투여한 군에서 GPx의 활성이 감소함을 관찰하였으며, Helen 등(44)의 연구에서도 CLA를 투여한 간세포에서의 GPx 활성이 대조군과 비슷하게 수치가 떨어짐을 볼 수 있었다. Marianne 등(45)은 MCF-7 세포에서 GPx의 활성을 관찰하였는데, CLA를 투여(7.5~30 μM)한 뒤 4일 배양 후 GPx 활성이 최소를 나타내었다고 보고하였다. 또한 CLA의 낮은 농도는 GPx 활성에 낮은 효과를 보인 반면에, CLA의 높은 농도(50 μM 이상)와 배양 시간이 길어질수록(8~12일) GPx 활성이 대조군보다 최고 60배 이상 높아졌다. 결론적으로 MCF-7 세포에서의 48시간 배양시 항산화 효소는 차이가 있었으나 배양시간이 길어질수록 CLA투여군에 대한 항산화 효소 활성이 더 커지며 이는 LA투여군과도 차이를 보였다. 따라서, CLA의 장기간 처치 경우에도 과산화물 생성이 감소할 수 있는 것은 항산화효소 활성의 역할이 있을 수 있음을 배제할 수 없겠다.

Prostaglandin E₂와 thromboxane A₂

LA와 CLA의 투여 지방산 종류에 따른 PGE₂ 생성 결과를 보면, 48시간 배양시 LA의 경우 PGE₂의 농도가 증가되었으나 CLA투여군은 그에 비해 생성량이 현저히 감소함을 볼 수 있었으며, 대조군과 비교하였을 때 CLA 30 μM 에서 PGE₂가 가장 적게 생성되었다. 72시간 배양시 PGE₂의 농도는 대조군에 비해 LA, CLA 투여군 모두 적게 생성되었다. 이와 같은 결과는 대조군의 PGE₂ 생성이 48시간보다 72시간 배양시 현저히 증가하였기 때문이지만 배양시간과 관계없이 CLA투여군의 PGE₂생성량은 LA투여군에 비하여 적었으며 이는 72시간 CLA를 배양시 AA생성의 감소와 일치한 결과이다. TXA₂생성 결과를 살펴보면 48시간 배양시 CLA는 60 μM 에서부터

Table 3. Mean of antioxidant enzymes activities in MCF-7 breast cancer cell treated with different types and concentrations of fatty acids according to different incubation time

		μM	0	15	30	60	120	p-value vs conc. ³⁾
GPx (unit)	48 hr	Control	1.128±0.05	1.128±0.05 ¹⁾	1.128±0.05	^y 1.128±0.05	1.128±0.05	NS ²⁾
		LA	1.128±0.05	1.257±0.35	1.657±0.60	^y 1.239±0.05	1.27±0.23	
		CLA	1.128±0.05	0.973±0.26	1.15±0.09	^x 0.870±0.07	1.33±0.47	
		p-value vs treat. ⁴⁾		NS	NS	<0.001	NS	
	72 hr	Control	1.349±0.09	1.349±0.09	1.349±0.09	1.349±0.09	^x 1.349±0.09	NS
		LA	1.349±0.09	1.245±0.10	1.398±0.21	1.610±0.02	^x 1.254±0.08	
CLA		1.349±0.09 ^a	1.155±0.09 ^a	1.488±0.17 ^a	1.510±0.26 ^a	^y 2.111±0.41 ^b		
	p-value vs treat. ⁴⁾		NS	NS	NS	<0.01		
GR (nM)	48 hr	Control	1128.6±46.9	1128.6±46.9	1128.6±46.9	^y 1128.6±46.9	1128.6±46.9	NS
		LA	1128.6±46.9	1390.5±122.2	1188.6±253.6	^y 1239.6±47.4	1270.2±228.5	
		CLA	1128.6±46.9	973.6±260.9	1145.9±88.0	^x 870.4±68.2	1103.6±73.2	
		p-value vs treat. ⁴⁾		NS	NS	<0.001	NS	
	72 hr	Control	1342.5±88.4	1342.5±88.4	1342.5±88.4	1342.5±88.4	^x 1342.5±88.4	NS
		LA	1342.5±88.4	1395.1±205.3	1356.8±244.9	1143.7±40.5	^x 1254.0±83.9	
CLA		1342.5±88.4 ^a	1154.8±92.4 ^a	1533.6±162.2 ^{ab}	1511±258.3 ^a	^y 2110.9±4102 ^b		
	p-value vs treat. ⁴⁾		NS	NS	NS	<0.01		
SOD (unit)	48 hr	Control	1.23±0.15	1.23±0.15	1.23±0.15	1.23±0.15	1.23±0.15	NS
		LA	1.23±0.15	1.15±0.05	1.30±0.10	1.30±0.26	1.30±0.09	
		CLA	1.23±0.15	1.75±0.65	1.43±0.35	1.37±0.43	1.47±0.40	
		p-value vs treat. ⁴⁾		NS	NS	NS	NS	
	72 hr	Control	1.13±0.13	1.13±0.13	1.13±0.13	1.13±0.13	1.13±0.13	NS
		LA	1.13±0.13	1.37±0.33	1.38±0.46	1.38±0.33	1.25±0.23	
CLA		1.13±0.13	1.00±0.35	1.62±0.43	1.46±0.41	1.38±0.40		
	p-value vs treat. ⁴⁾		NS	NS	NS	NS		

¹⁾Mean ± SD.

²⁾NS: Values are not significantly different between groups.

³⁾P-values for the significance among the treatment concentrations in the different types of fatty acid.

⁴⁾P-values for the significance among the types of fatty acids with the various concentration of fatty acid treatment.

TXA₂의 농도가 감소한 반면 LA는 60 μM부터 현저히 증가하는 상반된 결과를 보였다. 72시간 배양시에서도 CLA 투여군이 LA 투여군보다 TXA₂ 생성이 낮은 경향을 보였으며(Fig. 3-a,b) 에이코사노이드는 여러 가지 생화학적 반응에 중요하고도 효과적인 매개물질이며, 세포 사이의 생리적인 상호작용을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 한다. 아라키돈산으로부터 유도된 eicosanoid 중에서 PGE₂와 TXA₂는 최종 산물이 아닌 중간 대사산물로 세포내에서 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. Sebedio 등(46)은 CLA가 탄소사슬연장과 불포화도 증가에 관여하는 cyclooxygenase 효소에 대한 아라키돈산과의 경쟁적 작용으로 다른 n-3계 지방산과 유사하게 PGE₂ 생성을 감소시킨다고 하였다. Kai-Li와 Claudine 등의 연구(25,47)에서도 식이성 CLA가 아라키돈산에서 유도되는 PGE₂ 합성을 유의적으로 감소시키는데 이것이 CLA의 항암성 기전이라고 보고하였다. Anne 등의 연구(48)에서는 CLA가 cyclooxy-

genase에 의하여 생성되는 TXA₂ 형성도 억제시킨다고 보고하고 이를 항혈전성 효과로 설명하였다. Abou-EI-Ela 등(49)은 n-6계 지방산인 LA는 에이코사노이드의 생성을 증가시켜 종양 성장을 촉진시키는 반면에, n-3 계열은 종양 성장을 억제한다고 하였다. CLA의 경우 n-3계 지방산과 유사하게 PGE₂의 생성을 억제하여 최종적으로 종양 성장을 억제한다고 하였고 전반적으로 본 연구의 결과와 유사하였다. 그러나 PGE₂와 TXA₂ 측정시 불안정한 형태로 존재하므로 방법적인 문제가 나타났다. PGE₂는 혈액내 반감기가 짧아서 PGF_{2α}로 상호 전환이 가능하며, TXA₂도 안정한 형태인 TXB₂로 전환이 가능하다. 본 연구에서는 반감기가 짧은 TXA₂는 안정화된 형태인 TXB₂를 측정하여 환산하였다. 따라서 안정한 TXB₂ 수치를 측정하여 환산한 TXA₂의 수치는 정확하지만 PGE₂ 수치는 상호전환이 가능한 PGF_{2α}로 전환되었을 가능성이 있다. PGE₂를 측정함에 있어서 PGE₂의 반감기가 혈액의 경우 약 30초 정

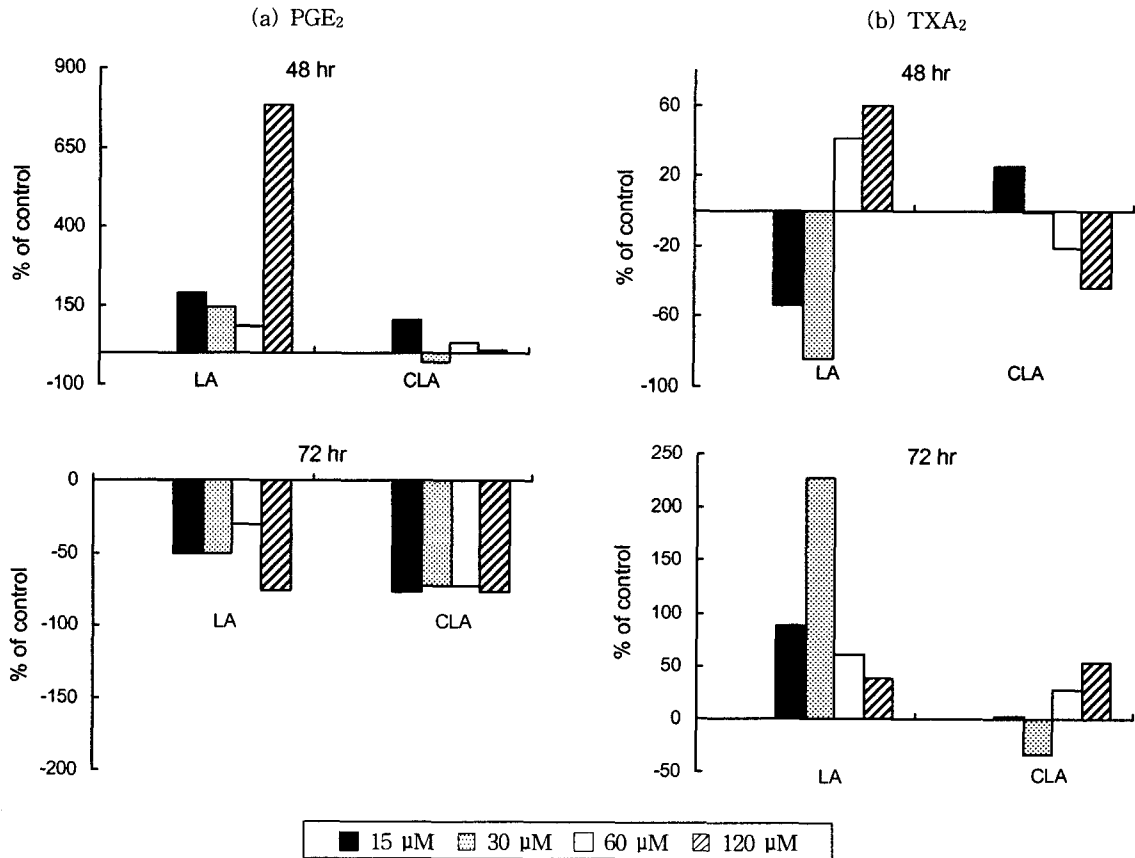


Fig. 3. Relative changes of prostaglandin E₂ (PGE₂) and thromboxane A₂ (TXA₂) of MCF-7 breast cancer cell treated by LA or CLA with various concentrations at different incubation times compared to control.

The set of concentration bars in left side was for LA treated group, those in right side was for CLA treated group.

도로 매우 짧으므로 PGE₂의 생성 시점을 정확히 측정하는 것이 중요하다. 본 연구에서 실시한 48시간 배양은 그 시간이 적절하였으나, 72시간은 PGE₂가 생성되고 다시 다른 대사물(13, 14-dihydro-15-keto-PGE₂)로 전환되었을 가능성이 높다. 따라서, PGE₂와 TXA₂ 측정시의 불안정성 때문에 수치는 정확한 세포내 PGE₂ 농도라고 말하기는 힘들기 때문에 대조군에 대한 비교(% of control)로 나타내었다.

요 약

본 연구는 식이성 CLA 투여에 따른 MCF-7 세포에서의 항암 효과를 기전적으로 규명하여 점차 증가하는 지방암 환자의 식이 지방질의 식생활 지침서 설정에 기초 자료를 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 연구의 결과로, 지방산 종류에 따른 증식율을 살펴보면, 48시간 배양시 LA투여군에 비하여 CLA투여군에서 농도가 증가할수록 세포증식이 증가하는 경향이 있었으나 LA군과 CLA군간의 차이는 없었다. 처치 농도별로 살펴보면 LA에 비하여 72시간 배양에서 CLA 농도가 15 μM에서 60 μM로 증가할수록 LA투여군에 비하여 증식이 감소하였고 120 μM에서는 차이가 없었다. 따라서 CLA투여군은 배양시간이 길수록 농도에 따라 LA투여군보다 증식이 억제된 것으로

나타났다. 세포내 지방산 유입률은 대조군보다 LA와 CLA 투여군의 세포내 유입률이 각각 22~54%, 17~41% 정도로 더 많이 유입되어 세포내 지방산 조성에 영향을 주는 것으로 보인다. LA의 경우 고농도에서 세포내로의 유입이 잘 되지 않은 것은 세포내 항상성과 관련이 있는 것으로 생각된다. 대조군보다 LA과 CLA 지방산을 48시간 배양시 지질 과산화물 생성이 50~130% 증가하였고 투여량이 증가할수록 MDA의 생성이 모두 증가하였다. 그러나, 72시간 배양시 CLA 30 μM에서는 대조군과 같은 수준으로 감소하였고 120 μM에서는 LA의 과산화물 생성이 CLA군보다 1.7배가량 증가하였다. 72시간 120 μM CLA처치시 항산화 효소인 GPx, GR의 활성이 높게 나타난 것은 배양시간이 길어질수록 CLA에 대한 항산화효소 활성이 더 커지며 이는 LA군과도 큰 차이를 보였다. 따라서, CLA의 장기간 처치 경우에도 과산화물 생성이 LA군보다 적게 생성된 것은 항산화효소 활성의 역할이 있을 수 있음을 배제할 수 없었다. 또한, 유선암 세포에 CLA를 투여할 경우 LA투여군에 비하여 PGE₂와 TXA₂ 생성이 크게 감소하였으며 이는 AA생성의 감소와 일치하는 결과이다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 MCF-7 유선암세포에 LA군에 비하여 CLA투여에 따른 세포증식의 차이는 없었으나 배양시간이 증가할수록 CLA농도에 따른 세포증식률이 LA군보다 감소하는 경향이 있었다.

이는 항산화효소의 증가에 의한 지질 과산화물 생성삼소와 PGE₂ 및 TXA₂ 등의 유의적인 감소가 유선암세포의 증식을 억제하는 인자로 작용할 수 있는 가능성을 시사하였다. 또한 지방산 투여에 따른 과산화물 생성과 항산화 시스템이 유선암 세포에서는 상호기전적으로 작용하지 않았으나 이는 농도와 배양시간에 따른 CLA의 항암효과가 *in vivo* 실험에서 재검증할 필요가 있음을 시사한다. 또한 장시간의 세포배양 실험시 PGE₂는 반감기가 짧고 다른 대사로 쉽게 전환되는 불안정한 물질이므로 새로운 측정방법의 개발이 필요하겠다. 더우기 CLA에 의한 항암효과가 정확히 어떤 기전에 의한 것인지 보다 깊이 있는 연구가 필요하지만 본 연구에서 얻은 에이코사노이드 대사의 변화등은 유선암 예방 연구에 기초적인 자료가 될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 성신학원의 운정재단 연구비에 의하여 수행된 연구입니다.

문헌

- Park SC, Oh SL, Lee MS. 1998. Korean status of alcoholics and alcohol related health problems. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 170s-172s.
- Korean National Statistical Office. 2000. Annual Report on the Cause of Death Statistics.
- Pitot HC, Sirica AE. 1980. The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 605: 191-215.
- Pariza MW, Aeschbacher HU, Felton JS, Sato S. 1990. Mutagens and carcinogens in the diet. *Progress in Clinical and Biological Research* 347: 217-221.
- Prasad K, Meyskens FL. 1990. *Nutrients and cancer prevention*. Human press, Clifton, NJ.
- Kim SH, Kim JO, Lee SH, Park KY, Chung HY. 1991. Antimutagenic compounds identified from the chloroform fraction of garlic (*Allium sativum*). *J Korean Soc Food Nutr* 20: 253-259.
- Ha YL, Pariza MW. 1990. Anticarcinogenic conjugated derivatives of linoleic acid found in grilled ground beef: isolation, identification, and mechanism of action. In *First Korean Conference on Science and Technology*. Korean Fed Sci Assoc, Seoul, Korea. p 442.
- Ha YL, Storkson JM, Pariza MW. 1990. Inhibition of benzos [a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 50: 1097-1011.
- Pariza MW, Ha YL. 1990. Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid: A new class of anticarcinogens. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 7: 169-171.
- Pariza MW, Ha YL. 1990. Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid: Mechanism of anticarcinogenic effect. In *Mutagens and carcinogens in the diet*. Pariza MW, Aeschbacher HU, Felton JS, Sato S, eds. Wiley-Liss, Inc., New York. p 217.
- Park HS. 2000. Mechanism of cancer prevention and other physiological function by CLA. *Korean J Nutrition* 33: 556-565.
- Ip C, Shin M, Thompson HJ, Scimeca JA. 1994. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res* 54: 1212-1215.
- Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW. 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 51: 6118-6124.
- Visonneau S, Cesano A, Tepper SA, Scimeca JUA, Santoli D, Kritchevsky D. 1997. Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID mice. *Anticancer Res* 17: 969-974.
- Ip C, Carter CA, Ip MM. 1985. Requirement of essential fatty acid for mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 45: 1997-2000.
- Diane CC, Lisa YH, Terry DS. 1997. Proliferative responses of normal human mammary and MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid, conjugated linoleic acid and eicosanoid synthesis inhibitors in culture. *Anticancer Res* 17: 197-204.
- Shultz TD, Chew BP, Seaman WR. 1992. Differential stimulatory and inhibitory response of human MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid and conjugated linoleic acid in culture. *Anticancer Res* 12: 2143-2146.
- Ip C, Juang C, Thompson HJ, Scimeca JA. 1997. Retention of conjugated linoleic acid in the mammary gland is associated with tumor inhibition during the post-initiation phase on carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18: 755-759.
- Vijayender RD, Gabriel F. 1997. The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is released to estrogen response system. *Cancer Lett* 116: 121-130.
- Van den Berg JJM, Cook NE, Tribble DL. 1995. Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipid* 30: 599-605.
- Banni S, Angioni E, Contini MS, Carta G, Casu V, Iengo GA, Melis MP, Diana M, Dessi MA, Corongiu FP. 1998. Conjugated linoleic acid and oxidative stress. *J Am Oil Chem Soc* 75: 261-267.
- Lee MS. 2000. *Apolipoprotein metabolism*. Hyoil Co., Seoul. p 265-295.
- Alfthan G, Aro A, Arvilommi H, Huttunen JK. 1991. Selenium metabolism and platelet glutathione peroxidase activity in healthy Finnish men: effects of selenium yeast, selenite and selenate. *Am J Clin Nutr* 53: 120-125.
- Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bailey DB, Croxtall J, Willoughby DA. 1994. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2046-2050.
- Kai-Li L, Martha AB. 1998. Conjugated linoleic acid reduces arachidonic acid content and PGE₂ synthesis in murine keratinocytes. *Cancer Letters* 127: 15-22.
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48: 4827-33.
- Van Grembrock MMJ, Voorhout WF, Erkelens DW, van Meer G, de Braun TAW. 1995. Palmitic acid and linoleic acid metabolism in Caco-2 cells: different triglyceride synthesis and lipoprotein secretion. *J Lipid Res* 36: 13-24.
- Folch J, Lees M, Shoane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- Packer L, Smith J. 1974. Extension of the lifespan of cultured human diploid cells by vitamin E. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 4763-4767.
- Cavanagh EMV, Inserra F, Ferder L, Romano L, Ercole L, Fraga CG. 1996. Superoxide dismutase and glutathione per-

- oxidase activities are increased by enalapril and captopril in mouse liver. *FEBS Lett* 361: 21-24.
31. Carlberg I, Mennervick B. 1985. Glutathione reductase. *Meth Enzymol* 113: 484-450.
 32. McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase - An enzymatic function for erythrocyperin (hemocuperin). *J Biol Chem* 224: 6049-6055.
 33. Kim WK. 1997. Effect of different sources of dietary n-3 fatty acids on immune response and eicosanoids production. *J Korean Soc Foooc Sci Nutr* 26: 697-703.
 34. Yang JA, Kim SO, Choi JH, Kwag OG, Rhee SJ, Chang HW. 1998. Activities of phospholipase A₂ and cyclooxygenase, and syntheses of thromboxane and prostacyclin in streptozotocin induced diabetic rats. *J Korean Soc Foooc Sci Nutr* 27: 175-181.
 35. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
 36. Rose DP, Connolly JM. 1989. Stimulation of growth of human breast cancer cell lines in culture by linoleic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 277-283.
 37. Martha A, Anna KS. 1997. Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids* 32: 199-204.
 38. Cook ME, Miller CC, Park Y, Pariza M. 1993. Immune modulation by altered nutrient metabolism: Nutritional control of immune-induced growth depression. *Poultry Sci* 72: 1301-1305.
 39. John JT, Young L, Ingrid AS, Ken GDA, Bruce AW. 1998. Modulation of macrophage cytokine production by conjugated linoleic acids is influenced by the dietary n-6 : n-3 fatty acid ratio. *J Nutr Biochem* 9: 258-266.
 40. Ip C, Stephanie PB, Alvert DH, Henry JT, Jayne S, Joseph AS. 1996. The efficiency of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 17: 1045-1050.
 41. Hartley JA, Gibson NW, Qwelling LA, Yuspa SH. 1985. The association of DNA strand breaks with accelerated terminal differentiation in mouse epidermal cells exposed to tumor promoters. *Cancer Res* 45: 4864-4871.
 42. Song HJ, Park HS. 1999. Effect of conjugate linoleic acid on hepatic peroxidation and antioxidant enzyme system in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. *MS Thesis*. Kyunghee University.
 43. Kwon SY, Lee MS. 2000. The effect of feeding conjugated linoleic acid (CLA) on antioxidant enzymes system in S.D. rats. *MS Thesis*. Sungshin Women's University.
 44. Helen C, Rosaleen D, Catherine S, Feragal L. 1998. The effect of a conjugated linoleic acid on superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in oxidatively-challenged liver cells. *Biochemical Society Transactions* S62: 26.
 45. Marianne O, Catherine S, Rosaleen D. 1999. Antioxidant enzyme defence responses of human MCF-7 and SW480 cancer cell to conjugated linoleic acid. *Cancer Res* 19: 1953-1960.
 46. Sebedio JL, Juaneda P, Dobson G, Ramilison I, Martin JC, Chardigny JM, Christie WW. 1997. Metabolites of conjugated isomers of linoleic acid (CLA) in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1345: 5-10.
 47. Claudine JK, Kai-Li L, Martha AB. 1999. Effect of dietary conjugated linoleic acid on phorbol ester-induced PGE₂ production and hyperplasia in mouse epidermis. *Nutrition and Cancer* 33: 132-138.
 48. Anne T, Gerald M, Jack YV. 1999. Antiplatelet effects of conjugated linoleic acid isomers. *Biochim Biophys Acta* 1438: 239-246.
 49. Abou-EI-Ela SH, Prasse KW, Carroll R, Wade AE, Dharwadkar S, Bounce OR. 1988. Eicosanoid synthesis in 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary adenocarcinomas in Sprague-Dawley rats fed primrose oil, menhaden oil or corn oil diet. *Lipid* 23: 948-954.

(2003년 1월 17일 접수; 2003년 4월 7일 채택)