

식이에 첨가한 CLA Isomer가 쥐에서 대장점막의 세포사멸과 세포증식에 미치는 영향*

박현서^{*§} · 권필수^{*} · 윤정환^{**} · 하영래^{***}

경희대학교 생활과학대학 식품영양학과,^{*} 한림대학교 생명과학부,^{**} 경상대학교 응용생명과학부^{***}

Effect of Dietary CLA Isomers on Apoptosis and Cell Proliferation in Colonic Mucosa of DMH-Treated Rats

Park, Hyun-Suh^{*§} · Kwon, Pil-Su^{*} · Park, Jung HY^{**} · Ha, Yeong-Lae^{***}

Department of Food and Nutrition,^{*} Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Division of Life Sciences,^{**} Hallym University, Chunchon, Kangwon 200-702, Korea

Division of Applied Life Sciences, Graduate School,^{***} Gyeongsang National University, Chinju, Kyungnam 660-701, Korea

ABSTRACT

The study was designed to compare the anti-carcinogenic effect of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on colon carcinogenesis in 1,2-dimethylhydrazine (DMH)- treated rats by determining the levels of apoptosis, cell proliferation, eicosanoids and 1,2-diacylglycerol (DAG) in colonic mucosa. Sixty male Sprague Dawley rats were randomly divided into 3 groups depending on the types of CLA isomers, i.e. BT group (no CLA contained), CLA-C group (cis-9, trans-11 isomer contained), and CLA-T group (trans-10, cis-12 isomer contained). The experimental diet was composed of protein at 20%, carbohydrate at 56.2%, and fat at 14.5% including 0.8% CLA isomers by weight. The experimental diet was fed for 14 weeks with the initiation of intramuscular injection of DMH, which was injected twice a week for 6 weeks to give total dose of 180mg per kg body weight.

Two CLA isomers (c9t11 and t10c12) significantly increased the relative percentage of apoptosis but reduced cell proliferation in mucosal cell and also the levels of PGE₂, TXB₂, and DAG in colonic mucosa. However, there was no significant differences in anti-carcinogenic effect between c9t11 isomer and t10c12 isomer. Overall, colon carcinogenesis could be significantly inhibited by CLA isomers by increasing apoptosis and reducing cell proliferation, the levels of eicosanoids and DAG in colonic mucosa. (*Korean J Nutrition* 36(7): 661~666, 2003)

KEY WORDS : CLA isomers, apoptosis, cell proliferation, eicosanoid, DAG, colon cancer.

서론

CLA는 필수지방산인 linoleic acid (LA)의 탄소의 이중 결합 위치가 다른 기하학적 이성체로서 8번과 10번, 9번과 11번, 10번과 12번, 11번과 13번의 탄소원자에 이중 결합을 형성하고 cis와 trans형의 이성체를 포함하여 많은 이성체가 존재하는데 이중에서 cis-9, trans-11 isomer

(c9t11 isomer)와 trans-10, cis-12 isomer (t10c12 isomer)가 생리활성이 높은 것으로 알려져 있다.^{1,2)}

CLA의 항암효과에 관한 연구가 활발하게 진행 중에 있는데 CLA는 유방암 예방에 효과적인 인자로 apoptosis를 증가시킨다고 하였으며,³⁾ 결장암 세포의 세포증식을 억제시켰을 뿐 아니라⁴⁾ 각질세포 배양시 LA 처리군은 세포내 AA를 증가시킨 반면에 CLA 처리시에는 세포내 LA와 arachidonic acid (AA) 농도가 의존적으로 감소하였으며 AA에서 유래된 prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성이 억제되었다.⁵⁾ 또한 쥐에게 CLA가 0.5~1%수준으로 함유된 식이를 먹었을 때 대장점막세포에서 CLA는 세포막 인지질의 지방산 조성을 변화시켜 AA 함량이 감소하였으며 이에 따라 eicosanoid 함량과 1,2-diacylglycerol (DAG) 함량이 감

접수일 : 2003년 5월 9일

채택일 : 2003년 8월 4일

This work was supported by grant No.[R01-1999-000-00166-0(2002)] form the basic research program of the Korea Science & Engineering Foundation.

[§]To whom correspondence should be addressed.

소되었고 대장상피세포의 apoptosis를 증가시켜 암화과정을 억제할 수 있었다고 하였다.^{2,6-8)}

지금까지 CLA의 isomer 혼합물에 의한 항암효과에 관한 연구는 많이 이루어졌으나 CLA isomers 중 c9t11 isomer와 t10c12 isomer의 항암효과를 비교한 연구가 미비한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 DMH로 대장암을 유발시킨 쥐에서 CLA isomers (c9t11, t10c12)를 첨가한 실험식으로 사육한 후 대장상피세포의 apoptosis, 세포증식, 대장점막의 PGE₂, TXB₂와 DAG 함량을 측정하여 isomer 종류에 따라 대장의 암화과정에 미치는 효과를 비교하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험계획

생후 6주된 Sprague Dawley 중 수컷 쥐를 1주일간 일반 사료로 사육한 다음 체중에 따라 난괴법에 의하여 20마리씩 3군, 즉 BT군 (CLA 무첨가), CLA isomers로 c9t11 isomer 첨가군 (CLA-C), t10c12 isomer 첨가군 (CLA-T)으로 나누어 실험식으로 14주간 사육하였다. 동시에 모든 군에게 화학적 발암원인 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH, 99% Aldrich chemical Co, Milwaukee, Wis) 1.5 g을 0.9% saline 100 ml에 용해시킨 후 1 M NaOH로 pH 6.7이 되도록 조절하여 좌, 우 대퇴근에 교대로 근육 주사하였다. DMH 투여량은 주 2회씩 체중 kg 당 DMH 15 mg을 6주간 투여하여 총 투여량이 180 mg/kg 이 되도록 하였다.

2. 실험식이

실험식은 총 식이 무게 중 단백질이 20%, 당질이 56.2%, 지방이 14.5% (30% kcal)가 되도록 구성하였으며, 다른 성분의 양은 동일하게 하였다. 실험 식이에 사용된 지방 급원으로는 포화지방산이 주로 함유된 쇠기름을 사용하였고 필수지방산인 linoleic acid의 급원으로 옥수수유를 사용하였다. CLA는 각 실험식이 100 g당 CLA isomer가 0.8% (w/w) 되도록 공급하였다. 필수지방산의 결핍을 예방하기 위하여 linoleic acid가 3.7% kcal 수준이 되도록 모든 군에게 옥수수유를 첨가하였다 (Table 1). 실험동물은 12 hr dark-light cycle로 조절되었고 물과 사료는 자유롭게 먹을 수 있도록 공급하였으며, 체중은 일주일에 한번 같은 시간에 측정하였다.

3. 시료채취

실험기간이 끝나는 날 공복상태에서 세포증식 측정에 사용할 쥐는 해부하기 전에 5-bromo-2'-deoxyuridine

Table 1. Composition of experimental diets[†]

Ingredients	g/100 g diet		
	BT diet ¹⁾	CLA-C ²⁾	CLA-T ³⁾
Corn starch	56.20	56.20	56.20
Casein	20.00	20.00	20.00
L-methionine	0.30	0.30	0.30
α -Cellulose	3.70	3.70	3.70
Beef tallow	11.59	10.48	10.47
Corn oil	2.91	2.92	2.96
c9t11-rich oil ⁴⁾	-	1.10	-
t10c12-rich oil ⁵⁾	-	-	1.07
AIN93-Mineral mixture	4.00	4.00	4.00
AIN93-Vitamin mixture	1.00	1.00	1.00
Choline bitartrate	0.30	0.30	0.30
Total	100.00	100.00	100.00
	% Nutrients of calculated as calories		
Total calorie, kcal/100 g diet	435.3		
Protein, %	18.4		
Fat, %	30.0		
Carbohydrate, %	51.6		

1) BT diet contains no CLA in diet

2) CLA-C contains 0.8% (w/w) c9t11 isomer in diet

3) CLA-T contains 0.8% (w/w) t10c12 isomer in diet

4) c9t11-rich oil contains 72.50% (w/w) c9t11 isomer

5) t10c12-rich oil contains 74.62% (w/w) t10c12 isomer

[†]: All rats were intramuscularly injected with 1,2-dimethylhydrazine (DMH) 15 mg/kg twice a week for 6 weeks to give total dose of 180 mg/kg body weight.

(BrdU, Sigma)을 복강 주사한 후 정확하게 1시간 후에 ethyl ether로 마취시킨 후, 대장을 잘라낸 후 길이를 열어서 차게 해 놓은 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) buffer로 변을 잘 씻어낸 후 대장 후반부의 끝 부분으로부터 1.5 cm위에서 1 cm씩 자른다. 자른 조직을 펴서 여과지에 붙여 70% ethanol에 고정시켜 냉장 보관하였고, apoptosis 측정을 위해서는 10% formalin 용액에 고정시켜 냉장 보관하였다. 근육조직으로부터 분리한 대장점막은 TXB₂ 및 PGE₂, 1,2-diacylglycerol (DAG)의 함량을 측정하는데 사용하였다.

4. 대장점막의 조직학적 검사

1) 대장상피세포의 Apoptosis 측정

대장 상피조직의 apoptosis를 측정하기 위해서 대장을 절개한 후 Gavridli 등⁹⁾ 방법에 의해서 distal 끝 부분으로부터 1.5 cm을 잘라 펴서 여과지에 붙인 후 10% formalin 용액에 고정하여 통상적인 paraffin block을 만들고 조직을 4 μ m로 절편 후 ion coated slide에 고정시켰다가 apoptosis가 일어나는 정도를 세포의 DNA strand break의

DNA 3' -OH 말단에 terminal deoxynucleotide transferase (TdT) 결합에 기초를 둔 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 방법을 이용하여 세포의 변화 정도를 비교하였다. 조직 염색에는 ApoTag Peroxydase In Situ Apoptosis Detection Kit (Intergen, #S7100, NY)를 이용하여 진행하였다.

2) 세포증식 측정 (BrdU 방법)

대장조직에서 세포증식을 측정하기 위해 정확하게 쥐를 해부하기 1시간 전에 체중 kg 당 5 mg의 BrdU를 PBS (pH 7.4) buffer에 용해시켜 복강 주사하였다. 쥐를 해부한 후 대장의 distal 끝 부분으로부터 1.5 cm 잘라 퍼서 여과지에 붙인 후 70% ethanol solution에 저장하였다가 통상적인 paraffin block을 만들고 조직을 4 μm로 절편 후 ion coated slide에 고정시켰다가 면역조직학적 방법¹⁰⁾에 의해 BrdU staining kit (ZYMED, South San Francisco)를 이용하여 BrdU가 DNA에 결합된 정도를 관찰하였다.

5. 생화학적인 분석

1) Prostaglandin (PG)E₂와 thromboxane (TX)B₂ 함량 측정

TXB₂와 PGE₂¹¹⁾ 분석을 위해 대장 점막의 50 mg을 취해서 indomethacin이 함유된 0.05 M Tris solution (pH 8.0, 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA) 2 ml을 첨가한 후 균질화 하였다. 균질액을 37°C shaking water bath에 30분간 방치하였다가 0.35 ml ice cold ethanol을 첨가하고 여기에 1 M citric acid를 첨가하여 산성상태로 만든 후 4,000 × g에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 Amprep C-2 column (1 ml/100 mg column, Amersham Pharmacia biotech, England #RPN 1903)에 loading 한 후 methylformate를 통과시켜 얻은 용출액을 수집하여 질소 가스로 건조시킨 뒤 assay buffer에 용해시켜 약 5000배 희석하여 eicosanoid를 각각 TXB₂ enzyme immunoassay (EIA) kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK) 과 PGE₂ EIA kit를 사용하여 측정하였다.

2) 1,2-Diacylglycerol (DAG) 함량 측정

대장점막 100 mg을 취하여 Bligh와 Dyer¹²⁾의 방법으로 지질을 추출하고 이 과정에서 지방산의 분해를 막기 위해 추출용매에 butylated hydroxy toluene을 0.005% 첨가하였다. 이 지질 추출액은 질소 가스로 건조시킨 후 다시 일정량의 chloroform에 녹여 Duncan과 Lloyd¹³⁾의 방법을 이용하여 silica gel thin layer chromatography plate (Silica gel F254, Merck KGaA, Germany)에 전개시킨 후 1,2-DAG에 해당하는 부위를 긁어서 chloroform에 녹인 후 원심분리하여 일정량의 상층액을 취해 standard로 triglyceride 대신 diglyceride를 사용하여 Fletcher¹⁴⁾의 방법에 따라 함량을 측정하였다.

3) 통계분석

실험결과는 Statistic Analysis System program (SAS, 8.0 ver.)을 이용하여 two way-ANOVA 방법으로 검증하였으며, p < 0.05 유의수준에서 general linear model (GLM)을 이용해 Duncan's multiple test로 검증하였고, 모든 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였다.

결 과

14주간 사육한 결과 Table 2에서 사료 섭취량과 체중증가에 관한 것을 살펴보면 BT군에 비해 CLA-C군과 CLA-T군에서 사료를 유의하게 더 적게 섭취하였으나 CLA isomer군 (c9t11, t10c12)간에는 유의한 차이가 없었다. 사료 섭취량의 결과와 마찬가지로 동물의 마지막 체중이나 실험기간동안 증가된 체중도 BT군에 비해 CLA isomer를 공급한 두 군에서 더 낮았는데 통계적으로 유의한 수준은 아니었으며, CLA isomer군 (c9t11, t10c12)간에도 유의한 차이를 보이지 않았다.

1. 대장상피세포의 Apoptosis 수준

BT군에 비해 CLA isomer 군인 CLA-C와 CLA-T군에서 apoptosis 정도가 유의하게 높았으나 CLA-C군과 CLA-T군간에는 차이를 보이지 않았다 (Table 3).

Table 2. Feed intake and body weight gain during experimental period

Groups	Feed intake	Initial BW	Final BW	Weight gain
	g/day	g	g	g
BT	34.29 ± 2.08 ^a	250.20 ± 21.97 ^a	553.85 ± 65.56 ^{ab}	303.64 ± 53.07 ^{ab}
CLA (C)	32.55 ± 1.96 ^b	251.24 ± 21.80 ^{ab}	526.90 ± 35.86 ^b	275.66 ± 33.84 ^b
CLA (T)	31.16 ± 2.18 ^b	247.58 ± 16.35 ^b	530.12 ± 29.77 ^b	282.54 ± 30.34 ^b

Values are mean ± SD. N: 18 - 20 for each group
Values with different superscript are significantly different at p < 0.05

2. 대장상피세포의 Cell kinetic indices

Table 4에서와 같이 crypt circumference의 세포수효는 대장 점막의 crypt를 절단하여 circumference 세포수를 확인한 결과 BT군에 비해 CLA-T군에서는 유의하게 낮았으나 CLA-C군과는 차이를 보이지 않았고 CLA-C군과 CLA-T군간에도 차이를 보이지 않았다. 마찬가지로 crypt height는 각 crypt의 하단부터 상피까지 이르는 세포수를 말하는 것으로 BT군에 비해 CLA-C군에서는 유의하게 낮았으나 CLA-T군과는 유의한 차이가 없었고, CLA-C군과 CLA-T군간에는 유의한 차이를 보이지 않았다. Labeling index란 한 sample 당 10개의 crypt를 선택 하여서, 한 crypt를 구성하는 전체 세포중 BrdU로 labeled된 세포수를 상대적 %로 나타낸 다음 다시 각 군에 해당되는 여러 sample의 값을 평균 ± 표준편차로 계산하여 비교한 것이다. 그 결과 BT군에 비해 CLA isomer를 공급한 두 군인 CLA-C군과 CLA-T군에서 유의하게 낮았다. 그러나 CLA-C군과 CLA-T군 사이에는 유의한 차이를 보이지 않았다. Proliferative zone 값은 한 crypt내에서 세

포중식이 밑에서부터 상단으로 진행될 때 BrdU로 labeled된 제일 높은 위치의 세포수를 crypt 상단까지의 전체 세포수로 나누어 100을 곱하여 %로 표현한 것이다. 이때 BT군에 비해 CLA isomer를 공급한 CLA-C군과 CLA-T군에서 유의하게 낮았으며 CLA-C군과 CLA-T군 사이에는 유의한 차이가 없었다.

3. 대장점막의 TXB₂, PGE₂, DAG 함량

Table 5에서와 같이 대장점막조직에서 TXB₂ 함량은 BT군에 비해 CLA-C군에서만 유의하게 낮았고 CLA-T군에서는 유의한 차이를 보이지 않았으며, CLA-C군과 CLA-T군사이에도 유의한 차이를 보이지 않았다. PGE₂ 함량은 BT군에 비해 CLA-C군과 CLA-T군에서 유의하게 낮았으며 CLA-C군과 CLA-T군 사이에는 차이가 없었다. DAG 함량도 BT군에 비해 CLA-C군에서만 유의하게 낮았으며 CLA-C군과 CLA-T군간에도 차이가 없었다.

고 찰

Apoptosis는 특정 세포 자체 내에 내재된 프로그램에 의한 세포사멸로 유기체로부터 불필요한 해로운 세포를 제거하여 진화적인 과정이 유지되도록 해준다.¹⁵⁾ 병태 생리학적인 상태에서는 apoptosis가 정상적으로 조절되지 않아서 변이된 세포가 생존할 가능성이 높아질 뿐만 아니라 세포증식은 증가하고 세포사는 감소되어 균형을 이루지 못하고 암 발생이 촉진된다.¹⁶⁾ CLA는 유방암에서도 apoptosis를 증

Table 3. Effect of conjugated linoleic acid isomers on apoptosis index of colonic mucosa in DMH-treated rats

Dietary group	N	Apoptosis (%)
BT	6	43.06 ± 2.69 ^b
CLA-C	5	61.98 ± 3.33 ^a
CLA-T	5	63.52 ± 4.94 ^a

Values are mean ± SD. N: number of samples
Values with different superscript are significantly different at p < 0.05

Table 4. Effect of conjugated linoleic acid isomers on cell kinetic indices of colonic mucosa in DMH-treated rats

Dietary group	Circumference	Crypt height	Labeling index	Proliferative zone
	cells	cells	%	%
BT	28.59 ± 1.02 ^a	33.03 ± 1.15 ^a	8.41 ± 0.95 ^a	33.79 ± 2.27 ^a
CLA-C	27.06 ± 0.34 ^{ab}	29.59 ± 0.64 ^{bc}	5.24 ± 0.30 ^b	24.79 ± 1.05 ^{bc}
CLA-T	25.58 ± 0.91 ^{bc}	31.90 ± 1.17 ^{ab}	4.76 ± 0.24 ^b	26.71 ± 3.80 ^{bc}

mean ± SE
Means sharing common superscripts in the same column are not significant at p < 0.05
Crypt height: total number of cells in each crypt.
Labeling index: (total number of labeled cells/crypt height) × 100
Proliferative zone: (position of highest labeled cell/crypt height) × 100

Table 5. Effect of conjugated linoleic acid isomers on mucosal levels of eicosanoid and 1,2-DAG in DMH-treated rats

	TXB ₂	PGE ₂	1,2-DAG
	ng/mg tissue		μg/mg tissue
BT	1.58 ± 0.95 (9) ^a	0.40 ± 0.29 (5) ^a	0.172 ± 0.019 (5) ^a
CLA-C	0.58 ± 0.17 (8) ^c	0.10 ± 0.04 (6) ^c	0.139 ± 0.005 (7) ^b
CLA-T	1.02 ± 0.51 (8) ^{abc}	0.14 ± 0.04 (6) ^{bc}	0.164 ± 0.013 (5) ^{ab}

Values are mean ± SD (): Number of samples
Means sharing common superscripts in the same column are not significant at p < 0.05

가시켜 전암상태 부위를 50% 정도 억제시켰으며,³⁾ 대장암에서 쥐에게 CLA mixture를 0.5~1.5%까지 다르게 공급하였을 때 모두 apoptosis를 증가시켰다.⁶⁾ Ip 등¹⁷⁾의 연구에서는 정상적인 유선세포의 배양액에 c9,t11 isomer와 CLA mixture에 의해서 apoptosis가 효과적으로 증가되었다. 그러나 본 연구에서는 c9,t11 isomer와 t10,c12 isomer에 의한 효과를 동시에 비교해 본 결과 두개의 CLA isomer가 BT군에 비해 apoptosis를 유의하게 증가시켰다. 그러나 c9,t11 isomer와 t10,c12 isomer의 효과에는 차이가 없었다 (Table 3). CLA가 apoptosis를 증가시키는 것에 관한 기전은 아직 확립되지는 않았으므로 이와 관련된 분자생물학적 연구가 계속해서 이루어져야 할 것이다.

암화 과정의 촉진 및 진행단계에서 필수적으로 일어나는 현상인 세포증식을 촉진시키는 요인은 대장암 발생을 촉진하는 인자로 간주할 수 있다.¹⁸⁾ 세포증식이 촉진되었을 경우 생성되는 세포수가 탈락하는 세포수보다 더 많아짐으로 crypt size가 넓어지고 길어지게 되어 대장암의 발생위험이 증가되었으며,¹⁹⁾ 정상에서보다 labeling index와 proliferation 정도가 유의하게 높았다고 하였다.¹⁹⁾ 본 연구에서는 c9t11 isomer와 t10c12 isomer 각각 세포증식을 감소시켰으나 두 개의 isomer간의 차이는 볼 수 없었다.

각질세포 배양시 LA 처리군에서는 세포내 AA가 증가한 반면 CLA 처리군에서는 세포내 LA와 AA 농도가 의존적으로 감소하였으며 PGE₂ 생성이 억제되었다.⁵⁾ 이것은 CLA가 세포막내 PL의 지방산 조성을 변화시켜서 eicosanoid 합성을 조절하여 항암효과를 나타낸 것으로 보고하였다.^{5,6)} 대장암을 유발시킨 쥐에서도 CLA mixture (1%)를 공급하였을 때 대장상피세포의 apoptosis를 증가시켰으며, 대장 상피세포막 인지질의 AA의 함량을 감소시켰고 PGE₂, TXB₂의 함량도 감소시켰다.⁶⁾ Truitt 등²⁰⁾ 연구에 의하면 c9t11 isomer와 t10c12 isomer는 세포내 cyclooxygenase를 조절하여 혈소판의 TXB₂ 형성을 억제한다고 하였다.

지금까지 CLA mixture의 항암효과에 관해서는 많은 연구가 진행되고 있으나 CLA isomer에 관한 연구가 미비한 실정이다. 본 연구결과에 의하면 TXB₂는 c9t11 isomer에 의해서 감소되었고, PGE₂는 두 개의 isomer (c9t11, t10c12)에 의해서 유의하게 감소하였다. 그러나 c9t11와 t10c12 isomer간의 차이는 보이지 않았다 (Table 5). 이와 같은 결과는 CLA isomers가 세포막내 phospholipids의 지방산 조성을 변화시켜 세포막 인지질내의 AA를 감소시키므로 eicosanoid 합성을 조절하여 항암효과를 보인 것으로 사려된다.

1,2-diacylglycerol (DAG)은 대장 상피세포의 성장 프

로그래를 조절하는 protein kinase C (PKC)의 활성제로 알려져 있으며 중앙 촉진과 관련된 signal transduction에서 중요하다.²¹⁾ Phospholipase C (PLC)는 phospholipid 중 phosphatidylinositol (PI)의 가수분해를 촉진하여 1,2-DAG와 1,4,5-triphosphate (IP₃)를 생성하게 된다. Farquharson 등²²⁾의 보고에서는 전립선 암세포 배양액에 CLA를 첨가하였을 때 DAG 함량이 50% 감소하였고, 동물에게 CLA mixture를 먹었을 때 1,2-DAG 함량이 유의하게 감소하였다.⁶⁾ 본 연구에서는 CLA isomers를 동물에게 먹었을 때 BT군에 비해 c9t11 isomer에 의해서 DAG 함량이 유의하게 감소하였으나 두 개의 isomer(c9t11, t10c12)간에 차이는 볼 수 없었다 (Table 5).

CLA isomers에 의해 세포 내 2차 전령인 1,2-DAG의 함량이 감소되고 이에 따라 세포증식이 감소되었을 것이라고 사려된다. 아직 미발표자료이지만 본 연구실에서 얻어진 결과에 의하면 CLA isomer 군중 c9t11 isomer는 더욱 microsomal membrane에 유의하게 높게 incorporate되었지만 t10c12 isomer는 microsomal membrane에서 미량 정도밖에 검출되지 않았다. 그러나 1,2-DAG 형성이나 eicosanoid 형성에는 isomer 간의 유의한 차이를 발견하지 못하였다. 아직 CLA isomers의 항암효과를 비교한 연구가 발표된 바가 없으므로 비교하기는 어려운 시기이지만 앞으로 이에 관한 생화학적 기전에 관한 비교 연구가 더욱 흥미로울 수 있다고 사려된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 DMH로 대장암을 유발한 Sprague Dawley 중 수컷 쥐에게 식이지방에 CLA isomers를 각각 0.8% 수준으로 첨가시킨 실험식으로 14주간 사육하여 대장의 암화과정에 관한 기전을 연구하기 위하여 대장상피세포의 apoptosis와 세포증식, PGE₂ 및 TXB₂ 함량, 1,2-DAG 함량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 대장 상피세포에서의 apoptosis는 c9t11 isomer와 t10c12 isomer에 의해서 유의하게 증가되었으나 두 개의 isomer간의 apoptosis 증가효과에는 차이가 없었다.

2) Crypt circumference와 crypt height는 t10c12 isomer에 의해서 유의하게 낮았으며, labeling index와 proliferative zone은 c9t11 isomer와 t10c12 isomer에 의해서 유의하게 낮았다. 그러나 두 개의 isomer간의 세포증식 억제효과에는 차이가 없었다.

3) TXB₂와 1, 2-DAG 함량은 c9t11 isomer에 의해서 유의하게 낮았으며, PGE₂ 함량은 c9t11 isomer와 t10c12

isomer에 의해서 유의하게 낮았다. 그러나 두 개의 isomer가 TXB₂, PGE₂, 1,2-DAG 함량을 감소시키는 효과에는 유의한 차이를 보이지 않았다.

본 연구결과에 의하면 식이 지방에 첨가한 CLA isomers인 c9t11 isomer와 t10c12 isomer는 대장상피세포에서 암 억제효과에는 서로 유의한 차이를 보이지는 않았지만 두 개의 isomer는 모두 대장상피세포의 apoptosis를 증가시켰고 세포증식은 감소시켰다. 또한 대장점막에서 TXA₂와 PGE₂ 함량 및 1,2-DAG의 함량을 유의하게 감소시켜 암을 예방하는데 효과가 있는 것으로 나타났다.

Literature cited

- 1) Pariza MW, Park YH, Cook ME. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research* 40: 283-298, 2001
- 2) Belury MA. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. *J Nutr* 132: 2995-2998, 2002
- 3) Ip C, Ip MM, Loftus T, Shoemaker S, Shea-Eaton W. Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of the rat mammary gland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9(7): 689-696, 2000
- 4) MacDonald HB. Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge. *J Am Coll Nutr* 19(2): 111S-118S, 2000
- 5) Liu KL, Belury MA. Conjugated linoleic acid reduces arachidonic acid content and PGE₂ synthesis in murine keratinocytes. *Cancer Letters* 127: 15-22, 1998
- 6) Park HS, Ryu JH, Ha YL, Park HY. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Brit J Nutr* 86: 549-555, 2001
- 7) Whigham LD, Cook EB, Stahl JL, Saban R, Bjorling DE, Pariza MW, Cook ME. CLA reduces antigen-induced histamine and PGE₂ release from sensitized guinea pig tracheae. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 280: R908-912, 2001
- 8) Kim KH. Effect of dietary supplementation of conjugated linoleic acid on tumor incidence and colon carcinogenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. Doctoral Dissertation, *Kyung Hee Univ*, 2000
- 9) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992
- 10) Schutte B, Reyders MMJ, Bosman FT, Blijham GH. Studies with anti-bromo deoxyuridine antibodies: II. Simultaneous immunocytochemical detection of antigen expression and DNA synthesis by in vivo labeling of mouse intestinal mucosa. *J Histochem Cytochem* 35: 371-374, 1987
- 11) Granstron E, Samuelson B. In: Advances in prostaglandin and thromboxane research. JC Frolich, ed. *Raven Press*, New York 5: 1-13, 1981
- 12) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917, 1957
- 13) Duncan EM, Lyoyd JV. An increase in phosphatidic acid in the absence of changes in diacylglycerol in human platelets stimulated with ADP. *Int J Biochem* 25: 23-27, 1993
- 14) Fletcher MJ. A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin Chim Acta* 22: 393-397, 1968
- 15) Schulte-Hermann R, Bursch W, Kraupp-Grasl B, Oberhammer F, Wagner A. Programmed cell death and its protective role with particular reference to apoptosis. *Toxicology Letters* 64-65: 569-574, 1992
- 16) Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giar-diello FM, Zehnbauser BA, Hamilton SR, Jones RJ. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res* 55: 1811-1816, 1995
- 17) Ip MM, Masso-Welch PA, Shoemaker SF, Shea-Eaton WK, Ip C. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of normal rat mammary epithelial cells in primary culture. *Exp Cell Res* 250: 22-34, 1999
- 18) Schorkhuber M, Richter M, Dutter A, Sontag G, Marian B. Effect of anthraquinone-laxatives on the proliferation and urokinase secretion of normal, premalignant and malignant colonic epithelial cells. *Eur J Cancer* 34(7): 1091-1098, 1998
- 19) Wilson RG, Smith AN, Bird CC. Immunohistochemical detection of abnormal cell proliferation in colonic mucosa of subjects with polyps. *J Clin Pathol* 43(9): 744-747, 1990
- 20) Truitt A, McNeill G, Vanderhoek JY. Antiplatelet effects of conjugated linoleic acid isomers. *Biochim et Biophys Acta* 1438: 239-246, 1999
- 21) Pickering JS, Lupton JR, Chapkin RS. Dietary fat, fiber and carcinogen alter fecal diacylglycerol composition and mass. *Cancer Res* 55(11): 2293-2298, 1995
- 22) Farquharson A, Wu H-CL, Grant I, Graf B, Choung J-J, Eremin O, Heys S, Wahle K. Possible mechanism for the putative antiatherogenic and antitumorigenic effects of conjugated polyenoic fatty acid. *Lipid* 34: S343, 1999