

리놀레산에 의한 인체암세포의 성장 억제효과 및 암세포막 인지질 지방산 변화

임선영 · 이숙희 · 이세윤* · 박건영†

부산대학교 식품영양학과 및 암연구소

*동덕여자대학교 약학연구소

Growth Inhibitory Effect and Changes in Membrane Phospholipid Fatty Acid Composition on MG-63 and AZ-521 Human Cancer Cells by Linoleic Acid

Sun-Young Lim, Sook-Hee Rhee, Seh-Yoon Yi* and Kun-Young Park†

Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan Cancer Research Center,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

*Institute of Pharmacy, Dongduk Womans University, Seoul 136-714, Korea

Abstract

Linoleic acid(LA) was examined to evaluate its potential as a chemotherapeutic agent for MG-63 human osteosarcoma and AZ-521 gastric cancer cells. The treatment of LA(0.005% for 6 days) to the MG-63 and AZ-521 cancer cells inhibited growth of the cancer cells by 54% and 52%, respectively as compared to that of the controls. It also exhibited that LA with 0.01% concentration decreased the [³H] thymidine incorporation by more than 90% in the both cancer cells. In additions we observed morphological changes in MG-63 and AZ-521 cells under inverted microscope, and the changes in membrane fatty acid compositions of the cancer cells when LA was added at the level of 0.005%. The treatment with LA revealed that the contents of 16:0 and 18:0 decreased significantly, but fatty acids that C numbers are more than 20 and unsaturated(20:4, 22:6, and 24:4) increased, concomitantly the morphological changes of the cells were observed.

Key words: linoleic acid, human cancer cells, growth inhibition, membrane fatty acids

서론

지방과 암 발생율의 관계는 매우 복잡한 것으로 동물 실험에 의하면 옥수수유, 동물성 지방을 함유한 고지방식은 저지방식에 비해 대장암의 발생을 증가시키는 반면 야자기름, 올리브유 또는 tran-fat을 함유한 식이는 대장암의 발생율과는 유의적인 관계가 없었고 생선이나 어유의 섭취는 오히려 암의 발생을 억제하는 효과가 있었다(1). 식이지방은 직접적인 발암물질이기 보다는 종양의 생성이나 성장에 좀 더 적합한 환경을 제공하여 암의 발달 과정에 영향을 준다고 하겠으나 구체적으로 식이지방이 어떻게 암 발생에 영향을 미치는지는 정확히 규명되지는 않았다. 지금까지 제시된

기전으로는 세포내에서 free radical 및 과산화물의 생성이 증가하여 DNA나 단백질과 결합함으로써 세포기능에 이상을 초래하고 불포화지방산으로부터 유도된 호르몬의 기능을 갖는 eicosanoids가 발암을 진행시킨다고 알려져 있다(2).

최근 연구에서 linoleic acid(LA)가 prostaglandin의 합성을 변화시킴으로써 종양세포 증식을 억제한다는 보고가 나오고 있다(3-5). Zhu 등(6)은 Ehrlich ascites carcinoma와 Ehrlich solid carcinoma를 이식시킨 ACR mice에 linoleic acid를 투여하였을 때 항암효과가 있었음을 보고하였다. 이들은 복막의 지방산 조성을 gas chromatography로 분석한 결과 종양 유도군과 종양 유도군에 linoleic acid를 처리한 군의 복막의 지방산 구성성분

† To whom all correspondence should be addressed

이 변화되었음을 보고하였다. Siegal 등(7)은 linoleic acid(18:2)와 linolenic acid(18:3) 혼합액이 암을 가진 쥐의 생명 연장에 현저한 효과가 있었음을 보고하였다. Beggin(8)은 다중 불포화지방산이 선택적으로 작용하여 세포의 증식을 억제하였고 nonneoplastic 세포에서는 억제효과를 나타내지 않는다고 보고하였다. 이러한 지방산의 암에 대한 효과를 연구하였을 때 불포화지방산들이 포화지방산들 보다 종양세포를 사멸시키는데 더 효과적이었으며, 이들 중에는 linoleic acid가 가장 효과가 크다고 보고했다. Linoleic acid 등의 불포화지방산은 발암이나 노화작용의 주요원인으로도 생각되고 있지만 산화적 반응이 유도되지 않는 환경에서는 필수지방산으로서의 역할이나 항암적 기능을 수행하리라 추측된다(9).

본 실험에서는 linoleic acid의 *in vitro* 항암효과를 확인하기 위해 MG-63 인체 골육암세포와 AZ-521 인체 위암세포에 linoleic acid를 처리하여 암세포의 성장 억제효과 및 세포막의 인지질 지방산 구성의 변화를 검토하였고 역상 현미경의 관찰을 통하여 암세포의 형태학적 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

재료

Linoleic acid는 미국의 Sigma사로부터 구입하였으며, dimethyl sulfoxide(DMSO)에 일정 농도로 희석하여 사용하였다.

사용시약 및 기구

세포배양을 위해 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal calf serum(FCS), fetal bovin serum(FBS), 0.05% trypsin-0.02% EDTA 그리고 100unit/ml Penicillin-Streptomycin을 Gibco사(USA)로부터 구입하여 사용하였고 세포배양은 CO₂ incubator(Sanyo, model MCO96, Japan)를 사용하였으며 암세포 형태의 조직학적 관찰은 inverted microscope(Olympus, model PM-10AK, Japan)를 이용하여 실험하였다.

암세포 및 암세포 배양

암세포로서 인체 골육암세포인 MG-63은 한국 세포주은행(서울)으로부터, 인체 위암세포인 AZ-521은 Japanese Cancer Research Resources Bank(JCRB)-cell Bank(동경, 일본)로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였다. 또한 정상세포인 NRK(Mouse kidney fibro-

blast normal cell)은 부산대학교 의과대학 김희선 교수로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

암세포는 100units/ml의 Penicillin-Streptomycin과 10% FCS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 중인 세포는 일주일에 2번 refeeding하고 일주일 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 뒤 0.05% trypsin-0.02% EDTA(Gibco Co., USA)로 분리·계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

암세포 성장 억제 및 DNA합성 저해효과 실험

암세포 배양과 동일한 방법으로 배양하되 원심분리 후 집적된 암세포를 팔고루 분산되도록 잘 혼합하여 24 well plate에 20,000cells/ml의 농도로 seeding 하여 하룻밤 배양하였다. 0.1, 0.5, 1, 5, 10%로 녹인 LA시료를 10μl/ml medium에 첨가(0.001~0.1%/ml)하여 2일 마다 배지로 교체해서 배양 6일 후에 증식된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA 효소로 분리하여 각 세포수를 hemocytometer로 측정하여 대조군과 비교하여 암세포 성장 억제효과를 관찰하였다.

DNA합성 저해효과는 배양 48시간 후에 3μCi/ml의 [³H] thymidine이 표시화된 배지로 교체한 후 2시간 동안 배양한 후 표시화된 배지를 제거하고 고형성분을 1ml의 PBS로 2번 씻은 다음 1ml의 5% cold TCA를 첨가하여 4°C에서 냉장 방치하였다. 1시간 후 TCA를 제거하고 250μl의 1% SDS를 첨가하여 cells을 분리하기 위해 55°C에서 1시간 동안 가열하였다. Vial에 옮긴 후 125μl의 H₂O로 2번 씻어내고 3.5ml의 cocktail을 첨가한 후 vortexing하여 Beckman LS 250 Scintillation counter(USA)로 radioactivity를 측정하였다.

암세포의 형태학적 관찰

MG-63 인체 골육암세포 MG-63의 형태학적 관찰을 위해, 암세포를 20×10⁴cells/ml 농도로 seeding 한 후 0.005%의 LA가 첨가된 DMEM 배지로 이틀에 한번씩 교체하면서 2일간 배양한 뒤 암세포의 모양을 inverted microscope로 관찰하였다.

암세포막의 지방산 구성 변화 실험

세포막 분리

Grover 등(10)의 방법에 따라서 먼저 배양된 세포를 PBS로 2번 씻은 후에 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 분리하여 pellet을 만들었다. 여기에 homogenizing medium(250mM sucrose, 10mM triethanolamine-HCl, pH

7.4)로 무게의 10%를 첨가하였다. Tissue homogenizer (동경이화학기계, 일본)를 사용해서 8 speed에서 20 strokes 이상 homogenize시켰다. 4000rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 검은 부분의 pellet은 버리고 뿌연 부분과 상등액을 취하고 homogenize한 후 25,000rpm에서 45분 동안 원심분리하여 최종 pellet을 취하였다.

인지질 추출 및 지방산 측정

세포막의 sucrose 등을 제거하기 위해 membrane pellet을 50vol의 20mM Tris, 2mM EDTA(pH 7.2)로 희석하고 이것을 20,000rpm에서 60분 동안 원심분리한 후, 증류수(1ml)로 현탁하였다. 세포막 현탁액 1vol에 끓인 2-propanol 4vol을 첨가해서 이 혼합액을 30초 끓인 다음 냉각해서 항산화제 BHA를 함유한 클로로포름 8vol을 첨가하고 증류수 1vol을 첨가한 후 이 혼합액을 shaking하고 원심분리시켰다(11). 클로로포름층을 취한 후, 다시 물층에 클로로포름 4vol을 첨가하여 재추출한 후, 처음과 합하고 anhydrous sodium sulfate로 수분을 제거하였다. TLC를 사용하여 phospholipid를 분리하였는데 이때 전개용매 조건으로는 petroleum ether : diethyl ether : acetic acid(90 : 15 : 1, v/v/v)이었고 처음에 남아있는 phospholipid를 취해서 1% H₂SO₄를 함유한 methanol에 녹여 70°C에서 3시간 동안 수욕조에서 methylation시켰다. 다음에 methanol을 적당히 증발시킨 후 hexane을 첨가하고 shaking한 후 상층액을 취해서 anhydrous sodium sulphate로 수분을 제거한 후 질소가스로 hexane을 증발시키고 농축액을 gas chromatography로(Varian Star 36,000) 분석하였다. GC 분석에 사용한 detector는 flame ionization detector이고 column은 HP-5 capillary column(25m×ID 0.2mm×0.11μm)이었다. 분석된 지방산은 총 지방산에 대한 상대적인 양으로 계산하였다.

결과 및 고찰

암세포의 성장억제 및 DNA합성 저해효과

Linoleic acid(LA)가 정상세포에 비해서 암세포만 선택적으로 암세포 성장 억제효과를 지니는 지를 알아보기 위해 NRK 정상세포를 이용하여 세포 성장 억제효과를 검토하였다(Fig. 1). NRK에서는 0.001~0.01%의 농도까지 정상세포 성장에 영향을 끼치지 않음을 관찰할 수 있었고 0.05% 수준에서는 약 50% 정도의 성장 저해효과가 나타났으며 0.1% 이상에서는 급격한 성장 저해효과를 나타내어 0.1% 이상에서는 세포에 대한 독성을 관찰할 수 있었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 MG-63

암세포는 이미 0.001%에서부터 성장이 저해받아 0.01%에서는 90% 이상이 사멸되었고 AZ-521 암세포는 MG-63 암세포에서 나타난 결과와 유사하게 농도에 의존하여 저해효과가 증대되었다. 0.01% 첨가 농도에서는 86% 이상의 위암세포가 사멸되었다. 이러한 결과를 통해 LA가 일정농도에서는 암세포의 대해 선택적 성장 저해효과를 가지게 됨을 알 수 있었다. Salerno와 Smith (12)도 본 연구와 유사한 결과를 나타냈었는데 LA는 3개의 malignant human colon adenocarcinoma cell lines의 성장을 저해하였지만 정상세포에는 성장저해효과를 나타내지 않는 것으로 보고하였다.

암세포 성장의 저해효과는 DNA합성의 저해와 일치한다. 두 암세포는 비슷한 DNA합성 저해효과를 나타내었는데 linoleic acid의 첨가 농도 0.005%까지는 DNA 합성이 서서히 감소하다가 0.01% 농도 이하에서는 급격히 감소되어 두 암세포 모두에서 DNA 합성이 거의 일어나지 않는 것으로 관찰되었다(Fig. 3). 암세포는 DNA합성 수준에서 생성이 억제되어 결국 성장이 저해받는 것으로 나타났다.

암세포막내의 인지질 지방산 조성 및 암세포 형태의 변화

Biological cell membrane의 lipid bilayer에 있는 지질의 지방산 조성이 변형되었을 때 막의 유동성은 물론 세포내의 기능, 즉 막에 부착된 효소들, 막표면의 단백질 또는 receptor 노출 정도와 자극에 대한 반응들,

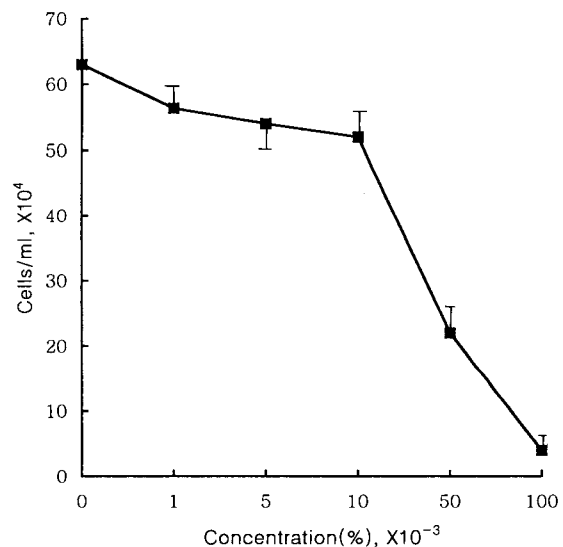


Fig. 1. Effect of various concentrations of linoleic acid on the growth of NRK normal cells.

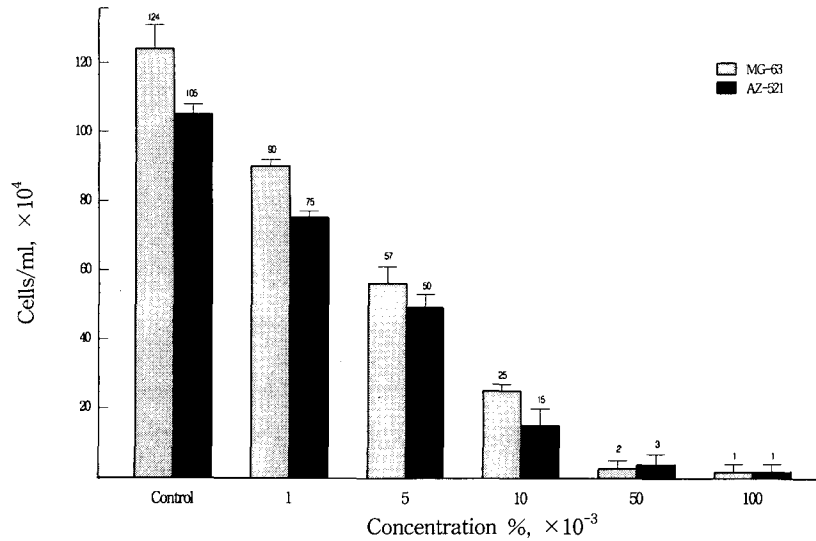


Fig. 2. Inhibitory effect of various concentrations of linoleic acid(LA) on the growth of MG-63 human osteosarcoma cells and AZ-521 human gastric cancer cells.

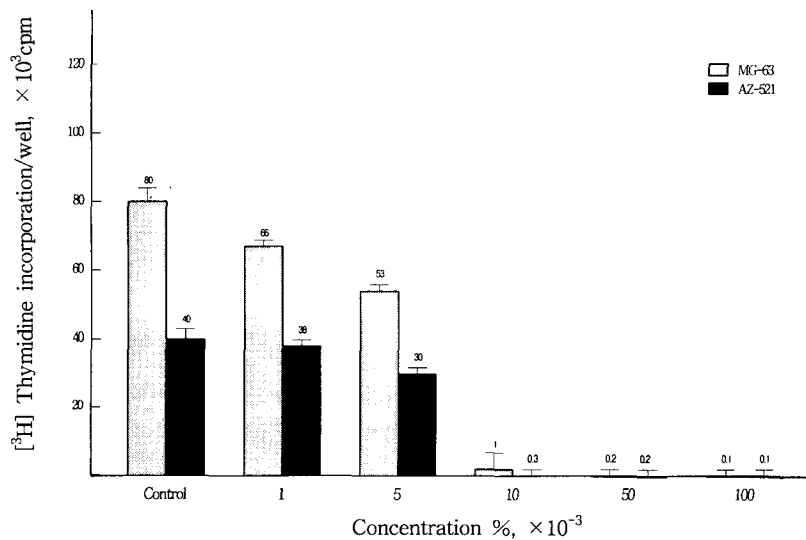


Fig. 3. [³H] Thymidine incorporation at different concentration of linoleic acid(LA) in MG-63 human osteosarcoma cells and AZ-521 human gastric cancer cells.

식균작용, amino acid transport 그리고 cholesterol esterification 등에 영향을 줄 수 있으므로 항암기작의 과정으로 받아지고 있다(13). 또한 lipid bilayer를 구성하고 있는 phospholipid의 fatty acid의 unsaturated 정도가 클수록 membrane fluidity가 증가하므로 세포막 생화학 분야에서도 관심이 있는 분야이다. 본 연구에서는 membrane의 lipid bilayer를 구성하고 있는 인지질의 지방산의 조성의 변화를 보기 위해 암세포를 배양해

서 대조군과 linoleic acid 첨가 실험군과의 형태를 비교해서 형태의 변형을 일으킨 농도에서, 이들 대조군과 LA를 첨가해서 배양한 암세포의 세포막을 추출하고 인지질의 지방산 조성을 관찰해 보았다. LA를 처리해서 형태가 변형된 암세포들의 세포막 인지질의 지방산 조성이 대조군에 비해 16:0과 18:0(AZ-521의 경우), 그리고 18:3의 지방산 함량은 현저하게 감소하는 반면 20 이상의 탄소수를 가지거나 불포화도가 높은 지방산

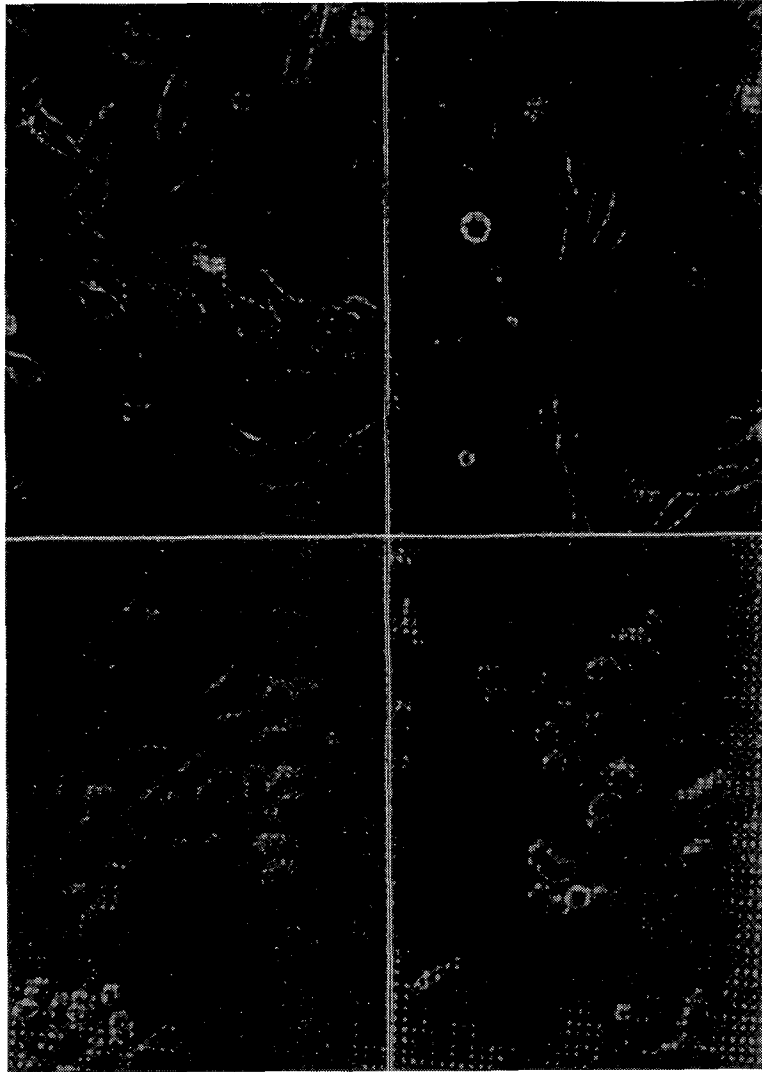


Fig. 4. Photomicrographs of MG-63 human osteosarcoma cells and AZ-521 human gastric cancer cells incubated for 48hrs with or without linoleic acid(0.005%) ($\times 200$).

MC: MG-63 cells, control

ML: MG-63 cells, linoleic acid treated

AC: AZ-521 cells, control

AL: AZ-521 cells, linoleic acid treated

이 증가함을 관찰할 수 있었다(Table 1). 특히 20:4, 24:0, 그리고 24:4은 LA처리 실험군에서 현저히 증가하였으며 22:0과 22:4는 나타나지 않았다. 한편 Fig. 4는 LA를 0.005% 첨가했을 때 암세포의 형태적인 변형을 찍은 사진이다. MG-63 세포는 LA의 처리시 암세포가 긴 형태로 변형되었고 AZ-521세포는 둥근형태로 변형되는 것을 관찰할 수 있었다.

LA처리 후 긴 형태로 변형이 되어 정상세포의 형태를 나타낸 것은 LA에 의한 세포막의 인지질 대사에 변형됨을 의미한다. 암세포의 형태가 변형되었을 때 이들

세포막을 추출했으므로 앞서도 언급한 phospholipid fatty acid의 불포화도가 높을수록 membrane fluidity가 크다는 설명과도 일치하는 것으로 보인다. 또한 extracellular matrix의 fibronectin은 세포의 접착성을 증가시켜 결국 정상적 세포의 형태를 유지하는데 관여하는 것으로 암세포의 경우 이러한 물질의 합성이 저해된다고 알려져 있다(14). Franceshi 등(15,16)은 1,25-(OH)₂ vitamin D₃를 처리했을 때 MG-63세포가 이와 같이 긴 형태 변화로 변형되어지고 이때 extracellular matrix인 fibronectin(FN)의 mRNA와 단백질 합성도

Table 1. Relative fatty acid composition of phospholipid in cell membranes of AZ-521 human gastric cancer cells and MG-63 osteosarcoma cells when linoleic acid(LA, 0.005%) was treated

Fatty acid	AZ-521		MG-63	
	Control	LA	Control	LA
16 : 0	25.3	9.0	22.3	20.2
18 : 0	4.2	2.6	1.7	2.9
18 : 1	1.8	2.8	2.9	2.2
18 : 2	2.2	9.4	8.9	11.8
18 : 3	6.2	2.1	21.0	5.0
20 : 0	7.9	7.8	6.9	7.8
20 : 4	2.1	10.7	0.9	8.4
22 : 0	1.7	-	0.4	-
22 : 2	10.7	11.2	8.6	8.0
22 : 4	8.6	-	1.6	-
22 : 6	1.5	8.4	1.1	1.4
24 : 0	17.4	24.9	17.3	22.2
24 : 4	10.5	11.3	6.7	10.5

증가된다고 보고하였다. 인지질 대사의 과정에서 생기는 생성물에 의해 protein kinase C(PKC)의 활성도의 조작으로 tumor promoter의 관련의 기작도 예측해 볼 수 있다. PKC는 신호전달계에 중요한 효소의 하나이므로 이와 관련된 oncogene의 발현정도, 세포종식과의 연관성을 분자수준에서 계속 연구되어야 할 과제이다. 또한 이러한 형태적인 변형은 암세포에서는 찾아 볼 수 없는 정상세포의 apoptosis와 관련되어 있다고 사료되어진다. Linoleic acid의 항암 효과에 대한 기전을 고려할 때 세포막의 기능적 변화를 일으키고 선택적 독성에 의한 것도 중요시 여겨진다. 특히 암세포는 정상세포에 비해 성장은 매우 빠르나 방어기작은 약화되어 있는 상태이므로 linoleic acid 투여시 암세포의 인지질막에 존재하는 lipid의 조성 변화와 생리적 및 물리적 변화로 인해 기능상의 저하, 그리고 tumor promoter에 대한 sensitivity 감소 등에 기인한 것으로도 여겨진다.

Linoleic acid(LA)는 인체 골육암세포인 MG-63과 인체 위암세포인 AZ-521의 성장을 크게 저해하였고 암세포의 형태적 변화를 유발하였으나, 정상세포에는 안정하여 암세포에 선택적으로 반응할 수도 있다. MG-63와 AZ-521같은 암세포에 LA처리하는 암세포막의 구성 지방산을 변형시켜 형태학적인 변형을 유발하였는데 특히 LA처리로 16:0과 18:0이 현저하게 감소되고 반면 18:2와 20 이상의 탄소수를 가진 불포화도가 높은 지방산을 증가시켰다. 이로서 LA는 암세포의 성장 억제효과 및 암세포의 DNA합성 저해와 암세포의 세포막의 지방산 종류의 변형, 막의 유동성 변화와 함께 여러 분자 생물학적, 생리적 영향을 끼치리라 사료된다.

요 약

MG-63 골육암세포 및 AZ-521 인체 위암세포 성장에 미치는 리놀레산(LA)의 성장 억제효과와 이때 암세포막의 인지질 유리지방산 조성 변화에 대한 연구를 하였다. LA 첨가 농도 0.005%에서 MG-63 암세포와 AZ-521 암세포는 대조군에 비해 각각 54% 및 52%의 암세포 성장이 억제되었다. 또한 LA 첨가(0.01%)시 이들 암세포의 [³H] thymidine 결합능은 90% 이상이 억제되어 암세포의 DNA합성이 크게 억제되었다. 한편 LA(0.005%) 첨가시 각 암세포의 형태학적인 변형을 유발시켰으며 세포막의 인지질 지방산 조성의 변화가 관찰되었다. LA처리하는 이런 세포의 형태적 변형과 함께 세포막의 인지질 중 16:0과 18:0의 지방산은 현저히 감소되었으나 탄소수가 20 이상의 탄소수를 가지거나 불포화도가 높은 지방산(20:4, 22:6, 24:4)은 증가되었다.

문 헌

- Erasmus, U. : Fats and oils. Alive Books, Canada(1986)
- 磯田好弘, 崔春彦 : α -Linolenic acid의 생리기능. 식품과학과 산업, **23**, 58(1990)
- Booyens, J., Engelbrecht, P., Le Roux, S. et al : Some effect of essential fatty acids linoleic acid and α -linolenic acid and of their metabolites γ -linolenic acid, arachidonic acid, eicosapentanoic acid, docohexaenoic acid, and of PGA₁ and E₂ on the proliferation of human osteogenic sarcoma cells in culture. *Prostaglandins Leukot Med.*, **15**, 15(1984)
- Elattar, T. M. A. and Lin, H. S. : Comparison of the inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on prostaglandin synthesis I oral squamous carcinoma cells. *Pros. Leuk. Ess. F.A.*, **38**, 119(1989)
- Pace-Asciak, C. and Wolfe, L. S. : Inhibition of prostaglandin synthesis by oleic, linoleic, and linolenic acids. *Biochem. Biophys. Acta.*, **152**, 784(1968)
- Zhu, Y. P., Su, Z. W. and Li, C. H. : Growth-inhibition effects of oleic acid, linoleic acid and their methyl esters on transplanted tumors in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 1302(1989)
- Siegel, I., Liu, T. L. and Yaghoubzadeh, E. : Cytotoxic effects of free fatty acids on ascites tumor cells. *JNCT.*, **78**, 271(1987)
- Begin, M. E. : Effects of polyunsaturated fatty acids and of their oxidation products on cell survival. *Chem. Phys. Lipids*, **45**, 269(1987)
- Park, K. Y., Moon, S. H., Cheigh, H. S. and Baik, H. S. : Antimutagenic effects of doenjang(Korean soy paste). *J. Food Sci. Nutr.*, **1**, 151(1996)
- Grover, A. K., Kwan, C. Y., Garfield, R. E., Mclean, J., Fox, J. E. T. and Daniel, E. E. : Fractionation and Ca uptake studies on membranes of rabbit longitudinal and circular intestinal smooth muscle. *Canadian. J.*

- Physiol. Pharmacol.*, **58**, 1102(1980)
11. Gibson, R. A., Mumuchie, E. J., Charnock, J. S. and Kneebone, G. M. : Homeostatic control of membrane fatty acid composition in the rat after dietary lipid treatment. *Lipid*, **19**, 942(1984)
 12. Salerno, J. W. and Smith, D. E. : The use of sesame oil and other vegetables oil in the inhibition of human colon cancer growth *in vitro*. *Mutat. Res.*, **11**, 209(1991)
 13. Yoo, T. J., Kuo, C. Y. and Spector, A. A. : Effect of fatty acid of cultured hepatoma cells on susceptibility to natural killer cells. *Cancer Res.*, **42**, 3596(1982)
 14. Stubbs, C. D. and Smith, A. D. : The modification of mammarian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochem. Biophys. Acta*, **779**, 89(1984)
 15. Franceschi, R. T., James, W. M. and Zerlauth, G. : 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ specific regulation of growth, morphology and fibronectin in a human osteosarcoma cell line. *J. Cell Physiol.*, **123**, 401(1985)
 16. Franceschi, R. T., Linson, C. J., Peter, T. C. and Romano, P. R. : Regulation of cellular adhesion and fibronectin synthesis by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Biol. Chem.*, **262**, 4165(1987)

(1997년 5월 8일 접수)