

쥐에서 식이 Calcium이 대장 암화과정의 세포증식과
대장점막의 Eicosanoid 및 1,2-diacylglycerol
수준에 미치는 영향*

김 채 종 · 박 현 서
경희대학교 가정대학 식품영양학과

Effect of Dietary Calcium on Cell Proliferation and Colonic Mucosal Levels of
Eicosanoid and 1,2-diacylglycerol in Colon Carcinogenesis of Rats

Kim, Chae-Jong · Park, Hyun-Suh
Department of Food and Nutrition, Kyung Hee University, Seoul, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to observe the effect of dietary calcium(Ca) level on colonic mucosal levels of cell proliferation, 1,2-diacylglycerol(DAG), TXB₂, PGE₂ and phospholipid fatty acid composition which have been known as biomarkers for colon cancer. One hundred male Sprague Dawley rats, at 7 weeks of age, were divided into two fat type groups, each group of which was further divided into two Ca level groups. Each rat was intramuscularly injected with 1,2-dimethylhydrazine(DMH) for 6 weeks(total dose of 180mg/kg body weight) and simultaneously fed one of four experimental diets containing 15% dietary fat(corn oil or perilla oil) and 0.3% or 1.0% Ca by weight for 20 weeks. Compared to corn oil, perilla oil significantly reduced cell proliferation by decreasing labeling index, proliferating zone, crypt length in colonic mucosa and colonic mucosal levels of DAG, TXB₂, PGE₂ and phospholipid (PL) arachidonic acid distribution. The effect of Ca on biomarkers was different depending on the type of dietary fat consumed. Ca effect was not significantly shown in the PO group, but it was significant in the CO group in which high Ca(1.0%) decreased the levels of PL-C20 : 4(%), DAG and PGE₂. However, high Ca supplementation had shown only the trends of improving cell proliferation. Overall, high dietary Ca significantly reduced cell proliferation by inhibiting the synthesis of eicosanoid and DAG with reduced distribution of PL-C20 : 4, which may have resulted in lower activation of PKC through reduced signal transduction. Since a high level of dietary Ca was more effective in reducing the risk factor against colon cancer in corn oil fed rats, it could be suggested that a higher amount of dietary Ca be consumed, especially when more vegetable oil rich in linoleic acid is included in the diet. (*Korean J Nutrition* 31(1) : 21~27, 1998)

KEY WORDS : colon cancer biomarker · cell proliferation · diacylglycerol · PGE₂ · calcium level · corn oil · perilla oil.

채택일 : 1998년 1월 4일

*본 연구는 한국학술진흥재단 1993-95년도 자유공모과제 연구결과중의 일부임.

서 론

역학조사에 의하면¹⁾ Finland인의 식이는 지방의 총 섭취량이나 지방산조성은 미국인의 식생활과 큰 차이가 없음에도 불구하고 대장암 발생률이 더 낮았다는 것은 이 민족들의 calcium(Ca) 섭취량이 높았기 때문이라고 하였다. 그러나 일본인과 미국인의 식습관 조사²⁾에 의하면 미국인이 Ca 섭취가 더 높았음에도 불구하고 대장암 발생률은 높았기 때문에 Ca 섭취량과 대장암 발생률이 반드시 정의 상관관계를 보이는 것은 아니었다. 이와 같은 역학 연구결과는 Ca이 대장암 발생에 미치는 영향은 같이 섭취하는 여러가지 영양소에 의해서도 영향을 받기 때문이라고 사려된다.

식이중 Ca 함량이 종양발생에 어떤 생화학적 기전을 통해 영향을 미치는지는 아직 확실하게 밝혀지지는 않았다. 동물실험에 의하면 식이의 Ca는 주로 간접적인 영향에 의한 것으로 Ca이 장내에서 유리지방산이나 bile acid와 같은 물질과 결합하여 불용성염을 형성하므로서 toxicity로부터 장내 상피세포를 보호하여 대장 상피세포의 증식을 감소시켜 종양발생을 억제할 것이라고 하였다³⁾. 그러나 식이지방의 함량이나 종류에 의해 Ca의 protective effect가 서로 다르게 나타난 연구 결과들도 보고되었다⁴⁾⁵⁾. 지금까지 식이의 Ca이 대장암 발생에 미치는 영향에 대해서 단편적인 연구는 이루어졌으나 대장암을 유발시키고 종양발달이 촉진되는 과정에서 식이 Ca이 어떠한 생화학적 기전을 통해 영향을 미치는지에 대한 연구는 거의 없는 실정이며 특히 대장암의 주요 biomarker로 알려진 대장점막의 지방산조성이나 1,2-diaclyglycerol(DAG) 수준에 미치는 영향에 대해서는 연구가 이루어지지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 두가지의 식이지방에 각각 첨가한 Ca이 어떤 생화학적 기전에 의해 대장 암화과정에 영향을 미치는지 관찰하고자 biomarker로서 대장점막의 세포증식(in vivo cell proliferation), 대장점막 인지질의 지방산조성, eicosanoid 및 DAG 등의 함량을 비교하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험계획

Sprague Dawley종 수컷 흰쥐 100마리를 생후 7주까지 고형사료로 사육하여 체중에 따른 난괴법에 의해 4군 즉, 식이지방 종류에 의해 크게 두군(corn oil군과 perilla oil군)으로 나누고 이를 다시 Ca수준(0.3%, 1.0%)

Table 1. Diet composition of experimental groups

Ingredient	Experimental groups	
	0.3% Ca diet	1.0% Ca diet
Corn starch	54.0	54.0
Casein	22.0	22.0
Fat(CO or PO)	15.0	15.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2
Vitamin mix ¹⁾	1.0	1.0
Mineral mix ²⁾	4.0	4.0
α -Cellulose	3.5	3.5
CaHPO ₄	-	1.3

1 : Vitamin A and E were provided at the level of 4800 IU and 180 IU per kg diet, respectively

2 : 0.3% Ca diet contains 255g CaHPO₄/kg mineral mixture(AIN-76). 1.0% Ca diet contains 500g CaHPO₄/kg mineral mixture(AIN-76).

CO or PO : corn oil or perilla oil used as fat source.

에 따라 각각 두군씩으로 나누었다. 실험식은 Table 1에서와 같이 탄수화물은 식이무게의 54%, 단백질은 22%, 지방은 15%로서 식이의 지방산조성과 Ca의 함량만을 다르게 구성하여 20주동안 먹였다. 발암원인 1,2-dimethylhydrazine(DMH)을 체중 kg당 15mg씩 주 2회 6주간 총 180mg/kg을 근육주사 하였다.

2. 시료준비

실험기간이 끝나는 날 공복상태에서 diethyl ether로 마취시켜 대장을 취하여 절개한 후 점막을 saline(4℃)에 적신 탈지면으로 가볍게 닦아내고 점막층에서 mucosa를 spetula로 분리하여 -70℃에 보관하였다.

3. 생화학적 분석

1) In vivo cell proliferation(BrdU test)

대장조직에서 in vivo cell proliferation을 검증하기 위해 쥐를 희생시키기 1시간 전에 체중 kg당 5mg의 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)을 phosphate buffer saline(pH 7.4)에 용해시켜 복강주사하였다. 쥐를 희생시킨 후 대장의 distal 부분에서 1cm를 잘라 펴서 고정하여 Carnoy's solution에 저장하였다가 통상적인 paraffin block을 만들고 조직을 4 μ m로 절편 한후 면역조직학적 방법⁶⁾에 의해 BrdU가 DNA에 유입된 정도를 관찰하였다.

2) 대장점막 phospholipid의 지방산조성 및 DAG 함량

대장점막의 일정량을 취하여 Bligh와 Dyer 방법⁷⁾으로 지질을 추출하였으며 이때 지방산의 분해를 막기 위해 용매에 butylated hydroxytoluene을 0.005% 되게 첨가하였다. 추출한 지질은 질소 가스로 완전히 건조시켜 일정량의 chloroform에 용해시킨 후 silica

gel TLC plate에 spot하여 Kaufmann과 Makus방법⁶⁾으로 전개시켰다. 전개 후 phospholipid(PL)와 DAG에 해당하는 부위를 취해 일정량의 chloroform에 용해시켜 Morrison과 Smith 방법⁷⁾에 따라 methylation 시킨 후 gas chromatography(Hewlett Packard Model 5890 II)를 이용하여 전보고서¹⁰⁾와 동일한 방법으로 지방산 조성을 검토하였다. DAG 함량은 첨가한 internal(heptadecanoic acid, Sigma) 양을 표준으로 지방산 함량을 산출하였다. 1 mole의 DAG에는 2 mole의 지방산이 결합되어 있으므로 지방산의 mole수로 부터 총 DAG의 mole수를 계산하였으며 1,2-diacylglycerol(1,2-DAG)과 1,3-DAG가 동일한 양으로 존재한다고 가정하여 총 DAG 함량에서 1,2-DAG의 mole수를 계산하였다.

3) 대장점막의 TXB₂와 PGE₂

TXB₂와 PGE₂ 분석을 위해 대장점막을 일정량 취해서 0.05 M Tris-buffer(pH 8.0, 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA)내에서 잘게 쪼갠 혼합액을 37°C shaking water bath에 30분간 방치하였다가 0.35ml ice cold ethanol을 첨가하고 여기에 1 M의 citric acid를 첨가하여 pH 3-3.5의 산성상태로 만든 후 원심분리하였다(4000g, 15분). 상층액을 취하여 C-18 solid phase extraction column에 loading하여 처리한 후 methyl formate를 통과시켜 얻은 추출액을 수집하여 질소가스로 건조시킨 뒤 ethanol에 용해시켜 TXB₂와 PGE₂를 각각 [¹²⁵I]TXB₂ kit와 [¹²⁵I]PGE₂ kit(DuPont/NEN Research Product, Boston, MA)를 사용하여 radioimmunoassay하였다.

4. 통계처리

모든 실험결과의 통계처리는 Statgraphics 통계 program을 이용하였으며 결과는 mean과 standard error(SE, 표준오차)로 표시하였다. 식이지방의 종류와 Ca 함량과의 상호작용을 검증하기 위해 2 way-ANOVA로 분석하여 유의성을 검증하였다(p<0.05).

결 과

1. Cell kinetic index

식이지방과 Ca 함량이 cell proliferation에 미치는 영향을 Table 2에서 살펴보면, CO군에 비해 PO군에서 crypt length가 유의성있게 짧았으며(p<0.05), 식이 Ca 함량은 식이지방보다는 큰 영향을 주지 않았으나 Ca 함량이 증가함에 따라 crypt length가 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. Crypt 당 총 세포수는 Ca함량과 무관하게 CO군에 비해 PO군에서 유의성있게 낮았으며 Ca 함량을 0.3%에서 1.0% 수준으로 증가시킨 경우에는 CO군과 PO군 모두에서 감소하였으며 특히 CO군에서 유의성있게 감소하였다. Labeling index와 proliferating zone은 CO군에 비해 PO군에서 유의성있게 낮았으나 Ca에 의한 영향은 뚜렷하게 나타나지 않았다. 그러나 CO군과 PO군 모두 Ca 함량이 증가함에 따라 약간은 감소하는 경향을 보여주고 있으므로 Ca 함량을 증가시킬 경우 전체적으로 cell kinetic index가 개선되는 것으로 나타났다.

2. 대장점막 인지질의 지방산 조성

식이지방이 대장점막 인지질의 지방산조성에 미치는 영향을 Table 3에서 살펴보면, Ca 함량과 무관하게 식이지방에 의한 영향이 뚜렷하여 C18 : 2와 C20 : 4의 함량은 CO군에서 유의성있게 높았고 C18 : 3은 PO군에서 높았다. 그러나 CO군에서는 Ca을 0.3%에서 1.0% 수준으로 증가시켰을 때 C18 : 2와 C20 : 4 분포가 1/4 수준으로 유의하게 감소하였다.

3. 대장점막의 DAG 함량

Ca 수준이 1,2-DAG 함량에 미치는 영향을 Fig. 1에서 살펴보면, Ca 함량을 0.3%에서 1.0% 수준으로 증가시켰을 때 DAG 함량은 역으로 감소하였으며 특히 CO군에서는 50%정도 감소하여 유의성있는 차이를 보

Table 2. Effect of Ca levels on cell kinetic indices in distal colon of DMH-treated rats fed different fats

	Corn oil		Perilla oil	
	0.3% Ca	1.0% Ca	0.3% Ca	1.0% Ca
Crypt length(cells)	42.0 ± 0.9 ^b	39.8 ± 0.7 ^b	34.0 ± 0.7 ^{ab}	33.0 ± 0.7 ^a
Total cells per crypt(cells)	1027.5 ± 11.8 ^c	935.7 ± 19.1 ^b	776.2 ± 19.3 ^a	708.5 ± 13.2 ^a
Labeling index(%)	28.0 ± 0.8 ^c	25.6 ± 0.9 ^{bc}	23.0 ± 0.8 ^{ab}	19.7 ± 0.8 ^a
Proliferative zone(%)	64.7 ± 0.8 ^b	61.5 ± 1.2 ^b	40.2 ± 1.0 ^a	37.5 ± 2.4 ^a

Mean ± SE, N=6.

Means sharing common superscripts in the same row are not significant at p<0.05.

Crypt length = total # of cells in each crypt

Total cells per crypt = crypt length x circumference

Labeling index = (total # of labeled cells/crypt length) x 100

Proliferative zone = (position of highest labeled cell/crypt length) x 100

Table 3. Effect of Ca levels on fatty acid composition of colonic mucosal phospholipid in DMH-treated rats

Fatty acids	Dietary groups				Oil	P-value	
	Corn oil		Perilla oil			Ca	DMHxCa
	0.3% Ca	1.0% Ca	0.3% Ca	1.0% Ca			
%	%	%	%				
C16 : 0	18.81 ± 0.28 ^a	36.85 ± 1.61 ^c	24.67 ± 2.75 ^b	39.29 ± 1.28 ^c	0.029	<0.001	NS
C18 : 0	6.01 ± 0.75 ^a	32.06 ± 1.24 ^c	24.32 ± 2.18 ^b	37.31 ± 1.57 ^d	<0.001	<0.001	<0.001
C18 : 1n9	27.92 ± 1.17 ^d	9.59 ± 1.48 ^b	18.39 ± 2.27 ^c	3.94 ± 0.83 ^a	<0.001	<0.001	NS
C18 : 2n6	40.59 ± 0.38 ^c	10.05 ± 1.53 ^b	3.06 ± 2.32 ^b	4.10 ± 0.47 ^a	<0.001	<0.001	<0.001
C18 : 3n3	0.60 ± 0.16 ^a	ND	6.90 ± 2.42 ^b	2.92 ± 0.33 ^a	<0.001	<0.001	<0.001
C20 : 4n6	2.27 ± 0.21 ^b	0.13 ± 0.13 ^a	ND	ND	<0.001	<0.001	<0.001
C20 : 5n3	0.12 ± 0.12	ND	1.58 ± 1.58	ND	NS	NS	NS
C22 : 5n3	0.13 ± 0.13 ^a	ND	3.20 ± 1.43 ^b	3.10 ± 0.10 ^b	<0.001	NS	NS

Values are Mean ± SE and expressed as relative % of total fatty acids. N=5.

ND : not detected, NS : not significant

Means with different superscripts in the same row are significant at p < 0.05.

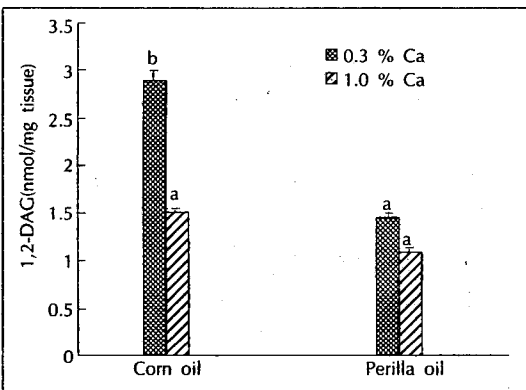


Fig. 1. Comparison of the effect of calcium on 1,2-diacylglycerol in colonic mucosa of DMH-treated rats. Mean ± SE. Bars with different letter are significant at p < 0.05.

였다. 또한 식이지방에 의해서도 영향을 받아 0.3% Ca 수준에서는 CO군이 PO군보다 높았으나 Ca 함량이 1.0%로 증가되었을 때는 두 군간에 차이를 보이지 않아 Ca 영향은 DAG 생성이 높았던 군에서 더 효과적으로 DAG의 함량을 낮춰주는 것으로 나타났다.

4. 대장점막의 PGE₂와 TXB₂의 수준

Table 3에서 PGE₂의 수준을 살펴보면 Ca 0.3% 수준에서는 식이지방의 영향이 뚜렷하게 나타나 PO군에 비해 CO군에서 2배 이상 높았으나 Ca 1.0% 수준에서는 CO와 PO군이 유의성있는 차이를 보이지 않았다. 즉, Ca 수준을 증가시켰을 때 PGE₂ 수준을 감소시켰는데 PO군에서는 큰 변화를 보이지 않았던 반면에 CO군에서는 50% 수준으로 감소하여 유의성있는 변화를 보인 것이다. TXB₂의 경우는 PGE₂와는 다르게 Ca 함량에 의한 효과를 나타내지 않은 반면 식이지방에 의한 효

Table 4. Effect of calcium levels on colonic mucosal levels of thromboxane B₂ and prostaglandin E₂ in DMH-treated rats

Dietary oils	Calcium levels	TXB ₂		PGE ₂	
		µg/g tissue			
Corn oil	0.3%	7.84 ± 0.65 ^b	9.48 ± 1.14 ^b		
	1.0%	10.07 ± 0.83 ^b	5.01 ± 0.41 ^a		
Perilla oil	0.3%	5.02 ± 0.72 ^a	4.43 ± 0.34 ^a		
	1.0%	3.46 ± 0.26 ^a	3.69 ± 0.34 ^a		
P-value					
Oil		<0.001	0.001		
Ca		NS	0.001		
Oil × Ca		0.009	0.010		

Values are mean ± SE. N=6-7. NS : not significant

Means with different letters are significant at p < 0.05.

과는 뚜렷하여 CO군에 비해 PO군에서 유의성있게 낮았다.

고찰

Callkins등¹¹⁾의 보고에 의하면 대장암에 걸릴 위험이 높은 환자들에게 Ca섭취를 증가시킨 결과 대장상피세포의 proliferation이 감소되었다. 동물실험에서도 Ca을 높게 투여하였을 때 유리지방산이나 bile acid로 인한 대장점막의 손상을 감소시켜 대장 상피세포의 proliferation이 감소되었다¹⁻³⁾. 지방과 Ca과의 관계는 Leveen등¹²⁾에 의해 처음으로 언급되었는데 ricinolenic acid(d-12-hydroxyoleic acid)에 의해 유발된 설사는 calcium carbonate를 투여함으로써 억제되는데 이때 Ca 이온은 ricinolenic acid와 결합하여 non-absorbed hydroxy fatty acid를 형성하는 것으로 보인다 고 하였다. 한편 Wargovich등⁴⁾의 보고에 의하면 지방의 함량이 20%(w/w)인 고지방식이에서는 Ca의

투여가 종양의 발생을 억제하였지만 지방함량을 5%로 낮추었을 때는 Ca이 종양 발생에 영향을 미치지 못했다고 하였다. 그러나 다른 보고⁹⁾에 의하면 저지방식사에서 Ca은 종양생성을 감소시키지는 못했지만 invasive carcinoma의 수는 감소시켰다고 하였다. 지금까지 대장암에 대한 Ca의 protective한 영향은 주로 간접적인 영향으로 유리지방산이나 bile acid와 같은 물질과 결합하여 불용성염을 형성하므로서 toxicity로부터 장내 상피세포를 보호하여 대장암의 발생을 저하시키는 것이라고 하였다. 그러나 아직까지 Ca과 식이지방과의 상호작용에 대해서는 분명한 기전이 밝혀지지 않았으며, 식이내 Ca 함량이 대장암의 주요 biomarker로 알려진 대장세포막 인지질의 지방산조성과 종양의 전이 및 촉진에 관여하는 것으로 알려진 대표적인 prostaglandin인 thromboxane A₂(TXA₂)나 prostaglandin E₂(PGE₂) 그리고 DAG 등의 생성에 미치는 영향에 관해서는 발표된 결과가 없었다.

그러므로 본 연구에서는 Ca과 식이지방과의 상호작용에 관하여 연구하고자 전보고¹⁹⁾에서 대장암 발생을 촉진키는 n-6 계열의 corn oil 투여군과 대장암의 발생을 억제하였던 n-3 계열의 perilla oil군에 Ca을 두가지 수준(0.3%, 1.0%)으로 조정하여 섭취시켜 식이지방과 Ca이 대장암의 주요 biomarker에 미치는 영향을 관찰하였다.

Table 3에서 보여주는 바와 같이 식이 Ca과 식이지방은 모두 대장점막 인지질의 지방산 조성에 영향을 미쳤다. Ca함량과 무관하게 C18 : 2와 C20 : 4의 함량은 CO군에서 유의성 있게 높았고 C18 : 3은 PO군에서 높았다. 그러나 Ca을 0.3%에서 1.0%로 증가시켰을 때 CO군에서는 C18 : 2 분포가 Ca 0.3% 수준에 비해 1/4 수준으로 유의하게 감소되었으며 C20 : 4도 유의성있게 감소되었다. 본 연구 결과에서는 식이의 Ca 함량은 인지질의 대사산물인 DAG 함량에도 영향을 미쳤다. DAG는 protein kinase C(PKC)를 활성화시켜 cell proliferation activity를 증가시킨다고 하였다¹³⁾. Fig. 1에서 보는 바와 같이 Ca 1.0% 수준에서 DAG 생성이 감소되었는데 특히 DAG 생성이 많았던 CO군에서 Ca에 의한 효과가 뚜렷하였다. Choe등¹⁴⁾은 고지방식을 투여한 쥐에서 DAG 함량의 증가와 함께 PKC의 활성이 증가된 것을 관찰하였으며, 정상적인 세포가 암세포로 전환되는 과정에서도 세포내의 DAG 함량이 증가되었다¹⁵⁾¹⁶⁾. Friedman등¹⁷⁾도 종양조직을 배양한 실험에서 DAG는 cell proliferation을 증가시켰다고 하였다. 본 연구에서도 DAG 함량이 crypt length에 어떤 영향을 미쳤는지를 살펴보기 위해 두 biomarker간의

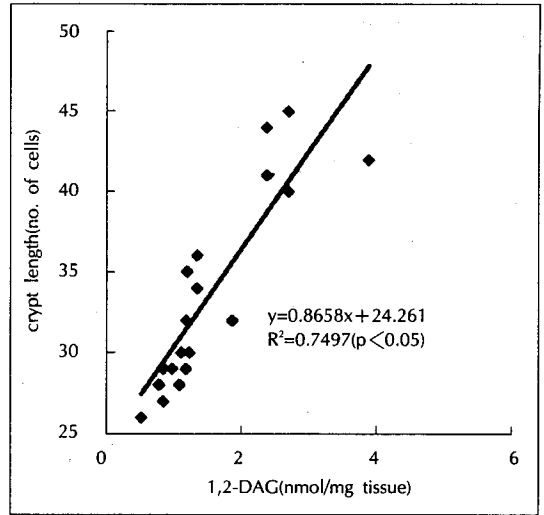


Fig. 2. Correlation between 1,2-diacylglycerol and crypt length of colonic mucosa in DMH-treated rats.

상관관계를 Fig. 2에서 살펴본 결과 DAG함량과 crypt length와는 정의 상관관계를 보였다. 그러므로 본 연구에서도 다른 보고¹⁷⁾¹⁸⁾와 일치되게 DAG 함량의 증가는 cell proliferation을 촉진시켰다고 사려된다.

식이 Ca 수준이 0.3% 일때는 식이지방 종류에 따라 PGE₂와 TXB₂에 미치는 영향이 뚜렷하게 관찰되어 PO군에 비해 CO군에서 모두 유의성있게 높았다. 그러나 Ca 함량을 1.0%로 증가시켰을 때는 Fig. 3에서와 같이 CO군의 PGE₂ 함량은 Ca 0.3% 식이의 50% 수준으로 감소하여 PO군과 큰 차이를 보이지 않았다. 이와 같은 결과는 인지질의 지방산 조성에서 CO군의 C20 : 4 함량이 유의성있게 감소한 결과로 인해 PGE₂ 합성이 적었던 것으로 사려된다. 이것은 식이의 지방산 조성이 대장암의 biomarker 수준에 미치는 영향을 관찰한 전보고서¹⁹⁾에서와 마찬가지로 인지질의 C20 : 4 함량은 대장점막의 TXB₂와 PGE₂ 농도와 유의성있는 정의 상관관

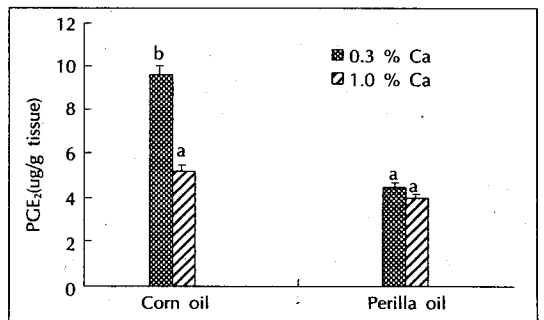


Fig. 3. Comparison of the effect of calcium on colonic mucosal PGE₂ in DMH-treated rats. Mean±SE. Bars with different letter are significant at p<0.05.

계를 보인것과 일치하는 결과이었다.

대장암 발생과정에서 cell proliferation의 증가는 암 발생의 개시, 촉진, 진전과정에서 필수적으로 일어나는 과정으로 cell proliferation을 촉진시키는 요인은 대장암 발생을 촉진시키는 것으로 간주하였다²⁰⁾. Cell cycle 중 S-phase에 있는 세포수가 증가하거나 S-phase의 기간이 늘어나면 DNA 합성이 증가하고 세포분열이 활발히 일어나서 crypt에서 생산되는 세포수가 대장관내로 탈락되는 세포수보다 증가되어 crypt의 크기가 비정상적으로 길고 넓어지며 분화 및 성숙이 안되고 종양으로 진전된다. 따라서 이러한 세포증식의 상태가 대장암 발생을 예측하는 한 biomarker로 사용되고 있다. 송 등²¹⁾의 보고에 의하면 발암원인 MNU를 투여한 쥐에게 지방을 16%(w/w) 수준으로 주었을 때 들기름에 비해 쇠기름에 의해서 종양발생 빈도가 높았으며, 이때 crypt length도 쇠기름에 의해서 유의성있게 증가하였다. 이 연구²¹⁾에서 crypt length의 증가는 종양발생과 밀접한 연관이 있으며 식이지방에 의해 영향을 받는다는 것을 보여주었다. 또한 Kim 등²²⁾의 보고에 의하면 발암원으로 처리하지 않았을 때도 쇠기름은 어유에 비해 crypt를 더 많이 자극하여 crypt length가 증가된 것을 관찰하였다. 식이의 Ca 함량이 cell proliferation에 미치는 영향을 관찰한 연구를 살펴보면 대장암 발생 위험률이 높은 환자에게 매일 Ca 1.25g을 공급한 결과 직장점막의 proliferation이 감소되었으며²³⁾, 대장암의 발생 위험이 높은 환자의 조직을 2.2mM CaCl₂ 용액에서 배양한 결과 proliferation이 감소되었다²⁴⁾. 본 연구에서 식이지방의 종류나 Ca 함량이 cell kinetic index에 미치는 영향을 살펴보면(Table 2) 식이의 Ca 함량보다는 식이의 지방산 조성이 cell kinetic index에 더 큰 영향을 미친 것으로 나타났다. Crypt length의 경우 식이지방에 의한 영향이 뚜렷하여 CO군에 비해 PO군에서 유의성있게 짧았으며($p < 0.05$), proliferating 정도를 나타내는 labeling index와 proliferative zone도 CO군에 비해 PO군에서 유의하게 낮았다. Crypt length와 crypt circumference로부터 계산된 crypt당 총 세포수는 Ca 함량과 무관하게 CO군에 비해 PO군에서 유의성있게 낮았으며, Ca 함량을 0.3%에서 1% 수준으로 증가시켰을 때는 CO군과 PO군 모두에서 감소하였으며 특히 CO군에서 유의성있게 감소하였다. 이와 같이 식이의 Ca 증가는 cell kinetic index에 큰 영향을 미치지 않았지만 전반적으로 개선하는 방향으로 작용한 것으로 나타났다.

그러므로 본 연구의 결과들을 종합해보면 식이중 Ca은 대장점막 인지질의 arachidonic acid의 분포를 감소

시켜 eicosanoid의 합성을 억제시켰고, 또한 DAG의 생성을 줄여주므로서 PKC를 활성화시키는 signal transduction을 감소시키므로서 대장점막의 cell proliferation이 감소되었을 것이라고 사려된다. 또한 식이중의 Ca 수준이 biomarker에 미치는 영향은 같이 섭취한 식이지방의 종류에 의해서도 영향을 받았는데, 대장암 암화과정을 촉진시키는 것으로 보고된 CO군에서 Ca 첨가가 더 뚜렷한 영향을 미친 것을 관찰하였다. 고지방식이와 Ca의 관계에 대한 보고와 마찬가지로⁴⁾ 본 연구에서도 PO군보다는 CO군에서 Ca의 효과가 뚜렷하였던 것은 옥수수유는 종양 발생을 촉진시키는 영향이 컸던 반면에 들기름은 암화과정에 관여하는 biomarker의 수준을 억제하는 방향으로 작용하였으므로 CO군에서 Ca 효과가 더 뚜렷했던 것으로 사려된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 식이의 Ca 함량이 대장 암화과정의 biomarker인 대장점막의 세포증식과 eicosanoid와 DAG 농도 및 지방산조성에 미치는 영향을 살펴보기 위해 대장암 발생을 촉진시키는 n-6계 linoleic acid가 높은 corn oil(CO)과 대장암 발생을 억제시키는 n-3계 α -linolenic acid가 풍부한 perilla oil(PO)에다 Ca 함량을 무게의 0.3%, 1.0% 수준으로 각각 첨가한 실험식을 20주동안 먹여 식이지방 종류에 따라 Ca의 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 식이지방에 의한 영향을 살펴보면 CO에 비해 PO에 의해서 대장점막의 세포증식을 유의하게 낮추었으며(labeling index, proliferating zone, crypt length), 인지질의 C20 : 4 함량(%), DAG, TXB₂, PGE₂의 농도가 더 낮았다($p < 0.05$).

2) Ca의 영향은 같이 섭취한 식이지방의 종류에 따라 다르게 나타났다. 대장암 발생을 억제시켜주는 PO군에서는 Ca의 영향이 유의하지 않았으나 CO군에서는 Ca 함량이 증가되었을 때 세포막 인지질의 C20 : 4 함량(%)을 감소시켰으며 DAG와 PGE₂ 함량도 유의성있게 낮추었다. 세포증식에는 유의성있는 영향을 미치지 못했지만 전체적으로는 Ca 함량이 증가함에 따라 개선되는 방향으로 작용하였다. 그러므로 암화과정을 촉진시키는 CO에 의해서 biomarker 수준이 높은 경우에 Ca 첨가가 더 뚜렷한 영향을 보였다.

결론적으로 식이중 Ca은 대장점막 인지질의 arachidonic acid의 분포를 감소시켜 eicosanoid의 합성을 억제시켰고, 또한 DAG의 생성을 줄여주므로서 PKC를 활성화시키는 signal transduction을 감소시키

로서 대장점막의 cell proliferation이 감소되었을 것이라고 사려된다. 또한 식이중의 Ca 수준이 biomarker에 미치는 영향은 같이 섭취한 식이지방의 종류에 의해서도 영향을 받아 대장암 압화과정을 촉진시키는 것으로 보고된 CO군에서 Ca 첨가가 더 뚜렷한 영향을 미친 것을 관찰하였다. 우리가 식생활에서 사용하는 식용유의 대부분이 n-6계열의 지방산 함량이 높은 옥수수유나 식물성기름인 점을 감안할 때 대장암 발생을 억제하는데 도움이 되도록 하기 위해서는 Ca 섭취를 충분히 해줄 것을 적극 권장하고 싶다.

Literature Cited

- 1) Sorenson AW, Slattery ML, Ford MH. Calcium and colon cancer : A review. *Nutr Cancer* 11 : 135-145, 1988
- 2) Appleton BVN, Owen RW, Wheeler EE, Chalcombe DN, Williamson RCN. Effect of dietary calcium on the colonic luminal environment. *Gut* 32 : 1372-1377, 1991
- 3) Karkare MR, Clark TD, Glauert HP. Effect of dietary calcium on colon carcinogenesis induced by a single injection of 1,2-dimethylhydrazine in rats. *J Nutr* 121 : 568-577, 1991
- 4) Wargovich MJ, Allnut D, Palmer C, Anaya P, Stephens LC. Inhibition of the promotional phase of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in the F 344 rat by calcium lactate : effect of simulating two human nutrient density levels. *Cancer Letters* 53 : 17-25, 1990
- 5) MeSherry CK, Cohen BI, Bokkenheuser VD, Nosbach EH, Winter J, Matoba N, Seholes J. Effect of calcium and bile acid feeding on colon tumors in the rat. *Cancer Res* 49 : 6039-6043, 1989
- 6) Schutte B, Reynders MMU, Bosman FR, Blijham GH. Studies with anti-bromodeoxyuridine 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
- 7) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37 : 911-917
- 8) Kaufmann HP, Makus Z. *Fette Seifen Anstrichmittel* 62 : 1014, 1960
- 9) Morrison WR, Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 5 : 600-608, 1964
- 10) 김채중 · 박현서. Dimethylhydrazine을 투여한 쥐에서 한국인인 섭취하는 혼합지방이 조직의 지방산조성과 Eicosanoids 수준에 미치는 영향. *한국저질학회지* 4(2) : 170-181, 1994
- 11) Callkins BW, Whittaker DJ, Nair PP, Pider AA, Turjman

N. Diet, nutrition intake, and metabolism in populations at high and low risk for colon cancer. *Am J Clin Nutr* 40 : 896-901, 1984

- 12) Leveen HH, Borke B, Axelrod DR, Johnson A. Cause and treatment of diarrhea following reaction of the small intestine. *Surg Gynecol Oncol* 124 : 776-770, 1967
- 13) Weitzman SA, Weitberg AB, Clark EP, Stossel TP. Phagocytes as carcinogens : malignant transformation produced by human macrophages. *Science* 277 : 1231-1233, 1985
- 14) Choe M, Kris ES, Luthra R, Copenhaver J, Pelling JC, Donnelly TE, Birt DF. Protein kinase C is activated and diacylglycerol is elevated in epidermal cells from Sencar mice fed high fat diets. *J Nutr* 122 : 2322-2329, 1992
- 15) O'Connor TP, Roebuck BD, Peterson FL, Lokesh B, Kinella JE, Campbell TC. Effect of dietary omega-3 and omega-6 fatty acids on development of azaserine-induced preneoplastic lesions in rat pancreas. *J Natl Cancer Inst* 81(11) : 858-863, 1989
- 16) Lecal JC, Moscat J, Aaronson SA. Novel source of 1,2-diacylglycerol elevated in cells transformed by Ha-ras oncogene. *Nature* 330 : 269-272, 1987
- 17) Friedman E, Isaksson P, Rafter J, Marian B, Winawer S, Newmark H. Fecal diacylglycerides as selective endogenous mitogens for premalignant and malignant human colonic epithelial cells. *Cancer Res* 49 : 544-548, 1989
- 18) Narisawa T, Takahashi M, Kotangi H, Kusaka H, Yamazaki Y, Koyama H, Fukaura Y, Nishizawa Y, Kotsugai M, Isoda Y, Hirano J, Yanida N. Inhibitory effect of dietary perilla oil rich in the n-3 polyunsaturated fatty acid, α -linolenic acid on colon carcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res* 82 : 1089-1096, 1991
- 19) 김채중 · 최주선 · 박현서. 들기름이 Dimethylhydrazine으로 처리한 쥐에서 대장암의 Biomarker인 지방산조성과 1, 2-Diacylglycerol 및 Eicosanoid 함량에 미치는 영향. *한국영양학회지* 28(11) : 112-121, 1996
- 20) Butterworth BE, Goldsworthy TL. The role of cell proliferation in multistage carcinogenesis. *Cell Proliferation* 37 : 683-687, 1991
- 21) 송지현 · 박현서 · 서은숙 · 김동연. 발암원을 투여한 쥐에서 식이지방이 대장의 종양발생과 세포증식에 미치는 영향. *한국영양학회지* 27(6) : 552-562, 1984
- 22) Kim DY. Modulation of biomarkers of colon carcinogenesis by dietary fiber and fat. Doctoral dissertation, Texas A & M University, May 1992
- 23) Cheah PY, Bernstein H. Modification of DNA by bile acids : a possible factor in the etiology of colon cancer. *Cancer Lett* 49 : 207-210, 1990
- 24) Kandell RL, Bernstein C. Bile salt/acid induction of DNA damage in bacterial and mammalian cells : implications for colon cancer. *Nutr Cancer* 16 : 227-238, 1991