

## 쥐의 간 발암과정에서 N-3, N-6 지방산 섭취 및 d-Limonene 투여가 생체막 지질조성 및 Protein Kinase C 활성도에 미치는 영향

김미정 · 김정희<sup>†</sup>

서울여자대학교 영양학과

### Effect of N-3, N-6 Fatty Acid and d-Limonene Treatment on Membrane Lipid Composition and Protein Kinase C Activity in Experimental Rat Hepatocarcinogenesis

Mi-Joung Kim and Jung-Hee Kim<sup>†</sup>

Dept. of Nutrition, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

#### Abstract

This study was done to investigate the effects of n-3, n-6 fatty acid and d-limonene on the hepatic membrane lipid composition, protein kinase C (PKC) and glutathione S-transferase (GST) activities in experimental rat hepatocarcinogenesis. Sprague-Dawley female rats were fed with two different types of dietary oil for 20 weeks. Corn oil (CO) and sardine oil (SO) were used at 15% by weight as a source of n-6 and n-3 fatty acid, respectively. One week after feeding, rats were intraperitoneally injected twice with a dose of diethylnitrosamine (DEN, 50 mg/kg body weight) and after 1 week 0.05% phenobarbital (PB) was provided with drinking water. Membrane fractional lipid composition showed that the content of cholesterol was higher in SO group than CO group and also significantly decreased by d-limonene. The content of phospholipid was increased by carcinogen treatment but not affected by dietary oils or d-limonene. Membrane C/PL molar ratio was significantly decreased by d-limonene or carcinogen treatment in SO groups but not in CO groups. Fatty acid composition was changed by dietary oils but not by carcinogen treatment or d-limonene. Cytosolic PKC activity was not significantly different by dietary oils, d-limonene or carcinogen treatment. However, membrane PKC activity was significantly increased by carcinogen treatment and decreased by d-limonene. Cytosolic GST activity was affected by d-limonene or carcinogen treatment in all dietary groups. These data indicate that dietary oils, d-limonene and carcinogen treatment can not change much membrane phospholipid composition. But membrane C/PL molar ratio was changed by carcinogen treatment and d-limonene although the effect was different between dietary oils. Therefore, it is suggested that different dietary oils and d-limonene can somewhat modulate the changes of membrane fluidity and activities of membrane bound enzymes like membrane associated PKC during carcinogenesis.

**Key words:** d-limonene, sardine oil, hepatocarcinogenesis, protein kinase C, glutathione S-transferase

#### 서론

세계적으로 사망 원인의 높은 수위를 차지하는 암의 발생 원인 및 발암 기전이 아직 완전히 밝혀져 있지 않은 상태이다. 암 발생과 가장 밀접한 관련을 갖는 식이 인자는 지방이며(1), 지방은 섭취량 뿐만 아니라 지방에 함유된 지방산의 종류에 따라서 암의 발생에 미치는 영향이 다르다는 사실이 밝혀지고 있다(2,3). 일반적으로 n-3 지방산은 3계열의 prostaglandin(PG)을 합성하고, n-6계 지방산에 의한 PGE<sub>2</sub>의 생성을 감소시켜 항암작용과 항병원성에 좋은 효과가 있다고 보고된다(4). 또한, 세포막의 지질 성분을 변화시켜 생체막의 유동성을 변화시키고, 막부착 protein kinase C(PKC)

의 활성도에 영향을 미쳐 세포의 비정상적인 증식을 억제하는 것으로 알려졌다(4).

PKC는 막단백질 인산화에 관여하는 효소로 세포의 기능과 증식을 활성화하는 신호 변환에 중요한 역할을 하며, 약 12종류의 isoenzyme중에서 Ca<sup>++</sup>-activated, phospholipid-dependent PKC는 발암 촉진제로 알려진 phorbol ester의 세포막 표적으로 알려지고 있다(5,6). 세포가 발암물질이나 phorbol ester에 의해 자극되면, 세포막에서 phosphatidyl inositol이 diacylglycerol(DAG)과 inositol-1,4,5-triphosphate(IP<sub>3</sub>)로 분해된다. 이때, DAG는 PKC를 cytosol부분에서 membrane부분으로 이동시켜 phorbol ester와 같은 발암물질의 수용체가 되게 하고, IP<sub>3</sub>는 세포내 칼슘을 이동시켜

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: jheekim@swu.ac.kr  
Phone: 82-2-970-5646, Fax: 82-2-976-4049

PKC를 활성화시켜 세포막의 단백질 인산화를 촉진하며 비정상적인 세포 증식을 촉진하게 한다(7). 세포막의 인지질의 조성에 따라 PKC와 phorbol ester의 binding activity가 달라지므로 식이 지방산의 종류에 따라 막부착 PKC의 활성도가 변할 수 있다. Nair 등(8)의 연구에 의하면 EPA나 DHA 보충시 세포내 IP<sub>3</sub>의 농도와 PKC의 활성도가 감소하였다고 보고하고 있어 이런 감소가 n-3 지방산의 발암 억제 기전의 하나로 설명될 수 있다.

암의 발생기전에 대해서는 아직 명확하지는 않지만 콜레스테롤 대사와 암과의 관계에 대한 연구들이 보고되고 있다(9-12). 콜레스테롤은 동물세포 세포막의 필수성분으로 암세포에서는 콜레스테롤 합성에 있어서 정상적인 feedback inhibition mechanism이 상실되어 있어 암세포의 빠른 성장을 위해 필요한 많은 콜레스테롤과 콜레스테롤 전구체를 합성하게 되며(9), Siperstein과 Fagan(10)은 간암에서도 feedback inhibition system이 결여되어 있다고 보고하였다. 그래서 암세포에서 콜레스테롤이나 콜레스테롤 전구체의 섭취나 합성을 억제했을 때 암세포 성장 억제 효과를 볼 수 있다고 한다(11). 그러므로 d-limonene과 같은 콜레스테롤 합성 억제제의 섭취가 발암을 더욱 억제할 것으로 추측된다.

d-Limonene은 monoterpenoids로써 감귤류의 껍질에서 추출되는 추출물의 95%이상을 차지하고 있으며, 동물의 콜레스테롤 합성 과정과 유사한 경로로 식물의 secretory gland에서 합성된다. 감귤류 껍질의 추출물은 향수, 음식, 주스에서 레몬의 향과 맛을 내기 위한 첨가제로 다양하게 사용되고 있다. d-Limonene은 동물을 대상으로 한 실험에서 피부암 및 유방암에 대한 발암 억제 효과가(12) 알려져 있으며, 사람의 hepatoma cell를 대상으로 한 세포 배양 실험(13)에서 암세포의 성장을 억제하는 효과가 hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A(HMG CoA) reductase의 강력한 억제제인 pravastatin과 함께 더욱 증가하였다고 한다. 따라서 최근 여러 가지 암을 억제하는 식품의 비영양 성분 중의 하나로 인식되고 있으며 발암 억제제나 암치료제로서 개발 가능성을 탐색하고 있는 흥미 있는 물질이다.

이제까지 알려진 d-limonene의 발암 억제 기전은 d-limonene이 HMG CoA reductase의 활성을 감소시켜 간에서의 콜레스테롤 합성이 저해됨으로써 유방암 세포의 성장을 억제시키거나(14) 콜레스테롤 합성 경로에서 부가적으로 합성되는 isoprenylation에 대한 선택적인 저해 효과로 post-translational stage에서 단백질의 modification이 억제되어 결과적으로 암세포의 성장이나 분화를 억제하게 된다고(15)한다. 그러나 정확한 기전은 아직도 분명하지 않다. 특히 d-limonene의 발암 억제 효과가 주로 유방암을 대상으로 한 연구가 많았고, 간암에서는 거의 연구되지 않아 우리나라에서 발병율이 높은 간암에서도 d-limonene의 발암 억제 효과를 조사하는 것이 의의가 있다고 생각된다.

그러므로 본 연구에서는 우리나라에서 발병률이 높은 간

암의 발생과정에서 식이 지방산의 종류와 d-limonene의 섭취가 미치는 영향을 세포막 지질조성 및 PKC 활성도를 통해 조사하여 이들의 작용기전을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험설계 및 실험식이

간암의 유도를 위한 발암물질의 투여 및 사육은 Jang 등(16)의 중기 간 발암모델을 약간 수정하여 체중이 80~90 g 정도로 이유된 3주령 Sprague-Dawley종 암쥐 80마리를 20주간 사육하였다. 숫쥐의 경우 d-limonene이 방광에 독성을 나타낸다는 보고(17)가 있어 본 실험에서는 암쥐를 사용하였다. 발암 유도를 위한 개시 물질로 실험 개시 첫 주에 DEN을 체중 kg당 50 mg을 생리식염수에 녹여 2회 복강 투여하고 1주일 후부터 촉진물질로 0.05% phenobarbital(PB)을 물에 섞어서 공급하였다(Fig. 1). 실험기간중 사육실의 실내 온도는 23±2°C를 유지시켰고, 채광은 12시간 주기로 일정하게 조절하였다. 처음 3일간 일반 고형식이를 공급하여 적응시킨 후 각 군간의 차이가 없도록 randomized block design에 따라 oil의 종류(corn oil, sardine oil), DEN 투여 여부, d-limonene 섭취 여부에 따라 8군으로 나누어 실험식이의 공급을 시작하였다.

실험식이는 식이지방의 종류에 따라 옥수수유(n-6 지방산)군과 정어리유(n-3 지방산)군으로 나누었고, 각각의 식이지방군에 d-limonene의 섭취유무, 발암물질 투여여부에 따라 8군으로 나누어 실시하였다. 식이 성분 조성은 발암 연구에 사용되는 실험식이에 대한 Rao(18)의 연구를 참고로 AIN-76(19)을 약간 수정하여 결정하였다. 각 군의 실험 식이는 모든 영양소의 함량을 동일하게 하였고, 지방은 열량의 15%정도 사용하여 제조하고, d-limonene(선경 인더스트리) 보충군은 5%(g/100 g diet)를 섞어 주었다. 모든 실험식이는 지방의 산패를 방지하기 위해 한 번에 1 kg씩 조제하여 비닐 팩에 담아 -40°C에 보관하였다가 1일 1회 일정 시간에 공급하였다. 발암물질의 투여에 따라 식이섭취량의 감소가 생기

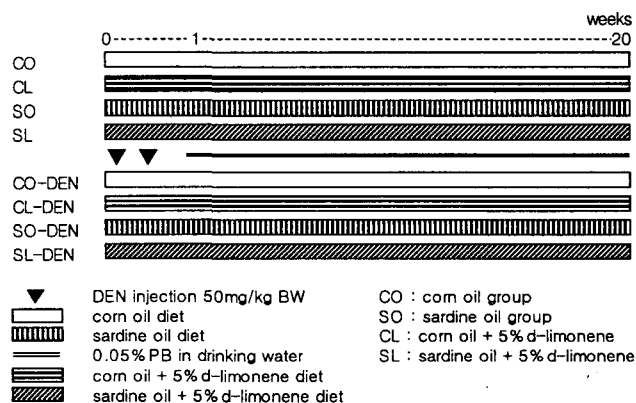


Fig. 1. Experimental design.

게 되므로 각 군별로 섭취 열량의 차이가 생기는 것을 방지하기 위해서 발암물질 투여군의 섭취량에 맞추어 제한식을 실시하였고, 물의 섭취는 제한하지 않았다. 실험식이 조성은 Table 1과 같다.

#### 실험동물 희생 및 시료 수집

실험 동물은 20주 사육하여 희생하였고, 희생 전에 12시간 금식시킨 후 단두로 희생시켰다. 간은 단두 후 즉시 절제하여 차가운 생리식염수로 세척 후 여과지에서 여분의 수분을 제거한 후 중량을 측정하고 생화학적 분석을 위하여 세포내 소기관을 분리하였다.

간의 세포내 소기관 분리는 Masmoudi 등(20)의 방법에 따라 5 g의 동일한 간엽을 취하여 buffer A(0.3 M sucrose, 2 mM EDTA, 10% glycerol, and 20 mM Hepes, pH 7.5) 25 mL에 넣어 균질기로 균질화시켜 일부는 분석용으로 냉동시키고, 나머지는 고속 냉동 원심분리기(DuPont Sorvall, RC-28S)를 이용하여 각각의 subfraction으로 분리하였다. 간 균질액을 1,000 g에서 15분간 원심분리하고 상층액을 다시 100,000 g에서 60분간 원심 분리하여 membrane fraction(pellet)과 cytosol(supernatant)을 분리하고, cytosol은 지방을 제거한 후 tube에 담아 보관하였으며 membrane fraction의 일부는 buffer B(20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, and 0.5% Triton X-100, pH 7.5)로 현탁하여 분석실험을 위해 보관하였다. 각 시료들은 액체 질소에 급속 동결시켜 -80°C에 보관하였다가 분석시 꺼내 사용하였다.

Table 1. Diet composition

Ingredient	Amount (%)
Corn starch	55.2
Cellulose	5.0
Casein	20.0
DL-methionine	0.3
Oil (corn or sardine)	15.0
Salt mixture <sup>1)</sup>	3.5
Vitamin mixture <sup>2)</sup>	1.0
Vitamin E	0.015
BHT	0.01

<sup>1)</sup>Composition of salt mixture (AIN 76), g/kg mixture: calcium phosphate dibasic (CaHPO<sub>4</sub>) 500, sodium chloride (NaCl) 74, potassium citrate, monohydrate (K<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O) 220, potassium sulfate (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 52, magnesium oxide (MgO) 24, manganese carbonate (43~48% Mn) 3.5, ferric citrate (16~17% Fe) 6.0, zinc carbonate (70% ZnO) 1.6, cupric carbonate (53~55% Cu) 0.3, potassium iodate (KIO<sub>3</sub>) 0.01, sodium selenite (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O) 0.01, chromium potassium sulfate [CrK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12H<sub>2</sub>O] 0.55, sucrose finely powdered to make 1,000.0 g.

<sup>2)</sup>Composition of vitamin mixture (Oriental yeast), g/kg mixture: vitamin A acetate 500,000 IU, vitamin D<sub>3</sub> 100,000 IU, vitamin E acetate 5 g, vitamin K<sub>3</sub> 5.2 g, thiamin chloride 1.2 g, riboflavin 4.0 g, pyridoxine hydrochloride 0.8 g, vitamin B<sub>12</sub> 0.5 mg, ascorbic acid 30.0 g, D-biotin 20 mg, folic acid 0.2 g, calcium pantothenate 5.0 g, p-aminobenzoic acid 5.0 g, nicotinic acid 6.0 g, inositol 6.0 g, choline chloride 200 g, cellulose powder to make 1,000 g.

#### 생화학적 분석

**세포막의 콜레스테롤 및 총 인지질 함량 측정**: Membrane fraction의 지질은 Bligh와 Dyer(21)의 방법을 이용하여 추출한 후 지질 조성 분석에 사용하였다. 콜레스테롤 함량은 Sale 등(22)의 방법을 수정한 효소법을 이용하는 영동제약 cholesterol정량 kit(BC 108-E)를 이용하여 측정하였다.

**세포막의 인지질 조성 측정**: 막의 인지질 조성은 chloroform에 녹아 있는 상태의 간 membrane fraction 지질 추출액에서 HPLC를 이용하는 Patton 등(23)의 방법을 사용하여 측정하였다. 분리용 column은 Hiber II column(Merck Co, LiChrospher Si-100)을 사용하였다. 인지질 조성은 membrane fraction에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있는 여섯 가지를(phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, cardiolipin, phosphatidylinositol, phosphatidylglycerol, phosphatidylserine) 분리하였으며, 각 인지질의 함량은 자동 면적 적분기에서 면적 %로 계산하였다. 분리된 각 peak는 표준 인지질 용액의 retention time과 비교 확인하여 구하였다.

**세포막의 지방산 조성 측정**: 지방산 조성은 지질 추출액을 Metcalfe 등(24)의 방법으로 먼저 transmethylation시킨 후 gas chromatograph(Hewlette Packard 5890 II Series)로 분석하였다. Column은 innowax capillary column을 사용하였고 검출기는 flame ionization detector를 사용하였다. 각 지방산의 함량은 자동 면적 적분기에서 면적 %로 구하였으며 분리된 각 peak의 확인은 표준 지방산 methyl ester의 retention time과 비교하여 이루어졌다.

**Protein kinase C 활성도 측정**: PKC 활성도는 Yasuda 등(25)의 방법에 의하여 cytosol, membrane fraction에서 각각 측정하였다.

PKC fraction에 reaction mixture(20 mM Tris-HCl; pH 7.5, 5 mM magnesium acetate, 0.5 µg/mL phosphatidylserine(PS), 50 ng/mL diolein(DO), 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 40 µM MBP<sub>4-14</sub>, 10 µM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP(3-6 × 10<sup>5</sup> cpm)] 50 µL를 넣어 30°C에서 20분간 반응시킨 후 ice-cold 100% trichloroacetic acid(TCA) 5 µL를 넣고 ice에서 10분간 incubation시켜 반응을 정지시켰다. 반응을 정지시킨 후 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액 30 µL를 2 × 2(cm)로 자른 P-81 paper에 spotting시킨 후 즉시 paper를 75 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>에 5분씩 4번 washing하고, 건조시켜 bial에 담아 scintillation cocktail(BBOT 8 g, Toluene 2 L, Triton X-100 1 L) 10 mL를 넣어 liquide scintillation counter로 측정하였다. Control은 CaCl<sub>2</sub>와 DO를 제외시킨 condition에서의 값으로 하였다. PKC의 활성도는 표준조건하에서 1분 동안 ATP로부터 MBP<sub>4-14</sub>로 <sup>32</sup>P를 incorporation 시키는 enzyme의 양으로 계산하여 cpm/mg protein/min으로 나타내었다.

**Glutathione S-transferase 활성도 측정**: Cytosol의 glutathione S-transferase(GST)의 활성도는 GSH과 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)를 기질로 사용하여 Habig

등(26)의 방법으로 측정하였다. GST의 활성도는 340 nm에서 포함되는 CDNB의 분자흡광계수  $9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 계산하였으며, mg protein 당 1분 동안 결합되는 CDNB의 nmole수로 표시하였다.

**단백질 함량 측정** : Cytosol, membrane fraction의 단백질 함량은 Lowry 방법(27)으로 측정하였다.

측정된 단백질의 양은 membrane fraction의 콜레스테롤 함량, 인지질의 양, PKC specific activity, cytosol의 PKC specific activity 및 GST specific activity의 계산에 이용하였다.

**통계처리**

식이지방의 종류, d-limonene의 섭취효과 및 발암물질 투여에 따른 효과와 이들간의 상호작용을 보기 위하여 실험결과를 3-way analysis of variance(ANOVA)로 분석하여  $\alpha = 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 유의성을 검증 하였다. 모든 실험 결과의 통계 처리는 Statistical Analysis System(SAS) program을 이용하였고 모든 결과는 평균과 표준편차로 표시하였다.

**결과 및 고찰**

**식이 섭취량, 체중 및 간무게**

식이 섭취량은 발암에 미치는 섭취 열량의 영향을 배제하기 위해 발암물질의 투여에 의해 일어나는 식이 섭취량의 감소를 고려하여 발암물질 투여군의 섭취량에 맞추어 제한식을 실시하였기 때문에 군간에 유의적인 차이가 없었으나 체중 증가량은 d-limonene 섭취에 따라 감소하는 경향을 보였다(Table 2). 식이 지방의 종류에 따른 체중의 변화는 유의적 차이가 없고, 발암물질 투여에 따라 체중이 약간 감소하는 경향이 있으나 d-limonene과 발암물질 투여가 상호효과( $p < 0.05$ )를 보여 d-limonene을 투여한 군에서는 발암물질을 투여하면 체중이 오히려 약간 증가하는 경향을 보여 주었다. Tisdale과 Dhesi(28)는 암이 진행되면 체중의 감소가 일어나며, 탄수화물 대신 fish oil을 25%이상 공급하면 숙주의 체중 감소를 줄일 수 있다고 하였는데 본 실험에서는 암이 발생되었다기보다는 암화과정중에 있는 상태이고, 지방량도 15%이었으므로 큰 효과를 나타내지는 못하였지만 경향은 나타내고 있는 것으로 생각된다.

간무게는 식이지방 종류에 따른 차이는 없었으며, 발암물질을 투여한 경우 유의적으로 증가( $p < 0.001$ )하였고, d-limonene을 섭취한 경우에 증가 경향을 보였으나 유의적이지는 않았다. 또한, 암물질과 d-limonene과의 상호효과( $p < 0.01$ )가 있어 유지군에 d-limonene만 투여했을 때는 간무게가 유의적으로 증가되지 않았으나 발암물질을 동시에 투여했을 때는 간무게가 유의적으로 증가되었다.

체중에 대한 상대적인 간무게(간무게/체중)는 식이지방에 따라 정어리유군에서 증가하는 경향을 보이거나 유의적이

**Table 2. Effect of different dietary oils and d-limonene on body weight and liver weight of rat treated with DEN**

Groups <sup>1)</sup>	Body weight (g)	Liver weight (g)	Liver weight/Body weight (%)
CO	270.1 ± 19.9 <sup>2)a3)</sup>	5.9 ± 0.5 <sup>d</sup>	2.20 ± 0.18 <sup>g</sup>
CO-DEN	244.0 ± 26.8 <sup>ab</sup>	7.6 ± 0.6 <sup>c</sup>	3.13 ± 0.38 <sup>e</sup>
CL	195.1 ± 25.1 <sup>d</sup>	6.6 ± 1.0 <sup>cd</sup>	3.39 ± 0.40 <sup>de</sup>
CL-DEN	219.1 ± 29.7 <sup>bcd</sup>	10.7 ± 1.4 <sup>b</sup>	4.91 ± 0.43 <sup>b</sup>
SO	257.7 ± 35.3 <sup>a</sup>	7.2 ± 1.0 <sup>cd</sup>	2.81 ± 0.14 <sup>f</sup>
SO-DEN	257.6 ± 23.3 <sup>a</sup>	10.9 ± 1.8 <sup>b</sup>	4.25 ± 0.63 <sup>c</sup>
SL	206.5 ± 33.0 <sup>cd</sup>	7.5 ± 1.8 <sup>c</sup>	3.62 ± 0.64 <sup>d</sup>
SL-DEN	226.6 ± 35.8 <sup>bc</sup>	13.3 ± 2.2 <sup>a</sup>	5.89 ± 0.62 <sup>a</sup>
Significant factor <sup>4)</sup>	L, D × L	O, D, L, O × D, D × L	O, D, L, O × D, D × L

<sup>1)</sup>CO=corn oil, CL=corn oil + d-limonene, SO=sardine oil, SL=sardine oil + d-limonene.

<sup>2)</sup>Values are mean ± SD.

<sup>3)</sup>Means with different superscripts within a column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test; n = 7~11.

<sup>4)</sup>Statistical significance was calculated by 3-way ANOVA at  $p < 0.05$ , O=oil, D=DEN, L=limonene, O × D=oil × DEN, D × L=DEN × limonene.

지는 않았고, 발암물질 투여와 d-limonene섭취에 따라서는 유의적인 증가( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ )가 나타나 발암물질과 d-limonene을 동시에 투여한 군에서 가장 간무게가 비대하였다(Table 2).

간의 상태를 육안으로 관찰한 결과 발암물질 투여시 간이 매우 비대해 있고 섬유질화 되어 있음을 알 수 있었다. 발암물질에 의한 간의 비대는 발암물질에 대한 신체의 방어작용으로 간에서 여러 가지 해독효소의 발현이 증가하기 때문이다(29). 또한 d-limonene에 의해 간이 비대 역시 간의 해독효소를 증가시킬 가능성을 시사하는 것으로 사료되나 이에 대해서는 정확한 원인을 밝히기 위한 연구가 필요하다고 사료된다.

**세포막에서 콜레스테롤 및 인지질 함량**

콜레스테롤 함량은 식이지방의 종류에 따른 차이가 나타나 정어리유군에서 증가하였고, 발암물질 투여에 따라서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 d-limonene의 섭취에 따라서는 모든 식이지방군에서 감소하였으며, 특히 그 감소 정도가 옥수수유군에서는 유의적으로 크지는 않았으나 정어리유군에서 더욱 두드러져 유의적인 감소를 나타냈다(Table 3).

Kawata 등(30)은 hepatocellular carcinoma환자의 간세포에서 활성형 HMG-CoA reductase의 활성도가 정상인의 경우보다 유의적으로 높음을 보고하였다. 본 실험의 결과와 비교해 보면 콜레스테롤 함량이 식이지방의 종류, d-limonene의 섭취 여부에 따라 다르게 나타나는 것으로 보아 식이지방의 종류에 따라 d-limonene이 발암에 미치는 영향이 다름을 추측할 수 있다. 또한 본 실험에서 d-limonene이 콜레스테롤 합성의 inhibitor로 작용할 가능성이 있음을 알 수

**Table 3. Effect of different dietary oils and d-limonene on hepatic membrane fractional cholesterol and phospholipid contents in rats treated with DEN**

Groups <sup>1)</sup>	Total cholesterol (nmole/mg protein)	Phospholipid-Pi (nmole/mg protein)	C/PL-Pi <sup>2)</sup> (molar ratio)
CO	38.31 ± 4.35 <sup>3)bc4)</sup>	322.28 ± 35.10 <sup>ab</sup>	0.120 ± 0.021 <sup>bc</sup>
CO-DEN	41.20 ± 4.33 <sup>bc</sup>	360.95 ± 29.76 <sup>a</sup>	0.115 ± 0.013 <sup>bc</sup>
CL	37.03 ± 7.41 <sup>c</sup>	325.04 ± 48.04 <sup>ab</sup>	0.114 ± 0.016 <sup>bc</sup>
CL-DEN	38.67 ± 11.22 <sup>bc</sup>	323.20 ± 73.43 <sup>ab</sup>	0.118 ± 0.016 <sup>bc</sup>
SO	50.18 ± 9.44 <sup>a</sup>	311.19 ± 54.46 <sup>b</sup>	0.163 ± 0.029 <sup>a</sup>
SO-DEN	45.40 ± 7.83 <sup>ab</sup>	343.30 ± 35.79 <sup>ab</sup>	0.133 ± 0.024 <sup>b</sup>
SL	35.67 ± 7.55 <sup>c</sup>	309.48 ± 54.70 <sup>b</sup>	0.117 ± 0.028 <sup>bc</sup>
SL-DEN	38.41 ± 4.19 <sup>bc</sup>	356.92 ± 32.46 <sup>ab</sup>	0.108 ± 0.009 <sup>c</sup>
Significant factor <sup>5)</sup>	O, L, O×L	D	O, D, L, O×L

<sup>1)</sup>CO=corn oil, CL=corn oil+d-limonene, SO=sardine oil, SL=sardine oil+d-limonene.

<sup>2)</sup>C/PL-Pi: cholesterol/phospholipid-Pi.

<sup>3)</sup>Values are mean ± SD.

<sup>4)</sup>Means with different superscripts within a column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test;  $n = 5 \sim 11$ .

<sup>5)</sup>Statistical significance was calculated by 3-way ANOVA at  $p < 0.05$ , O=oil, D=DEN, L=limonene, O×L=oil×limonene.

있었다.

세포막의 인지질 함량은 식이지방 종류, d-limonene의 섭취 여부에 따라서는 유의적인 차이가 없으나, 발암물질 투여 시 약간 증가( $p < 0.01$ )하는 경향이 있다. 이러한 결과는 식이지방의 종류가 미토콘드리아 막의 총 인지질 함량에는 영향을 미치지 않는다는 Innis와 Clandinin(31)의 연구 결과나 tummor cell의 인지질 함량이 정상 세포보다 50~70% 더 높다는 Daum(32)의 보고와 일치하여 미토콘드리아 막에서 뿐만 아니라 모든 membrane fraction에서의 총 인지질 함량도 식이지방의 종류에는 상관없고 발암물질 투여에 따라 증가한다는 것을 알 수 있다.

Cholesterol/Phospholipid(C/PL) molar ratio는 식이지방의 종류에 따라 다른 차이를 보였다. 즉, 옥수수유군에서는 발암물질 투여와 d-limonene 섭취에 따른 효과가 나타나지 않았으나 정어리유군에서는 발암물질 투여시 유의적인 감소를 하였고, d-limonene 섭취시에도 유의적 감소를 나타냈다. 따라서, 정어리유군에서는 발암물질과 d-limonene을 동시에 투여한 군(SLD)에서 C/PL-Pi molar ratio가 가장 낮았다. 이런 결과는 암화과정에 미치는 d-limonene의 효과가 식이지방의 종류에 따라 다름을 의미할 수 있다(Table 3).

Kessler 등(33)은 C/PL molar ratio가 높으면 막 지질의 유동성이 낮아진다고 보고하면서 식이 중의 지방을 달리하여 섭취시키면 C/PL molar ratio가 변화한다고 했다. 그러므로 막의 유동성을 직접 측정하지는 않았지만 C/PL ratio로 간접적으로 비교해 볼 때 식이지방의 종류에 따라 막의 유동성이 변화하고, 정어리유군에서 발암물질 투여나 d-limonene의 섭취에 따라 막 유동성이 높아진다고 생각할 수 있다. 이 결과는 선행 연구(34)의 결과와 일치하는 것으로 정어리유군에서 발암물질 투여에 의한 막 유동성의 증가 뿐 아니라 d-limonene에 의해서도 막의 유동성이 증가하여 막부착 효소들의 활성도에 영향을 미치리라 생각된다.

#### 세포막의 인지질 및 지방산 조성

Membrane fraction의 인지질 조성은 cardiolipin(CL)을 제외하고는 식이지방의 종류, d-limonene의 섭취, 발암물질의 투여에 따라 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 4).

CL은 옥수수유군보다 정어리유군에서 유의적으로 높게 나타났고, 식이지방과 발암물질 사이에 상호작용이 있는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ).

Phosphatidylserine은 정어리유군에서 발암물질 비투여시 d-limonene 섭취에 따라 유의적으로 증가하고, d-limonene 섭취시 발암물질 투여에 따라 유의적으로 감소하는 것으로

**Table 4. Effect of different dietary oils and d-limonene on hepatic membrane fractional phospholipid composition in rats treated with DEN (%)**

Groups <sup>1)</sup>	Phospholipid composition <sup>2)</sup>						
	PE	PG	PI	PS	CL	PC	PE/PC
CO	31.7 ± 5.3 <sup>3)NS</sup>	4.6 ± 2.3 <sup>NS</sup>	8.1 ± 2.9 <sup>NS</sup>	4.0 ± 1.2 <sup>ab4)</sup>	3.2 ± 0.5 <sup>c</sup>	48.4 ± 4.5 <sup>NS</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>NS</sup>
CO-DEN	28.8 ± 5.5	3.5 ± 0.4	9.0 ± 1.8	3.9 ± 0.8 <sup>ab</sup>	3.5 ± 1.5 <sup>bc</sup>	51.3 ± 4.7	0.6 ± 0.1
CL	32.6 ± 3.7	3.4 ± 0.4	8.6 ± 2.2	3.3 ± 1.0 <sup>b</sup>	3.5 ± 1.0 <sup>bc</sup>	48.5 ± 4.3	0.7 ± 0.1
CL-DEN	28.3 ± 4.7	4.2 ± 0.9	10.2 ± 1.9	4.3 ± 0.8 <sup>ab</sup>	3.8 ± 0.6 <sup>bc</sup>	49.2 ± 4.3	0.6 ± 0.1
SO	29.2 ± 4.2	3.7 ± 1.1	8.7 ± 1.9	3.4 ± 0.8 <sup>b</sup>	4.9 ± 1.0 <sup>a</sup>	50.1 ± 3.8	0.6 ± 0.1
SO-DEN	32.1 ± 6.5	3.5 ± 0.9	8.1 ± 2.3	3.7 ± 0.9 <sup>ab</sup>	3.9 ± 0.8 <sup>abc</sup>	49.2 ± 5.2	0.7 ± 0.2
SL	32.6 ± 6.8	3.6 ± 1.1	8.0 ± 3.1	4.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	4.5 ± 1.0 <sup>ab</sup>	47.4 ± 4.9	0.7 ± 0.2
SL-DEN	29.4 ± 3.7	3.9 ± 1.4	9.2 ± 1.8	3.4 ± 0.8 <sup>b</sup>	4.0 ± 0.3 <sup>abc</sup>	50.1 ± 5.3	0.6 ± 0.1
Significant factor <sup>5)</sup>	NS	NS	NS	NS	O, O×D	NS	NS

<sup>1)</sup>CO=corn oil, CL=corn oil+d-limonene, SO=sardine oil, SL=sardine oil+d-limonene.

<sup>2)</sup>PE=phosphatidyl ethanolamine, PG=phosphatidyl glycerol, PI=phosphatidyl inositol, PS=phosphatidyl serine, CL=cardiolipin, PC=phosphatidyl choline.

<sup>3)</sup>Values are mean ± SD, Data are presented as % of total phospholipids

<sup>4)</sup>Means with different superscripts within a column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test, NS=not significant;  $n = 5 \sim 11$ .

<sup>5)</sup>Statistical significance was calculated by 3-way ANOVA at  $p < 0.05$ , O=oil, O×D=oil×DEN, NS=not significant.

나타났다. Phosphatidylinositol(PI), phosphatidylcholine(PC), phosphatidylglycerol(PG), phosphatidylethanolamine(PE), PE/PC ratio는 모두 식이지방 종류, d-limonene 섭취, 발암물질 투여에 따라 차이가 없는 것으로 나타났다. Hargreaves 등(35)과 Robblee와 Clandinin(36)은 식이지방의 지방산 종류에 따라 PE/PC ratio를 변화시킨다고 보고하였으나 본 실험에서는 그런 경향을 나타내지 않았다. 이런 차이는 본 실험에서는 면적적분기에 의한 인지질 면적비로 상대적인 인지질 조성만을 측정하였기 때문에 나타날 수 있으며, 앞으로는 인지질의 양에 대한 보다 더 정밀한 실험이 요구된다고 하겠다.

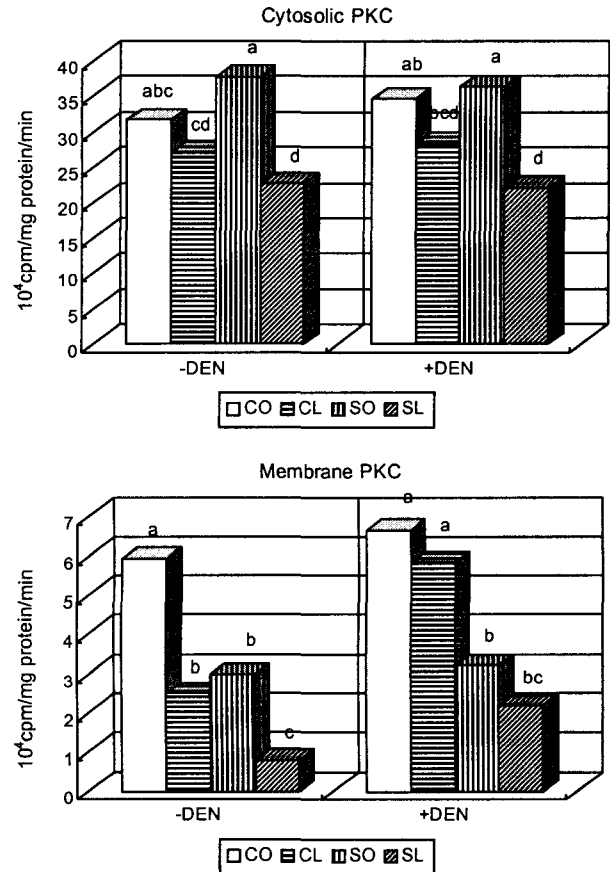
Membrane fraction의 지방산 조성은 d-limonene 섭취나 발암물질 투여에 따른 차이는 나타나지 않았으나 섭취 식이지방의 종류에 따른 뚜렷한 차이가 나타나 옥수수유군에서는 n-6계 지방산의 함량이 정어리유군보다 유의적으로 높고, 정어리유군에서는 n-3계 지방산의 함량이 높은 것으로 나타났다(Table 5). 따라서 n-6/n-3 ratio가 정어리유군에서 유의적으로 낮게 나타났다. 지방산의 포화정도를 계산한 결과 단일불포화지방산(MUFA)의 경우 정어리유군에서 유의적으로 높은 함량을 나타내고, 고도불포화지방산(PUFA)의 경우 옥수수유군에서 함량이 유의적으로 높게 나타났다. 포화지방산(SFA)의 함량과 불포화/포화비율(UFA/SFA)은 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

**Protein kinase C 활성도**

Cytosol에서의 PKC활성도는 식이지방 종류나 발암물질 투여에 따른 차이는 거의 없고, d-limonene 섭취시 유의적으로 감소하였다(p<0.001). 특히 그 감소 정도가 옥수수유군보다 정어리유군에서 크게 나타났다.

Membrane fraction에서는 옥수수유군보다 정어리유군에서 유의적으로 감소(p<0.001)했으며, 발암물질 투여시 증가하는 경향을 나타냈고, d-limonene 섭취시 감소하는 경향을 나타냈다. 특히, membrane fraction에서는 발암물질과 d-

limonene의 상호작용(p<0.05)이 있는 것으로 나타났다(Fig 2). 이는 membrane fraction에서의 PKC 활성도가 발암물질 비투여군에서는 식이지방의 종류에 상관없이 d-limonene 투여에 의하여 감소하였으나, 발암물질 투여군에서는 d-limo-



**Fig 2. Effect of different dietary oils and d-limonene on hepatic cytosolic and membrane PKC specific activity in rat treated with DEN.**

Groups: refer to the legend of Table 2. Values are mean. Different alphabets above the bar indicate significant difference at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

**Table 5. Effect of different dietary oils and d-limonene on hepatic membrane fractional fatty acid composition in rats treated with DEN**

Fatty acid	CO <sup>1)</sup>	CO-DEN	CL	CL-DEN	SO	SO-DEN	SL	SL-DEN
SFA (%)	41.7±4.9 <sup>2)3)ab</sup>	44.8±4.9 <sup>a</sup>	38.8±3.8 <sup>b</sup>	40.9±1.9 <sup>ab</sup>	43.3±4.9 <sup>a</sup>	42.3±1.9 <sup>ab</sup>	42.5±2.3 <sup>ab</sup>	42.6±2.4 <sup>ab</sup>
MUFA (%)	5.9±0.9 <sup>b</sup>	5.5±0.6 <sup>b</sup>	6.8±2.0 <sup>b</sup>	7.0±0.7 <sup>b</sup>	11.7±3.2 <sup>a</sup>	11.3±2.4 <sup>a</sup>	11.1±2.1 <sup>a</sup>	10.8±1.7 <sup>a</sup>
PUFA (%)	52.4±4.3 <sup>ab</sup>	49.7±5.2 <sup>bc</sup>	54.4±5.5 <sup>a</sup>	52.1±1.4 <sup>ab</sup>	45.1±3.4 <sup>d</sup>	46.5±1.9 <sup>cd</sup>	46.4±3.4 <sup>cd</sup>	46.6±1.3 <sup>cd</sup>
UFA/SFA	1.4±0.4 <sup>ab</sup>	1.3±0.2 <sup>b</sup>	1.6±0.3 <sup>a</sup>	1.4±0.1 <sup>ab</sup>	1.3±0.3 <sup>b</sup>	1.4±0.1 <sup>ab</sup>	1.4±0.1 <sup>b</sup>	1.4±0.1 <sup>b</sup>
MCL	18.7±0.2 <sup>bc</sup>	18.6±0.1 <sup>cd</sup>	18.5±0.1 <sup>d</sup>	18.5±0.1 <sup>d</sup>	18.8±0.1 <sup>ab</sup>	18.8±0.1 <sup>a</sup>	18.8±0.1 <sup>a</sup>	18.7±0.1 <sup>ab</sup>
UI	2.2±0.2 <sup>b</sup>	2.0±0.2 <sup>b</sup>	2.2±0.2 <sup>b</sup>	2.1±0.1 <sup>b</sup>	2.4±0.2 <sup>a</sup>	2.5±0.1 <sup>a</sup>	2.5±0.2 <sup>a</sup>	2.5±0.1 <sup>a</sup>
Σn-6	39.0±2.7 <sup>b</sup>	41.3±4.6 <sup>b</sup>	45.8±3.5 <sup>a</sup>	45.2±1.5 <sup>a</sup>	17.5±1.4 <sup>c</sup>	18.7±1.9 <sup>c</sup>	18.3±2.0 <sup>c</sup>	18.6±4.5 <sup>c</sup>
Σn-3	12.9±6.0 <sup>b</sup>	8.2±0.9 <sup>c</sup>	8.2±2.1 <sup>c</sup>	6.5±1.1 <sup>c</sup>	26.8±3.2 <sup>a</sup>	26.7±3.5 <sup>a</sup>	27.3±3.0 <sup>a</sup>	27.0±4.2 <sup>a</sup>
n-6/n-3	3.4±1.1 <sup>c</sup>	5.1±0.6 <sup>b</sup>	5.9±1.5 <sup>b</sup>	7.1±1.3 <sup>a</sup>	0.7±0.1 <sup>d</sup>	0.7±0.2 <sup>d</sup>	0.7±0.1 <sup>d</sup>	0.7±0.3 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup>CO=corn oil, CL=corn oil+d-limonene, SO=sardine oil, SL=sardine oil+d-limonene, MCL=mean chain length, UI=unsaturation index, Σn-6=sum of n-6 fatty acids, Σn-3=sum of n-3 fatty acids, n-6/n-3: n-6/n-3 fatty acids ratio.

<sup>2)</sup>Expressed as % distribution of fatty acid methyl esters.

<sup>3)</sup>Values are mean ± SD. Means with different superscripts within each row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test; n=5~11.

nene 투여에 의해 PKC 활성도가 유의적인 감소 효과를 보지 못했다는 것을 의미한다.

Nair 등(8)의 연구에서 n-3 지방산 섭취시 막부착 PKC의 활성도가 감소됨을 보고하였고, Blumberg(6)은 발암물질 투여시 Ca<sup>++</sup>activated, lipid-dependent PKC 활성도가 증가한다고 하였다.

Masmoudi 등(20)과 Castagna 등(7)에 의하면 Ca<sup>++</sup>activated, lipid-dependent PKC가 cytosol에 많이 분포하고, 암화과정시 cytosol PKC가 membrane로 이동한다고 했으며, Crowell 등(15)은 d-limonene이 anticarcinogen으로 작용하여 isoprenylation을 억제한다고 하였다.

이런 경향은 본 실험에서도 같은 것으로 나타나 옥수수유군보다는 정어리유군에서 PKC 활성도가 낮았고, 발암물질 투여시 membrane fractional PKC의 활성이 증가하는 경향을 나타냈으며, d-limonene 섭취시 감소하였다. 따라서 cytosolic PKC가 암화과정에 의해 membrane으로 이동되며, 식이지방의 종류와 d-limonene의 효과가 membrane associated PKC에 더 크게 작용한다고 생각된다.

최근에는 n-3 지방산이나 d-limonene이 PKC expression을 감소시키고, apoptosis 촉진 단백질의 발현을 증가시켜 tumor cell의 apoptosis를 증가시킨다는 연구(37)가 보고되고 있어 n-3 지방산과 d-limonene의 발암억제 기전을 설명하고 있다.

#### Glutathione S-transferase 활성도

식이지방의 종류에 따른 활성도의 변화는 나타나지 않았으나 발암물질 투여 시와 d-limonene 섭취 시 모두 유의적으로 증가( $p < 0.001$ )하였고, 발암물질과 d-limonene을 같이 처리했을 때 더욱 증가하였다(Fig. 3). GST는 독성물질을 투여할 때 그것을 제거하기 위하여 활성도가 주로 증가하였다. 따라서 d-limonene도 많은 양을 투여하면 독성이 있을 것으

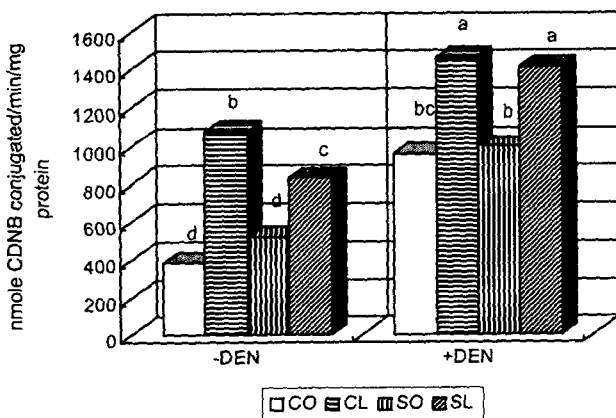


Fig. 3. Effect of different dietary oils and d-limonene on hepatic cytosolic glutathione S-transferase specific activity in rat treated with DEN.

Groups: refer to the legend of Table 2.

Values are mean. Different alphabets above the bar indicate significant difference at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

로 추정된다. 또한, 식이지방의 종류와 d-limonene 섭취의 상호작용이 있는 것으로 나타나 옥수수유를 섭취한 군이 정어리유를 섭취한 군보다 d-limonene 투여 시 GST 활성도의 증가폭이 더 컸다.

#### 요 약

본 연구는 우리나라에서 발병률이 높은 간암의 발생과정에서 정어리유와 d-limonene의 섭취가 미치는 영향을 세포막 지질조성 및 PKC 활성도를 통해 조사하여 이들의 항암작용관련 기전을 규명하고자 하였다. 따라서 이유된 흰쥐를 지방산 조성이 아주 다른 옥수수유, 정어리유를 15% 수준으로 공급하고 d-limonene 섭취군은 5%수준으로 공급하여 실험군에서는 발암물질인 DEN을 2회 복강 주사하고 PB를 물에 섞어 주어 20주간 사육하여 membrane fraction의 지방산 조성 및 지질의 조성, glutathione-S-transferase, PKC 활성도를 조사하여 아래와 같은 결과를 얻었다. 간 세포막의 콜레스테롤과 인지질 함량에 대한 C/PL ratio는 옥수수유군에서 발암물질 투여나 d-limonene의 섭취에 따른 효과가 없었으나 정어리유군에서는 발암물질 투여시, d-limonene 섭취시 유의적인 감소를 나타내어 식이지방의 종류에 따라 발암물질과 d-limonene의 작용이 차이가 있는 것으로 나타났다. Membrane fraction의 인지질 조성은 CL을 제외한 PE, PI, PG, PC, PS와 PE/PC ratio 등 모두에 있어서 식이지방의 종류, 발암물질의 투여, d-limonene 섭취에 따른 차이가 나타나지 않았다. 세포막의 지방산 조성을 나타내는 n-6/n-3 ratio가 정어리유군에서 옥수수유군보다 유의적으로 낮았고, 옥수수유군에서는 발암물질 투여나 d-limonene의 섭취에 따라 유의적으로 증가했으나 정어리유군에서는 발암물질과 d-limonene에 의한 차이가 없었다. Cytosolic PKC의 활성은 식이지방의 종류와 발암물질 투여에 따른 차이는 없었고, d-limonene의 섭취에 따라 유의적 감소를 나타냈으며, 막부착 PKC의 활성은 옥수수유군에서 유의적으로 높았고, d-limonene 섭취에 따라 감소 경향을 발암물질 투여에 따라서는 증가 경향을 보였으나 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. GST 활성은 식이지방의 종류에 따른 차이는 없었으나 발암물질 투여와 d-limonene 섭취에 따라 유의적으로 증가하였으며, 발암물질과 d-limonene을 같이 공급 시에 더욱 더 유의적으로 증가하였다. 이상의 실험 결과를 종합해 보면 암화과정에 일어나는 지방의 대사가 식이지방의 종류에 따라 차이를 보이며, 특히 정어리유군에서 d-limonene에 의한 C/PL ratio가 감소하여 막 유동성에 변화를 초래하고, 이에 따라 membrane bound enzyme의 활성에 변화를 가져오는 것으로 생각된다. 따라서 식이지방의 종류가 암의 발생에 미치는 영향이 다르고, 막부착 PKC 활성도를 감소시켜 발암을 억제하는 효과가 있으며, 이 효과는 지방의 종류의 따라 차이가 있는 것으로 생각된다. 최근 n-3 지방산이나 d-lim-

onene이 PKC expression을 감소시키고, apoptosis 촉진 단백질의 발현을 증가시켜 tumor cell의 apoptosis를 증가시킨다고 하여 n-3 지방산과 d-limonene의 또 다른 발암억제 기전을 설명하고 있다. 그러나 n-3 지방산과 d-limonene의 상호효과에 대한 연구는 부족한 실정이므로 d-limonene과 n-3 지방산의 교호작용에 의한 발암억제 기전에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다고 하겠다.

### 감사의 글

본 논문은 2003년도 서울여자대학교 교내 특별과제 연구비의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 문헌

1. WHO. 2002. *Nutrition and lifestyle: opportunities for cancer prevention*. IARC press, Lyon. Vol 156.
2. Birt DF. 1990. The influence of dietary fat on carcinogenesis: Lessons from experimental models. *Nutr Rev* 48: 1-5.
3. Bartsch H, Nair J, Owen R. 1999. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their roles as risk modifiers. *Carcinogenesis* 20: 2209-2218.
4. Roynette CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C. 2003. N-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clinical Nutrition*, In Press.
5. Blobe GC, Obeid LM, Hannun YA. 1994. Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* 13: 411-431.
6. Blumberg PM. 1988. Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters. *Cancer Res* 48: 1-8.
7. Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. 1982. Direct activation of calcium activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257: 7847-7851.
8. Nair SSD, Leitch J, Garg ML. 2001. N-3 polyunsaturated fatty acid supplementation alters inositol phosphate metabolism and protein kinase C activity in adult porcine cardiac myocytes. *J Nutr Biochem* 12: 7-13.
9. Law MR. 1992. Serum cholesterol and cancer. *Br J Cancer* 65: 307-308.
10. Siperstein MD, Fagan VM. 1964. Deletion of the cholesterol-negative feedback system in liver tumor. *Cancer Res* 24: 1108-1115.
11. Rao CV, Newmark HL, Reddy BS. 2002. Chemopreventive effect of farnesol and lanosterol on colon carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* 26: 419-425.
12. Crowell PL, Gould MN. 1994. Chemoprevention and therapy of cancer by d-limonene. *CRC Crit Rev Oncogen* 5: 1-22.
13. Kawata S, Nagase T, Yamasaki E, Ishiguro H, Matsuzawa Y. 1994. Modulation of the mevalonate pathway and cell growth by pravastatin and d-limonene in a human hepatoma cell line (Hep G2). *Br J Cancer* 69: 1015-1020.
14. Clegg RJ, Middleton B, Bell GD, White BA. 1982. The mechanism of cyclic monoterpene inhibition of hepatic HMG CoA reductase in vivo in the rat. *J Biol Chem* 257: 2294-2299.
15. Crowell PL, Chang PR, Ren Z, Elson CE, Gould MN. 1991. Selective inhibition of isoprenylation of 21-26-KDa proteins by the anticarcinogen d-limonene and its metabolites. *J Biol Chem* 266: 17679-17685.
16. Jang JJ, Lee YS, Lee MS, Kim TH. 1994. Development of GST-P<sup>+</sup> foci in 3week old rats induced by diethylnitrosamine: Preliminary data for liver foci model. *J Korean Cancer* 26: 23-235.
17. Hard GC, Whysner J. 1994. Risk assessment of d-limonene: an example of male rat-specific renal tumorigens. *Critical Rev Toxicol* 24: 231-254.
18. Rao GN. 1988. Rodent diets of carcinogenesis studies. *J Nutr* 118: 929-931.
19. American Institute of Nutrition. 1977. Report of the AIN Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 107: 1340-1348.
20. Masmoudi A, Labourdette G, Mersel M, Huang FL, Huang KP, Vincendon G, Malviya AN. 1989. Protein kinase C located in rat liver nuclei. *J Biol Chem* 264: 1172-1179.
21. Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
22. Sale FD, Marchesini S, Fishman PH, Berra B. 1984. A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts. *Anal Biochem* 142: 347-350.
23. Patton GM, Fasulo JM, Robin SJ. 1982. Separation of phospholipids and individual molecular species of phospholipids by high-performance liquid chromatography. *J Lipid Res* 23: 190-196.
24. Metcalfe LD, Schmitz AA, Pelka JR. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 38: 514-515.
25. Yasuda I, Kishimoto A, Tanaka S, Tominaga M, Sakurai A, Nishizuka Y. 1990. A synthetic peptide substrate for selective assay of protein kinase C. *BBRC* 166: 1220-1227.
26. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferase: The first enzymatic steps in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RT. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
28. Tisdale MJ, Dhesi JK. 1990. Inhibition of weight loss by  $\omega$ -3 fatty acids in an experimental cachexia model. *Cancer Res* 50: 5022-5026.
29. Lee MS, Kim JH. 1993. Effects of different dietary oils on hepatic mitochondrial lipid composition, adenine nucleotide translocase and ATPase activities in carcinogen treated rats. *Korean J Nutrition* 26: 532-546.
30. Kawata S, Yakaishi K, Nagase T, Ito N, Matsuda Y, Tamura S, Matsuzawa Y, Tarui S. 1990. Increase in the active form of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in human hepatocellular carcinoma: Possible mechanism for alteration of cholesterol biosynthesis. *Cancer Res* 50: 3270-3273.
31. Innis SM, Clandinin MT. 1981. Mitochondrial-membrane polar-head-group composition is influenced by diet fat. *Biochem J* 198: 231-234.
32. Daum G. 1985. Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 822: 1-42.
33. Kessler AR, Kessler B, Yehuda S. 1985. Changes in the cholesterol level, cholesterol-to-phospholipid mole ratio, and membrane lipid microviscosity in rat brain induced by age and a plant oil mixture. *Biochem Pharmacol* 34: 1120-1121.
34. Lee MS, Kim JH. 2000. Effects of different dietary oil and d-limonene on histopathological and biochemical changes



- in experimental hepatocarcinogenesis. *Korean J Nutr* 33: 23-32.
35. Hargreaves KM, Pehowich DJ, Clandinin MT. 1989. Effect of dietary lipid composition on rat liver microsomal phosphatidylcholine synthesis. *J Nutr* 119: 344-348.
36. Robblee NM, Clandinin MT. 1984. Effect of dietary fat level and polyunsaturated fatty acid content on the phospholipid composition of rat cardiac mitochondrial membranes and mitochondrial ATPase activity. *J Nutr* 114: 263-269.
37. Mally A, Chipma JK. 2002. Non-genotoxic carcinogen: early effects on gap junctions cell proliferation and apoptosis in the rat. *Toxicology* 180: 233-248.

(2003년 7월 15일 접수; 2003년 11월 29일 채택)