

## Conjugated Linoleic Acid (CLA)와 그 이성체가 대장암 세포인 Caco-2 세포의 Apoptosis에 미치는 영향

<sup>1</sup>한림대학교 생명과학부, <sup>2</sup>실버생물산업기술연구센터, <sup>3</sup>한국영양연구소

김 은 지<sup>1,2</sup> · 윤 정 한<sup>1,2,3</sup>

### Effect of Conjugated Linoleic Acid and Its Isomers on the Apoptosis of Caco-2 Colon Cancer Cells

Eun Ji Kim<sup>1,2</sup> and Jung Han Yoon Park<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Division of Life Sciences, <sup>2</sup>Silver Biotechnology Research Center,  
<sup>3</sup>the Korean Institute of Nutrition, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

Conjugated linoleic acid (CLA) is a group of positional and geometric isomers of linoleic acid (LA) and has chemoprotective properties in a variety of experimental cancer models. *Cis-9,trans-11* and *trans-10,cis-12* CLA are the principal isomers found in foods. The present study was performed to determine whether a mixture of CLA isomers and the two individual CLA isomers induce apoptotic cell death in Caco-2 cells. Caco-2 cells were incubated in serum-free medium containing 100  $\mu$ M of the mixture of CLA isomers, 100  $\mu$ M linoleic acid, 10  $\mu$ M *cis-9,trans-11* CLA, or 10  $\mu$ M *trans-10,cis-12* CLA. The mixture of CLA isomers and *trans-10,cis-12* CLA inhibited Caco-2 cell growth. By contrast *cis-9,trans-11* CLA had no effect. Cells treated with the mixture of CLA isomers and *trans-10,cis-12* CLA produced a distinct oligonucleosomal ladder with different sizes of DNA fragments, a typical characteristic of cells undergoing apoptosis and were stained with Annexin-V. The mixture of CLA isomers and *trans-10,cis-12* CLA increased the activity of caspase-3, which is a central regulator of apoptosis. These results suggested that the growth inhibitory effect of the mixture of CLA isomers may, at least in part, be attributed to caspase-3 dependent apoptosis in Caco-2 cells.

**Key Words:** Conjugated linoleic acid (CLA), *trans-10,cis-12* CLA, Apoptosis, Caspase-3

## 서 론

한국인의 사망원인 1위를 차지할 만큼 그 발생과 그에 의한 사망이 급증하고 있는 암의 발생은 다양한 환경적 요인에 기인하는 것으로 생각되고 있다.<sup>1)</sup> 암의 발생에 영향을 주는 환경적 요인 중 식이가 중요한 조절인자로 알려짐에 따라,<sup>1)</sup> 식품 내 존재하는 발암 성분 및 항암 성분에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

Conjugated linoleic acid (CLA)는 새김질 동물의 고기와 유제품에 자연적으로 함유되어 있는 지방산으로, 켈레(conjugated) 이중결합을 가지고 있는 리놀레산(linoleic acid, LA)의 위치적, 기하학적 이성체의 혼합물이다.<sup>2)</sup> CLA는 LA와 매우 유사한 구조를 가지고 있지만 LA와는 다른 생물학적인 효과를 나타낸다. 가장 특징적인 면으로, LA는 암을 촉진하는<sup>3,4)</sup> 반면 CLA는 강한 항암 효과가 있는 것으로 알려졌다.<sup>5,6)</sup> 동물실험에서 여러 생리적인 효과를 나타낸 CLA는 화학적으로 linoleic acid로부터 합성된 것으로 *cis-9,trans-11* CLA와 *trans-10, cis-12* CLA 이성체가 각각 48% 함유되어 있고, *cis-9,cis-11* CLA, *trans-9,cis-11* CLA, *trans-9,trans-11* CLA, *cis-10,cis-12* CLA, *cis-10,trans-12* CLA, *trans-10,trans-12* CLA 등 6종 이상의 이성체가 미량 함유되어 있는 혼합물이다.<sup>7,8)</sup> CLA의 다양한 가능성이 생화학적 구조에 따른 것이라는 증거들이 제시되고 있으며,<sup>9)</sup> 몇몇 연구는<sup>10,11)</sup> *cis-9,trans-11* CLA와 *trans-10, cis-12* CLA가 서로 다른 효과를 나타냄을 보고하였다.

CLA는 쇠고기에서 항암 효과를 가진 물질로 Ha 등<sup>5)</sup>에 의해 분리 동정된 이후 여러 실험을 통해 항암 효과가 입증되었다. 동물실험들은 CLA가 유방암,<sup>12)</sup> 피부암,<sup>13)</sup> 전립샘암,<sup>14)</sup> 및 대장암<sup>15)</sup>의 발생을 억제함을 보여주었다. 또한 다양한 암세포주를 사용한 *in vitro* 실험에서도 CLA는 암세포의 증식을 억제하였다.<sup>16~19)</sup> CLA의 항암 기전은 명확하게 밝혀지지 않았으나, 여러 가지 가능한 기전이 제시되고 있다. Apoptosis가 CLA의 가능한 항암 기전으로 생각되고 있으며,<sup>20)</sup> 이를 뒷받침하는 연구결과가 보고되었다.<sup>21~23)</sup>

Programmed cell death라고도 불리는 apoptosis는

세포가 정상적인 상태 또는 병리학적 요인에 노출된 후에 죽음에 이르게 되는 생리학적 과정을 일컫는다. Apoptotic cell은 세포 수축, 핵의 응축과 DNA 절단과 같은 형태학적인 특징을 나타낸다.<sup>24)</sup> Apoptosis 기전의 결함이나 부적절한 apoptosis 신호전달 등에 의해 apoptosis 조절에 이상이 생기면, 세포가 비정상적으로 증식하여 암이 초래될 수 있으므로, apoptosis 기전을 회복시키는 것은 중요한 항암 작용으로 간주된다.<sup>11,24)</sup>

Apoptosis는 세포내·외적인 신호에 의해 시작되어 일련의 과정을 거쳐 이루어진다. Cysteine acid proteases인 caspase는 apoptosis의 중요한 조절인자로 작용한다.<sup>25)</sup> Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , TNF receptor ligand (FasL), DNA damage 와 endoplasmic reticulum stress 등의 proapoptotic 신호가 들어오면 caspase-8, -9, -10, -12 등의 initiator caspase가 활성화되고, 활성화된 initiator caspase는 caspase-3, -6, -7 등의 effector caspase를 활성화시킨다. 활성화된 effector caspase는 poly (ADP-ribose) polymerase,  $\alpha$ -fodrin, DNA fragmentation factor (DFF), lamin A 등의 단백질을 분해하여 apoptosis를 유도한다.<sup>26)</sup>

본 연구에서는 CLA와 그 이성체의 항암 기전 연구의 일환으로, CLA 이성체 mixture와 개별 이성체가 인간의 대장암 세포인 Caco-2의 apoptosis에 미치는 영향과, apoptosis의 주요한 조절인자인 caspase의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 재료

Caco-2 세포(HTB-37)는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포배양에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium:Nutrient Mixture Ham's F12 (DMEM/F12), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin, transferrin, selenium, 100 bp DNA ladder 등은 Gibco/BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Linoleic acid (LA)와 conjugated linoleic acid (CLA) 이성체 mixture, bovine serum albumin (BSA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol 등 실험에 사용한 시약은 Sigma Chemical Co. (St.

Louis, MO, USA)에서 구입하였다. CLA의 이성체인 *cis*-9,*trans*-11 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA는 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다. Annexin-V-FLUOS는 Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany)에서 구입하였고, ApoAlert™ Caspase-3 Colorimetric Assay Kit과 ApoAlert™ Caspase-8 Colorimetric Assay Kit은 Clontech (Palo Alto, CA, USA)에서 구입하였다. 세포 배양에 사용한 1회용 멸균 용기는 Corning (Corning, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

## 2) 세포배양

Caco-2 세포는 DMEM/F12 배지를 사용하여 37°C 습윤한 CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>/95% air)에서 배양하였다. 실험에 사용할 세포를 유지하기 위해서는 DMEM/F12 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 세포가 80% confluent 해지면 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA로 처리하여 계대 배양하였고 배지는 2일마다 교환하였다.

## 3) 세포증식 변화 측정

CLA 이성체 mixture와 CLA 이성체가 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포를 10% FBS가 포함된 배지로 희석하여  $4 \times 10^4$  cells/well의 밀도로 24 well-plate에 분주하였다. 24시간이 지난 후 FBS가 없는 serum-free medium으로 교환하였다. Serum-free medium은 DMEM/F12에 transferrin (5 µg/ml), selenium (5 ng/ml)을 첨가하여 만들었고 지방산의 산화를 방지하기 위해 ascorbic acid (50 ng/ml)와  $\alpha$ -tocopherol (20 ng/ml)을 첨가하였다. 24시간 동안 serum-free medium에서 배양하여 FBS의 효과를 배제한 후 지방산이 들어 있는 serum-free medium으로 배지를 교환하였다. 배지에 첨가한 지방산은 Kim 등<sup>18)</sup>이 사용한 방법으로, 지방산이 없는 BSA와 4 : 1의 몰비로 결합시켜 만든 지방산-BSA 결합체를 사용하였다. 배지에 지방산 첨가 시 모든 well에 같은 농도의 BSA가 포함되도록 BSA의 양을 조절하여 첨가하였고, 지방산이 들어 있는 배지는 2일 마다 교환하였다. 지방산을 첨가하고 24시간, 48시간, 72시간이 경과한 후 MTT assay로 살아

있는 세포 수를 측정하였다.<sup>27)</sup>

## 4) DNA laddering 측정

CLA 이성체 mixture와 CLA 이성체가 apoptosis에 미치는 영향을 조사하기 위해 DNA fragmentation 정도를 측정하였다. Caco-2 세포를  $1 \times 10^5$  cells/dish의 밀도로 100 mm dish에 분주한 후 위와 동일한 방법으로 지방산을 처리하였다. 지방산을 첨가하여 72시간 배양한 후 차가운 PBS를 넣어 굵은 후 2,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포를 수집하였다. 수집한 세포에 extraction buffer (50 mM Tris, 20 mM EDTA, 1% Nonidet, pH 7.5)를 넣어 4°C에서 2시간 교반하였다. 그 후 SDS를 1%가 되도록 넣고 4°C에서 2시간 교반하고, RNase A (0.55 mg/ml)를 첨가하여 37°C에서 2시간, proteinase K (0.55 mg/ml)를 첨가하여 42°C에서 2시간 교반하였다.<sup>28)</sup> 총 volume과 같은 양의 phenol-chloroform-isoamylalcohol (25 : 24 : 1)를 넣어 잘 섞은 후에 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 상층액에 0.3 M sodium acetate와 2.5배의 100% ethanol을 넣어 DNA를 침전시킨 후 DNA를 70% ethanol로 세척하고 건조시켰다. 건조된 DNA를 TE buffer (20 mM Tris, 1 mM EDTA)로 녹인 후 260 nm, 280 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정량한 뒤, 2% agarose gel에서 전기 영동하였으며, ethidium bromide로 염색하여 가시화하였다.

## 5) Annexin-V 염색

Caco-2 세포를  $4 \times 10^4$  cells/well의 밀도로 Chamber slide에 분주한 후 위와 동일한 방법으로 지방산을 처리하였다. 지방산으로 처리한 후 48시간이 지난 후에 PBS로 세포 단층을 씻어내었다. 세포에 Annexin-V-FLUOS와 propidium iodide를 1 : 3의 비율로 incubation buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH7.4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>)에 녹인 용액을 넣어 어두운 곳에서 20분 동안 염색하였다. PBS로 세포를 충분히 씻은 후 세포에 차가운 4% formaldehyde를 처리하여 세포를 고정한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

## 6) Caspase 활성 측정

Caco-2 세포를  $3 \times 10^6$  cells/dish의 밀도로 150 mm

dish에 분주한 후 위와 동일한 방법으로 지방산을 처리한 후 ApoAlert™ Caspase-3 Colorimetric Assay Kit과 ApoAlert™ Caspase-8 Colorimetric Assay Kit을 사용하여 제조회사에서 제시한 방법에 따라 caspase activity를 측정하였다. 방법을 간단히 서술하면 다음과 같다. 차가운 PBS를 첨가하여 세포를 끊은 후 원심분리하여 세포를 수집하였다. Cell pellet에 cold cell lysis buffer를 첨가하여 얼음에서 15분간 교반한 후 원심분리하여 상층액을 얻었으며, BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA)을 사용하여 상층액의 단백질을 측정하였다. 50 µg 단백질에 DTT가 들어있는 reaction buffer를 첨가하고 caspase-3 substrate인 DEVD-p-nitroanilide (DEVD-pNA) 또는 caspase-8 substrate인 IETD-pNA를 넣어 37°C에서 1시간 동안 incubation하면서 20분 간격으로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 통계 처리

모든 분석 수치는 mean ± SEM으로 나타내었다. 수집된 결과는 SAS (Statistical Analysis System) PC 프로그램을 이용하여 통계 분석하였다. 각 실험군들의 평균치간의 유의성은 α=0.05 수준에서 analysis of variance와 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.

결 과

1) CLA 이성체 mixture와 CLA 이성체가 대장암 세포의 증식에 미치는 영향

CLA 이성체 mixture와 CLA 이성체가 인간의 대장암 세포에서 유래한 cell line인 Caco-2 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 CLA 이성체 mixture, trans-10,cis-12 CLA, cis-9,trans-11 CLA, LA를 세포 배양액에 첨가하여 세포를 배양한 후 살아있는 세포수를 측정하였다. 100 µM CLA 이성체 mixture을 첨가한 경우 세포 증식은 24시간이 지난 후부터 유의적으로 감소하여 72시간에는 지방산을 첨가하지 않은 대조군에 비해 살아있는 세포수가 36% 감소하였다(Fig. 1). LA를 CLA 이성체 mixture 첨가 농도와 같은 농도로 첨가한 경우 24시간에는 지방산을 첨가하지 않은 대조군보다 세포 증식이 증가하였으나, 48시간, 96시간에는 유의적

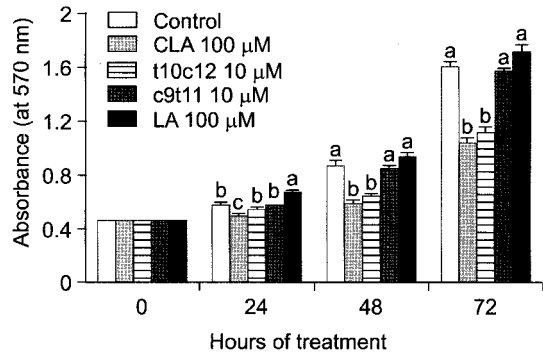


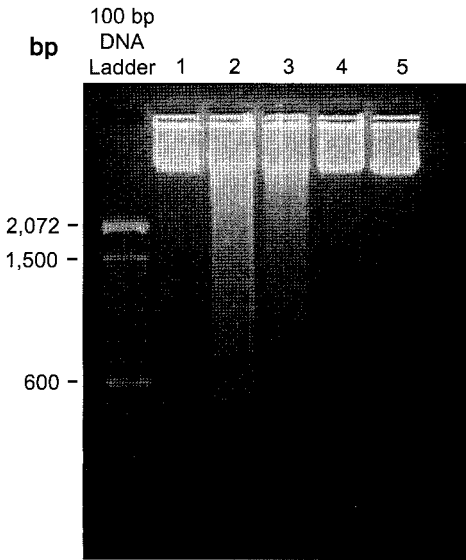
Fig. 1. Effect of the mixture of conjugated linoleic acid (CLA) isomers and the individual CLA isomers on viable Caco-2 cell number. Caco-2 cells were plated in 24-well plates at 4 × 10<sup>4</sup> cells/well in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. One day later, the monolayers were serum-starved with serum-free DMEM/F12 supplemented with 5 µg/ml transferrin and 5 ng/ml selenium for 24 hours. After serum starvation, cells were incubated in serum-free medium containing 100 µM CLA, 100 µM linoleic acid (LA), 10 µM cis-9,trans-11 CLA (c9t11), or 10 µM trans-10,cis-12 CLA (t10c12). Cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean ± SEM (n=5). Bars with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test at each time point.

인 차이가 없었다(Fig. 1). CLA를 구성하고 있는 이성체 중 그 함량이 가장 많은 이성체인 cis-9,trans-11 CLA와 trans-10,cis-12 CLA가 Caco-2 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 CLA 이성체 mixture 첨가 농도의 1/10인 10 µM의 농도로 세포 배양액에 첨가하여 세포의 증식 정도를 비교하였다. cis-9,trans-11 CLA는 세포증식에 영향을 미치지 않았으나 trans-10,cis-12 CLA는 세포의 증식을 현저히 감소하였다. trans-10,cis-12 CLA의 세포 증식 억제는 48시간 이후부터 나타났고, 10 µM trans-10,cis-12 CLA는 100 µM CLA 이성체 mixture에 의한 세포 증식 억제 정도와 유의적인 차이가 없었다(Fig. 1).

2) CLA 이성체 mixture와 CLA 이성체가 대장암 세포의 apoptosis에 미치는 영향

CLA 이성체 mixture와 CLA 이성체가 apoptosis를 유도하는지를 알아보기 위해 DNA laddering을

실시하여 DNA fragmentation 정도를 조사하였다. 세포의 증식 억제 효과가 있었던 100  $\mu$ M CLA 이성체 mixture와 10  $\mu$ M *trans*-10,*cis*-12 CLA를 처리한 세포에서는 apoptotic cell death의 특징인 oligonucleosomal-laddering pattern이 현저히 나타났다. 반면 세포 증식에 아무런 영향을 미치지 않았던 LA와 *cis*-9,*trans*-11 CLA를 처리한 세포에서는 DNA laddering pattern이 나타나지 않았다(Fig. 2). CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 유도된 apoptosis를 확인하기 위해 Annexin-V로 염색한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 지방산을 처리하지 않은 대조군의 세포는 Annexin-V에 의해 염색되지 않았지만 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA를 처리한 세포는 Annexin-V에 의해 염색되어 형광색을 띠었다(Fig. 3).

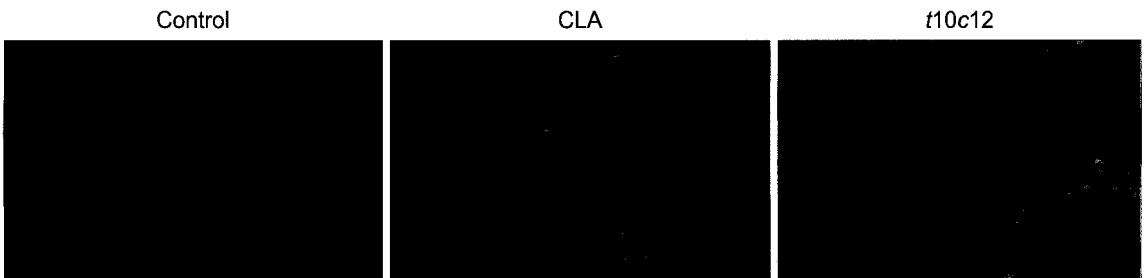


**Fig. 2.** Effect of the mixture of CLA isomers and the individual CLA isomers on DNA fragmentation in Caco-2 cells. Cells were plated at a density of  $1 \times 10^5$  cells/dish in 100 mm dishes and treated with fatty acid for 72 h as described in Fig. 1. DNA samples were prepared and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. A photograph of the ethidium bromide-stained gel, which is representative of three independent experiments, is shown. (lane 1; Control, lane 2; CLA isomer mixture 100  $\mu$ M, lane 3; t10c12 10  $\mu$ M, lane 4; c9t11 10  $\mu$ M, lane 5; LA 100  $\mu$ M)

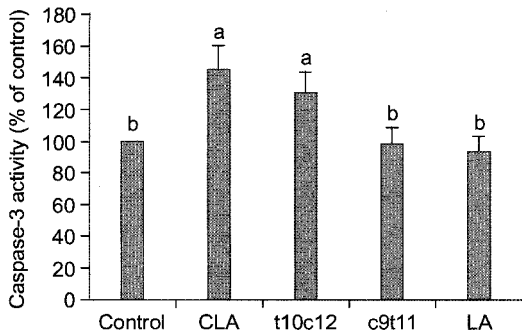
leosomal-laddering pattern이 현저히 나타났다. 반면 세포 증식에 아무런 영향을 미치지 않았던 LA와 *cis*-9,*trans*-11 CLA를 처리한 세포에서는 DNA laddering pattern이 나타나지 않았다(Fig. 2). CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 유도된 apoptosis를 확인하기 위해 Annexin-V로 염색한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 지방산을 처리하지 않은 대조군의 세포는 Annexin-V에 의해 염색되지 않았지만 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA를 처리한 세포는 Annexin-V에 의해 염색되어 형광색을 띠었다(Fig. 3).

**3) CLA 이성체 mixture와 CLA 이성체가 caspase 활성화에 미치는 영향**

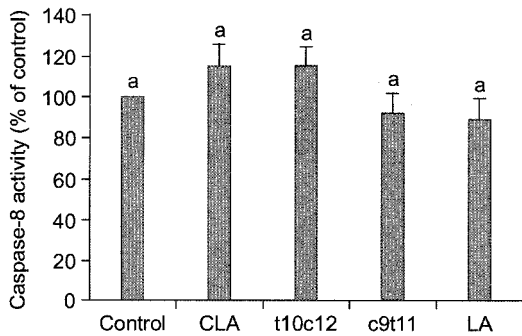
CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA의 apoptosis 유도 기전을 알아보기 위해 caspase-3와 caspase-8의 활성을 측정하였다. 지방산을 첨가하지 않은 대조군에 비해 100  $\mu$ M CLA 이성체 mixture와 10  $\mu$ M *trans*-10,*cis*-12 CLA 첨가한 경우 caspase-3 활성은 유의적으로 증가하였다. 100  $\mu$ M LA와 10  $\mu$ M *cis*-9,*trans*-11 CLA은 casapse-3 활성화에 영향을 미치지 않았다(Fig. 4). Fig. 5는 서로 다른 지방산 처리 후 caspase-8 활성을 측정된 결과이다. Caspase-30 활성과는 달리 caspase-8 활성은 CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해 다소 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다(Fig. 5).



**Fig. 3.** Fluorescence micrographs of Caco-2 cells stained with Annexin-V after exposure to CLA or *trans*-10,*cis*-12 CLA. Cells were plated at a density of  $4 \times 10^4$  cells/well in chamber slide and treated with fatty acid for 48 h as described in Fig. 1. Cells were double stained with Annexin V and propidium iodide. Images were obtained using a fluorescence microscope. Microphotographs are representative of three independent experiments. Magnification,  $\times 200$ .



**Fig. 4.** Effect of the mixture of CLA isomers and the individual CLA isomers on caspase-3 activity in Caco-2 cells. Cells were plated at a density of  $3 \times 10^6$  cells/dish in 150 mm dishes and treated with fatty acid for 48 h as described in Fig. 1. Cytosolic extracts were prepared from cells, and caspase-3 activity was determined by measuring the cleavage of the substrate DEVD-pNA. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM (n=3). Values with different letters above each bar are significantly different ( $p < 0.05$ ) between different treatments.



**Fig. 5.** Effect of the mixture of CLA isomers and the individual CLA isomers on caspase-8 activity in Caco-2 cells. Cells were plated at a density of  $3 \times 10^6$  cells/dish in 150 mm dishes and treated with fatty acid for 48 h as described in Fig. 1. Cytosolic extracts were prepared from cells, and caspase-8 activity was determined by measuring the cleavage of the substrate IETD-pNA. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM (n=3). Values with different letters above each bar are significantly different ( $p < 0.05$ ) between different treatments.

## 고 찰

최근 암 발생과 암에 의한 사망률이 급증함에 따라 암을 예방하거나 암의 증식을 억제하는 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 약물에 비해 비교적 부작용이 없으며 안전하게 사용할 수 있을 것으로 생각되는 항암 특성을 가지고 있는 식품 성분들에 대한 관심이 고조되고 있다. 반추 동물의 육류나 유제품에 자연적으로 존재하는 지방산인 CLA는 강한 항암 작용이 있는 식품 성분으로 주목받고 있다. CLA의 항암 작용은 많은 연구에서 증명되고 있는데, 발암원을 투여하거나 면역 능력이 결여된 쥐에 암세포를 주입하여 종양을 유도한 동물실험에서 CLA는 여러 부위의 종양 형성을 억제하였다.<sup>12~15)</sup> 쥐에게 식이로 CLA를 공급하고 1,2-dimethylhydrazine으로 암을 유발한 경우 대장의 종양 형성이 억제되었음이 Park 등<sup>22)</sup>에 의해 보고되었으며, 대장암 세포인 SW480 세포<sup>28)</sup>와 HT-29 세포<sup>18)</sup>를 사용한 *in vitro* 실험에서도 CLA는 대장암 세포의 증식을 현저히 억제하였다. 이는 CLA가 대장암에도 강한 항암 작용이 있음을 보여준다. 본 연구에서도 CLA 이성체 mixture는 인간의 대장에서 유래한 암세포인 Caco-2 세포의 증식을 현저히 억제하였다(Fig. 1).

여러 실험에서 항암 작용을 나타낸 CLA는 8개의 이성체가 혼합되어 있는 혼합물이다.<sup>7,8)</sup> CLA를 구성하는 이성체가 서로 다른 생물학적 효과를 나타낸다는 보고들<sup>9-11)</sup>에 의해 CLA 이성체 중 활성이 있는 이성체를 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다. Kim 등<sup>18)</sup>과 Oh 등<sup>19)</sup>은 각각 대장암 세포인 HT-29 세포와 전립선암 세포인 TSU-Pr1 세포에서 *trans*-10,*cis*-12 CLA가 항암 효과가 있는 이성체임을 보고하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 CLA 이성체 mixture의 1/10 농도로 *cis*-9,*trans*-11 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA를 세포 배양액에 첨가한 경우 *cis*-9,*trans*-11 CLA는 세포 증식에 유의적인 영향을 미치지 않은 반면 *trans*-10,*cis*-12 CLA는 세포 증식을 현저히 감소하였다. 이는 *trans*-10,*cis*-12 CLA가 항암 활성을 나타내는 이성체라는 선행 연구의 결과<sup>18,19)</sup>를 확인하는 결과이다.

CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA의 강한 항암 효과가 밝혀졌으나, 암 예방이나 암 치료의 목적으로 사용하기 위해서는 항암 기전 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다. 암은 세포의 증식과 사멸의 불균형에 의한 세포의 비정상적인 증식에 의해 초래된다. 그러므로 암세포에 apoptosis를 적절하게 유도하는 것은 효과적인 항암 기전의 하나로 간주된다.<sup>11,24)</sup> 본 연구에서는 CLA 이성체 mixture와 CLA 이성체가 대장암 세포인 Caco-2 세포의 apoptosis에 미치는 영향을 조사하였다. CLA 이성체 mixture와 CLA 이성체가 apoptosis의 특징인 DNA fragmentation에 미치는 영향을 Fig. 3에 나타내었다. 암세포의 증식에 영향을 미치지 않은 LA와 *cis*-9,*trans*-11 CLA는 DNA fragmentation을 초래하지 않았으나, 세포의 증식을 현저히 억제한 CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA는 DNA fragmentation을 초래하였다(Fig. 2). CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의한 apoptosis는 세포를 Annexin-V로 염색하여 재확인할 수 있었다(Fig. 3). 비슷한 연구로서, Oh 등<sup>24)</sup>은 전립선암 세포인 TSU-Pr1 세포에서 CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA는 암세포의 DNA fragmentation을 초래하였으나, LA와 *cis*-9,*trans*-11 CLA는 DNA fragmentation에 영향을 미치지 않음을 보고하였다. CLA는 정상 쥐의 유선 상피세포의 apoptosis를 유도하여 유선 상피 세포의 밀도를 감소하고 세포의 비정상적 증식을 억제하였고,<sup>30)</sup> CLA는 유방암세포의 apoptosis도 유도하였다.<sup>22)</sup> 본 연구에서 CLA 이성체 mixture의 1/10의 농도로 *cis*-9,*trans*-11 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA를 세포에 처리한 경우 *trans*-10,*cis*-12 CLA는 apoptosis를 유도하였으나 *cis*-9,*trans*-11 CLA는 apoptosis를 유도하지 않았다(Fig. 3). *trans*-10,*cis*-12 CLA는 쥐의 간암 세포인 dRLh-84 세포,<sup>31)</sup> 대장암 세포인 SW480 세포,<sup>32)</sup> 전립선 암세포인 TSU-Pr1 세포<sup>23)</sup> 등 다양한 세포에 모두 효과적으로 apoptosis를 유도하였다. 반면 *cis*-9,*trans*-11 CLA는 고농도로 처리 시 몇몇 암세포주에서 apoptosis를 유도하였으나,<sup>21,32,33)</sup> 본 연구에서와 같이 저농도로 처리 시에는 apoptosis를 유도하지 못했다.<sup>11,23,30)</sup> 이는 *trans*-10,*cis*-12 CLA가 *cis*-9,*trans*-11 CLA보다 효과적으로 apoptosis를 유도함과 더불어 CLA를 구성하는 이성체 중 암세포

증식을 효과적으로 억제하는 활성 이성체임을 제시한다.

Caspase는 apoptosis의 중요한 조절인자로 작용한다.<sup>26)</sup> 항암제들은 caspase의 활성을 증가시켜 세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 알려지고 있다.<sup>25,34)</sup> Palombo 등<sup>11)</sup>은 대장암 세포인 MIP-101 세포와 전립선암 세포인 PC-3 세포에서 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해 total caspase (caspase-2, 3, 6-10) 활성이 증가하였다고 보고하였다. 이는 CLA의 항암 작용이 caspase-dependent apoptosis에 기인한다는 가능성을 제시한다. 본 연구에서는 death receptor-mediated signal에 의해 활성화되는 initiator caspase인 caspase-8 활성과 effector caspase인 caspase-3 활성을 측정하였다. Caspase-8 활성은 CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해 유의적으로 변화하지 않았으나(Fig. 5), caspase-3 활성은 CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해 증가하였다(Fig. 4). Yamasaki 등<sup>31)</sup>은 간암 세포인 dRLh-84 간암 세포에서 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의한 caspase-3와 caspase-9의 활성이 증가하였다고 보고하였다. 대장암 세포인 Caco-2 세포에서 CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA가 caspase-3-dependent apoptosis를 초래함을 알 수 있다.

## 결론

본 연구에서는 CLA와 그 이성체의 항암 기전 연구의 일환으로, CLA 이성체 mixture와 주요 이성체가 인간의 대장암 세포인 Caco-2의 apoptosis에 미치는 영향과, apoptosis의 주요한 조절인자인 caspase의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. CLA 이성체 mixture는 대장암 세포인 Caco-2의 세포 증식을 유의적으로 억제하였고, CLA를 구성하는 주요 이성체인 중 *cis*-9,*trans*-11 CLA는 세포의 증식에 영향을 미치지 않았으나 *trans*-10,*cis*-12 CLA는 세포의 증식을 현저하게 억제하였다. 세포 증식을 억제한 CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA는 apoptotic cell death를 유도하였고, apoptosis의 주요 조절인자인 caspase-3의 활성은 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해 증가하였다. 이로써 CLA의 세포 증식 억제는 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의한 것임을 알 수 있으며, CLA 이성체 mixture의 세포 증식 억

제는 부분적으로 caspase-3-dependent apoptosis에 의한 것임을 알 수 있다.

### 감사의 글

This work was supported by grant No. (R01-1999-000-00166-0) from the Korea Science & Engineering Foundation, by the Industry-University-Research Institute Consortium grant from the Small & Medium Business Administration, and by the Korea Science and Engineering Foundation through the Silver Biotechnology Research Center at Hallym University (R12-2001-047-02004-0).

### 참 고 문 헌

- 1) Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 1191-1308.
- 2) Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Newly recognized anticarcinogenic fatty acid: Identification and quantification in natural and processed chesses. *J Agr Food Chem* 1989; 37: 75-81.
- 3) Erickson KL. Is there a relation between dietary linoleic acid and cancer of the breast, colon, or prostate? *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 5-7.
- 4) Ip C, Carter CA, Ip MM. Requirement of essential fatty acid for mammary tumorigenesis in the rat. *Cancer Res* 1985; 45: 1997-2001.
- 5) Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1881-1887.
- 6) Ip C. Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 1523S-1529S.
- 7) Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Comp Anal* 1992; 5: 185-197.
- 8) Ip C, Scimeca J, Thompson HJ. Conjugated linoleic acid. *Cancer* 1992; 74: 1050-1054.
- 9) Pariza MW, Park Y, Cook ME. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223: 8-13.
- 10) Choi Y, Park Y, Pariza MW, Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase activity by the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284: 689-693.
- 11) Palombo JD, Ganguly A, Bistriani BR, Menard MP. The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Lett* 2002; 177: 163-172.
- 12) Visonneau S, Cesano A, Tepper SA, Scimeca J, Santoli D, Kritchevsky D. Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID mice. *Anticancer Res* 1997; 17: 969-974.
- 13) Belury MA, Nickel KP, Bird CE, Wu Y. Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutr Cancer* 1996; 26: 149-157.
- 14) Cesano A, Visonneau S, Scimeca JA, Kritchevsky D, Santoli D. Opposite effect of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res* 1996; 18: 1429-1434.
- 15) Liew C, Schutt HAJ, Chin SF, Pariza MW, Dashwood RH. Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 Rat: A study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis* 1996; 16: 3037-3043.
- 16) Shultz TD, Chew BP, Seaman WR. Differential stimulatory and inhibitory responses of human MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid and conjugated linoleic acid in culture. *Anticancer Res* 1992; 12: 2143-2145.
- 17) Schonberg S, Krokan HE. The inhibitory effect of conjugated linoleic acid derivatives (CLA) of linoleic acid on the growth of human tumor cell lines is in part due to increased lipid peroxidation. *Anticancer Res* 1995; 15: 1241-1246.
- 18) Kim EJ, Cho HJ, Kim SJ, Kang Y-H, Ha Y-L, Park JHY. Effect of conjugated linoleic acid on the proliferation of the human colon cancer cell line, HT-29. *Korean J Nutr* 2001; 34: 894-904.
- 19) Oh YS, Kim EJ, Kim JW, Kim WK, Lee HS, Yoon JH. The effect of conjugated linoleic acid and its isomers on the proliferation of prostate TSU-Pr1 cancer cells. *Korean J Nutr* 2002; 35: 192-200.
- 20) Belury MA. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. *J Nutr* 2002; 132: 2995-2998.
- 21) 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* 2000; 9: 689-696.
- 22) Park HS, Ryu JH, Ha YL, Park JH. 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. *Br J Nutr* 2001; 86: 549-555.
  - 23) Oh YS, Kim EJ, Lee SG, Chung C-K, Kang I-J, Shin HK, Park JHY. Induction of apoptotic cell death and depression of Bcl-2 protein levels by *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid in human prostate cancer. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2002; 31: 1126-1133.
  - 24) Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *Cancer J Sci Am* 1998; 4(Suppl): S8-S14.
  - 25) Thornberry N, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
  - 26) Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998; 17: 3261-3270.
  - 27) Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunological Methods* 1986; 89: 271-277.
  - 28) Goh EL, Pircher TJ, Lobie PE. Growth hormone promotion of tubulin polymerization stabilizes the microtubule network and protects against colchicine-induced apoptosis. *Endocrinology* 1998; 139: 4364-4372.
  - 29) O'Shea M, Stanton C, Devery R. Antioxidant enzyme defence responses of human MCF-7 and SW480 cancer cells to conjugated linoleic acid. *Anticancer Res* 1999; 19: 1953-1959.
  - 30) 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* 1999; 250: 22-34.
  - 31) Yamasaki M, Chujo H, Koga Y, Oishi A, Rikimaru T, Shimada M, Sugimachi K, Tachibana H, Yamada K. Potent cytotoxic effect of the *trans*10, *cis*12 isomer of conjugated linoleic acid on rat hepatoma dRLh-84 cells. *Cancer Lett* 2002; 188: 171-180.
  - 32) Miller A, Stanton C, Devery R. *Cis* 9, *trans* 11- and *trans* 10, *cis* 12-conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultured SW480 cells. *Anticancer Res* 2002; 22: 3879-3887.
  - 33) Liu JR, Chen BQ, Yang YM, Wang XL, Xue YB, Zheng YM, Liu RH. Effect of apoptosis on gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 induced by *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 999-1004.
  - 34) Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1067-1074.
-