

## 고지방식을 급여한 비만 마우스에서 luteolin이 화학적으로 유도한 대장암 발생에 미치는 영향\*

박정은 · 김은정<sup>†</sup>

대구가톨릭대학교 식품영양학과

### Effects of luteolin on chemical induced colon carcinogenesis in high fat diet-fed obese mouse\*

Park, Jeong-Eun · Kim, Eunjung<sup>†</sup>

Department of Food Science and Nutrition, Daegu Catholic University, Gyeongsan 38430, Korea

#### ABSTRACT

**Purpose:** Colorectal cancer, which is one of the most commonly diagnosed cancers in developing and developed countries, is highly associated with obesity. The association is largely attributed to changes to western style diets in those countries containing high-fat and high-energy. Luteolin (LUT) is a known potent inhibitor of inflammation, obesity, and cancer. In this study, we investigated the effects of LUT on chemical-induced colon carcinogenesis in high fat diet (HFD)-fed obese mice.

**Methods:** Five-week-old male C57BL/6 mice received a single intraperitoneal injection of azoxymethane (AOM) at a dose of 12.5 mg/kg body weight. Mice were then divided into four groups (n=10) that received one of the following diets for 11 weeks after the AOM injection: normal diet (ND); HFD; HFD with 0.0025% LUT (HFD LL); HFD with 0.005% LUT (HFD HL). One week after AOM injection, animals received 1~2% dextran sodium sulfate in their drinking water over three cycles consisting of five consecutive days each that were separated by 16 days. **Results:** Body weight, ratio of colon weight/length, and tumor multiplicity increased significantly in the HFD group compared to the ND group. Luteolin supplementation of the HFD significantly reduced the ratio of colon weight/length and colon tumors, but not body weight. The levels of plasma TNF- $\alpha$  and colonic expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 protein increased in response to HFD, but were suppressed by LUT supplementation. Immunohistochemistry analysis also showed that iNOS expression was decreased by LUT. **Conclusion:** Consumption of LUT may reduce the risk of obesity-associated colorectal cancer by suppression of colonic inflammation.

**KEY WORDS:** colon cancer, high fat diet, obesity, mouse, luteolin

## 서 론

대장암은 전 세계적으로 세 번째로 가장 흔히 발생하는 암이며 네 번째로 사망률이 높은 암이다.<sup>1,2</sup> 우리나라의 경우 보건복지부가 발표한 2015년 암 등록통계에 따르면 대장암은 위암에 이어 두 번째로 발생률이 높으며 인구 10만 명당 발생율로는 세계 1위인 것으로 나타났다. 대장암의 발생원인은 유전적 요인과 환경적 요인을 들 수 있는데 이중 식사적 요인이 전 세계 대장암 발생의 30 ~ 50%를 설

명할 수 있는 것으로 추정되고 있다.<sup>3,4</sup> 특히, 고지방, 고열량으로 대표되는 서구식 생활은 체지방의 증가와 함께 비만을 유도할 수 있으며 많은 역학연구와 실험연구에서 비만과 대장암 발생과의 상관관계에 대해서 보고해오고 있다.<sup>5</sup> 총 섭취열량 중 60%를 지방으로 공급하여 비만이 유도된 마우스에게 발암제인 azoxymethan (AOM)을 처리했을 때 대조군에 비해 aberrant crypt foci (ACF)의 발달이 증가하였으며,<sup>6</sup> AOM-dextran sodium sulfate (DSS) 대장암 모델에서도 고지방식이 급여군이 정상식이 급여군에

Received: February 2, 2018 / Revised: February 18, 2018 / Accepted: February 19, 2018

\* This work was supported by research grants from Daegu Catholic University in 2012.

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-53-850-3523, e-mail: kimeunj@cu.ac.kr

© 2018 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

비해 대장 종양수가 현저히 증가하였다.<sup>7</sup> 2015년 발표된 메타분석연구에서는 체중이 5 kg 증가할 때마다 대장암 발생률이 4%씩 증가한다고 보고되었으며, 특히 남성에서 비만에 따른 대장암 발병 위험률이 더 높은 것으로 나타났다.<sup>8</sup> 비만이 대장암을 촉진시키는 기전에 대해서는 아직 정확히 밝혀지지지는 않았지만, 고혈당, 고인슐린혈증, 인슐린저항성, 만성 지속성 염증, adipokine, 호르몬 등의 영향으로 대장 점막의 세포사멸이 감소하고 세포증식이 증가하여 대장암발생이 촉진되는 것으로 생각되고 있다.<sup>5,9,10</sup>

Luteolin (3', 4', 5', 7-tetrahydroxyflavone, LUT)은 flavonoids에 속하는 phytochemical의 하나로 로즈마리, 타임, 세이지, 카모마일과 같은 허브나 셀러리, 파슬리, 브로콜리, 양배추, 사과껍질, 양배추, 양파, 고추 등의 녹색채소에 풍부히 함유되어있다.<sup>11</sup> LUT의 생리활성기능으로는 항산화,<sup>12</sup> 항염증,<sup>13</sup> 항당뇨<sup>14</sup> 등으로 다양하며, 대장암을 포함하여 여러 암 종에 대해서도 강한 항암 작용을 가지는 것으로 알려져 있다.<sup>15</sup> 한편, 최근 여러 *in vivo*와 *in vitro* 실험에서 LUT는 갈색지방조직의 열발생 및 에너지 소비 증가,<sup>16</sup> 체중 및 체지방량 감소,<sup>17</sup> 인슐린 저항성 개선,<sup>18,19</sup> 지방세포염증반응 억제<sup>20</sup> 등 식이성 비만에 따른 여러 증

상들을 개선하는 효능이 뛰어남이 밝혀지고 있다. 이러한 선행연구결과들을 보았을 때 LUT는 비만과 연관된 대장암 발생을 예방하는 효과가 있을 것으로 기대가 되나 아직까지 *in vivo* 동물실험에서 이를 규명한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 고지방식을 급여한 마우스에서 LUT의 첨가가 대장암 발생에 미치는 영향에 대해서 염증반응을 중심으로 분석해 보았다.

## 연구방법

### 실험동물 및 식이

수컷 5주령 C57BL/6 마우스를 코아텍 바이오 (Busan, Korea)에서 구입하여 1주 동안 고형사료를 급여하며 실험 환경에 적응시켰다. 이 후 난괴법 (randomized complete block design)에 의해 10마리씩 총 4개의 군으로 나누었다: 정상식이 (normal diet, ND)군, 고지방식이 (high fat diet, HFD, 지방함량: 총 열량의 40%)군, HFD+0.0025% LUT 보충 (HFD LL)군, 그리고 HFD+0.005% LUT 보충 (HFD HL)군. 실험식은 AIN-76A diet 구성을 바탕으로 Table 1과 같이 제조하였다. 실험동물은 12시간 명암주기를 유지하고,

**Table 1.** Composition of experimental diets

Ingredient(g)	Groups <sup>1)</sup>			
	ND	HFD	HFD LL	HFD HL
Casein	200	200	200	200
D,L-methionine	3	3	3	3
Corn starch	150	111	111	111
Sucrose	500	370	370	370
Cellulose	50	50	50	50
Corn oil	50	30	30	30
Lard		170	170	170
Mineral mix <sup>2)</sup>	35	42	42	42
Vitamin mix <sup>3)</sup>	10	12	12	12
Choline bitartrate	2	2	2	2
Cholesterol		10	10	10
t-BHQ <sup>4)</sup>	0.01	0.04	0.04	0.04
Luteolin			0.025	0.05
Total	1,000.01	1,000.04	1,000.065	1,000.09
				kcal/kg (% energy)
Protein	800 (20.78)	800 (17.34)	800 (17.34)	800 (17.34)
Carbohydrate	2,600 (67.53)	1,924 (41.70)	1,924 (41.70)	1,924 (41.70)
Fat	450 (11.69)	1,890 (40.96)	1,890 (40.96)	1,890 (40.96)
Total energy	3,850	4,614	4,614	4,614

1) ND, normal diet; HFD, high fat diet; HFD LL, HFD+0.0025% luteolin; HFD HL, HFD+0.005% luteolin 2) Composition of AIN-76A mineral Mix (g/kg): Calcium phosphate, dibasic 500; Sodium chloride 74; Potassium citrate, monohydrate 220; Potassium sulfate 52; Magnesium oxide 24; Manganous carbonate (43-48% Mn) 3.5; Ferric citrate (16-17% Fe) 6; Zinc carbonate (70% ZnO) 1.6; Cupric carbonate (53-55% Cu) 0.3; Potassium iodate 0.01; Sodium selenite 0.01; Chromium potassium sulfate 0.55; Sucrose, finely powdered 118.03 3) Composition of AIN-76A vitamin Mix (g/kg): Thiamin hydrochloride 0.6; Riboflavin 0.6; Pyridoxine hydrochloride 0.7; Nicotinic acid 3.0; D-calcium pantothenate 1.6; Folic acid 0.2; D-biotin 0.02; Cyanocobalamine 0.001; Cholecalciferol (400,000 IU/g) 0.25; Manaquinone 0.005; Ascorbic acid 0.2; Sucrose, finely powdered 992.824 4) t-BHQ: tert-butylhydroquinone

항온 ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), 항습 ( $50 \pm 5\%$ ) 환경에서 사육하였다. 1일 1회 식이섭취량을 기록하고, 주 1회 체중을 측정하였다. 본 연구에서 수행된 동물실험은 대구가톨릭대학교 동물실험 윤리위원회 승인을 얻어 수행하였다 (IACUC-2017-067).

### 대장암 유발실험

1주일 적응기간 후 마우스들이 6주령이 되었을 때 체중 kg 당 12.5 mg의 AOM (Sigma-Aldrich Korea Ltd, Yongin, Korea)을 1회 복강 주사하였다. AOM 투여 1주일 후 총 3 cycle의 DSS (MP Biomedicals Korea, Seoul, Korea)를 음용수로 공급하였다. 처음 두 cycle은 2% DSS를 공급하였고 동물건강상태의 악화로 마지막 1 cycle은 1% DSS를 공급하였다. 각 cycle은 DSS 공급 5일후 휴식기간 16일로 구성하였다. 실험식은 AOM 발암시점부터 총 11주간 급여하였다.

### 혈액 및 장기 적출

희생 전 12시간 절식 후 실험동물은  $\text{CO}_2$ 로 마취한 후 복부 대정맥으로부터 헤파린 처리된 주사기를 사용하여 채혈하였다. 혈액은  $4^\circ\text{C}$ 에서 13,200 rpm의 속도로 10분간 원심 분리하여 혈장을 분리한 후  $-80^\circ\text{C}$  급속 냉동고에서 실험 전까지 보관하였다. 맹장에서 직장까지 대장을 적출하여 자로 길이를 측정한 후 차가운 생리식염수로 내장을 세척하고 무게를 측정하였다. 적출한 대장은 길이대로 잘라 열어 편 후 생리식염수로 세척하고, proximal, middle, distal의 세 부분으로 구분한 후 중양수를 측정하였다.

### 혈장 cytokine 측정

혈장  $\text{TNF-}\alpha$ 는 Mouse Tumor Necrosis Factor-alpha Ready-SET-Go! kit (eBioscience, San Diego, CA, USA)를 사용하여 제조사의 설명서를 따라서 측정하였다.

### 면역조직화학적 분석

대장의 distal 부분은 적출 후 10% formaldehyde 용액에 24시간 고정시켰다. 파라핀으로 포매한 뒤  $4\ \mu\text{m}$  두께로 절편하고 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 항체를 이용하여 면역염색 하였다.

### 단백질 발현 분석

대장의 단백질을 추출하기 위하여 조직 0.2 g당 1 ml의 radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.5% Sodium deoxycholate, 50 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.5 M EDTA, 0.1 M EGTA)를 넣고 균질화기기를 사용하여 대장조직을

균질화 하였다. 균질액은 13,200 rpm,  $4^\circ\text{C}$ , 10분 동안 원심 분리한 다음 상층액을 취하여 4X SDS sample buffer (8% SDS, 20% 1 M Tris-HCl [pH 6.8], 20% 2-mercaptoethanol, 0.5% bromo phenol blue, glycerol)을 넣고 5분간  $95^\circ\text{C}$ 에서 끓인 후에 차갑게 식혔다. 10% SDS-PAGE에서 단백질을 분리하고 분리된 단백질은 PVDF membrane (Roche, Indianapolis, IN, USA)으로 transfer 하였다. Blot은 0.05% Tris-buffered saline Tween 20 (TBST)를 용매로 한 5% 탈지분유 용액으로 blocking한 후 iNOS (1:1000; Abcam, Cambridge, MA, USA), COX-2 (1:1000; Cell Signaling, Beverly, MA, USA), actin (1:1000; Cell Signaling, Beverly, MA, USA) 1차 항체로  $4^\circ\text{C}$ 에서 O/N incubation 하였다. 0.1% TBST로 10분 동안 3회 세척한 후 1:1000 비율로 희석한 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 배양하였다. 단백질 발현량은 enhanced luminol-based chemiluminescent kit (Bio Science technology, Pohang, Korea)를 사용하여 CP-BU NEW film (AGFA, Seoul, Korea)에 노출시켜 검출하였다. 검출된 단백질은 Gel Doc-It TS (UVP, Upland, CA, USA)를 이용하여 Vision Work Software로 정량하였다.

### 통계분석

실험의 모든 결과는 평균값  $\pm$  표준오차로 나타내었고 통계분석은 SPSS 통계 처리 프로그램 version 19 (IBM Corp., Chicago, IL, USA)를 사용하였다. 각 군간의 분석 항목별 차이는 일원배치분산분석 (one-way analysis of variance)을 실시하였으며, 각 군들 사이에 유의한 차이가 있는 경우, 유의 수준  $p < 0.05$  에서 Duncan's multiple range test로 사후검정을 하였다.

## 결 과

### 식이 섭취량 및 체중

먼저, 실험식이의 급여와 대장암 유발에 따른 식이섭취량과 체중의 변화를 확인하기 위하여 총 11주의 실험기간 동안 1일 평균 식이섭취량, 체중증가량, 그리고 식이효율을 측정하였다. 동물의 1일 평균 식이 섭취량은 실험군들 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 2). 실험 시작 시 군별 동물들의 체중은 차이가 없었으며 실험 종료시점에는 HFD를 급여한 세 군의 동물체중이 ND군에 비해 유의적으로 증가하였다. 식이효율도 HFD 급여군들에서 ND군보다 높게 나타났다. 그러나 체중변화와 식이효율에서 HFD에 LUT을 보충한 효과는 나타나지 않았다.

**Table 2.** Daily food intake and body weight change

Measurements	ND	HFD	HFD LL	HFD HL
Food intake <sup>1)</sup> (g/day)	2.29 ± 0.06 <sup>NS</sup>	2.15 ± 0.11	2.01 ± 0.10	2.14 ± 0.11
Initial body weight <sup>2)</sup> (g)	19.1 ± 0.20 <sup>NS</sup>	19.8 ± 0.40	19.7 ± 0.29	19.8 ± 0.49
Final body weight (g)	21.0 ± 1.44 <sup>b</sup>	26.8 ± 2.06 <sup>a</sup>	27.3 ± 1.00 <sup>a</sup>	28.7 ± 1.31 <sup>a</sup>
Body weight gain <sup>3)</sup> (g/day)	0.03 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.02 <sup>a</sup>
FER <sup>4)</sup> (%)	1.05 ± 0.97 <sup>b</sup>	4.51 ± 1.09 <sup>a</sup>	5.31 ± 0.53 <sup>a</sup>	5.85 ± 0.78 <sup>a</sup>

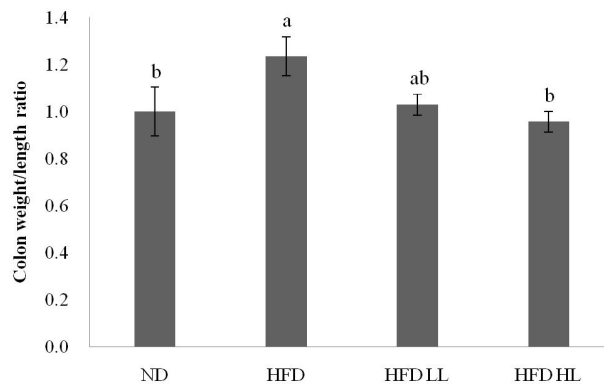
1) Fresh food was provided to the mice in each group and daily food intake was measured everyday. 2) Body weight was measured once a week. 3) Body weight gain was calculated by (final body weight-initial body weight)/experimental period (days).

4) FER was calculated by body weight gain/daily food intake.

Values are means ± SE. Significant differences are indicated by different letters in a row at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test. The alphabet a in the table was given to the largest number. FER; food efficiency ratio. ND, normal diet; HFD, high fat diet; HFD LL, HFD + 0.0025% luteolin; HFD HL, HFD + 0.005% luteolin; NS, not significant

### 대장 길이와 무게

1 ~ 5%의 DSS 레진을 음용수로 수일간 공급하였을 때에는 대장점막에 염증과 궤양이 유발되면서<sup>21-23</sup> 대장 길이의 감소 및 대장 무게의 증가가 특징적으로 나타난다.<sup>24,25</sup> 고지방식이의 급여와 LUT 보충이 DSS 공급에 의한 대장 염증반응에 영향을 주었는지를 알아보기 위하여 동물 희생 후 대장을 적출하여 길이와 무게를 측정하였다. 측정 결과, ND군에 비해 HFD군에서 대장 길이의 감소 및 대장 무게의 증가가 나타났고 (길이 대비 무게 비율 증가) HFD에 LUT의 첨가는 용량 비례적으로 대장 길이 대 무게 비율을 감소시켜 HFD HL군의 비율은 ND군과 유사한 수준으로 감소하였다 (Fig. 1). 이러한 결과는 HFD의 급여는 DSS에 의한 대장염증반응을 악화시킨 반면, LUT의 보충은 HFD에 의해 악화된 대장염을 완화시킨 것으로 보인다.



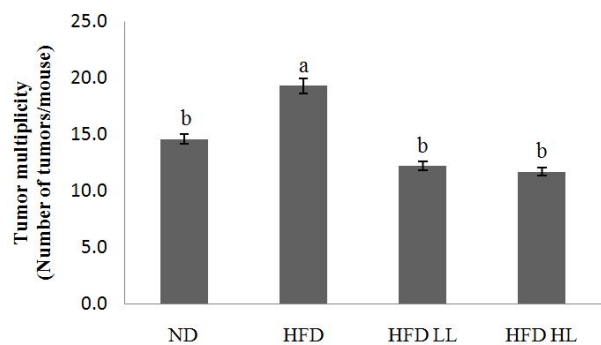
**Fig. 1.** Weight and length of large intestine. The entire large intestine from cecum to rectum was taken out and the length of large intestine was measured with a ruler. The large intestine was weighed after flushing out luminal contents with phosphate buffered saline. Values are presented as the mean ± SE. Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. The alphabet a in the figure was given to the largest number. ND, normal diet; HFD, high fat diet; HFD LL, HFD + 0.0025% luteolin; HFD HL, HFD + 0.005% luteolin

### 대장 종양 발생 수

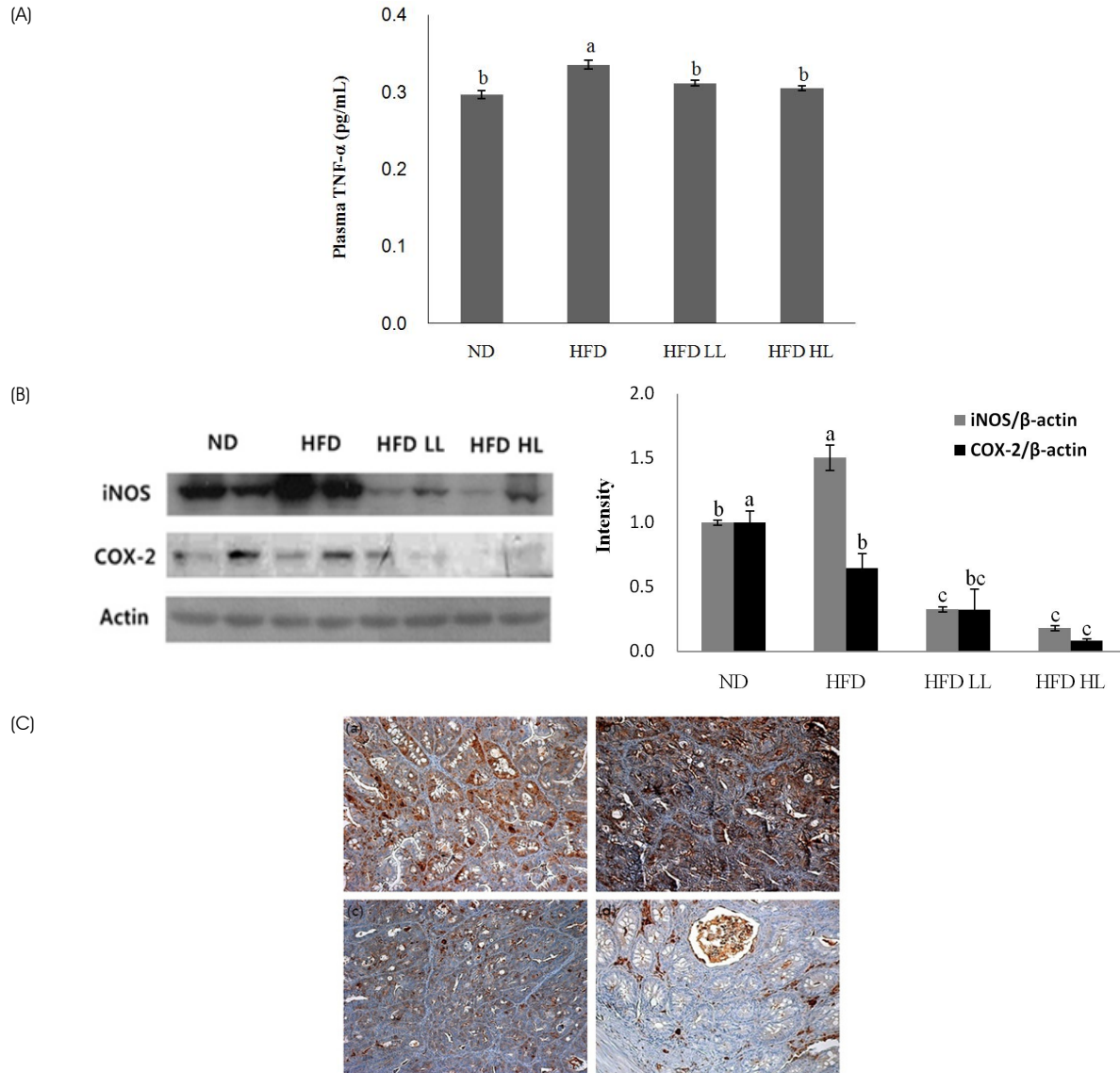
HFD와 LUT의 급여가 대장 종양의 발생에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 대장 전체의 종양수를 측정하였다. 총 종양 수는 ND군이 14.6 ± 0.4개, HFD군이 19.3 ± 0.7개, HFD LL군이 12.2 ± 0.4개, HFD HL군이 11.7 ± 0.4개로 HFD군에서 가장 많은 종양이 발생하였다 (Fig. 2). HFD에 LUT를 보충한 HFD LL, HFD HL군에서는 두 군 모두 대장 종양 발생수가 ND군 수준으로 감소하였다. 이는 LUT 보충이 HFD에 의해 비만이 유도된 쥐에서 대장암 발생을 억제할 수 있음을 제시한다.

### 혈장 TNF-α 농도 및 대장 염증지표 단백질 발현

다음으로 LUT이 비만에 의한 대장암 발생을 억제할 수 있는 기전을 알아보기 위하여 혈장과 대장 조직의 염증 지표들을 분석해 보았다. DSS 급여에 의한 대장염 유발과 고지방식이 급여에 의한 비만은 모두 염증상태를 유발하고



**Fig. 2.** Chemopreventive effect of luteolin in high fat diet-fed C57BL/6 mouse. After colon carcinogenesis experiment, the entire large intestine was taken out, open longitudinally and the number of tumors was counted macroscopically. Values are presented as the mean ± SE. Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. The alphabet a in the figure was given to the largest number. ND, normal diet; HFD, high fat diet; HFD LL, HFD + 0.0025% luteolin; HFD HL, HFD + 0.005% luteolin



**Fig. 3.** Anti-inflammatory effects of luteolin in high fat diet-fed C57BL/6 mouse. (A) Plasma TNF- $\alpha$  was measured as described in the methods. (B) The distal part of large intestine was immunoblotted with relevant antibodies. Photograph of chemiluminescent detection of the representative blots (left). The relative abundance of each band to its own  $\beta$ -actin was quantified (right). (C) Rectum was removed and fixed in 10% formalin. Tissue sections were stained with antibody against iNOS and photographed at  $\times 200$ . (a) ND (b) HFD (c) HFD LL (d) HFD HL. Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. The alphabet a in the figure was given to the largest number. ND, normal diet; HFD, high fat diet; HFD LL, HFD + 0.0025% luteolin; HFD HL, HFD + 0.005% luteolin

이는 대장 상피세포의 증식에 기여할 수 있는 것으로 알려져 있다. 급·만성 염증상태에서 증가하는 대표적인 염증 지표로 혈장 TNF- $\alpha$ 와 대장조직의 iNOS, 그리고 COX-2 단백질 발현량을 분석한 결과, 혈장 TNF- $\alpha$ 의 농도는 ND 군에 비해 HFD군에서 유의적으로 증가하였으며 HFD군에 비해 HFD LL, HFD HL군에서는 ND군 수준으로 감소하였다 (Fig. 3A). 대장조직 iNOS의 발현은 ND군보다 HFD군에서 유의적으로 증가하였고 HFD LL, HFD HL군

에서의 발현은 HFD군에 비해 용량 비례적으로 감소하였다 (Fig. 3B). COX-2의 발현은 ND군에 비하여 HFD군에서 감소하였으나 HFD LL, HFD HL군에서 COX-2의 발현은 iNOS와 마찬가지로 HFD군에 비해 LUT의 용량에 비례하여 감소하였다. 대장조직을 iNOS 항체로 면역염색한 결과에서도 ND군에 비해 HFD군에서 positive한 iNOS 염색부가 증가하였으며 HFD군에 비해 HFD LL, HFD HL군에서는 iNOS 염색부가 역시 LUT 용량 비례적으로 감소하

는 것을 확인하였다 (Fig. 3C).

## 고 찰

대장암은 우리나라를 포함하여 전 세계적으로 암 발생율과 암으로 인한 사망률에 기여하는 주요 암 중 중의 하나로 주로 산업화된 선진국이나 개발도상국에서 높은 발생율을 보인다.<sup>3</sup> 많은 역학연구에서 이러한 대장암의 지역적인 분포 및 발생은 식생활, 즉 육류, 지방, 알코올의 섭취 증가, 채소, 곡류와 같은 섬유소 섭취 감소와 상관관계가 높은 것을 보였으며 특히 고지방식으로 인한 과도한 체중증가와 비만은 대장암 발생의 주요 위험인자로 인식되고 있다.<sup>4,5</sup> 최근 우리나라의 대장암 발생율의 증가도 식생활의 서구화와 비만 인구의 증가와 무관하지 않은 것으로 보이며 대장암 예방과 치료를 위한 수단으로 안전하고 부작용이 없는 식품성분의 발굴 및 개발에 많은 관심이 집중되고 있다. 따라서 본 연구에서는 대장을 포함하여 간, 폐, 유방 등 다양한 암 종에서 강한 항염증 및 항암 활성을 보일뿐만 아니라 여러 폴리페놀화합물 중에서도 항비만 효능이 뛰어난 것으로 알려진<sup>17</sup> LUT이 비만과 연관된 대장암 발생을 억제하는지 알아보고자 실험을 진행하였으며 고지방식을 급여한 비만 마우스에서 LUT이 지방섭취증가에 따른 대장암 발생증가를 억제한다는 결과를 처음으로 보고하는 바이다.

비만과 대장암과의 상관관계에 대해서는 역학연구와 실험연구에서 일관되게 보고가 되고 있다. 체질량지수 (body mass index, BMI)에 근거한 전반적인 비만도와 허리둘레 혹은 허리/엉덩이둘레 비에 근거한 복부비만도가 클수록 대장암 위험율이 증가하는 것으로 알려져 있는데 유럽 30 개국을 대상으로 BMI와 암 발생율과의 관계를 분석한 결과 대장암 환자 중 남자는 16%, 여자는 2.6%가 과체중 (BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>)이 대장암 발생의 원인으로 제시되었다.<sup>26</sup> 또한 31건의 연구결과를 메타 분석한 연구에 의하면 비만 (BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>)인 사람들에서 남자의 경우 대장암 발생율이 정상인에 비해 1.41배 더 높았으며<sup>27</sup> 여자를 대상으로 한 전향적 연구에서도 비만여성이 대조군에 비하여 대장암 발생이 1.45배 더 증가하는 것으로 나타났다.<sup>28</sup> 대장암의 발생에 보다 직접적으로 영향을 미치는 것으로 보이는 복부비만의 경우 허리둘레가 10 cm 증가할 때마다 남자와 여자에서 대장암 발생율이 각각 33%, 16% 증가하였고, 허리/엉덩이 둘레비율은 0.1 증가할 때마다 남녀 각각 대장암 발생율이 43%, 20% 증가하였다.<sup>29</sup>

동물실험에서도 Baltgalvis 등<sup>30</sup>의 연구에서 *Apc*<sup>Min/+</sup> 마우스에 지방으로 40%의 열량을 공급한 결과 체중과 체지방,

지방세포의 크기가 증가하였고 대장 polyp의 수가 대조군에 비해 75% 증가한 것이 보고되었다. 대장암 xenograft 마우스 모델에서는 총 열량 중 45%를 지방으로 공급한 HFD군에서 지방을 13.5%로 공급한 대조군에 비해 종양 조직의 무게와 지방량, 체중, 그리고 세포증식의 지표인 proliferating cell nuclear antigen과 염증지표인 COX-2의 대장조직 발현량이 증가하였다.<sup>31</sup> 본 연구에서도 ND군에 비해 HFD군의 체중증가량 및 대장 종양수가 유의적으로 증가하여 선행연구들과 일치하는 결과를 보였다. 한편, 대장암의 발생은 총 식이지방 공급량 뿐만 아니라 식이 지방을 구성하는 지방산의 종류에 따라서 다른 결과가 나타나기도 하는데,<sup>32</sup> 포화지방산의 공급은 대장암의 발생을 촉진하는 것으로 알려져 있지만,<sup>33</sup> n-3계 지방산이 풍부한 어유의 공급은 대장암의 발생을 억제한다고 보고된 바 있다.<sup>34</sup> 본 연구에서는 포화지방산인 lard를 40%로 공급하였으며, ND군에 비해 HFD군에서 대장 종양 발생 수가 132% 증가하였다.

LUT는 다양한 측면에서 대장암에 대한 항암효과를 가지는 것으로 보고되었다.<sup>15</sup> 사람 대장암 세포주인 HT-29 세포에서 LUT는 항산화활성과 mitogen-activated protein kinase 신호전달체계를 활성화시킴으로써 HT-29 세포의 cell cycle arrest와 apoptosis를 유도하였고<sup>35</sup> HCT-15 colon adenocarcinoma 세포에서는 Wnt/ $\beta$ -catenin/GSK-3 $\beta$  신호전달체계를 연관되어 세포증식을 억제<sup>36</sup>시키고 apoptosis<sup>37</sup>를 유도하였다. Caco-2 세포에서는 DNA 손상복구를 증진시킴으로써 DNA를 산화적 손상으로부터 보호하는 효과를 보였다.<sup>38</sup> AOM으로 유도한 대장암 동물모델에서 LUT를 1.2 mg/kg body weight로 3주간 매일 경구투여하였을 때 AOM 투여에 의해 증가되었던 mitochondria 에너지 산화효소들<sup>39</sup>과 matrix metalloproteinase (MMP)-2와 MMP-9의 발현은 억제하고 MMP 억제단백질인 tissue inhibitor of MMP-2 발현은 오히려 증가<sup>40</sup>시킴으로써 대장암 치료제로서의 가능성도 제시되었다.

한편, 지속적인 고지방식의 섭취는 과도한 체지방 축적으로 인한 비만을 유도할 뿐만 아니라 인슐린 저항성, 고인슐린혈증, 만성 염증, 성장인자농도의 변화, 그리고 지방세포에서 분비되는 다양한 adipokine과 호르몬 등에 의해 암 세포의 증식을 촉진시키는 반면 세포 사멸을 억제함으로써 대장암 발생에 기여하는 것으로 생각되어지고 있다.<sup>5,9,10</sup> LUT는 고지방식이유도 비만 마우스 모델에서 갈색 지방과 백색 지방조직의 열발생 유전자 발현을 증가시킴으로써 에너지 소비를 증가시키고<sup>16</sup> AMP activated protein kinase 신호전달체계를 peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 를 활성화시켜 비만에 의한 인슐린 저항성을 개



선<sup>18,19</sup>시키는 것으로 보고된 바 있다. 그러나 본 연구에서는 Kwon 등<sup>17</sup>이 보고한 바와 달리 HFD군과 LUT 급여군 사이에 체중의 차이는 나타나지 않았음에도 불구하고 LUT는 고지방식이에 의한 대장종양발생수를 효과적으로 억제하였다. 이는 LUT이 체중감량의 효과와는 독립적으로 대장암 발생을 예방할 수 있는 효능이 있는 것으로 사료된다. Rankin 등<sup>41</sup>은 체중감량을 위한 식단에서 동일열량의 고탄수화물 저지방 식이군과 저탄수화물 고지방 식이군을 비교하였을 때 저탄수화물 고지방 식이군에서 더 많은 체중감량이 있었음에도 불구하고 체내 염증을 나타내는 지표인 C-reactive protein (CRP)의 농도는 오히려 25% 증가하였음을 보고하였다. 또한 Balb/c 마우스에 서구화된 식이를 급여하였을 때 대조군에 비해 체중증가는 비슷하였으나 DSS-유도 대장염 및 대식세포의 침윤이 더 현저하게 나타났고 대장종양 발생수도 더 많았다.<sup>42</sup> 이러한 결과들은 체중과 관계없이 고지방식이에 의한 대장의 염증반응의 증가가 대장암 발생의 독립적인 위험인자로 작용할 수 있음을 제시한다고 볼 수 있다.

AOM-DSS 대장암 모델은 DSS 급여에 따른 대장의 급성 염증반응의 유발로 AOM으로 개시된 세포의 증식이 증가하는 대장염-관련 대장암 (colitis-associated colon cancer) 동물모델이다.<sup>43,44</sup> 수일간 DSS 급여 이후에는 TNF- $\alpha$ 를 포함한 많은 전염증성 사이토카인들의 증가가 나타나고<sup>45</sup> iNOS와 COX-2의 발현 또한 증가한다. iNOS의 발현은 대장의 ACF, adenoma, adenocarcinoma에서 증가되는 것이 관찰되었고<sup>46</sup> Apc<sup>Min/+</sup>-iNOS knockout 마우스에서는 대장종양 발생율이 정상 wild type 마우스에 비해 감소하였다.<sup>47</sup> 대장암 환자에서도 iNOS 발현은 대장의 정상 점막조직과 비교해서 carcinoma 조직에서 증가하는 것이 보였다.<sup>48</sup> 정상 장 상피세포에 COX-2의 발현을 증가시켰을 때는 탈분화 (dedifferentiation), 세포외 조직에 부착, apoptosis 억제 등을 통하여 암 세포로의 변환이 촉진되는데 COX-2의 발현 및 활성은 iNOS에 의해 생성된 NO에 의해서도 증가할 수 있다.<sup>49</sup> LUT의 항염증활성은 AOM으로 대장암을 유도한 Balb/c 마우스에서 iNOS와 COX-2 발현을 억제하는 것으로 보고된 바 있다.<sup>13</sup> 한편, 비만으로 증가된 체지방조직에는 지방세포뿐만 아니라 대식세포와 같은 면역관련 세포들도 존재하기 때문에 TNF- $\alpha$ , CRP, interleukin-6와 같은 다양한 염증성 cytokine 들이 증가하여 지속적인 만성 염증상태가 유발된다. 본 연구에서도 HFD군의 마우스에서 TNF- $\alpha$ 와 iNOS의 발현이 증가하였고 LUT은 용량에 비례하여 이들 발현을 저해하였다. 이러한 결과는 HFD급여에 의한 대장종양발생을 LUT이 효과적으로 억제할 수 있었던 기전 중의 하나는 체중조절과는 별개로 고지방식

이에 의한 대장의 염증반응 억제에 의한 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구는 LUT이 고지방식으로 비만이 유도된 C57BL/6 마우스의 대장암 발생에 미치는 영향을 분석하기 위해 실험동물을 각 10마리씩 정상식이 (ND)군, 고지방식이 (HFD)군, HFD + 0.0025% LUT 보충 (HFD LL)군, 그리고 HFD + 0.005% LUT 보충 (HFD HL)군의 4군으로 분류하였다. 각 실험군은 AOM을 1회 복강 주사하고 AOM 투여 1주일 후 총 3 cycle의 1~2% 농도의 DSS를 음용수로 공급하여 대장암을 유발하였다. 실험식은 AOM 발암시점부터 총 11주간 급여하였다. 연구결과, 군간 식이섭취량의 차이는 없었으나 HFD 급여군에서 체중과 식이효율의 유의적인 증가가 나타났으며 HFD군과 비교했을 때 LUT 보충에 따른 체중의 변화는 없었다. 그러나 LUT 보충은 ND군에 비해 HFD군에서 나타난 대장 무게/길이 비, 대장종양 수, 혈장 TNF- $\alpha$  농도, 대장 iNOS와 COX-2 발현을 유의적으로 감소시켰으며 그 효과는 HFD HL군이 HFD LL군보다 높았다. 이러한 결과는 체중조절과는 별개로 LUT이 고지방식이에 의한 대장의 염증반응 억제를 통하여 비만과 연관된 대장암 발생을 억제할 수 있음을 제시하며 향후 비만에 의한 인슐린 저항성 및 adipokine 분비, 그리고 장내 균총 변화에 따른 대장 점막세포 증식과 대장암 발생에 LUT이 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구를 더 깊이 있게 수행한다면 비만으로 인한 대장암 발생에 LUT이 효과적인 화학적 예방 (chemoprevention)제로 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

## References

1. World Cancer Research Fund; American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, D.C.: WCRF/AICR; 2007.
2. Haggard FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. Clin Colon Rectal Surg 2009; 22(4): 191-197.
3. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: epidemiology. BMJ 2000; 321(7264): 805-808.
4. Young GP, Le Leu RK. Preventing cancer: dietary lifestyle or clinical intervention? Asia Pac J Clin Nutr 2002; 11 Suppl 3: S618-S631.
5. Na SY, Myung SJ. Obesity and colorectal cancer. Korean J Gastroenterol 2012; 59(1): 16-26.
6. Padidar S, Farquharson AJ, Williams LM, Kearney R, Arthur JR, Drew JE. High-fat diet alters gene expression in the liver and colon: links to increased development of aberrant crypt

- foci. *Dig Dis Sci* 2012; 57(7): 1866-1874.
7. Sung MK, Yeon JY, Park SY, Park JH, Choi MS. Obesity-induced metabolic stresses in breast and colon cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1229: 61-68.
8. Schlesinger S, Lieb W, Koch M, Fedirko V, Dahm CC, Pischon T, Nöthlings U, Boeing H, Aleksandrova K. Body weight gain and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Obes Rev* 2015; 16(7): 607-619.
9. Liu Z, Brooks RS, Ciappio ED, Kim SJ, Crott JW, Bennett G, Greenberg AS, Mason JB. Diet-induced obesity elevates colonic TNF- $\alpha$  in mice and is accompanied by an activation of Wnt signaling: a mechanism for obesity-associated colorectal cancer. *J Nutr Biochem* 2012; 23(10): 1207-1213.
10. Jochem C, Leitzmann M. Obesity and colorectal cancer. *Recent Results Cancer Res* 2016; 208: 17-41.
11. López-Lázaro M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev Med Chem* 2009; 9(1): 31-59.
12. Ashokkumar P, Sudhandiran G. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomed Pharmacother* 2008; 62(9): 590-597.
13. Nishitani Y, Yamamoto K, Yoshida M, Azuma T, Kanazawa K, Hashimoto T, Mizuno M. Intestinal anti-inflammatory activity of luteolin: role of the aglycone in NF- $\kappa$ B inactivation in macrophages co-cultured with intestinal epithelial cells. *Biofactors* 2013; 39(5): 522-533.
14. Salib JY, Michael HN, Eskande EF. Anti-diabetic properties of flavonoid compounds isolated from *Hyphaene thebaica* epicarp on alloxan induced diabetic rats. *Pharmacognosy Res* 2013; 5(1): 22-29.
15. Pandurangan AK, Esa NM. Luteolin, a bioflavonoid inhibits colorectal cancer through modulation of multiple signaling pathways: a review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(14): 5501-5508.
16. Zhang X, Zhang QX, Wang X, Zhang L, Qu W, Bao B, Liu CA, Liu J. Dietary luteolin activates browning and thermogenesis in mice through an AMPK/PGC1 $\alpha$  pathway-mediated mechanism. *Int J Obes (Lond)* 2016; 40(12): 1841-1849.
17. Kwon EY, Jung UJ, Park T, Yun JW, Choi MS. Luteolin attenuates hepatic steatosis and insulin resistance through the interplay between the liver and adipose tissue in mice with diet-induced obesity. *Diabetes* 2015; 64(5): 1658-1669.
18. Zhang L, Han YJ, Zhang X, Wang X, Bao B, Qu W, Liu J. Luteolin reduces obesity-associated insulin resistance in mice by activating AMPK $\alpha$ 1 signalling in adipose tissue macrophages. *Diabetologia* 2016; 59(10): 2219-2228.
19. Ding L, Jin D, Chen X. Luteolin enhances insulin sensitivity via activation of PPAR $\gamma$  transcriptional activity in adipocytes. *J Nutr Biochem* 2010; 21(10): 941-947.
20. Nepali S, Son JS, Poudel B, Lee JH, Lee YM, Kim DK. Luteolin is a bioflavonoid that attenuates adipocyte-derived inflammatory responses via suppression of nuclear factor- $\kappa$ B/mitogen-activated protein kinases pathway. *Pharmacogn Mag* 2015; 11(43): 627-635.
21. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993; 69(2): 238-249.
22. Cooper HS, Murthy S, Kido K, Yoshitake H, Flanigan A. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis* 2000; 21(4): 757-768.
23. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Hata K, Sugie S, Niho N, Sakano K, Takahashi M, Wakabayashi K. Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in ApcMin/+ mice: inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Int J Cancer* 2006; 118(1): 25-34.
24. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115(1): 182-205.
25. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(1): 79-94.
26. Renehan AG, Soerjomataram I, Tyson M, Egger M, Zwahlen M, Coebergh JW, Buchan I. Incident cancer burden attributable to excess body mass index in 30 European countries. *Int J Cancer* 2010; 126(3): 692-702.
27. Moghaddam AA, Woodward M, Huxley R. Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(12): 2533-2547.
28. Martínez ME, Giovannucci E, Spiegelman D, Hunter DJ, Willett WC, Colditz GA. Leisure-time physical activity, body size, and colon cancer in women. Nurses' Health Study Research Group. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(13): 948-955.
29. Larsson SC, Wolk A. Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(3): 556-565.
30. Baltgalvis KA, Berger FG, Peña MM, Davis JM, Carson JA. The interaction of a high-fat diet and regular moderate intensity exercise on intestinal polyp development in Apc Min/+ mice. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009; 2(7): 641-649.
31. Tang FY, Pai MH, Chiang EP. Consumption of high-fat diet induces tumor progression and epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer in a mouse xenograft model. *J Nutr Biochem* 2012; 23(10): 1302-1313.
32. Reddy BS. Types and amount of dietary fat and colon cancer risk: Prevention by omega-3 fatty acid-rich diets. *Environ Health Prev Med* 2002; 7(3): 95-102.
33. Dai W, Liu T, Wang Q, Rao CV, Reddy BS. Down-regulation of PLK3 gene expression by types and amount of dietary fat in rat colon tumors. *Int J Oncol* 2002; 20(1): 121-126.
34. van Beelen VA, Spenkelink B, Mooibroek H, Sijtsma L, Bosch D, Rietjens IM, Alink GM. An n-3 PUFA-rich microalgal oil diet protects to a similar extent as a fish oil-rich diet against AOM-induced colonic aberrant crypt foci in F344 rats. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(2): 316-320.
35. Kang KA, Piao MJ, Ryu YS, Hyun YJ, Park JE, Shilnikova K, Zhen AX, Kang HK, Koh YS, Jeong YJ, Hyun JW. Luteolin induces apoptotic cell death via antioxidant activity in human colon cancer cells. *Int J Oncol* 2017; 51(4): 1169-1178.
36. Pandurangan AK, Dharmalingam P, Sadagopan SK, Ramar M, Munusamy A, Ganapasam S. Luteolin induces growth arrest



- in colon cancer cells through involvement of Wnt/ $\beta$ -catenin/GSK-3 $\beta$  signaling. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2013; 32(2): 131-139.
37. Lim DY, Jeong Y, Tyner AL, Park JH. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292(1): G66-G75.
38. Ramos AA, Pereira-Wilson C, Collins AR. Protective effects of ursolic acid and luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells. *Mutat Res* 2010; 692(1-2): 6-11.
39. Pandurangan AK, Ananda Sadagopan SK, Dharmalingam P, Ganapasam S. Luteolin, a bioflavonoid, attenuates azoxymethane-induced effects on mitochondrial enzymes in BALB/c mice. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 14(11): 6669-6672.
40. Pandurangan AK, Dharmalingam P, Sadagopan SK, Ganapasam S. Luteolin inhibits matrix metalloproteinase 9 and 2 in azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Hum Exp Toxicol* 2014; 33(11): 1176-1185.
41. Rankin JW, Turpin AD. Low carbohydrate, high fat diet increases C-reactive protein during weight loss. *J Am Coll Nutr* 2007; 26(2): 163-169.
42. Kim IW, Myung SJ, Do MY, Ryu YM, Kim MJ, Do EJ, Park S, Yoon SM, Ye BD, Byeon JS, Yang SK, Kim JH. Western-style diets induce macrophage infiltration and contribute to colitis-associated carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25(11): 1785-1794.
43. Clapper ML, Cooper HS, Chang WC. Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28(9): 1450-1459.
44. Park YH, Kim N, Shim YK, Choi YJ, Nam RH, Choi YJ, Ham MH, Suh JH, Lee SM, Lee CM, Yoon H, Lee HS, Lee DH. Adequate dextran sodium sulfate-induced colitis model in mice and effective outcome measurement method. *J Cancer Prev* 2015; 20(4): 260-267.
45. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014; 18(4): 279-288.
46. Takahashi M, Mutoh M, Kawamori T, Sugimura T, Wakabayashi K. Altered expression of beta-catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21(7): 1319-1327.
47. Ahn B, Ohshima H. Suppression of intestinal polyposis in Apc(Min/+) mice by inhibiting nitric oxide production. *Cancer Res* 2001; 61(23): 8357-8360.
48. Yagihashi N, Kasajima H, Sugai S, Matsumoto K, Ebina Y, Morita T, Murakami T, Yagihashi S. Increased in situ expression of nitric oxide synthase in human colorectal cancer. *Virchows Arch* 2000; 436(2): 109-114.
49. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med* 2002; 53: 35-57.