

고지방식이와 열량제한식이가 백서상피세포의 Protein Kinase C 활성화에 미치는 영향*

최 면

강원대학교 축산대학 축산가공학과

Effect of High Fat Diet and Calorie-restricted Diet on Protein Kinase C Activity in Mouse Epidermal Cell

Choe, Myeon

*Department of Animal Products Science, College of Animal Agriculture,
Kangweon National University*

ABSTRACT

To determine the effect of dietary fat and calorie level on protein kinase C(PKC) activity in mouse epidermal cells, female BALB/c mice(4weeks of age) were placed on high(24.6%), moderate(5%) fat or calorie-restricted diets for at least 4 weeks. Diets were formulated on a nutrient/kcal basis such that the mice consumed the same amounts of protein, vitamins, minerals and fiber per kcal. PKC was assayed by the procedure of Wise et al. An apparent increase of PKC activity was observed from the animal fed high fat diet when compared with the animal fed moderate fat diet. PKC activity was decreased 40% by calorie restriction. In summary levels of dietary fat may contribute to mechanism of tumor promotion by increasing PKC activity in the mouse skin model.

KEY WORDS : fat · calorie restriction · protein kinase C · tumor promotion.

서 론

각종암을 예방하기 위한 방법으로 식이성분의 변화조절이 많은 실험연구의 대상으로 되어 온 것은 약 20여년전부터인데, 현재까지 내려진 결론은 영양소들의 섭취량이 많은 부위의 발암과정에 중요한 역할을 한다는 것이다. 특히 식이지방의

양은 많은 부위의 발암과정에 중요한 비례관계가 성립되고 있는듯 하다. 현재까지의 실험결과에 따르면, 보통정도의 지방을 섭취하는 동물군에 비교하여 고지방을 섭취하는 동물군은 각종 발암 물질이 투여된 실험에서 피부암¹⁾, 유방암²⁾³⁾, 대장암⁴⁾⁵⁾, 폐암⁶⁾⁷⁾ 그리고 췌장암⁸⁾⁹⁾등을 증가시킨다고 알려져 있다. 1982년에는 Diet, Nutrition, and Cancer에 관한 미국 National Academy Science Committee에서도 고지방식이와 발암현상과의 상관관계는 다른 어떤 영양소의 경우보다도 밀접하

본 연구는 한국과학재단 기초신진 연구비를 지원받아 이루어진 것임(과제번호 893-1509-091-1).
접수일자 : 1991년 4월 24일

다고 결론을 내렸다¹⁰⁾. 이러한 실험결과가 보고 되면서 많은 연구자들에 의해 세포수준에서 어떻게 지방질이 발암과정에 관여하는가에 대한 연구가 행해져 왔다.

고지방식기와 발암촉진 기전에 관한 기초적 연구의 한 분야가 세포내 protein kinase C(PKC)활성 이동에 관한 연구인데, PKC는 막단백질 인산화에 관여하는 효소로서 세포의 기능과 증식을 활성화하는 신호 변환(signal transduction)에 중요한 역할을 한다. Ca^{++} -activated, phospholipid-dependent protein kinase인 PKC는 발암촉진제로 알려진 phorbol ester의 세포막 표적이므로 in vitro 실험에서 TPA에 의해 쉽게 활성화 된다는 사실이 보고되었다¹¹⁾. 현재까지 알려진 PKC 활성화와 관련된 되는 기작은 세포가 외부의 agonists나 carcinogens 특히 phorbol ester들에 의해 자극 되었을 때 세포막에서는 phosphatidyl inositol이 분해되어 phosphatidylinositol-4-phosphate(PIP), phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate(PIP_2)를 거쳐 diacylglycerol과 inositol-1, 4,5-triphosphate(IP_3)가 생성되는데 이때 diacylglycerol은 PKC를 cytosolic 부분에서 membrane 부분으로 이동시켜 phorbol ester와 같은 발암물질의 수용체가 되게 하고 또한 IP_3 는 세포내 Ca^{++} 을 이동시켜 Ca^{++} 에 의해 활성화되는 PKC 활성을 증가 시키는 것으로 밝혀졌다¹¹⁾¹²⁾.

고지방식기에 의한 발암현상 증가에 관한 기초적 실험에서도 PKC 활성도가 cytosolic PKC에서 membrane-associated PKC로 이동되어 나타나는 것을 알아냈는데¹⁴⁾ 이러한 PKC의 이동원인은 현재까지 알려진 바에 의하면¹³⁾¹⁴⁾, 고지방식기내의 diacylglycerol의 지방산 사슬 부분은 TPA와 같은 PKC의 활성을 이동시킬 수 있는 phorbol ester와 불포화지방산 부분의 구조유사성 즉, TPA는 12번위치에 tetradecanoic acid, 13번위치에 acetic acid가 ester결합을 하고 있어서 이 부분의 구조가 diacylglycerol과 흡사하다는 것이다.

어떤 부위의 세포단지 식이지방의 종류나 양에 의해 membrane-associated PKC 활성의 변화가 있다면 세포막 인지질의 조성이 변화될수 있고

이는 세포막유동성¹⁵⁾의 변화를 가져올수 있다. 즉, PKC 활성도는 Ca^{++} , 인지질, diacylglycerols에 의해 활성이 조절되므로 식이 성분의 변화는 PKC 활성변화와 이 효소의 세포막과의 결합정도를 바꿀수 있다고 생각된다.

지금까지 고지방식기와 발암과의 관련정도를 측정할 대부분의 실험들은¹⁶⁻¹⁹⁾ 먹이를 주는 과정에서 중지방식기와 같은 조성의 식이를 양만 늘려서 또는 고지방식기와 중지방식기의 조성을 달리 하였지만 자유급식 상태로 섭취시켜 왔기 때문에 고지방식이군이 지방의 양 뿐만아니라 총 열량의 섭취도 자연히 증가하게 되어 실험의 결과가 고지방에서 오는지 또는 고열량에서 오는지가 분명치 못했었다.

또한 열량 제한식이는 채식²⁰⁾, 피부암²¹⁾, 대장암²²⁾등을 감소시킨다는 보고가 있었으나, 대부분의 실험에서 중지방식이군과 같은 식이를 양만 줄여서 실험군에 투여한 것이 발견되기 때문에 이군은 열량제한식이군이 아니라 영양소 전체가 제한되어 상대적으로 적은 양의 protein, fiber, vitamins 및 minerals을 섭취하게 되므로 열량원이 아닌 다른 영양소의 감소에 따른 생체의 영향을 받게되는 문제점이 있다.

본 실험의 목적은 식이조성과 양을 조절하여 순수한 고지방식기와, 열량제한식이가 PKC 활성에 미치는 영향을 명확히 검토하고자 함에 있다.

실험 방법 및 재료

1. 제조 및 급여

본 실험에서는 Table 1와 같은 식이를 혼합해 중지방식이군(MF group)이 4.76g의 식이를 소비할때 고지방식이군(HF group)이 3.85g의 식이를 소비하도록 조절급여 하여 총열량 및 protein, fiber, vitamins와 minerals의 섭취량이 양쪽 group에서 같아지도록 하였으며 단지 총지방 섭취량만이 변화 인자가 될수 있도록 식이를 조절하였다.

또한 열량제한군(CR group)에 투여되는 식이는 Table 1과 같이 protein, fiber, vitamins 및 minerals의 함량이 MF group이 섭취하는 식이의 양에

Table 1. Composition of experimental diet

Ingradient	Moderate-fat diet (MF group)	High-fat diet (HF group)	Calorie-restricted diet (CR group)
Corn oil	5.0	24.6	3.8
Casein	20.0	24.6	31.1
D, L-methionine	0.3	0.5	0.5
Glucose	15.0	9.0	11.0
Dextrin	50.0	29.5	38.1
Fiber	5.0	6.2	7.8
AIN mineral mix	3.5	4.3	5.4
AIN vitamin mix	1.0	1.2	1.5
Choline bitartrate	0.2	0.3	0.3
Total gram	100	100	100
Caloric density (kcal/g)	3.85	4.76	3.59
Percentage calories from fat	11.6	46.5	9.5
Feeding amount(g) in each group per 1g of MF group	1	0.81	0.64

포함되는 양과 같게 하고 지방과 탄수화물의 양만을 MF group에 비교하여 감소시킨 상태에서 실험을 진행 할수 있도록 식이의 조성을 조절하였다. 즉, CR group에 0.64g의 식이를 투여하면 protein, fiber, vitamins 및 minerals의 양은 MF group이 1g의 식이를 섭취 할 때와 같아지며 총 열량은 MF group의 60%가 되어 약 40%의 열량이 감소된 실험군이 될 수 있도록 하여 실험의 결과가 열량섭취에 의존할 수 있도록 고안하였다.

2. 실험동물의 사육

4 주령의 BALB/c mouse 15 마리를 HF group, MF group(대조군), CR group 각군에 5마리씩 임의 배정후, 한마리씩 cage에 넣고 3일간 mouse pellet diet을 주며 안정시킨후 각군에 해당되는 먹이를 4주간 섭취시켰다. 식이는 매일 오전 9시에 투여하였으며 대조군의 섭취량을 기준으로 각 군별로 정확한 투여량을 결정하였다. 실험식은 식물성 유지의 변패를 고려하여 매주 신선하게 제조하여 4℃냉장고에 보관하였다. 사육조건은 온도 22~23℃, 습도 55±5%을 유지하며 하루 12시

간씩 점등 및 소등하며 사육하였다.

3. 피부 상피세포의 분리

4주간의 해당 식이를 섭취시킨후 각 군별로 5마리 쥐의 등부분에 털을 제거하고 cervical dislocation에 의해 쥐를 희생 시킨후 등부분의 표피를 도려내어 minimum essential medium에 침치 시킨후 얼음위에 놓인 시계 접시위에서 상피세포를 제외한 모든 지방질을 제거 시켰다. 이 과정이 끝나면 피부세포를 2×2cm로 자르고 세포분리를 위한 배지인 MCDB-151 solution에 0.2%의 trypsin을 넣어 sample의 표피 부분을 위로하여 상온에서 1시간 30분동안 trypsinization 시킨후 한조각씩 수술용 칼로 끊어서 epidermal cell들을 개체로 분리한 직후 trypsin inhibitor로 처리하고 세포수를 cell counter에서 션다. 각 실험군중에서 가장 적은 숫자의 세포수를 기준으로 하여 나머지 실험군의 세포수를 조정하였는데 각각 6.21×10⁶이었으며 이들 세포로부터 cytosolic fraction과 membrane fraction을 분리 하였다.

4. Cytosol과 membrane fraction의 분리

각 실험군 백서의 상피세포중 cytosol과 membrane fraction의 분리는 Donnelly등의 방법¹⁸⁾을 사용하였다. 즉, 분리된 세포를 5ml homogenization buffer solution(20mM Tris HCl, pH 7.5; 2mM EDTA; 50mM 2-mercaptoethanol; 20% glycerol)에 넣고 4°C에서 sonicator를 이용해 낮은 강도로 30초동안 세포벽을 파괴시킨다음 그 균질액을 20,000 g 에서 30분동안 원심분리하여 상층액을 cytosolic fraction으로 사용하였다. 침전물을 extraction buffer solution(0.3% triton X-100이 포함된 5ml homogenization buffer solution)에 다시 풀어넣고 낮은 강도로 1분간 sonication 시킨 다음 0°C에서 60분동안 incubation 하였다. 그 혼합물을 20,000 g에서 30분동안 원심분리하여, 그 상층액을 membrane-associated fraction으로 사용하였다. Cytosolic fraction과 membrane-associated fraction을 각각 DEAE-cellulose column을 이용 fractionation 시켜 PKC를 분리하였다.

5. 각 fraction 으로부터의 PKC의 분리

PKC는 상피세포로부터 Wise 등의¹⁹⁾ 방법을 변형한 Donnelly등의 방법¹⁴⁾으로 분리하였다. 즉, cytosolic fraction과 membrane-associated fraction을 homogenization buffer solution으로 미리 씻어놓은 DEAE-cellulose column(1×10cm)에 옮긴후, 같은 buffer solution으로 다시 세척하고 0-0.3M KCl gradient(30ml)로 fraction collector에서 각각의 fraction을 분획 수집하였다. PKC 용출과정동안 fraction collector의 각 실험군에는 1ml씩의 용출

액이 채집 되도록하여 용출이 끝날 때까지 수집하였다. 분획 수집된 각 실험관에서 100ul 씩 취하여 칼슘 의존형 PKC의 활성도를 측정하였다.

6. PKC의 측정

PKC의 활성도 측정을 위해 각 분획액이 수집된 실험관에서 100ul씩 새 실험관으로 각각 옮긴 다음, 125ul의 assay mixture(5umol Tris-HCl, pH 7.4; 2umol MgCl₂; 40ug lysine-rich histone; 10ug phosphatidylserine)와 혼합된 CaCl₂를 Iset의 실험관에, 125ml의 assay mixture와 혼합된 EGTA를 다른 Iset의 실험관에서 각각 첨가하여 Ca⁺⁺의존형 PKC가 기질인 lysine-rich histone을 인산화시키는 정도를 측정하고자 약 35,000 cpm의 radioactivity를 갖는 1nmol의 [³²P]ATP를 첨가한 후 30°C의 항온 수조에서 교반하며 5분간 반응시키고, 2ml의 2.5% H₃PO₄와 0.25% NaWO₄의 혼합용액을 가하여 반응을 정지시켰다. Assay mixture내 histone의 ³²P표지 정도를 측정하기 위하여 반응을 정지시킨 각각의 실험관에 0.2ml의 0.6% BSA와 2.0ml의 2.5% H₃PO₄와 0.25% NaWO₄ 혼합용액을 넣고 흔들어 pellet을 완전 용해시킨후 2100rpm에서 5분간 원심분리한후 상등액을 제거 시킨후 0.2ml의 1N NaOH와 2ml의 2.5% H₃PO₄+0.25% NaWO₄의 혼합용액을 써서 세척하는 과정을 6회 반복한 후 liquid scintillation counter로 측정하였다. 각군별 PKC의 변화정도 측정은 실험방법의 2~5의 과정을 3회 반복하여 대조군과 비교하여 student t-test로 유의성 검정을 실시하였으며 PKC활성은 pmole/ml of reactant/5 min으로 환산 표시하였다.

Table 2. Relative changes in protein kinase C levels in mouse epidermal cells

Cytosolic portion			Membrane portion		
MF	CR	HF	MF	CR	HF
100 ^b	45±13 ^a	133±17 ^c	100 ^b	65±14 ^a	148±11 ^c

Mean values with different letter superscripts within same portion were significantly different each other at P<0.05 level by student t-test.

*Mean values were obtained from three experiments.

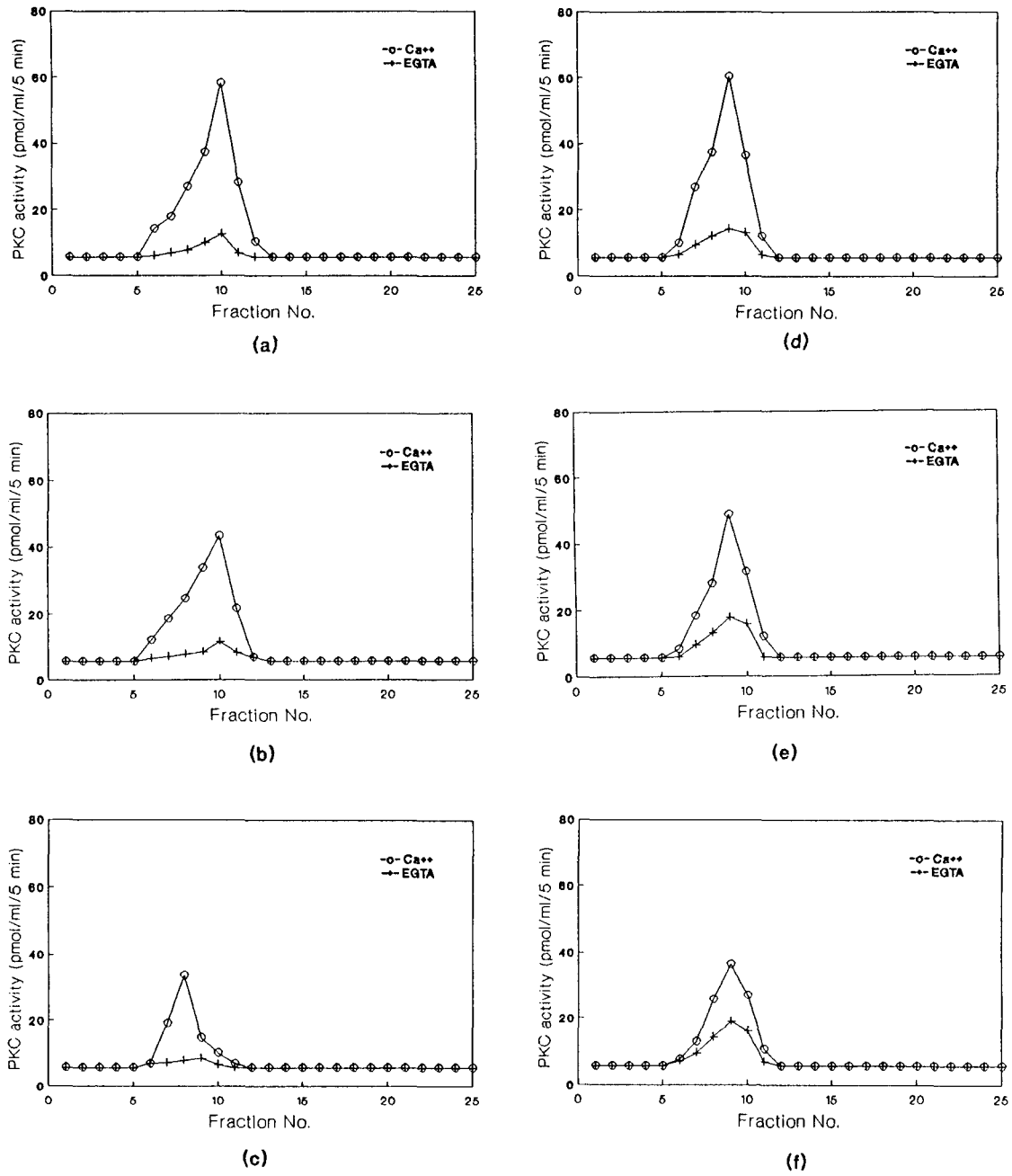


Fig. 1. Column chromatography profiles of protein kinase C activity in cytosolic and membrane-associated fractions of the mouse epidermal cells fed with high-fat(a and d), moderate-fat(b and e)and calorie-restricted(c and f)diets, respectively. Partially purified sample of protein kinase C was loaded on a DEAE cellulose column and fractionated by the buffers as described in the "Materials and Methods". -O-; reactant with Ca⁺⁺ ; -+-; reactant with EGTA when protein kinase C activity was determined as described in the "Materials and Methods".

결과 및 고찰

HF group의 식이섭취방법은 MF group이 섭취하는 먹이량을 kcal로 환산하여 같은 양의 kcal이 되도록 식이를 투여 하기위해서 MF group의 전날 식이섭취량을 기준하여 다음날 오전 9시에 투여 하였다.

CR group의 식이 섭취방법은 MF group의 식이 섭취량 1g 당 CR group 식이 0.64g을 투여하여 kcal 섭취량을 MF group의 60% 수준으로 유지 하였다. 이러한 식이의 투여는 4주간 계속 되었는데 CR group에서 발육 상태의 저조함을 관찰할 수 있었으나 생명현상의 유지에는 아무런 지장을 주지 않았다. 체중의 증감 정도를 살펴보면 MF group 4.8±0.4g, HF group 5.0±0.5g 증가를 보인 반면 CR group은 오히려 1.8±0.6g의 감소를 보였다. 이와 비슷한 체중 증감 현상은 다른 연구의 경우²³⁾에서도 나타나고 있어서 일반적인 경향으로 사료된다.

고지방식을 이용한 실험에서 발암물질의 동시투여는 피부암¹⁾, 유방암²⁾³⁾, 대장암⁴⁾⁵⁾등을 촉진 시킨다는 보고들이 있었지만 그 기작에 대해서는 알려진 것이 없었고 단지 상당 부분이 너무 많은 열량의 섭취에 기인하리라는 것이 예측되고 있었을 뿐이다. 그러나 본 실험은 같은양의 총 열량을 섭취 하였는데도 불구하고 MF group과 비교할 때 HF group에서 PKC의 활성증가 즉, cytosolic PKC는 33% (Fig. 1-b vs 1-a) membrane-associated PKC는 48% (Fig. 1-e vs 1-d)의 증가를 나타내었다. 또한 MF group과 비교할 때 CR group은 PKC의 유의적 감소 즉, cytosolic PKC 55% (Fig. 1-b vs 1-c), membrane-associated PKC는 35% (Fig. 1-e vs 1-f)의 감소를 보였다. 이는 두가지 의미를 갖고 있는데 첫째는 연구 배경에서 설명된 기작에 의한 PKC와 암 발생과의 관계를 고려할 때 열량의 섭취제한은 암예방과 관련이 있을 것이라는 것이다. 둘째는 이 실험에서의 열량제한식이 군이 체중의 감소를 가져올 정도로 제한된 식이

만이 급여되었기 때문에 PKC에 의한 정상적인 단백질 인산화를 저해 받았을 가능성도 배제할 수 없다는 점이다. 이 부분에 대해서는 좀 더 개선된 실험 고안을 이용하여 차후 밝히고자 한다. 하지만 최근 연구들은 고열량섭취 또는 고지방식을 섭취한 동물은 체내 열량 이용율이 달라지면서 암 발생이 증가 된다는 보고가²⁴⁾²⁵⁾있어서 과다한 열량소비가 암 발생의 중요한 조절인자 일 것이라는 사실을 뒷받침하고 있는데 특히 각종 부위의 암이 열량제한에 의해서 효과적으로 저해된다는 사실은 주목 할만하다²⁶⁾.

HF group은 동량의 열량을 섭취했음에도 불구하고 MF group보다 PKC의 활성이 증가함을 고려해 볼때 PKC의 활성증가는 식이중의 지방질 섭취의 증가에 기인되는 것으로 사료된다. Donnelly등¹⁴⁾은 본 실험과 같은 식이로 행한 실험에서 고지방식은 PKC 활성화 기작의 중요한 인지질인 phosphatidylinositol(PI)의 증가와 PI를 구성하고 있는 지방산중 linoleic acid의 증가, stearic acid의 감소를 관찰하였다.

이는 증가된 PI와 그 대사산물인 DG의 생성증가를 의미하며 이들이 PKC의 활성증가에 기인됨을 시사하는 것으로 사료되어 본 연구의 결과를 잘 뒷받침 해 주고 있는 것이다.

요 약

고지방식이와 총열량섭취 제한식이 protein kinase C 활성에 미치는 영향을 규명하고자 기타 영양소 또 총열량섭취가 정확히 조절된 식이를 제조하여 투여해본 결과, protein kinase C의 활성은 본 실험에서 사용한 옥수수유의 양의 증가에 따라 cytosolic과 membrane-associated protein kinase C의 활성을 모두 증가시키는 것을 관찰 하였다.

또한 기타 영양소는 같게 투여하고 열량소만 40% 감소시킨 실험군은 대조군에 비해 양쪽의 protein kinase C가 모두 감소하는 경향을 보였다.

Literature cited

- 1) Carroll KK, Khor HT. Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog Biochem Pharmacol* 10: 308-353, 1975
- 2) Chan PC, Dao TL. Enhancement of mammary carcinogenesis by a high-fat diet in Fisher, Long-Evans, and Sprague-Dawley rats. *Cancer Res* 41: 164-167, 1981
- 3) Selenskas SL, IP MM, Ip C. Similarity between trans fat and saturated fat in the modification of rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 44: 1321-1326, 1984
- 4) Bull AW, Soullier BK, Wilson PS, Haydern MT, Nigro ND. Promotion of azoxymethane-induced intestinal cancer by high-fat diet in rats. *Cancer Res* 39: 4956-4959, 1979
- 5) Reddy BS, Narisawa T, Uukusich D, Wiesburger JH, Wvnder EL. Effect of quality of dietary fat and dimethylhydrazine in colon carcinogenesis in rats. *Proc Soc Exptl Biol Med* 151: 237-239, 1976
- 6) Birt DF, Pour PM. Increased tumorigenesis induced by N-nitrosobis(2-oxo-propyl)amine in Syrian golden hamsters fed high-fat diets. *J Natl Cancer Inst* 70: 1135-1138, 1983
- 7) Beems RB, van Beek L. Modifying effect of dietary fat on benzo[a]pyreneinduced respiratory tract tumours in hamsters. *Carcinogenesis* 5: 413-417, 1984
- 8) Birt DF, Salmasi S, Pour PM. Enhancement of experimental pancreatic cancer in Syrian golden hamsters by dietary fat. *J Natl Cancer Inst* 67: 1327-1332, 1981
- 9) Roebuck BD, Yager JD, Longnecker DS, Wilpone SA. Promotion by unsaturated fat of azaserine-induced pancreatic carcinogenesis in the rat. *Cancer Res* 41: 3961-3966, 1981
- 10) Committee on Diet, Nutrition and Cancer, Assembly of Life Science, National Research Council, Diet, Nutrition and Cancer, National Academy Press, Washington D.C., 1982
- 11) Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257: 7847-7851, 1982
- 12) Niedel JE, Kuhn LJ, Vandebark GR. Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 36-40, 1983
- 13) Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308: 693-698, 1984
- 14) Donnelly TE, Birt DF, Sittler R, Anderson CL, Choe M, Julius A. Dietary fat regulation of the association of protein kinase C activity with epidermal cell membranes. *Carcinogenesis* 8: 1867-1870, 1987
- 15) Solomonson LP, Liepkalois VA, Spector AA. Changes in (Na⁺ + K⁺)-ATPase activity of Ehrlich ascites tumor cells produced by alteration of membrane fatty acid composition. *Biochemistry* 15: 892-897, 1976
- 16) Tannenbaum A The dependence of the genesis of skin tumors on the calorie intake during different stage of carcinogenesis. *Cancer Res* 4: 673-677, 1944
- 17) Tannenbaum A The dependence of tumor formation on the degree of calorie restriction. *Cancer Res* 5: 609-615, 1945
- 18) Donnelly TE Jr, Sittler R, Scholar EM. Relationship between membrane-bound protein kinase C activity and calcium-dependent proliferation of BALB/c 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Comm* 120: 741-747 1985
- 19) Wise BC, Raynor RL, Kuo JF. Phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase from heart. I. Purification and general properties. *J Biol Chem* 257: 8181-8488, 1982
- 20) Choe M, Birt DF, Donnelly TE, White L, Julius A. Relative changes in membrane lipids and protein kinase C activity in pancreatic acinar cells from hamsters fed high-fat diets. *FASEB J* 2: 5205, 1988
- 21) Birt DF, Choe M, Hanna JT, Pelling JC, Donnelly TE. Modulation of protein kinase C activity in epidermal cells from SENCAR mice by dietary fat and calorie restriction. *Proc Am Assoc Cancer Res* 30: 196, 1989
- 22) Reddy BS, Sugie S. Effect of different levels of omega-3 and omega-6 fatty acids on azoxyme-

- thane-induced colon carcinogenesis in F344rats. *Cancer Res* 48 : 6642-6647, 1988
- 23) Tannenbaum A The initiation and growth of tumors. 1. Effect of underfeeding. *Am J Cancer* 38 : 335-338, 1940
- 24) Pariza MW. Dietary fat and cancer risk : evidence and research needs. *Annu Rev Nutr* 8 : 167-183, 1988
- 25) Albanes D. Total calories, body weight, and tumor incidence in mice. *Cancer Res* 47 : 1987-1992, 1987
- 26) Birt DF. Fat and calorie effects on carcinogenesis at sites other than the mammary gland. *Am J Clin Nutr* 45 : 203, 209, 1987