

## 지방질원으로서 어유가 백서 상피세포의 인지질 조성 및 Protein Kinase C 활성화에 미치는 영향

최 면

강원대학교 축산대학 축산가공학과

### Effect of Menhaden Oil Feeding on Protein Kinase C Activity and Membrane Phospholipid Profiles in Mouse Epidermal Cells

Myeon Choe

Department of Animal Products Science, College of Animal Agriculture, Kangweon National University,  
Choonchun, Korea

#### ABSTRACT

To investigate the effect of dietary menhaden oil on protein kinase C(PKC) activity and membrane phospholipid composition in epidermal cells, female BALB/C mice were fed either menhaden oil or corn oil with two different levels(5% or 20%) for 6 weeks. Membrane phosphatidylcholine(PC) was decreased in menhaden oil-fed group. Eicosapentaenoic acid(EPA) and Docosahexaenoic acid(DHA) were only presented in the acyl chain of membrane phospholipid of menhaden oil-fed mice, so that membrane fluidity of the group could be different from the other group. Both cytosolic and membrane-associated PKC activity in epidermal cells were decreased in menhaden oil-fed mice when compare with corn oil-fed mice.

Furthermore, rate of PKC transfer from cytosol to membrane in menhaden oil-fed group was not as fast as in corn oil-fed group. Based on these observations, dietary menhaden oil might act differently from other dietary fat in carcinogenesis.

KEY WORDS : menhaden oil · membrane phospholipid · protein kinase C · carcinogenesis.

#### 서 론

현재까지의 식이성분의 변화에 의해 암을 예방하는 연구의 결과에 따르면 영양소들의 섭취량이 많은 부위의 발암과정에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 밝혀져 왔으며, 영양소 중 식이지방의 양은 많은 부위의 발암과정에 주요한 인자로 대두되고 있다. 즉 지방질의 과다 섭취와 각종 암, 특히 피

부암<sup>1)</sup>, 유방암<sup>2)3)</sup>, 대장암<sup>4)5)</sup>, 폐암<sup>6)7)</sup>, 췌장암<sup>8)9)</sup> 등의 발생과의 관계를 조사한 결과에서 보면 지방이 총섭취 열량의 40~45%가 되는 경우, 20% 정도인 경우와 비교할때 유방암, 췌장암, 대장암의 발생율은 약 4~8배정도의 증가를 보인다고 하였다. 고지방식이 암예방에 절대로 불리한 것도 중요한 사실이지만 식이지방의 종류 또한 문제가 된다. 지방의 종류에 따라 지방산의 조성이 크게 다르다는 것을 전제로 linoleic acid(18:2, ω-6)를 중심으로

채택일 : 1994년 4월 29일

초기 연구가 이루어져 왔는데 초기에는 불포화 지방산이 포화지방산보다 암을 더 촉진시키는 것으로 알려졌었지만 그후 연구 결과를 보면 문제는 그리 단순하지 않다는 사실들이 밝혀지고 있다. 유방암의 경우 대장암에 비해 linoleic acid의 함량에 민감하게 반응하는 듯하며<sup>10)</sup> 췌장암의 경우 beef tallow, corn oil 순으로 암발생에 관여하고 있었으며 경화야자유는 영향이 없는 것으로 나타났다<sup>11)12)</sup>.

최근에 관심의 대상이 되는 다른 한 분야의 연구는 생선기름(menhaden oil) 즉, ω-3지방산 함량이 높은 지방질에 관한 연구이다. ω-3 지방산 5.9g%, 11.8g%, 17.6g%를 옥수수기름과 혼합한 총지방함량 23.5g%의 고지방식이군과 옥수수유 23.5g% 식이군간의 암발생 정도를 비교해 본 결과 ω-3 지방산을 혼합한 식이군에서 45~60%의 암 발생율(종양숫자)의 감소를 볼 수 있었다<sup>13)</sup>. 저지방 실험군의 경우도 5g% linoleic acid 식이군과 비교할 때 4.7g%의 EPA(eicosapentaenoic acid) + 0.3g%의 linoleic acid 식이군이 약 80%의 발암감소를 보였다<sup>14)</sup>. 또한 EPA 급여는 대장 정상세포 및 대장 암 세포에서의 PG E2생성을 감소시켰다<sup>15)</sup>. 생선기름

에 의한 유방암의 발생감소에 대한 연구 결과도 발표된 바 있다<sup>16)</sup>. 하지만 EPA와 같은 생선기름 내의 ω-3 지방산들이 어떠한 기작을 통하여 암의 발생을 감소시키는지에 대한 기작적 연구는 거의 연구되지 못하고 있는 실정이다. 지방질 섭취와 관련된 암 발생기작의 최근 연구분야로서 protein kinase C(PKC)의 활성 변화와 인지질의 관련성에 관해서는 이미 요약 설명한 바 있다<sup>17)</sup>.

본 연구에서는 지방산의 종류에 따른 영향을 연구하기 위해 ω-3 지방산이 풍부한 생선기름(menhaden oil)과 ω-6 지방산이 풍부한 옥수수 기름(corn oil)을 함유한 지방식이 급여시 백서에서 나타나는 상피세포막의 인지질 조성과 PKC 활성의 변화를 관찰하여 ω-3 지방산에 의한 암 발생저하에 대한 기작연구에 기초자료를 제공하고자 한다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 사료제조

3주령 BALB/c mice 60마리를 Table 1과 같이 네개의 실험군으로 나누어 각 군에 15마리씩 무

**Table 1.** Experimental groups

Experimental group	Number of mice
Moderate fat corn oil group(MFCO)	15
Moderate fat menhaden oil group(MFMO)	15
High fat corn oil group(HFCO)	15
High fat menhaden oil group(HFMO)	15

**Table 2.** Experimental diet

Ingredient	Moderate fat		High fat	
	Corn oil	Fish oil	Corn oil	Fish oil
Casein	20	20	20	20
D, L-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Glucose	15	15	10	10
Dextrin	50	50	40	40
Fiber	5	5	5	5
AIN mineral mix	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN vitamin mix	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Corn oil	5.0		20	
Fish oil(menhaden oil)		5.0		20

작위적으로 배정한 후, 한마리씩 사육 cage(shoe box cage)에 넣어 3일간 mouse chow diet로 적응 시킨 뒤 Table 2의 사료를 6주간 급여 시켰다. Menhaden fish oil의 산패문제를 고려하여 사료는 매주 제조하여 냉동실에 보관하며 일일단위로 급여하였다. 실험에 사용된 지방질원의 지방산의 조성 및 P/S ratio를 조사하기 위하여 1ml의 지방질원에 3 ml의 BF<sub>3</sub> methanol을 넣고 80°C에서 15~20분간 가열한 다음(heat block 사용) 1ml의 hexane : ultrapure H<sub>2</sub>O(1 : 1)을 넣어 지방산의 methyl ester를 추출하였다. 이 추출액을 nitrogen gas로 증발건조 시킨후 5μl의 n-hexane을 가하고 그중 1μl를 gas-chromatography에 주입하여 지방산을 분리하였다. 이때 사용한 column은 cyanosilicone widebore capillary column으로 injection temperature 150°C에서부터 시작하여 1분에 5°C씩 증가시켜 최종온도 200°C에서 4분간 유지하면서 분리하였다. Carrier gas로는 분당 10cc의 helium을 사용하고 flame ionization detector로 각 지방산을 감지한 후 intergration에 의한 각 지방산의 profile을 백분율로 계산하였다.

### 2. 피부 상피세포의 분리

6주간의 식이 섭취실험이 끝난 후 각 군별로 5 마리 백서의 등부분에 털을 깎아내고 cervical dislocation에 의해 쥐를 희생시킨 후 등부분의 표피조직을 도려내어 5% fetal bovine serum이 포함된 essential medium에 침지시킨 후 하나씩 건져내서 얼음위에 놓고 시계 접시위에서 상피조직을 제외한 모든 지방질을 제거시켰다. 이 과정이 끝나면 상피세포 개체분리를 위한 배지인 MCDB-151 solution에 0.2%의 trypsin을 섞어 각 sample의 표피부분을 위로 하여 trypsinization시켜 상피세포들을 개체(single cell)로 분리한 후 trypsin inhibitor로 처리하고 세포수를 cell counter에서 세었다. 각 실험군별로 5×10<sup>6</sup> cells을 채취한 후 세포로부터 cytosolic fraction과 membrane fraction을 분리하였다. 일부 세포는 인지질 및 인지질내 지방산 조성의 변화를 측정하는데 사용하였다.

### 3. Cytosol과 Membrane Fraction의 분리

Donnclley등<sup>18)</sup>의 방법을 이용하여 5ml homoge-

nization 완충용액(20mM Tris HCl(pH 7), 2mM EDTA, 50mM 2-mercaptoethanol, 그리고 20% glycerol)에 4°C 상태로 세포(5×10<sup>6</sup>)를 풀어넣고, sonicator를 이용해 낮은 power로 30초동안 초음파 분쇄시켰다. 그 균질액을 100,000g에서 30분동안 원심분리하여 상층용액을 cytosolic fraction으로 사용하였다.

침전물을 5ml homogenization 완충용액(0.3% triton x-100을 포함)에 다시 풀어넣고, 4°C에서 60분동안 incubation한 후 그 혼합물을 100,000g에서 60분동안 원심분리하여, 그 상층용액을 membrane fraction으로 사용하였다.

### 4. 각 Fraction으로부터의 PKC의 정제

PKC는 상피세포로부터 Wise등<sup>19)</sup>의 방법을 변형한 Donnelly<sup>18)</sup> 방법으로 부분정제 하였다. Cytosolic fraction과 membrane fraction을 균질화 완충용액(homogenization buffer)으로 미리 씻어놓은 DEAE-셀룰로즈(1×10cm) column에 따로따로 얹은 후 같은 완충용액으로 다시 세척하고 0~0.3M KCl gradient(30ml)로 fraction collector에서 용출시켰다. 용출과정동안 fraction collector의 각 tube에는 1ml씩의 용출액이 수집되도록하여 용출이 끝날 때까지 1ml씩 각 tube에 차례로 수집하였으며 그후 각 tube에서 100μl씩 취하여 칼슘 의존형 PKC의 활성도를 측정하였다.

### 5. PKC의 측정

PKC의 활성도 측정을 위해 각 tube에서 100ul씩 취하여 새 tube로 옮긴 다음, 125μl의 incubation mixture(5μmol Tris-HCl(pH 7.4), 2μmol MgCl<sub>2</sub>, 40μg lysine-rich histone, 10μg phosphatidylserine, CaCl<sub>2</sub> 또는 EGTA)를 첨가하고 1nmol의 [<sup>32</sup>P]-ATP를 첨가한 후 30°C의 항온 수조에서 교반하며 6분간 반응시키고, TCA를 가하여 반응을 정지시켰다. Incubation mixture 내 histone의 radio labeling 정도를 liquid scintillation counter로 측정하고, 단위는 pmol of [<sup>32</sup>P] ATP incorporated with lysine-rich histone/ 1ml of sample/ 6min으로 표시하였다. PKC활성 측정은 실험군별로 3회 반복하여 student t-test로 유의성 검정을 실시하였다.

6. 상피세포막의 인지질 및 지방산 조성 변화 측정

상피세포내 인지질 조성의 변화를 측정하기 위하여 각 실험군에서 동수의 상피세포를 취한다음 chloroform : methanol(2 : 1) 용액으로 지질을 추출하고 Sep-Pak(waters)으로 여과하였다. 인지질의 분리정량은 HPLC를 사용하였는데 5µm ultrasphere silca column에 A buffer(hexane/propanol/H<sub>2</sub>O : 6/8/0.75)와 B buffer(hexane/ propanol/ H<sub>2</sub>O : 6/8/1.5)를 linear gradient를 유지하면서 U.V.detector를 사용해서 인지질을 분리 monitor 하였다. 각각의 분획을 분리 수집하여 일부는 perchloric acid로 분해한 후 phosphate를 정량하여 인지질의 양을 계산하였고 일부는 인지질내 지방산 조성측정에 사용하였다. 각 인지질 분획의 지방산조성은 1ml의 인지질을 사용해서 사료내 지방질원의 지방산조성 측정과 같은 방법으로 실시하였다.

7. 자료의 통계처리

실험을 통하여 얻어진 각 군간의 수치에 대한 통계처리는 ANOVA를 행하였으며 유의성이 안정된 경우 각 군간의 평균치를 ANOVA로 부터 얻어진 residual means square에 근거해서 t-test를 실시하여 평균치간에 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 백쥐사육 및 식이투여

본 실험에 사용된 식이지방인 corn oil과 menhaden oil의 P/S ratio와 지방산 조성을 알아보기 위하여 gas chromatography로 분석한 결과는 Table 3과 같다. Corn oil의 경우 ω-6 지방산인 linoleic acid가 56.9%, 그 이상의 polyunsaturated fatty acid는 극소량만 존재하였으며 P/S ratio는 3.87을 나타냈다. Menhaden oil의 경우 EPA와 DHA를 각각 19.2와 10.3% 함유하는 반면 myristic acid와 palmitic acid를 각각 7.9와 21.9% 함유하고 있어 P/S ratio는 1.15를 나타냈다. 이 실험에서 사용한 menhaden oil 내 EPA와 DHA 함량은 다소 높은 편이었지만 계절, 어획장소 등에 따라 차이가 크다는 것은 잘

알려져있다<sup>20)</sup>.

실험기간 동안에 각 군별 사료섭취량, 사료효율은 유의적인 차이가 없었으며 성장발육상태도 군별 차이를 보이지 않았다(Table 4). 다른 연구에서도<sup>21)</sup> fish oil이 safflower oil이나 palm oil등으로 사육할 때와 비교하여 사료섭취와 체중증가에 차이가 없음을 보고한 바 있다.

Table 3. Fatty acid profiles of dietary lipids used in this expernment (%)

Fatty acids	Corn oil	Menhaden oil
12 : 0	0.6	trace
14 : 0	trace	7.9
16 : 0	12.4	21.9
16 : 1w7	trace	12.4
18 : 0	1.9	3.9
18 : 1w9	27.0	12.3
18 : 1w7		2.7
18 : 2w6	56.9	1.5
18 : 3w3	0.8	1.1
20 : 1w9	trace	2.4
20 : 4w6	—	1.0
20 : 5w3	—	19.2
22 : 1w11	—	0.8
22 : 5w3	—	2.3
22 : 6w3	—	10.3
P/S	3.87	1.15

Detector temp. : 220°C      Injector temp. : 200°C  
 Initial temp. 150°C for 8min. 5°C/min increase  
 Final temp. 200°C for 4min.

Table 4. Feed consumption and body weight gain during the experimental period(Mean±SE)

Experimental group	Feed consumption(g)	Body weight gain(g)	FER <sup>1)</sup>
MFCO <sup>2)</sup>	196.5±5.3 <sup>a</sup>	25.2±1.8 <sup>a</sup>	0.128
MFMO <sup>2)</sup>	187.7±4.8 <sup>a</sup>	25.0±1.9 <sup>a</sup>	0.133
HFCO <sup>2)</sup>	193.3±4.5 <sup>a</sup>	26.1±2.0 <sup>a</sup>	0.135
HFMO <sup>2)</sup>	190.1±4.1 <sup>a</sup>	25.8±1.9 <sup>a</sup>	0.136

1) FER(Feed efficiency ratio)=Body weight gain(g) / Feed consumption(g)

2) MFCO : Moderate fat corn oil group  
 MFMO : Moderate fat menhaden oil group  
 HFCO : High fat corn oil group  
 HFMO : High fat menhaden oil group

2. 세포막의 인지질 및 지방산 조성 변화

세포내 인지질은 전체적으로 식이지방의 수준이 같을 때 menhaden oil 급여군이 corn oil군에 비해 낮았으나 유의성은 MFCO와 MFMO군간의 phosphatidylcholine에서만 나타났으며(Table 5) 고지방 식이를 급여하면 인지질의 양도 유의적으로 증가함이 관찰되었다. Menhaden oil 급여시 phosphatidylcholine의 유의적 감소는 EPA로 세포배양시킨 간세포에서도 보고된 바 있으며<sup>22)</sup> phosphatidylcholine 생합성 정도의 지표가 되는 phosphorylcholine cytidyltransferase의 활성이 menhaden oil 급여에 의해 낮아진다는 보고도<sup>21)</sup> 있었음을 볼 때 본 실험의 결과는 이들 연구결과와 잘 일치하는 듯 하다. Phosphorylcholine cytidyltransferase의 활성저하는 phosphatidylcholine 생합성 경로 중 salvage pathway 중 phosphorylcholine과 CTP(cytidine triphosphate)가 결합해 CDP-choline이 되는 과정이 저해되는 것을 의미한다.

이러한 보고 이외에도 fish oil은 triacylglycerol을 함유하는 lipoprotein의 합성저해, 지방산 합성 저해, 지방산의 산화 증가 등을 일으킨다는 점을 고려할때<sup>23)</sup> 전반적인 인지질 합성 또한 영향을 받을 것으로 생각된다.

세포막 인지질을 구성하고 있는 지방산 조성의 변화(Table 6)를 보면 모든 인지질에서 EPA와 DHA는 menhaden oil 급여군에서만 25.4~28.9%로

나타난 반면 corn oil군에서는 흔적만 검출할 수 있었다. 또한 palmitic acid와 oleic acid의 함량이 menhaden oil 급여군에서 유의적으로 낮음을 볼 수 있었다. 이는 세포막 인지질의 지방산 조성이 menhaden oil 투여에 의해 변화되었음을 의미하며 포화지방산의 감소와 EPA, DHA같은 고도 불포화 지방산의 증가에 의한 막유동성의 변화를 암시하고 있다. 세포막 인지질내 지방산의 구조는 식이지방의 종류에 의해 변화될 수 있음은 오래전에 보고된 바 있다<sup>24)</sup>. 막유동성의 변화측정 방법으로서 membrane order parameter(S)를 사용한 실험에서 암세포에 고도의 불포화지방을 급여하면 S는 어떤 온도에서도 낮아져서 유동성을 높인다는 보고가 있었으며<sup>25)</sup> 유동성의 증가는 세포내 특정 부위에서만 아니라<sup>26)</sup> 세포막의 bilayer에서도 일어나고 있음이 알려졌다<sup>27,28)</sup>. 이와같은 세포막 유동성의 증가를 통한 암치료 효과 증진에 관한 연구도 다수 보고되고 있다<sup>29-32)</sup>. 백서의 상피세포는 아니지만 rhesus monkey의 retina와 brain 세포를 대상으로 연구된 보고<sup>33)</sup> 또한 EPA와 DHA 급여가 membrane fluidity를 변화시킬 만큼 지방산조성을 변화시키고 있음을 알리고 있다.

3. Protein Kinase C 활성 변화

Menhaden oil 급여에 의한 PKC 활성은 corn oil군에 비해 cytosolic PKC와 membrane-associated PKC 활성이 모두 전반적으로 낮아졌으며(Fig. 1)

Table 5. Phospholipid profile in epidermal cells from BALB/C mice

Experimental group	Phospholipid (Mean±SE, µg/10 <sup>8</sup> cell) <sup>2)</sup>			
	PE <sup>1)</sup>	PI <sup>1)</sup>	PS <sup>1)</sup>	PC <sup>1)</sup>
MFCO <sup>3)</sup>	178±16 <sup>a</sup>	43±6 <sup>a</sup>	47±7 <sup>a</sup>	218±13 <sup>a</sup>
MFMO <sup>3)</sup>	166±15 <sup>a</sup>	40±7 <sup>a</sup>	42±8 <sup>a</sup>	199±14 <sup>b</sup>
HFCO <sup>3)</sup>	219±18 <sup>b</sup>	89±7 <sup>b</sup>	70±9 <sup>b</sup>	315±18 <sup>c</sup>
HFMO <sup>3)</sup>	201±17 <sup>b</sup>	79±8 <sup>b</sup>	65±7 <sup>b</sup>	294±17 <sup>c</sup>

1) PE=phosphatidylethanolamine, PI=phosphatidylinositol, PS=phosphatidylserine, PC=phosphatidylcholine.

2) Values with different letter superscript within same column were significantly different by t-test using the residual mean square from the ANOVA at p<0.05 level.

3) MFCO : Moderate fat corn oil group  
 MFMO : Moderate fat menhaden oil group  
 HFCO : High fat corn oil group  
 HFMO : High fat menhaden oil group

어유지방질과 세포막 인지질 조성 및 Protein Kinase C 활성

Table 6. Fatty acid profile in epidermal cells from BALB/C mice<sup>1)</sup>

Phospho-lipid	Experimental group <sup>3)</sup>	Fatty acid composition(mean±SEM, %) <sup>2)</sup>							
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4	20:5	22:6
PE <sup>1)</sup>	MFCO	31.9±2.7 <sup>b</sup>	20.9±1.4 <sup>a</sup>	24.0±1.3 <sup>b</sup>	10.9±1.5 <sup>a</sup>	4.2±0.5 <sup>a</sup>	8.2±1.1	trace	trace
	MFMO	23.4±1.8 <sup>a</sup>	19.0±1.3 <sup>a</sup>	17.2±1.6 <sup>a</sup>	5.4±0.3 <sup>a</sup>	3.3±0.2 <sup>a</sup>	5.8±1.0	10.7±1.4 <sup>a</sup>	15.2±1.1 <sup>a</sup>
	HFCO	37.4±2.7 <sup>b</sup>	15.3±1.4 <sup>a</sup>	23.5±1.3 <sup>b</sup>	9.0±1.5 <sup>a</sup>	5.6±0.5 <sup>a</sup>	8.2±1.1	—	—
	HFMO	24.8±1.8 <sup>a</sup>	16.2±1.0 <sup>a</sup>	16.9±0.9 <sup>a</sup>	4.7±0.1 <sup>a</sup>	3.0±0.1 <sup>a</sup>	5.5±0.4	13.2±1.0 <sup>a</sup>	15.7±0.2 <sup>a</sup>
PI <sup>1)</sup>	MFCO	32.3±1.6 <sup>b</sup>	22.7±1.1 <sup>a</sup>	19.9±1.4 <sup>ab</sup>	6.4±0.6 <sup>a</sup>	6.8±1.0 <sup>a</sup>	12.0±0.8 <sup>b</sup>	—	—
	MFMO	23.2±1.2 <sup>a</sup>	19.7±0.9 <sup>a</sup>	15.7±0.9 <sup>a</sup>	4.7±0.2 <sup>a</sup>	5.3±0.8 <sup>a</sup>	6.0±0.7 <sup>a</sup>	11.2±0.9 <sup>a</sup>	14.2±0.7 <sup>a</sup>
	HFCO	35.3±1.6 <sup>b</sup>	19.1±1.1 <sup>a</sup>	23.2±1.4 <sup>b</sup>	7.4±0.6 <sup>a</sup>	8.2±1.0 <sup>a</sup>	6.9±0.8 <sup>a</sup>	—	—
	HFMO	25.3±1.1 <sup>a</sup>	17.1±0.7 <sup>a</sup>	15.9±0.8 <sup>a</sup>	4.8±0.3 <sup>a</sup>	5.1±0.2 <sup>a</sup>	4.7±0.8 <sup>a</sup>	13.0±1.1 <sup>a</sup>	14.1±0.9 <sup>a</sup>
PS <sup>1)</sup>	MFCO	29.1±1.9 <sup>b</sup>	22.6±0.7 <sup>a</sup>	31.4±1.2 <sup>b</sup>	6.8±0.4 <sup>a</sup>	6.5±0.6 <sup>a</sup>	3.5±0.4 <sup>a</sup>	—	—
	MFMO	20.1±1.2 <sup>a</sup>	20.1±1.0 <sup>a</sup>	21.0±1.1 <sup>a</sup>	4.9±0.4 <sup>a</sup>	3.7±0.2 <sup>a</sup>	3.6±0.2 <sup>a</sup>	12.1±0.7 <sup>a</sup>	14.5±0.2 <sup>a</sup>
	HFCO	31.7±1.9 <sup>b</sup>	20.3±0.7 <sup>a</sup>	31.6±1.2 <sup>b</sup>	7.4±0.4 <sup>a</sup>	4.8±0.6 <sup>a</sup>	4.3±0.4 <sup>a</sup>	—	—
	HFMO	20.2±1.4 <sup>a</sup>	19.7±1.1 <sup>a</sup>	21.4±1.4 <sup>a</sup>	5.0±0.4 <sup>a</sup>	3.6±0.4 <sup>a</sup>	3.7±0.2 <sup>a</sup>	12.9±0.7 <sup>a</sup>	13.5±0.8 <sup>a</sup>
PC <sup>1)</sup>	MFCO	33.5±2.0 <sup>b</sup>	15.1±0.5 <sup>a</sup>	22.1±0.9 <sup>b</sup>	15.7±2.5 <sup>b</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>	10.0±2.0 <sup>a</sup>	—	—
	MFMO	23.3±1.3 <sup>a</sup>	16.6±0.8 <sup>a</sup>	15.9±0.9 <sup>a</sup>	7.6±0.7 <sup>a</sup>	3.1±0.2 <sup>a</sup>	5.7±0.4 <sup>a</sup>	12.4±0.7 <sup>a</sup>	15.6±0.9 <sup>a</sup>
	HFCO	33.9±2.0 <sup>b</sup>	14.7±0.5 <sup>a</sup>	21.6±0.9 <sup>b</sup>	20.7±2.5 <sup>b</sup>	5.2±0.5 <sup>a</sup>	5.3±2.0 <sup>a</sup>	—	—
	HFMO	22.8±1.3 <sup>a</sup>	16.8±0.9 <sup>a</sup>	16.2±0.9 <sup>a</sup>	9.2±0.6 <sup>a</sup>	3.3±0.3 <sup>a</sup>	4.8±0.4 <sup>a</sup>	13.4±1.1 <sup>a</sup>	13.5±1.1 <sup>a</sup>

1) PE=phosphatidylethanolamine, PI=phosphatidylinositol, PS=phosphatidylserine, PC=phosphatidylcholine

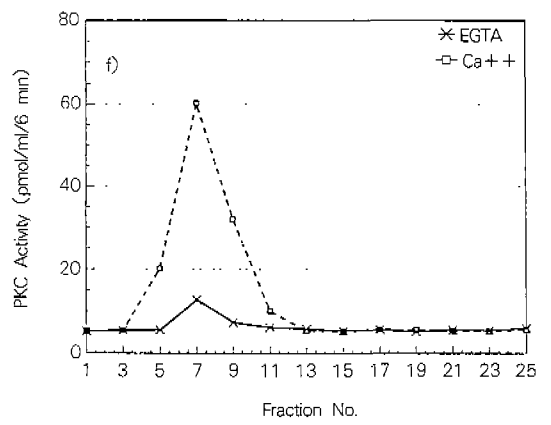
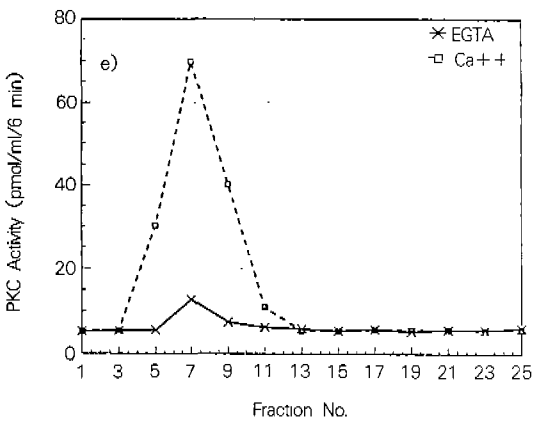
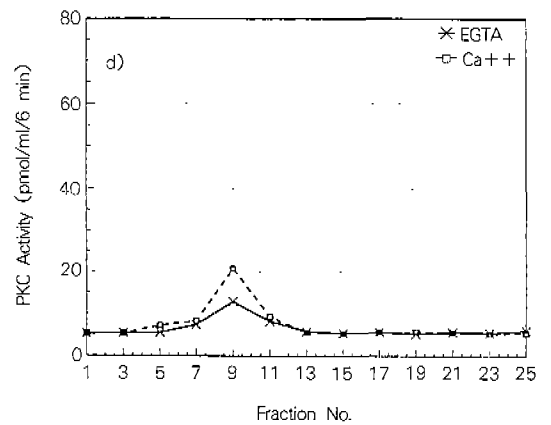
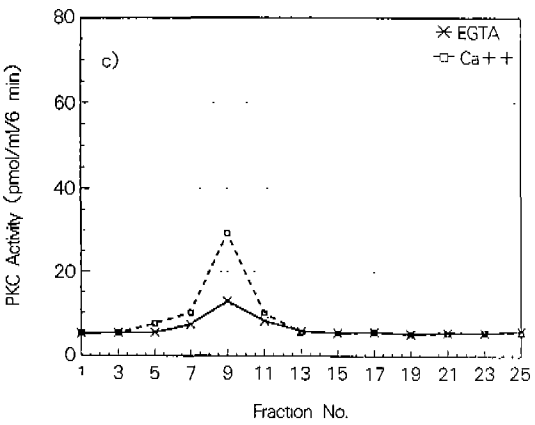
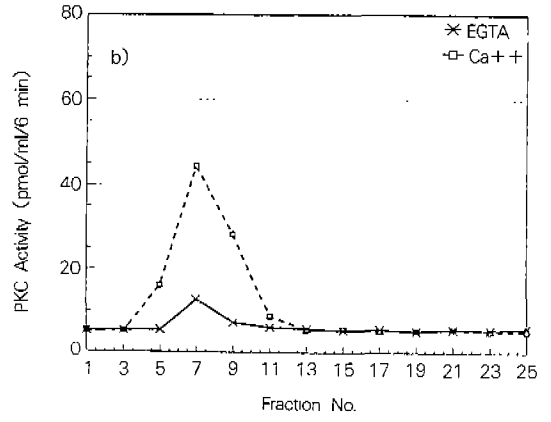
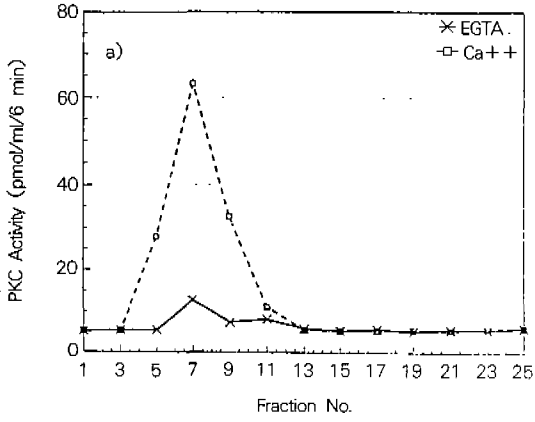
2) Values with different letter superscript within same fractions of phospholipid and fatty acid were significantly different by t-test using the residual mean square from the ANOVA(p<0.05)

3) MFCO : Moderate fat corn oil group  
 MFMO : Moderate fat menhaden oil group  
 HFCO : High fat corn oil group  
 HFMO : High fat menhaden oil group

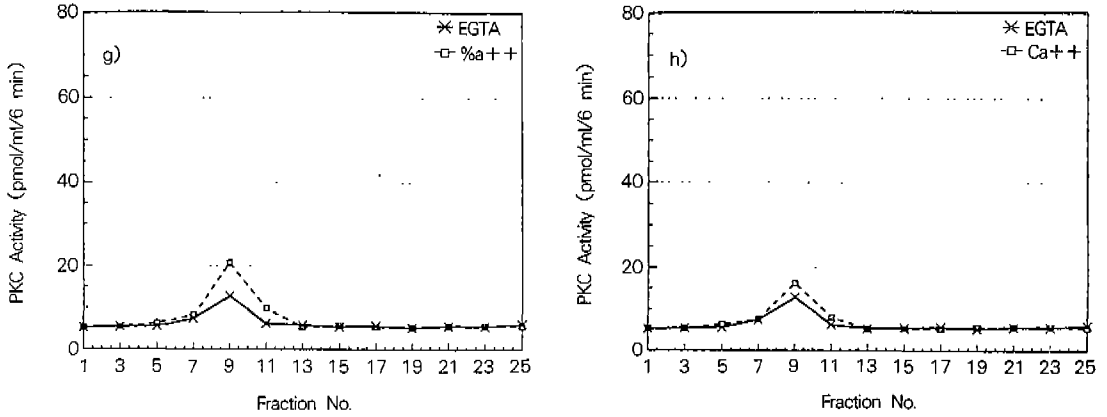
고지방식이의 급여에 의해 menhaden oil 급여군과 corn oil 급여군 모두에서 cytosolic PKC는 높아진 반면 membrane-associated PKC는 오히려 낮아졌다. HFCO 급여군의 경우 cytosolic 및 membrane-associated PKC 전체활성은 MFCO군의 경우보다(a) + c) vs e) + g)) 19% 증가하였지만 실제적 증가는 cytosolic PKC였으며 membrane-associated PKC는 약간 감소하는 경향을 보였다. 하지만 HFMO 급여군의 경우 전체 PKC의 증가는 4% 정도(b) + d) vs f) + h))였는데 cytosolic PKC의 증가는(b) vs f)) 25% 여서 membrane-associated PKC가 감소되고 cytosolic PKC로 이동하는 현상이 뚜렷하였다.

Ca<sup>++</sup>-activated, phospholipid-dependent protein kinase인 PKC는 membrane protein phosphoryla-

tion에 관여하는 효소로서 세포의 기능과 증식을 활성화시키는 신호 변환에 중요한 역할을 한다. 세포내 PKC는 cytosol에 존재하는 것(cytosolic PKC)과 세포막에 관련되어 존재하는 것(membrane-associated PKC)으로 구분이 되는데 phorbol ester와 같은 발암물질들이 세포막과 접촉되면 cytosolic PKC가 membrane 쪽으로 이동하면서(membrane-associated PKC) phorbol ester의 수용체로 작용함이 발견되었다<sup>34)35)</sup>. Cytosolic PKC는 불활성인 상태로 보통 존재하지만 위와 같은 이유로 membrane-associated PKC가 되면 활성화되면서 cell protein을 인산화 시켜 세포분열에 관여하게 된다. 현재까지 알려진 PKC 활성화와 관련된 기작은, 세포가 외부의 agonist들이나 carcinogen들에 의해 자극되



어유지방질과 세포막 인지질 조성 및 Protein Kinase C 활성



**Fig. 1.** Column chromatography profile of protein kinase C activity in cytosolic(a, c, e, g) and membrane-associated(b, d, f, h) fractions of the mouse epidermal cells fed moderate corn oil, a) and b); moderate menhaden oil, c) and d); high corn oil, e) and f); high menhaden oil, g) and h) diet 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". \*; reactant with EGTA, □; reactant with Ca++ when protein kinase C was determined as described in the "Materials and Methods".

있을 때, 세포막에서는 phosphatidyl inositol이 분해되어 diacylglycerol(DG)과 inositol triphosphate가 생성되는데, 이때 DG는 PKC를 cytosolic 부분에서 membrane 부분으로 이동시켜 phorbol ester와 같은 발암물질의 수용체가 되게 하고 이 상태에서 inositol triphosphate는 세포막으로 Ca<sup>++</sup>을 이동시켜 PKC 활성을 증가 시키므로서 세포막의 단백질 인산화를 촉진하면서 비정상적인 세포증식을 촉진하게 되는데<sup>36)</sup> 이 현상은 phorbol ester와 DG의 지방산 사슬 부분의 구조유사성<sup>37)</sup> 때문인 것으로 알려져 있다.

고지방식이에 의한 membrane-associated PKC 활성의 증가가 췌장세포(acinar cells)<sup>38)</sup>, 상피세포<sup>39-41)</sup> 등에서 뚜렷하게 보여진다는 연구보고는 고지방식이의 발암 촉진 기작을 특정한 조직에 관계없이 세포단위로 연구하는데 중요한 역할을 했다고 평가되고 있다.

그러나 본 실험의 결과를 살펴보면 고지방식이에 의한 PKC 증가 정도가 corn oil의 경우는 다른 보고들과<sup>39-41)</sup> 유사한 경향을 보였으나 menhaden oil 급여는 고지방식이라 할지라도 PKC의 전체활성 증가가 4%정도로 매우 적었으며 오히려 membrane-associated PKC는 감소하는 경향을 보였다.

Menhaden oil 또는 기타 fish oil을 사용하여 PKC 활성을 조사한 보고가 없어 비교 고찰은 할 수 없으나 본 실험의 결과로서는 menhaden oil의 급여가 PKC의 활성과 관련된 발암과정을 지연시킴을 추측할 수 있다. 최근들어 암세포의 막유동성 변화를 통한 암치료제의 효능증가를 위해 ω-3 지방산을 식이지방원으로 사용한 보고들이<sup>29-32)</sup> 많은 점을 고려하면 본 실험의 결과 또한 세포막 인지질의 고도 불포화 지방산 함량의 증가에 의한 막유동성 변화가 active PKC인 membrane-associated PKC의 변화를 가져왔을 것으로 생각된다.

**결론**

Menhaden oil이 백서 상피세포막의 인지질 조성, 인지질 내 지방산 사슬의 조성, 상피세포의 PKC 활성 및 이동변화를 통하여 암발생에 미치는 영양학적 가능성을 조사한 결과, 대조군인 corn oil 군과 비교할 때 세포막 phosphatidylcholine의 감소, EPA 및 DHA 지방산 사슬의 증가, PKC 활성의 전체적인 감소 및 cytosolic PKC의 membrane-associated PKC로의 이동감소 등을 관찰할 수 있었다. 지방섭취와 관련하여 관심을 끌고 있는 발암 기작인



PKC 활성변화와 발암과정을 근거로 할 때 지방질 원으로서 menhaden oil의 급여는 다른 지방질원과는 다른 양상을 보이고 있음을 알 수 있었다.

■ 감사의 말씀

본 연구는 91년도 한국학술진흥재단(자유공모과제)으로 부터 연구비를 지원 받아 행해진 것으로 연구 수행을 지원해 주신 재단측에 감사를 드립니다.

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. Promption of azoxymethane-induced intestinal cancer by high-fat diet in rats. *Cancer Res* 39 : 4956-4959, 1979
- 5) Reddy BS, Narisawa T, Uukusich D, Weisburger JH, Wynder EL. Effects of quality and quantity 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-oxopropyl) amine in Syrian golden hamsters fed high-fat diet. *J Natl Cancer Inst* 70 : 1135-1138, 1983
- 7) Beems RB, van Beek L. Modifying effect of dietary fat on benzo[a]pyrene-induced respiratory tract tumors in hamsters. *Caricinogenesis* 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) Bull AW, Bronstein JC, Nigro ND. The essential fatty acid requirement for azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Lipids* 24 : 340-346, 1989
- 11) Roebuck BD, Yager JD Jr, Longnecker DS. Dietary modulation of azaserine-induced pancreatic carcinogenesis in the rat. *Cancer Res* 41 : 888-893, 1981
- 12) Birt DF. Effects of dietary fat on pancreatic carcinogenesis in the Syrian golden hamster. In : Kabara J, ed. *Pharmacological effects of lipids*. Champaign, IL : American Oil Chemists Society, 1989
- 13) Reddy BS, Sugie S. Effect of different levels of omega-3 and omega-6 fatty acids on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Res* 48 : 6642-6647, 1988
- 14) Minoura T, Takata T, Sakaguchi M. Effect of dietary eicosapentaenoic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rat. *Cancer Res* 48 : 4790-4794, 1988
- 15) Gabor H, Abraham S. Effect of dietary menhaden oil on tumor cell loss and the accumulation of mass of a transplantable mammary adenocarcinoma in BALB/c mice. *J Natl Cancer Inst* 76 : 1123-1129, 1986
- 16) Braden LM, Carroll KK. Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats. *Lipids* 21 : 285-288, 1986
- 17) 최 면. 고지방 식이와 열량제한 식이가 백서상피 세포의 Protein Kinase C 활성에 미치는 영향. *한국영양학회지* 24 : 149-156, 1991
- 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 Commun* 126 : 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) Drevon CA. Marine oils and their effects. *Nutr*

- Rev 50 : 38-45, 1992
- 21) Halminski MA, Marsh JB, Harrison EH. Differential effects of fish oil, safflower oil on fatty acid oxidation and glycerolipid synthesis in rat liver. *J Nutr* 121 : 1554-1561, 1991
  - 22) Strum-Odin R, Adkins-Finke B, Blake WL, Phinney SD, Clarke SD. Modification of fatty acid composition of membrane phospholipids in hepatocyte monolayer with n-3, n-6 and n-9 fatty acids and its relationship to triacylglycerol production. *Biochim Biophys Acta* 921 : 378-391, 1987
  - 23) Coniglio JG. How does fish oil lower plasma triglycerides. *Nutr Rev* 50 : 195-206, 1992
  - 24) Spector AA, Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res* 26 : 1015-1035, 1985
  - 25) Burns CP, Spector AA. Membrane fatty acid modification in tumor cells : A potential therapeutic adjunct. *Lipids* 22 : 178-184, 1987
  - 26) Simon I, Burns CP, Spector AA. Electron spin resonance studies on intact cells and isolated lipid droplets from fatty acid-modified L1210 murine leukemia. *Cancer Res* 42 : 2715-2721, 1982
  - 27) Guffy MM, Rosenberger JA, Simon I, Burns CP. Effect of cellular fatty acid alteration on hyperthermic sensitivity in cultured L1210 murine leukemia cells. *Cancer Res* 42 : 3625-3630, 1982
  - 28) Spector AA, Burns CP. Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. *Cancer Res* 47 : 4529-4537, 1987
  - 29) Burns CP, Spector AA. Effects of Lipids on Cancer therapy. *Nutr Rev* 48 : 233-240, 1990
  - 30) Burns CP, Luttenegger CG, Dudley DT, Buettner GR, Spector AA. Effect of modification of plasma membrane fatty acid composition on fluidity and methotrexate transport in L1210 murine leukemia cells. *Cancer Res* 39 : 1727-1732, 1979
  - 31) Burns CP, North JA. Adriamycin transport and Sensitivity in fatty acid-modified leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 888 : 10-17, 1986
  - 32) Burns CP, Haugstad BN, Mossman CJ, North JA, Ingraham LM. Membrane lipid alteration : effect on cellular uptake of mitoxantrone. *Lipids* 23 : 393-397, 1988
  - 33) Connor WE, Neuringer M, Reischick S. Essential fatty acids : The importance of n-3 fatty acids in the retina and brain. *Nutr Rev* 50(II) : 21-29, 1992
  - 34) Nishizuka Y. Perspectives on the role of protein kinase C in stimulus-response coupling. *J Natl Cancer Inst* 76 : 363-370, 1986
  - 35) Craven PA, DeRubertis FR. Role of activation of protein kinase C in the stimulation of colonic epithelial proliferation by unsaturated fatty acids. *Gastroenterology* 95 : 676-685, 1988
  - 36) Blumberg PM. Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters ; sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* 48 : 1-8, 1988
  - 37) Nishizuka, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308 : 693-698, 1984
  - 38) 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 [abstracts]. *FA-SEB J* 2 : 5202, 1988
  - 39) Donnelly TE, Birt DF, Sittler R, Anderson CL, Choe M, Julius AD. Dietary fat regulation of the association of protein kinase C activity with epidermal cell membranes. *Carcinogenesis* 8 : 1867-1870, 1987
  - 40) Birt DF, Choe M, Hanna T, 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(abstract), 1989
  - 41) Choe M, Kris ES, Luthra R, Copenhaver J, Pelling JC, Donnelly TE, Birt DF. Protein Kinase C is activated and diacylglycerol is elevated in epidermal cells from SENCAR mice fed high fat diet. *J Nutr* 122 : 2322-2329, 1992