

Effect of High-Fat Diet-induced Obesity on the Incidence and Progression of Prostate Cancer in C57BL/6N Mouse

Yun Ju Choi¹, Ji Eun Kim¹, Su Jin Lee¹, Jeong Eun Gong¹, Yu Jeong Jin¹, Jae Ho Lee¹, Yong Lim² and Dae Youn Hwang^{1,3*}

¹Department of Biomaterials Science (BK21 FOUR Program)/Life and Industry Convergence Research Institute, College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

²Department of Clinical Laboratory Science, College of Nursing and Healthcare Science, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

³Longevity & Wellbeing Research Center/Laboratory Animal Resources Center, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

Received April 10, 2022 / Revised May 9, 2022 / Accepted May 10, 2022

Obesity induced by high-fat diet (HFD) is verified as a strong risk factor and negative prognostic factor for prostate cancer in several genetically engineered mice although it was not examined in the normal mice. To investigate whether HFD-induced obesity can affect the development and progression of cancer in the prostate of normal mice, alterations in the weight and histological structure of the prostate as well as the expression of cancer-related proteins were analyzed in obese C57BL/6N mice fed with 60% HFD for 16 weeks. First, HFD-induced obesity, including an increase in organ weight, body weight, fat accumulation, and serum lipid profile, was successfully induced in C57BL/6N mice after HFD treatment. The total weight of the prostate significantly increased HFD-induced obesity in the model mice compared with the control group. Among the four lobes of the prostate, the weight of the ventral prostate (VP) and anterior prostate (AP) were higher in HFD-induced obesity model mice than in the control group, although the weights of the lateral prostate (DLP) and seminal vesicle (SV) were constantly maintained. In addition, the incidences of hyperplasia and non-hodgkin's lymphoma (NHL) in the histological structure were remarkably increased in HFD-induced obesity model mice, while the epithelial thickness was higher in the same group. A significant increase in the phosphorylation levels of key proteins in the AKT (protein kinase B) signaling pathway was detected in HFD-induced obesity model mice. Therefore, these results suggest that HFD-induced obesity can promote hyperplasia and NHL in the prostates of C57BL/6N mice through the activation of the AKT signaling pathway.

Key words : AKT, high fat diet, hyperplasia, obesity, prostate cancer

서 론

전립선암(Prostate cancer)은 서구에서 많이 발생하는 암 중에 하나로, 2020년 기준으로 185개 나라의 남성에서 3 번째로 발병률이 높다[8]. 최근 우리나라도 고령인구의 증가와 서구화된 식습관으로 인해 전립선암의 발병률이 증가하고 있다. 전립선암은 주로 65세 이상의 노인에 발생하며, 2020년 한 해 동안 약 14,561명이 전립선암 진단을 받았고, 그들 중에서 약 2,040명이 사망하였다[15]. 전립선

조직의 암세포는 증식을 시작하여 곧바로 종양결절(Tumor nodule)을 형성하여 전립선 외부로 자라나거나, 전립선 내로 국소화된다. 전이 후에는 일반적으로 뼈(Bone)와 림프절(Lymph node)에서 많이 발견된다[10]. 하지만 대부분의 전립선암은 느리게 성장하기 때문에 초기에 진단하기가 어렵고, 암 발병 후기에는 혈뇨(Hematuria), 혈변(Bloody stool), 뼈의 통증 또는 배뇨에 어려움을 겪을 수 있다[6]. 전립선암의 원인은 연령, 인종, 유전적 요인, 흡연, 비만, 식단 등이 있으며 이러한 원인들 중 비만과 식단이 전립선암의 발생률과 진행을 촉진시키는 주요 원인으로 고려되고 있다[24, 31]. 미국의 3,673명의 남성을 대상으로 한 예비 연구에서 체질량 지수(Body mass index, BMI)는 전립선암의 예후에 영향을 미치는 것으로 평가되었다[9].

최근, 고지방식이(High fat diet, HFD) 섭취와 전립선암의 상관관계는 전립선암 세포 이종이식모델(Xenograft model)이나 암유전자(Oncogene)와 암억제유전자(Tumor suppressor gene)를 결실한 유전자변형마우스(Genetically

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5388, Fax : +82-55-350-5389

E-mail : dyhwang@pusan.ac.kr

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.

engineered mice, GEM)에서 연구되었다[23]. HFD의 14주 동안 급여는 전립선암 세포주 LNCaP세포를 이종이식한 BALB/c-nu/nu mice에서 Protein kinase B (AKT)의 인산화의 증가를 유발하였다[14]. 또한, HFD의 2주 동안 급여는 인간 전립선암 DU145 세포주를 이식한 수컷 nude mice의 전립선 조직에서 STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3)의 발현증가 유도로 암세포의 증식을 촉진시켰다[20]. 그리고, HFD의 12 혹은 17주 동안 급여는 선택적으로 종양억제유전자가 결핍된 Pten^{PE-/-} 마우스의 전립선 조직에서 IL-6 (Interleukin-6) 및 AKT 신호전달계 활성화를 증가시켰고, 암세포의 증식을 촉진하였다[12, 21]. 더불어, 40% HFD를 20-28주 동안 Transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) 모델에 급여하였을 때 전염증성 싸이토카인들(Pro-inflammatory cytokines)의 발현이 증가되었고, 전립선 조직에서 암세포의 전이를 촉진시킴으로써 전립선암의 진행 및 사망률 증가시켰다[13, 34].

한편, HFD-유도 비만은 결장암(Colorectal cancer), 유방암(Breast cancer), 신장암(Kidney cancer), 자궁내막암(Endometrial cancer) 등 다른 암들에 대한 예후가 부정적이고 암으로 인한 사망률을 증가시켰다[3, 11]. 42주 동안 60% HFD의 급여는 암컷 BALB/C 마우스에서 염증반응(Inflammatory response) 및 성장인자(Growth factors)의 발현을 촉진시킴으로써 유방암의 발생률을 증가시켰다[38]. 하지만, HFD-유도 비만이 정상 마우스에서 전립선암의 발병 및 진행에 미치는 영향에 대해서는 거의 연구된 바가 없다.

따라서, 본 연구에서는 HFD-유도 비만이 전립선암 발병에 미치는 영향을 분석하기 위해 16주 동안 60%의 HFD를 C57BL/6N 마우스에 급여하고, 전립선 조직에서 종양의 발생률 및 발병기전에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 연구에 수행된 동물실험은 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACAU)로부터 동물실험의 윤리성과 과학성에 대한 승인(승인 번호: PNU-2019-0086)을 받아 수행하였다. 7주령의 수컷 C57BL/6N 마우스(21-23 g)는 Samtako BioKorea Co. (Osan, Korea)에서 구입하여, 일주일 순환시킨 후 사용하였다. 사료와 물은 자유 급식하였으며, 실험동물은 12시간의 조명주기(08:00~20:00)로 Specific pathogen free (SPF) 상태에서 AAALAC International (승인 번호: 001525)의 인증과 식품의약품안전처에 등록됨(등록 번호: 000231) 부산대학교 청정실험동물센터(온도 23±2 °C, 상대습도 50±10%)에서 사육하였다.

Table 1. Composition of normal diet and high fat diet

Ingredients	Normal diet (Kcal%)	High fat diet (Kcal%)
Protein	20	20
Carbohydrate	70	20
Fat	10	60

동물실험 설계

7주령의 수컷 C57BL/6N 마우스(n=20)는 No그룹(n=10), HFD처리그룹(n=10)으로 분류하여 무작위로 배정하였다. No그룹은 10% 지방을 함유한 normal diet (D12450K; Research Diets Inc., New Brunswick, New Jersey, USA)을 16주 동안 급여하였고, HFD처리그룹은 60% 지방을 함유한 HFD (D12492; Research Diets Inc.)을 16주 동안 급여하였다(Table 1). 마우스는 부검 전 12시간 동안 절식하고, CO₂를 사용하여 안락사시킨 후 혈액을 채취하고, 장기를 적출하였다.

체중 및 장기 무게 측정

실험동물의 체중은 해부 전에 화학저울(OHAUS Corporation, NJ, USA)을 이용하여 측정하였고, 간, 지방, 전립선의 무게는 CO₂를 사용하여 안락사시킨 후 적출하여 화학저울을 이용하여 측정하였다. 전립선은 anterior prostate (AP), dorso-lateral prostate (DLP), ventral prostate (VP), seminal vesicle (SV)의 4개 엽들(lobes)로 구분하여 적출한 후 무게를 측정하였다.

혈청 생화학적 분석

혈청은 CO₂가스로 안락사된 실험동물의 복부정맥으로부터 혈액을 채취하여 실온에서 30분간 방치하고, 1,500×g로 15분간 원심분리하여 확보하였다. 혈청에 함유된 total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL)의 농도는 automatic serum analyzer (HITACHI 747, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다.

조직병리학적 분석

각 실험군에서 적출한 간, 지방, 전립선 조직은 10% formalin 용액에서 48시간 고정된 뒤, 병변 조직 부위가 관찰될 수 있도록 적당한 크기로 절단하여 카세트에 넣었다. 전립선 조직은 고정시키기 전에 4개의 엽들(AP, DLP, VP, SV)로 분리시켰다. 카세트에 담긴 조직은 조직처리기(STP-DO, SM Medical Co., Gyeonggi-do, Korea)를 이용해서 70, 80, 90, 95, 100% alcohol에 각각 1-2시간 정도 처리하고, xylene으로 4시간 처리하였다. 고정된 조직은 paraffin embedding station (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 사용하여 embedding한 후, rotary microtome

(Leica Microsystems)을 사용하여 블록(block)을 4 μm 두께로 박절하였다. 박절한 간, 지방, 전립선 조직은 H&E (Hematoxylin and Eosin) 용액(Sigma-Aldrich Co., MO, USA)로 염색한 후 광학현미경(Optical microscope)을 사용하여 100, 400, 1,000배에서 관찰하였고, AP의 두께(μm)와 지방세포의 크기를 Leica Application Suite (Leica Microsystems)를 사용하여 측정하였다. 지방세포의 크기를 Image J 소프트웨어(National Institutes of Health, Maryland, USA)를 사용하여 분석하였다.

Western blot 분석

전립선암 관련 단백질의 발현은 Western blot을 이용하여 분석하였다. 먼저, No그룹과 HFD처리그룹의 전립선 조직(30 mg)은 PRO-PREP protein extraction solution (iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea)에 첨가하여 분쇄한 후, 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 30 μg 의 단백질을 전기영동에 사용하였다. 8-10% SDS-PAGE gel에 전기영동된 단백질은 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 막(Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 단백질이 전이된 막은 anti- β -actin (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), anti-PI3K (Cell Signaling Technology Inc.), anti-p-PI3K (Cell Signaling Technology Inc.), anti-AKT (Cell Signaling Technology Inc.), anti-p-AKT (Cell Signaling Technology Inc.), anti-GSK-3 β (Cell Signaling Technology Inc.), anti-p-GSK-3 β (Cell Signaling Technology Inc.) 등의 1차 항체로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 배양한 후, HRP-conjugated된 secondary anti-rabbit antibody를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 사용하여 발광정도를 검출하였다.

통계분석

No그룹과 HFD처리그룹 간의 실험 결과에 대한 유의성은 One way ANOVA (SPSS for windows, Release 10.10, Standard Version, Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석된 결과는 모든 값을 평균 \pm SD (Standard deviation)로 표기하였고, p -value $<$ 0.05를 유의성 있는 값으로 제시하였다.

결 과

HFD-유도 비만의 유발확인

먼저, HFD의 급여가 C57BL/6N 마우스에서 비만을 성공적으로 유도하는지 확인하기 위하여, 체중, 간, 지방의 무게변화, 혈청 내 지방농도 변화, 지방의 축적을 16주간 HFD를 급여한 C57BL/6N 마우스에서 측정하였다. 그 결과, 체중, 간과 지방의 무게는 No그룹에 비하여 HFD처리그룹에서 유의적으로 증가하였다(Fig. 1). 혈청 내 TC, HDL, LDL의 농도도 유의적으로 증가하였으나 TG의 농도는 일정하게 유지되었다(Fig. 2). 또한, 간조직에서 지방세포의 수는 No그룹에 비하여 HFD처리그룹에서 유의적으로 증가하였으며, 지방조직에서 지방세포의 크기도 No그룹에 비하여 HFD처리그룹에서 증가하였다(Fig. 3). 따라서, 이러한 결과는 C57BL/6N 마우스에 16주간 HFD의 급여는 비만증상을 성공적으로 유도하였음을 제시하고 있다. 이러한 마우스는 비만이 전립선암의 발병률에 미치는 영향을 평가하는데 적합한 모델임을 제시하고 있다

HFD-유도 비만이 전립선 각 엽들의 형태와 무게에 미치는 영향

HFD-유도 비만이 전립선의 비대에 미치는 영향을 확인하기 위해, 전립선 각 엽들의 형태와 무게의 변화를 HFD처리그룹과 No그룹에서 관찰하였다. 그 결과, 전립선 각 엽들의 형태는 HFD처리그룹과 No그룹간에 유의적인 차이가 없었다(Fig. 4A). 그러나, 전립선 각 엽들의 무게는

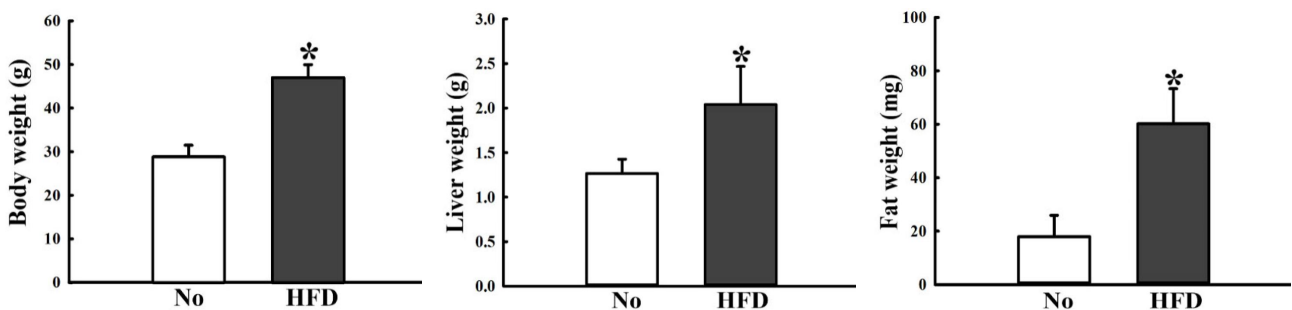


Fig. 1. Body, liver and fat weight of HFD-treated C57BL/6N mice. The weights of body, liver, and fat were measured in C57BL/6N mice after treatment of HFD for 16 weeks. After final administration, their weights were measured by following the procedure described in materials and methods. *, p <0.05 compared to the No treated group. Abbreviation: No, Non treated group; HFD, High fat diet treated group.

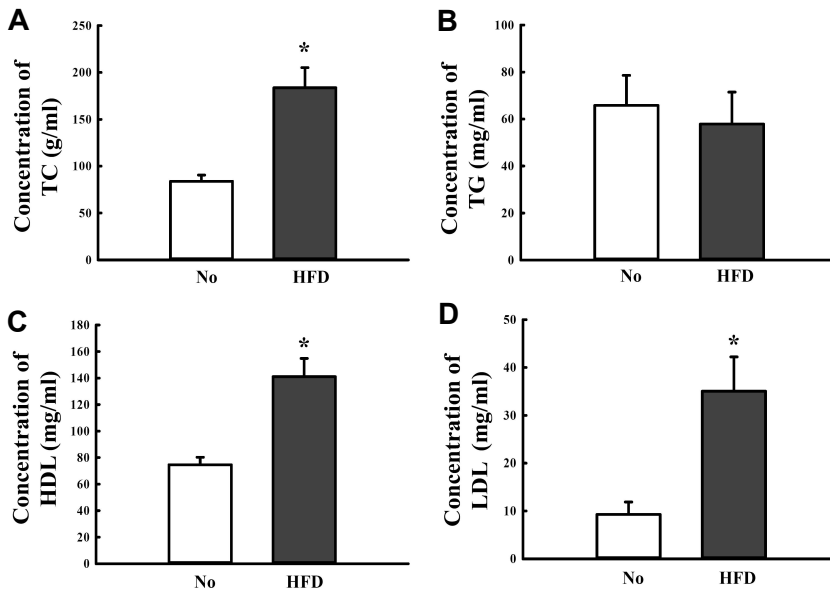


Fig. 2. Serum lipid profile of HFD-treated C57BL/6N mice. Serum was harvested from the blood collected from the abdominal veins of No and HFD treated group. The concentrations of TC, TG, HDL and LDL in serum were analyzed in duplicate using a serum biochemical analyzer as described in the sect. Data represent the mean \pm SD $p < 0.05$ relative to the No treated group. Abbreviation: No, Non treated group; HFD, High fat diet treated group; TC, Total cholesterol; TG, Triglyceride; HDL, High-density lipoprotein; LDL, Low-density lipoprotein.

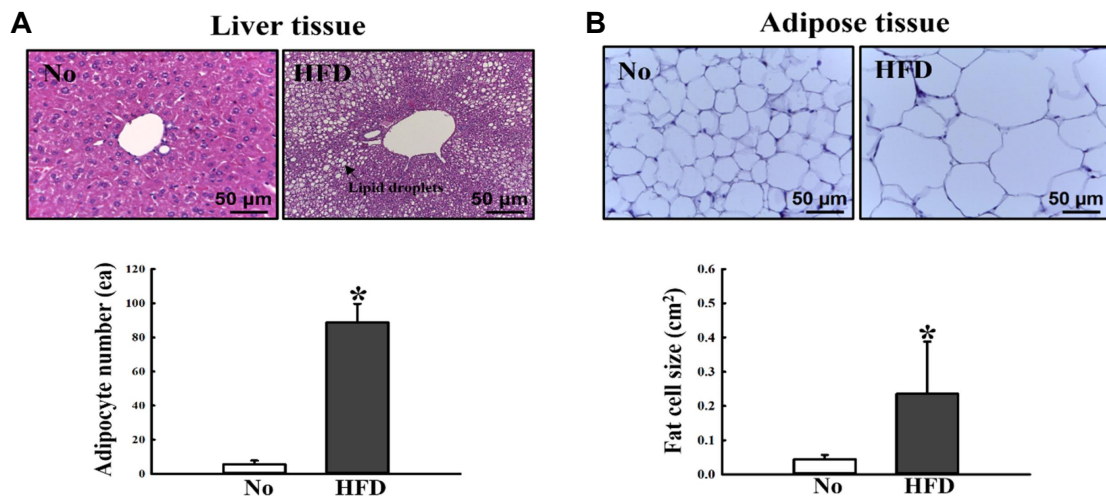


Fig. 3. Histological structure of liver and fat in HFD treated C57BL/6N mice. (A) Liver tissues were stained with H&E and histological structure was observed at 400 \times magnification. The number of adipocyte per specific area in the stained liver sections was detected using Leica Application Suite. (B) Fat tissues were stained with H&E, and histological structure was observed at 400 \times magnification. Fat cell size in the stained fat sections was detected using Image J Software. *, $p < 0.05$ relative to the No treated group. Abbreviation: No, Non treated group; HFD, High fat diet treated group.

유의적인 차이를 나타내었다. VP와 AP의 무게는 No그룹보다 HFD처리그룹에서 유의적으로 증가하였지만, DLP와 SV의 무게는 두개 그룹 간에 차이가 없었다(Fig. 4B). 이러한 결과는 HFD-유도 비만은 전립선 각 엽들의 형태에는 영향을 주지 못하지만, VP와 AP의 무게 증가를 유도함을 제시하고 있다.

HFD-유도 비만이 전립선 조직의 암발병에 미치는 영향

HFD-유도 비만이 전립선 조직에서 암발병에 영향을 미치는지 확인하기 위하여, HFD처리그룹과 No그룹으로부터 전립선을 채취하여 H&E한 후 세포들의 변화를 관찰하

였다. 그 결과, 세포가 과도하게 증식하는 hyperplasia의 slight와 moderate 정도는 No그룹보다 HFD처리그룹에서는 유의적으로 증가하였으며, 이러한 증상은 AP, VP, DLP, VP에서 모두 관찰되었다(Fig. 5A, Fig. 5B). 또한, 비정상적인 다핵의 세포가 발생하는 non-hodgkin's lymphoma (NHL)도 No그룹보다 HFD처리그룹에서 2배 정도 증가하였고, 특히, VP와 SV에서 주로 관찰되었다(Fig. 5C) (Table 2). 또한, AP의 상피두께는 No그룹보다 HFD처리그룹이 유의적으로 증가하였다(Fig. 5D). 이러한 결과는 HFD-유도 비만이 전립선에서 hyperplasia와 NHL의 발생을 촉진시킴을 제시하고 있다.

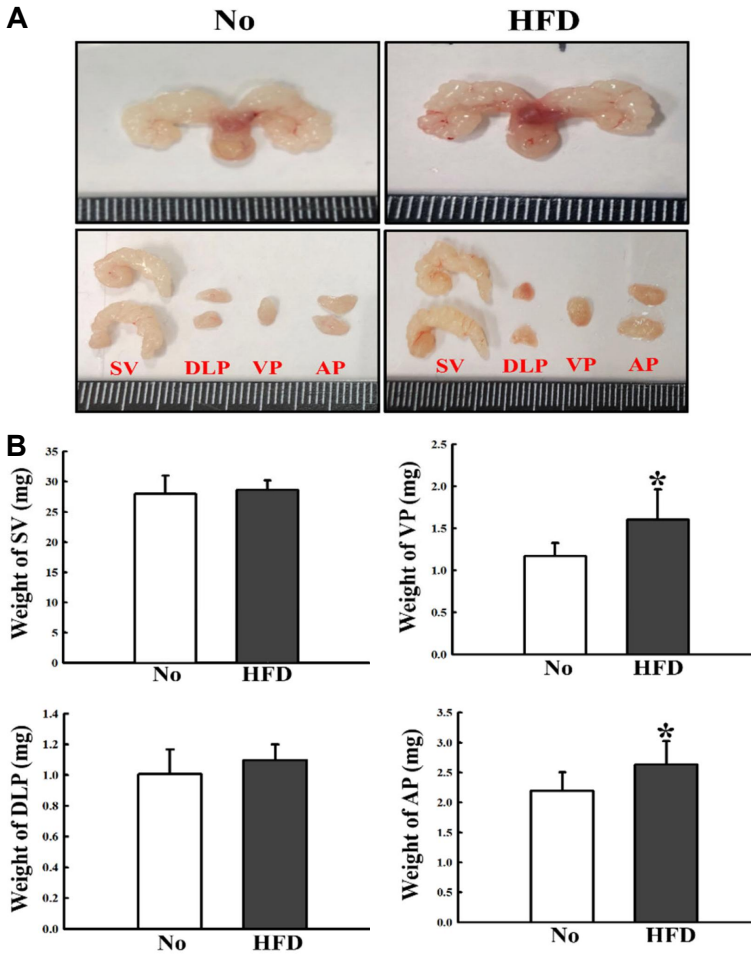


Fig. 4. Weights of total and each lobe of prostate in HFD treated C57BL/6N mice. Four lobes (SV, DLP, VP, AP) were collected from the prostate of HFD treated C57BL/6N mice and their weights were measured as described in materials and methods. *, $p < 0.05$ relative to the No treated group. Abbreviation: No, Non treated group; HFD, High fat diet treated group; AP, Anterior prostate; DLP, Dorsolateral prostate; SV, Seminal vesicle; VP, Ventral prostate.

Table 2. Cancer incidence and type on prostate histological structure of C57BL/6N mice treated with HFD

Group	Tumor type	Tumor incidence (%)			
		Hyperplasia			NHL
		Minimal	Slight	Moderate	
No	Adenoma	50	25	25	25
HFD	Adenoma	-	33	67	50

* Abbreviation: No, Non treated group; HFD, High fat diet treated group; NHL, Non-hodgkin's lymphoma.

HFD-유도 비만이 전립선 조직의 암 관련 신호전달에 미치는 영향

PI3K/AKT pathway는 전립선암의 발생 및 진행을 촉진하는 주요 신호전달 경로로 알려져 있으며[29], 전립선암의 치료를 위한 표적으로 잠재성을 갖고 있다[22]. HFD-유도 비만에 의한 전립선에서 hyperplasia와 NHL의 발생 촉진이 암 관련 신호전달의 변화를 동반하는지 분석하기 위하여, 전립선암 관련 AKT 신호전달과정 주요 단백질인 PI3K, AKT, GSK-3β의 인산화 정도를 Western blot을 이용하여 분석하였다. 그 결과, PI3K, AKT, GSK-3β의 인산화

수준은 No그룹에 비해 HFD처리그룹에서 40%, 75%, 43%가 유의성 있게 증가하였다. 증가율은 AKT에서 가장 높았으며, PI3K에서 가장 낮았다(Fig. 6). 하지만, PI3K와 GSK-3β의 인산화형태와 비인산화형태의 단백질 농도는 No그룹보다 HFD그룹에서 증가되었으며, 이러한 결과는 HFD그룹에서 단백질 발현의 증가를 동반함을 제시하고 있다. 그러나, AKT와 p-AKT의 단백질의 농도의 합계는 No그룹과 HFD그룹에서 일정하게 유지되었다(Fig. 6). 이러한 결과는 HFD-유도 비만에 의해 전립선 조직에서 hyperplasia와 NHL의 촉진은 PI3K/AKT 신호경로의 활성화와 연계됨을 제시하고 있다.

고 찰

비만은 칼로리 섭취와 에너지 소비의 불균형으로 인해 발생하며, 정상범위보다 과도한 지방이 축적된 상태를 의미한다[19, 30]. 이러한 불균형으로 인해 비만환자는 지질과 포도당 대사의 장애, 만성염증 및 산화스트레스, 심혈관질환, 당뇨병, 암과 같은 여러 질병의 발병률이 증가한다[1, 26, 33]. 또한, 전립선암의 진행촉진 인자로서 비만의

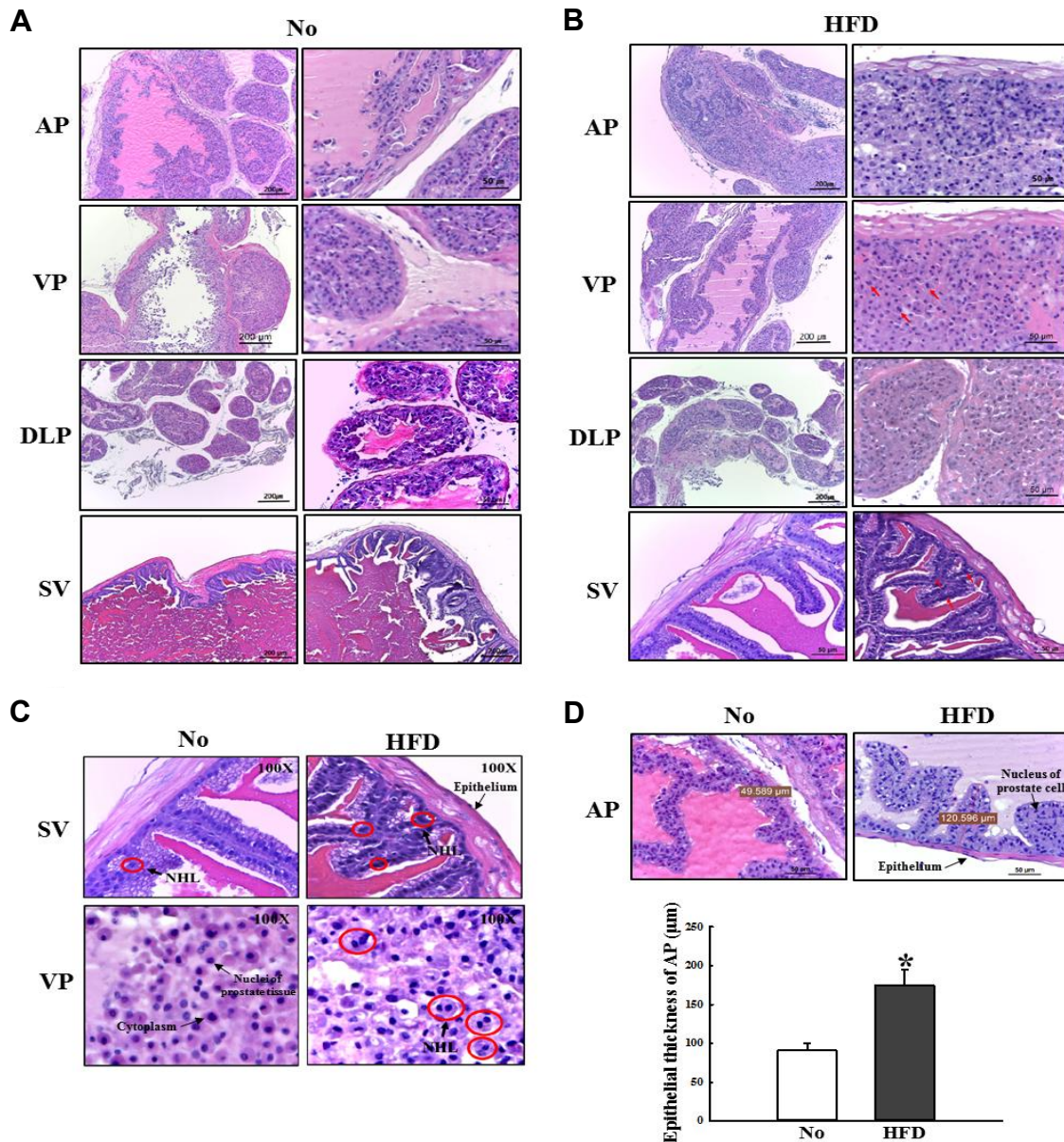


Fig. 5. Histological structure of prostate cancer in HFD treated C57BL/6N mice. Each lobe of prostate in No (A) and HFD treated group (B) were stained with H&E, and histological structure was observed at 100× and 400× magnification. Red arrow indicates NHL. (C) NHL structure in VP and SV of prostate was observed at 400× magnification. (D) Epithelial structure and thickness of AP were observed in HFD treated C57BL/6N mice at 400× magnification. *, $p < 0.05$ relative to the No treated group. Abbreviation: No, Non treated group; HFD, High fat diet treated group; AP, Anterior prostate; DLP, Dorsolateral prostate; SV, Seminal vesicle; VP, Ventral prostate.

기능은 전립선암세포 이식모델동물과 유전자변형마우스를 이용하여 연구되었다[9, 13, 24]. 하지만, 정상적인 동물에서 HFD로 유발된 비만이 전립선암에 미치는 영향에 대한 연구는 수행된 바 없다. 따라서, 본 연구는 전립선암 유발 가능성이 높은 조건이 아닌 정상적인 조건 생리조건에서 비만이 전립선암에 미치는 영향에 대한 중요한 기초 자료를 제공할 수 있는 매우 중요한 연구결과를 제시하고 있다. 하지만, 16주 이상의 장기간 동안 실험을 수행하여

만성적인 조건에서 미치는 영향을 분석하는 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

설치류에서 전립선은 AP, DLP, VP의 3개 엽들(Lobes)로 구성되어 있으며, 이들은 요도 주변에 원주형으로 배치되어 있다[2]. 이러한 구조를 갖는 전립선은 정자를 보호하고 영양을 공급하는 분비액을 만드는 역할을 한다[25]. SV은 전립선 기저부에 양쪽으로 위치하며, 정액의 일부를 이루는 액체를 분비하여 정자의 운동을 돕는다

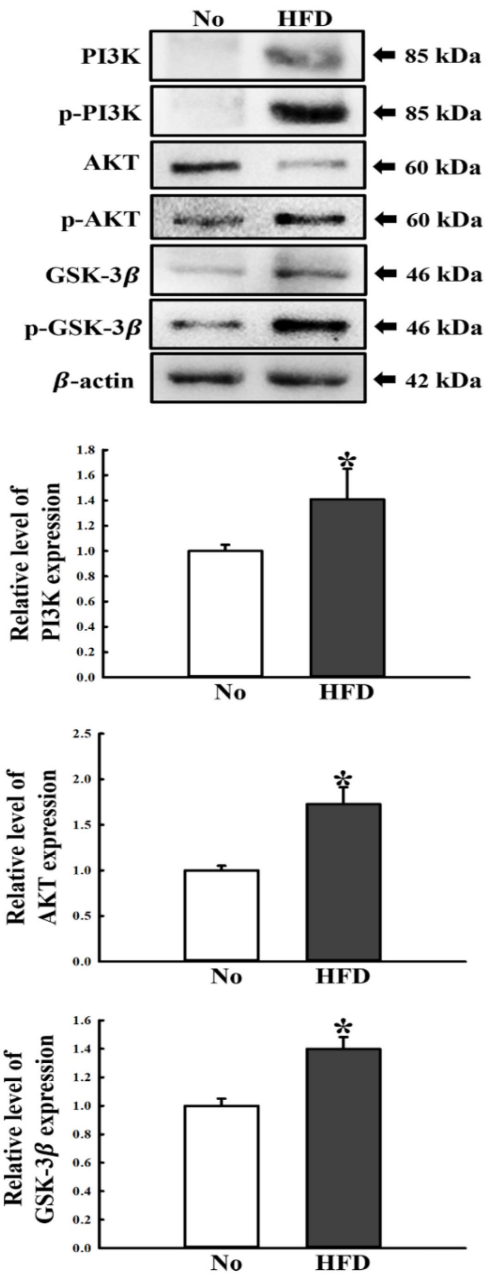


Fig. 6. Expression levels of key proteins in AKT signaling pathway. The expression levels of six proteins including p-PI3K, PI3K, p-AKT, AKT, p-GSK-3β, GSK-3β were detected in the prostate homogenate of HFD treated C57BL/6N mice. Value was defined as 1 (No treated group) for the acquisition of other relative values. Data represent the mean ± SD of three replicates. *, $p < 0.05$ relative to the No treated group. Abbreviation: No, Non treated group; HFD, High fat diet treated group.

[37]. 전립선의 무게 증가는 대표적인 전립선암의 증상 중에 하나이다. HFD급여는 전립선 특이적인 Pten 결핍마우스(prostate-specific Pten-knockout mice)에서 전립선 무게를 증가시켰다. 그러나 각 엽들 무게를 분석하지는 않았

다[12]. NKX3.1 결핍마우스는 전립선의 형태학적 변화없이 24주령에서 DLP와 AP의 무게가 증가하였다[28]. 본 연구에서는 HFD가 전립선의 무게증가에 미치는 영향을 분석하기 위하여 전립선 각 엽들의 무게를 측정하였다. 전립선 엽들 중 SV, DLP의 무게는 HFD처리그룹과 대조군 사이에 유의적인 차이가 없었지만 오직 VP와 AP의 무게는 HFD에서 유의적으로 증가하였다. 비록 암의 발생정도, 동물의 종류, 분석한 엽들의 종류 등에는 차이가 있어서 명확한 비교에 한계가 있지만, 이러한 결과는 NKX3.1 결핍마우스에서 엽들을 분석한 결과와 AP의 증가만 일치한다. 전립선 엽들 중에서 VP와 AP의 무게증가 원인은 조직학적으로 암발생 부위를 관찰한 실험결과로부터 추론할 수 있다. VP에서는 비정상적인 다핵세포가 증가하는 NHL이 2배 이상 증가하는 현상이 무게 증가의 원인으로 고려될 수 있으며, AP에서는 상피세포의 두께 증가를 중요한 원인으로 고려할 수 있다. 하지만 정확한 무게증가의 비율과 작용기전에 대한 연구는 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

한편, 전립선암이 발생한 마우스는 전립선의 각 엽들의 내부조직에 세포가 증식하고, 분비선의 상피가 두꺼워지는 hyperplasia 증상을 나타내며, 이후 hyperplasia의 증가로 전립선 조직의 점진적인 경화가 이루어졌다[5, 18]. 또한, 드물게 비정상적인 다핵의 림프구가 발생하는 NHL가 발생하였다[5, 16]. 더불어, hyperplasia 증상은 HFD를 급여한 마우스의 전립선 엽들에서도 관찰되었다[13, 32]. 본 연구에서 HFD 유도 비만이 전립선 조직에서 암 발생에 영향을 미치는지 확인하기 위해, 전립선 조직을 H&E 염색을 실시하여 분석하였다. 그 결과, hyperplasia는 HFD를 투여한 마우스의 SV, DLP, VP, AP에서 No 그룹에 비하여 증가하였고, HFD 그룹의 VP, SV에서는 NHL이 발생함을 확인하였다. 이러한 결과는 이전의 전립선암 모델의 조직에서 관찰되는 변화가 HFD 유도비만동물의 전립선에서도 유사하게 관찰됨을 제시하고 있다. 그러나, 보다 명확한 암발생에 따른 조직변화를 관찰하기 위해서는 시간의 변화에 따른 전립선 조직의 변화를 관찰할 필요가 있다.

PI3K/AKT 신호전달 경로는 세포의 증식, 생존 또는 이동과 같은 암의 특징인 세포성장 과정을 조절하는 데 중요한 역할을 한다[27]. 또한, 이러한 AKT와 PI3K의 활성화 돌연변이는 인간의 암에서도 자주 관찰되며, 암의 성장을 유도한다[7]. 이러한 신호전달 경로는 전립선암의 발병 및 진행에 중요한 역할을 한다[4]. PI3K/AKT pathway의 활성화는 전립선암 세포주와 전립선암 모델인 Pten 결핍마우스에서 관찰되었다[29, 36]. 특히, p-AKT단백질 발현의 촉진, 활성화된 PI3K/AKT신호전달경로, 비활성화된 Pten은 HFD를 급여한 TRAMP 모델에서 관찰되었다[35]. 유사한 연구에서, p-AKT, p-PI3K p-GSK3α/β의 발현은 전립선 암이 형성된 Pten 결핍마우스에서 HFD를 급여한 그

룹에서 정상식이 처리그룹보다 증가하였다[23]. 본 연구에서, 비만유도 전립선암의 신호전달과정에 대한 분석을 위해 PI3K, AKT, GSK-3 β 의 활성화를 비교하였다. 그 결과, HFD처리그룹에서 모든 인자들의 인산화가 증가함을 확인하였다. 비록 이전의 연구에 사용된 모델동물과 종류는 다르지만, 우리의 연구결과는 이전의 연구결과와 일치하였다.

이상의 결과에서 살펴본 바와 같이, 본 연구에서는 HFD 유도 비만이 전립선암의 발생과 진행을 촉진하는 역할을 함을 제시하고 있다. 이를 뒷받침하는 연구결과로서 HFD 비만은 전립선의 VP, DLP, AP의 무게 증가를 유도하였고, hyperplasia와 NHL의 발생을 촉진하였고, PI3K/AKT 신호전달경로를 활성화하였음을 제시하고 있다. 하지만, HFD 유도 비만조건에서 나타나는 다양한 생리적인 변화와 전립선에 발생하는 세포생물학적인 변화가 전립선암의 유발에 작용하는지 명확한 기전을 규명하기 위한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Bendor, C. D., Bardugo, A., Pinhas-Hamiel, O., Afek, A. and Twig, G. 2020. Cardiovascular morbidity, diabetes and cancer risk among children and adolescents with severe obesity. *Cardiovasc. Diabetol.* **19**, 1-14.
- Bhatia-Gaur, R., Donjacour, A. A., Scivolino, P. J., Kim, M., Desai, N., Young, P., Norton, C. R., Gridley, T., Cardiff, R. D., Cunha, G. R., Abate-Shen, C. and Shen, M. M. 1999. Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev.* **13**, 966-977.
- Calle, E. E. and Kaaks, R. 2004. Overweight, obesity and cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 579-591.
- Chen, H., Zhou, L., Wu, X., Li, R., Wen, J., Sha, J. and Wen, X. 2016. The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer. *Front. Biosci.* **21**, 1084-1091.
- Dan, C., Zhang, H., Zeng, W., Huang, L., Gong, X., Li, H., Yang, E., Wang, L. and Yao, Q. 2019. HNF1B expression regulates ECI2 gene expression, potentially serving a role in prostate cancer progression. *Oncol. Lett.* **17**, 1094-1100.
- Discacciati, A., Orsini, N. and Wolk, A. 2014. Coffee consumption and risk of nonaggressive, aggressive and fatal prostate cancer—a dose-response meta-analysis. *Ann. Oncol.* **25**, 584-591.
- Faes, S. and Dormond, O. 2015. PI3K and AKT: unfaithful partners in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 21138-21152.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A. and Bray, F. 2021. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer* **149**, 778-789.
- Fujita, K., Hayashi, T., Matsushita, M., Uemura, M. and Nonomura, N. 2019. Obesity, inflammation, and prostate cancer. *J. Clin. Med.* **8**, 201.
- Friedenreich, C. M., McGregor, S. E., Courneya, K. S., Angyalfi, S. J. and Elliott, F. G. 2004. Case-control study of anthropometric measures and prostate cancer risk. *Int. J. Cancer* **110**, 278-283.
- Giovannucci, E. and Michaud, D. 2007. The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas. *Gastroenterology* **2208-2225**.
- Hayashi, T., Fujita, K., Nojima, S., Hayashi, Y., Nakano, K., Ishizuya, Y., Wang, C., Yamamoto, Y., Kinouchi, T., Matsuzaki, K., Jingushi, K., Kato, T., Kawashima, A., Nagahara, A., Ujike, T., Uemura, M., Pena, M. D. C. R., Gordetsky, J. B., Morii, E., Tsujikawa, K., Netto, G. J. and Nonomura, N. 2018. High-fat diet-induced inflammation accelerates prostate cancer growth via IL6 signaling. *Clin. Cancer Res.* **54**, 4309-4318.
- Hu, M. B., Xu, H., Zhu, W. H., Bai, P. D., Hu, J. M., Yang, T., Jiang, H. W. and Ding, Q. 2018. High-fat-diet-induced adipokine and cytokine alterations promote the progression of prostate cancer *in vivo* and *in vitro*. *Oncol. Lett.* **15**, 1607-1615.
- Huang, M., Koizumi, A., Narita, S., Inoue, T., Tsuchiya, N., Nakanishi, H., Numakura, K., Tsuruta, H., Saito, M., Satoh, S., Nanjo, H., Sasaki, T. and Habuchi, T. 2016. Diet-induced alteration of fatty acid synthase in prostate cancer progression. *Oncogenesis* **5**, e195.
- Jung, K. W., Won, Y. J., Hong, S., Kong, H. J. and Lee, E. S. 2020. Prediction of cancer incidence and mortality in Korea, 2020. *Cancer Res. Treat.* **52**, 51-358.
- Kalender, M. E., Sevinc, A., Tutar, E., Buyukberber, S. and Camci, C. 2007. Metachronous non-hodgkin's lymphoma in a patient with localized prostate cancer. *Med. Oncol.* **24**, 466-468.
- Kim, C. W. and Lee, K. H. 2014. Effects of pharmacopuncture on experimental rat model of benign prostatic hyperplasia. *J. Acupunct. Res.* **31**, 95-103.
- Knudsen, B. S. and Vasioukhin, V. 2010. Mechanisms of prostate cancer initiation and progression. *Adv. Cancer Res.* **109**, 1-50.
- Kojta, I., Chacińska, M. and Błachnio-Zabielska, A. 2020. Obesity, bioactive lipids, and adipose tissue inflammation in insulin resistance. *Nutrients* **12**, 1305.
- Kwan, H. W., Liu, B., Huang, C., Fatima, S., Su, T., Zhao,

- Z., Ho, A. H. M., Han, Q., Hu, X., Gong, R. H., Chen, M., Wong, H. L. Z. and Bian, Z. 2019. Signal transducer and activator of transcription-3 drives the high-fat diet-associated prostate cancer growth. *Cell Death Dis.* **10**, 637.
21. Labbe, D. P., Uetani, N., Vinette, V., Lessard, L., Aubry, I., Migon, E., Sirois, J., Haigh, J. J., Begin, L. R., Trotman, L. C., Paquet, M. and Tremblay, M. L. 2016. PTP1B deficiency enables the ability of a high-fat diet to drive the invasive character of PTEN-deficient prostate cancers. *Cancer Res.* **76**, 3130-3135.
 22. Lin, H. P., Lin, C. Y., Liu, C. C., Su, L. C., Huo, C., Kuo, Y. Y., Tseng, J. C., Hsu, J. M., Chen, C. K. and Chuu, C. P. 2013. Caffeic acid phenethyl ester as a potential treatment for advanced prostate cancer targeting akt signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 5264-5283.
 23. Liu, S., Zhang, Q., Chen, C., Ge, D., Qu, Y., Chen, R., Fan, Y. M., Li, N., Tang, W. W., Zhang, W., Zhang, K., Wang, A. R., Rowan, B. G., Hill, S. M., Sartor, O., Abdel-Mageed, A. B., Myers, L., Lin, Q. and You, Z. 2016. Hyperinsulinemia enhances interleukin-17-induced inflammation to promote prostate cancer development in obese mice through inhibiting glycogen synthase kinase 3-mediated phosphorylation and degradation of interleukin-17 receptor. *Oncotarget* **7**, 13651.
 24. Narita, S., Nara, T., Sato, H., Koizumi, A., Huang, M., Inoue, T. and Habuchi, T. 2019. Research evidence on high-fat diet-induced prostate cancer development and progression. *J. Clin. Med.* **8**, 597.
 25. Mah, C. Y., Nassar, Z. D., Swinnen, J. V. and Butler, L. M. 2020. Lipogenic effects of androgen signaling in normal and malignant prostate. *Asian J. Urol.* **7**, 258-270.
 26. Manrique-Acevedo, C., Chinnakotla, B., Padilla, J., Martinez-Lemus, L. A. and Gozal, D. 2020. Obesity and cardiovascular disease in women. *Int. J. Obes.* **44**, 1210-1226.
 27. Martini, M., De Santis, M. C., Braccini, L., Gulluni, F. and Hirsch, E. 2014. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann. Med.* **46**, 372-383.
 28. Park, J. J., Kim, J. E., Jeon, Y., Lee, M. R., Choi, J. Y., Song, B. R., Park, J. W., Kang, M. J., Choi, H. J., Bae, S. J., Lee, H., Kang, B. C. and Hwang, D. Y. 2020. Deletion of NKX3.1 via CRISPR/Cas9 induces prostatic intraepithelial neoplasia in C57BL/6 mice. *Technol. Cancer Res. Treat.* **19**, 1533033820964425.
 29. Shukla, S., MacLennan, G. T., Hartman, D. J., Fu, P., Resnick, M. I. and Gupta, S. 2007. Activation of PI3K-Akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion. *Int. J. Cancer Res.* **121**, 1424-1432.
 30. Sivaprakasam, S., Sikder, M. O. F., Ramalingam, L., Kaur, G., Dufour, J. M., Moustaid-Moussa, N., Wachtel, M. S. and Ganapathy, V. 2021. SLC6A14 deficiency is linked to obesity, fatty liver, and metabolic syndrome but only under conditions of a high-fat diet. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1867**, 166087.
 31. Venkateswaran, V., Haddad, A. Q., Fleshner, N. E., Fan, R., Sugar, L. M., Nam, R., Klotz, L. H. and Pollak, M. 2007. Association of diet-induced hyperinsulinemia with accelerated growth of prostate cancer (LNCaP) xenografts. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 1793-1800.
 32. Wang, X., Wei, L., Xiao, J., Shan, K., He, Q., Huang, F., Ge, X., Gao, X., Feng, N. and Chen, Y. Q. 2022. Cholesterol and saturated fatty acids synergistically promote the malignant progression of prostate cancer. *Neoplasia* **24**, 86-97.
 33. Włodarczyk, M. and Nowicka, G. 2019. Obesity, DNA damage, and development of obesity-related diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1146.
 34. Xu, H., Hu, M. B., Bai, P. D., Zhu, W. H., Liu, S. H., Hou, J. Y., Xiong, Z. Q., Ding, Q. and Jiang, H. W. 2015. Proinflammatory cytokines in prostate cancer development and progression promoted by high-fat diet. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 249741.
 35. Yang, T., Wu, X., Hu, J., Hu, M., Xu, H., Jiang, H. and Ding, Q. 2018. Maternal high-fat diet promotes the development and progression of prostate cancer in transgenic adenocarcinoma mouse prostate offspring. *Cell Physiol. Biochem.* **47**, 1862-1870.
 36. Yamamoto, Y., De Velasco, M. A., Kura, Y., Nozawa, M., Hatanaka, Y., Oki, T., Ozeki, T., Shimizu, N., Minami, T., Yoshimura, K., Yoshikawa, K., Nishio, K. and Uemura, H. 2015. Evaluation of *in vivo* responses of sorafenib therapy in a preclinical mouse model of PTEN-deficient of prostate cancer. *J. Transl. Med.* **13**, 1-12.
 37. Zaidi, S., Gandhi, J., Seyam, O., Joshi, G., Waltzer, W. C., Smith, N. L. and Khan, S. A. 2018. Etiology, diagnosis, and management of seminal vesicle stones. *Curr. Urol.* **12**, 113-120.
 38. Zhao, Y., Tan, Y. S., Aupperlee, M. D., Langohr, I. M., Kirk, E. L., Troester, M. A., Schwartz, R. C. and Haslam, S. Z. 2013. Pubertal high fat diet: effects on mammary cancer development. *Breast Cancer Res.* **15**, R100.

초록 : C57BL/6N 마우스에서 전립선암의 발병률 및 진행에 대한 고지방식이-유도 비만의 영향최윤주¹ · 김지은¹ · 이수진¹ · 공정은¹ · 진유정¹ · 이재호¹ · 임 용² · 황대연^{1,3*}(¹부산대학교 바이오소재과학과, ²동의대학교 임상병리학과, ³부산대학교 노화 & 웰빙제품연구센터/실험동물센터)

고지방식이(High fat diet, HFD)에 의해 유발되는 비만은 정상적인 마우스에서는 연구되지 않았지만 여러 유전자변형마우스의 전립선암(Prostate cancer)에 대한 강력한 위험인자 및 예후인자로 검증되었다. HFD-유도 비만이 정상적인 마우스에서 전립선암의 발생 및 진행에 영향을 미칠 수 있는지 여부를 조사하기 위해, 16주 동안 60% HFD 식이를 급여한 비만 C57BL/6N 마우스에서 전립선의 무게 및 조직학적 구조 변화와 암관련 단백질 발현을 분석하였다. 첫째, HFD 식이를 급여한 C57BL/6N 마우스는 체중, 장기의 무게, 지방 축적, 혈청지질 수치의 증가 등을 포함한 비만증상을 성공적으로 유도되었다. 전립선의 무게는 No그룹에 비해 HFD-유도 비만마우스에서 유의미하게 증가하였다. 전립선의 4가지 엽들 중 외측전립선(Dorsolateral prostate, DLP)과 정낭(Seminal vesicle, SV)의 무게는 유의적인 변화가 없었지만, 복부전립선(Ventral prostate, VP)과 전방전립선(Anterior prostate, AP)의 무게는 No그룹보다 HFD-유도 비만마우스에서 증가하였다. 또한, 전립선의 조직학적 구조에서 과형성(Hyperplasia) 및 비호지킨림프종(Non-hodgkin's lymphoma, NHL)의 발생률은 HFD-유도 비만마우스에서 유의미하게 증가하였으며, 같은 그룹에서 AP의 상피두께도 증가하였다. HFD-유도 비만마우스에서 AKT (Protein kinase B) 신호경로에서 주요 단백질의 인산화수준이 유의미하게 증가했다. 따라서 이러한 결과는 HFD-유도 비만은 C57BL/6N 마우스에서 전립선암의 발생과 진행을 촉진할 수 있음을 시사한다.