



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

간에서 Liver receptor homolog-1에 의한
Cystathionine γ -lyase 조절 기전계명대학교 대학원
의학과

박 수 영

지도교수 임 승 순

2024년 2월

간에서 Liver receptor homolog-1에 의한 Cystathionine γ -lyase 조절 기전

지도교수 임 승 순

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2 0 2 4 년 2 월

계 명 대 학 교 대 학 원

의학과 생리학 전공

박 수 영

박수영의 석사학위 논문을 인준함

주 심 송 대 규

부 심 임 승 순

부 심 배 재 훈

계 명 대 학 교 대 학 원

2 0 2 4 년 2 월

감 사 문

이번 논문을 제출하기까지 바쁘신 일정 중에서도 부족함이 많은 저에게 열정을 다해 가르침을 주신 지도교수님이신 임승순 교수님과 심사위원을 맡아주신 배재훈 교수님, 송대규 교수님께 감사의 인사를 드립니다.

그리고 지난 2년 동안 실험실에서 많은 힘이 되어주신 이재호 박사님과 이은호 박사님, 한희경, 서민희 선생님과 장혜지 선생님 및 생리학 교실 모든 분들께도 감사 인사 전합니다. 모든 분들의 지원이 아니었다면 이렇게 논문을 쓰는 과정이 무척 힘들었을 겁니다.

마지막으로 한결같이 격려해 주시고 믿어주신 부모님과 동생, 친구들에게도 고맙다는 인사를 드리고 싶습니다.

2024년 2월

박 수 영

목 차

1. 서 론	1
2. 재료 및 방법	3
3. 성 적	12
4. 고 찰	28
5. 요 약	30
참고문헌	31
Abstract	36
국문초록	38

표 목차

<표 1> 정량 중합효소 연쇄반응 프라이머 리스트.....	10
----------------------------------	----

그림 목차

<그림 1> 금식 시 간에서 liver receptor homolog-1(LRH-1)의 증가·····	15
<그림 2> 간 조직에서 지질 생성 유전자의 발현 변화·····	16
<그림 3> 간 조직에서 포도당 신생합성 유전자의 발현 변화·····	17
<그림 4> 금식에 의한 LRH-1 유전자 결핍 마우스의 간 조직 내 지질 축적의 증가··	18
<그림 5> 간 조직에서 중성지방과 콜레스테롤의 함량 변화·····	19
<그림 6> 혈청에서 중성지방과 콜레스테롤의 함량 변화·····	20
<그림 7> 간 조직에서 지방산 산화 유전자의 발현 변화 ·····	21
<그림 8> 일차 간세포에서 미토콘드리아 기능과 지방산 산화 발현 변화··	22
<그림 9> 금식 시 간에서 cystathionine γ -lyase(CTH)의 발현 변화·····	23
<그림 10> CTH 프로모터에서 LRH-1 부착부위 추정 ·····	24
<그림 11> LRH-1에 의한 CTH의 활성 검증 ·····	25
<그림 12> 금식 시 간 조직과 혈청의 황화수소 함량 변화·····	26

<그림 13> LRH-1 결핍에 따른 지질 축적 과정 모식도27

1. 서론

간 수용체 동족체-1(liver receptor homolog-1, LRH-1)은 간, 장 및 췌장 등을 포함한 내배엽 기원 유래 조직에서 주로 발현된다. LRH-1은 생식 능력, 분화 발달 및 세포 증식에 대한 영향과 함께 스테롤 대사 조절에 중요한 역할을 하며, 스테로이드 생성, 포도당, 담즙산 및 콜레스테롤 대사에 중추적인 역할을 하는 생물학적인 주요 조절인자이다(1-3). 간에서는 peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha(PGC-1 α) 조절, 미토콘드리아 생합성 및 베타 산화작용을 통하여 지질 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있고, LRH-1이 결핍되었을 때 소포체 스트레스에 의한 지방간 생성이 유도되는 것으로 알려져 있다(4,5). 따라서 금식 시 LRH-1이 결핍되어 있을 때 베타 산화작용에 의해 간에서 중성지방 축적이 더 쉽게 증가한다고 보고되어 있다(6). 금식 시 간에서 과도하게 축적된 중성지방은 주로 지질 방울(lipid droplet) 내에 저장된다(7). 지질 방울은 지질 저장 및 이용의 균형을 유지하는데 사용되며, 낮은 세포 내 유리 지방산 수준을 조절하므로 영양 스트레스 조건에서 과도한 지방산으로 인한 지방 독성으로부터 간을 보호하는데 중요한 역할을 한다(8-10).

Cystathionine γ -lyase(CTH)는 포유류에서 L-시스테인 및 호모시스테인을 주 기질로 하여 두 개의 피리독살-5'-인산 의존성 효소인 cystathionine β -lyase(CBS)와 함께 주요 내인성 황화수소 생성 효소로 알려져 있다(11-13). CTH는 심혈관계에서 주로 발현되며, 간, 췌장 및 신장에서 주된 황화수소 생성 효소로 알려져 있으며, 노령화, 알츠하이머 환자, 당뇨 및 비만 등의 질환이 있을 때 감소한다고 보고된 바 있어서 대사적 양면에서 중요한 효소로 인식되고 있다(14-17).

황화수소는 가스 전달물질로서, 특히 시스테인 잔기를 -SSH로 변환시켜 단백질의 활성을 조절하는 단백질 sulfhydration을 통해 세포 내에서 산화 스트레스, 지방산 산화 및 미토콘드리아 생합성 등을 매개하는 것으로 알려져 있다(18). 황화수소 생성에 관여하는 효소는 CBS, CTH, 3-mercaptopyruvate sulfotransferase(3-MST) 및 cysteine aminotransferase(CAT)로 4 가지가 주로

알려져 있다(19). 현재까지 황화수소에 의해 유도되는 단백질 sulfhydration 표적은 굉장히 소수이며 이러한 표적을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다. 황화수소는 간에서 산화 스트레스를 줄이고, 염증을 억제하는것으로 알려져 있고, 반응성 산소종의 활성을 감소시키고 글루타티온과 항산화 효소를 증가시켜 산화 스트레스부터 간을 보호함을 알 수 있다(20,21).

따라서 이번 연구는 간에서 LRH-1에 의한 CTH의 조절 기전을 확인하고, 금식에 의한 황화수소 생성이 간의 중성지방 축적에 미치는 영향을 규명하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2. 1. 동물 모델:

생후 8 주령의 정상 및 LRH-1 결핍(knock out) C57BL/6 마우스를 각각 5 마리씩 정상 식이 및 24 시간 금식을 진행하였다. 모든 동물실험은 계명대학교 의과대학 실험동물 윤리위원회의 승인을 통해 수행되었다 (KM-2022-25R1).

2. 2. 헤마톡실린-에오신 염색법:

간 조직을 4-5 μm 두께로 박절하여 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 동안 파라핀을 녹인 후, 건조 오븐에서 3 분간 슬라이드에 고정시켰다. 파라핀을 제거하기 위해 자일렌으로 5 분씩 3 회 담근 후, 100%, 95% 및 90% 에탄올에서 각각 2 분간 흡수 과정을 거쳤다. Mayer's hematoxylin 용액(H&E, BBC Biochemical, Mount Vernon, WA, 미국)으로 4 분간 염색한 후, 따뜻한 물로 2 분간 수세한다. 95% 에탄올로 살짝 흘려준 후 eosin Y 용액(H&E, BBC Biochemical)으로 7 초간 반응하였다. 물로 수세한 후 90%, 95% 및 100% 에탄올 및 자일렌으로 탈수화 과정을 거친 후 봉입제와 커버 슬라이드로 고정시켰다.

2. 3. 중성지방 및 콜레스테롤 측정:

지질 축적을 확인하기 위하여 간 조직 50 mg을 클로로포름(CHCl_3)과 메탄올(MeOH)을 2:1로 혼합한 용액에 넣고 균질화시킨다. 분리된 상층액을 2:1 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 용액 2 mL에 혼합하는 과정을 3번 정도 반복한다. 그 뒤

6-8 mL 정도의 추출물에 질소가스를 주입하여 건조 시켰다. 건조한 후 1:1 CHCl₃/MeOH 4 mL과 50 mM LiCl 2 mL을 추가하여 혼합하고 실온에서 783 × g로 10 분간 원심분리하였다. 아래쪽에 생긴 층 즉, CHCl₃층을 다른 튜브로 분리하고 원래 튜브에 CHCl₃ 2 mL을 추가하고 다시 원심분리하여 CHCl₃층을 분리하는 과정을 3번 반복하였다. 수집한 CHCl₃층 용액은 질소를 사용하여 건조한 후 1:1 CHCl₃/MeOH 4 mL과 10 mM LiCl 2 mL을 추가하고 원심분리한 후 과정을 동일하게 2번 반복한다. 건조한 시료에 500 µl CHCl₃을 넣어 혼합하였다. 마지막으로, 중성지방과 총 콜레스테롤 키트를 사용하여 중성지방과 콜레스테롤을 측정하였다(아산셋트 중성지방 측정용 시액, 아산셋트 총 콜레스테롤 측정용 시액, 아산제약, 경기도 화성시, 대한민국). 지질 농도는 사용된 간 조직의 무게로 표준화하였다. 혈청 내 중성지방과 총 콜레스테롤 측정도 조직과 동일한 키트를 사용하여 측정하였다.

2. 4. 정량 중합효소 연쇄반응 분석:

정상 식이 및 24 시간 금식을 한 8 주령의 정상 및 LRH-1 결핍 마우스의 간 조직에서 RNA를 추출하였다. 추출에는 TriZol reagent(Life Technologies, Carlsbad, CA, 미국)를 사용하였다. 그 중 1 µg의 RNA를 iScript cDNA 합성키트(Bio-rad, Hercules, CA, 미국)를 사용하여 상보적 DNA(cDNA)로 합성시키고 cDNA에 프라이머와 SYBR green(iQ SYBR Green Supermix, Bio-rad)를 혼합하여 정량 중합효소 연쇄반응 분석을 진행하였다. 정량 중합효소 연쇄반응 분석은 CFX96TM(real time system, Bio-rad)를 사용하여 수행하였다. 분석에 사용된 forward와 reverse 프라이머는 다음과 같다(표 1).

중합효소 연쇄반응 증폭은 95 °C에서 3 분, 95 °C에서 10 초, 55 °C에서 30 초를 1 회로 하여 총 39 회 증폭시킨 후, 55 °C에서 5 초 그리고 95 °C 까지 온도를 증가시켜 녹는 곡선을 그렸다. 결과 값을 분석하여 그래프로

나타내었다.

2. 5. Western Blot 분석:

8 주령의 정상 마우스와 LRH-1 결핍 마우스에 정상 식이 및 24 시간 금식을 한 후 간 조직을 분리하여 조직 용해 완충제(T-PERTM tissue protein extraction reagent, Thermo Scientific, Rockford, IL, 미국)를 사용하여 시료를 준비하였다. 시료의 단백질은 bicinchoninic acid 단백질 정량 키트(BCA, Thermo Scientific)를 사용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였으며, 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel에서 단백질을 분리한 후, 0.2 μ m nitrocellulose membrane(GE Healthcare, Uppsala, 스웨덴)으로 옮겨준 후 5% skim milk/TBST(20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4)에 넣어 실온에서 1 시간 동안 실온에서 유지시켰다. 그 후 LRH-1 1차 항체(ARP37407_P050, Aviva System Biology, San Diego, CA, 미국), CTH 1차 항체(sc-365382, Santa Cruz Biotechnology, DALLA, Texas, 미국), GAPDH 1차 항체(2118, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, 미국)를 사용하여 16 시간 동안 4 °C에서 반응시켰다. 2차 항체로는 anti-mouse 또는 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase/TBST(Santa Cruz, Paso Robles, CA, 미국)로 1 시간 반응시킨 후 단백질 검출에 사용하였다. pico ECL(Clarify Western ECL Substrate, Bio-rad) 용액에서 2 분간 발색시켜 단백질을 확인하였다.

2. 6. 일차 간세포 분리:

정상 식이 및 24 시간 금식한 정상 마우스와 LRH-1 결핍 마우스에서 일차 간세포를 관류법(22)을 사용하여 분리되었다. 먼저 마우스는 이소플로란(이소플로란, (주)하나제약, 경기도, 한국)으로 마취 후 개복하여 정맥에 카테터를 삽입하고 간문맥을 잘라 혈액이 방출되도록 한 후, EBSS(EBSS, (주)웰

진, 경산, 한국)와 0.5 mM EGTA를 간에 관류하여 혈액을 제거하였다. 그 후 EBSS와 2 M $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Liberase(liberase perfusion, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, 미국)를 주입하여 간 효소를 분해시켰다. 간을 즉시 10 cm 세포배양 접시에 분리하고 EBSS와 2 M $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 로 부드럽게 풀어준 후, 100 μM 나일론 세포 여과기를 사용하여 세포를 여과시켜 조직 찌꺼기를 제거하여 여과물을 50 × g, 4 °C에서 1 분간 원심분리하였다. percoll buffer(GE Healthcare, Uppsala, 스웨덴)에 다시 현탁하고, 100 × g에서 10 분간 원심분리하여 간세포를 분리하였다. 분리된 간세포는 10% FBS, 1% Glutamax, 1% P/S로 보충된 William's Medium E(Gibco)에 부드럽게 재현탁하고 콜라겐으로 코팅된 10 cm 배양 접시에 세포를 배양하였다.

2. 7. 실시간 세포 대사 분석:

미토콘드리아 호흡 활성과 지방산 산화를 측정하기 위해 Seahorse XF96 분석기(XF96, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, 미국)를 사용하여 일차 간세포에서의 농도를 측정하였다. 일차 간세포는 콜라겐 코팅이 된 seahorse microplate(96-well)에 2×10^5 로 배양하였다. 세포 내 산소 소모율(Oxygen consumption rate, OCR) 측정 전날 센서 카트리지에 보정 버퍼(XF Calibrant, Agilent Technologies)를 넣고 37 °C의 이산화탄소가 없는 인큐베이터에서 배양한 후 중탄산나트륨 없는 DMEM에서 일차 간세포를 배양하였다. OCR 검사 당일 미토콘드리아 OXPHOS 억제제와 배지를 pH 7.4로 조정하였다. 미토콘드리아 OXPHOS 억제제인 올리고마이신(2 mg/mL) 및 로테논(1 mM)을 각각 추가한 후 기본 OCR을 세 번 측정하고 세 번의 판독을 실시하였다. 올리고마이신 OCR은 안정된 상태를 유지한 후 마지막 세 번의 측정을 평균내서 계산하였다. 결합 호흡은 기본 호흡에서 백분율 감소로 표현되었다. 지방산 산화(Fatty acid oxidation, FAO) 측정은 올리고마이신, FCCP, 로테논, 에토목실을 처리하여 측정하였다

(Seahorse XF Long Chain Fatty Acid Oxidation Stress Test Kit, Agilent Technologies). OCR과 FAO는 단백질 농도에 의해 표준화하고 카트리지와 seahorse XF96 소프트웨어에 의해 자동으로 계산하고 기록하였다.

2. 8. RNA-sequencing(RNA-seq):

분석에 필요한 간 조직 샘플은 정상 식이 및 24 시간 금식을 진행한 정상 및 LRH-1 결핍 마우스에서 수집하였다. 간 조직에서 얻은 RNA를 수집하여 RNA-seq(Macrogen Inc., 서울, 한국) 분석을 실시하였다. 총 RNA 중 1 mg은 Truseq RNA 라이브러리 키트(Illumina, San Diego, CA, 미국)를 사용하여 cDNA 라이브러리를 구성하기 위해 분석하였다. 프로토콜에는 폴리 A가 선택된 RNA 추출, RNA 단편화, 무작위 헥사머 프라이밍 역전사, Illumina HiSeq 2000(Illumina, San Diego, CA, 미국)을 사용한 100 nt 쌍의 엔드 시퀀싱이 포함되었으며, agilent technologies의 2100 바이오 분석기를 사용하여 분석하였다.

2. 9. 프로모터 활성 측정:

HEK-293T 세포를 6-well 배양접시에 well당 1.5×10^5 개로 배양했다. 세포에 Lipofectamine[®]2000(Invitrogen, Waltham, MA, 미국)을 이용하여 pcDNA 3.1(100 ng), pcLRH-1(100 ng), pCMB- β -galactosidase(50 ng) 발현 플라스미드 및 pmCTH 2000(100 ng)을 형질주입 시켰다. 형질주입 24 시간 후, 세포에 100 μ M DLPC를 첨가한 다음, 다시 24 시간 배양하였다. 그 후, 세포들을 수거하여 루시퍼라아제 분석법을 시행하였다.

2. 10. 시스테인 농도 측정:

먼저 정상 식이 및 24 시간 금식을 한 정상 마우스와 LRH-1 결핍 마우스의 혈액을 분리했다. 그 뒤 25 μL 의 혈청과 50 μL 의 물을 혼합하여 혈청을 희석 시키고, 희석한 혈청 20 μL 와 물 10 μL 그리고 80 μL 의 메탄올을 혼합하여 섞고 10 분간 얼려주었다. 혼합된 샘플을 4 $^{\circ}\text{C}$, $14,200 \times g$ 에서 10 분간 원심분리 한 후, 분리된 샘플 40 μL 와 20 μL 탄산 나트륨(Sodium carbonate), 20 μL 2% 벤젠카르보닐 클로라이드(BzCl)을 혼합하여주고 20 μL IS(333 μL Working STD + 333 μL 100mM Sodium carbonate + 333 μL BzCl-d5 (2% (v/v)) in acetonitrile) + 1 μL formic acid)를 추가하여 4 $^{\circ}\text{C}$, $14,200 \times g$ 에서 10 분간 원심분리 하였다. 시스템인 측정은 LC-MS(NexeraX2 LC-30AD & LCMS-8050 system, SHIMADZU, Kyoto, Japan)로 측정하였다.

2. 11. 황화수소 함량 측정:

먼저 정상 식이 및 24 시간 금식을 한 정상 마우스와 LRH-1 결핍 마우스의 혈액을 분리했다. 간 조직은 PBS로 균질화 한 후, BCA정량법을 이용하여 450 μg 으로 정량하였다. 정량된 단백질에 10 mM L-cystein 10 μL 와 2 mM pyridoxal 5'-phospahte 10 μL 를 혼합하고 PBS로 총량 250 μL 를 맞춰 주었다. 20 초 동안 샘플에 질소가스를 주입해 주고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60 분 동안 반응시킨 후, 1% Zinc acetate 250 μL 와 10 M NaOH 2.5 μL 를 넣어준 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60 분간 황화수소를 잡아준다. 그 후 10% TCA 125 μL , 20 mM N,N-dimethyl-p-phenylenediamine sulfate 133 μL , 30 mM FeCl_3 133 μL 를 추가하여 실온에서 20 분 동안 반응시켰다. 그 후 $282 \times g$, 5 분에서 원심분리 하고, 샘플은 670 nm에서 흡광도 측정하였다.

혈액에서의 황화수소 농도는 200 μL 혈청을 사용하여 동일한 방법으로 측정하였다.

2. 12. 통계 분석

데이터는 GraphPad Prism 5.0(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, 미국)를 통해 각각의 자료에서 평균과 표준 오차로 표시하였다. 유의성은 Student's t - test로 검증하였으며, p 값이 0.05 이하에서 유의하다고 판단하였다.

<표 1> 정량 중합효소 연쇄반응 프라이머 리스트

프라이머		염기서열(5'→3')
<i>L32</i>	sense	ACATTTGCCCTGAATGTGGT
	antisense	ATCCTCTTGCCCTGATCCTT
<i>Lrh-1</i>	sense	TGGGAAGGAAGGGACAATCTT
	antisense	CGAGACTCAGGAGGTTGTTGAA
<i>Srebp-1c</i>	sense	GGAGCCATGGATTGCACATT
	antisense	GGCCCGGGAAGTCACTGT
<i>Scd-1</i>	sense	CCGGAGACCCCTTAGATCGA
	antisense	TAGCCTGTAAAAGATTTCTGCAAACC
<i>Fas</i>	sense	GCTGCGGAAACTTCAGGAAAT
	antisense	AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT
<i>Red</i>	sense	GCAGCAGGACATCTTGTCAG
	antisense	CGCTTCAGTTCAGTGTCAGG
<i>Pepck</i>	sense	CCACAGCTGCTGCAGAACA
	antisense	GAAGGGTCGCATGGCAA
<i>Pgc-1α</i>	sense	AACAAGCACTTCGGTCATCCCTG
	antisense	TTACTGAAGTCGCCATCCCTTAG
<i>Ppara</i>	sense	AGAGCCCCATCTGTCCTCTC
	antisense	ACTGGTAGTCTGCAAAACCAA
<i>Cpt1α</i>	sense	CTCCGCCTGAGCCATGAAG
	antisense	CACCAGTGATGATGCCATTCT
<i>Cpt1β</i>	sense	GCACACCAGGCAGTAGCTTT
	antisense	CAGGAGTTGATTCCAGACAGGTA
<i>Cpt2</i>	sense	CAGCACAGCATCGTACCCA
	antisense	TCCAATGCCGTTCTCAAAT
<i>Cth</i>	sense	TTCTGCCTAGTTTCCAGCAT
	antisense	GGAAGTCCTGCTTAAATGTGGTG
<i>Cbs</i>	sense	GGGACAAGGATCGAGTCTGGA
	antisense	AGCACTGTGTGATAATGTGGG
<i>Mpst</i>	sense	TCACAGCCGCTGAAGTTACTG
	antisense	CAGCATGTGGTTCGTAGGGG

CBS: cystathionin β-lyase; Cpt-1α: carnitine palmitoyltransferase1α; Cpt-1β:

carnitine palmitoyltransferase1 β ; Cpt-2: carnitine palmitoyltransferase2; Fas: fatty acid synthase; L32: ribosomal protein L32; MPST: mercaptopyruvate sulfurtransferase; Pepck1: phosphoenolpyruvate carboxykinase1; Pgc-1a: peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha; Ppara: peroxisome proliferator activated receptor α ; Red: HMG-CoA reductase; Scd-1: stearoyl-CoA desaturase 1; Srebp-1c: sterol regulatory element-binding protein-1c.

3. 성 적

3. 1. 금 식 시 지 질 생 성 유 전 자 발 현 감 소 :

LRH-1의 활성을 확인하기 위해 24 시간 동안 정상 식이 및 금식을 한 마우스로부터 간 조직을 분리한 후 LRH-1의 유전자 발현을 확인한 결과, LRH-1이 결핍된 것을 확인하였다(그림 1).

다음으로 지질 생성 유전자인 sterol regulatory element-binding protein-1c(SREBP-1c)를 살펴본 결과, 발현이 증가되지 않았다. 또한 SREBP-1c의 표적 유전자로 알려진 fatty acid synthase(FAS), HMG-CoA reductase(RED)와 stearyl-CoA desaturase 1(SCD-1)의 발현 또한 감소되는 것을 보아, 지질 생성 유전자들은 LRH-1이 소실된 간 조직에서의 지질 축적에 큰 영향을 끼치지 못했다(그림 2).

포도당 신생합성 유전자인 phosphoenolpyruvate carboxykinase1(PEPCK1)과 PGC-1 α 를 살펴본 결과 발현이 증가하였으며, 금식이 잘된 것을 확인하였다(그림 3).

3. 2. 금 식 시 간 조 직에 서의 지 질 축 적 증 가:

지질 축적의 유무를 확인하기 위해 24 시간 동안 정상 식이 및 금식을 한 마우스로부터 간 조직을 분리한 후 조직학적 형태와 중성지방, 콜레스테롤 함량의 차이를 비교해 보았다(그림 4, 5 및 6).

먼저 실험군 마우스의 지질 축적 유무를 확인하기 위해 각각의 간 조직을 헤마톡실린-에오신 염색을 진행하여 조직학적 형태를 비교한 결과, 금식한 LRH-1 결핍 마우스에서 지질 축적이 더 잘 된 것을 확인하였다(그림 4).

또한 마우스의 간 조직에서 중성지방과 콜레스테롤 수치를 측정해 본 결

과, 금식 한 LRH-1 결핍 마우스에서 수치가 더 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다(그림 5).

다음으로 지질이 간에서 분비가 되는지 확인하기 위해서 마우스의 혈청에서 중성지방과 콜레스테롤 수치를 측정해 본 결과, 간에서 분비가 되지 않아 수치 차이가 없음을 확인하였다(그림 6).

3. 3. 금식 시 지방산 산화에 따른 지질 축적 증가:

지질 축적이 지질 생성 유전자에 의한 것이 아님을 확인하였기 때문에 지질축적이 지방산 산화에 의한 것인지 확인하였다(그림 7 및 8).

먼저 지방산 산화 유전자인 peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α), carnitine palmitoyltransferase 1 α (CPT1 α), carnitine palmitoyltransferase 1 β (CPT1 β), carnitine palmitoyltransferase 2(CPT2)에서 금식 시 증가하였고, LRH-1 결핍 마우스에서는 발현이 감소하는 것을 확인하였다(그림 7).

그에 따라 세포 내 산소 소모율을 직접적으로 측정할 수 있는 seahorse로 미토콘드리아 활성을 측정하였을 때, 금식 시 LRH-1 결핍 마우스에서 감소하는 것을 확인하였고, 지방산 산화를 측정하였을 때도 감소하는 것을 확인하였다(그림 8).

3. 4. LRH-1에 의한 CTH 발현의 증가:

LRH-1의 새로운 타겟을 찾기 위해서 RNA-sequencing 분석을 하였을 때 황화수소 생성에 관여하는 3 가지 인자 중 CTH의 발현이 금식 시 증가하였으며, LRH-1 결핍 마우스에서 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 마우스 간 조직에서 RNA를 추출하여 황화수소 조절에 관여하는 3 가지 인자인 CTH, CBS, mercaptopyruvate sulfurtransferase(MPST)를 측정하였을 때 RNA 염기서열 분석 결과와 동일하게 금식 시 CTH만 유의하게 증가하였

으며, CBS와 MPST에서는 차이가 없음을 확인하였다. 단백질 발현량에서도 유전자 발현량과 동일하게 CTH 발현량이 금식 시 증가하는 것을 확인하였다(그림 9).

3. 5. LRH-1의 CTH 프로모터 활성 조절:

새로운 표적 유전자를 밝혀내기 위해 기존에 밝혀진 마우스 LRH-1 전장 유전체 ChIP-seq analysis 데이터를 분석한 결과, CTH 프로모터 내에 LRH-1이 결합 부위가 있음을 확인하였다. 실제로 CTH 프로모터에서 LRH-1 결합 염기서열인 AGGTCA를 분석해본 결과 결합하는 4 개의 부분이 존재함을 확인하였다(그림 10).

CTH 프로모터에서 4 가지 LRE를 찾았고, 그 중 LRE2 부위에서 마우스, 사람, 쥐에서 종간의 동족체가 일치함을 확인하였고, CTH 프로모터 활성을 측정된 결과 LRH-1에 의해 프로모터의 활성이 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(그림 11).

3. 6. LRH-1에 의한 황화수소 생성 조절 :

황화수소를 생성하는 주요인자인 CTH가 만들어 지기 위해서는 먼저 cystein이 생성되어야 하기 때문에 CTH에서 생성되는 cystein을 메타볼로믹스를 통해 분석한 결과, 금식 시 cystein이 증가하고 LRH-1이 결핍되면 감소하는 것을 확인하였다(그림 12).

CTH가 황화수소 생성에 중요한 인자이므로 금식 시 간에서 황화수소 생성능을 측정하였을 때 LRH-1 결핍 마우스에서 감소하는 것을 확인하였고, 황화수소가 간에서 분비되므로 혈청에서 측정하였을 때 마찬가지로 감소하는 것을 확인하였다(그림 13).

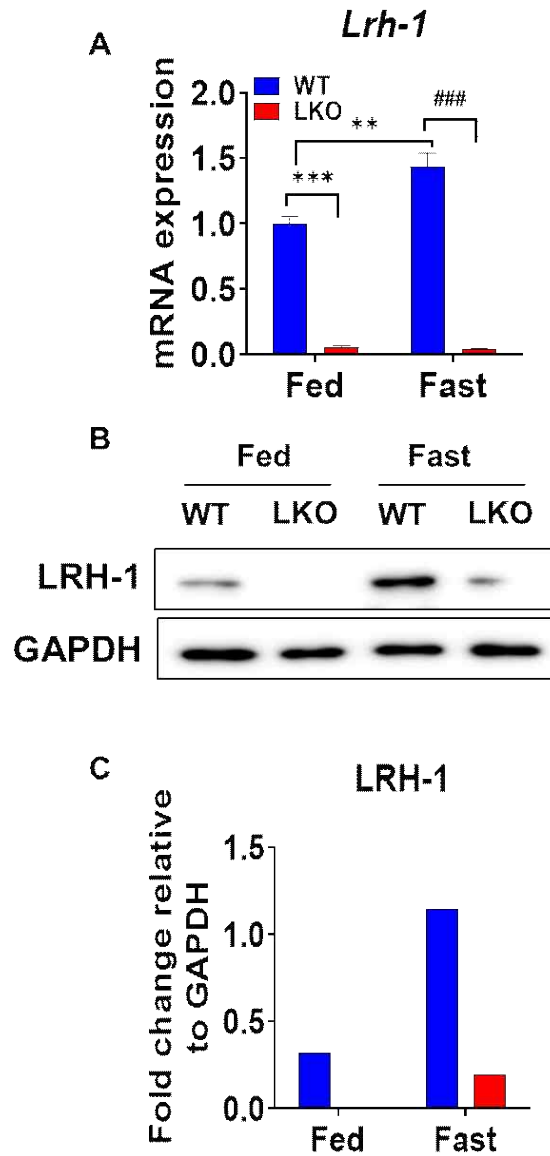


그림 1. 금식 시 간에서 liver receptor homolog-1(LRH-1)의 증가. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, 정상 식이 시 정상 마우스와 비교. ### $p < 0.001$, 금식 시 정상 마우스와 비교. WT: wild type; LKO: liver-specific knockout.

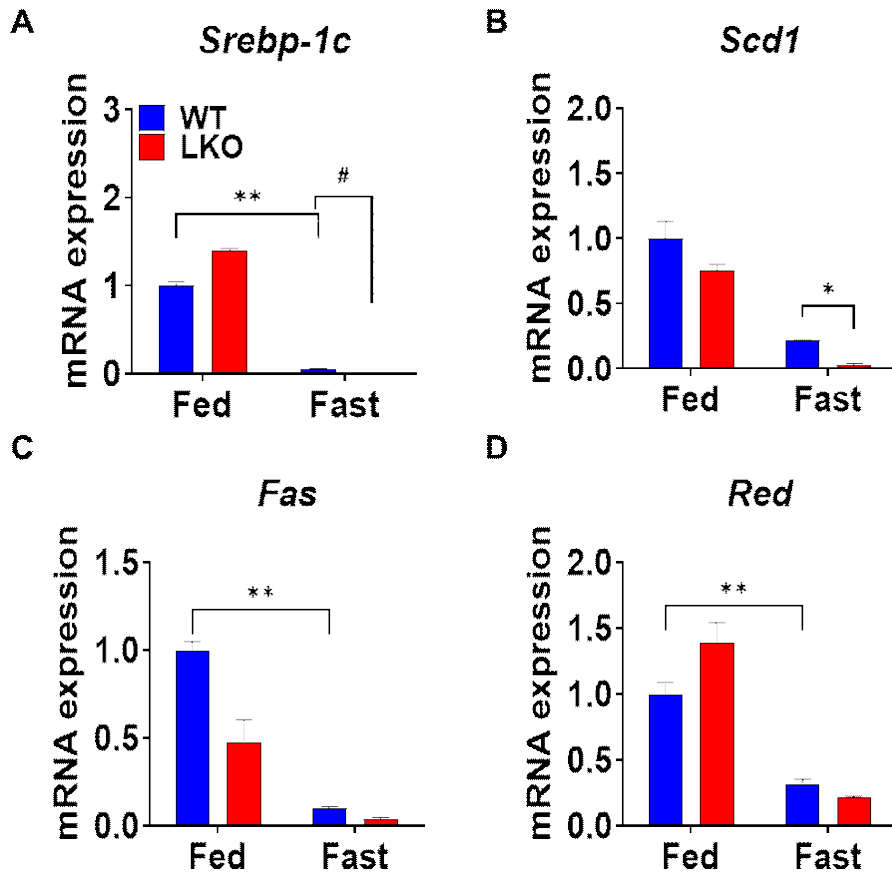


그림 2. 간 조직에서 지질 생성 유전자의 발현 변화. 정량 중합효소 연쇄 반응으로 Srebp-1c(A), Scd-1(B), Fas(C)와 Red(D)의 유전자 발현을 확인하였음. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 정상 식이 시 정상 마우스와 비교. # $p < 0.05$, 금식 시 정상 마우스와 비교. Fas: fatty acid synthase; Red: HMG-CoA reductase; Scd-1: stearoyl-CoA desaturase 1; Srebp-1c: sterol regulatory element-binding protein-1c.

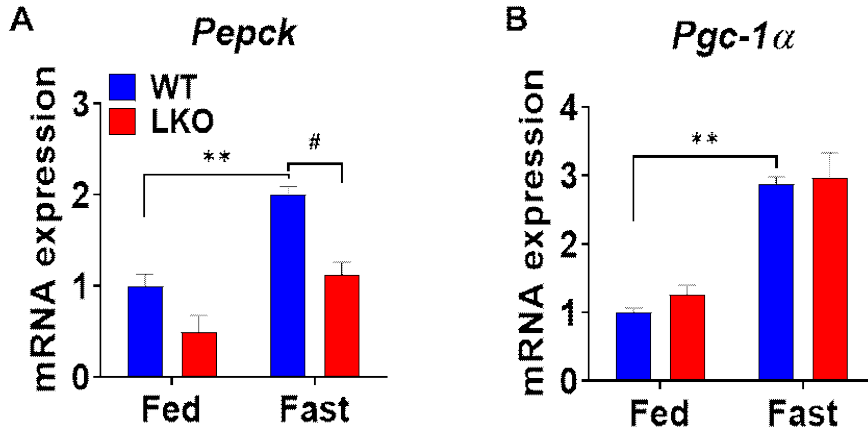


그림 3. 간 조직에서 포도당 신생 합성 유전자의 발현 변화. ** $p < 0.01$, 정상 식이 시 정상 마우스와 비교. # $p < 0.05$, 금식 시 정상 마우스와 비교. *Pepck*: phosphoenolpyruvate carboxykinase1; *Pgc-1α*: peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 alpha.

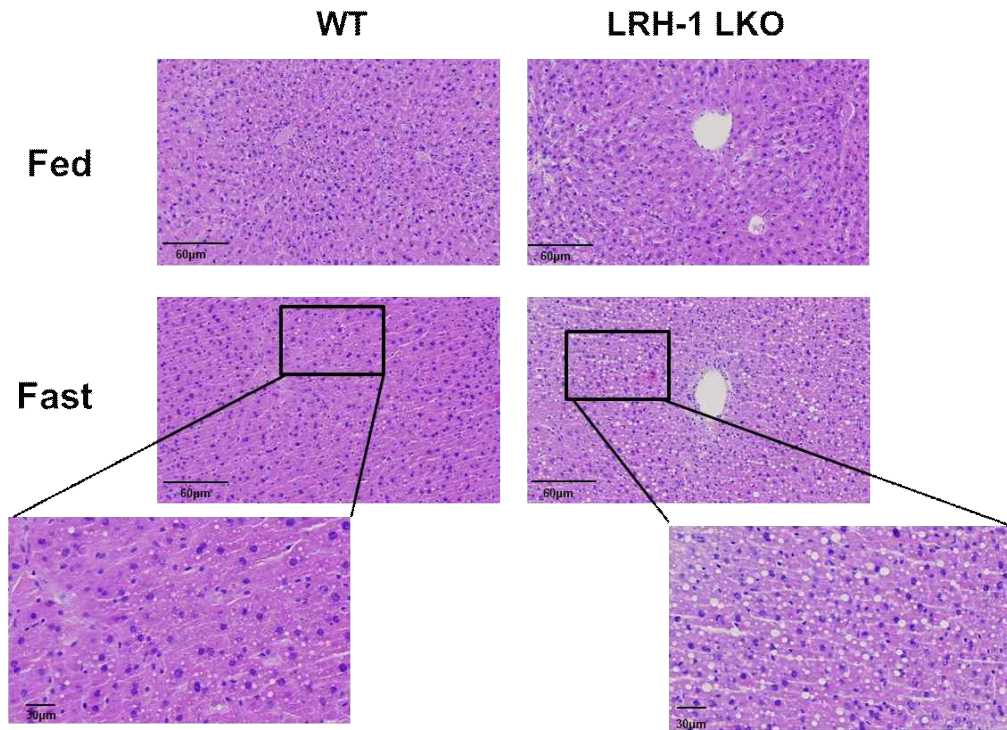


그림 4. 음식에 의한 LRH-1 유전자 결핍 마우스의 간 조직 내 지질 축적
 의 증가. 마우스의 간 조직을 분리하여 헤마톡실린-에오신 염색함
 (scale bar = 30 µm, 60 µm).

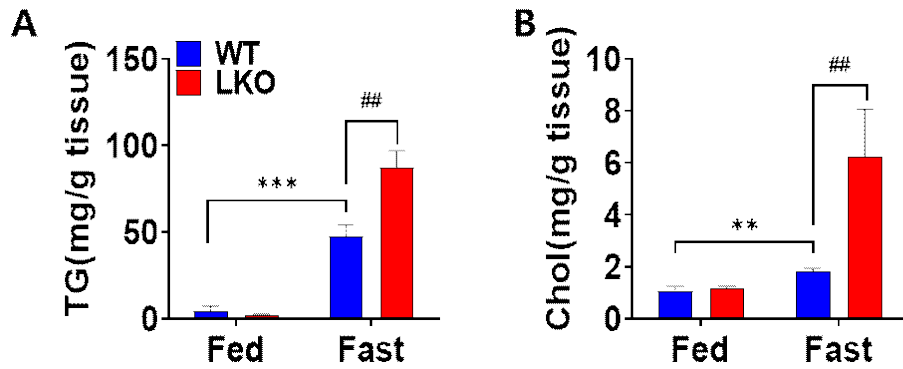


그림 5. 간 조직에서 중성지방(A)과 콜레스테롤(B)의 함량 변화. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, 정상 식이 시 정상 마우스와 비교. ## $p < 0.01$, 금식 시 정상 마우스와 비교.

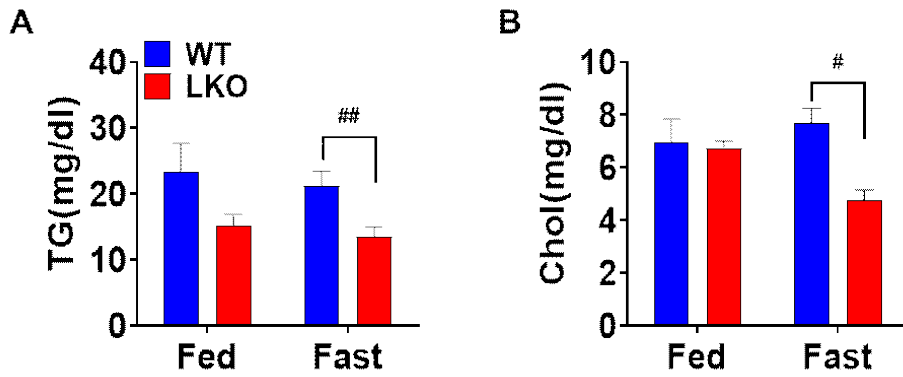


그림 6. 혈청에서 중성지방(A)과 콜레스테롤(B)의 함량 변화. # $p < 0.05$,
 ## $p < 0.01$, 금식 시 정상 마우스와 비교.

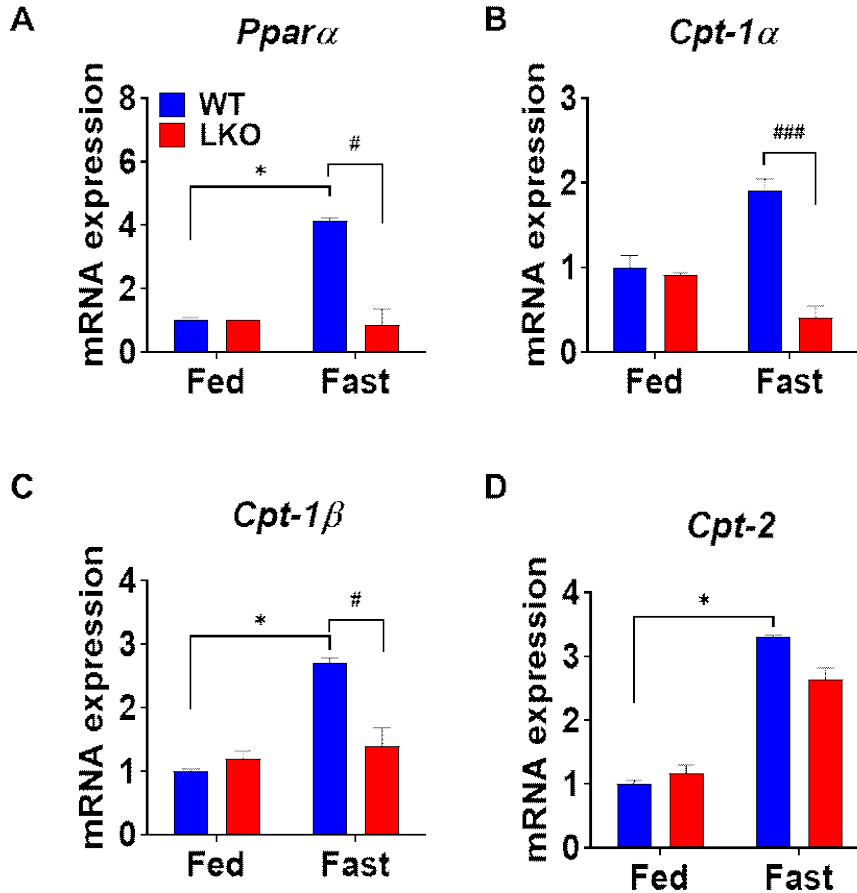


그림 7. 간 조직에서 지방산 산화 유전자의 발현 변화. Ppara(A), Cpt-1α(B), Cpt-1β(C)와 Cpt-2(D)의 유전자 발현을 확인하였음. * $p < 0.05$, 정상 식이 시 정상 마우스와 비교. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$, 금식 시 정상 마우스와 비교. Cpt-1α: carnitine palmitoyltransferase 1α; Cpt-1β: carnitine palmitoyltransferase 1β; Cpt-2: carnitine palmitoyltransferase 2; Ppara: peroxisome proliferator activated receptor α.

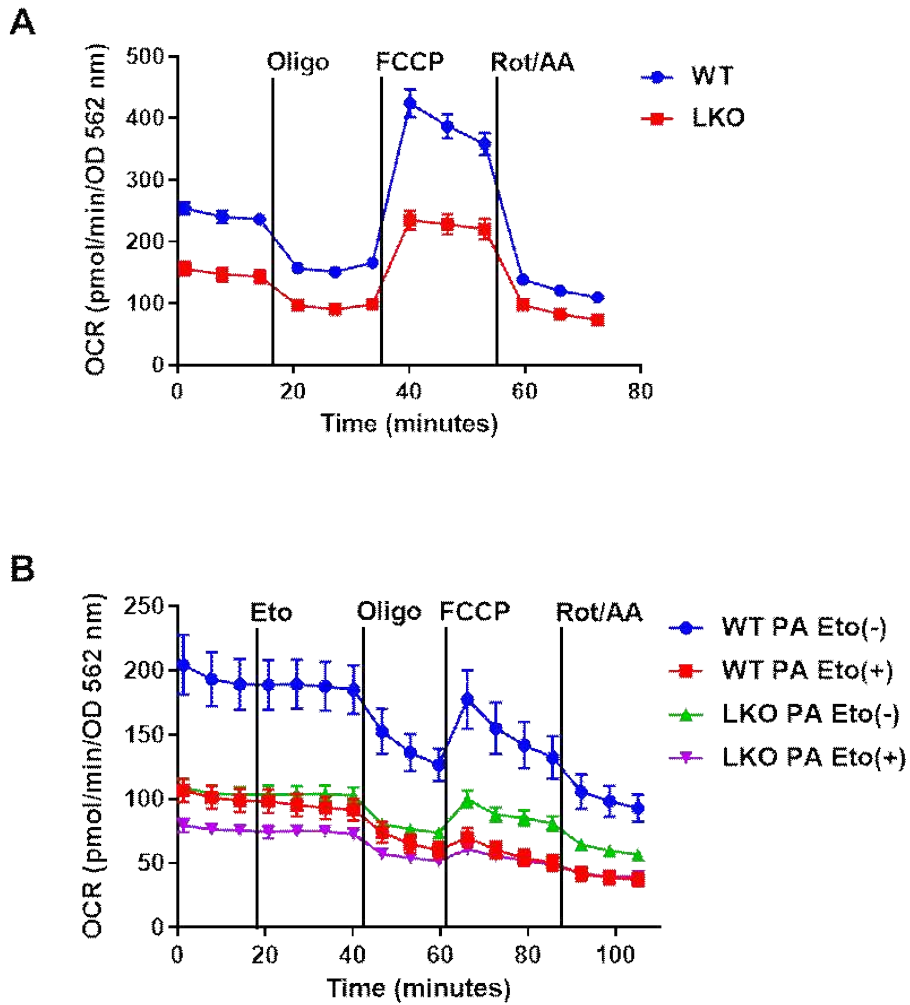


그림 8. 일차 간세포에서 미토콘드리아 기능과 지방산 산화 발현 변화. 산소 소모율(oxygen consumption rate, OCR) 발현 차이 측정(A), 지방산 산화(fatty acid oxidation, FAO) 발현 차이 측정(B).

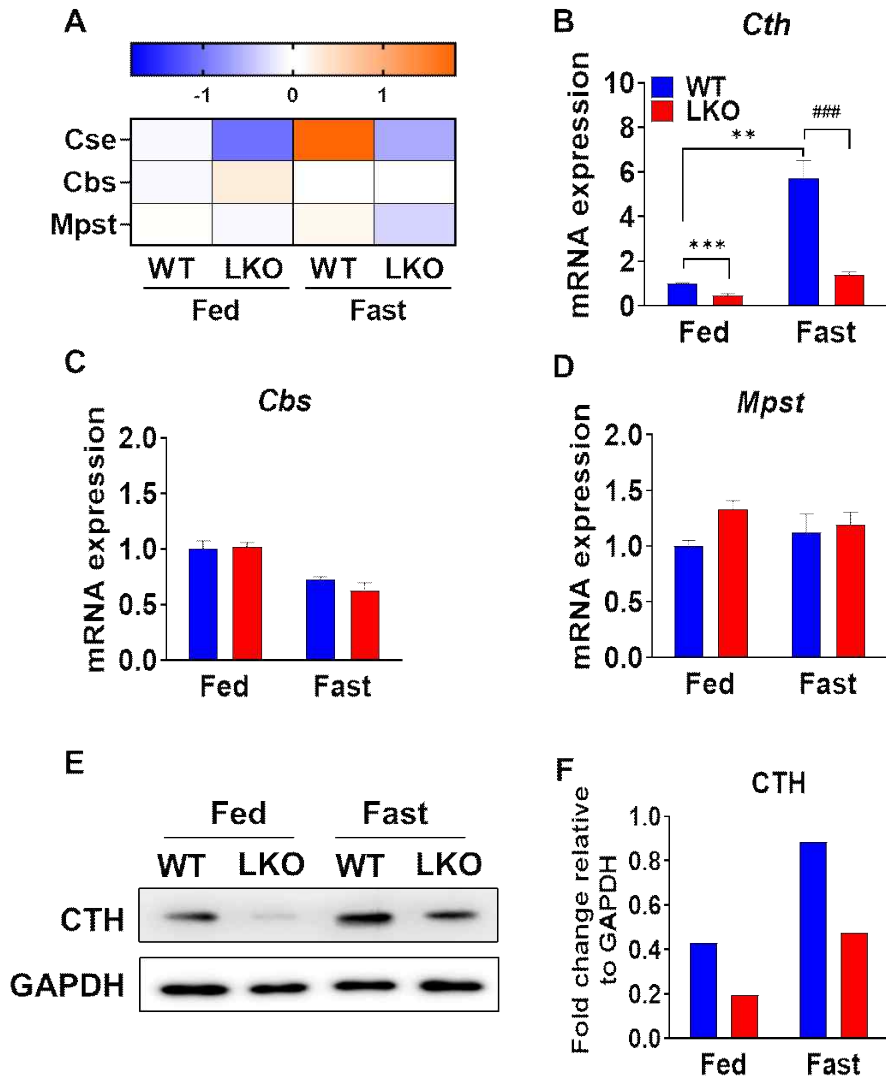


그림 9. 음식 시간에서 cystathionin γ -lyase(CTH)의 발현 변화. RNA-sequeuncing 분석(A), 정량 중합효소 연쇄반응으로 CTH(B), CBS(C)및 MPST(D)분석, CTH(E, F)단백질 발현 측정. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, 정상 식이 시 정상 마우스와 비교. ### $p < 0.001$, 음식 시 정상 마우스와 비교. CBS: cystathionin β -lyase; MPST: mercaptopyruvate sulfurtransferase.

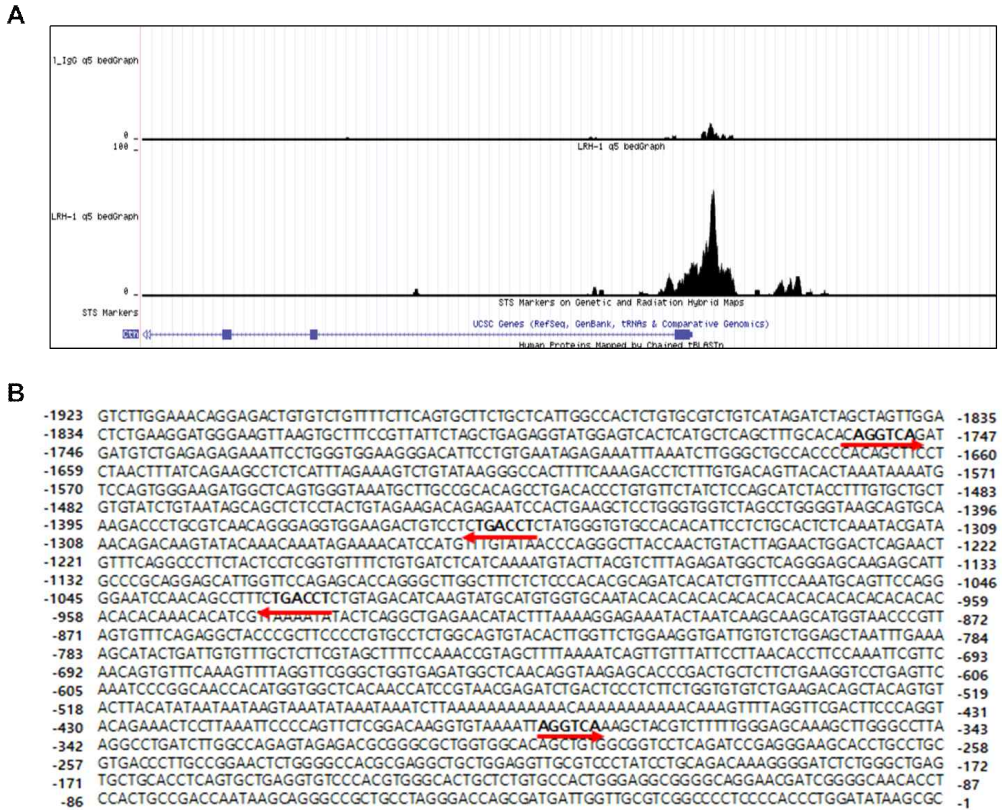


그림 10. CTH 프로모터에서 LRH-1 부착부위 추정. ChIP-sequencing 분석을 통한 CTH 프로모터에서 LRH-1 결합 추정 부위 확인(A), CTH 프로모터 시퀀스에서 LRH-1의 바인딩 시퀀스인 AGGTCA 확인(B).

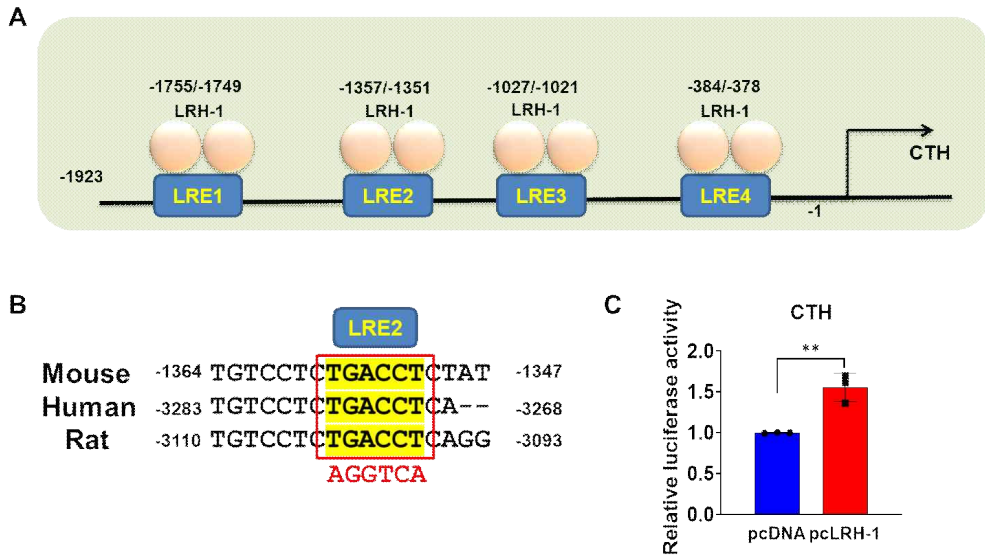


그림 11. LRH-1에 의한 CTH의 활성 검증. CTH 프로모터에서 4군데의 LRE 결합 부위(A), 마우스, 사람, 쥐의 CTH 프로모터 시퀀스에서 동일한 LRE 결합 부위(B) 및 인간 신장유래 세포인 HEK-293T 세포에서 LRH-1에 의한 CTH 프로모터 활성(C). ** p < 0.01. pcDNA와 pcLRH-1의 활성 비교.

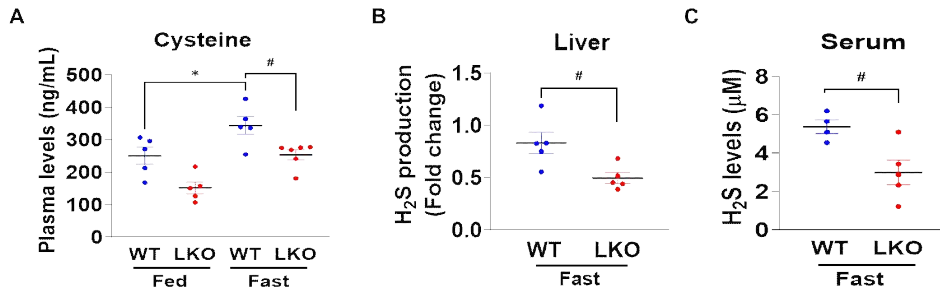


그림 12. 음식 시간 조작과 혈청의 황화수소 함량 변화. 혈청에서 시스테인 농도 측정(A), 간 조직에서 황화수소 함량 측정(B) 및 혈청에서 황화수소 농도 측정(C). * $p < 0.05$, 정상 식이 시 정상 마우스와 비교. # $p < 0.05$, 음식 시 정상 마우스와 비교.

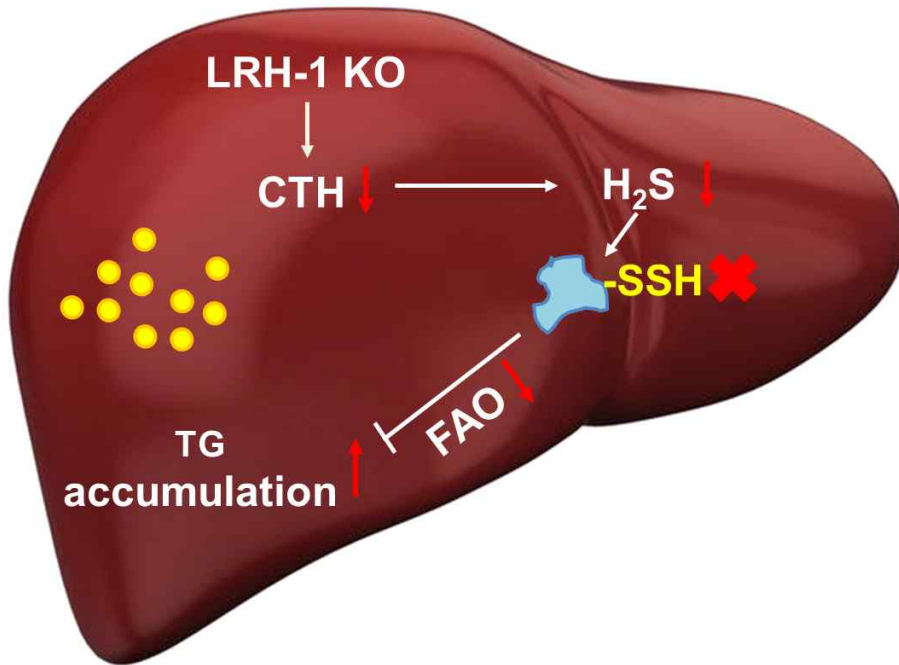


그림 13. LRH-1 결핍에 따른 지질 축적 과정 모식도. LRH-1이 결핍되면 CTH의 발현이 감소하고, 황화수소 생성이 감소함으로써 단백질의 시스테인 잔기에 sulfhydrylation이 일어나지 않아 지방산 산화가 억제되면서 간세포 내에서 지방산 베타 산화의 감소에 따르는 지방산 분해가 줄어들게 됨으로서 중성지방의 축적을 증가시킴.

4. 고찰

이번 연구에서는 간에서 LRH-1에 의한 CTH의 조절 기전을 규명하고 금식에 의한 황화수소 생성이 간의 중성지방 축적에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

간은 에너지 항상성과 관련하여 생리학적으로 중요한 역할을 하는 동시에 주요 해독 조직이기도 하다. 유해 물질, 약물, 환경 독소 및 내독소에 대한 항상성을 조절할 수 있고, 이와 관련하여 황화수소를 생성하고 제거하는 가장 중요한 조절기관으로 알려져 있다(23-25). 간에서 LRH-1은 PGC-1 α 의 조절을 통해 미토콘드리아 생성 및 지방산 산화에 관여하며, 지질 항상성에 중요한 역할을 한다. 하지만, LRH-1이 간에서 결핍되면 소포체 스트레스에 의해 유발된 지방간의 양상을 보여 중성지방 축적에 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있다(26-28). 이번 연구에서는 생리학적으로 빠른 지질축적을 유도하기 위해 정상 및 LRH-1의 간 특이적 결핍 마우스를 정상 식이, 24 시간 동안 금식을 실시하였다. 그 후 중성지방의 축적을 확인해 본 결과, 이전에 보고된 바(6)와 같이 금식에 의한 중성지방 축적이 야기되었고, LRH-1 결핍 마우스의 간에서 더욱 축적되는 것을 확인하였다. 하지만, 내재적 지질 생성 유전자들의 발현을 측정해 보았을 때 유전자들의 발현이 감소하는 것을 볼 수 있었고, 지질 축적의 원인이 내재적인 지질 생성이 아닌 다른 원인에 기인할 것임을 예상하였다(29). 또 다른 생리학적인 간 내 지질 축적의 원인으로 지방 조직으로부터 유입되어 축적된 지방산 산화의 감소를 예상하여, 지방산 산화와 관련한 유전자들의 발현을 측정하였다. 그 결과, 금식을 한 LRH-1 결핍 마우스의 간에서 지방산 산화와 관련한 유전자의 발현량이 감소된 것을 확인하였다. 그에 따라 마우스의 간세포 내 산소 소모량을 측정한 결과, 미토콘드리아의 기능 감소와 함께 지방산 산화작용이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 간 내 지질 축적이 지방산 산화에 기인한 것임을 알 수 있었고, 지방산 산화를 매개 할 수 있는 물질을 찾아보았다.

황화수소는 생체조직 내에서 세포 보호, 염증 및 세포사멸에 관여하며, 간

지질 및 포도당 대사, 산화 스트레스, 미토콘드리아 생합성 등의 작용을 통하여 간 섬유화, 간경화, 간 보호 및 간독성 조절 완화와 같은 과정에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(30-33). 황화수소는 CBS, CTH 및 MPST 세 가지 효소에 의해 생성되는 것으로 알려져 있고, CTH는 L-시스테인 및 호모시스테인을 기질로 하여 황화수소를 생성하는 효소이다(11-13,34,35). 위 결과에 따라 황화수소가 지방산 산화를 매개 할 것이라 추정되었고, LRH-1의 새로운 표적을 찾기 위해 황화수소 생성에 관여하는 세 가지 효소를 RNA-염기서열분석을 통해 확인해 보았다. 그 결과 CTH의 발현량이 금식 시 정상 마우스에서 증가하고, LRH-1이 결핍된 마우스에서 감소하는 반면, CBS와 MPST의 발현량에서는 차이가 없음을 확인하였다. 따라서 LRH-1의 새로운 타겟이 CTH일 것으로 판단하였다.

그러므로, LRH-1이 CTH 프로모터에 결합하였을 때 발현을 증가시키는지 확인하기 위해 HEK-293T 세포에 형질주입을 시켜 확인하였다. LRH-1 플라스미드 및 DLPC에 의해 CTH 프로모터 활성이 증가하는 것을 통해서 CTH가 LRH-1의 직접적인 표적임을 확인하였다.

마지막으로, LRH-1이 황화수소 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 CTH에 의해 황화수소가 생성될 때 만들어지는 시스테인의 농도를 측정하였다. 그 결과, 시스테인의 농도가 금식한 정상 마우스의 혈청에서 증가하였고, LRH-1 결핍 마우스에서는 감소하였다. 이는 CTH의 발현량과 같은 양상을 보였다. 이에 따라, LRH-1에 의해 CTH의 발현이 조절되면 시스테인의 농도가 조절되는 것을 알 수 있었고, 황화수소 생성에도 영향을 미칠 것이라 예상하였다. 이 결과를 바탕으로 마우스의 간 조직과 혈액에서 황화수소 함량을 측정해 보았을 때 금식을 한 정상 마우스에서 황화수소 생성이 증가하고, LRH-1 결핍 마우스에서 황화수소 생성이 감소하였다.

결론적으로 이번 연구는 LRH-1에 의해 CTH가 증가하면 황화수소를 증가시켜 표적 단백질의 sulfhydrylation을 유도하고 그에 따라 지방산 산화가 증가하므로 중성지방 축적이 억제되는 것을 규명하였다. 그러므로 LRH-1이 CTH의 발현을 조절하여 황화수소 생성을 조절함으로써 지방산 산화와 간내 지방축적 정도를 조절하는 것으로 생각된다.

5. 요약

지질 축적을 유도하기 위해 정상 마우스 및 LRH-1 결핍 마우스에 24 시간 금식을 시킨 결과, LRH-1 결핍 마우스에서 간 조직 내 지질 축적이 더욱 증가하였다. 지질 생성 유전자들의 발현이 감소하므로, 이러한 지질 축적이 지방산 산화와 관련이 있을 것으로 보고, 24 시간 금식한 마우스의 일차 간세포에서 세포 내 산소 소모량을 측정한 결과, 미토콘드리아의 기능이 감소하였고, 지방산 산화도 감소하였다. LRH-1 RNA-Seq 결과에서 CTH가 유의하게 증가하였고, CTH의 mRNA 발현 또한 증가되었다. LRH-1 ChIP-Seq 결과에서 CTH 프로모터에 LRH-1이 결합하는 것을 확인하였고, LRH-1이 CTH 프로모터에 결합하여 활성이 증가되는 것을 확인하였다. CTH가 황화수소 생성 효소이므로 간과 혈청에서 황화수소 생성을 확인하였을 때 LRH-1이 결핍되면 황화수소의 생성이 감소하였고, 혈액에서의 시스테인의 농도도 마찬가지로 감소하였다. 따라서 이 연구를 통해 LRH-1이 CTH를 매개로 한 황화수소 발현을 조절함으로써 지방산 산화를 증가시켜 간 내 지방 축적을 개선 할 수 있을 것이라는 것을 증명하였다.

참 고 문 헌

1. Kim SK: Effect of diabetes on dementia and Its preventive strategies. J Korean Diabetes 2012; 13(3): 140-4.
2. Fayard E, Auwerx J, Schoonjans K: LRH-1 an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. Trends Cell Biol 2004; 14(5): 250-60.
3. Schwaderer J, Phan TS, Glockner A et al.: Pharmacological LRH-1/Nr5a2 inhibition limits pro-inflammatory cytokine production in macrophages and associated experimental hepatitis. Cell Death Dis 2020; 11(2): 154-67.
4. Choi S, Dong B, Lin CJ et al.: Methyl-sensing nuclear receptor liver receptor homolog-1 regulates mitochondrial function in mouse hepatocytes. Hepatology 2020; 71(3): 1055-69.
5. Mamrosh JL, Lee JM, Wagner M et al.: Nuclear receptor LRH-1/NR5A2 is required and targetable for liver endoplasmic reticulum stress resolution. Elife 2014; 3: e01694.
6. Pantha R, Lee JH, Bae JH, Song DK, Im SS et al.: Perilipin 5 is a novel target of nuclear receptor LRH-1 to regulate hepatic triglycerides metabolism. BMB Rep 2021; 54(9): 476-81.
7. Keenan SN, Meex RC, Lo JCY et al.: Perilipin 5 deletion in hepatocytes remodels lipid metabolism and causes hepatic insulin resistance in mice. Diabetes 2019; 68(3): 543-55.
8. Kimmel AR, Sztalryd C: Perilipin 5, a lipid droplet protein adapted to

mitochondrial energy utilization. *Curr Opin Lipidol* 2014; 25(2): 110-7.

9. Khor VK, Shen WJ, Kraemer FB: Lipid droplet metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013; 16(6): 632-7.

10. Pol A, Gross SP, Parton RG: Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites. *J Cell Biol* 2014; 204(5): 635-46

11. Zhao K, Li H, Li S, Yang G: Regulation of cystathionine gamma-lyase/H(2)S system and its pathological implication. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2014; 19: 1355-69.

12. Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I: L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes* 2006; 55: 1391-7.

13. Thanki KK, Johnson P, Higgins EJ, Maskey M, Phillips C, Dash S et al.: Deletion of cystathionine-gamma-lyase in bone marrow-derived cells promotes colitis-associated carcinogenesis. *Redox Biol* 2022; 55: 102417.

14. Rui Wang: Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?. *The FASEB Journal* 2002; 16(13): 1792-8.

15. Rui Wang: Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev* 2012; 92(2): 791-896.

16. Asif K, Mustafa, Moataz M, Gadalla, Nikantha Sen, Rui Wang, Solomon H, Snyder et al.: H₂S Signals Through Protein S-Sulfhydration. *Sci Signal* 2009; 2(96): 72-81.

17. Panzhi Wang, Liming Wu: Hydrogen sulfide and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2018; 7(2): 122-4.
18. Lee JH, Im SS: Function of gaseous hydrogen sulfide in liver fibrosis. *BMB Rep* 2022; 55(10): 481-7.
19. Kimura H: The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide* 2014; 41: 4-10.
20. Wu D, Zheng N, Qi K, Cheng H, Sun Z, Gao B et al.: Exogenous hydrogen sulfide mitigates the fatty liver in obese mice through improving lipid metabolism and antioxidant potential. *Med Gas Res* 2015; 5: 1-9.
21. Li L, Salto-Tellez M, Tan CH, Whiteman M, Moore PK: GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 103-13.
22. Im SS, Hammond LE, Yousef L, Nugas-Selby C, Shin DJ, Seo YK et al.: Sterol regulatory element binding protein 1a regulates hepatic fatty acid partitioning by activating acetyl coenzyme A carboxylase 2. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 4864-72.
23. Grant DM: Detoxification pathways in the liver. *J Inherit Metab Dis* 1991; 14: 421-30.
24. Melaram R: Environmental Risk Factors Implicated in Liver Disease: A Mini-Review. *Front Public Health* 2021; 9: 683719.
25. Norris EJ, Culberson CR, Narasimhan S, Clemens MG: The liver as a central regulator of hydrogen sulfide. *Shock* 2011; 36: 242-50.

26. Choi S, Dong B, Lin CJ, Heo MJ, Kim KH, Sun Z et al.: Methyl-Sensing Nuclear Receptor Liver Receptor Homolog-1 Regulates Mitochondrial Function in Mouse Hepatocytes. *Hepatology* 2020; 71: 1055-69.
27. Miranda DA, Krause WC, Cazenave-Gassiot A, Suzawa M, Escusa H, Foo JC et al.: LRH-1 regulates hepatic lipid homeostasis and maintains arachidonoyl phospholipid pools critical for phospholipid diversity. *JCI Insight* 2018; 3(5): e96151.
28. Mamrosh JL, Lee JM, Wagner M, Stambrook PJ, Whitby RJ, Sifers RN et al.: Nuclear receptor LRH-1/NR5A2 is required and targetable for liver endoplasmic reticulum stress resolution. *Elife* 2014; 15(3): e01694.
29. Quiroga AD, Lehner R: Liver triacylglycerol lipases. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1821: 762-9.
30. Li L, Rose P, Moore PK: Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011; 51: 169-87.
31. Xiao Q, Ying J, Xiang L, Zhang C: The biologic effect of hydrogen sulfide and its function in various diseases. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97(44): e13065.
32. Wu DD, Wang DY, Li HM, Guo JC, Duan SF, Ji XY: Hydrogen Sulfide as a Novel Regulatory Factor in Liver Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019: 3831713.
33. Sun HJ, Wu ZY, Nie XW, Wang XY, Bian JS: Implications of hydrogen sulfide in liver pathophysiology: Mechanistic insights and therapeutic potential. *J Adv Res* 2021; 27: 127-35.

34. Ahmad A, Gero D, Olah G, Szabo C: Effect of endotoxemia in mice genetically deficient in cystathionine- γ -lyase, cystathionine- β -synthase or 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. *Int J Mol Med* 2016; 38: 1683-92.
35. Augsburg F, Szabo C: Potential role of the 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST)-hydrogen sulfide (H_2S) pathway in cancer cells. *Pharmacol Res* 2020; 154: 104083.

Regulatory Mechanism for Cystathionine γ -lyase

by Liver Receptor Homolog-1 in the Liver

Park, Soo-Young

Department of Physiology

Graduate School

Keimyung University

(Supervised by Professor Im, Seung-Soon)

(Abstract)

Liver receptor homolog-1 (LRH-1) is a widely expressed transcription factor belonging to the family of orphan nuclear receptors. It plays a crucial role in bile acid synthesis and cholesterol reverse transport in the liver and pancreas. Hydrogen sulfide involved in cell protection, inflammation, vascular function, nerve function and mitochondrial function, is generated through a reverse sulfur reaction catalyzed by enzymes like cystathionine γ -lyase (CTH), cystathionine β -synthase, and 3-mecaptopyruvate sulfur transferase. However, the regulatory mechanism governing CTH expression remains unknown. This study aimed to investigate how LHR-1 controls CTH expression and the impact of hydrogen sulfide on the hepatic

accumulation of neutral fat. CTH expression was significantly increased by 24-hour fasting in normal mice. To assess hydrogen sulfide activity, mice were measured for hydrogen sulfide production under non-fasting or 24-hour fasting conditions, and it was confirmed that hydrogen sulfide production was significantly reduced in LRH-1 LKO mice than in WT mice. In conclusion, this study supports the notion that CTH is a target gene for LRH-1 and that LRH-1 deficiency leads to reduced hydrogen sulfide production by downregulating CTH expression. This decrease in hydrogen sulfide production impairs fatty acid oxidation, resulting in the accelerated accumulation of triglycerides in the liver.

간에서 Liver receptor homolog-1에 의한 Cystathionine γ -lyase 조절 기전

박 수 영

계명대학교 대학원

의학과 생리학 전공

(지도교수 임 승 순)

(초록)

Liver receptor homolog-1(LRH-1)은 고아핵수용체 계열의 전사인자로 주로 간, 췌장 그리고 난소에서 많이 발현되고, 담즙산 합성과 콜레스테롤 역수송에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 간에서는 포도당, 담즙산 및 미토콘드리아 대사의 조절자로 알려져 있다. 황화수소는 가장 최근에 발견된 신경전달물질로 세포 보호, 염증, 혈관 기능, 신경 기능, 미토콘드리아 기능, 에너지대사 및 노화에서 중요한 역할을 한다. 황화수소는 cystein, cystathionine, homocysteine 경로의 효소 중 cystathionine γ -lyase(CTH), cystathionine β -synthase와 3-mecaptopyruvate sulfurtransferase에 의해 촉매되는 반응에서 역 황화 경로를 통하여 생성된다. CTH는 주로 간, 혈관계 및 췌장에서 발현된다고 알려져 있으며, 황화수소 생성에 크게 기여한다. 하지만 CTH의 발현조절 기전에 대해서는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 이 연구에서는 LRH-1에 의한 CTH의 발현조절 기전을 규명하고, 황화수소 생성이 간의 중성지방 축적에 미치는 영향을 밝히고자 하였다. 이전 RNA-seq 자

료를 바탕으로 CTH 프로모터에 LRH-1 결합이 가능한 유전자 염기서열이 있음을 발견하였다. 인간 간암 세포주 HEK-293T 세포에 LRH-1을 과발현 유도 후 활성물질인 DLPC를 처리하였을 때 CTH의 프로모터 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 그래서 CTH가 LRH-1의 표적 유전자임을 검증하기 위해 정상 및 간 특이적 LRH-1 결핍 마우스에 식이 또는 24 시간 금식 후 간 및 혈청을 분리하였다. 조직병리학적, mRNA 발현, 단백질 발현량을 분석한 결과, 선행연구에서 밝혀진 것과 같이 간 내 지질축적이 증가 되었고, CTH는 24시간 금식한 정상 마우스에서 발현이 증가하였으나, LRH-1이 결핍된 마우스에서는 증가하지 않았다. CTH가 황화수소 생성에 관여하는 효소이므로 황화수소의 활성을 정상 식이 또는 24 시간 금식한 마우스에서 각각 측정해 보았더니 금식한 정상 마우스에서만 황화수소의 생성이 증가하였고, LRH-1이 결핍된 마우스에서는 증가하지 않았다. 결론적으로 이 연구를 통하여 CTH가 LRH-1의 표적 유전자임을 규명하였으며, LRH-1 결핍에서 CTH 발현이 감소함으로써 황화수소의 생성이 감소하여 간 내 중성지방 축적이 가속화되는 기전을 규명하였다.