



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](#)

석 사 학 위 논 문

간에서 Liver Receptor Homolog-1에 의한 Aldehyde Dehydrogenase 1B1 조절 기전

계 명 대 학 교 대 학 원

의 학 과

서 민 회

지 도 교 수 임 승 순

2 0 2 4 년 8 월

간에서 Liver receptor homolog-1에 의한 Aldehyde dehydrogenase 1B1 조절 기전

서
민
회

2
0
2
4
년
8
월

간에서 Liver Receptor Homolog-1에 의한 Aldehyde Dehydrogenase 1B1 조절 기전

지도교수 임 승 순

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2 0 2 4 년 8 월

계 명 대 학 교 대 학 원

의학과 생리학 전공

서 민 희

서민회의 석사학위 논문을 인준함

주 심 배 재 훈

부 심 임 승 순

부 심 송 대 규

계 명 대 학 교 대 학 원

2 0 2 4 년 8 월

감 사 문

본 논문을 완성하는 동안 수많은 분들의 따뜻한 격려와 도움을 받았습니다. 이 자리를 빌려 제 마음 깊이 감사의 뜻을 전하고자 합니다.

가장 먼저, 항상 탁월한 지도와 진심 어린 가르침을 아낌없이 주신 지도교수님 임승순 교수님께 깊은 감사의 마음을 전합니다. 덕분에 연구자의 길을 걸어가는 첫 걸음에서 많은 성장을 할 수 있었습니다. 그리고 심사위원을 맡아 주신 배재훈 교수님, 송대규 교수님께 진심으로 감사드리며, 아울러 박재형 교수님께도 감사의 인사를 전합니다.

부족함이 많은 저에게 많은 도움을 주셨던 이재호, 이은호, 수라그나 무카르지 박사님, 장혜지, 박수영 선생님들 덕분에 저는 포기하지 않고 마지막까지 달려올 수 있었습니다. 여러 차례의 고비마다 실질적인 조언과 따뜻한 위로를 주신 것에 대해 진심으로 감사드립니다.

언제나 저의 든든한 버팀목이 되어주시며, 변함없는 사랑과 응원으로 저를 지지해 주신 부모님과 동생에게도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 항상 응원해준 선후배와 친구들 모두 감사합니다.

그 외 언제나 저에게 많은 도움을 주신 분들께 감사드리며, 이 논문을 바칩니다.

2024년 8월

서 민 희

목 차

1. 서 론	1
2. 재료 및 방법	3
3. 성 적	12
4. 고 찰	32
5. 요 약	35
참고문헌	36
Abstract	40
국문초록	42

표 목차

<표 1> 정량 중합효소 연쇄반응 마우스 프라이머 리스트.....	9
<표 2> 정량 중합효소 연쇄반응 인간 프라이머 리스트.....	11

그림 목차

<그림 1> 에탄올 함유 식이에 따른 체성분 변화.....	16
<그림 2> 에탄올 함유 식이에 따른 간 조직 내 지질 축적의 차이.....	17
<그림 3> 간 조직에서 중성지방과 콜레스테롤의 함량 측정.....	18
<그림 4> 혈청에서 중성지방, 콜레스테롤 및 유리지방산 함량 측정	19
<그림 5> 혈청에서 간 손상 표지 효소 측정	20
<그림 6> 혈청에서 아세트알데하이드의 함량 변화.....	21
<그림 7> 에탄올 대사 관련 유전자의 RNA-Sequencing 분석	22
<그림 8> 에탄올 함유 식이 시 LRH-1 ^{f/f} 및 LRH-1 ^{f/cre+} 마우스의 간에서 에탄올 관련 유전자의 발현 변화.....	23
<그림 9> 에탄올 함유 식이 시 LRH-1 ^{f/f} 및 LRH-1 ^{f/cre+} 마우스의 간에서 에탄올 관련 유전자의 단백질 발현.....	24
<그림 10> LRH-1 과발현에 의한 ALDH1B1 유전자 발현 유도	25
<그림 11> ALDH1B1 프로모터에서 LRH-1의 예상 결합부위.....	26

<그림 12> 간에서 지질 생합성 유전자의 발현 변화.....	27
<그림 13> 간에서 지방산 산화 유전자의 발현 변화.....	28
<그림 14> 에탄올 함유 식이에 따른 간 조직 내 대식세포 침윤 증가.....	29
<그림 15> 간 조직에서 대식세포 및 염증 관련 유전자의 발현 변화.....	30
<그림 16> LRH-1 결핍에 따른 알코올성 지방간 생성 과정 모식도.....	31

1. 서 론

간 수용체 동족체-1(liver receptor homolog-1, LRH-1)은 세포 주기 조절에서 분화, 발달, 대사 및 스테로이드 항상성 등의 생리학적 과정을 조절하는 고아 핵 수용체이다(1-3). LRH-1은 주로 장, 간 및 췌장 등 내배엽 기원 유래 조직에서 발현이 되며, 리간드 결합, 인산화, 수모화 등의 작용으로 타겟 유전자의 발현을 조절하는 전사인자이다(4). LRH-1은 간에서 높게 발현되며 콜레스테롤, 포도당 및 담즙산 대사에서 중요한 조절인자이다(2,5). 또한 간에서는 미토콘드리아 생합성 및 베타 산화작용을 통하여 지질 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이는 지방간 질환, 제2형 당뇨병 및 심혈관 질환과 같은 대사 질환 치료에 적용 가능한 표적임을 시사한다(6-7). LRH-1은 간에서 중성지방을 축적시키는 역할을 한다고 보고된 바 있다(8). 간에 중성지방이 과도하게 축적될 경우에 주로 지질 방울 내에 보관되며(9), 이는 지질 저장 및 이용의 균형 유지에 사용되는데(10), LRH-1이 지질 항상성 조절에 기여하는 지질 방울 관련 단백질의 변화를 야기할 수 있다는 추측이 가능하다(11-12). LRH-1과 상호작용할 수 있는 화합물로서 RJW100이 알려져 있으며, LRH-1을 활성화하는 강력한 작용제이다. RJW100은 헥사하이드로펜탈렌(hexahydropentalene)핵을 포함하는 2개의 광학이성질체의 라세믹 혼합물이며(13), LRH-1과 상호작용하여 small heterodimer partner(SHP)의 활성 증가를 유도하여 담즙산 합성 및 포도당 대사와 같은 다양한 대사 과정을 조절한다(14). 이처럼 RJW100은 LRH-1의 리간드로서 생물학적 효과를 유발하고, 이를 통해 대사, 염증 및 세포 증식과 관련된 생리적 과정을 조절한다고 알려져 있다(14-15).

간 내 에탄올 대사는 미토콘드리아에서 다양한 효소의 활성으로 일어난다. 그 중 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenases, ALDHs)가 제대로 작용하지 않게 되면 아세트알데하이드(acetaldehyde)에서 아세트이트(acetate)로 전환되는 반응의 활성이 떨어져 체내 독성물질인 아세트알

데하이드가 축적된다(16-17). 간 세포 내 지속된 아세트알데하이드의 축적은 지방간, 간경변으로 이어질 수 있으며, 더 나아가 간암까지 진행될 수 있다(18-20).

알데하이드 탈수소효소 1B1(aldehyde dehydrogenase 1B1, ALDH1B1)은 아세트알데하이드를 효율적으로 산화시키는 에탄올 대사 관련 효소이며, 이전에는 ALDHX 또는 ALDH5로 알려졌다(21-22). 주로 간, 소장 및 고환에서 풍부하게 발현되며, 췌장 및 대장을 포함한 다른 조직에서도 발현이 된다. ALDH1B1은 에탄올 대사에서 알데하이드 탈수소효소 2(aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2) 다음으로 효율적인 효소라고 알려져 있으며(23), ALDH1B1이 결핍되었을 때 포도당 항상성에 문제가 생기거나 혈액 내 아세트알데하이드 분해 능력이 감소한다고 보고된 바 있어서 대사적으로 중요한 효소로 인식되고 있다(24). 그러나 아직까지 LRH-1에 의한 ALDH1B1의 발현조절 기전에 대한 연구가 알려진 바 없으며, LRH-1이 에탄올 대사에 미치는 영향에 대한 연구 또한 부족한 실정이다.

따라서 이 연구에서는 LRH-1에 의해 조절되는 ALDH1B1 발현 기전을 규명하고 이로 인한 에탄올 대사의 변화가 간 대사 기능에 미치는 영향을 밝히고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2. 1. 알코올성 간질환 동물 모델:

몸무게 23 g 이상이 되는 생후 10 주령의 LRH-1^{f/f} 및 LRH-1^{f/cre+} C57BL6/J 마우스를 각각 7 마리 씩 3 주간 Lieber-Decarli 액체 식이 (Bio-Serv, Flemington, NJ, USA)를 이용하여, 표준 식이와 에탄올 함유식으로 나누어 매일 공급하였으며, 마우스의 무게 및 체성분을 매주 1 회 측정하였다. 모든 동물실험은 계명대학교 의과대학 실험동물 윤리위원회의 승인을 통해 수행되었다(KM-2024-03).

2. 2. 체성분 분석:

마우스의 체성분 변화를 보기 위해 매주 1회 소동물 체성분 분석기 Minispec LF50(Bruker, Billerica, MA, USA)을 이용하여 체성분을 측정하였다.

2. 3. 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. 탈파라핀화 시키기 위해 자일렌으로 5 분간 3 회 담근 후, 100%, 95% 및 90% 에탄올에서 각각 2 분간 흡수 과정을 거쳤다. Mayer의 헤마톡실린 용액(H&E, BBC Biochemical, Mount Vernon, WA, USA)으로 4 분간 염색한 후, 온수로 2 분간 세척한다. 95% 에탄올로 살짝 흘려준 후 에오신 Y 용액(H&E, BBC Biochemical)으로 7 초간 반응하였다. 물로 세척한 후, 90%, 95% 및 100%

에탄올 및 자일렌으로 탈수화 과정을 거쳐 봉입제와 커버 슬라이드로 고정시켰다.

2. 4. 중성지방 및 콜레스테롤 측정:

간 조직 내 지질 축적을 확인하기 위해 식이를 진행한 마우스로부터 간 조직 50 mg을 취하여 chloroform(CHCl_3)과 methanol(MeOH)을 2:1로 혼합한 용액에 넣고 균질화하여 질소가스로 건조하였다. 1:1 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 과 50 mM lithium chloride(LiCl)을 추가하여 혼합하고 실온에서 $500 \times g$ 로 원심 분리하였다. CHCl_3 층인 분리된 하층을 채취하여 수집한 CHCl_3 층 용액을 모아 질소가스로 건조하였다. 건조된 시료에 1:1 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 과 10 mM LiCl 을 추가하고 재현탁 후 원심분리를 하여 하층을 채취하고 다시 위의 과정을 순차적으로 2회 정도 반복하여 건조된 시료를 채취하였다. 건조한 시료에 CHCl_3 을 넣고 혼합하여 정량화하였다. 마지막으로, 중성지방과 총 콜레스테롤 키트를 Infinite 200 PRO(Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland)에 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정한 후, 중성지방과 콜레스테롤 함량을 분석하였다(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. 5. 혈청 내 유리지방산 및 아세트알데하이드 측정

표준 식이 및 에탄올 함유 식이를 진행한 $\text{LRH-1}^{\text{f/f}}$ 및 $\text{LRH-1}^{\text{f/cre+}}$ 마우스로부터 채취한 혈액을 4°C 에서 $900 \times g$ 으로 15 분 동안 원심분리를 하여 혈청을 분리하였다. 그 후 유리지방산(non-esterified fatty acid, NEFA)과 아세트알데하이드의 활성도는 NEFA 측정 키트(LabAssayTM NEFA, Fujifilm, Osaka, Japan) 및 아세트알데하이드 측정 키트(Acetaldehyde, R-Biopharm

AG, Darmstadt, Germany)를 사용하여 각 550 nm, 340 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

2. 6. 혈청 내 간 기능 관련 효소 측정:

채취된 혈액은 4 °C에서 $900 \times g$ 으로 15 분 동안 원심분리 후 분리된 혈청으로 알라닌 아미노전이효소(alanine amino transferase, ALT) 및 아스파르테이트 아미노전이효소(aspartate amino transferase, AST) 활성도는 ALT(아산셋트 지피티 측정용 시약, 아산제약, 경기도 화성시, 대한민국) 및 AST(아산셋트 지오티 측정용 시약, 아산제약, 경기도 화성시, 대한민국) 측정 키트와 Infinite 200 PRO를 사용하여 505 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2. 7. 실시간 정량 중합효소 연쇄반응 분석:

표준 식이 및 에탄올 함유 식이를 한 LRH-1^{f/f} 및 LRH-1^{f/cre+} 마우스의 간 조직을 조직 분쇄기, steel beads를 이용해 균질화하였다. 균질화한 용액은 원심 분리하여 TriZol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 추출하였다. 그 중 1 µg의 RNA를 iScript cDNA 합성키트(Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 상보적 DNA(cDNA)로 제작하였고, cDNA에 프라이머와 iQ SYBR green supermix(Bio-rad)를 혼합하여 CFX96TM (real time system, Bio-rad)으로 실시간 정량 중합효소 연쇄반응을 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 회로 증폭하였다. 다음으로 55 °C에서 5 분 후, 5 초마다 0.5 °C씩 증가하여 최종적으로 95 °C까지 증가시켜 melting curve를 그린 후, 결과값은 L32 프라이머를 사용하여 delta-delta 임계값 계산 방법으로 표준화하여 나타내었다.

2. 8. Western Blot 분석:

10 주령의 LRH-1^{f/f} 및 LRH-1^{f/cre+} 마우스에 표준 식이 및 에탄올 함유 식이를 한 후 간 조직을 분리하여 조직 용해 완충제(T-PERTM tissue protein extraction reagent, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 시료를 분리하였다. 시료의 단백질은 bicinchoninic acid 단백질 정량 키트(BCA, Thermo Scientific)를 사용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였으며, 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel에서 단백질을 분리하였고, 0.2 μ m nitrocellulose membrane(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)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 유지시켰다. 그 후 3% bovine serum albumin(BSA, VWR, Avantor, PA, USA)/TBST에 ALDH1B1 1차 항체(PA5-28554, Invitrogen, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), ALDH2 1차 항체(ab133306, Abcam), β -ACTIN 1차 항체(A5441, Sigma-Aldrich)를 사용하여 16 시간 동안 4 °C에서 반응시켰다. 2차 항체로는 anti-mouse 또는 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase/TBST(Santa cruz, Paso Robles, CA, USA)로 1 시간 반응시킨 후, clarity western ECL substrate(Bio-rad) 용액을 가하여 발색시켜 단백질 발현을 확인하였다.

2. 9. 세포배양 및 플라스미드 형질 주입:

인간 유래 간세포 암종인 hepatic carcinoma cancer(HepG2) 세포는 10% 태아 소 혈청(fetal bovine serum, FBS, Hyclone, Logan, UT, USA), 1 \times penicillin-streptomycin(P/S, Gibco, Carlsbad, CA, USA)를 포함한 dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, Hyclone) 배지를 이용하여 37 °C, 5% CO₂ 배양 조건에서 배양하였다.

HepG2 세포를 6-well 배양접시에 well 당 5 \times 10⁵개로 배양했다. 세포에 Lipofectamine[®]2000(Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 이용하여 pcDNA 3.1(200 ng), pcLRH-1(200 ng) 발현 플라스미드를 형질주입 시켰다. 형질주입

24 시간 후, 세포에 DMSO 및 10 μ M RJW100를 첨가한 다음, 다시 24 시간 배양하였다. 그 후, 세포들을 수거하여 mRNA 발현량을 측정하였다.

2. 10. RNA-Sequencing 자료 분석:

Data bank(PRJNA743542)에 있는 데이터를 활용하여 분석하였다. Sequence read archive(SRA) groups-RNA-seq 데이터를 분석하기 위해 대조군용 샘플 3 개와 간에서 유도된 에탄올용 샘플 3 개가 사용되었다. 데이터를 다운로드한 후 fast quality check(FastQC) 및 multiple quality check(MultiQC) 도구를 사용하여 품질 분석을 위해 판독값을 확인했다. Salmon 도구를 사용하여 정렬을 하였으며, differential expression analysis of sequence data 2(DeSeq2) 소프트웨어를 이용하여 R integrated development environment(R-Studio)에서 유전자 발현의 차이를 분석하였다.

2. 11. LRH-1의 전장유전체 ChIP-Sequencing 자료 분석:

미국 캘리포니아 대학교 Santa Cruz(UCSC) 게놈 브라우저를 이용하여 마우스 전장유전체 LRH-1 ChIP-Sequencing 자료를 분석하였으며, ALDH1B1의 프로모터에서 LRH-1의 결합 부위를 확인하였다.

2. 12. 면역조직화학법:

헤마톡실린-에오신 염색법과 마찬가지로 간 조직을 함수 과정까지 동일한 방법으로 처리한 후, pH 6.0의 10 mM 시트르산 버퍼에서 3 분간 극초단파로 열을 가한 다음 20 분간 실온에 둔 후, PBS로 5 분간 3 회 세척하였다. 내인성 과산화효소(oxidase)를 억제하고자 peroxidase 차단제에 8 분간 두었으며, 그 후 PBS로 5 분간 3 회 세척하였다. 불특정한 배경 염색을 최

소화하기 위해 실온에서 단백질 차단제(Dako, Glostrup, Denmark)에 8 분간 반응시킨 후 배액시켰다. 마우스 F4/80 항체를 1차 항체로 사용하였으며, 실온에서 1 시간동안 반응시켰다. 그 후 2차 항체를 실온에서 30 분간 반응한 후, PBS로 5 분간 3 회 세척하였다. 90%, 95% 및 100% 에탄올과 100% 자일렌에서 각각 탈수 과정을 거친 다음, 마운트 용액과 커버 슬라이드로 고정시켰다.

2. 13. 통계 분석

본 연구에서 얻은 결과는 GraphPad Prism 10.2.3(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 통해 각각의 자료에서 평균과 표준 오차를 표시하였다. 유의성은 Student's t -test로 검증하였으며, p 값이 0.05 이하에서 유의하다고 판단하였다.

<표 1> 정량 중합효소 연쇄반응 마우스 프라이머 리스트

프라이머		염기서열(5'→3')
Mouse		
<i>L32</i>	sense	ACATTTGCCCTGAATGTGGT
	antisense	ATCCTCTTGCCCTGATCCTT
<i>Lrh-1</i>	sense	GAACTGTCCAAAACCAAAAAAGG
	antisense	CGTTTTCTCTGCGTTTTGTCA
<i>Aldh1b1</i>	sense	CTCCAGGGCAGGACTACCTC
	antisense	CATGCCACTCGTTGTTGATGA
<i>Adh1</i>	sense	GTGACTTGTGTGAAACCAGGT
	antisense	GCTACAAAAGTTGCTTTCCGGG
<i>Aldh2</i>	sense	GACGCCGTCAGCAGGAAAA
	antisense	CGCCAATCGGTACAACAGC
<i>Aldh1a1</i>	sense	GGAATACCGTG GTTGTCAAGCC
	antisense	CCAGGGACAATGTTTACCACGC
<i>Srebp-1c</i>	sense	GGAGCCATGGATTGCACATT
	antisense	GCTTCCAGAGAGGAGGCCAG
<i>Fasn</i>	sense	AGCTTCGGCTGCTGTTGGAAGT
	antisense	TCGGATGCCTCTGAACCACTCACA
<i>Acc1</i>	sense	TGACAGACTGATCGCAGAGAAAG
	antisense	TGGAGAGCCCCACACACA
<i>Scd1</i>	sense	CCGGAGACCCCTTAGATCGA
	antisense	TAGCCTGTAAAAGATTTCTGCAAACC
<i>Ppara</i>	sense	AGAGCCCCATCTGTCTCTCTC
	antisense	ACTGGTAGTCTGCAAAACCAAA
<i>Cpt-1α</i>	sense	CTCCGCCTGAGCCATGAAG
	antisense	CACCAGTGATGATGCCATTCT
<i>Mcp-1</i>	sense	ACTGAAGCCAGCTCTCTCTTCC
	antisense	TTCTTCTTGGGGTCAGCACAG
<i>Il-6</i>	sense	GTGACGTTGACATCCGTAAAGA
	antisense	GCCGGA CT CATCGTACTCC
<i>Il-1β</i>	sense	CCGTGGACCTTCCAGGATGA
	antisense	GGGAACGTCACACACCAGCA

L32: ribosomal protein; *Lrh-1*: liver receptor homolog-1; *Aldh1b1*: aldehyde dehydrogenase1b1; *Adhl*: alcohol dehydrogenase1; *Aldh1a1*: aldehyde dehydrogenase1a1; *Srebp-1c*: sterol regulatory element-binding protein-1c; *Fasn*: fatty acid synthase; *Acc1*: acetyl-CoA carboxylase 1; *Scd1*: stearoyl-CoA desaturase 1; *Ppara* α : peroxisome proliferator activated receptor α ; *Cpt-1a*: carnitine palmitoyltransferase 1 α ; *Mcp-1*: monocyte chemoattractant protein-1; *Il-6*: interleukin-6; *Il-1 β* : interleukin-1 β .

<표 2> 정량 중합효소 연쇄반응 인간 프라이머 리스트

프라이머		염기서열(5'→3')
Human		
<i>RPLP0</i>	sense	GTGCTGATGGGCAAGAAC
	antisense	AGGTCCTCCTTGGTGAAC
<i>LRH-1</i>	sense	CTTTGTCCCGTGTGTGGAGAT
	antisense	GTCGGCCCTTACAGCTTCTA
<i>CYP7A1</i>	sense	GAGAAGGCAAACGGGTGAAC
	antisense	GGATTGGCAAATTGCAGA
<i>ALDH1B1</i>	sense	CCCATTCTGAACCCAGACATC
	antisense	AATGACCTCCCCGGTGGTA

RPLP0 : ribosomal protein lateral stalk subunit P0; *LRH-1*: liver receptor homolog-1; *CYP7A1*: cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1; *ALDH1B1* : aldehyde dehydrogenase 1b1.

3. 성 적

3. 1. LRH-1의 결핍에 의한 알코올성 간질환의 형태적 분석:

알코올성 간질환 마우스 모델을 생성하기 위해 3 주간의 표준 식이 및 에탄올 함유 식이를 진행하였으며(그림 1A), 이 마우스로부터 체성분을 비교해 보았다(그림 1B-E). 5일 간의 액체 식이 및 에탄올 함유 식이의 적응기간을 거치며, 1 주차부터 5% 에탄올을 급여시켰다. 5% 에탄올을 급여한 1 주후 측정 시 에탄올 함유 식이 그룹의 식이 섭취량이 감소하였다. 오직 에탄올의 영향만을 확인하기 위해 C57BL6/J마우스가 에탄올 함유 식이를 잘 섭취하지 않는 특성을 고려하여 표준 식이량을 제한적으로 조절하였다.

마우스의 간에서 지방간 생성 유무를 확인하기 위해 에탄올 함유 식이를 한 마우스로부터 간 조직을 분리한 후 조직학적 형태와 간 무게, 중성지방 및 콜레스테롤 함량의 차이를 비교하였다(그림 2, 3). 먼저 간 조직에 헤마톡실린-에오신 염색을 진행하여 조직학적 형태를 비교한 결과, 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{f/f} 마우스에 비해 LRH-1^{f/cre+} 마우스에서 지질 축적이 더 증가하였음을 확인하였다(그림 2). 또한 마우스의 간 조직에서 간 무게, 중성지방 및 콜레스테롤 수치를 측정해 본 결과, 에탄올 함유 식이를 한 LRH-1^{f/cre+} 마우스에서 수치가 더 증가되어 있는 것을 확인하였다(그림 3A-C).

반면 혈액 내 중성지방은 그룹 간의 차이가 없으며, 혈액 내 총 콜레스테롤 함량은 에탄올 함유 식이를 한 LRH-1^{f/cre+} 마우스에서 감소하였다(그림 4A-B), 유리지방산은 LRH-1^{f/f} 마우스에서 표준 식이 그룹과 비교하여 에탄올 함유 식이 그룹에서 증가하였다(그림 4C).

3. 2. LRH-1 결핍에 의한 아세트알데하이드 축적:

ALT는 간세포의 괴사 및 파괴에 의해 혈청으로 유출되는 효소이며, AST는 세포의 파괴에 의해 혈청으로 유출되어 근육세포, 간세포 및 적혈구의 괴사와 파괴 정도를 반영하는 효소이다. 에탄올 함유 식이에 의한 간 기능의 변화를 확인한 결과, 표준 식이보다 에탄올 함유 식이를 섭취한 LRH-1^{f/f} 마우스가 ALT와 AST가 모두 활성화 되었고, LRH-1^{f/cre+} 마우스에서 수치가 더 증가되었다(그림 5A-B).

에탄올 함유 식이를 섭취한 LRH-1^{f/f} 및 LRH-1^{f/cre+} 마우스로부터 채취한 혈액에서 혈청을 분리하여 독성물질인 아세트알데하이드 함량을 살펴본 결과, 에탄올 함유 식이를 섭취한 LRH-1^{f/cre+} 마우스에서 LRH-1^{f/f} 마우스보다 아세트알데하이드 수치가 유의하게($p < 0.001$) 증가된 것을 확인하였다(그림 6).

3. 3. 에탄올 대사 관련 유전자의 RNA-Sequencing 분석:

분석을 위한 미가공 데이터를 이용하여 샘플의 분포를 보기 위해 주성분 분석(principal component analysis, PCA)을 통해 표본 분포를 확인하였다(그림 7A). 대조군과 에탄올군 각각 3 개의 샘플이 사용되었다(그림 7B). 에탄올 대사에 관여하는 유전자에서 ALDH1B1이 유의성을 보였으며, 반면 LRH-1은 대조군과 에탄올군 사이에 유의미한 차이를 보이지 않았다(그림 7C). 이어서 지방산 대사에 유의하게 관여하는 유전자의 히트맵에서 LRH-1이 있음을 확인하였다(그림 7D). volcano plot을 통해서 유의하게 발현된 유전자로 ALDH1B1을 검증하였다(그림 7E), 대조군과 에탄올군 샘플이 주로 어떠한 생물학적 과정에 관련이 있는 지 알아보기 위해 enrichment bubble plot으로 나타낸 결과, 특히 스테로이드 및 지방산 대사와 관련된 유전자의 수가 많다는 사실을 확인하였다(그림 7F). gene ontology 자료 및 질병 유전자 네트워크(disease genes network, DisGenNet)을 이용하여 gene enrichment analysis plot을 통해 에탄올군에서 지방간 질환 유전자의 관련도가 높다는 것을 확인하였다(그림 7G).

3. 4. LRH-1 결핍에 의한 ALDH1B1 발현 감소:

RNA-Sequencing 결과를 바탕으로, LRH-1^{f/f} 및 LRH-1^{f/cre+} 마우스의 간 조직에서 RNA를 추출하여 에탄올 대사에 관여하는 유전자의 발현을 확인하였다(그림 8A-E). 먼저 *Lrh-1*의 유전자 발현 확인을 통해 간 특이적 LRH-1 결핍이 잘 이루어진 것을 확인하였고(그림 8A), 대표적인 에탄올 대사 관련 인자 4 가지 중 *Aldh1b1*의 발현만 LRH-1^{f/cre+} 마우스에서 유의하게 감소하였다(그림 8B). 반면 *Adh1*과 *Aldh1a1*은 LRH-1^{f/cre+} 마우스에서 발현이 증가하였고(그림 8C, E), *Aldh2*는 차이가 없었다(그림 8D).

간 조직에서 단백질을 추출하여 단백질 발현을 측정한 결과에서도 LRH-1^{f/cre+} 마우스에서 ALDH1B1의 발현량이 감소한 것을 확인하였고, ALDH2는 차이가 없었다(그림 9A). 단백질의 양을 수치화하여 그래프로 나타내었을 때도 같은 양상임을 확인하였다(그림 9B, C). 이를 통해 ALDH1B1이 LRH-1에 의해 조절된다는 것을 예상해 볼 수 있다.

3. 5. LRH-1 과발현에 의한 ALDH1B1 유전자 발현 조절:

ALDH1B1가 LRH-1에 의해 조절되는지 확인하기 위해 인간 유래 간세포 암종인 HepG2 세포에 LRH-1 과발현을 유도한 다음, LRH-1의 활성제인 10 μ M RJW100을 24 시간 처리한 후 *ALDH1B1* 유전자 발현을 확인하였다(그림 10A-C). 그 결과, LRH-1 과발현 세포에서 LRH-1의 발현이 4,000 배 정도 증가하였고(그림 10A), 양성 대조군으로 알려진 *CYP7A1*의 유전자 발현이 2 배 정도 증가하였으며(그림 10B), *ALDH1B1*의 유전자 발현은 1.5배 이상 증가하였다(그림 10C). 이는 ALDH1B1이 LRH-1에 의해 조절될 수 있음을 나타낸다.

3. 6. ALDH1B1 프로모터 내 LRH-1 결합 부위 확인:

LRH-1의 새로운 표적 유전자를 밝혀내기 위해 기존에 알려진 마우스 LRH-1 전장유전체 ChIP-Sequencing 자료를 통해 분석한 결과, ALDH1B1 프로모터 영역에서 LRH-1 결합 부위 피크를 확인하였다(그림 11A). 실제로 ALDH1B1 프로모터에서 LRH-1 결합 염기서열인 AGGTCA를 분석해 본 결과, 결합하는 3개의 부분이 있음을 확인하였다(그림 11B).

3. 7. 간에서의 지질 생합성 및 지방산 산화 유전자 발현 감소:

지질 생합성 유전자인 *Srebp-1c*의 발현을 확인해본 결과에 의해 발현이 증가되지 않았다(그림 12A). *Srebp-1c*의 표적 유전자로 알려진 *Fasn*, *Acc1* 및 *Scd-1*의 발현이 감소되는 것으로 보아(그림 12B-D), 에탄올 함유 식이를 진행한 LRH-1 결핍 간 조직에서의 지질 축적은 지질 생합성 유전자의 조절 기전이 아닌 다른 경로로 축적될 수 있음을 알 수 있었다.

또한 지방산 산화 유전자인 *Ppara*, *Cpt-1α*의 발현을 측정해본 결과, 에탄올 함유 식이 시 발현이 감소하는 것을 확인하였다(그림 13A-B).

3. 8. LRH-1 결핍에 의한 간 조직 내 대식세포 침윤 증가:

마우스의 간 조직에서 대식세포 침윤 정도를 확인하기 위해 F4/80 항체를 이용하여 간세포를 염색한 후 비교해보았다. 에탄올 함유 식이를 진행한 LRH-1^{f/cre+} 마우스의 간 조직에서 대식세포의 침윤이 LRH-1^{f/f}에 비해 더 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다(그림 14). 지방간 생성 시 증가되는 대식세포 지표 유전자인 *Mcp-1*의 경우 LRH-1이 결핍된 간 조직에서 확연히 증가된 것을 볼 수 있었고(그림 15A), 염증반응에 의해 증가되는 지표 유전자인 *Il-6*와 *Il-1β* 또한 LRH-1^{f/cre+} 마우스에서 증가되었다(그림 15B-C).

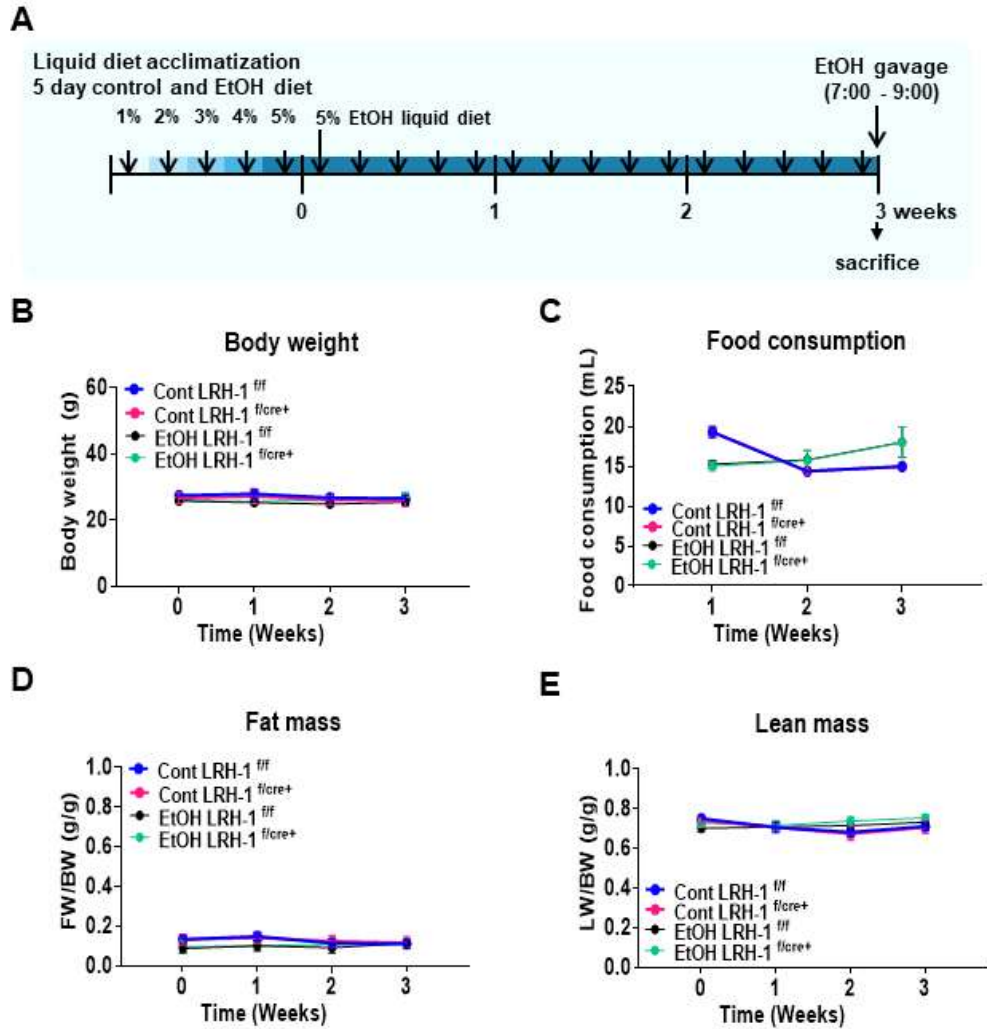


그림 1. 에탄올 함유 식이에 따른 체성분 변화. 식이 계획표(A)대로 에탄올을 투여한 식이 진행으로 유도된 알콜성 간질환 모델을 이용하여 체중(B), 식이 섭취량(C), 지방량(D) 및 체지방량(E)을 정량적으로 분석함. Cont: control diet; EtOH: ethanol diet; LRH-1^{fl/fl}: LRH-1 flox/flox; LRH-1^{fl/cre+}: liver specific LRH-1 knockout.

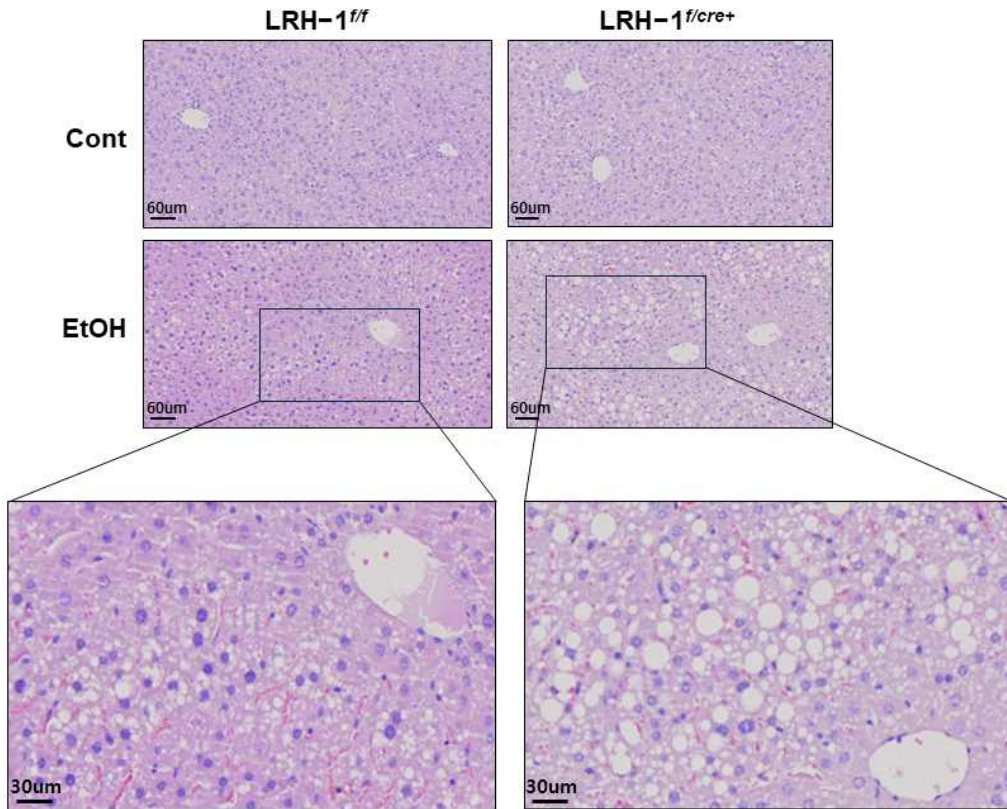


그림 2. 에탄올 함유 식이에 따른 간 조직 내 지질 축적의 차이. 마우스의 간 조직을 분리하여 헤마톡실린-에오신 염색함(scale bar = 30 μm 또는 60 μm).

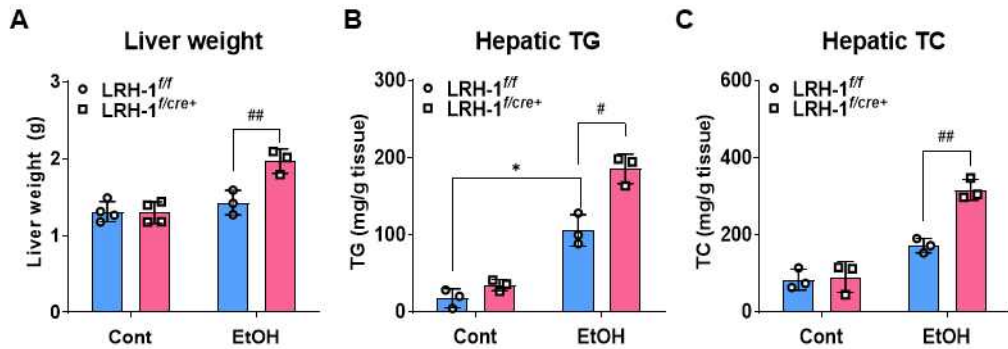


그림 3. 간 조직에서 중성지방과 콜레스테롤의 함량 측정. 간 조직의 무게(A), 중성지방(B) 및 콜레스테롤(C)을 정량적으로 분석함. TG: triglyceride; TC: total cholesterol; * p < 0.05, 표준식이 및 에탄올 함유식이 시 LRH-1^{f/f} 마우스의 비교. # p < 0.05, ## p < 0.01, 에탄올 함유식이 시 LRH-1^{f/f} 및 LRH-1^{f/cre+} 마우스의 비교.

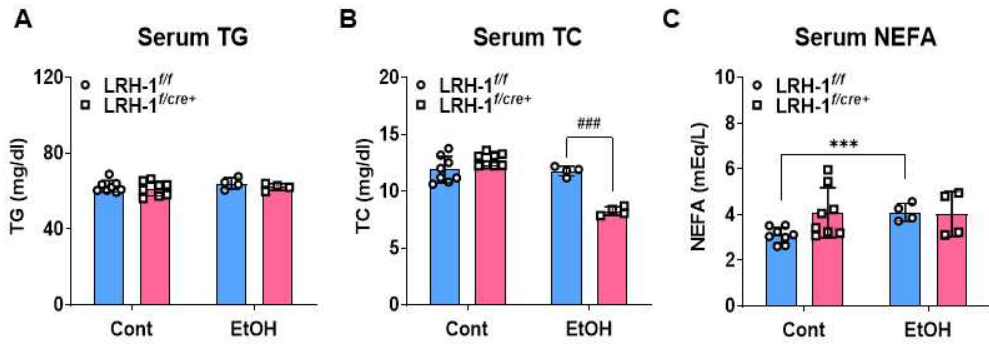


그림 4. 혈청에서 중성지방, 콜레스테롤 및 유리지방산 함량 측정. 혈청 내 중성지방(A), 콜레스테롤(B) 및 유리지방산(C) 함량을 정량적으로 분석함. TG: triglyceride; TC: total cholesterol; NEFA: non-esterified fatty acid. *** $p < 0.001$, 표준 식이 및 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{f/f} 마우스의 비교. ### $p < 0.001$, 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{f/f} 및 LRH-1^{f/cre+} 마우스의 비교.

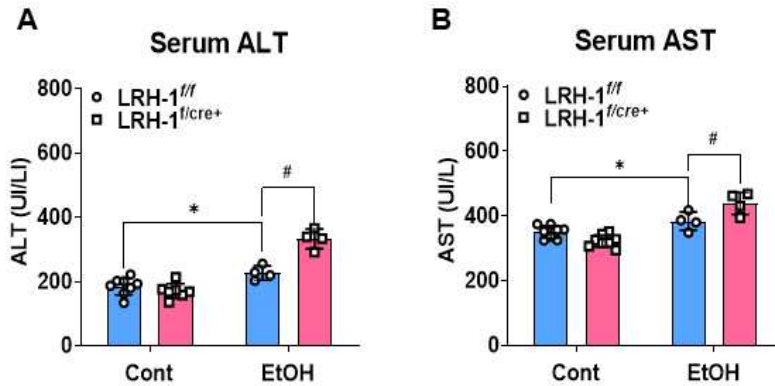


그림 5. 혈청에서 간 손상 표지 효소 측정. 표준 식이 및 에탄올 함유 식이를 3 주간 진행한 마우스에서 혈액을 채취한 뒤, 혈청을 분리하여 혈액 내 손상된 간세포 표지인 알라닌 아미노전이효소(A)와 아스파르트산 아미노전이효소(B)를 효소결합 면역흡착법을 통해 측정함. ALT: alanine amino transferase; AST: aspartate amino transferase. * $p < 0.05$, 표준 식이 및 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{fl/f} 마우스의 비교. # $p < 0.05$, 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{fl/f} 및 LRH-1^{fl/cre+} 마우스의 비교.

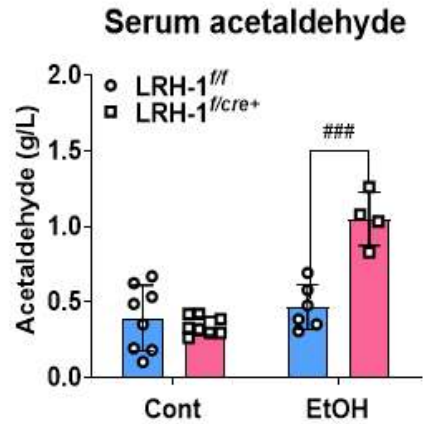


그림 6. 혈청에서 아세트알데하이드의 함량 변화. 표준 식이 및 에탄올 함유 식이를 3 주간 진행한 마우스의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 뒤 아세트알데하이드의 함량을 측정함. ### $p < 0.001$, 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{f/f} 및 LRH-1^{f/cre+} 마우스의 비교.

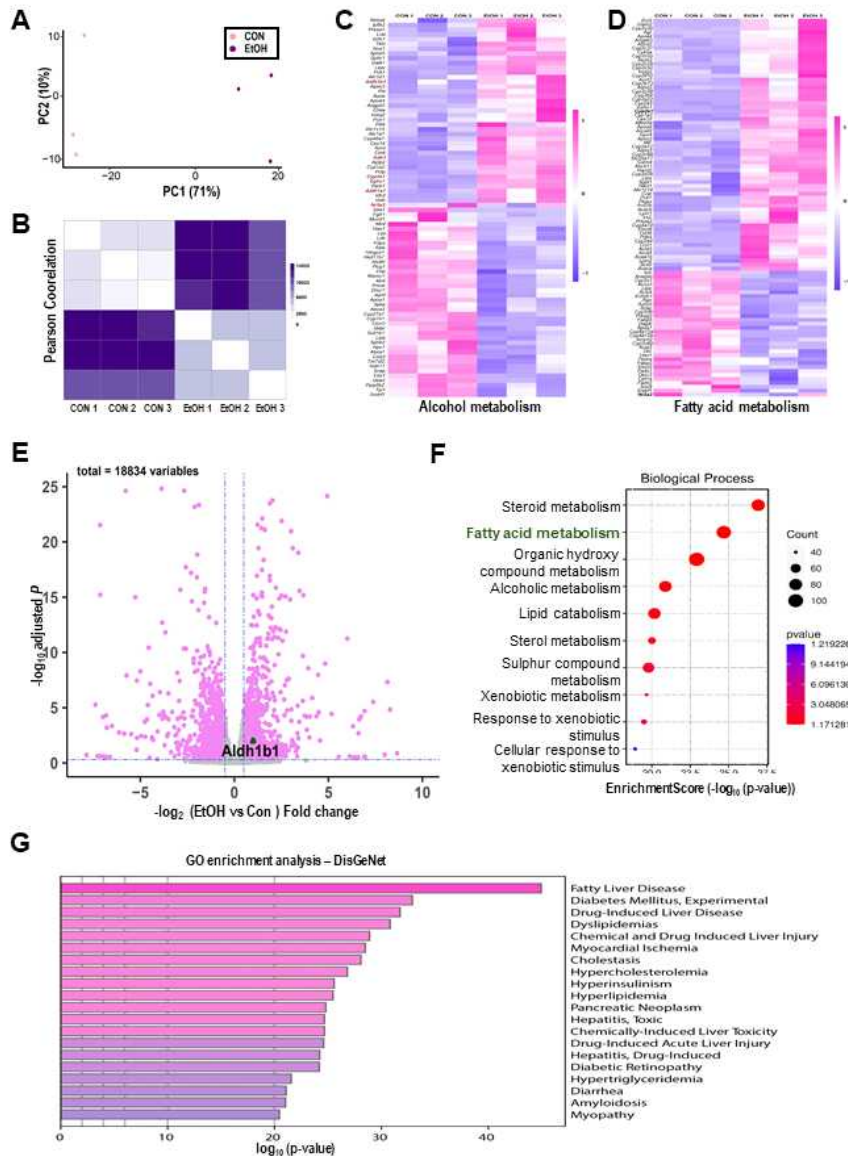


그림 7. 에탄올 대사 관련 유전자의 RNA-Sequencing 분석. 대조군 및 에탄올군 샘플을 이용하여 주성분 분석(A), pearson correlation plot(B), 에탄올을 대사 관련 유전자의 히트맵(C), 지방산 대사 관련 유전자의 히트맵(D), volcano plot(E), enrichment bubble plot(F), gene enrichment analysis plot(G)을 나타냄.

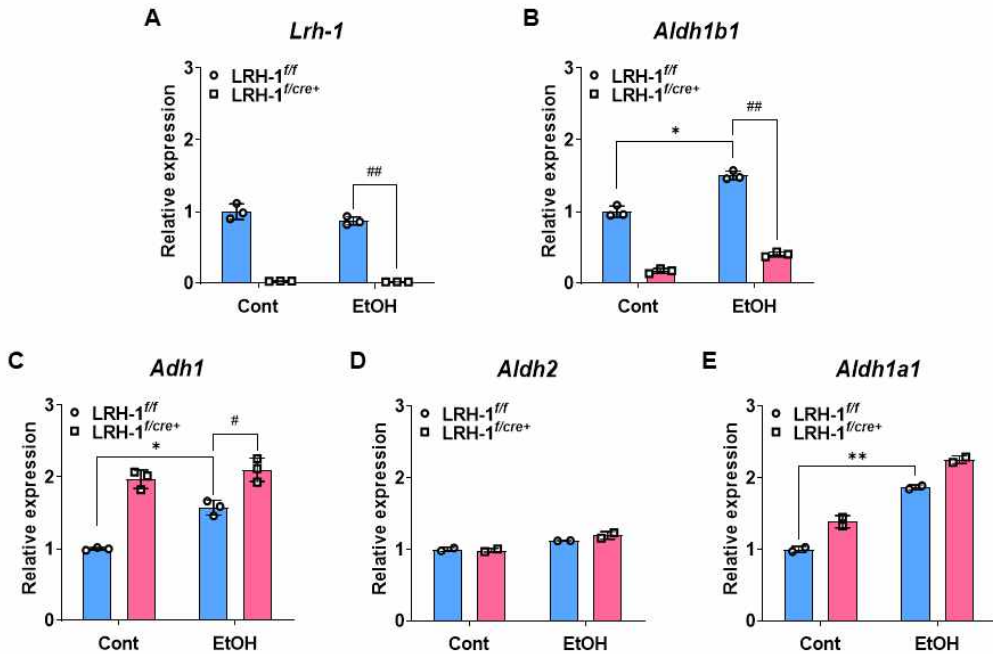


그림 8. 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{fl/fl} 및 LRH-1^{fl/cre+} 마우스의 간에서 에탄올 관련 유전자의 발현 변화. 표준 식이 및 에탄올 함유 식이를 섭취한 마우스의 간에서 실시간 정량 중합효소 연쇄반응을 통해 *Lrh-1*(A) 및 에탄올 대사 관련 유전자인 *Aldh1b1*(B), *Adh1*(C), *Aldh2*(D), *Aldh1a1*(E)의 발현을 측정함. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 표준 식이 및 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{fl/fl} 마우스의 비교. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{fl/fl} 및 LRH-1^{fl/cre+} 마우스의 비교. *Lrh-1*: liver receptor homolog-1; *Aldh1b1*: aldehyde dehydrogenase 1b1; *Adh1*: alcohol dehydrogenase 1; *Aldh2*: aldehyde dehydrogenase 2; *Aldh1a1*: aldehyde dehydrogenase 1a1.

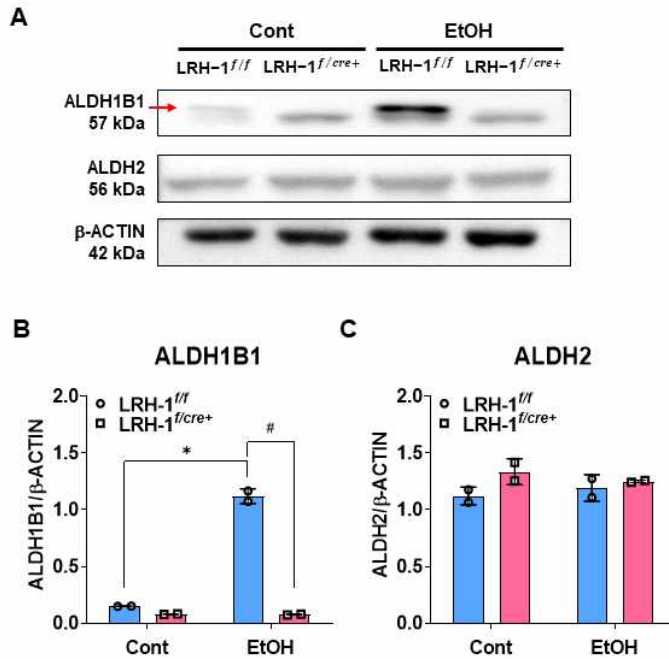


그림 9. 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{f/f} 및 LRH-1^{f/cre+} 마우스의 간에서 에탄올 관련 유전자의 단백질 발현 변화. 표준 식이 및 에탄올 함유 식이를 섭취한 마우스의 간에서 Western blot을 통해 에탄올 대사에 관련된 유전자인 ALDH1B1 및 ALDH2 발현을 측정함(A). 각 단백질 발현량을 정량화하여 그래프로 나타냄(B, C). * $p < 0.05$, 표준 식이 및 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{f/f} 마우스의 비교. # $p < 0.05$, 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{f/f} 및 LRH-1^{f/cre+} 마우스의 비교.

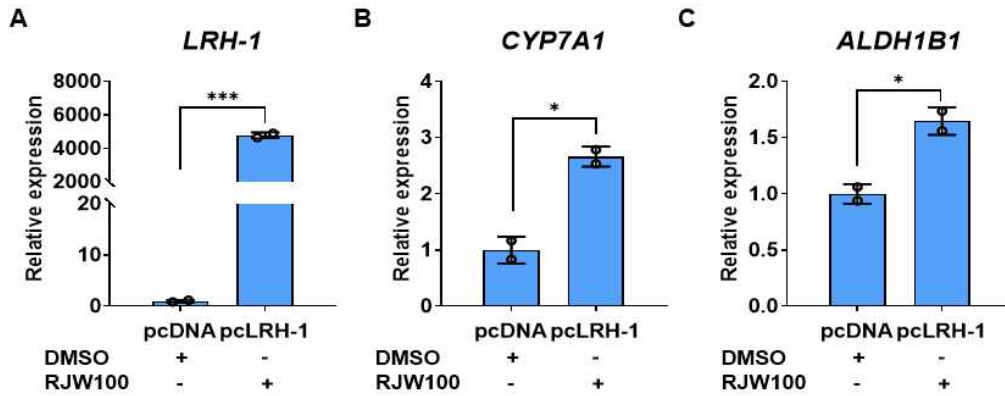


그림 10. LRH-1 과발현에 의한 ALDH1B1 유전자 발현 유도. 실시간 정량 중합효소 연쇄반응을 통해 *LRH-1*(A), *CYP7A1*(B) 및 *ALDH1B1*(C) 발현을 측정함. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, HepG2 세포에서 pcDNA와 pcLRH-1의 활성 비교. HepG2: hepatic carcinoma cancer; *CYP7A1*: cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1.

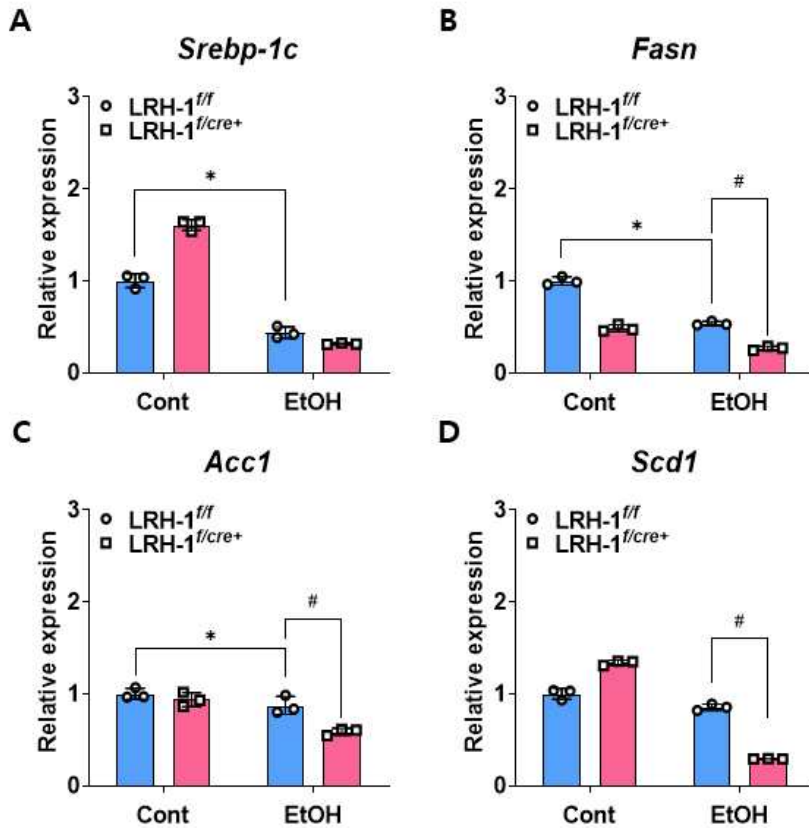


그림 12. 간에서 지질 생합성 유전자의 발현 변화. 정량 중합효소 연쇄반응을 통해 지질합성 표적 유전자인 *Srebp-1c*(A), *Fasn*(B), *Acc1*(C)와 *Scd1*(D)의 유전자 발현을 확인하였음. * $p < 0.05$, 표준 식이 및 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{f/f} 마우스의 비교. # $p < 0.05$, 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{f/f} 및 LRH-1^{f/cre+} 마우스의 비교. *Srebp-1c*: sterol regulatory element-binding protein-1c; *Fasn*: fatty acid synthase; *Acc1*: acetyl-CoA carboxylase 1; *Scd1*: stearoyl-CoA desaturase 1.

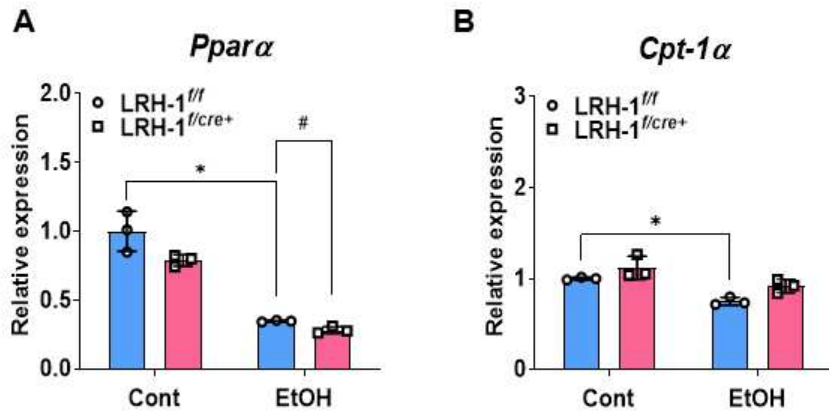


그림 13. 간에서 지방산 산화 유전자의 발현 변화. 정량 중합효소 연쇄반응으로 지방산 산화 표적 유전자인 *Ppara*(A), *Cpt-1α*(B)의 유전자 발현을 확인하였음. * p < 0.05, 표준 식이 및 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{fl/fl} 마우스의 비교. # p < 0.05, 에탄올 함유 식이 시 LRH-1^{fl/fl} 및 LRH-1^{fl/cre+} 마우스의 비교. *Ppara*: peroxisome proliferator activated receptor α ; *Cpt-1α*: carnitine palmitoyltransferase 1 α .

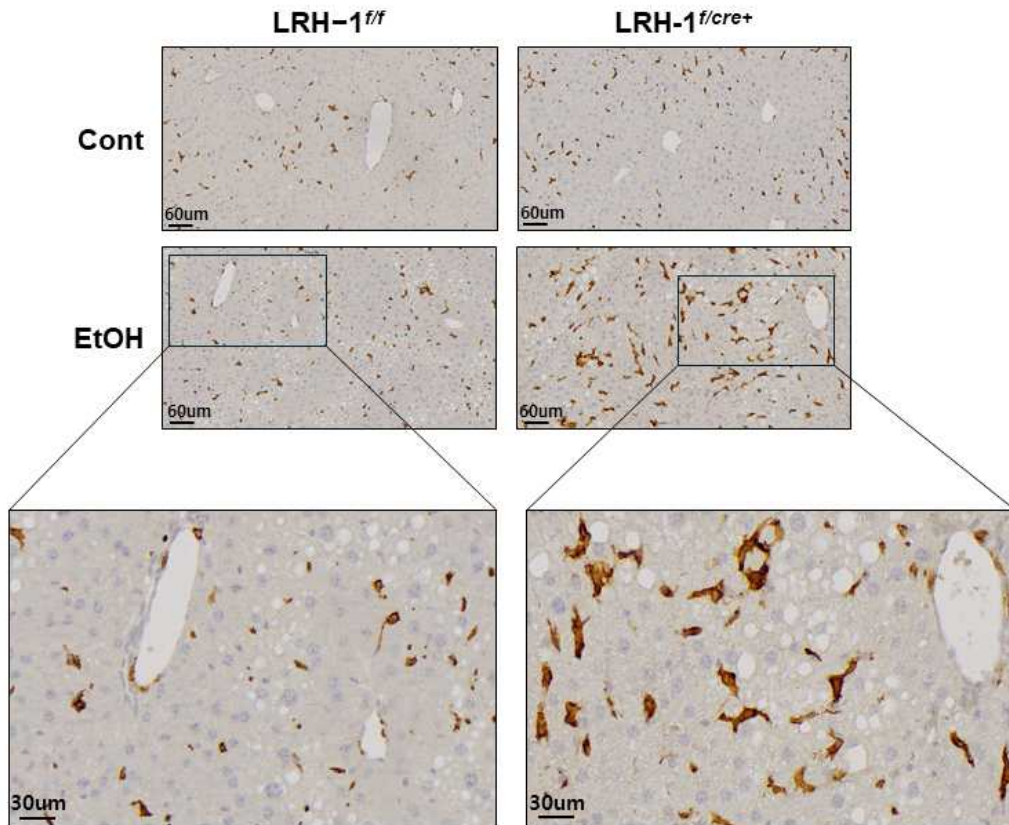


그림 14. 에탄올 함유 식이에 따른 간 조직 내 대식세포 침윤 증가. 표준 식이 및 에탄올 함유 식이를 3 주간 한 마우스에서 간 조직을 분리하여 45 μm 두께로 슬라이스 한 후 마우스 F4/80 항체와 goat-rat IgG HRP로 염색을 한 후 LRH-1^{f/f} 마우스와 LRH-1^{f/cre+} 마우스의 형태적인 차이를 확인하였음(scale bar = 30 μm 또는 60 μm).

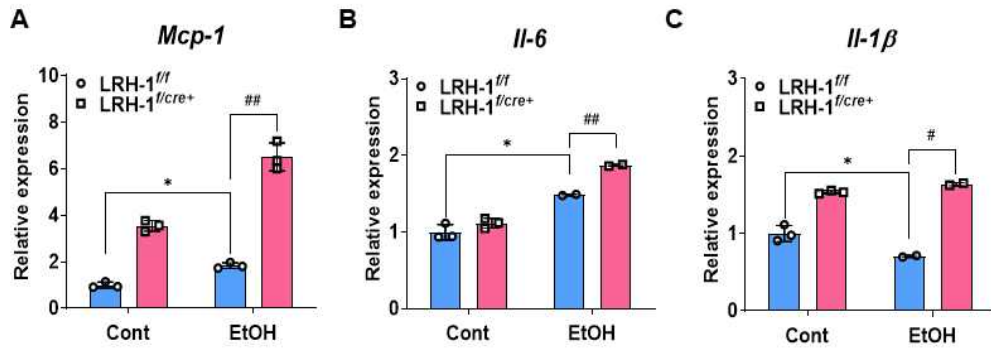


그림 15. 간 조직에서 대식세포 및 염증 관련 유전자의 발현 변화. 3 주간 표준식이 및 에탄올 함유 식이를 진행한 마우스의 간에서 정량 중합효소 연쇄반응으로 대식세포 지표 유전자인 *Mcp-1*(A)과 염증반응에 의해 유도되는 *Il-6*(B) 및 *Il-1β*(C)의 발현을 측정함. * $p < 0.05$, 표준식이 및 에탄올 함유식이 시 LRH-1^{f/f} 마우스의 비교. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, 에탄올 함유식이 시 LRH-1^{f/f} 및 LRH-1^{f/cre+} 마우스의 비교. *Mcp-1*: monocyte chemoattractant protein-1; *Il-6* interleukin-6; *Il-1β* interleukin-1β.

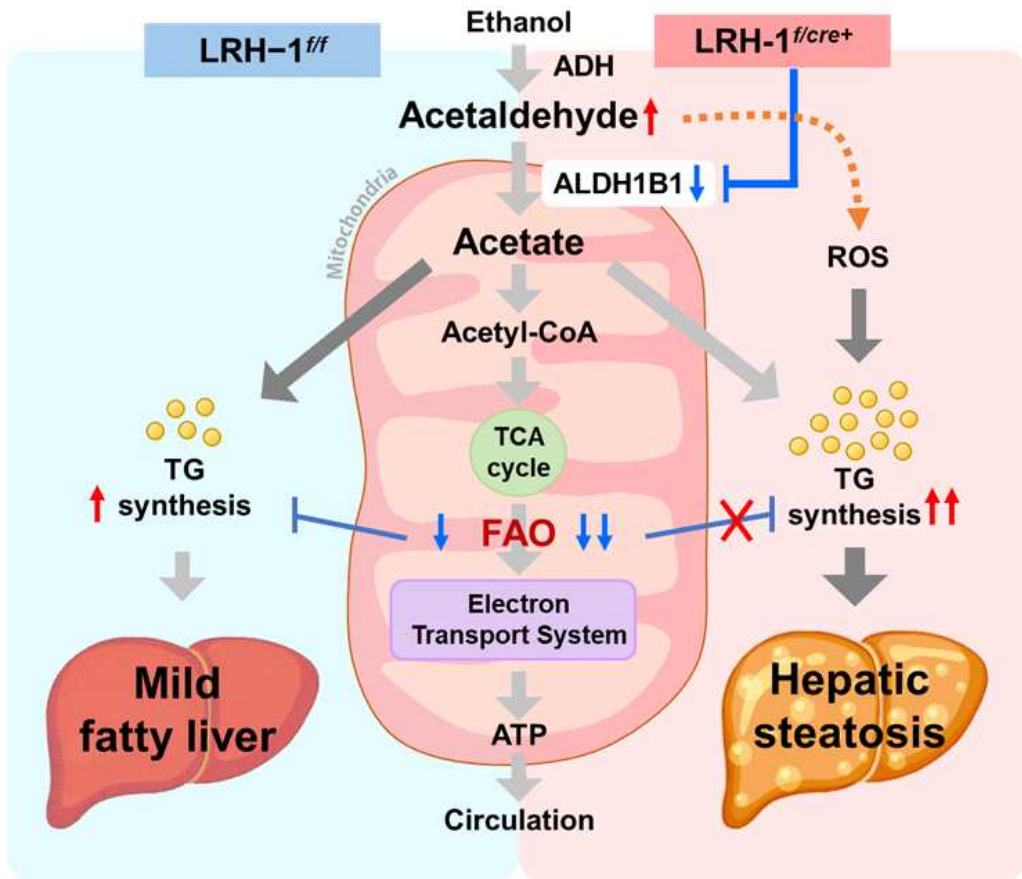


그림 16. LRH-1 결핍에 따른 알코올성 지방간 생성 과정 모식도. 일반적으로 에탄올이 유입될 경우 간에서 ADH에 의해 아세트알데하이드로 분해되고 ALDH에 의해 아세테이트로 분해되는 해독작용이 일어남. 반면 LRH-1 결핍 시 ALDH1B1의 활성이 감소하여 간세포 내 아세트알데하이드는 축적됨. 지속된 아세트알데하이드 축적으로 생성된 ROS에 의해 중성지방이 축적되고 지방산 산화는 감소되므로 알코올성 지방간염을 가속화시킴.

4. 고 찰

이번 연구에서는 간에서 LRH-1에 의한 *ALDH1B1*의 조절 기전을 규명하고 에탄올 함유 식이에 의한 아세트알데하이드 축적이 간의 중성지방 축적에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

LRH-1은 현재까지 에탄올 대사와 관련된 연구가 이루어진 바가 없지만, 간에서 콜레스테롤 및 지질 대사와 관련하여 주로 연구가 되어 왔기 때문에 (24-25), 에탄올 함유 식이 시 지질축적이 일어난다는 것을 확인한 이전 연구 결과를 바탕으로 에탄올 대사에 있어서 중요한 역할을 하는 지 확인해 보고자 하였다. 먼저 간 특이적 LRH-1^{fcre+} 마우스를 이용하여 3 주간 에탄올 함유 식이를 진행한 결과, 헤마톡실린-에오신 염색을 통해 LRH-1^{fcre+} 마우스에서 지질축적이 더 증가한 것을 확인할 수 있었다. 간 조직 내 중성지방과 콜레스테롤 함량 또한 같은 양상을 보였다.

에탄올은 체내 유입 시 주로 간에서 해독작용을 거친다. 해독과정에서 문제가 생겨 독성물질인 아세트알데하이드가 간 세포 내 축적이 되면 지질 대사에 악영향을 미칠 수 있으며(26-27), 혈청 내 아세트알데하이드 함량을 살펴본 결과, LRH-1^{fcre+} 마우스에서 아세트알데하이드 수치가 더 증가한 것을 확인하였다. 따라서 아세트알데하이드 축적에 의해 LRH-1 결핍 마우스의 간 내 지질축적이 일어나는 것임을 알 수 있었다.

대조군과 에탄올군의 간 조직 RNA-Sequencing 분석 결과에서 *ALDH1B1*이 유의성이 있음을 확인하였고, mRNA와 단백질 발현을 살펴본 결과, LRH-1^{fcre+} 마우스에서 확연하게 감소하는 것을 확인하였다. 그 외 *ALDH1B1*과 함께 에탄올 대사 내 중요한 역할을 하는 유전자들의 발현도 검증해 본 결과, LRH-1 결핍에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 *ALDH1B1*이 LRH-1의 표적 유전자일 것이라고 예상하고 이를 검증하기 위해 인간 유래 간암 세포주인 HepG2 세포에 LRH-1의 과발현을 유도하여 *ALDH1B1*의 발현량을 확인하였고, 예상대로 *ALDH1B1*의 발현이 증가함

을 확인하였다. 다음으로 ALDH1B1 프로모터 부위에 LRH-1이 결합하여 발현을 조절하는 지 확인하기 위해 ChIP-Sequencing 분석을 통해 살펴보았을 때, LRH-1이 ALDH1B1의 프로모터 부위에 결합할 수 있다는 것을 보여주었다. 그리고 LRH-1 결합 부위를 탐색한 결과, 3개의 결합 위치를 확인하였다. 하지만 직접적인 결합을 확인하기 위해서 부가적으로 크로마틴 면역 침강법을 통해 LRH-1이 ALDH1B1 프로모터에 결합하는 지를 볼 필요가 있다.

아세트알데하이드가 축적되면, 간 세포 내의 다양한 대사 경로에 영향을 미쳐 중성지방과 같은 지질의 비정상적 축적을 유도할 수 있다(19). 먼저 간 조직에서의 지질생성 관련 유전자의 발현을 살펴본 결과, *Srebp-1c*의 발현이 크게 증가되지 않았다. 또한 *Srebp-1c*에 의해 조절되는 *Fasn*, *Acc1* 및 *Scd1*의 발현이 지방간이 형성됨에도 크게 증가하지 않았다. 이는 에탄올 함유 식이에 의한 지질 축적이 지질 생합성 경로가 아닌 다른 경로에 의해 일어나는 것으로 예상할 수 있었다. 지방산 산화작용의 영향을 살펴보기 위해 *Ppara*와 *Cpt-1α*의 발현을 확인한 결과, 감소하는 양상이 나타났지만 실제로 미토콘드리아의 호흡 활성화와 지방산 산화가 감소하는 지 확인하기 위해 실시간 세포 대사 분석을 통해 직접적인 미토콘드리아의 기능을 추가적으로 확인할 필요가 있다.

또한, 아세트알데하이드의 축적은 다양한 염증성 사이토카인과 화학물질의 생성을 촉진하여 간 손상을 가중시킨다고 알려져 있다(28). 이를 확인하기 위해 염증반응을 F4/80 염색을 통해 조직학적 분석을 해본 결과, 에탄올 함유 식이를 진행한 LRH-1^{fl/cre+} 마우스에서 간 내의 대식세포의 침윤이 더욱 증가된 것을 확인할 수 있었다. 또한 간 조직 내 염증 유전자인 *Mcp-1*, *Il-6* 및 *Il-1β*의 발현 확인해보았을 때, LRH-1 결핍에 의해 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이는 LRH-1의 결핍이 ALDH1B1의 발현을 감소시켜 아세트알데하이드 축적을 가속화시킴으로써, 염증반응을 유도하여 간 손상을 더 진행시킨다고 예상해볼 수 있다.

결론적으로, 본 연구는 LRH-1의 새로운 표적 유전자로 ALDH1B1을 발굴

하여 발현조절 기전을 규명함으로써, LRH-1의 결핍으로 인해 ALDH1B1의 유전자 발현이 감소한 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 LRH-1이 결핍되면 ALDH1B1의 발현 감소로 인해 아세트알데하이드를 축적시켜 간 내 지방축적을 가속화 시킨다는 것을 예상할 수 있다. 이는 LRH-1을 매개로 한 ALDH1B1의 활성이 지방간 개선 치료 신약 개발에 도움이 될 것이라는 가능성을 제시하였다.

5. 요약

지질 축적을 유도하기 위해 LRH-1^{f/f} 및 LRH-1^{f/cre+} 마우스에 3 주간 5%의 에탄올 함유 식이를 진행한 결과, LRH-1^{f/cre+} 마우스에서 간 조직 내 지질 축적이 더욱 증가하였다. 대조군과 에탄올군의 간 조직에서 RNA-Sequencing 분석 결과에서 유의성을 나타내는 ALDH1B1을 측정해본 결과, 간 내 LRH-1의 결핍으로 인해 ALDH1B1의 mRNA 및 단백질 발현이 감소된 것을 확인하였다. LRH-1의 표적 유전자인지 확인하기 위해 LRH-1을 과발현하여 살펴본 결과에서 ALDH1B1의 발현이 유의하게 증가하는 것으로 보아, ALDH1B1이 LRH-1에 의해 조절된다는 것을 확인하였다. 실제로 ALDH1B1 프로모터에 LRH-1 결합부위가 존재하는 지 확인하기 위해 LRH-1 ChIP-Sequencing 분석을 해본 결과, LRH-1이 ALDH1B1의 프로모터에 결합할 수 있음을 확인하였다. ALDH1B1이 아세트알데하이드를 분해하는 효소이므로 혈청에서 아세트알데하이드 축적을 측정한 결과에서 LRH-1^{f/cre+} 마우스 간에서 아세트알데하이드의 함량이 더 증가하는 것을 확인하였다. 간 조직 내 대식세포 침윤 또한 LRH-1이 결핍되었을 때 증가한 것을 확인하였다. 따라서 이 연구를 통해 LRH-1에 의한 ALDH1B1의 발현 조절을 매개로 아세트알데하이드 축적을 조절하여 지방간 질환 개선에 도움이 될 것이라고 제시하였다.

참 고 문 헌

1. Lazarus KA, Wijayakumara D, Chand AL, Simpson ER, Clyne CD: Therapeutic potential of Liver Receptor Homolog-1 modulators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012; 130: 138-46.
2. Sun Y, Demagny H, Schoonjans K: Emerging functions of the nuclear receptor LRH-1 in liver physiology and pathology. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2021; 1867: 166145-57.
3. Meinsohn MC, Smith OE, Bertolin K, Murphy BD: The Orphan Nuclear Receptors Steroidogenic Factor-1 and Liver Receptor Homolog-1: Structure, Regulation, and Essential Roles in Mammalian Reproduction. *Physiol Rev* 2019; 99: 1249-79.
4. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J, Schoonjans K: Emerging actions of the nuclear receptor LRH-1 in the gut. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 947-55.
5. 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: 96151-66.
6. Fayard E, Auwerx J, Schoonjans K: LRH-1 an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 250-60.
7. 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.

8. 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; 3: 01694-718.

9. Gluchowski NL, Becuwe M, Walther TC, Farese RV Jr: Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14: 343-55.

10. Olzmann JA, Carvalho P: Review: Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019; 20: 137-55.

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

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

13. Mays SG, Stec J, Liu X, D'Agostino EH, Whitby RJ, Ortlund EA: Enantiomer-specific activities of an LRH-1 and SF-1 dual agonist. *Sci Rep* 2020; 10: 22279-93.

14. Whitby RJ, Stec J, Blind RD, Dixon S, Leesnitzer LM, Orband-Miller LA et al.: Small molecule agonists of the orphan nuclear receptors steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and liver receptor homologue-1 (LRH-1, NR5A2). *J Med Chem* 2011; 54: 2266-81.

15. Lee YK, Moore DD: Dual mechanisms for repression of the

monomeric orphan receptor liver receptor homologous protein-1 by the orphan small heterodimer partner. *J Biol Chem* 2002; 277: 2463-7.

16. Subramaniam V, Chakravarthi S, Jegasothy R, Seng WY, Fuloria NK, Fuloria S et al.: Alcohol-associated liver disease: A review on its pathophysiology, diagnosis and drug therapy. *Toxicol Rep* 2021; 8: 376-385.

17. Zakhari S: Overview: how is alcohol metabolized by the body?. *Alcohol Res Health* 2006; 29: 245-54.

18. Kawaratani H, Tsujimoto T, Douhara A, Takaya H, Moriya K, Namisaki T et al.: The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 495156-67.

19. Hyun J, Han J, Lee C, Yoon M, Jung Y: Pathophysiological Aspects of Alcohol Metabolism in the Liver. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 5717-33.

20. Aghara H, Chadha P, Zala D, Mandal P: Stress mechanism involved in the progression of alcoholic liver disease and the therapeutic efficacy of nanoparticles. *Front Immunol* 2023; 14: 1205821-36.

21. Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V: Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4: 697-720.

22. Stagos D, Chen Y, Brocker C, Donald E, Jackson BC, Orlicky DJ et al.: Aldehyde dehydrogenase 1B1: molecular cloning and characterization of a novel mitochondrial acetaldehyde-metabolizing enzyme. *Drug Metab Dispos* 2010; 38: 1679-87.

23. Singh S, Chen Y, Matsumoto A, Orlicky DJ, Dong H, Thompson DC

et al.: ALDH1B1 links alcohol consumption and diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 463: 768-73.

24. Stein S, Lemos V, Xu P, Demagny H, Wang X, Ryu D et al.: Impaired SUMOylation of nuclear receptor LRH-1 promotes nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2017; 127: 583-92.

25. Zhang T, Zhao M, Lu D, Wang S, Yu F, Guo L et al.: REV-ERBalpha Regulates CYP7A1 Through Repression of Liver Receptor Homolog-1. *Drug Metab Dispos* 2018; 46: 248-58.

26. Park SH, Lee YS, Sim J, Seo S, Seo W et al.: Alcoholic liver disease: a new insight into the pathogenesis of liver disease. *Arch Pharm Res* 2022; 45: 447-59.

27. Liu SY, Tsai IT, Hsu YC: Alcohol-Related Liver Disease: Basic Mechanisms and Clinical Perspectives. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 5170-97.

28. Dukić M, Radonjić T, Jovanović I, Zdravković M, Todorović Z, Kraišnik N et al.: Alcohol, Inflammation, and Microbiota in Alcoholic Liver Disease. *Int J Mol Sci* 2023; 24: 3735-48.

Regulatory Mechanism for Aldehyde Dehydrogenase 1B1 by Liver Receptor Homolog-1 in the Liver

Seo, Min-Hee

Department of Physiology

Graduate School

Keimyung University

(Supervised by Professor Im, Seung-Soon)

(Abstract)

Ethanol is detoxified in the liver by various enzymes. Previous studies confirm that ethanol intake causes liver lipid accumulation. The Liver receptor homolog-1 (LRH-1) is involved in the regulation of lipid and bile acid metabolism, but its role in ethanol metabolism is not clear. Therefore, this study aimed to explore the relation between ethanol-induced lipid accumulation and LRH-1. To understand LRH-1's role in liver ethanol metabolism, LRH-1^{fl/fl} and liver-specific LRH-1^{fl/cre+} mice conducted a liquid ethanol diet for three weeks. The results showed that LRH-1^{fl/cre+} mice exhibited increased indicated by higher liver weight, neutral fat, and total cholesterol levels. Measurement of

serum liver damage and acetaldehyde levels increased in LRH-1^{f/cre+} mice fed an ethanol diet. To explore LRH-1 target in ethanol metabolism, RNA-Sequencing analysis was conducted. The results showed that Aldehyde dehydrogenase 1B1 (ALDH1B1) was related to ethanol metabolism. When LRH-1 was deficient, ethanol metabolism genes exhibited a significant decrease in ALDH1B1 expression. Additionally, LRH-1 overexpression in HepG2 cells resulted in increased ALDH1B1 expression, and ChIP-Sequencing data confirmed the binding peaks of LRH-1 in the ALDH1B1 promoter. In conclusion, this study confirms that depletion of LRH-1 leads to decreased expression of ALDH1B1, resulting in the accumulation of acetaldehyde and accelerated intrahepatic fat accumulation.

간에서 간 수용체 동족체 -1에 의한 알데하이드 탈수소효소 1B1 조절 기전

서 민 회

계명대학교 대학원

의학과 생리학 전공

(지도교수 임 승 순)

(초록)

에탄올이 유입되면 간에서 다양한 효소 활성화에 의해 해독작용을 거친다. 그 중 알데하이드 탈수소효소가 제대로 작용하지 않으면 간 세포에서 독성물질인 아세트알데하이드의 지속적인 축적으로 인해 악화되어 알코올성 지방간염에서 더 나아가 간암까지 진행될 수 있다. 이전 연구에서 에탄올의 과도한 섭취에 의해 지질축적이 간 조직에서 일어남을 확인하였다. 간 수용체 동족체 -1(liver receptor homolog-1, LRH-1)은 핵 수용체 NR5A 구성원으로 간, 장 및 췌장 등에서 발현된다. LRH-1은 지질, 담즙산 및 포도당 대사에 관여하는 조절인자이지만 에탄올 대사에서의 역할은 명확하지 않다. 따라서 이번 연구는 에탄올에 의한 지질축적과 LRH-1의 관계성을 확인해 보고자 하였다. 먼저 간의 에탄올 대사에서 LRH-1의 기능을 밝히기 위해 LRH-1^{fl/fl} 및 간 특이적 LRH-1^{fl/cre+} 마우스에 3주간 에탄올 액상 식이를 진행하여 분석해 본 결과, LRH-1^{fl/cre+} 마우스에서 간 내 지질 축적이 되었고, 간 무게, 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량이 증가한 것을 볼 수 있었다. 혈청으로 간 손상도 및 아

세트알데하이드 함량을 측정해 본 결과 또한 에탄올 함유 식이를 한 LRH-1^{f/cre+} 마우스에서 높은 수치를 보였다. 에탄올 대사에서 LRH-1의 표적인자를 탐색하기 위해 RNA-Sequencings 분석을 하였다. 그 결과, 대조군과 에탄올군에서 알데하이드 탈수소효소 1B1(aldehyde dehydrogenase 1B1, ALDH1B1)이 에탄올 대사에 유의성을 가지고 있으며, 이와 관련된 유전자가 지방산 대사 및 간질환에 연관이 있음을 확인하였다. 이를 검증하기 위해 에탄올 대사 관련 유전자의 발현을 살펴본 결과, LRH-1이 결핍되었을 때 ALDH1B1의 mRNA 및 단백질 발현이 확연하게 감소하는 것을 확인하였다. 그리고 ALDH1B1이 LRH-1의 표적인자인지 확인하기 위해 HepG2 세포에 LRH-1을 과발현한 결과, ALDH1B1의 발현이 증가하였으며, ChIP-Sequencing 자료를 통해 ALDH1B1 프로모터 영역에서 LRH-1 결합 부위 피크를 확인하였다. 결론적으로 이 연구를 통하여 LRH-1 결핍되면 ALDH1B1 발현이 감소하여 아세트알데하이드가 축적되고 간 내 중성지방 축적이 가속화됨을 확인하였다.