

호르몬과 단쇄지방산이 HepG2 Cell 내에서 CYP7A1발현에 미치는 효과

양정례¹ · 이현정² · 김양하^{2*}

¹창원대학교 생활과학연구소

²이화여자대학교 식품영양학과

Effect of Hormones and Short Chain Fatty Acids on CYP7A1 Gene Expression in HepG2 Cell

Jeong-Lye Yang¹, Hyun-Jung Lee² and Yang-Ha Kim^{2*}

¹Research Institute of Human Ecology, Changwon University, Changwon 641-773, Korea

²Dept. of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract

Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) is the rate-limiting enzyme in the conversion of cholesterol to bile acids and plays a central role in regulating cholesterol homeostasis. We previously showed that a fermentable β -glucan ingestion decreased plasma cholesterol levels due to fecal bile acid excretion elevation involved in increase of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA expression and activity. It is proposed that short chain fatty acids (SCFA) produced by cecal and colonic fermentation of soluble fiber are associated with cholesterol-lowering effect of fiber. In the present study, we investigated whether CYP7A1 expression is up-regulated by short chain fatty acids or by hormones in cultured human hepatoma (HepG2) cells. Confluent HepG2 cell were incubated with acetate, propionate, or butyrate at 1 mM concentration for 24 hrs. Acetate as well as propionate increased to 1.8-fold expression of CYP7A1 mRNA than the control. Butyrate also increased 1.5-fold expression of CYP7A1 mRNA. Our data show for the first time that SCFA increase expression of CYP7A1 mRNA. Adding insulin, dexamethasone and triiodothyronine (1 μ M) to HepG2 cell increased the expression of CYP7A1 mRNA to 150%, 173%, 141%, respectively. These results suggest that SCFA produced by cecal fermentation stimulate enteric nervous system, in which secreted some neuropeptides may be responsible for change in cholesterol and bile acid metabolism. These findings suggest that SCFA are involved in lowering plasma cholesterol levels due to the up-regulation of CYP7A1 and bile acid synthesis.

Key words: cholesterol 7 α -hydroxylase, mRNA, SCFA, hormones, HepG2 cell

서 론

Cholesterol 7 α -hydroxylase는 콜레스테롤로부터 담즙산의 생합성과정에서 속도-제한단계를 촉매하는 효소이며 cytochrome P-450 family의 원형질 효소이다(1). 사람과 흰쥐에서, 이 대사과정의 주요 생성물은 cholic acid와 chenodeoxycholic acid이다. 담즙산은 콜레스테롤 항상성에 중요한 역할을 한다. 담즙산의 합성과 배설은 간 콜레스테롤 수준을 감소시키며, 소장내에서 식이지방의 가용화를 촉진하고 콜레스테롤과 지용성 비타민의 흡수에 필요하다. 이러한 기능적 중요성 때문에, 간에서 담즙산의 합성은 콜레스테롤 항상성 유지를 위해서 조심스럽게 조절되고 있다(1). Cholesterol 7 α -hydroxylase의 활성은 장관순환을 통하여 간으로 회수되는 담즙산(2), 콜레스테롤(3,4), steroid/thyroid 호르몬(5,6), 인슐린(7) 및 주야 리듬(8)에 의해 주로 전사수준

에서 조절되고 있다. Cholesterol 7 α -hydroxylase를 암호화하는 유전자(CYP7A1)는 흰쥐(9-11), 사람(12-14), 햄스터(15) 및 마우스(16)에서 clone되었으며, 담즙산 합성과 CYP7A1 유전자 조절연구의 model system으로 흰쥐(17,18)와 돼지(19) 간세포의 primary cultures와 HepG2 cell(20)이 일반적으로 사용된다. 그러나, 담즙산 합성과 cholesterol 7 α -hydroxylase 활성에는 중의 차이점이 보고되었고, 전사조절에는 transient transfection assay에 의한 연구가 대부분이다.

일부 식이섭취의 섭취는 혈장 콜레스테롤을 저하시키는데 그 분자적 기전은 명확히 밝혀지지 않았다. 제한된 기전으로는 담즙산과 총 스테로이드의 배설증가 및 담즙산 생합성의 up-regulation에 초점이 맞춰지고 있다. 본 연구자들은 앞선 실험에서 보리 β -glucan의 급여가 흰쥐의 혈청 콜레스테롤을 저하시키며, 이는 분변으로의 담즙산 배설증가와 간에서의 CYP7A1 활성과 발현 증가에 기인함을 밝혔다(21).

*Corresponding author. E-mail: yhmoon@ewha.ac.kr
Phone: 82-2-3277-3101. Fax: 82-2-3277-2862

맹장과 결장에서 식이섬유의 발효로 생성된 단쇄지방산(SCFA)이 식이섬유의 콜레스테롤 저하 효과와 관계있음이 제안된 바 있다(22-25). Hara 등(26)은 대장 내용물로 발효시킨 sugar beet fiber(SBF) 발효생성물 및 그에 상당하는 acetate, propionate 및 butyrate 혼합물의 경구섭취는 SBF 섭취시의 효과와 유사한 혈청 콜레스테롤 저하 작용이 나타나며, 특히 acetate가 SCFA의 유익한 효과와 관련 있음을 제안하였다. 식이섬유의 발효산물인 propionate 역시 장에서 흡수되어 콜레스테롤 합성에 직접적으로 영향을 줄 수 있다(27,28). 식이섬유의 혈청 콜레스테롤 저하 작용에 관한 또 다른 기전으로는, 식이섬유 또는 그 발효산물이 대장을 자극하고, 대장으로부터 분비된 humoral factors 또는 enteral 신경계가 콜레스테롤 대사를 조정하는 것이다. Goodlad 등(29)은 식이섬유의 결장발효가 혈장의 내인성 글루카곤(enteroglucagon)을 증가시킴을 보았고, 대장은 이 호르몬의 생성에 중요하다고 알려져 있다(30). 게다가, 대장내의 enteric 신경계는 식이섬유 또는 그 발효산물에 의해 자극받을 수 있다. 일부 neuropeptides가 콜레스테롤과 담즙산 대사에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(31-33).

본 연구의 목적은 식이섬유의 대장 발효산물인 acetate, propionate 및 butyrate 단쇄지방산과 생리적 조절자로서 알려진 insulin, dexamethasone과 triiodothyronine 호르몬이 사람의 간세포인 HepG2 cell 내의 CYP7A1 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양 실험의 재료 및 시약

HepG2 세포는 생명공학연구원(한국, 대전)으로부터 분양받아 액체질소에 보관하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), glutamine, trypsin-EDTA, penicillin/streptomycin, Hank's balanced salt solution(HBSS), bovine serum albumin 및 fetal bovine serum은 GIBCO(USA)에서 구입하였고, HEPES는 Amresco에서 구입하였다. Acetate, propionate, butyrate 및 dexamethasone, triiodothyronine, insulin(from porcine pancreas)은 Sigma(USA)사를 이용하였고, RNA isolation kit인 TRIZOL[®] reagent는 Invitrogen(USA)에서 구입하였다. RT-PCR에 사용한 5X RT buffer, PCR Nucleotide mix(10 mM), M-MLV(moloney-murine leukemia virus) reverse transcriptase(200 U/μL), 100bp DNA Ladder는 Promega(USA)에서 구입하였고, oligo dT₁₉는 Bioneer(Korea)에서 구입하였다. Primer는 Bioneer(Korea)에서 구입하였고, 10X Taq polymerase buffer, 2.5 mM dNTPs, Super Taq polymerase(5 U/μL)는 Super-Bio(Korea)에서 구입하였다. DNA thermal cycler(GeneAmp[®] PCR System 2700)는 Applied Biosystems의 제품을 사용하였다.

HepG2 세포의 배양

HepG2 세포는 이전의 방법(34)에 따라 배양하였다. 즉, growth medium(Dulbecco's modified Eagle's medium, 10% FBS, 1% glutamine, 50 IU penicillin/mL, 50 μg streptomycin/mL)에 5×10^5 cell/plate의 배율로 plating하고, media는 1회/2일으로 교환하면서 cell의 confluent condition을 확인하였다.

SCFA 및 hormones treatment

HepG2 세포가 약 80%의 confluence를 나타낼 때 serum free medium(Dulbecco's modified Eagle's medium, 1 mg/mL BSA, 15 mM HEPES, 100 IU penicillin, 100 μg streptomycin/mL)에 acetate, propionate와 butyrate를 각각 0.5, 1, 2.5, 5 mM의 네 가지 농도로 처리한 후 24시간, 48시간 및 72시간 동안 배양하여 최적의 조건을 확립하였다. 호르몬으로 insulin, thyroid(T3)와 dexamethasone을 배지에 각각 0.5, 1, 2.5, 5 μM의 네 가지 농도로 처리한 후 24시간, 48시간 및 72시간 동안 배양하여 최적의 조건을 확립하였다.

Total RNA의 추출

여러 가지 처리 조건에서 배양된 세포의 total RNA는 1×10^7 cells/1 mL TRIZOL[®] reagent로 추출하였다. 추출된 RNA의 농도는 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다.

Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

CYP7A1 mRNA는 반 정량적 RT-PCR을 사용하였으며(35), housekeeping gene으로 β-actin을 사용하였다. Reverse transcription은 5X RT buffer(250 mM Tris-HCl; pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 mM dNTPs, 30 pmole oligo dT₁₉, 200 U M-MLV(moloney-murine leukemia virus) reverse transcriptase가 포함된 총 volume 20 μL에 4 μg total RNA를 혼합하여 반응시켰으며, cDNA는 37°C에서 1시간, 70°C에서 15분간 합성하였다.

Forward primer의 sequence는 다음과 같다: CYP7A1 5'-TGG ATT AAT TCC ATA CCT GG-3'; β-actin, 5'-GGA CCT GAC AGA CTA CCT CA-3'. Reverse primer의 sequence는 다음과 같다: CYP7A1 5'-CCT TAT GGT ATG ACA AGG GA-3'; β-actin, 5'-GTT GCC AAT AGT GAT GAC CT-3'.

RT-product의 semi-quantitation을 위하여 cDNA를 농도별로 희석시켜 준비하고 β-actin으로 증폭하여 동량의 cDNA를 구하였다. 각각의 cDNA를 10X Taq polymerase buffer(15 mM MgCl₂ 포함), 0.2 mM dNTPs, 0.125 U Super Taq polymerase와 혼합하고, 0.25 μM의 primer와 반응시켰다. 증폭은 DNA thermal cycler(GeneAmp[®] PCR System 2700)로 하였다.

PCR의 반응조건은 다음과 같다. 95°C에서 5분, 95°C에서 15초(denaturation), CYP7A1 25 cycle, β-actin 20 cycle을

55°C에서 30초(annealing), 72°C에서 40초(extension), 72°C에서 10분(final extension)하였다. 증폭된 각각의 시료는 ethidium bromide으로 염색하여 1.5% agarose gel에 전기영동하였다.

통계분석

각 실험의 결과는 3회 반복 실험한 결과를 Statistic Analysis System(SAS) 통계 프로그램에 의하여 실험군의 평균과 표준오차를 계산하였다. 각 실험군의 분석항목별 차이는 Duncan's multiple range test로 general linear model(GLM)을 이용하여 p<0.05수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

Hormones 처리에 의한 HepG2 cell에서의 CYP7A1 발현정도

호르몬에 의한 HepG2 cell에서의 CYP7A1 gene의 발현 정도를 측정하기 위하여 insulin, dexamethasone 및 triiodothyronine을 0, 0.1, 0.5, 1 µM의 4가지 농도에서 24시간, 48시간 및 72시간 처리한 후, CYP7A1 유전자의 발현 정도를 semi-quantitative RT-PCR을 이용하여 안정적인 조건을 조사하였다. Insulin을 24시간 처리한 경우 0.1 µM 농도에서 발현이 가장 증가하였으며 그 이외의 농도에서도 대조구보다 유의적으로 상승하였다(Fig. 1). 이러한 결과는 배양시간을 48, 72시간으로 각각 연장시켰을 경우에도 0.1 µM에서 가장 발현이 증가하였으며 그 이상의 농도에서는 대조구보다 상승하는 유사한 경향을 보였다(Fig. 1). Dexamethasone에 의한 HepG2 cell에서의 CYP7A1 gene의 발현 정도를 살펴본 결과는 24시간 배양시에 0.1 µM의 농도에서 발현이 가장 증가하였으며(Fig. 1), 그 이상의 농도에서는 대조구보다 상승하였다. 배양시간을 24시간에서 48, 72시간으로 각각 연장시켰을 경우에도 역시 0.1 µM 이상의 농도에서는 발현이 더 이상 증가하지 않았다(Fig. 1). 또한, triiodothyronine의 영향을 살펴본 실험에서도 위와 유사한 경향이었다(Fig. 1). 이상의 결과로부터 호르몬의 처리조건을 0.1 µM, 24시간 배양으로 채택하였다.

호르몬에 의한 HepG2 세포에서의 CYP7A1 유전자의 발현 정도를 측정하기 위하여 insulin, dexamethasone 및 triiodothyronine을 0.1 µM의 농도로 24시간 배양한 결과, dexamethasone에서 가장 높은 173%의 증가를 나타내었다. 그 다음으로 insulin에서 150%, triiodothyronine에서 141%의 증가를 나타내었다(Fig. 2).

CYP7 mRNA는 간에서 독점적으로 발견되고(4), 간-특이적인 유전자 발현에 포함되어 있는 분자적 기전 연구를 위한 대상이 된다. 몇몇 그룹의 연구는 CYP7 mRNA 수준이 다수의 effectors에 의해 배양된 세포에서 조절된다고 증명하였다. 예를 들어, 배양된 흰쥐 간세포(36)와 사람의 간암세포

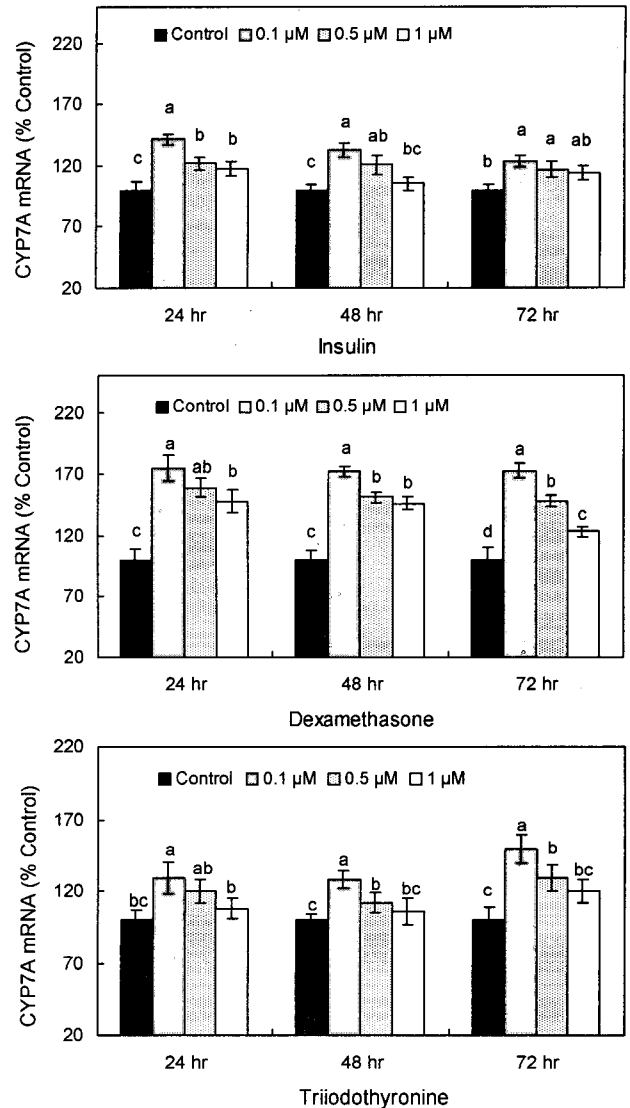


Fig. 1. Effect of insulin, dexamethasone and triiodothyronine on CYP7A1 gene expression in cultured HepG2 cell. Confluent HepG2 cell were incubated for 24 hr, 48 hr, and 72 hr in serum free medium in the presence of indicated concentrations of insulin, dexamethasone, and triiodothyronine. Data represent the means±SD of triplicate experiments. A value sharing same superscript is not significantly different at p<0.05.

포에서, 배양배지에 담즙산의 첨가는 CYP7 mRNA 수준을 낮추고(37), 식이 콜레스테롤과 dexamethasone은 CYP7 mRNA 수준을 증가시켰다(38). 그러나, 콜레스테롤 급여는 흰쥐에서 CYP7 mRNA 수준을 증가시키지만 dexamethasone은 감소시켰다(2,38). Lavery and Schibler(39)는 흰쥐에서, CYP7 유전자 발현이 저녁에 최고가 되는 엄격한 주야리듬을 따른다는 것을 증명하였다. 이 현상은 특별한 전사 인자, DBP에 의해 전사수준이 통제된다.

Cholesterol 7α-hydroxylase의 조절에 관한 대부분의 연구는 흰쥐 모델에서 수행되었다. Crestani 등(15)은 rat CYP7A gene promoter가 glucocorticoid, cAMP, retinoic acid에 의해 자극되었고, 담즙산, 인슐린, phorbol ester에 의해 억제됨

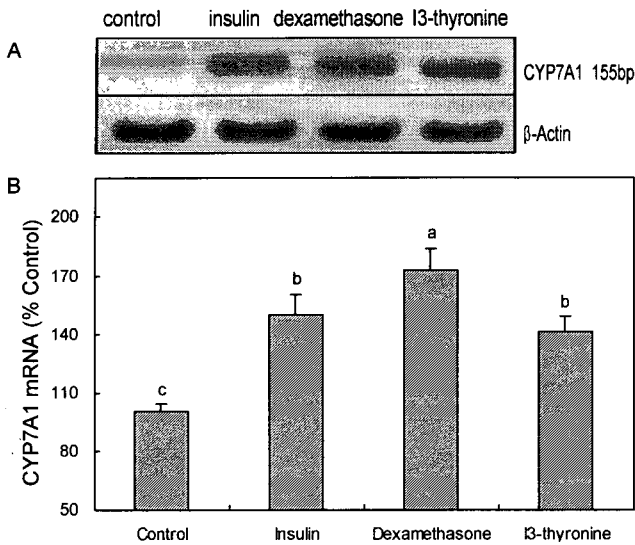


Fig. 2. Hormonal control of CYP7A1 mRNA expression in HepG2 cell.

Confluent HepG2 cell were incubated with indicated hormones (0.1 μ M) for 24 hr in serum free medium. (A) Levels of CYP7A1 mRNA were determined by semi-quantitative RT-PCR analysis using ImageQuant program. β -Actin was used as a control. (B) All signals were normalized to mRNA levels of housekeeping gene, β -actin, and expressed as a % control. Data represent the means \pm SD of triplicate experiments. A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$.

을 발견하였다. 그러나, 담즙산 합성과 cholesterol 7 α -hydroxylase 활성에서 중의 차이점이 보고되었다(15,40,41). Cholesterol 7 α -hydroxylase 활성은 사람에서 cholestyramine에 의해 증가되었고 담즙산에 의해 억제되었다(42). 정제된 사람의 효소가 흰쥐 효소와 유사한 Km과 Vmax를 가지며(43), 사람의 간에서 발현된 cholesterol 7 α -hydroxylase의 활성이 낮은 것은 유전자 전사의 수준이 낮은 데에 기인한다. HepG2 세포는 보통의 일차 담즙산을 합성하고 분비하며(44) transient transfection assay에 의해 cholesterol 7 α -hydroxylase의 전사조절을 연구하는 모델로 채택되어 왔다(37,39). 담즙산, 호르몬과 콜레스테롤에 의한 HepG2 세포에서 cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA의 발현과 조절이 몇몇 연구실에 보고되었다(37,44).

HepG2 세포에 CYP7 upstream region의 deletion mutant를 luciferase reporter gene과 연결하여 transient transfection 한 후, rat CYP7의 전사조절을 promoter activity 측정으로 연구한 보고가 있다(39). CYP7/luciferase chimeric genes의 전사는 HepG2 세포의 subconfluent시보다 confluent할 때 높았으며, glucocorticoid receptors는 dexamethasone 존재시에 CYP7 유전자를 up-regulate하였음을 보고하였다. Thyroid hormones은 영향을 주지 않았으며, insulin은 저해하였고 dexamethasone에 의한 CYP7 유전자의 up-regulation 효과를 상쇄시켰다. 위의 연구 결과는 본 실험결과와 차이가 있었으나, 이는 사람의 CYP7A 유전자와 rat CYP7A 유전자의 차이에 의한 것으로 추측된다. 이제까지, transient

transfection assay에 의한 CYP7A1 유전자의 발현 조절을 살펴본 보고들은 있으나, CYP7A1 유전자를 transfection하지 않은 HepG2 cell에서의 mRNA 발현을 조사한 보고는 없었다. 간세포인 HepG2 cell은 자체적으로 CYP7A1 유전자를 가지므로, confluent한 HepG2 cell 상태에서 insulin, dexamethasone 및 triiodothyronine 호르몬과 단쇄지방산을 처리하여 그 발현정도를 살펴본 본 연구의 결과는 의미가 있다. Semi-quantitative RT-PCR 기법을 이용하여 조사한 호르몬 모두에서 CYP7A1 발현이 증가하였으며, 그 효과는 dexamethasone 처리 시에 가장 컸다. 본 연구의 결과는 사람의 간세포에서 CYP7A1 mRNA 발현이 HepG2 transient transfection system 내의 rat gene and/or human gene과는 다르게 조절됨을 제안한다.

Short chain fatty acids처리에 의한 HepG2 cell에서의 CYP7A1 발현정도

단쇄지방산인 acetate(C2)와 propionate(C3)를 0, 0.5, 1, 2.5, 5 mM의 5가지 농도를 HepG2 cell에 24시간, 48시간 처리한 후, CYP7A1 유전자의 발현정도를 semi-quantitative RT-PCR을 이용하여 최적의 조건을 조사하였다. HepG2 cell에서의 CYP7A1 gene의 발현은 acetate의 처리시 0에서 1 mM의 농도에서는 dose-dependant하게 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 약간 증가하는 경향을 보였다(Fig. 3, Acetate). 배양시간을 24시간에서 48시간으로 연장시켰을 경우에 발현이 더 이상 증가하지는 않았다. 또한, propionate의 처리시 HepG2 cell에서의 CYP7A1 gene의 발현은 acetate의 경우와 유사하였다. 즉, 0에서 1 mM의 농도에서는 dose-dependant하게 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 약간의 상승 경향을 보였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 3, Propionate). 배양시간을 24시간에서 48시간으로 연장시켰을 경우의 발현정도는 최고농도에서 큰 차이를 나타내지 않는 것으로 보였다. 또한, butyrate의 영향을 살펴본 실험에서도 위와 유사한 경향이였다(Fig. 3, Butyrate). 이상의 결과로부터 단쇄지방산의 처리 조건을 1 mM 농도, 24시간 배양으로 채택하였다.

단쇄지방산 처리에 의한 HepG2 세포에서의 CYP7A1 유전자의 발현 정도를 측정하기 위해서 acetate, propionate 및 butyrate를 각각 1 mM, 24시간 배양한 결과, 모든 단쇄지방산이 CYP7A1의 발현을 증가시켰다. Acetate와 propionate는 유사한 효과를 나타내어 대조군에 비하여 1.8배의 증가를 나타내었으며, butyrate는 1.5배의 증가를 보였다(Fig. 4).

식이섬유의 콜레스테롤 저하효과를 설명해줄 단독 또는 조합해서 작용하는 몇 가지 기전이 제안되었다(45). 즉, 위비움 속도의 저하, 담즙산 흡수와 대사의 수정, 지질 흡수와 대사의 간섭, 맹장에서 식이섬유의 발효로 SCFA의 생성, 간의 LDL 수용체의 up-regulation(46) 및 인슐린 또는 다른 호르몬에 대한 혈장 농도 또는 조직민감도의 변화 등이다. 식이섬유는 결장 박테리아에 의해 발효가 되어 acetate, propionate

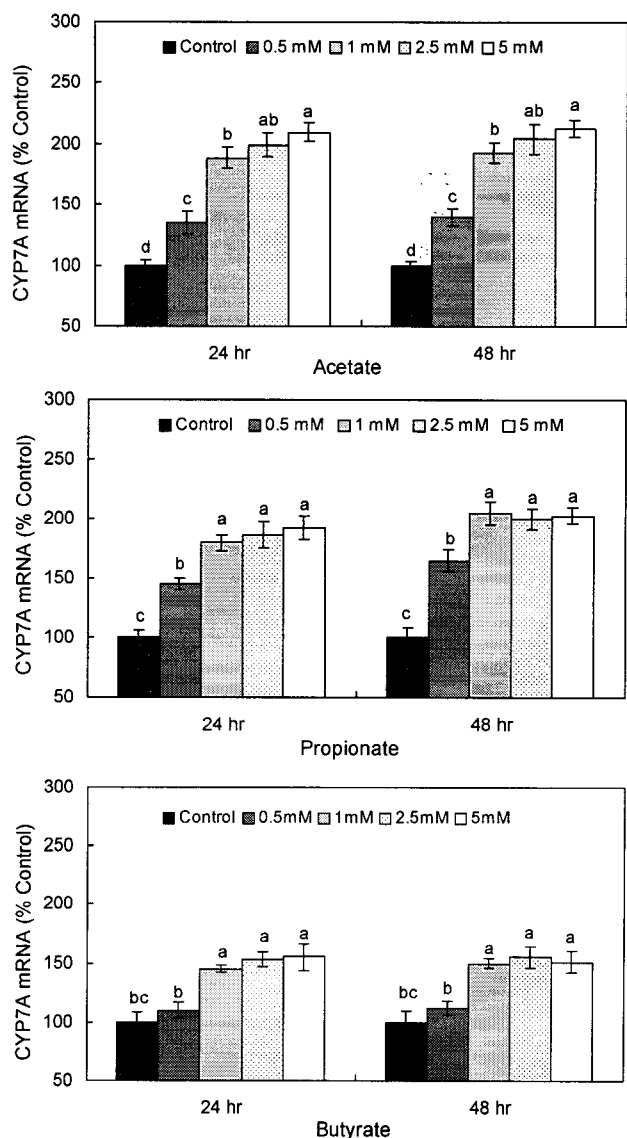


Fig. 3. Effect of acetate on CYP7A1 gene expression in cultured HepG2 cell.

Confluent HepG2 cell were incubated for 24 hr and 48 hr in serum free medium in the presence of indicated concentrations of acetate, propionate, and butyrate. Data represent the means \pm SD of triplicate experiments. A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$.

및 butyrate와 같은 단쇄지방산이 되어 결장에서 흡수된다 (47). 분리된 간세포의 초기 연구로부터, propionate가 콜레스테롤 합성에 저해효과를 가지는 것으로 추측되었다(48-50). 이 가설은 propionate (<1 mmol/L 농도에서)가 간세포에서 acetate로부터 콜레스테롤 생합성을 유의적으로 저해할 수 있다는 관측으로부터 일부 지지를 받았다(51). 중수소를 추적자로 사용하여 Demigne 등(52)은 propionate의 생리적 농도(약 0.6 mmol/L)가 간세포에서 *in vitro* 콜레스테롤 합성을 약간 그러나 유의성 있게 억제함을 보였다. 그러나, 중수소를 사용한 다른 연구에서, 더 높은 농도(1 mmol/L)는 억제하지 않았다(48,51). Propionate의 억제 효과는 논쟁

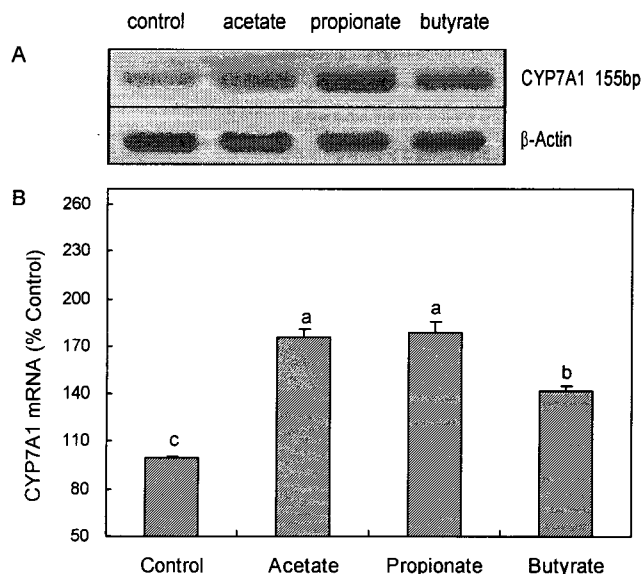


Fig. 4. SCFA control of CYP7A1 gene expression in HepG2 cell.

Confluent HepG2 cell were incubated with indicated SCFA (1 mM) for 24 hr in serum free medium. (A) Levels of CYP7A1 mRNA were determined by semi-quantitative RT-PCR analysis using ImageQuant program. β -Actin was used as a control. (B) All signals were normalized to mRNA levels of housekeeping gene, β -actin, and expressed as a % control. Data represent the means \pm SD of triplicate experiments. A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$.

적이다. *In vivo* 연구에서도 propionic acid가 혈장 콜레스테롤에 미치는 감소효과는 논쟁의 여지가 있다. 즉, Kishimoto 등(53)은 소량의 propionate를 지속적으로 주입하면 혈장 콜레스테롤이 감소하였다고 보고하였다. Wright 등(51)은 2.5 mM이하의 propionate 농도에서는 간세포에서 콜레스테롤 생합성이 저해되었으며 그 이상의 농도에서는 지방산 생합성이 저해되었다고 보고하였다. Chen 등(50)은 0.5% sodium propionate와 콜레스테롤 식이를 섭취한 흰쥐에서 혈청과 간의 콜레스테롤이 유의적으로 감소하였으며 이는 식이섬유의 콜레스테롤 저하효과에 그 발효산물인 propionate가 일부 관여함을 주장하였다. 그럼에도 불구하고, 콜레스테롤 합성은 발효가능한 수용성 식이섬유 또는 propionate를 섭취한 실험동물에서 감소되지 않았고 증가되는 것으로 반복적으로 보였다. Levrat 등(54)은 propionic acid투여가 혈장 콜레스테롤과 콜레스테롤 합성을 감소시키지 않았다고 보고하였다. 분리된 간세포에서 1 mmol/L propionate 존재는 지방산 생합성을 억제하지 않았다는 보고(50,51)와 돼지의 원위 결장에 외과적으로 propionate(36 mmol/kg 0.75 daily)를 주사하였을 때, propionate는 흡수되지 않아 혈청지질과 스테롤 배설에 영향을 미치지 않았다는 보고(55)가 있다. 오히려 펙틴 급여는 흰쥐에서 간 콜레스테롤 합성을 두드러지게 증가시켰다(56,57). 이 보고를 한 연구자들은 펙틴 급여시 간 콜레스테롤 합성증가는 담즙산 배설 증가에 대한 보상이며, 간 콜레스테롤 합성물은 발효성 식이섬유를 섭취한 흰쥐에

서 콜레스테롤 수준을 낮추는데 관여하지 않는다고 제안하였다. 한편, Hara 등(26)은 propionate, butyrate 또는 propionate + butyrate식이 혈장 콜레스테롤을 낮추지 않았으나, acetate 또는 다른 두 SCFA의 하나에 acetate가 더해진 식이급여는 혈장 콜레스테롤을 낮추어 propionate라기보다는 acetate가 SCFA의 콜레스테롤 저하효과에 관계함을 보였다. 또한, SCFA 식이를 섭취한 흰쥐의 간 조각을 사용한 *in vitro* 콜레스테롤 합성은 저하되지 않았음을 보고하였고, 이는 식이섬유의 섭취가 분변 담즙산 배설을 증가시키고, 이것이 *in vitro*간 콜레스테롤 합성 활성(예를 들어 HMG-CoA reductase)을 유도했으며, 식이섬유 발효로 생성된 SCFA가 담즙산 배설 증가에 기인하여 *in vivo* 콜레스테롤 합성을 억제하였다고 제안하였다. 이상에서처럼 지금까지 단쇄지방산의 콜레스테롤 저하효과와 관련한 연구는 콜레스테롤 합성 조절에 관한 것이 대부분이었다. 본 연구자들은 앞선 연구에서 발효성의 보리 β -glucan의 급여가 흰쥐의 혈청 콜레스테롤을 저하시키며, 이는 분변으로의 담즙산 배설 증가와 간에서의 CYP7A1 활성과 발현 증가에 기인함을 밝혔다(21). 따라서 본 연구자는 식이섬유의 결장발효로 생성된 단쇄지방산이 간 콜레스테롤 합성 조절이 아니라 주로 담즙산 생합성과 관련한 CYP7A1의 전사 조절을 통해서 혈청 콜레스테롤을 저하시키는 것으로 확신했으며, 본 실험의 결과가 이것을 지지한다. 또한 본 연구에서 사용된 단쇄지방산의 농도(1 mM)는 0, 0.5, 1, 2.5, 5 mM의 농도에서 측정된 예비실험의 결과로써 결정되었으며, 이용가능한 자료(26,58,59)로부터 생리적 수준의 농도임을 알 수 있다. 이상의 결과로써, 식이섬유 섭취시 나타나는 콜레스테롤 저하 효과는 발효산물인 단쇄지방산 acetate, propionate 및 butyrate 등이 흡수되어 간에서의 CYP7A1의 up-regulation에 의한 담즙산 배설증가에 따른 결과로 설명할 수 있다. 또한, acetate와 propionate의 작용이 butyrate보다는 큼을 알 수 있었다.

요 약

수용성 식이섬유의 섭취는 혈청 콜레스테롤 저하효과가 있으며, 그 작용기작으로는 수용성 식이섬유의 점성으로 인한 콜레스테롤과 담즙산 흡수저해, 대장내 미생물 발효로 생성된 단쇄지방산에 의한 콜레스테롤 합성률 변경 및 담즙산 합성증가 등으로 설명되어진다. 그러나 명확한 작용기전은 규명되지 않았다. 본 연구에서는 간세포 핵내의 CYP7A1의 발현에 호르몬과 식이섬유의 발효로 생성된 단쇄지방산이 미치는 영향을 알아보았다. 사람의 간세포(HepG2 세포)의 배양배지에 insulin, dexamethasone 및 triiodothyronine을 각각 1 μ M 투여하고 24시간 배양하였다. Semi-quantitative RT-PCR 기법에 의해 CYP7A1 mRNA 발현을 측정된 결과, dexamethasone에서 가장 높아 173%의 증가를 나타내었고, 그 다음으로 insulin에서 150%, triiodothyronine

에서 141%의 증가를 나타내었다. 이처럼 transient transfection을 하지 않은 HepG2 세포에서 생리적 조절자로 알려진 insulin, dexamethasone 및 triiodothyronine이 CYP7A1의 발현을 모두 증가시킨다는 결과는 본 연구에서 처음으로 규명하며, rat gene and/or human gene 발현이 다르게 조절됨을 제안한다. 단쇄지방산에 의한 HepG2 세포에서의 CYP7A1 유전자의 발현 정도를 측정하기 위해서 acetate, propionate 및 butyrate를 각각 1 mM 농도로 24시간 동안 배양한 결과, 모든 단쇄지방산이 CYP7A1의 발현을 증가시켰다. Acetate와 propionate는 유사한 효과를 나타내어 대조군에 비하여 1.8배의 증가를 나타내었으며, butyrate는 1.5배의 증가를 보였다. 이상의 결과는 수용성 식이섬유 섭취시 나타나는 콜레스테롤 저하 효과는 수용성 식이섬유의 대장 발효가 대장을 자극함으로써 내인성 호르몬의 변화를 통해서 나타나거나 대장내 발효산물인 acetate, propionate 및 butyrate 등이 흡수되어 간에서의 CYP7A1의 up-regulation에 의한 담즙산 배설증가에 따른 결과로 설명할 수 있을 것이다. 단쇄지방산의 CYP7A1 발현에 미치는 작용은 acetate와 propionate가 butyrate보다 큼을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 전문연구인력(KRF-2002-075-E00002)의 지원으로 수행된 연구의 일부로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Vlahcevic ZR, Heuman DM, Hylemon PB. 1991. Regulation of bile acid synthesis. *Hepatology* 13: 590-600.
2. Pandak WM, Li YC, Chiang JYL, Studer EJ, Gurley EC, Heuman DM, Hylemon PB. 1991. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA and transcriptional activity by taurocholate and cholesterol in the chronic biliary diverted rat. *J Biol Chem* 266: 3416-3421.
3. Li YC, Wang DP, Chiang JYL. 1990. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase in the liver. *J Biol Chem* 265: 12012-12019.
4. Jelinek DF, Andersson S, Slaughter CA, Russell DW. 1990. Cloning and regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase, the rate-limiting in bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* 265: 8190-8197.
5. Ness GC, Pendleton LC, Li YC, Chiang JYL. 1990. Effect of thyroid hormone on hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase, LDL receptor, HMG-CoA reductase, farnesyl pyrophosphate synthetase and apolipoprotein A-I mRNA levels in hypophysectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 1150-1156.
6. Hylemon PB, Gurley EC, Stravitz RT, Litz JS, Pandak WM, Chiang JYL, Vlahcevic ZR. 1992. Hormonal regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA levels and transcriptional activity in primary rat hepatocyte cultures. *J Biol Chem* 267: 16866-16871.
7. Twisk JM, Hoekman FM, Lehmann EM, Meijer P, Mager

- WH, Princen HMG. 1995. Insulin suppresses bile acid synthesis in cultured rat hepatocytes by down-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase gene transcription. *Hepatology* 21: 501-510.
8. Lavery DJ, Schibler U. 1993. Circadian transcription of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene may involve the liver-enriched bZIP protein DBP. *Gene & Dev* 7: 1871-1884.
 9. Jelinek D, Russel DW. 1990. Structure of the rat gene encoding cholesterol 7 α -hydroxylase. *Biochemistry* 29: 7781-7785.
 10. Nishimoto M, Gotoh O, Okuda K, Noshiro M. 1991. Structural analysis of the gene encoding rat cholesterol 7 α -hydroxylase, the key enzyme for bile acid synthesis. *J Biol Chem* 266: 6467-6471.
 11. Chiang JYL, Yang TP, Wang DP. 1992. Cloning and 5'-flanking sequence of a rat cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Biochim Biophys Acta* 1132: 337-339.
 12. Molowa DT, Chen WS, Cimis GM, Tan CP. 1992. Transcriptional regulation of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Biochemistry* 31: 2539-2544.
 13. Cohen JC, Cali JJ, Jelinek DF, Mehrabian M, Sparkes RS, Lusis AJ, Russell DW, Hobbs HH. 1992. Cloning of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7) and localization to chromosome 8q11-q12. *Genomics* 14: 153-161.
 14. Wang DP, Chiang JYL. 1994. Structure and nucleotide sequences of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7). *Genomics* 20: 320-323.
 15. Crestani M, Galli G, Chaing JYL. 1993. Genomic cloning, sequencing and analysis of hamster cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7). *Arch Biochem Biophys* 306: 451-460.
 16. Tzung K, Ishimura-Oka K, Kihara S, Oka K, Chan L. 1994. Structure of the mouse cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Genomics* 21: 244-247.
 17. Davis RA, Highsmith WE, Malone-McNeal M, Archambault-Schexnayder J, Kuan JCW. 1983. Bile acid synthesis by cultured hepatocytes: inhibition by mevinolin but not by bile acids. *J Biol Chem* 258: 4079-4082.
 18. Stravitz RT, Hylemon PB, Heuman DM, Hagey LR, Schteingart CD, Ton-Nu H-T, Hoffman AF, Vlahcevic ZR. 1993. Transcriptional regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA by conjugated bile acids in primary cultures of rat hepatocytes. *J Biol Chem* 268: 13987-13993.
 19. Kwekkeboom J, Princen HMG, Van Voorthuizen EM, Kempen HJM. 1990. Bile acids exert negative feedback control on bile acid synthesis in cultured pig hepatocytes by suppression of cholesterol 7 α -hydroxylase. *Hepatology* 12: 1209-1215.
 20. Everson GT, Polokoff MA. 1986. A human hepatoma line exhibiting defects in bile acid synthesis and conjugation. *J Biol Chem* 261: 2197-2201.
 21. Yang JL, Kim YH, Lee HS, Lee MS, Moon YK. 2003. Barley beta-glucan lowers serum cholesterol 7 α -hydroxylase activity and mRNA abundance in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 49: 381-387.
 22. Anderson JW. 1985. Physiological and metabolic effects of dietary fiber. *Fed Proc* 44: 2902-2906.
 23. Moundras C, Demigne C, Mazur A, Remesy C. 1995. The cholesterol lowering effect of steroid sequestrants is modulated by large intestine fermentation. *J Nutr Biochem* 6: 158-162.
 24. Nishimura N, Nishikawa H, Kiriya S. 1993. Ileorectostomy or cecectomy but not colectomy abolishes the plasma cholesterol-lowering effect of dietary beet fiber in rats. *J Nutr* 123: 1260-1269.
 25. Hara H, Haga S, Takanori K, Kiriya S. 1998. Fermentation products of sugar-beet fiber by cecal bacteria lower plasma cholesterol concentration in rats. *J Nutr* 128: 688-693.
 26. Hara H, Haga S, Aoyama Y, Kiriya S. 1999. Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver. *J Nutr* 129: 942-948.
 27. Lin Y, Vonk RJ, Slooff MJ, Kuipers F, Smit MJ. 1995. Differences in propionate-induced inhibition of cholesterol and triacylglycerol synthesis between human and rat hepatocytes in primary culture. *Br J Nutr* 74: 197-207.
 28. Nishina PM, Freedl RA. 1990. Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *J Nutr* 120: 668-673.
 29. Goodlad RA, Ratcliffe B, Fordham JP, Ghatei MA, Domin J, Bloom SR, Wright NA. 1989. Plasma enteroglucagon, gastrin and peptide YY in conventional and germ-free rats refed with a fiber-free or fiber-supplemented diet. *Q J Exp Physiol* 74: 437-442.
 30. Kennedy HJ, Sarson DL, Bloom SR, Truelove SC. 1982. Gut hormone responses in subjects with a permanent ileostomy. *Digestion* 24: 133-136.
 31. Cho WK, Mennone A, Rydberg SA, Boyer JL. 1997. Bombesin stimulates bicarbonate secretion from rat cholangiocytes: implications for neural regulation of bile secretion. *Gastroenterology* 113: 311-321.
 32. Farouk M, Geoghegan JG, Pruthi RS, Thomson HJ, Pappas TN, Meyers WC. 1992. Intracerebroventricular neuropeptide Y stimulates bile secretion via a vagal mechanism. *Gut* 33: 1562-1565.
 33. Gebhard RL, Morley JE, Prigge WF, Goodman MW, Prasad C. 1981. TRH and histidyl-proline diketopiperazine inhibit cholesterol synthesis in dog intestine. *Peptides* 2: 137-140.
 34. Levy-Wilson B, Fortier C, Blackhart BD, McCarthy BJ. 1988. DNase I- and micrococcal nuclease-hypersensitive sites in the human apolipoprotein B gene are tissue specific. *Mol Cell Biol* 8: 71-80.
 35. Pohlodek K, Galbavy S, Bartosova M, Mucha V, Holoman K, Pastorek J, Pastorekova S. 2004. Semi-quantitative RT-PCR assessment of molecular markers in breast large-core needle biopsies. *Neoplasma* 51: 415-421.
 37. Twisk J, Lehmann EM, Princen HMG. 1993. Differential feedback regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA and transcriptional activity by rat bile acids in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Biochem J* 290: 685-691.
 38. Princen HMG, Meijer P, Hofstee B. 1989. Dexamethasone regulates bile acid synthesis in monolayer cultures of rat hepatocytes by induction of cholesterol 7 α -hydroxylase. *Biochem J* 262: 341-348.
 39. Lavery DJ, Schibler U. 1993. Circadian transcription of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene may involve the liver-enriched bZIP protein DBP. *Genes Dev* 7: 1871-1884.
 40. Rudel L, Deckelman C, Wilson M, Scobey M, Anderson R. 1994. Dietary cholesterol and down-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and cholesterol absorption in African green monkeys. *J Clin Invest* 93: 2463-2472.
 41. Poorman JA, Buck RA, Smith SA, Overturf ML, Loose-Mitchell DS. 1993. Bile acid excretion and cholesterol 7 α -hydroxylase expression in hypercholesterolemia-resistant rabbits. *J Lipid Res* 34: 1675-1685.
 42. Bertolotti M, Abate N, Loria P, Dilengite M, Carubbi F, Pinetti A, Digrisolo A, Carulli N. 1991. Regulation of bile acid synthesis in humans: effect of treatment with bile acids, cholestyramine, or simvastatin on cholesterol 7 α -

- hydroxylase rats *in vivo*. *Hepatology* 14: 830-837.
43. Karam WG, Chiang JYL. 1994. Expression and purification of human cholesterol 7 α -hydroxylase in *Escherichia coli*. *J Lipid Res* 35: 1222-1231.
 44. Cooper AD, Craig WY, Taniguchi T, Everson GT. 1994. Characteristics and regulation of bile salts synthesis and secretion by human hepatoma HepG2 cells. *Hepatology* 20: 1522-1531.
 45. Anderson JW, Deakins DA, Floore TL, Smith BM, Whitis SE. 1990. Dietary fiber and coronary heart disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 29: 95-147.
 46. Jackson KA, Sute DA, Topping DL. 1994. Oat bran, barley and malted barley lower plasma cholesterol relative to wheat bran but differ in their effects on liver cholesterol in rats fed diets with and without cholesterol. *J Nutr* 124: 1678-1684.
 47. Illman RJ, Trimble RP, Snoswell AM, Topping DL. 1982. Daily variations in the concentrations of volatile fatty acids in the blood vessels of rats fed diets high in pectin and bran. *Nutr Rep Int* 26: 439-446.
 48. Nishina PM, Freedland RA. 1990. Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *J Nutr* 120: 668-673.
 49. Anderson JW, Bridges SR. 1984. Short-chain fatty acid fermentation products of plant fiber affect glucose metabolism of isolated rat hepatocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 177: 372-376.
 50. Chen WJ, Anderson JW, Jennings D. 1984. Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 175: 215-218.
 51. Wright RS, Anderson JW, Bridges SR. 1990. Propionate inhibits hepatocyte lipid synthesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 195: 26-29.
 52. Demigne C, Mor C, Levrat MA, Besson C, Moundras C, Remesy C. 1995. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br J Nutr* 74: 209-219.
 53. Kishimoto Y, Wakabayashi S, Takeda H. 1995. Effects of intravenous injection and intraperitoneal continual administration of sodium propionate on serum cholesterol levels in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 41: 73-81.
 54. Levrat MA, Favier ML, Moundras C, Remesy C, Demigne C, Morand C. 1994. Role of dietary propionic acid and bile acid excretion in the hypocholesterolemic effects of oligosaccharides in rats. *J Nutr* 124: 531-538.
 55. Beaulieu KE, McBurney MI. 1992. Changes in pig serum lipids, nutrient digestibility and sterol excretion during cecal infusion of propionate. *J Nutr* 122: 241-245.
 56. Arjmi BH, Craig J, Nathani S, Reeves RD. 1992. Soluble dietary fiber and cholesterol influence *in vivo* hepatic and intestinal cholesterol biosynthesis in rats. *J Nutr* 122: 1559-1565.
 57. Stark AH, Madar Z. 1993. *In vitro* production of short-chain fatty acids by bacterial fermentation of dietary fiber compared with effects of those fibers on hepatic sterol synthesis in rats. *J Nutr* 123: 2166-2173.
 58. Illman RJ, Topping DL. 1985. Effects of dietary oat bran on fecal steroid excretion, plasma volatile fatty acids and lipid synthesis in rats. *Nutr Res* 5: 839-846.
 59. Illman RJ, Topping DL, McIntosh GH, Trimble RP, Storer GB, Taylor MN, Cheng BQ. 1988. Hypocholesterolemic effects of dietary propionate: studies in whole animals and perfused rat liver. *Ann Nutr Metab* 32: 95-107.

(2005년 2월 28일 접수; 2005년 6월 2일 채택)