

갑상선호르몬이 담즙수송체인 Bile Salt Export Pump 발현에 미치는 영향

안화영^{1,2} · 이관재² · 김순희¹ · 김은기¹ · 강아름¹ · 임정아¹ · 윤지원^{1,3} · 김경원^{1,3} · 박도준¹ · 조보연⁴ · 박영주^{1,2}

서울대학교 의과대학 내과학교실¹, 분당서울대학교병원 내과², 서울대학교병원 헬스케어시스템 강남센터 내과³, 중앙의대 중앙대학교병원 내과학교실⁴

Effect of Thyroid Hormone to the Expression of Bile Salt Export Pump

Hwa Young Ahn^{1,2}, Kwan Jae Lee², Soon Hui Kim¹, Eun Ky Kim¹, Ah Reum Kang¹, Jung Ah Lim¹, Ji Won Yoon^{1,3}, Kyung Won Kim^{1,3}, Do Joon Park¹, Bo Youn Cho⁴, Young Joo Park^{1,2}

Department of Internal Medicine¹, Seoul National University College of Medicine, Seoul; Department of Internal Medicine², Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam; Department of Internal Medicine³, Seoul National University, Healthcare System, Seoul; Department of Internal Medicine⁴, Chung-Ang University Hospital, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Background: Bile acids were important for the regulation of cholesterol homeostasis. Thyroid hormone increased the expression of CYP7A1 (cholesterol 7 α -hydroxylase), catalyzing the first step in the biosynthesis of bile acids. However, the effect of thyroid hormone on bile acid export has not been previously assessed. The principal objective of this study is to evaluate the effects of thyroid hormone on the bile salt export pump (BSEP).

Methods: Thyroid hormone, T3 (1 mg/g) was administered to male mice via intraperitoneal injection. After 6 hours and 5 days of T3 treatment, we measured serum total and LDL cholesterol and hepatobiliary bile acid concentrations. We assessed the changes associated with bile acid synthesis and transport. In order to evaluate the direct effect of thyroid hormone, we assessed the changes in the levels of BSEP protein after T3 administration in human hepatoma cells.

Results: Serum total and LDL cholesterol were reduced and hepatobiliary bile acid concentrations were increased following T3 treatment. Expressions of Cyp7a1 and BSEP mRNA were increased following T3 treatment. The levels of the BSEP protein in the mouse liver as well as in the human hepatoma cells were increased after T3 treatment.

Conclusion: Thyroid hormone can regulate LDL cholesterol metabolism. It increases bile acid synthesis and the excretion of bile acids via increased BSEP expression. (*Endocrinol Metab* 26:232-238, 2011)

Key Words: Bile acids, Cholesterol, Thyroid hormone

서론

체내 콜레스테롤은 음식에 함유되었거나 담즙과 함께 배설된 콜레스테롤이 장에서 흡수 혹은 재흡수 되거나, 주로 간에서 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase와 synthase에 의하여 생합성된 것으로 구성된다. 혈중 콜레스테롤은 간세포의 저밀도 지단백 수용체(low density lipoprotein receptor)를 통하여 간으로

이동하는데, 생합성되거나 흡수된 간세포내의 콜레스테롤은 주로 간에서 담즙산으로 분해되어 담관을 통해 배출되며, 일부 대사되지 않은 콜레스테롤 자체가 담즙에 섞여서 담관으로 배출됨으로써 대사된다. 즉, 담즙산의 생성 및 분비는 체내의 콜레스테롤을 대사시켜 외부로 배출하는 주요 경로 역할을 담당하고 있다. 뿐만 아니라, 담즙산염은 장내에서 콜레스테롤 및 지용성 비타민을 용해하여 흡수되기 쉬운 형태로 만드는 역할도 하기 때문에 장내 콜레스테롤의

Received: 13 June 2011, Accepted: 22 July 2011

Corresponding author: Young Joo Park

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, 101 Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea

Tel: +82-2-2072-4183, Fax: +82-2-764-2199, E-mail: yjparkmd@snu.ac.kr

※ 본 연구는 분당서울대학교병원의 지원으로 이루어진 것임(Grant No. 06-2009-118).

Copyright © 2011 Korean Endocrine Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

체내 흡수 조절에도 중요한 영향을 미치고 있어, 콜레스테롤 체내 항상성 유지에 담즙산의 생성 및 대사 과정이 매우 중요하다[1].

일차 담즙산인 cholic acid와 chenodeoxycholic acid는 주로 간에서 합성되며, glycine 및 taurine과 결합하여 담즙산염을 형성하고, 담즙을 통해 담관으로 배출된다(Fig. 1). 담관으로 배출된 담즙산염은 장내에서 세균에 의해 이차성 담즙산으로 변환되고, 소장 중 회장에서 재흡수되어 문맥을 통해 간으로 이동하여 재이용되고 일부는 대변을 통해 배출된다[2].

이 과정 중에 가장 중요한 반응속도 결정단계(rate-limiting step)로는 콜레스테롤이 담즙산으로 대사되는 과정으로 알려져 있다. 이 담즙 생성 과정에 가장 중요한 효소는 cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1)이며[3] 음식으로 섭취한 콜레스테롤에 의해 활성화되고 담즙산에 의해 억제된다[4]. CYP7A1의 활성은 되먹임 저해(feedback repression)에 의해 주로 조절되고, 되먹임 저해 이전에 중요한 역할을 하는 것은 담즙산의 핵수용체인 farnesoid X receptor (FXR), liver X receptor α (LXR α)이다[5]. 담즙산의 생산이 증가하면 담즙산과 FXR의 결합이 증가되면서 FXR이 활성화되고, 활성화된 FXR은 small heterodimer partner (SHP)의 발현을 증가시키게 된다. FXR에 의해 SHP의 발현이 증가하게 되면 SHP는 CYP7A1의 활성을 증가시키는 역할을 하는 liver receptor homolog-1 (LRH-1)에 결합하여 LRH-1의 작용을 억제함으로써 CYP7A1의 발현을 감소시켜 담즙산의 생성을 억제하게 된다[6].

최근, 간세포에서의 담즙 생성 과정뿐만 아니라, 담즙의 담관으로의 수송을 담당하는 담즙수송체의 활성화도 담즙의 생성 및 배출에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려졌다[7]. 간세포에서 담관으로 배출될 때 주로 이용되는 통로로 알려져 있는 것은 bile salt export

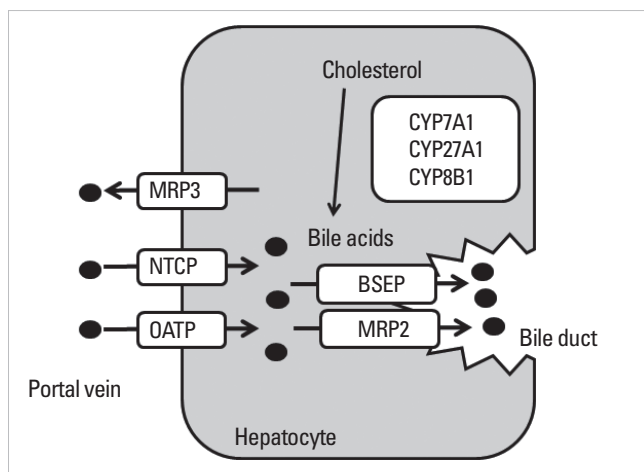


Fig. 1. Genes related to bile acid synthesis and transport in hepatocyte. BSEP, bile salt export pump; CYP7A1, cholesterol 7 α hydroxylase; CYP27A1, sterol 27 hydroxylase; CYP8B1, sterol 12 α hydroxylase; MRP, multidrug-resistance associated protein; NTCP, Na-dependent taurocholate cotransport peptide; OATP, organic anion transporting polypeptide.

pump (BSEP, ABCB11)이며[8], 이외에도 multidrug resistance associated protein-2 (MRP2, ABCC2)[9]와 multidrug resistance protein 1 (MDR1, ABCB1)[10]이 담즙산의 배출을 담당하고 있다. BSEP은 아직까지 그 조절 인자들이 잘 규명되지 않았는데, 현재까지 FXR, LRH-1, vitamin D receptor (VDR)의 활성화가 BSEP의 발현을 조절한다고 알려져 있다[8].

갑상선호르몬은 간에서의 콜레스테롤 대사를 조절하는 주요 물질 중 하나로, 콜레스테롤 대사를 조절하는 세가지 경로에 작용하는 것으로 알려져 있는데 간에서 콜레스테롤 생합성에 관여하는 효소인 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase를 활성화하여 간내 콜레스테롤 생합성을 증가시키며, 저밀도지단백 콜레스테롤 수용체의 수를 증가시켜 저밀도지단백 콜레스테롤의 간내 흡수를 증가시켜서 혈중 콜레스테롤 농도는 감소시키지만, 결국 간내 콜레스테롤의 농도는 증가시키게 된다. 그러나 갑상선호르몬은 담즙산 생성에 중요한 효소인 CYP7A1를 동시에 활성화시킴으로써 간에서 증가된 콜레스테롤을 이용하여 담즙산 생성을 증가시킴으로써 콜레스테롤의 배출을 유도하여 결국 간의 콜레스테롤 농도를 감소시킨다[11]. 이전 연구 결과에서 갑상선호르몬의 활성화 형태인 triiodo-L-thyronine (T3)을 뇌하수체 절제술을 시행한 쥐에 투여하였을 때 30분 후 CYP7A1의 발현이 급격히 증가하는 소견을 보여 갑상선호르몬이 직접적으로 CYP7A1의 발현을 조절하는 인자로 알려져 있으며[12, 13], CYP7A1 promoter에 TRE가 존재하는 것도 밝혀져 있다[14, 15].

그런데 생성이 증가된 담즙산이 담즙으로 배설되기 위해서는 담즙산 수송체의 활성 조절도 중요한 역할을 담당하는데, 갑상선호르몬 투여 후 담즙산 생산이 증가하므로, 갑상선호르몬이 담즙산 수송 수용체 활동 조절에도 관여할 가능성이 제기되고 있다. 그러나 아직까지 그 조절 기전에 대해서는 알려진 바가 없다. 이에 본 연구에서는 담즙산 분비를 담당하는 수용체의 발현을 확인하고 이에 갑상선호르몬이 어떠한 영향을 주는지에 대해 확인해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물 및 약물 투여

12-14 주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 온도(22 \pm 2°C)와 명암(12시간 주기)이 조절되는 특정병원균부재(specific pathogen free, SFP) 환경의 동물실험실에서 사육 하였다. 물과 식이를 제한 없이 공급하였고 실험을 종료하기 6시간 전부터 금식을 시켰다. 복강 내 마취제를 주사하여 마취를 시행한 후에 하대정맥(inferior vena cava)에서 채혈을 하고 조직을 적출하였다. 동물 관리와 조작은 분당서울대학교병원의 동물관리 규정에 따랐다. 마우스는 한 그룹당 4-5마리로 대조군을 포함하여 3그룹으로 나누어 갑상선호르몬인 T3 (3,5,3'-triiodo-L-thyronine; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)를 마

우스의 체중 g당 1 mg을 1일 1회 복강 내 주입하였다. 각 실험군은 3회 반복하였다. T3 투여 시간에 따라 대조군, 6시간 및 5일 투여군으로 나누어 T3를 주입한 후 조직을 적출하였다. T3는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후 생리식염수를 넣어 DMSO 농도를 20%로 맞추었고, 갑상선호르몬의 농도는 100 mg/L로 만들었다.

2. 인간 간종양 세포(human hepatoma cell, HepG2) 배양 및

갑상선호르몬 처리

HepG2 세포는 37°C, 5% CO₂ 하에서 minimum essential media (MEM), 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 혼합한 배지에 배양하였다. 시간대별 갑상선호르몬 처리를 위해 4개의 60 mm 배양접시에 1×10^5 개의 세포를 분주하여 70% 정도 자랐을 때 5% charcoal stripped 배지로 바꾸어 주고, 24시간 후 100 nM의 갑상선호르몬이 포함된 배양액을 각각 대조군, 1, 6, 24시간 군에 대해 시간 별로 처리하였다.

3. 혈중 콜레스테롤 및 간담도 조직의 담즙산 농도 측정

혈액은 채혈 후 3000 rpm으로 15분간 원심 분리한 후 혈청만 따로 보관하였다. 시중에서 구입한 키트(Thermo DMA Inc., St. Louisville, CO, USA)를 이용하여 총 콜레스테롤 및 저밀도지단백 콜레스테롤을 측정하였다.

간담계 담즙산(hepatobiliary bile acid) 농도를 측정하기 위하여, 간조직과 담낭을 포함한 간담관 조직을 75% 에탄올 3 mL에 넣고 분쇄한 후 50°C에서 2시간 배양하였다. 이후 3000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후에 상층액을 얻고 이를 bile acid L3K assay kit (Diagnostic Chemicals, Oxford, CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

4. 마이크로어레이 분석법

갑상선호르몬을 투여한 후 간의 유전자 발현양상을 보기 위해 affymetrix chip (Affymetrix - GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array, Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 microarray를 수행하였다. 갑상선호르몬을 5일간 투여한 마우스와 대조군 마우스의 간에서 RNA를 추출하여 DNA chip을 제작하였다. Data preprocessing 작업은 Affymetrix사의 Expression Console™ Software를 사용하였다. 각 처치 군에서 대조군에 비해 유의하게 변하는 유전자를 찾기 위해 통계량으로는 T-test statistic을 사용하였다. 통계량의 유의성 검정을 위해 class label을 1000회 permutation 시행하여 생성한 null distribution으로부터 P-value를 추정하였다. 본 P-value를 바탕으로 하여 두 군에서 유의하게 변한 유전자의 리스트를 추출하였다.

5. RNA분리 및 노던 블롯 분석과 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 분석

Trizol® Reagents (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 간

조직에서 RNA를 분리하였다.

노던 블롯에 사용된 Cyp7A1과 BSEP에 대한 방사선 표지 소식자는 (α -32P)2'-deoxycytidine 5'-triphosphate (dCTP)를 이용한 임의 프라이머 라벨방법으로 제작하였다. 각 유전자의 시동체는 마우스 Cyp7a1-F(forward), CAA GAA CCT GTA CAT GAG GGA C; mouse Cyp7a1-R(reverse), CAC TTC TTC AGA GGC TGC TTT C; 마우스 BSEP-F(forward), GAG TGG TGG GCA GAA GCA AA; mouse BSEP-R(reverse), TCA GGT AGC CAT GTC CAG AA로 제작하였다.

20 µg의 RNA를 1% 포르말데하이드-아가로스 겔에 전기영동을 시행한 후 나일론 막으로 이동시켰다. RNA가 이동된 나일론 막은 UVcross-linker를 사용하여 RNA를 나일론 막에 고정하였다. 이후 나일론 막을 방사선 표지 소식자와 24시간 동안 65°C에서 보합결합(hybridization)시킨 후 여러 차례 정해진 규칙에 따라 세정을 시행하였다. 세정이 끝난 나일론 막은 -70°C에서 24-48시간 동안 X-ray 필름에 노출시킨 후 mRNA 발현을 밀도계측기를 이용하여 분석하였다.

분리된 RNA에서 superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 cDNA를 제작하였다. 마우스 MRP2 유전자에 대한 시동체는 F (forward), CTG AGT GCT TGG ACC AGT GA; R (reverse), CAA AGT CTG GGG GAG TGT GT로 제작하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation, 94°C에서 30초간 denaturation, 68°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 마지막 30초간 elongation의 조건으로 30 cycle을 실시하고, 마지막 주기에는 72°C에서 5분간 extension을 시켰다.

6. 웨스턴 블롯 분석

완충액(20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 25 mM β -glycerophosphate, 1% Triton X-100, 10% glycerol)에 단백질 분해 효소 억제제를 처리하여 간조직에서 단백질을 추출하였다. 각 시료를 완충액과 섞어 5초간 10회 초음파분해(sonication) 한 후 30분간 얼음 위에서 식혔다. 이후 상층액만 분리하여 BCA법을 이용하여 정량화하였다. 인간 간종양세포는 정해진 갑상선호르몬 처리 시간이 지난 후 차가운 PBS용액으로 세포를 2회 세척한 후, 단백질 분해 효소 억제제를 첨가한 세포용해완충액을 이용하여 세포를 모아 4°C, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 단백질을 포함하는 상층액을 분리하였다. 마찬가지로 정량은 BCA법을 이용하였다.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide 8% 겔에서 전기영동 후 nitrocellulose membrane (Whatman, Schleicher and Schuell, Dassel, Germany)으로 이동시켰다. 5% 탈지유를 이용하여 반응을 차단하고 BSEP 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), actin (Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 4°C에서 16시간 반응시킨 후, horseradish peroxidase가 표지된 이차 항체(anti-rabbit, Santa Cruz Biotechnology, sc-2004, Santa Cruz, CA, USA)로 상온에서 1시간 반응시켰다. ECL (GE Healthcare, Milwaukee, WI)을 사용하여 단백질 발현을 확인하였다.

결 과

1. 갑상선호르몬 투여 후 혈중 콜레스테롤의 감소 및 간담조직

담즙산의 증가

마우스에 갑상선호르몬 1 mg/g를 복강 투여 후 6시간 및 5일 뒤에 혈중 콜레스테롤을 측정해 본 결과(Fig. 2A) 혈중 콜레스테롤은 6시간 후에는 약간 감소하는 경향을 보였고, 5일째에는 유의하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 저밀도지단백 콜레스테롤 역시 5일째에 유의하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). 갑상선호르몬이 간에서 콜레스테롤의 대사를 조절하는 기전 중 Cyp7a1의 발현 증가를 통해 담즙산 생산을 증가시켜서 콜레스테롤을 감소시키는 기전이 존재함이 알려져 있는데, 이를 확인하기 위해 간담조직 내의 담즙산을 측정한 결과 갑상선호르몬 투여 후 5일째에 담즙산이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2C). 이러한 결과를 바탕으로 담즙산 생산 및 배출에 관여하는 다른 유전자들에 대해서는 갑상선호르몬 투여 후 어떤 변화가 생기는지 알아보기 위해 마이크로

어레이 분석을 시행해 보았다.

2. 마이크로어레이(microarray) 분석을 통해 담즙산의 생산 및 배출에 관여하는 유전자의 발현 변화 관찰

갑상선호르몬이 간조직에서 담즙산 생산 및 배출을 조절할 가능성을 확인하기 위하여 갑상선호르몬을 5일간 투여한 마우스와 정상 갑상선기능인 마우스의 간조직에서 RNA를 분리하여 마이크로어레이 분석을 위한 유전자 칩을 제작하였고 간세포에서의 담즙 생산 및 이동에 관련된 유전자들(Fig. 1)의 발현 양상을 분석하였다. 분석 결과 담즙산 생산에 관련된 Cyp7a1, Cyp27a1, Cyp8b1뿐 아니라 배출에 관여하는 BSEP의 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Table 1). 또 다른 담즙산 수송체인 MRP2의 발현 역시 증가하는 경향을 보여 주었으나, 중합효소 연쇄반응으로 확인하였을 때에 뚜렷한 발현의 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 3B). 이러한 결과는 갑상선호르몬이 간에서 담즙산의 생산 및 배출을 증가시킴으로써 콜레스테롤 감소에 기여할 가능성이 있음을 시사하는 소견으로 생각되었다.

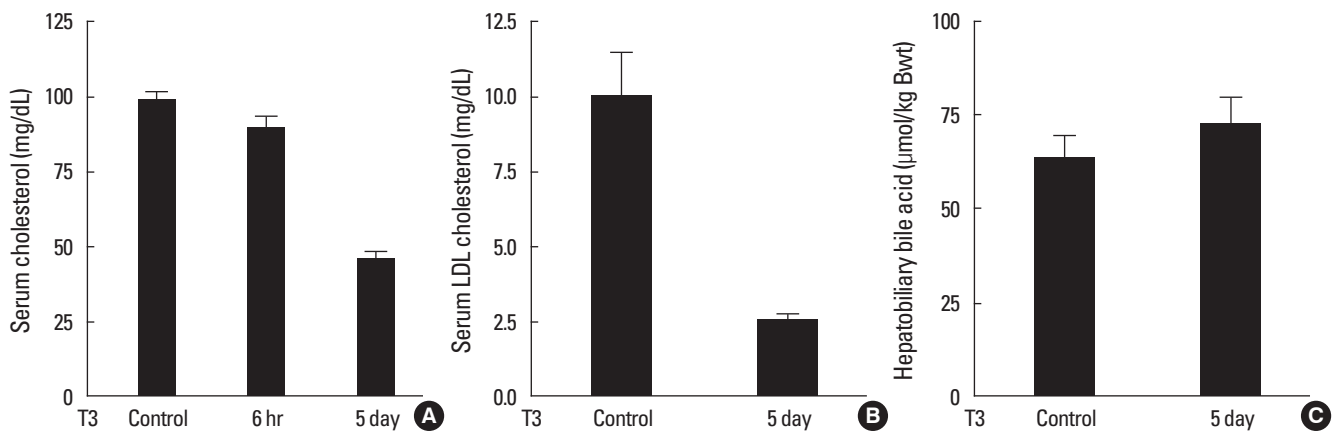


Fig. 2. Effect of thyroid hormone to serum cholesterol (A), LDL cholesterol (B) and hepatobiliary bile acid (C) level. LDL, low density lipoprotein; T3, 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (thyroid hormone).

Table 1. Differentially expressed genes involved in bile acid synthesis and transport in mouse hepatocytes after thyroid hormone treatment

Gene symbol	Gene expression	Fold changes	P-value	mRNA accession
Cyp7a1	Cholesterol 7α hydroxylase	2.801	0.000	NM_007824.2
Cyp27a1	Sterol 27 hydroxylase	1.810	0.021	NM_024264.4
Cyp8b1	Sterol 12α hydroxylase	0.632	0.010	NM_010012.3
MDR3	Multidrug-resistance protein3	0.133	0.465	NM_000443.3
BSEP	Bile salt export pump	1.424	0.021	NM_021022.3
MRP2	Multidrug-resistance associated protein2	0.656	0.032	NM_013806.2
OATP1b2	Organic Anion Transporting Polypeptide 1b2	0.910	0.085	NM_020495.1
NTCP	Na-dependent taurocholate cotransport peptide	1.282	0.060	NM_011387.2
FXR	Farnesoid X receptor	0.007	0.967	NM_001163700.1
VDR	Vitamin D receptor	-0.028	0.871	NM_009504.4
LRH-1	Liver receptor homolog-1	-0.128	0.479	NM_030676.3
PXR	Pregnane X receptor	-0.498	0.048	NM_001098404.1
CAR	Constitutive androstane receptor	-0.846	0.013	NM_009803.4

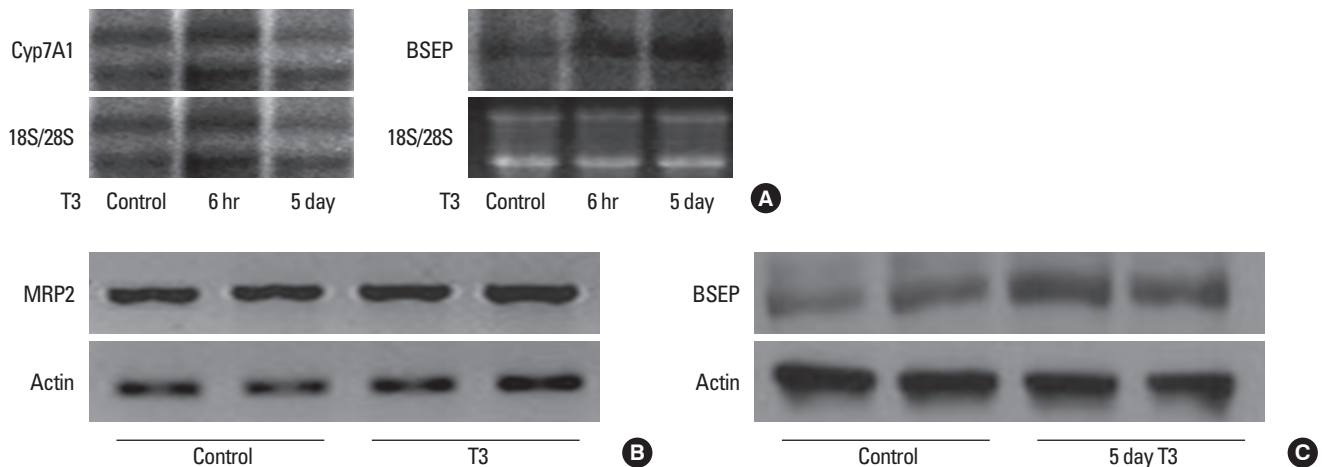


Fig. 3. Effect of thyroid hormone to Cyp7a1, BSEP and MRP2 expression. Cyp7a1 and BSEP mRNA expression of mouse liver were increased after T3 treatment in northern blot analysis (A), MRP2 mRNA expression of mouse liver after 5 days of T3 treatment did not change in RT-PCR analysis (B), protein level of BSEP in mouse liver was also increased after 5 days of T3 treatment in western blot analysis (C). Cyp7a1, cholesterol 7 α hydroxylase; BSEP, bile salt export pump; MRP2, -resistance associated protein 2; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; T3, 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (thyroid hormone).

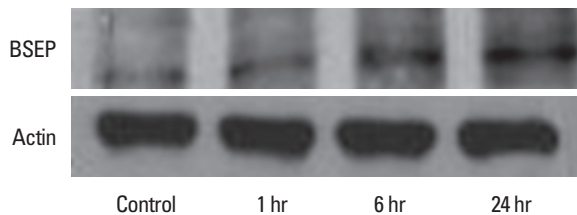


Fig. 4. Effect of thyroid hormone to protein levels of BSEP. Protein levels of BSEP were increased after T3 treatment in human hepatoma cells. BSEP, bile salt export pump; T3, 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (thyroid hormone).

3. 갑상선호르몬에 의한 마우스 간조직에서의 Cyp7a1, BSEP의 mRNA 및 BSEP 단백질 발현 변화

마이크로어레이에서 확인한 결과를 마우스 간조직에서 확인하기 위해 대조군, 6시간 및 5일간 갑상선호르몬을 처리한 마우스의 간조직에서 RNA를 분리하여 노던 블롯을 시행하였고, Cyp7a1은 갑상선호르몬 투여 6시간째 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며 BSEP은 5일간 갑상선호르몬 투여한 군에서 발현이 가장 많이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). BSEP 단백질 발현에 대해 갑상선호르몬 투여 대조군과 5일 투여군의 단백질 발현 정도를 비교해 보았을 때에도 5일간 갑상선호르몬을 투여한 마우스의 간조직에서 BSEP 단백질 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3C).

4. 인간 간종양 세포에서 갑상선호르몬에 의한 BSEP 단백질 발현의 변화

갑상선호르몬에 의한 BSEP 단백질 발현의 증가가 갑상선호르몬에 의한 직접적인 영향인지를 확인하기 위해 인간 간종양 세포를 배양하고 갑상선호르몬을 1, 6, 24시간 처리한 후 BSEP 단백질 발현을 확인한 결과 시간에 따라 BSEP의 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

5. 마이크로어레이(microarray) 분석을 통한 갑상선호르몬 투여에 따른 BSEP 전사 인자 발현 변화 관찰

마이크로어레이 분석을 통해 BSEP의 전사 조절 인자로 알려져 있는 FXR, VDR, LRH-1의 발현 변화를 관찰해 본 결과, 갑상선호르몬 투여에 따른 FXR, VDR, LRH-1의 발현은 변화가 없는 것으로 나타났다(Table 1).

고 찰

본 연구에서 갑상선호르몬이 혈중 저밀도지단백 콜레스테롤 농도를 감소시키고, 간담도의 담즙산을 증가시킬 뿐 만 아니라, 마우스의 간조직에서 Cyp7a1의 mRNA 발현을 증가시키고 BSEP의 mRNA와 단백질의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 이는 갑상선호르몬이 담즙의 생산 증가와 더불어 배출 증가를 유도하여 결국 혈중 저밀도지단백 콜레스테롤을 낮추는 기전에 주요 역할을 담당하고 있음을 시사하는 것이다.

담즙의 형성은 간세포의 중요한 역할 중 하나로 담즙 형성 및 분비를 통해 담즙산 및 담즙에 녹는 여러 화합물을 간내 혈액으로부터 담관으로 이동시키는 역할을 하게 된다[16].

BSEP은 160-kD의 단백질로 ATP binding cassette superfamily에 속하며 ACBC11이라고도 불리는데, 간세포의 모세담관막(canalicular membrane)에 존재하면서, ATP 의존적으로 담즙산 분비에 관여하는 것으로 알려져 있다[17].

지금까지 알려진 BSEP의 발현을 조절하는 인자로는 FXR, LRH-1, VDR 등이 있다. 이 중 FXR이 가장 주요한 전사조절 인자인데 담즙산이 리간드로 작용하여 FXR을 활성화시키면, FXR은 RXR과 이형 접합체를 이루어 BSEP promoter에 결합하여 BSEP의 발현을 증가

시키는 것으로 알려져 있다[18,19]. FXR을 결핍시킨 마우스에서는 BSEP의 발현이 감소하는 소견을 보인 결과 역시 이러한 사실을 뒷받침해 주고 있다[20]. LRH-1 역시 BSEP의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있으며[21], LRH-1이 결핍된 마우스에서는 BSEP의 발현이 감소하는 소견을 보였다[22].

반대로 VDR의 경우 vitamin D3가 결합하여 활성화 되면 직접적으로 FXR에 결합하여 FXR의 작용을 방해함으로써 BSEP의 발현 증가를 억제하게 된다[23].

본 연구결과에서는 갑상선호르몬이 BSEP의 발현을 증가시키는 것으로 나타났으나 BSEP promoter에는 갑상선호르몬반응부위(thyroid hormone response element, TRE)가 존재하는 것이 알려져 있지 않기 때문에[18,24], 갑상선호르몬에 의한 BSEP의 발현 증가는 갑상선호르몬의 직접적인 작용일 가능성은 떨어질 것으로 보인다. 그러나 갑상선호르몬이 Cyp7a1의 발현을 증가시키고, 이에 따라 담즙산 생산이 증가하게 되면서 증가된 담즙산에 의해 FXR이 활성화되면서 BSEP의 발현을 증가시켰을 가능성을 생각해 볼 수 있었고, 또 다른 가능성으로는 갑상선호르몬 및 갑상선호르몬 수용체가 BSEP의 발현을 증가시키는 전사인자를 활성화시켰을 가능성에 대해서도 고려해 볼 수 있었다. 이러한 가능성을 확인하기 위하여 갑상선호르몬 투여 후 BSEP 전사 조절 인자의 유전자 발현 변화를 간 조직의 마이크로어레이 분석을 통해 살펴 보았지만 각 인자들의 유전자 발현의 차이를 발견하지 못하였다. 이러한 가설을 확실히 증명하기 위해서는 BSEP의 발현을 조절하는 전사인자들에 대한 갑상선호르몬의 작용에 대해 해당 인자의 노던 블롯 분석 혹은 중합효소 연쇄반응을 통한 mRNA의 발현 변화 및 웨스턴 블롯 분석을 통한 단백질 발현 확인이 필요하겠다.

BSEP와 더불어 담즙산 분비 통로로서 MRP2가 중요한 역할을 담당하므로, 이의 발현 변화를 함께 살펴보았다. MRP2의 전사를 조절하는 인자 중 FXR이 BSEP의 전사 조절에도 관여하여[25], 두 개의 담즙 분비 통로의 발현이 비슷한 양상으로 조절되어 갑상선 호르몬에 의해서도 BSEP와 같은 양상으로 변화할 가능성이 있으나, 예상과 달리 갑상선호르몬 투여 후 mRNA 발현에 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 3B). 그런데, pregnane X receptor (PXR), constitutive X receptor (CAR)는 MRP2에서만 그 역할이 밝혀진 전사 조절 인자인데[26], 마이크로어레이 분석에서 갑상선 호르몬 투여 후 PXR과 CAR은 오히려 감소하는 경향이 관찰되어(Table 1), BSEP의 발현증가를 유도한 다른 전사 조절 인자들의 영향을 감소시키는 결과를 초래하여, 결과적으로 갑상선 호르몬 투여 후 MRP2의 발현이 변화하지 않을 가능성을 유추하여 볼 수 있겠다. 그러나 이를 증명하기 위해서는 역시 해당 조절 인자들에 대한 추가 실험이 필요하겠다. 또한, 이전의 연구에서 보고된 바와 같이 성별에 따른 MRP2의 발현 양상의 차이가 있고[27], 본 연구는 수컷 마우스만을 대상으로 하였으므로 갑상선 호르몬이 MRP2의 발현에 미치는 영향과 기전을 규명하기

위해서는 추가적인 연구가 필요하겠다.

요약하면 본 연구를 통해 갑상선호르몬이 담즙산 생산을 증가시킬 뿐 아니라, BSEP 발현을 증가시킴으로써 배출 증가를 촉진하여 혈중 저밀도지단백 콜레스테롤을 감소시키는 기전이 존재함을 알 수 있었다.

요 약

배경: 담즙은 콜레스테롤을 재료로 간세포에서 합성되어 담관을 통해 장내로 배출되며, 대부분은 회장에서 재흡수되지만, 일부는 대변으로 배출되는데 이러한 과정을 통해 콜레스테롤을 체외로 배출하는 역할을 하여 콜레스테롤 항상성 유지에 기여한다. 갑상선호르몬은 담즙산 생산에 중요한 CYP7A1 효소의 발현을 증가시켜 담즙산 생산을 증가시키는 것으로 알려져 있으나 담즙산 분비에 관여하는 배출 과정에 어떠한 작용을 하는지에 대해서는 밝혀진 바가 없다. 이에 본 연구에서는 갑상선호르몬이 담즙산 분비를 주로 담당하는 bile salt export pump (BSEP)에 미치는 영향에 대해 살펴보고자 하였다.

방법: 수컷 마우스에 6시간 및 5일간 갑상선호르몬을 복강 내 투여한 후 혈중 콜레스테롤 및 간담관 조직의 담즙산을 측정하였고, 간조직을 이용하여 관련 유전자들의 발현 변화를 관찰하였다. 갑상선호르몬에 의한 직접적 효과를 평가하기 위해 인간 간중양 세포를 이용하여 갑상선호르몬을 처리하고 BSEP 단백질의 발현 변화를 관찰하였다.

결과: 갑상선호르몬 투여 후 혈중 총 콜레스테롤 및 저밀도 지단백 콜레스테롤이 감소하였으며 간담관 조직의 담즙산은 증가하는 소견을 보였다. 담즙 생산에 관여하는 Cyp7a1와 담즙산 분비에 관여하는 BSEP은 갑상선호르몬 투여 후 증가하는 소견을 보였고, 또 다른 담즙산 분비 통로인 MRP2의 경우는 갑상선호르몬 투여에 따른 증가가 뚜렷하지 않은 소견을 보였다. BSEP의 단백질 발현 역시 갑상선호르몬 투여 시 증가하는 소견을 보였다. 갑상선호르몬이 BSEP을 발현시키는 효과가 직접적인 것인지를 평가하기 위해 인간 간중양 세포를 이용하여 갑상선호르몬 투여 후 변화를 확인한 결과 BSEP 단백질 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

결론: 본 연구를 통해 갑상선호르몬이 담즙산 생산을 증가시킬 뿐 아니라, BSEP 발현을 증가시킴으로써 배출 증가를 촉진하여 혈중 저밀도지단백 콜레스테롤을 감소시키는 기전이 존재함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Chiang JY: Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol* 40:539-551, 2004
2. Chiang JY: Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 50:1955-1966, 2009

3. Russell DW, Setchell KD: Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 31:4737-4749, 1992
4. Jelinek DE, Andersson S, Slaughter CA, Russell DW: Cloning and regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase, the rate-limiting enzyme in bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* 265:8190-8197, 1990
5. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA: A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 6:517-526, 2000
6. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ: Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 6:507-515, 2000
7. Trauner M, Boyer JL: Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83:633-671, 2003
8. Stieger B, Meier Y, Meier PJ: The bile salt export pump. *Pflugers Arch* 453: 611-620, 2007
9. Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H, Sugiyama Y: Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta* 1511: 7-16, 2001
10. Lam P, Wang R, Ling V: Bile acid transport in sister of P-glycoprotein (ABCB11) knockout mice. *Biochemistry* 44:12598-12605, 2005
11. Hashimoto K, Cohen RN, Yamada M, Markan KR, Monden T, Satoh T, Mori M, Wondisford FE: Cross-talk between thyroid hormone receptor and liver X receptor regulatory pathways is revealed in a thyroid hormone resistance mouse model. *J Biol Chem* 281:295-302, 2006
12. Ness GC, Pendleton LC, Li YC, Chiang JY: 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, 1990
13. Ness GC, Pendleton LC, Zhao Z: Thyroid hormone rapidly increases cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA levels in hypophysectomized rats. *Biochim Biophys Acta* 1214:229-233, 1994
14. Petty KJ, Desvergne B, Mitsuhashi T, Nikodem VM: Identification of a thyroid hormone response element in the malic enzyme gene. *J Biol Chem* 265:7395-7400, 1990
15. Shin DJ, Plateroti M, Samarut J, Osborne TF: Two uniquely arranged thyroid hormone response elements in the far upstream 5' flanking region confer direct thyroid hormone regulation to the murine cholesterol 7 α hydroxylase gene. *Nucleic Acids Res* 34:3853-3861, 2006
16. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ: Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 126:322-342, 2004
17. Suchy FJ, Ananthanarayanan M: Bile salt excretory pump: biology and pathobiology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43 Suppl 1:S10-16, 2006
18. Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ: Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem* 276:28857-28865, 2001
19. Plass JR, Mol O, Heegsma J, Geuken M, Faber KN, Jansen PL, Muller M: Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology* 35:589-596, 2002
20. Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ: Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 102:731-744, 2000
21. Song X, Kaimal R, Yan B, Deng R: Liver receptor homolog 1 transcriptionally regulates human bile salt export pump expression. *J Lipid Res* 49:973-984, 2008
22. Matakic C, Magnier BC, Houten SM, Annicotte JS, Argmann C, Thomas C, Overmars H, Kulik W, Metzger D, Auwerx J, Schoonjans K: Compromised intestinal lipid absorption in mice with a liver-specific deficiency of liver receptor homolog 1. *Mol Cell Biol* 27:8330-8339, 2007
23. Honjo Y, Sasaki S, Kobayashi Y, Misawa H, Nakamura H: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its receptor inhibit the chenodeoxycholic acid-dependent transactivation by farnesoid X receptor. *J Endocrinol* 188:635-643, 2006
24. Gerloff T, Geier A, Roots I, Meier PJ, Gartung C: Functional analysis of the rat bile salt export pump gene promoter. *Eur J Biochem* 269:3495-3503, 2002
25. Scotto KW: Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 22:7496-7511, 2003
26. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, Edwards PA: Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 277:2908-2915, 2002
27. Simon FR, Iwahashi M, Hu LJ, Qadri I, Arias IM, Ortiz D, Dahl R, Sutherland E: Hormonal regulation of hepatic multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2) primarily involves the pattern of growth hormone secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G595-608, 2006