

쓴메밀 새싹 추출물의 히스톤 아세틸화 효소 활성 저해에 의한 비알코올성 지방간 억제 효능

황진택^{1,2} · 남태규¹ · 정민유¹ · 박재호^{1,2} · 최효경¹

¹한국식품연구원

²과학기술연합대학원대학교

Effect of Tartary Buckwheat Sprout on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease through Anti-Histone Acetyltransferase Activity

Jin-Taek Hwang^{1,2}, Tae Gyu Nam¹, Min-Yu Chung¹, Jae Ho Park^{1,2}, and Hyo-Kyoung Choi¹

¹Korea Food Research Institute

²Korea University of Science & Technology

ABSTRACT Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is caused by chronic lipid accumulation due to dysregulation of lipid metabolism in the liver, and it is associated with various human diseases such as obesity, dyslipidemia, hypertension, and diabetes. Histone acetylation is a representative epigenetic mechanism regulated by histone acetyltransferases (HATs) and deacetylases. We observed that tartary buckwheat sprout (TBS) suppressed lipid accumulation in HepG2 cells through its anti-HAT activity. We showed that TBS was a novel HAT inhibitor with specificity for the major HAT enzyme p300. Importantly, TBS reduced acetylation of total and histone proteins, H3K9, H3K36, and H4K8, resulting in decreased transcriptional activities of sterol regulatory element-binding protein 1c, ATP citrate lyase, and fatty acid synthase. These results suggest that TBS inhibits the NAFLD transcription-modulating activity of lipogenesis-related genes through modification of histone acetylation.

Key words: non-alcoholic fatty liver disease, histone acetyltransferase, lipid accumulation, HepG2, tartary buckwheat sprout

서 론

비알코올성 지방간질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 간에서 나타나는 대표적 만성 대사증후군의 하나로 미국인에서 양성자 자기공명분광을 이용하여 간내 중성지방의 함량을 측정된 연구에서 NAFLD의 유병률은 31%였으며(1), 2030년까지 간이식의 가장 빈번한 요인이 될 것으로 예측되었다(2). 우리나라에서도 식생활의 서구화와 운동량의 감소로 인하여 2013년 그 유병률이 25~30% 정도로 추정된다(3). 비알코올성 지방간질환은 단순 지방간증(simple steatosis, non alcoholic fatty liver)에서부터 지방간염(steatohepatitis), 간경변(cirrhosis)까지 넓은 간질환의 스펙트럼을 포함한다. 특히 단순 지방간증은 비알코올성 지방간질환의 첫 단계로 지방간염이나 간경화 그리고 간암으로 진행될 수 있으며, 이로 인해 발생하는 심혈관계, 고혈압 및 신장질환 등 만성 대사성질환 발생의 위험인자로

알려져 있기 때문에 그 중요성이 증가하고 있다(4).

단순 지방간증은 1) 지방세포나 고지방식품으로부터 유리지방산의 섭취 증가, 2) 인슐린 저항성에 의해 증가한 글루코오스, 아세테이트를 이용한 간에서의 유리지방산 합성의 증가, 3) 유리지방산의 beta-oxidation의 감소, 4) 저밀도지단백질(very low density lipoproteins, VLDL)에서 중성지방의 분비 감소에 의한 과도한 중성지방의 축적이 주요 특징이다(5,6). 이와 관련된 유전적 요인들이 단순 지방간증의 주요 발병 요인이기는 하나 상대적으로 치료가 용이한 가역적 질환이기 때문에 식이, 운동 등을 통한 후성유전적 접근의 예방, 치료 그리고 관리가 매우 중요하다. 특히 단순 지방간증의 억제 및 치료를 위한 소재 개발을 위하여 다양한 식품소재를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다(7).

후성유전적 유전자의 발현 조절과 다양한 질병의 발생이 관련되어 있다는 보고와 함께, 비알코올성 지방간질환에 후성유전적 기전에 의한 간 기능 조절에 관한 연구 역시 계속되고 있다. 대표적 히스톤 아세틸 전이효소(histone acetyltransferase, HAT)인 p300의 활성 증가는 histone H3K9의 아세틸화 증가를 통하여 단순 지방간증의 진행에서 중성지방 합성과 연관된 *DGAT1*과 *DGAT2*의 전사를 할

Received 10 November 2016; Accepted 9 January 2017

Corresponding author: Hyo-Kyoung Choi, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi 13539, Korea
E-mail: chkyoung@kfri.re.kr, Phone: +82-31-780-9421

성화하며(8), 고지방식이에 의한 p300의 활성 증가가 carbohydrate-responsive element-binding protein(ChREBP)의 아세틸화를 유도하고 결과적으로 단순 지방간증과 인슐린 저항성을 높인다고 보고되었다(9). Glucose에 의하여 활성화된 p300 역시 전사인자인 ChREBP와 함께 히스톤 단백질과 비히스톤 단백질들의 아세틸화를 통하여 당분해(glycolytic) 그리고 지방생성(lipogenic) 관련 유전자 전사를 활성화하고(10), 제2형 당뇨병과 단순 지방간증을 유도한다(11, 12). 또한, adeno associated virus-Cre를 이용한 histone deacetylase 3(HDAC3) knock-down 마우스의 간 조직에서 중성지방의 함량이 정상 마우스 대비 6배가량 증가하며(10), 간 조직 특이적인 HDAC3의 제거 시 간섬유화(hepatic fibrosis)와 간암(hepatocarcinoma, HCC)의 진행이 더욱 가속화된다고 보고되었다(13). Sirtuin 1(SIRT1)은 NF- κ B 활성을 억제하여 지질 대사에 관여하는 다양한 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine)의 발현을 조절하며(14), 간 조직 특이적인 SIRT1의 결여는 단순 지방간증과 비만을 증가시키는 반면에 SIRT1의 과발현은 인슐린 저항성과 지방간염에 대한 간 조직 보호 효과가 있는 것이 보고되었다(15-17). 그러므로 HAT와 HDAC 활성을 이용한 지방합성 관련 유전자들의 발현 조절은 단순 지방간증 예방 및 치료제 개발에서 중요한 기작이 될 수 있으며, 이러한 활성을 지닌 천연물의 발굴이 기존의 치료와 병행할 수 있는 보완적 치료제 개발의 기반이 될 수 있다.

메밀(*Fagopyrum* spp.)은 마디풀과에 속하는 일년초로서 분류학상 곡류와 유사하여 잡곡으로 취급하고 있다(18). 새싹채소는 종자를 발아시킨 후 물로만 재배하여 1주 안에 수확하는 미성숙 채소이다. 메밀 새싹은 단백질, 미네랄, 식이섬유 및 비타민 공급원이며 루틴 등 다양한 플라보노이드를 함유하고 있다(19,20). 플라보노이드 식물은 항근작용, 항바이러스작용, 산화작용, 항암작용 등 생리학적 활성을 가지고 있는 물질이다(21). 메밀 재배종은 단메밀(*Fagopyrum esculentum*)과 쓴메밀(*Fagopyrum tataricum*)로 분류되며 두 종류 모두 곡실용 및 의약용으로 널리 재배되고 있다. 특히 쓴메밀은 의약품으로 사용되는 루틴 성분을 단메밀과 비교하여 22배 이상 함유하고 있으며 고미가 있어 높은 약리적 효용이 기대되므로 일명 약용메밀로 불리는 재배종이다(22). 우리나라에서도 쓴메밀이 당뇨(23), 비만(24), 노화(25)를 예방하고 치료하는 작용을 가진 식품이라는 임상적, 약리적 효과가 밝혀지면서 쓴메밀이 건강식품과 의약품의 원료로 널리 알려졌지만 이들이 작용하는 분자적 기전에 대한 이해는 아직도 명확하지 않다.

본 연구에서는 쓴메밀 새싹 추출물(TBS)이 HAT 활성을 억제하고 지방합성 관련 유전자들의 발현을 감소시킴으로써 지방세포 내 중성지방의 축적을 억제하는 것을 밝히며, 단순 지방간증 예방 치료를 위한 소재 개발의 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 쓴메밀은 강원도 평창에서 2013년 재배된 종자를 구입한 것을 사용하였다. 쓴메밀 종자는 소형 재배 용기에 파종하여 2일 동안 최아시킨 후, 암조건에서 증류수로 5일간 25±2°C에서 재배하였다. 메밀새싹은 뿌리부분을 제외한 줄기 이상의 부분을 절단하여 수확한 후, 30°C 항온기에서 음건하여 추출 전까지 -20°C에서 보관하였다.

쓴메밀 새싹의 추출

쓴메밀 새싹은 메탄올과 함께 균질화(homogenization) 방법을 이용하여 추출하였다. 쓴메밀 새싹 10 g과 80%(v/v) 메탄올 250 mL를 혼합한 후, homogenizer(Polytron RT-2100, Kinematica AG, Luzern, Switzerland)로 15,000 rpm에서 10분간 균질화하였다. 균질화된 추출물은 20분간 초음파 추출을 병행하였으며 Whatman No. 2 여과지(Whatman International Ltd., Kent, UK)를 이용하여 여과하였다. 여과박(filter cake)은 회수하여 같은 방법으로 2회 반복 추출하였으며, 추출과정 동안 지속해서 질소가스를 충전하였다. 여과된 추출물은 감압회전농축기(N-1000, Eyela, Tokyo, Japan)를 사용하여 농축한 후, 동결 건조한 다음 분석 전까지 -20°C에서 보관하였다.

세포배양

HepG2(human hepatoblastoma)는 ATCC(Manassas, VA, USA)에서 구매하여 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% fetal bovine serum(FBS), 1% antibiotics/antimycotics를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 습윤한 incubator에서 배양되었다.

세포 내 지방 축적

HepG2 세포 내 지방을 축적시키기 위하여 oleic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)와 palmitic acid (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다. 두 지방산의 세포 내 효과적인 흡수를 위하여 각각 8 mM의 농도로 95% 에탄올에 녹인 후 질소가스를 이용하여 에탄올을 증발(evaporation)시키고 DMEM을 이용하여 20%로 녹인 fatty acid free인 bovine serum albumin(BSA, Sigma-Aldrich Co.)과 conjugation 시켰다. 실험을 위하여 400 μ M의 oleic acid와 100 μ M의 palmitic acid를 동시에 세포에 처리하였고, 대조군으로 DMEM에 녹인 BSA만을 단독 처리하였다.

HAT 활성의 측정

세포 내에서 소재에 의한 HAT 활성의 변화를 확인하기 위하여 HepG2 세포에 400 μ M의 oleate, 100 μ M의 palmitate와 함께 200 μ g/mL, 500 μ g/mL의 쓴메밀 새싹 추출물

을 24시간 동안 함께 처리한 후 nuclear extract(NE)를 추출하였다. NE의 추출을 위하여 차가운 phosphate buffered saline(PBS)을 이용하여 세포를 3회 수세한 후 세포를 수확하였다. 1 mL의 cytosol lysis buffer(10 mM Tris pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5% NP40, protease inhibitor)를 첨가하여 ice에 20분간 incubation 한 후 4°C에서 5분간 4,000 rpm으로 원심분리 하여 cytosol을 분리하였다. 남은 pellet을 차가운 PBS를 이용하여 3회 세척하고 200 µL의 NE extraction buffer(20 mM Tris pH 7.9, 0.42 M KCl, 0.2 mM EDTA, 10% glycerol, protease inhibitor)를 넣어 ice에서 40분간 incubation 한 후 4°C에서 30분간 13,000 rpm으로 원심분리 하여 NE를 얻었다. 분리된 NE는 100 µg/µL의 농도로 HAT enzyme의 활성 측정을 위하여 사용되었다. HAT 활성 측정 중 상업적으로 시판되는 HAT activity kit을 이용한 활성 측정은 HeLa 세포에서 NE(Biovision, Milpitas, CA, USA)를, 그리고 특이적인 HAT 단백질인 p300(Enzo, UK)과 CBP(Millipore, Darmstadt, Germany) 활성 측정은 각각 단백질의 catalytic domain을 이용한 human recombinant 단백질을 이용하였으며, 측정방법은 판매사인 Biovision의 실험방법을 따랐다.

Total RNA의 추출과 quantitative real-time PCR(qRT-PCR)

세포 내 지방합성 관련 유전자의 발현을 관찰하기 위하여 수행된 qRT-PCR을 위하여 HepG2 세포를 5×10⁵ cells/well의 밀도로 6 well plate에 분주하고 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포가 70% confluence에 도달했을 때 세포를 1회 세척하여 새 DMEM으로 배지를 교체한 후 400 µM의 oleate와 100 µM의 palmitate를 처리하였다. 이때 실험군은 oleate, palmitate와 함께 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1,000 µg/mL 농도의 추출물을 동시에 처리하였다. 16시간 후 세포를 수집하고 total RNA를 추출하고 cDNA를 합성하였다. qRT-PCR 분석은 SYBR Green PCR Master mix reagent(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여(Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 다음과 같은 조건으로 시행하였다. 모든 결과는 GAPDH에 따라 상대적으로 정량화되었다. PCR은 95°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초에서 40 cycle로 시행되었으며, 마지막 72°C에서 10분간 추가로 반응하여 안정화시켰다. 증폭의 모든 데이터는 매 cycle의 72°C, 30초 단계에서 수집되었다. 본 분석에 사용된 프라이머는 다음과 같다. Sterol regulatory element-binding protein1(SREBP1c)은 forward 5'-AAACTCAAGCAGGAGAACCTAAGTCT-3', reverse 5'-GTCAGTGTGTCC TCCACCTCAGT-3', ATP-citrate synthase(ACLY)는 forward 5'-TACCACCTCAGCCATCCAGA-3', reverse 5'-GACCCCAACGAGACCAAGTT-3', fatty acid syn-

thase(FAS)는 forward 5'-AACCGGCTCTCCTTCTTCTTCGACTT-3', reverse 5'-TCCGAGCGGCAGTACCCATTC-3', 그리고 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)는 forward 5'-ATGTTTCGTCATGGGTGTGAAC-3', reverse 5'-GCATGGACTGTGGTCATGAGT-3'이 사용되었다. 모든 반응은 3반복으로 시행되었으며, 상대적 발현 및 standard deviation(SD) value는 comparative method를 사용하여 계산하였다.

Western blot

5×10⁵개의 밀도로 HepG2 세포를 6 well plate에 분주하고 세포가 70%의 confluence에 도달하였을 때 새로운 DMEM 배지로 교환하고 400 µM의 oleic acid, 100 µM의 palmitic acid와 함께 250 µg/mL, 500 µg/mL의 추출물을 처리하였다. 24시간 후 세포를 회수하고 RIPA buffer를 이용하여 whole cell lysis 하거나 Abcam histone extraction kit(Abcam, Cambridge, MA, USA)을 이용하여 히스톤 단백질을 분리하였다. 전체 15 µg의 단백질을 10% 또는 15% SDS gel에 전기영동 시행하고 HDAC1(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), β-actin(Sigma-Aldrich Co.), α-tubulin(Millipore), total-AcLys(Cell Signaling, Danvers, MA, USA), H3K9ac(Cell Signaling), H3K36ac(Cell Signaling), H4K8ac(Cell Signaling), 그리고 total H3(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 이용하여 western blotting을 실시하였다.

Oil Red O 염색

5×10⁴개의 HepG2 세포를 24 well plate에 분주한 후 70%의 confluence에 도달했을 때 400 µM oleic acid와 100 µM의 palmitic acid와 함께 200 µg/mL, 500 µg/mL의 추출물을 처리하였다. 24시간 후 PBS를 이용하여 두 차례 세포를 수세하고 3.7% formaldehyde를 이용하여 실온에서 10분간 세포를 고정하였다. 고정 후 PBS로 5분간 3회에 걸쳐 고정액을 완전히 제거한 후 0.1%의 Oil Red O 염색 용액을 넣어 실온에서 1시간 반응하였다. 반응 후 증류수를 이용하여 Oil Red O 염색시약을 완전히 제거한 후 세포의 상태를 현미경을 이용하여 관찰한 다음 AxioVision Rel 4.9.1(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 사진을 얻었다. 염색 정도의 정량화를 위하여 200 µL의 isopropanol을 넣어 세포 내 염색시약을 용해시킨 후 용해된 100 µL의 isopropanol을 96 well plate에 옮겨 담아 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

MTT assay

5×10⁴개의 HepG2 세포를 24 well plate에 분주하고 70% confluence에 도달하였을 때 400 µM oleic acid와 100 µM의 palmitic acid와 함께 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1,000 µg/mL 농도의 샘플을 동시에 처리하였

다. 24시간 후 PBS로 2회 세척하고 FBS가 포함되지 않은 배지로 교체한 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co.)를 배지에 첨가하여 2시간 동안 배양하고 형성된 blue formazan을 DMSO에 용해하여 570 nm와 630 nm에서 microplate reader를 사용하여 세포생존율을 측정하였다.

통계분석

본 연구에서는 최소 3회 반복에 대한 평균 및 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 실험군 간의 통계적 유의성은 Student's t-test를 사용하여 검정하였다. 통계검정은 SPSS(version 10.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다.

결과 및 고찰

TBS에 의한 HAT 활성 저해

TBS에 의한 HAT 활성 저해 효과를 측정한 결과는 Fig. 1A와 같았다. TBS를 처리한 실험군은 추출물을 처리하지 않은 정상군과 비교하였을 때 100 µg/mL로부터 500 µg/mL까지 농도 의존적으로 HAT 활성을 저해하였으며, 모든 농도에서 정상군에 대하여 유의적으로 HAT 활성을 저해하는 것으로 나타났다($P < 0.01$). 특이적인 HAT 단백질에 관해서는 Fig. 1B와 같이 100 µg/mL, 200 µg/mL, 500 µg/mL의 TBS를 처리하였을 때 p300과 CBP 모두에서 TBS에 의한 농도 의존적 HAT 활성 억제능이 관찰되었으며, 특히 p300의 경우 500 µg/mL 농도의 TBS에 의해 80% 가량 활성이 저해되었다. 실제적으로 TBS가 세포 내 존재하는 HAT enzyme들의 활성을 저해하는지를 알아보기 위하여

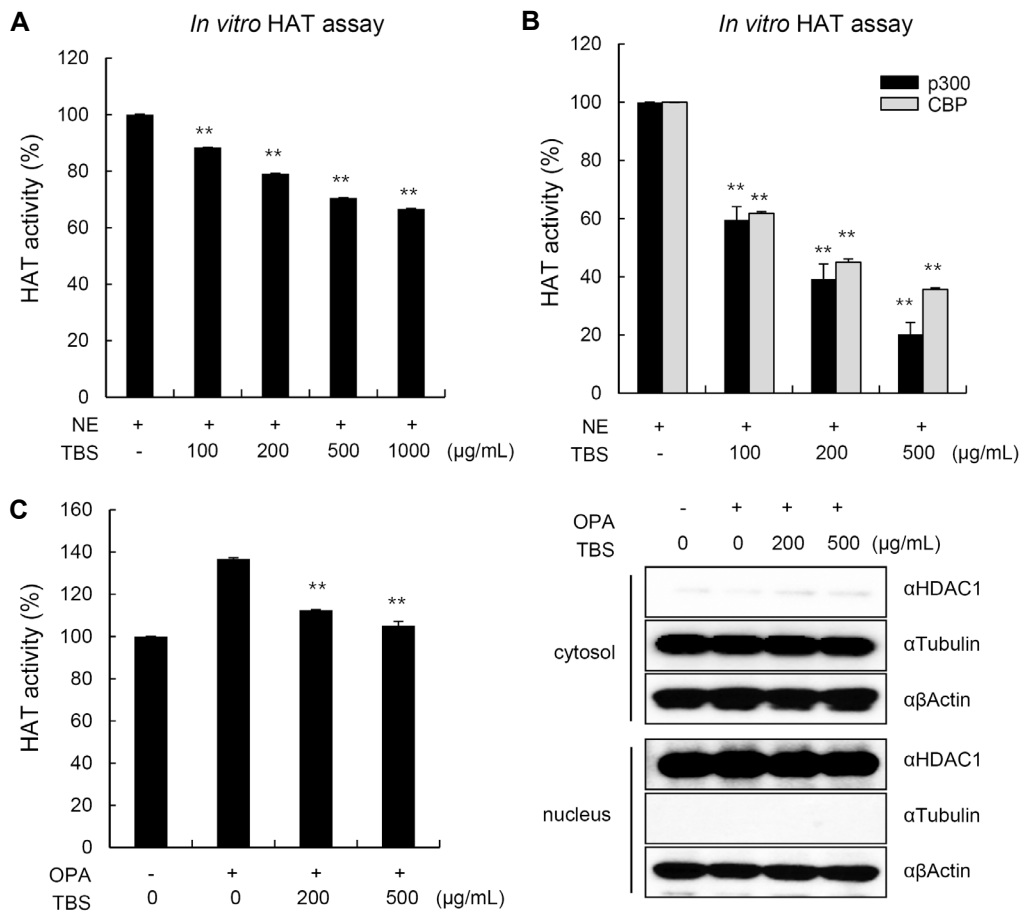


Fig. 1. Effect of methanol extract of tartary buckwheat sprout (TBS) on histone acetyl transferase (HAT) activity. (A) HAT activity assays were performed with TBS as indicated concentrations. The result was represented with relative percentage compared to a positive control which was incubated without TBS. Values are mean±SD for three independent experiments. ** $P < 0.01$ versus with control, treated NE only. (B) HAT inhibition activity of TBS against specific HAT enzymes was measured using representative HAT enzymes. The result was represented with relative percentage compared to a positive control which was incubated without TBS. Values are mean±SD for three independent experiments. ** $P < 0.01$ versus with control, treated NE only. (C) HAT assay was carried out using nuclear extract from HepG2 cells. TBS was treated with oleic acid and palmitic acid (OPA), and each activities were relatively represented with relative percentage compared to a positive control which was incubated without TBS. Values are mean±SD for three independent experiments. ** $P < 0.01$ versus with control. HDAC1 or tubulin was used as a marker of nucleus or cytosol, respectively.

HepG2 세포주에 oleic acid, palmitic acid와 함께 200 µg/mL, 500 µg/mL의 TBS를 24시간 동안 처리한 후, 세포 lysis를 통해 얻어진 100 µg의 NE를 이용하여 HAT 활성을 측정하였다. *In vitro* HAT assay의 결과와 마찬가지로 TBS가 함께 처리된 실험군에서 HAT 효소의 활성이 저해되었음을 확인하였다(Fig. 1C). 이러한 결과는 TBS가 HAT enzyme 저해 활성을 갖고 있으며, HAT 단백질 중 특히 p300에 대하여 특이적으로 높은 저해 효능을 보임을 의미한다. HAT의 활성 증가는 다양한 인체 질환에서 관찰되는 현상으로 질환의 예방과 치료를 위하여 천연물을 기반으로 한 HAT 단백질의 활성 저해제는 꾸준히 연구되고 있다. Gallic acid(26), EGCG(27), garcinol(28) 등은 암과 관련된 천연물 기반 HAT 저해제로 이미 그 기전이 잘 밝혀져 있다. 이러한 기존의 연구들을 통해 쓴메밀 새싹 역시 HAT 활성의 저해능을 지니고 있으며, 이를 통한 질환 예방 및 치료 소재로서의 가능성이 있음을 추측할 수 있었다.

TBS에 의한 세포 내 단백질 및 히스톤 아세틸화 억제

실제로 HepG2 세포 내 지방 축적 유도 시 단백질 및 히스톤의 아세틸화가 일어나는지, 그리고 TBS가 이를 효과적으로 억제할 수 있는지를 관찰하였다. Fig. 2A와 같이 OPA를 단독 처리하였을 경우 HepG2 세포 내 단백질들의 아세틸화가 전체적으로 증가함을 확인할 수 있었으며, TBS를 OPA와 함께 혼합 처리하였을 경우 아세틸화의 증가 현상이 TBS 처리에 의하여 억제됨을 관찰할 수 있었다. 이는 Fig. 1에서 보였던 TBS의 HAT 활성 억제능과 밀접한 관계를 갖는다.

세포 내 HAT 단백질들은 히스톤 단백질을 포함한 200여 종 이상의 다양한 비히스톤 단백질들의 아세틸화에 관여한다고 알려져 있다. 그러므로 세포 내 지질축적에 의해 이와 관련된 다양한 단백질들이 아세틸화되며, TBS에 의하여 이들의 아세틸화가 억제됨을 의미한다. 또한, 세포 내 지질 축적 시 증가한다고 알려진 H3K9, H4K8을 비롯하여 H3K36의 아세틸화 역시 TBS에 의하여 효과적으로 억제되고 있음을 확인하였다(Fig. 2B). 기존 연구 결과에 의하면 고지방식이를 실시한 마우스 간 조직의 *Tnfa* 유전자 promoter 부위 H3K9과 H3K18의 아세틸화가 증가한다(29). 또한, HAT의 기질로 사용되는 acetyl-CoA의 세포 내 농도는 널리 알려진 바와 같이 지방산 생합성의 중요한 효소인 ATP-citrate lyase(ACL)에 의하여 증가되며(30), acetyl-CoA의 증가와 비례하여 H3K9과 H4K8의 아세틸화가 증가한다(31). 비알코올성 지방간질환에서 이러한 히스톤 아세틸화의 증가는 p300과 CBP와 같은 대표적 HAT 효소들의 활성 증가와 밀접한 관련이 있으며, 증가한 이들의 활성은 히스톤뿐만 아니라 비히스톤 단백질들의 아세틸화를 통하여 지방합성 및 해당작용 관련 유전자를 활성화한다(9,14). 위와 같은 기존의 연구 결과들을 종합해볼 때 비알코올성 지방간질환의 억제를 위해서는 고지방식이에 기인하는 HAT 활성의 억제를 통한 질환 관련 유전자들의 promoter 부위 히스톤 단백질의 아세틸화 억제가 중요할 것으로 예측된다. 기존의 연구 결과들과 동일하게 본 연구에서도 OPA에 의한 HepG2 세포 내 지질축적 시 H3K9, H4K8, 그리고 H4K36의 아세틸화 증가가 관찰되었으며, 처리된 TBS의 농도 의존적으로 히스

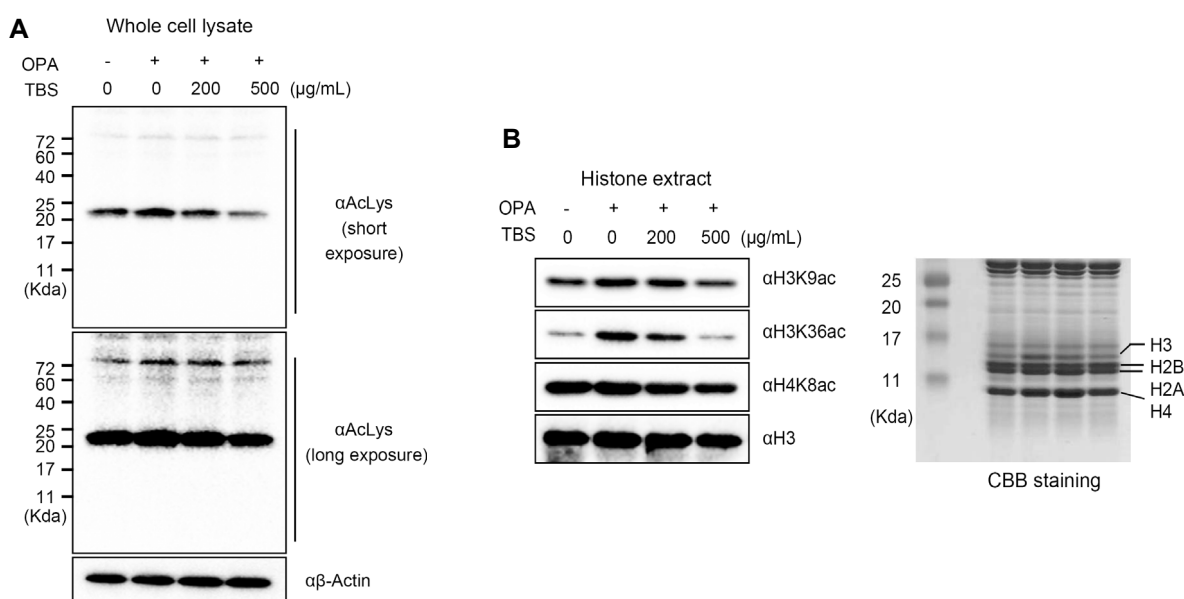


Fig. 2. TBS reduced acetylation of total cell lysate and histone. (A) HepG2 cells were treated with or without OPA, alone or in combination with TBS. Acetylation status of whole cell lysates were measured with anti-Ac-lysine (αAcLys) antibody. (B) HepG2 cells were treated with or without OPA, alone or in combination with TBS. Core histones were extracted from cells, and acetylation status on histone tails was measured with anti-H3K9ac, H3K36ac, and H4K8ac antibodies. To confirm histone extract, coomassie brilliant blue (CBB) staining was performed.

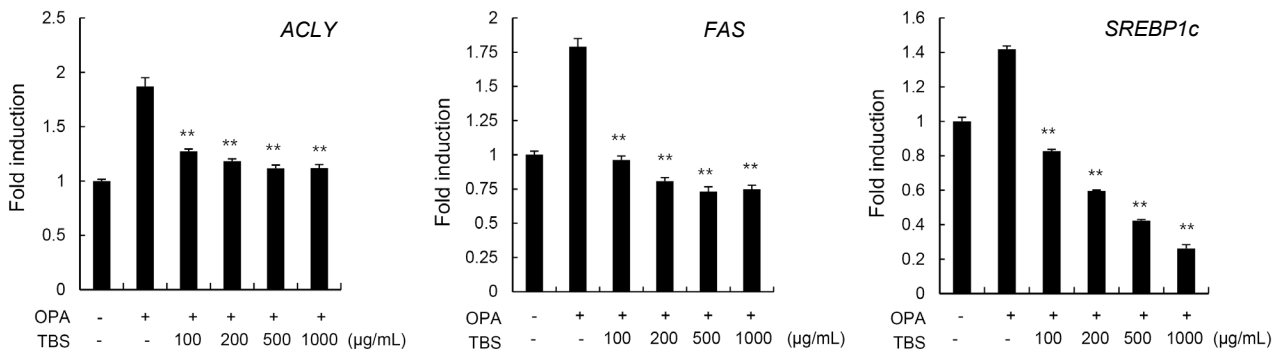


Fig. 3. TBS suppressed transcriptional activity of genes related lipid metabolism. HepG2 cells were treated with or without OPA, alone or in combination with TBS. mRNA expression of genes related lipid metabolism was measured by qRT-PCR. RNA was extracted from HepG2 cells, and then 2 μg RNA was synthesised to cDNA. All experiments were carried out three times independently and data are expressed as mean±SD. ** $P < 0.01$ versus with control.

톤 아세틸화가 저해되는 현상이 관찰되었다. 이러한 결과들을 종합해볼 때 히스톤 단백질의 아세틸화는 비알코올성 지방간의 주요 지표로 사용될 수 있으며, TBS는 히스톤 단백질의 아세틸화를 저해함으로써 비알코올성 지방간의 억제 작용에 관여하는 것으로 여겨진다.

TBS에 의한 지방산 합성 유전자 전사 활성 억제

히스톤 단백질들의 아세틸화는 관련 유전자의 전사 활성화 증가를 유도하므로, TBS의 지질축적 유도에 의한 히스톤 단백질 아세틸화 억제는 지방합성 관련 유전자들의 전사 활성을 저해할 가능성이 있다. 이를 증명하기 위하여 HepG2 세포주에 OPA를 이용하여 지질을 축적시키고 TBS가 지방산 합성 관련 유전자들의 전사 활성 조절에 미치는 영향을 조사하기 위하여 qRT-PCR을 통하여 대표적 지방합성 관련 유전자인 SREBP1c, ACLY, 그리고 FAS의 전사 활성 변화를 관찰하였다(Fig. 3). 예상했던 바와 같이 OPA 단독 처리에 의하여 증가하였던 SREBP1c, ACLY, 그리고 FAS 유전자의 전사 활성은 TBS 처리에 의하여 저해됨을 관찰할 수 있었다. 히스톤의 아세틸화는 유전자의 전사 활성과 매우 밀접한 관련을 갖는다(32). 히스톤 말단의 아세틸화는 이들의 positive charge를 중성화(neutralizing)하여 DNA와의 결합능을 감소시킨다(33). 그 결과 nucleosomal conformation이 일어나고 전사 활성과 관련된 다양한 인자들의 DNA로의 접근이 용이하게 된다(34). 이는 OPA에 의한 지방산 합성 관련 유전자들의 전사 활성 증가는 이들 유전자들의 프로모터 부위 히스톤 아세틸화 증가에 의한 것이며, 그러므로 TBS에 의한 지방산 합성 관련 유전자들의 전사 활성 억제는 HAT 활성 저해에 의한 히스톤 아세틸화의 감소에 따른 현상임을 의미한다. 그러나 추후 실제 TBS에 의한 SREBP1c, ACLY, 그리고 FAS 유전자의 전사 활성 변화가 히스톤 단백질의 아세틸화 억제에 의한 것임을 명확히 규명하기 위해서는 chromatin immunoprecipitation assay를 통하여 각 유전자들의 프로모터 부위 히스톤 아세틸화 변화 여부를 직접 관찰할 필요가 있다고 여겨진다.

TBS에 의한 세포 내 지질 축적 억제

마지막으로 TBS에 의한 HAT 활성 저해, 히스톤 및 비히스톤 단백질의 아세틸화 억제, 그리고 SREBP1c, ACLY, 그리고 FAS와 같은 지방합성 관련 유전자들의 전사 활성 저해가 OPA에 의한 세포 내 지질 축적을 억제할 수 있는지 알아보기 위하여 Oil Red O staining을 실시하였다. Fig. 4A와 같이 OPA를 처리하였을 경우 대조군 대비 200% 이상의 세포 내 지질 축적을 관찰할 수 있었으며, TBS 처리에 의하여 축적되는 지질의 양이 감소함을 관찰할 수 있었다. 또한, 동일 조건에서 세포독성은 관찰되지 않았다(Fig. 4B). 이와 같은 결과는 TBS에 의한 HAT 활성의 저해가 결과적으로 세포 내 지질의 축적을 억제할 수 있으며, 세포 내 과도한 지질 축적으로 유도되는 비알코올성 지방간의 억제를 위한 건강 기능성 식품의 소재로서, 그리고 더 나아가 비알코올성 지방간 치료제 개발의 천연물 소재로서 개발 가능성이 있음을 시사한다.

요 약

본 연구에서는 쓴메밀 새싹 추출물(TBS)을 대상으로 histone acetyltransferase(HAT) 활성 저해능을 평가하고 oleic acid와 palmitic acid(OPA)를 이용하여 HepG2 세포에서 비알코올성 지방간을 유도하여 그 효과를 검토하였다. HeLa 세포의 nuclear extract(NE)를 HAT의 source로 하여 *in vitro*에서 TBS에 의한 HAT 활성 저해능을 평가한 결과 추출물의 처리에 의하여 HAT 활성이 억제됨을 관찰할 수 있었다. 또한, 대표적인 HAT 단백질인 p300과 CBP를 이용하여 동일한 방식으로 HAT 억제능을 평가한 결과 TBS 처리에 의하여 두 단백질 모두 활성이 감소하였으며, 특히 TBS는 p300의 활성을 특이적으로 저해함을 확인할 수 있었다. 그뿐만 아니라 HepG2 세포에 400 μM의 oleic acid 및 100 μM의 palmitic acid와 함께 200 μg/mL, 500 μg/mL의 TBS를 처리한 후 NE를 이용하여 세포 내 HAT 활성을 측정한 결과 역시 추출물 처리에 의하여 세포 내 HAT 활성이 저해되어 있음이 관찰되었다. TBS에 의한 HAT 활성의

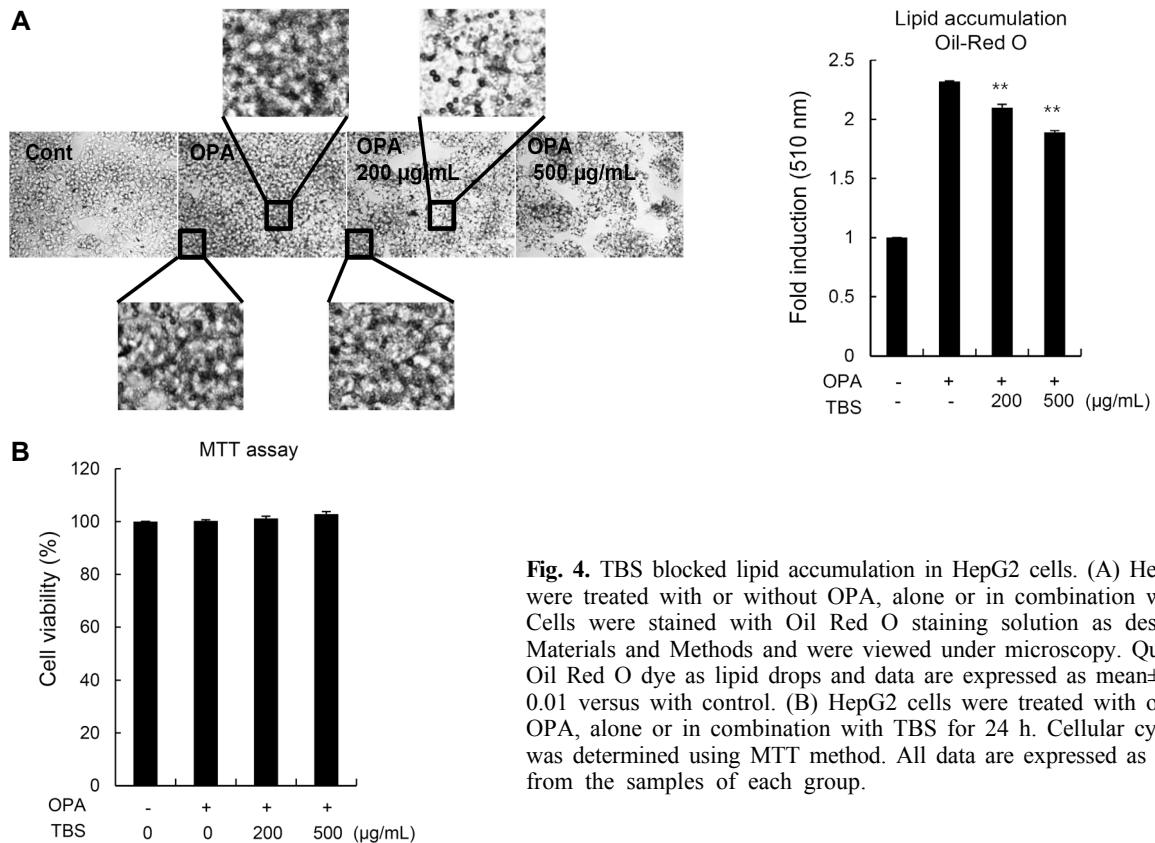


Fig. 4. TBS blocked lipid accumulation in HepG2 cells. (A) HepG2 cells were treated with or without OPA, alone or in combination with TBS. Cells were stained with Oil Red O staining solution as described in Materials and Methods and were viewed under microscopy. Quantitative Oil Red O dye as lipid drops and data are expressed as mean±SD. ***P*< 0.01 versus with control. (B) HepG2 cells were treated with or without OPA, alone or in combination with TBS for 24 h. Cellular cytotoxicity was determined using MTT method. All data are expressed as mean±SD from the samples of each group.

억제는 세포 내 다양한 단백질들의 아세틸화 저해와 지질축적에 의하여 아세틸화 변형을 일으키는 것으로 알려진 histone H3K9, H4K8의 아세틸화 및 H3K36의 아세틸화를 감소시켰으며, 세포 내 지질합성과 관련된 대표적 유전자인 SREBP1c, ACLY, FAS의 전사 활성 역시 저해함을 관찰하였다. 이와 같은 변화를 통하여 OPA에 의하여 HepG2 세포 내에 축적되었던 지질은 TBS의 처리에 의하여 효과적으로 감소하였으며 이때 처리된 OPA와 소재에 의한 세포 내 독성은 관찰되지 않았다. 그러므로 이러한 결과는 TBS에 의한 HAT 활성의 저해가 히스톤 단백질의 아세틸화 변형을 억제하고 이를 통하여 지방 합성 관련 유전자들의 전사 활성을 감소시켜 결과적으로 세포 내 지질축적을 방지하는 것으로 생각되며, TBS는 비알코올성 지방간질환의 예방에 좋은 천연물 소재로 활용될 수 있을 것이라 여겨진다.

REFERENCES

- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. 2004. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 40: 1387-1395.
- Byrne CD, Targher G. 2015. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol* 62: S47-S64.
- Jeong EH, Jun DW, Cho YK, Choe YG, Ryu S, Lee SM, Jang EC. 2013. Regional prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in Seoul and Gyeonggi-do, Korea. *Clin Mol Hepatol* 19: 266-272.
- Armstrong MJ, Adams LA, Canbay A, Syn WK. 2014. Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 59: 1174-1197.
- Tannapfel A, Denk H, Dienes HP, Langner C, Schirmacher P, Trauner M, Flott-Rahmel B. 2011. Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *Virchows Arch* 458: 511-523.
- Burt AD, Mutton A, Day CP. 1998. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 15: 246-258.
- Xu JY, Zhang L, Li ZP, Ji G. 2015. Natural products on nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Drug Targets* 16: 1347-1355.
- Jin J, Iakova P, Breaux M, Sullivan E, Jawanmardi N, Chen D, Jiang Y, Medrano EM, Timchenko NA. 2013. Increased expression of enzymes of triglyceride synthesis is essential for the development of hepatic steatosis. *Cell Rep* 3: 831-843.
- Bricambert J, Miranda J, Benhamed F, Girard J, Postic C, Dentin R. 2010. Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* 120: 4316-4331.
- Sun Z, Miller RA, Patel RT, Chen J, Dhir R, Wang H, Zhang D, Graham MJ, Unterman TG, Shulman GI, Sztalryd C, Bennett MJ, Ahima RS, Birnbaum MJ, Lazar MA. 2012. Hepatic Hdac3 promotes gluconeogenesis by repressing lipid synthesis and sequestration. *Nat Med* 18: 934-942.
- Denechaud PD, Dentin R, Girard J, Postic C. 2008. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett* 528: 68-73.
- Jin J, Valanejad L, Nguyen TP, Lewis K, Wright M, Cast

- A, Stock L, Timchenko L, Timchenko NA. 2016. Activation of CDK4 triggers development of non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Rep* 16: 744-756.
13. Bhaskara S, Knutson SK, Jiang G, Chandrasekharan MB, Wilson AJ, Zheng S, Yenamandra A, Locke K, Yuan JL, Bonine-Summers AR, Wells CE, Kaiser JF, Washington MK, Zhao Z, Wagner FF, Sun ZW, Xia F, Holson EB, Khabele D, Hiebert SW. 2010. Hdac3 is essential for the maintenance of chromatin structure and genome stability. *Cancer Cell* 18: 436-447.
 14. Tian Y, Wong VW, Chan HL, Cheng AS. 2013. Epigenetic regulation of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease. *Semin Cancer Biol* 23: 471-482.
 15. Herranz D, Serrano M. 2010. SIRT1: recent lessons from mouse models. *Nat Rev Cancer* 10: 819-823.
 16. Escande C, Chini CC, Nin V, Dykhouse KM, Novak CM, Levine J, van Deursen J, Gores GJ, Chen J, Lou Z, Chini EN. 2010. Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J Clin Invest* 120: 545-558.
 17. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. 2009. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab* 9: 327-338.
 18. Kim SL, Kim SK, Park CH. 2004. Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetable. *Food Res Int* 37: 319-327.
 19. Liu CL, Chen YS, Yang JH, Chiang BH. 2007. Antioxidant activity of tartary (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) and common (*Fagopyrum esculentum* moench) buckwheat sprouts. *J Agric Food Chem* 56: 173-178.
 20. Nam TG, Lee SM, Park JH, Kim DO, Baek NI, Eom SH. 2015. Flavonoid analysis of buckwheat sprouts. *Food Chem* 170: 97-101.
 21. Kumar S, Pandey AK. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci World J* 2013: 162750.
 22. Kim JK, Kim SK. 2005. Compositions and pasting properties of *Fagopyrum esculentum* and *Fagopyrum tartaricum* endosperm flour. *Korean J Food Sci Technol* 37: 149-153.
 23. Lee DG, Jang IS, Yang KE, Yoon SJ, Baek S, Lee JY, Suzuki T, Chung KY, Woo SH, Choi JS. 2016. Effect of rutin from tartary buckwheat sprout on serum glucose-lowering in animal model of type 2 diabetes. *Acta Pharm* 66: 297-302.
 24. Christa K, Soral-Śmietana M. 2008. Buckwheat grains and buckwheat products – Nutritional and prophylactic value of their components: A review. *Czech J Food Sci* 26: 153-162.
 25. Li D, Li X, Gao C, Chen X. 2009. Tartary buckwheat, *Fagopyrum tataricum* (Linn) Gaertn: A functional food ingredient from Eastern Asia. *Eur J Plant Sci Biotechnol* 3: 45-48.
 26. Choi KC, Lee YH, Jung MG, Kwon SH, Kim MJ, Jun WJ, Lee J, Lee JM, Yoon HG. 2009. Gallic acid suppresses lipopolysaccharide-induced nuclear factor- κ B signaling by preventing RelA acetylation in A549 lung cancer cells. *Mol Cancer Res* 7: 2011-2021.
 27. Choi KC, Jung MG, Lee YH, Yoon JC, Kwon SH, Kang HB, Kim MJ, Cha JH, Kim YJ, Jun WJ, Lee JM, Yoon HG. 2009. Epigallocatechin-3-gallate, a histone acetyltransferase inhibitor, inhibits EBV-induced B lymphocyte transformation via suppression of RelA acetylation. *Cancer Res* 69: 583-592.
 28. Saadat N, Gupta SV. 2012. Potential role of garcinol as an anticancer agent. *J Oncol* 2012: 647206.
 29. Mikula M, Majewska A, Ledwon JK, Dzwonek A, Ostrowski J. 2014. Obesity increases histone H3 lysine 9 and 18 acetylation at *Tnf α* and *Ccl2* genes in mouse liver. *Int J Mol Med* 34: 1647-1654.
 30. Galdieri L, Zhang T, Rogerson D, Lleshi R, Vancura A. 2014. Protein acetylation and acetyl coenzyme a metabolism in budding yeast. *Eukaryot Cell* 13: 1472-1483.
 31. Chow JD, Lawrence RT, Healy ME, Dominy JE, Liao JA, Breen DS, Byrne FL, Kenwood BM, Lackner C, Okutsu S, Mas VR, Caldwell SH, Tomsig JL, Cooney GJ, Puigserver PB, Turner N, James DE, Villén J, Hoehn KL. 2014. Genetic inhibition of hepatic acetyl-CoA carboxylase activity increases liver fat and alters global protein acetylation. *Mol Metab* 3: 419-431.
 32. Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C. 1988. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J* 7: 1397-1402.
 33. Hong L, Schroth GP, Matthews H, Yau P, Bradbury EM. 1993. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem* 268: 305-314.
 34. Vettese-Dadey M, Grant PA, Hebbes TR, Crane-Robinson C, Allis CD, Workman JL. 1996. Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA *in vitro*. *EMBO J* 15: 2508-2518.