

부추 추출물의 PCSK9 억제를 통한 LDL 콜레스테롤 저감 효능

최효경 · 김효진 · 황진택 · 정민유

한국식품연구원

Allium tuberosum Reverses PCSK9-Mediated LDLR Degradation by Inhibition of HNF1 α

Hyo-Kyoung Choi, Hyo Jin Kim, Jin-Taek Hwang, and Min-Yu Chung

Korea Food Research Institute

ABSTRACT Accumulation of excess low density lipoprotein (LDL) cholesterol in the blood can initiate and accelerate atherosclerosis. Statins mediate the transactivation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), which in turn limits their cholesterol-lowering effects via LDL receptor (LDLR) degradation. The objective of this study was to investigate whether or not *Allium tuberosum* (AT) regulates LDLR and PCSK9. Mice were fed a low fat control diet (LD) or Western diet (WD) supplemented with AT (1%, w/w). AT significantly attenuated total and LDL cholesterol levels in mice fed WD ($P < 0.05$). AT also significantly inhibited hepatic PCSK9 gene expression ($P < 0.05$) while AT maintained hepatic LDLR gene expression. To further investigate AT-mediated PCSK9 regulation, HepG2 cells were treated with 10% delipidated serum (DLPS) in the presence or absence of AT. Non-toxic level of AT dose-dependently increased the LDLR protein level, and AT at 400 $\mu\text{g/mL}$ markedly inhibited PCSK9 protein expression. Similarly, AT significantly increased LDLR gene expression, whereas it significantly down-regulated PCSK9 gene expression. AT-mediated reduction of PCSK9 gene expression is likely due to decreased hepatic nuclear factor 1 α (HNF1 α) expression, but not SREBP2 in HepG2 cells under lipid-depleted conditions. AT-mediated PCSK9 inhibition contributed to LDLR protein stabilization via protection against LDLR lysosomal degradation in HepG2 cells under lipid-depleted conditions. Further investigation is warranted to determine the active components of AT and whether or not these components are effective in reducing hypercholesterolemia.

Key words: PCSK9, LDL receptor, HNF1 α , HepG2, Western diet

서 론

혈중 과도로 축적된 저밀도 지단백(low-density lipoprotein, LDL) 콜레스테롤은 동맥경화를 촉진시키거나 악화시키는 주요 요인이다(1). 고콜레스테롤 혈증은 동맥경화 외에도 협심증, 심근경색증 등 다양한 심장 관련 질환과 뇌졸중, 고혈압 등 뇌혈관 질환 유발의 원인으로 알려져 오랫동안 연구되어 왔다. 최근 혈중 고콜레스테롤로 인한 이러한 질병들은 우리나라뿐 아니라 여러 나라에서 주요 사망 원인으로 알려져 있다(1). 고콜레스테롤 혈증은 운동과 식이요법을 통하여 콜레스테롤 수치를 정상 범위로 유지하는 것이 권고되지만, 이러한 생활습관의 교정은 지속하기 어렵고 약물에 의존하게 되는 경우가 빈번하다.

인체는 콜레스테롤 합성과 배출을 조절하여 생체 내 homeostasis를 이루려는 일련의 노력을 지속해서 한다. 콜레

스테롤 homeostasis 유지를 위하여 생체 내에서 주요하게 조절되는 인자 중 하나가 바로 sterol regulatory element-binding protein 2(SREBP2)이다(2). 콜레스테롤이 많은 환경에서 SREBPs는 SREBP cleavage-activating protein(SCAP)과 결합한 상태로 ER membrane에 존재하게 된다. 반면 콜레스테롤이 적은 환경(예를 들어, 스타틴 약물 복용에 의해 콜레스테롤 수치가 떨어진 경우)에서는 SREBP-SCAP 결합이 끊어지면서 SREBP는 ER에서 골지로 이동한다. SREBP의 proteolytic activation으로 골지에서 핵 안으로 이동한 후, SREBP는 타겟 유전자의 sterol regulatory elements(SRE)와 결합하여 콜레스테롤 합성에 관여하는 유전자들인 LDL receptor(LDLR), HMG-CoA reductase(HMGCR)의 발현을 조절한다. 이를 통해 혈중 콜레스테롤 함량은 줄어들게 되고 세포 내 LDL 콜레스테롤의 양은 증가하게 된다(2).

고콜레스테롤 치료제로 각광받아온 스타틴은 HMG-CoA 환원효소의 억제제로써 콜레스테롤 생합성을 억제하여 콜레스테롤 수치를 낮추는 약물이다. LDL 콜레스테롤 저감 효능이 뛰어나지만 최근 스타틴 복용 환자 5명 중 한 명꼴로

Received 11 October 2017; Accepted 18 October 2017

Corresponding author: Min-Yu Chung, Korea Food Research Institute, Wanju-gun, Jeonbuk 55365, Korea

E-mail: mic07002@kfri.re.kr, Phone: +82-63-219-9371

콜레스테롤 저항성이 보고되었다. Robinson 등(3)과 Sabatine 등(4)의 연구 결과, 고콜레스테롤 혈증 환자 중 스타틴 약물을 복용하고 있으나 LDL 콜레스테롤 저감 효능이 나타나지 않은 환자를 대상으로 proprotein convertase subtilisin/kexin type 9(PCSK9) inhibitor인 alirocumab (3)와 elolocumab(4)를 각각 투여한 결과 LDL 콜레스테롤 저감 효과가 60% 이상 증가하였다. 이러한 연구 결과들은 PCSK9이 LDL 콜레스테롤 저감에 새로운 타겟으로 작용할 수 있다는 가능성을 보여주고 있다.

PCSK9은 간에서 세포 표면에 존재하는 LDL 수용체와 결합하여 수용체를 degradation 시키며, 이는 혈중 LDL 콜레스테롤의 clearance를 방해하게 된다. Alirocumab와 elolocumab 등 PCSK9 inhibitor는 미국 FDA의 허가를 받았지만, 그 안전성 측면에 대한 연구는 현재까지도 진행 중이다. PCSK9을 억제하는 식품 소재를 발굴한다면 이러한 소재가 스타틴 복용과 함께 혹은 독립적으로 고콜레스테롤 혈증이나 콜레스테롤 저항성을 개선할 수 있는 안전한 소재로 제안될 수 있을 것이다.

부추(*Allium tuberosum*)는 중국 서북부 지역이 원산지이며, 여러 아시아권 국가에서 식용으로 재배된다. 부추의 독특한 매운 맛과 향은 부추의 함황 성분(dimethyl sulfide, diallyl sulfide) 때문이다. 부추의 여러 기능성은 이미 연구되어 왔다. 부추의 암 예방 효능은 apoptosis를 증가시켜 이루어지며, 이는 HT-29 human colon cancer cells(5), MCF-7 human breast cancer cells(6), 그리고 PC-3 human prostate cancer cells(7) 등 다양한 세포 모델을 사용한 연구를 통해 입증되었다. 기니피그를 이용한 동물 실험에서 8주간의 부추(2 g/kg body weight) 제공은 총 콜레스테롤, 중성지방, LDL 콜레스테롤 양을 유의적으로 감소시켰다 ($P<0.05$)(8). 또한, 선행 연구에서 마우스에 고지방 식이와 부추 추출물(2%, w/w)을 12주간 제공한 실험 결과, 부추 추출물은 체중과 간 조직 무게를 대조군 대비 유의적으로 감소시켰다(9). 하지만 현재까지 부추 추출물의 콜레스테롤 저감 효능 및 관련 기전을 밝힌 연구 결과는 없다. 본 연구에서는 부추 추출물(*Allium tuberosum*, AT)의 마우스 모델에서 콜레스테롤 저감 효능을 밝히고, HepG2 세포를 이용하여 관련 메커니즘을 연구하였다.

재료 및 방법

추출

부추(whole part)에 10배 부피의 70% 에탄올을 혼합하고 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 Limited, Kent, UK)를 이용하여 여과하였다. 여과박(filter cake)은 회수하여 동일한 방법으로 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°C 에서 보관하였다.

마우스 비만 유도 및 혈청 분석

실험에 사용한 동물은 7주령 수컷 C57BL/6 마우스로 동물 사육실(실내온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 5\%$, 12시간 light-dark cycle)에서 자유식이(식이, 증류수)를 제공하여 사육하였다. 동물실험은 원광대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 수행하였다(WKU16-21).

일주일간 기본식으로 적응시킨 후 난괴법에 따라 각 군당 10마리씩 3군으로 나누었다. 정상식이군에는 low fat diet(LD; D14041701)를 제공하고, 대조군에는 Western diet(WD; high-fat, high sucrose; D12079B)를 제공하였다. 실험군에는 WD에 1%(w/w) AT를 섞어서 제공하였다. 식이는 Research Diet사(New Brunswick, NJ, USA)에서 구입하였다. WD의 탄수화물원은 sucrose와 cellulose이며, 지방원으로는 corn oil과 milk fat이 사용되었다. 식이조성은 Table 1과 같다. 사육기간에 주 1회 간격으로 체중 및 식이 섭취량을 측정하였고, 12주간 사육한 후 해부하였다. 혈액은 원심분리(7,000 rpm, 30분) 하여 혈청을 회수하였고, 간 조직은 식염수로 세척한 후 액체질소에 넣어 급속 냉동하고 이후 -80°C 에 보관하였다.

총 콜레스테롤, LDL 및 HDL 콜레스테롤

원심분리로 얻은 혈청의 총 콜레스테롤, LDL 및 high-density lipoprotein(HDL) 콜레스테롤을 colorimetric 기

Table 1. Ingredient composition of the diets fed to mice. Mice were fed with either low fat control diet (LD) or Western diet (WD) for 12 weeks

	LD	WD	WD+AT
Protein (% of energy)	17	20	20
Carbohydrate (% of energy)	73	43	43
Fat (% of energy)	10	40	40
Total energy (kcal/kg)	100	100	100
Ingredient (g/kg diet)			
Casein	195	195	195
DL-Methionine	3	3	3
Corn starch	695	50	50
Maltodextrin 10	150	100	100
Sucrose	0	341	341
Cellulose, BW200	50	50	50
Milk fat, anhydrous	42.5	200	200
Corn oil	10	10	10
Ethoxyquin	0.04	0.04	0.04
Mineral mix S10001	35	35	35
Calcium carbonate	4	4	4
Vitamin mix V10001	10	10	10
Choline bitartrate	2	2	2
Cholesterol	0	1.5	1.5
<i>Allium tuberosum</i> (AT)	-	-	10

법으로 측정하였다. 아산제약(Seoul, Korea)에서 제공하는 키트(Total Cholesterol Assay Kit AM202; HDL Cholesterol Assay Kit AM203)를 사용하였고, 사용 설명서에 따라 실험하였다.

간 조직 total RNA의 추출 및 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

간 조직 RNA를 isogen과 chloroform을 이용하여 추출하고, 세척하여 얻은 total RNA(4 µg)로부터 cDNA를 합성하였다. qRT-PCR 분석은 SYBR Green PCR Master mix reagent(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 다음 같은 조건으로 시행하였다(Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). 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. PCSK9은 Forward 5'-GGCTATGTCATCAAGGTTCTA-3', Reverse 5'-CAGGTCAGTCTCATCTT-3', LDLR은 Forward 5'-GGGTTGATTCCAAACTCCATTC-3', Reverse 5'-TCCGATTGCCCCATTG-3', 그리고 GAPDH는 Forward 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3', Reverse 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT-3'이 사용되었다. 상대적 발현 및 standard deviation(SD) value는 comparative method를 사용하여 계산하였다.

HepG2 세포 배양

HepG2(human hepatoblastoma)는 ATCC(HB-8065; Manassas, VA, USA)에서 구매하여 DMEM(DMEM-high glucose; Corning, Manassas, VA, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS; Welgene Inc., Gyeongsan, Korea), 1% antibiotics/antimycotics를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator(Thermo Scientific BB15, Thermo Fisher Scientific)에서 배양하였다.

MTT assay

HepG2 세포가 약 70% confluence에 도달하였을 때 trypsin-EDTA(Welgene Inc.)를 이용하여 세포를 떼어내고, 96-well plate에 seed 하였다(day 0). 24시간 이후, 세포를 cold DPBS(Welgene Inc.)로 2회 세척한 후 새 DMEM 배지로 교체하였다. 이때 음성대조군은 DMEM+ 10% FBS를 처리하고, 양성대조군에는 DMEM에 지방이 제거된 FBS (delipidated serum, DLPS, 10%)와 1% antibiotics/antimycotics(DMEM+ 10% DLPS)를 첨가하여 24시간 동안 incubation 하였다(day 1). DLPS는 선행 문헌에 따라 제조하였고(10), 지방 및 콜레스테롤 함량 측정을 통해 배지의

지방 제거를 확인하였다. 배지를 제거하고 cold DPBS로 2회 세척한 후, fresh DMEM+ 10% FBS 혹은 DMEM+ 10% DLPS로 각각 교환하였다. 이때 실험군에는 DMEM+ 10% DLPS에 AT를 농도별(50, 100, 200, 400 µg/mL)로 처리하였다(day 2). 18시간 incubation 후(day 3), cold DPBS로 2회 세척하고 FBS가 포함되지 않은 배지로 교체한 다음 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) solution을 배지에 첨가하여 2시간 동안 배양하였다. 이후 형성된 blue formazan을 DMSO에 용해하여 570 nm와 630 nm에서 microplate reader(SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA)를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다.

Western blot

HepG2 세포가 약 70% confluence에 도달하였을 때 6-well plate에 세포를 seed 하였다(day 0). 24시간 후 세포를 cold DPBS로 2회 세척한 다음 새 DMEM 배지로 교체하였다. 이때 음성대조군에는 DMEM+ 10% FBS를 처리하였고, 양성대조군에는 DMEM+ 10% DLPS를 첨가하여 24시간 동안 incubation 하였다(day 1). 배지를 제거하고 cold DPBS로 2회 세척한 후, fresh DMEM+ 10% FBS 혹은 DMEM+ 10% DLPS로 각각 교환하였다. 이때 실험군에는 DMEM+ 10% DLPS에 AT를 50, 100, 200, 400 µg/mL로 처리하였다(day 2). 18시간 incubation 후(day 3), cold DPBS로 2회 세척하고 세포를 회수하였다. 원심분리(1,200 rpm, 3분) 하여 얻은 pellet을 cell lysis buffer(Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA)로 lysis 하고, bradford assay법으로 단백질을 정량하였다(Bio-Rad Laboratories). 총 15 µg의 단백질을 8% SDS gel에 전기영동하고, 항체[PCSK9(Circulex, Medical & Biological Laboratories. Co., Ltd., Woburn, MA, USA), LDLR(Bio Vision Inc., Milpitas, CA, USA), hepatic nuclear factor 1α (HNF1α; Cell Signaling Technology), SREBP2(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), Actin(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)]를 이용하여 western blotting을 하였다. Enhanced chemiluminescence(ECL) solution(Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)에 incubation 한 후, 표적 단백질의 band를 detection 하였다(Bio-Rad Laboratories).

Total RNA의 추출 및 qRT-PCR

세포 내 콜레스테롤 수용체 조절 관련 유전자의 발현을 측정하기 위하여 qRT-PCR을 수행하였다. HepG2 세포가 약 70% confluence에 도달하였을 때 6-well plate에 세포를 seed 하였다(day 0). 24시간 후 세포를 cold DPBS로 2회 세척한 다음 새 DMEM 배지로 교체하였다. 이때 음성대조군에는 DMEM+ 10% FBS를 처리하였고, 양성대조군에

는 DMEM+ 10% DLPS를 첨가하여 24시간 동안 incubation 하였다(*day 1*). 배지를 제거하고 cold DPBS로 2회 세척한 후 fresh DMEM+ 10% FBS 혹은 DMEM+ 10% DLPS로 각각 교환하였다. 이때 실험군에는 DMEM+ 10% DLPS에 AT 400 µg/mL를 동시 처리하였다(*day 2*). 18시간 incubation 후(*day 3*), cold DPBS로 2회 세척하고, 세포를 수집하고 total RNA를 추출하고, 총 4 µg의 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하였다. qRT-PCR 분석은 SYBR Green PCR Master mix reagent(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 다음과 같은 조건으로 시행하였다(Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories). 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. PCSK9은 Forward 5'-GGCAGTTGGCAGCTGTTT-3', Reverse 5'-CGTGTAGGCCCGAGTGT-3', LDLR은 Forward 5'-AGGAGACGTGCTTGTCTGTC-3', Reverse 5'-CTGAGCCGTTGTCGCAGT-3', SREBP2는 Forward 5'-CGGTAATGATCACGCCAACAT-3', Reverse 5'-TGGTATATCAAAGCTGCTGGAT-3', HNF1α는 Forward 5'-TGGCGCAGCAGTTCACCCAT-3', Reverse 5'-TGAAACGGTTCCTCCGCCCC-3', 그리고 GAPDH는 Forward 5'-ATGTTCTGCATGGGTGTGAAC-3', Reverse 5'-GCATGGACTGTGGTCATGAGT-3'이 사용되었다. 모든 반응은 3반복으로 시행되었으며, 상대적 발현 및 SD value는 comparative method를 사용하여 계산하였다.

LDLR의 lysosomal degradation 및 단백질 합성 조절 측정

HepG2 세포가 약 70% confluence에 도달하였을 때, 6-well plate에 세포를 seed 하였다(*day 0*). 24시간 후 세포를 cold DPBS로 2회 세척한 다음 fresh DMEM+ 10% DLPS를 첨가하여 24시간 동안 incubation 하였다(*day 1*).

배지를 제거하고 cold DPBS로 2회 세척한 후, fresh DMEM+ 10% DLPS를 첨가하였고, 이때 lysosomal degradation inhibitor인 bafilomycin A1(BA1; Sigma-Aldrich Co.)을 0 또는 50 nM 처리하고, 0 또는 400 µg/mL의 AT를 동시에 처리하였다(*day 2*). 18시간 incubation 후(*day 3*), cold DPBS로 2회 세척하고 세포를 회수하였다. 원심분리(1,200 rpm, 3분) 후, 세포 pellet을 얻었다. LDLR 단백질 합성 조절 실험을 위해서 day 1까지 동일하게 처리하였다. Day 2에 배지를 제거하고 cold DLPS로 2회 세척한 후, fresh DMEM+ 10% DLPS를 첨가하고 0 또는 400 µg/mL의 AT를 처리하였다. 24시간 incubation 한 다음 day 3에는 단백질 합성 억제제인 cycloheximide(CHX; 5 µg/mL; Sigma-Aldrich Co.)를 처리하고 0, 1, 2, 4, 8시간 후 세포를 회수하였다. 위의 방법으로 western blot을 실시하였다.

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 GraphPad Prism(version 5.0, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하였다.

결과 및 고찰

AT 보충식이의 콜레스테롤 조절 효능

WD로 사육된 마우스의 혈중 총 콜레스테롤 함량은 LD 대조군의 총 콜레스테롤 함량보다 유의적으로 높았다(Fig. 1). AT 보충식은 고콜레스테롤 혈증이 유도된 WD군 마우스의 총 콜레스테롤, HDL 및 LDL 콜레스테롤 모두를 유의적 수준으로 낮추었다($P < 0.05$).

선행 연구에서 부추 추출물(2%, w/w)은 고지방 식이로 비만이 유도된 마우스에서 체중과 간 조직 무게를 유의적으로 감소시켰다($P < 0.05$)(9). 또한, 부추 추출물은 간과 지방 조직에서 지방구의 축적 및 지방 조직의 크기를 각각 감소시

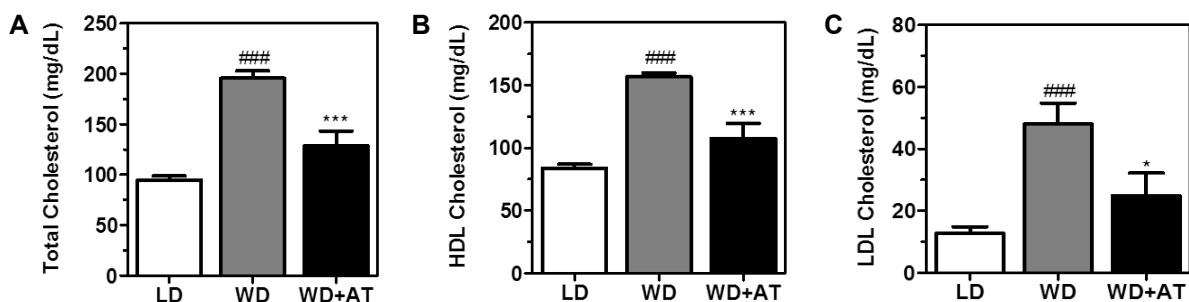


Fig. 1. *Allium tuberosum* (AT; 1%, w/w) supplementation reduces total (A), HDL (B), and LDL (C) cholesterol concentrations in mice fed with a Western diet (WD). Values are means±SD. Significant differences were compared with low fat control diet (LD) at ### $P < 0.001$ by Student's *t*-test. Significant differences were compared with WD at * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ by Student's *t*-test.

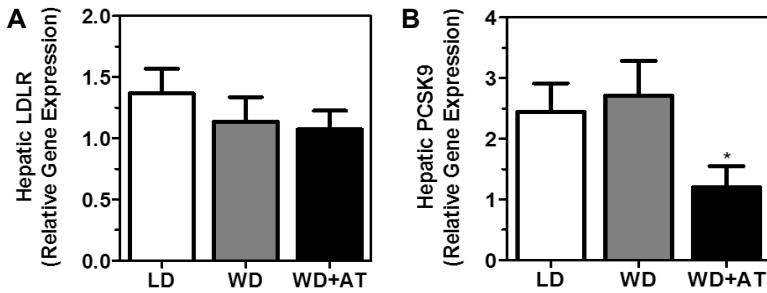


Fig. 2. *Allium tuberosum* (AT; 1%; w/w) supplementation does not affect hepatic LDLR gene expression (A), and downregulates hepatic PCSK9 gene expression (B) in mice fed with a Western diet (WD). Values are means±SD. Significant differences were compared with WD at $P < 0.05$ by Student's *t*-test.

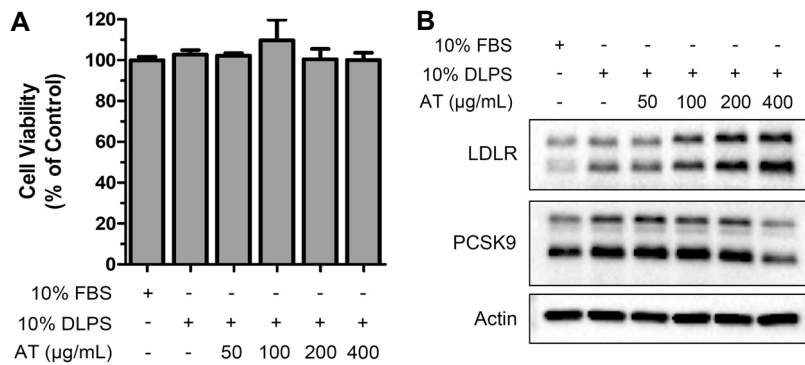


Fig. 3. *Allium tuberosum* (AT) dose-dependently enhances LDLR protein expression and attenuates PCSK9 protein expression in HepG2 cells cultured in lipid depleted condition. HepG2 cells were treated in a medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) or 10% delipidated serum (DLPS) with or without AT (50, 100, 200, 400 μg/mL). Cellular cytotoxicity was determined using MTT method (A). HepG2 cells were treated as described above, and LDLR and PCSK9 protein expression was measured using western blot analysis (B). All data are expressed as mean±SD from the samples of each group.

켰다(9). 기니피그를 이용한 연구에서도 부추(2 g/kg body weight)는 혈중 지질(콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, 중성지질 등)의 농도를 유의적으로 감소시켜 부추의 혈행 개선 효능을 입증하였다(8). 하지만 현재까지 부추 추출물의 콜레스테롤 저감 관련 기전을 밝힌 논문은 전무하다. 이러한 점에서 본 연구는 부추의 콜레스테롤 저감 효능에 PCSK9이라는 새로운 타깃 억제제의 가능성에 대하여 실험한 최초 연구 논문이라는 점에서 의의가 있다.

AT 보충식이의 간 조직 내 LDLR, PCSK9 유전자 발현 조절

AT의 LDLR 및 PCSK9 조절을 통한 혈청 콜레스테롤 저감 효능을 밝히기 위하여 간 조직 내 LDLR과 PCSK9의 유전자 발현량을 측정하였다. qRT-PCR 수행 결과 간 조직 내 LDLR의 발현량은 그룹 간 유의적인 변화가 없었다(Fig. 2). LD와 WD군 간의 차이는 유의적이지 않았지만, AT 보충 식이는 간 조직 내 PCSK9의 유전자 발현량을 유의적 수준($P < 0.05$)으로 억제하였는데, 이를 통하여 AT의 PCSK9 조절(억제) 가능성을 확인할 수 있었다.

AT의 콜레스테롤 저감 효능은 기존 알려져 있던 메커니즘(예를 들어, HMGCR 활성 억제 등)이 아닌 PCSK9 억제와 이를 통한 LDLR 발현 증진 혹은 적어도 LDLR을 억제시키지 않는 기전을 통해 이루어짐을 예측할 수 있었다. 이에 AT는 기존 스타틴 약물이 가지고 있던 PCSK9 증진을 통한 cholesterol tolerance 유발이라는 한계점을 극복할 수 있는 식품 소재로써 제안될 수 있다.

HepG2 세포에서 AT의 LDLR, PCSK9 단백질 발현 조절

본 연구에서는 HepG2 세포를 이용하여 AT의 콜레스테

롤 저감 관련 메커니즘을 밝히고자 하였다. 선행논문에 따라 DLPS를 제조하고(10), HepG2 세포를 DLPS에 incubation 하여 지방이 제거된 환경으로 만들어주었다. AT를 50, 100, 200, 400 μg/mL 농도로 처리한 후 cell viability를 MTT solution을 이용하여 측정하였다. 그 결과 AT 400 μg/mL 농도까지는 cell viability에 영향을 주지 않음을 알 수 있었다(Fig. 3A). HepG2 세포에서 DLPS 포함 배지 또한 10% FBS 포함 배지에 비해 cell viability를 낮추지 않음을 알 수 있었다.

독성 없는 농도의 AT를 세포에 처리하여 PCSK9과 LDLR 발현 조절을 western blot 기법으로 측정하였다. AT 400 μg/mL 처리는 HepG2 세포에서 LDLR의 단백질 발현을 농도 의존적으로 증가시켰다(Fig. 3B). AT는 특히 400 μg/mL에서 PCSK9의 단백질 발현을 확연하게 억제함을 알 수 있었다(Fig. 3B). 예상했던 바와 같이 PCSK9와 LDLR의 단백질 발현은 지방이 제거된 상태에서(10% DLPS 처리) 10% FBS 처리군보다 증가하였다.

콜레스테롤 고갈 상태에서 세포는 SREBP2 전사인자의 활성 증진을 통해 HMGCR, LDLR, PCSK9 등의 유전자 발현을 증가시키는 등 세포 내 콜레스테롤 증진 메커니즘을 작동시킨다. 따라서 PCSK9 inhibition 소재 발굴 시스템 구축을 위해서 세포를 콜레스테롤 고갈 상태로 만들어줌으로써 PCSK9을 증가시키고, 그 상태에서 inhibition 정도를 측정하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

HepG2 세포에서 AT의 LDLR, PCSK9, SREBP2, HNF1α 유전자 발현 조절

AT의 PCSK9 억제 및 LDLR 발현 증진을 조절하는 유전

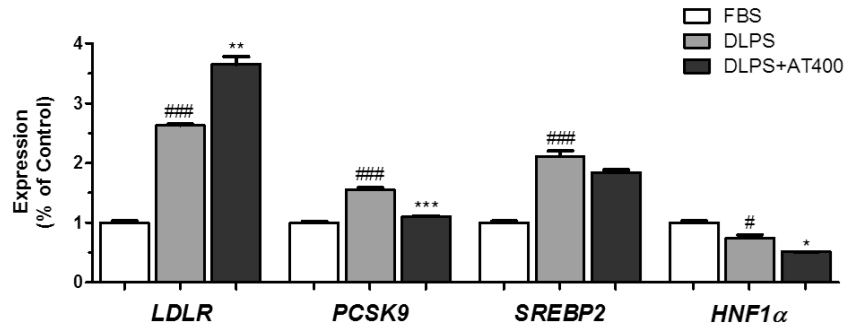


Fig. 4. *Allium tuberosum* (AT) significantly enhanced LDLR gene expression and significantly attenuated PCSK9 and HNF1 α gene expression in HepG2 cells. HepG2 cells were treated in a medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) or 10% delipidated serum (DLPS) with or without AT (400 μ g/mL). Expression of genes (LDLR, PCSK9, SREBP2, HNF1 α) was measured using quantitative real-time PCR. All data are expressed as mean \pm SD from the samples of each group. Significant differences were compared with FBS at $^{\#}P<0.05$ and $^{###}P<0.001$ by Student's *t*-test. Significant differences were compared with DLPS at $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, and $^{***}P<0.001$ by Student's *t*-test.

자 및 전사인자의 발현량을 qRT-PCR로 측정하였다. 지방이 제거된 상태에서 HepG2 세포의 PCSK9, LDLR 그리고 전사 인자인 SREBP2의 유전자 발현량은 유의적으로 증가하였다($P<0.05$; Fig. 4). 이는 지방이 없는 상태에서 세포는 homeostasis를 이루려는 노력의 일환으로 SREBP2의 유전자 발현 증진을 통해 LDLR을 증진시켜 세포 내 LDL uptake를 증가시키기 때문이다. AT 400 μ g/mL 처리는 LDLR의 유전자 발현을 유의적으로 증가시켰고($P<0.01$), PCSK9의 유전자 발현을 유의적으로 낮추었다($P<0.001$). 핵 내에서 LDLR과 PCSK9의 전사에 관여하는 SREBP2의 유전자 발현은 AT에 의해 변화하지 않았다(Fig. 4). 흥미롭게도 SREBP2 이외에 PCSK9의 전사에 독립적으로 관여하는 전사인자인 HNF1 α 의 발현량이 지방 제거 상태에서 유의적으로 감소하였고, AT 처리에 의해서 유의적으로 더욱 감소함을 볼 수 있었다($P<0.05$). 종합적으로 AT는 HNF1 α 의 억제를 통해 PCSK9의 전사를 감소시키며 이는 SREBP2와는 독립적으로 이루어짐을 알 수 있었다.

지방 제거 상태에서 보인 PCSK9 유전자 발현량의 유의적 감소는 HNF1 α 의 감소를 통해 이루어질 수 있다. 지방 제거 상태에서 SREBP2 유전자 발현량은 control 군(10% FBS 처리군)과 비교했을 때 유의적으로 증가하였고, 이는 앞서

언급한 세포의 콜레스테롤 homeostasis 유지 기전 작동에 의한 것이다. AT는 SREBP2의 유전자 발현량을 감소시키는 경향을 보였지만, 유의적으로 감소시키지는 않았다. 따라서 PCSK9의 억제는 PCSK9의 독립적 전사인자인 HNF1 α 의 감소와 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다. 흥미롭게도 AT에 의한 SREBP2의 변화 없이 LDLR의 유전자 발현은 유의적인 수준으로 증가하였다. 즉 AT는 LDLR의 유전자 발현량을 SREBP2-independent 하게 조절하고 있다. Ochiai 등(11)의 연구에 따르면 kaempferol은 HepG2 세포에서 LDLR의 유전자 발현과 활성을 증가시키는데, 특히 LDLR 유전자는 Sp1 유전자의 knockdown을 통해 억제된다는 사실을 밝혔다. 또한, kaempferol은 Sp1 유전자를 LDLR 유전자 promoter 부위로 recruit 하는 것을 촉진시켰다(11). 즉 kaempferol은 Sp1의 활성을 증가시키고 이를 통해 LDLR의 유전자 발현과 활성을 증가시켰다. AT의 SREBP2 독립적으로 LDLR의 발현을 증가시키는 단백질(예를 들어, Sp1)의 조절 여부 및 기전에 대한 추후 연구가 필요하겠다.

HepG2 세포에서 AT의 LDLR 단백질 합성 및 lysosomal degradation 조절

단백질 합성 억제제인 CHX를 이용하여 AT의 단백질 생

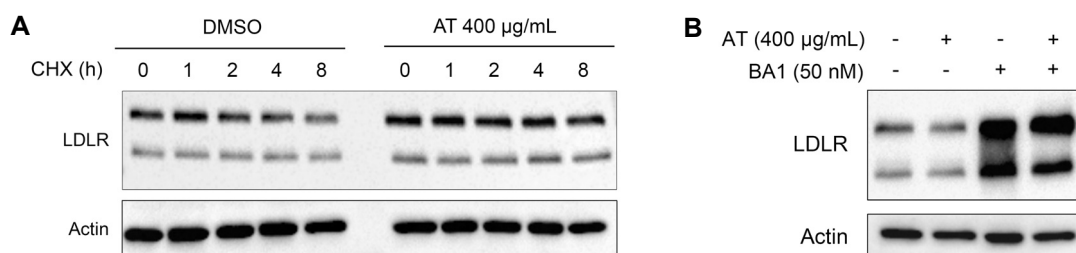


Fig. 5. *Allium tuberosum* (AT) reverses LDLR protein synthesis inhibition and protects against lysosomal degradation. LDLR protein expression was measured 0, 1, 2, 4, and 8 hours post-treatment with cycloheximide (CHX; 5 μ g/mL) in HepG2 cells supplemented with delipidated serum (DLPS). LDLR proteins expression was measured using western blot (A). HepG2 cells were treated with DLPS in the presence or absence of Bafilomycin A1 (BA1; 50 nM) and AT at 400 μ g/mL, and LDLR proteins expression was measured using western blot (B). All data are expressed as mean \pm SD from the samples of each group.

성 억제 회복능을 측정하였다. 지방 제거 상태에서 HepG2 세포에 AT를 0 또는 400 µg/mL로 처리하여 incubation 하고 0, 1, 2, 4, 8시간 동안 CHX에 incubation 한 후 세포를 회수하여 western blot을 수행하였다. 그 결과 AT를 처리하지 않은 군에서는 예상했던 바와 같이 CHX의 처리 시간이 길어질수록 LDLR의 발현이 감소하였다(Fig. 5A, 왼쪽 패널). 이는 CHX 처리에 의해 LDLR 단백질의 합성이 시간이 지날수록 억제됨을 보여주고 있다. 반면 AT를 미리 처리한 군에서는 이와 같은 현상이 reverse 되었다(Fig. 5A, 오른쪽 패널). 즉 CHX 처리에 의해 유도되는 LDLR 단백질 합성 억제를 AT가 효과적으로 막음을 알 수 있었다.

지방 제거 상태에서 HepG2 세포에 lysosomal inhibitor인 BA1을 처리하고, 동시에 AT 0 혹은 400 µg/mL를 처리하여 LDLR의 단백질 발현을 측정하였다. 그 결과 BA1 처리는 LDLR의 발현을 확연하게 증가시켰고, 이는 LDLR의 lysosomal degradation이 억제됨을 보여주는 결과이다(Fig. 5B). BA1과 AT를 동시에 처리했을 때 LDLR 단백질의 발현은 더욱 증가하였다. 이는 AT가 BA1 단독처리보다 더욱 효과적으로 LDLR의 lysosomal degradation을 막는다는 것을 보여주고 있다. 종합적으로 AT는 LDLR 단백질의 합성 억제를 reverse 시키며, 이는 lysosomal degradation 억제를 통해 이루어짐을 알 수 있었다.

지방이 제거된 상태에서 LDLR의 단백질 발현량은 증가하였고, AT는 LDLR 단백질의 발현량을 더욱 증가시켰다. 이러한 AT의 LDLR 조절능은 PCSK9 억제를 통해 이루어질 가능성이 크다. LDLR 억제제인 PCSK9은 LDLR의 lysosomal degradation을 통해서 콜레스테롤 homeostasis를 조절하는 역할을 한다. 예를 들어 PCSK9은 LDLR의 세포막으로의 recycle을 막고, 대신 LDLR의 lysosomal degradation을 유도한다(12). 즉 PCSK9의 농도가 높은 상황에서 LDL 콜레스테롤 clearance가 일어나지 않게 된다. 본 연구에서는 실험을 통해 PCSK9 inhibitor인 AT가 LDLR의 lysosomal degradation 억제를 통해 LDLR 단백질 합성 억제를 reverse 함을 밝혔다.

요 약

본 연구에서는 부추 추출물(*Allium tuberosum*, AT) 보충식이(1%, w/w)를 12주간 고지방 식이와 함께 마우스에 제공하였다. Western diet(WD)군의 마우스는 low fat diet(LD)군의 마우스보다 유의적으로 높은 총 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤 수치를 보였으며, 이는 AT 보충식에 의하여 유의적으로 감소하였다. 또한, 마우스 간 조직 내 PCSK9 유전자가 AT에 의해 유의적으로 감소하였다. 이를 통해 AT의 PCSK9 억제를 통한 LDL 콜레스테롤 저감 가능성을 확인하였다. HepG2 세포주를 지방 부족 환경으로 만들고 AT를 처리하여 PCSK9과 LDLR, 그리고 관련 단백질 및 유전자의 조절 정도를 평가하였다. 그 결과 독성 없는 농도의

AT는 LDLR 단백질 발현을 농도 의존적으로 증가시켰으며, 특히 400 µg/mL의 AT는 PCSK9 단백질 발현을 억제하였다. 유사하게 AT는 LDLR 유전자 발현량을 유의적으로 증가시켰고, PCSK9의 발현량은 유의적으로 감소시켰다. PCSK9의 억제는 SREBP2가 아닌 AT에 의해 유의적으로 감소한 HNF1a 전사인자 때문이다. AT에 의한 LDLR 유전자의 SREBP2-independent 한 조절은 추후 연구가 필요하다. 다음으로 PCSK9 억제제인 AT의 LDLR 단백질 degradation 및 단백질 합성 조절을 평가하기 위해 지방 제거 상태의 HepG2 세포에 lysosomal degradation inhibitor인 BA1과 단백질 합성 억제제인 CHX를 처리하여 LDLR 단백질 발현 변화를 관찰하였다. AT(400 µg/mL)는 LDLR 단백질의 합성 억제를 block 하였고, 이는 LDLR의 lysosomal degradation을 막음으로써 이루어짐을 알 수 있었다. PCSK9 억제는 고콜레스테롤 혈증이나 콜레스테롤 저항성 치료 혹은 예방 소재 개발에서 중요한 타깃이 될 수 있으며, 부추와 같은 PCSK9 억제 활성을 지닌 천연물 혹은 식품 소재의 발굴이 기존의 치료와 병행하여 또는 독립적으로도 쓰일 수 있는 안전한 소재로써 제안될 수 있다. 추후 동물 실험에서 부추 추출물 및 활성 성분의 PCSK9 활성 억제 연구 및 나아가 부추의 PCSK9 억제를 통한 콜레스테롤 저감 효능 임상 연구 등이 제안될 수 있겠다.

감사의 글

본 연구는 한국식품연구원 사업연구비(과제번호 E0133107-05)의 지원을 받아 수행한 연구 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Small DM, Shipley GG. 1974. Physical-chemical basis of lipid deposition in atherosclerosis. *Science* 185: 222-229.
2. Moon H, Hill MM, Roberts MJ, Gardiner RA, Brown AJ. 2014. Statins: protectors or pretenders in prostate cancer?. *Trends Endocrinol Metab* 25: 188-196.
3. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, Bergeron J, Luc G, Averna M, Stroes ES, Langslet G, Raal FJ, El Shahawy M, Koren MJ, Lepor NE, Lorenzato C, Pordy R, Chaudhari U, Kastelein JJ; ODYSSEY LONG TERM Investigators. 2015. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med* 372: 1489-1499.
4. Sabatine MS, Giugliano RP, Wiviott SD, Raal FJ, Blom DJ, Robinson J, Ballantyne CM, Somaratne R, Legg J, Wasserman SM, Scott R, Koren MJ, Stein EA; Open-Label Study of Long-Term Evaluation against LDL Cholesterol (OSLER) Investigators. 2015. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med* 372: 1500-1509.
5. Lee JH, Yang HS, Park KW, Kim JY, Lee MK, Jeong IY, Shim KH, Kim YS, Yamada K, Seo KI. 2009. Mechanisms of thiosulfates from *Allium tuberosum* L.-induced apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Toxicol Lett* 188: 142-147.
6. Park KW, Kim SY, Jeong IY, Byun MW, Park KH, Yamada

- K, Seo KI. 2007. Cytotoxic and antitumor activities of thiosulfinates from *Allium tuberosum* L.. *J Agric Food Chem* 55: 7957-7961.
7. Kim SY, Park KW, Kim JY, Jeong IY, Byun MW, Park JE, Yee ST, Kim KH, Rhim JS, Yamada K, Seo KI. 2008. Thiosulfinates from *Allium tuberosum* L. induce apoptosis via caspase-dependent and -independent pathways in PC-3 human prostate cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 18: 199-204.
8. Choudhary R. 2008. Beneficial effect of *Allium sativum* and *Allium tuberosum* on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis. *Pak J Physiol* 4: 1-3.
9. Shin EJ, Choi HK, Hur HJ, Park JH, Sung MJ, Lee AS, Hur JY, Kim MS, Um SJ, Hwang JT. 2017. *Allium tuberosum* improves hepatic steatosis via inhibition of histone acetylation. *Curr Top Nutraceutical Res* 15: 1-8.
10. Hannah VC, Ou J, Luong A, Goldstein JL, Brown MS. 2001. Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem* 276: 4365-4372.
11. Ochiai A, Miyata S, Iwase M, Shimizu M, Inoue J, Sato R. 2016. Kaempferol stimulates gene expression of low-density lipoprotein receptor through activation of Sp1 in cultured hepatocytes. *Sci Rep* 6: 24940.
12. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. 2007. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem* 282: 18602-18612.