

# Effects of Adipokine Retnla on the Regulation of High-Density Lipoprotein Metabolism

Mi-Ran Lee \*

## Abstract

In this paper, we propose to evaluate the effect of Resistin-like molecule alpha (Retnla) on the expression of transporters involved in modulating concentrations of peripheral cholesterol and plasma high-density lipoprotein (HDL) cholesterol. High levels of blood cholesterol are a well-recognized risk factor for atherosclerosis and are eliminated via the process of reverse cholesterol transport (RCT). We recently showed that Retnla ameliorates hypercholesterolemia and atherosclerosis by increasing biliary cholesterol secretion, the final step of the process, in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. However, the role of Retnla in HDL-mediated cholesterol efflux, initial step of RCT pathway, is not yet clear. To identify cholesterol transport genes regulated by Retnla, we performed an extensive microarray-based gene expression screen using livers from Retnla-overexpressing (Tg) mice and control animals. The most significant change in Retnla-Tg mice was an upregulation of ATP-binding cassette sub-family G member 4 (Abcg4) transport and was validated using quantitative RT-PCR. The validated gene was also induced by treatment of purified Retnla protein in RAW 264.7 cells incubated with acetylated low-density lipoprotein and Hepa1c1c7 cells. Taken together, these results indicates that Retnla might also accelerate initial step of RCT pathway, suggesting therapeutic value of Retnla in the treatment of hypercholesterolemia and atherosclerosis.

▶ Keyword : Resistin-like molecule alpha, Atherosclerosis, Reverse cholesterol transport, Hypercholesterolemia, High-density lipoprotein

## I. Introduction

세계보건기구(World Health Organization)의 통계에 따르면 심혈관 질환(cardiovascular diseases)은 전 세계적으로 사망률 1위를 차지하고 있으며, 대표적인 질환으로는 협심증과 심근경색증을 포함하는 관상동맥질환(coronary heart disease)과 뇌졸중(stroke)이 있다. 동맥경화(atherosclerosis)는 이들 심혈관질환의 주요 원인이 되고 있는 질환으로서 혈중 콜레스테롤 수치가 높은 상태인 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia)이 동맥경화를 유발하는 고위험 인자로 알려져 있다[1-2]. 2008년부터

2011년까지 최근 5년간 질병관리본부 국민건강영양조사과의 통계자료에 따르면, 우리나라는 고콜레스테롤혈증 유병자 수가 꾸준히 증가하고 있고, 향후 지속적으로 증가할 것으로 전망했다[3]. 이는 우리나라의 경제성장과 더불어 식생활의 서구화로 인한 고지방식 섭취량의 증가와 인구 고령화로 인한 영향 때문인 것으로 예상된다[4].

혈중 콜레스테롤은 주로 초저밀도 지단백질(very low-density lipoprotein, VLDL), 저밀도 지단백질(low-density lipoprotein, LDL), 고밀도 지단백질(high-density lipoprotein, HDL)에 의해서 운반되는데, 초저밀

• First Author: Mi-Ran Lee, Corresponding Author: Mi-Ran Lee

\*Mi-Ran Lee(leemr@jwu.ac.kr), Dept. of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University

• Received: 2016. 11. 23, Revised: 2016. 11. 30, Accepted: 2016. 12. 08.

• This work was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (NRF-2015R1C1A2A01053571).

도 지단백질과 저밀도 지단백질은 콜레스테롤을 동맥혈관 벽으로 수송하여 동맥벽에 콜레스테롤을 침착시키므로 동맥경화를 유발하는 작용을 하는 반면[5], 고밀도 지단백질은 동맥벽에 쌓인 콜레스테롤을 다시 간으로 수송하여 혈관을 깨끗하게 해 주므로 동맥경화를 억제하는 작용을 한다[2]. 이와 같이, 혈중 초저밀도 지단백질과 저밀도 지단백질의 높은 농도와 고밀도 지단백질의 낮은 농도는 동맥경화를 유발하는 주요 원인이 될 수 있다.

많은 동맥경화 치료제가 꾸준히 개발되어 왔고, 그 대부분은 체내 콜레스테롤 농도를 조절하는 분자기전에 기반 한 스타틴(statin) 계열의 약물이다. 스타틴 복용은 간의 콜레스테롤 합성을 저하시킬 뿐만 아니라 간의 저밀도 지단백질에 대한 수용체(receptor)를 증가시켜 간으로 콜레스테롤 흡수를 촉진시키는데, 이는 결국 혈액 내 저밀도 지단백질에 의해 수송되는 콜레스테롤 농도의 감소 효과를 나타내게 된다[6-7]. 하지만, 여전히 동맥경화로 인해 발생하는 심혈관 질환은 전 세계인의 사망원인 1위를 차지하고 있으며, 세계보건기구에서는 2020년에 이르면 전 세계인의 약 80%가 심혈관 질환으로 사망할 것으로 예측하고 있어서 이 질환의 심각성뿐만 아니라 효과를 더욱 극대화한 새로운 치료제의 개발이 시급하다는 것을 일깨워주고 있다. 따라서 동맥경화의 발생기전을 더욱 명확하게 규명하여 새로운 치료 전략을 모색하고, 스타틴을 보완 및 대체할 수 있는 신규 표적 유전자 및 단백질을 발굴하는 일이 시급하다.

아디포카인(adipokine)은 지방조직에서 분비되는 신진대사물질로 비정상적으로 분비되어질 경우 비만, 당뇨병, 이상지질혈증, 동맥경화를 포함하는 각종 만성 질환의 발생에 영향을 미칠 수 있다. 이러한 이유로 최근 만성질환 치료를 위한 후보물질로서 아디포카인에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다[8]. 따라서 이상지질혈증 및 동맥경화에 영향을 주는 아디포카인의 발굴 및 기전 연구를 통해 그 역할을 명확히 규명하는 것은 이들 만성 질환의 치료제 개발을 위한 새로운 치료 전략 모색을 가능하게 하고, 향후 이상지질혈증 및 동맥경화 치료를 위한 표적 단백질로 이용할 수 있는 기반을 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

이에 본 연구에서는 이상지질혈증 및 동맥경화 치료를 위한 후보물질로서 신규 아디포카인 Retnla (resistin-like molecule alpha) 유전자를 제안하고자 하는데, 2장에서 관련 연구를 살펴보고, 3장에서 본 연구를 진행하기 위해 이용된 주요 실험 기법에 대해 자세히 설명한다. 4장에서는 본 연구의 실험 결과를 제시하고, 마지막으로 5장에서 결론을 맺는다.

## II. Related Works

본 연구에서 제안하는 Retnla의 국내·외 연구동향은 다음과 같다. Retnla 유전자는 2000년 난황(ovalbumin)을 이용하여 기관지 염증을 유도한 마우스의 기관지 세척액에서 처음 발견되었다[9]. Retnla는 마우스의 폐, 비장, 심장, 지방조직 등 여러 장기에서 발현되지만, 특히 지방조직에서 가장 높게 발현되므로 아디포카인으로서 알려져 있다[10]. 지금까지 보고된 바

에 의하면 Retnla는 주로 염증조절 및 염증성 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나[11-12], 몇몇 논문에서는 Retnla가 대사조절에서도 중요한 역할을 할 수 있다는 가능성을 제시하였다. 예를 들면, Retnla가 지방세포 분화를 억제하였고, 비만 및 당뇨병 모델 마우스인 leptin 수용체 결핍 마우스(db/db)와 절식(dietary restriction)한 마우스에서 그 발현이 감소하였다[14-16]. 최근 이미란 외(2014)는 대사성 질환에서 Retnla의 기능을 최초로 보고하였는데, Retnla가 간에서 콜레스테롤을 담즙산으로 분해하는 효소인 Cyp7a1 (Cholesterol 7 alpha-hydroxylase) 유전자의 발현을 증가시켜서 간의 콜레스테롤 분해를 유도하고 결국 혈액으로 분비되는 콜레스테롤의 농도가 감소되어 동맥경화가 줄어든다는 사실을 증명하였다[13]. 이러한 국내·외의 선행연구결과를 바탕으로 본 연구에서는 Retnla에 의한 항동맥경화 효과의 또 다른 기전으로서 고밀도 지단백질 콜레스테롤 형성에서 Retnla의 영향을 in vitro 실험을 통해 확인해 보고자 하였다.

## III. Methodology

### 1. Animal Study and Microarray Analysis

Retnla 과발현 마우스가 미리 보고된 바와 같이 제작되었다[13]. 마이크로어레이(microarray) 분석 실험을 위해서 11주령의 Retnla 과발현(Tg) 웅성 마우스와 대조(non-Tg) 마우스가 각각 세 마리씩 이용되었고, 이들 마우스의 간 조직에서 추출한 RNA가 Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 array에 이용되었다. 그 결과가 GenPlex software (Istech Corporation)를 이용하여 분석되었고 qRT-PCR을 이용하여 검증되었다.

### 2. Purification of Recombinant Retnla Protein

활성형의 Retnla 단백질을 정제하기 위해서 신호 펩티드(signal peptide) 부분이 제외된 Retnla cDNA가 pSecTag2/hygro B 포유세포 발현 벡터(ThermoFisher Scientific)의 다중 제한효소 클로닝 부위(multiple cloning site)에 존재하는 NotI과 HindIII 제한효소 위치에 삽입되었다. 결과적인 재조합 벡터가 Retnla 단백질의 N말단 신호 펩티드를 제외한 아미노산 24~111의 생산을 가능하게 한다. pSecTag2/hygro B 포유세포 발현 벡터는 N말단 부위에 Iggkappa leader sequences가 존재하여 Retnla 단백질이 세포 배양 배지로 분비될 수 있게 해 주므로, 사람 배아 신장 세포주 HEK 293T 세포에 재조합 Retnla 발현 벡터를 형질 도입(transfection)한 후 세포배양배지로 분비된 Retnla 단백질을 Ni-NTA 친화크로마토그래피법을 이용하여 정제하였다.

### 3. Immunoblotting

재조합 Retnla 단백질의 분비와 정제를 확인하기 위해서 세

Table 1. Expression Profiles of Cholesterol Transport-Related Genes in Retnla-Tg Mice.

Gene symbol	Gene name	NCBI RefSeq	GeneChip
Abca1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	NM_012454	0.93
Abcg1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	1423570_at	0.8
Abcg4	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 4	NM_128955	5.86
Abcg5	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5	NM_031884	0.77
Abcg8	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8	NM_026180	0.75
Srb1	Scavenger receptor class B, member 1	NM_016741	1.17
CD36	CD36 antigen	1416050_a_at	1.17

Total RNA was extracted from livers of non-Tg and Retnla-Tg mice, and transcriptional profiling was performed on individual samples using Affymetrix Mouse Genome chips (column 4) as described in the Methods. \* $P < 0.05$ ; one-way analysis of variance (ANOVA).

포배양배지의 20 $\mu$ l와 최종 정제된 단백질 500ng이 15% SDS-PAGE에서 전기영동 되었고, anti-Retnla 다클론성 항체 (polyclonal antibody) (2,000배 희석)가 이용되었다[13].

#### 4. Cell Culture and Treatment

마우스 대식세포주 RAW 264.7 세포가 9% 우태혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium 배지에서 배양되었다. 본 연구를 위해서 세포를 3시간동안 혈청고갈(serum starvation) 처리 하였고, 12시간 동안 Fig. 4에서 지시된 농도대로 재조합 Retnla 단백질을 처리하였다. 아세틸화 저밀도 지단백질(acetylated LDL, acLDL)이 재조합 Retnla 단백질의 처리 12시간 전에 25 $\mu$ g/ml의 농도로 전 처리되었다.

마우스 간암세포주 Hepa1c1c7 세포가 9% 우태혈청을 포함하는 Alpha Minimum Essential Medium without nucleosides 배지에서 배양되었고, RAW 264.7 세포와 동일하게 재조합 Retnla 단백질이 처리되었다.

#### 5. RNA Isolation, RT-PCR, and qRT-PCR

간조직과 세포의 전체 RNA가 Trizol 시약(5 PRIME)을 이용하여 추출되었고, 1.5 $\mu$ g RNA가 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)를 이용하여 cDNA로 합성되었다. qRT-PCR이 ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems)을 이용하여 두 단계로 실행되었고, SYBR Green PCR master mix (KAPA Biosystems)가 이용되었다. RT-PCR에 사용된 Abcg4와 Vldlr에 대한 primer는 다음과 같다. Abcg4 forward, 5'-catgctctcctcatgtttg-3', Abcg4 reverse, 5'-ctgagactgggagacacag-3', Vldlr forward, 5'-gtgactcccacctgtacatac-3', Vldlr reverse, 5'-ccgtttatcctattgccattg-3'. RT-PCR에 사용된 나머지 primer는 다음의 선행연구를 참고하여 제작되었다. Cd36은 ref. 18을 참고하였고, Ldlr, Srb1, Lxra, Ppar $\gamma$ 은 ref. 19를 참고하여 제작되었다. 또한, Hmgcor는 ref. 20을 참고하여 제작되었다. qRT-PCR에 사용된 primer는 다음과 같다. Abcg4는 RT-PCR primer와 동일하게 사용되었고, Abca1은 ref. 21를 참고하여 제작되었다. 또한, Abcg1, Abcg5, Abcg8, Srb1, Cd36,  $\beta$ -actin은 ref. 18을 참고하였다.

#### 6. Statistical Analysis

마이크로어레이 결과가 일원분산분석(one-way analysis of variance)으로 평가되었다. 이중 콜레스테롤 수송 관련 유전자들을 선별하여 대조마우스와 비교했을 때 Retnla-Tg 마우스의 간조직에서 변화양상을 확인하였다. 두 그룹간의 평균이 유의수준 0.05이하일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. qRT-PCR 결과를 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었고, 두 그룹의 차이가 양측 비모수적 맨-휘트니 U 검정(two-tailed non-parametric Mann-Whitney U-test)을 이용하여 평가되었다.

### IV. Results

#### 1. Experimental procedures

본 연구의 전체적인 실험 방법은 Fig. 1과 같다. cDNA 마이크로어레이를 이용하여 Retnla 과발현에 의해 조절되는 간의 유전자들의 발현 양상을 분석하였고, qRT-PCR 기법을 이용하여 마이크로어레이 결과를 검증하였다. 다음으로 재조합 Retnla 단백질을 정제하여 RAW 264.7 대식세포와 Hepa1c1c7 간세포에 처리한 후, RT-PCR 기법을 이용하여 마이크로어레이에서 선별된 유전자가 Retnla에 의해 조절 받는지 최종 평가하였다.

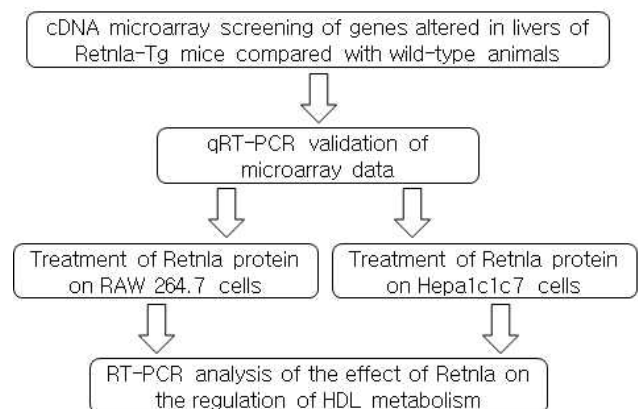


Fig. 1. Schematic diagram of experimental procedures.

## 2. Expression Profiling of Cholesterol Transport Genes Regulated by Retnla

말초 조직 내의 잉여 콜레스테롤은 역콜레스테롤수송 (reverse cholesterol transport) 경로를 통하여 간으로 운반된 후 분변으로 배출되는데, 이와 같은 역콜레스테롤수송 경로의 활성화는 체내 콜레스테롤을 제거하여 동맥경화를 억제하는데 유용하다[2]. 역콜레스테롤수송은 크게 3단계로 나눌 수 있는데, 첫 번째는 말초조직의 콜레스테롤을 혈중으로 배출하는 단계이고, 두 번째는 혈중으로 배출된 콜레스테롤을 간으로 운송하는 단계이고, 세 번째는 간으로 운송된 콜레스테롤을 담즙산으로 분해하여 분변으로 배출하는 단계이다. 이미란 외(2014)의 선행연구에서는 Retnla가 3번째 단계를 활성화시킴으로써 동맥경화 억제 효과를 나타낸다는 사실을 증명하였는데, 본 연구에서는 Retnla가 역콜레스테롤수송의 첫 번째와 두 번째 단계에서 효과가 있는지를 확인해 보고자 하였다. 즉, Retnla에 의해 조절되는 콜레스테롤 수송 인자들을 확인하기 위해서 Retnla 과발현 마우스와 대조 마우스로부터 지질대사의 주요기 관인 간 조직을 이용하여 cDNA 마이크로어레이 분석하였다. Table 1은 cDNA 마이크로어레이 분석의 결과를 나타내고 있는데, 4번째 열은 대조마우스와 비교하여 Retnla-Tg 마우스에서 변화한 콜레스테롤 수송관련 유전자들의 발현 양 차이를 배수 변화로 보여주고 있다. 흥미롭게도 많은 콜레스테롤 수송 유전자들 중에서 고밀도 지단백질 콜레스테롤 형성과 관련 있는 ATP-binding cassette transporter G4 (Abcg4)[17] 유전자의 발현이 Retnla 과발현 마우스에서 대조 마우스에 비해 6배 정도 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. Fig. 2은 마이크로어레이 결과를 Retnla 과발현 마우스와 대조마우스에서 qPCR을 이용하여 검증한 결과를 보여준다. 따라서 본 연구에서는 Retnla가 Abcg4 유전자를 조절하는지를 재조합 Retnla 단백질을 정제하여 간세포주와 대식세포주에서 검증하고자 하였다.

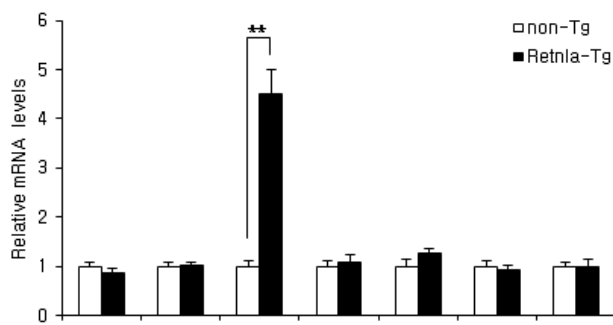


Fig. 2. Validation of microarray data by qRT-PCR. Microarray results were compared against the results of qPCR analysis using total RNA extracted from the same mice as in the microarray experiment. Data are presented as mean  $\pm$  s.d. according to the Mann-Whitney *U*-test; \*\**P*<0.01.

## 3. Purification of Recombinant Retnla Protein

cDNA 마이크로어레이 기법의 분석 결과로서 Retnla가 Abcg4 유전자 발현을 조절하는지를 in vitro 실험에서 검증하기 위하여 본 연구에서는 먼저 재조합 Retnla 단백질을 정제하였다. Fig. 3A는 재조합 Retnla 단백질을 정제하기 위해 이용한 Retnla 발현 벡터이다. 이 발현 벡터의 C말단 부위에 6개의 히스티딘이 존재하여 단백질을 Ni-NTA 친화크로마토그래피를 쉽게 정제할 수 있도록 하였다.

Retnla는 111개의 아미노산을 가진 단백질로 약 11 kDa의 분자량을 갖는다. Retnla의 아미노산 서열 N말단 부위에는 23개의 아미노산으로 이루어진 신호 펩티드가 존재하는데, 이와 같이 Retnla는 분비되는 특성을 가지고 있다. 본 연구에서는 신호 펩티드가 잘려진 활성형의 Retnla 단백질을 정제하기 위하여 신호 펩티드를 제외한 아미노산 24~111 번만을 포함하는 cDNA를 이용하였고, 111번째 아미노산인 종결 코돈(stop codon)은 재조합 Retnla 발현 벡터의 폴리아데닐산(poly A)을 이용하였다.

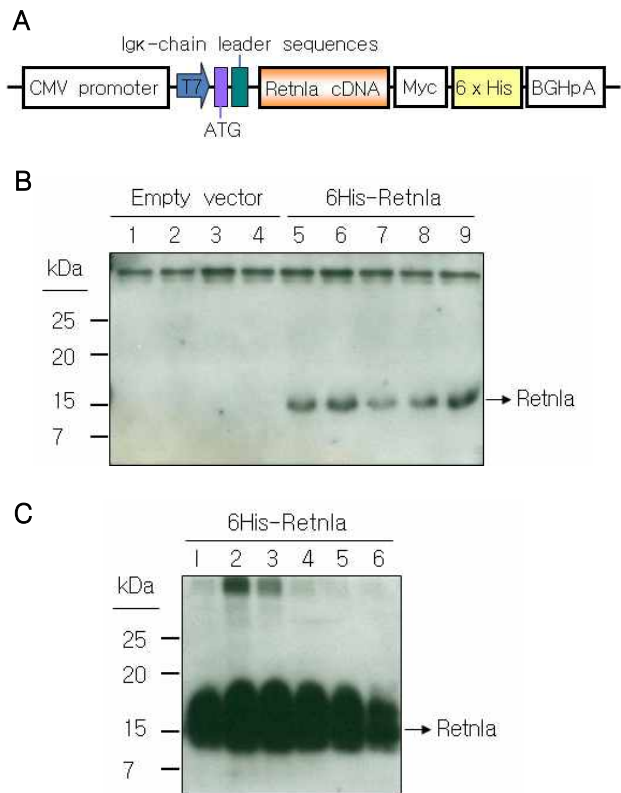


Fig. 3. Purification of recombinant Retnla protein. (A) The construction of recombinant expression vector used for the purification of Retnla protein. (B) Immunoblot analysis of recombinant Retnla proteins from conditioned media. (C) Immunoblot analysis of recombinant Retnla proteins after purification by Ni-NTA immobilized metal-affinity chromatography.

pSecTag2/hygro B 포유세포 발현 벡터는 N말단 부위에

Igkappa leader sequences가 존재하여 Retnla 단백질이 세포 밖으로 분비될 수 있게 하는데, Fig. 3B는 HEK 293T 세포에 재조합 Retnla 발현 벡터를 형질 도입(transfection)한 후 세포 배양배지로 분비된 Retnla 단백질을 Retnla 항체를 이용하여 면역블롯팅(immunoblotting)법으로 확인한 결과이다.

Fig. 3C는 세포배양배지로 분비된 Retnla 단백질을 Ni-NTA 친화크로마토그래피법을 이용하여 정제한 후 Retnla 항체를 이용하여 면역블롯팅(immunoblotting)법으로 확인한 결과인데, Retnla 단백질이 성공적으로 정제되었음을 보여준다.

#### 4. Regulation of Abcg4 Expression by Retnla in RAW 264.7 Macrophages

대식세포에서 Abcg4 유전자는 대식세포 내 콜레스테롤을 세포 밖으로 내보내어 성숙 고밀도 지단백질(mature HDL) 콜레스테롤 형성을 유도한다고 보고되었다[17]. Fig. 4은 cDNA 마이크로어레이 분석결과와 달리, RAW 264.7 세포에 재조합 Retnla 단백질을 처리하여도 Abcg4의 발현이 증가하지 않는 것을 보여준다. 반면, cDNA 마이크로어레이 분석결과에는 변화가 없었지만 Retnla 단백질을 처리하였을 때 콜레스테롤을 세포내로 수용하는 Cd36 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 cDNA 마이크로어레이 분석이 간을 이용하여 수행되었다는 점을 고려할 때 마이크로어레이 분석결과와 대식세포에서의 결과가 상이할 수도 있다.

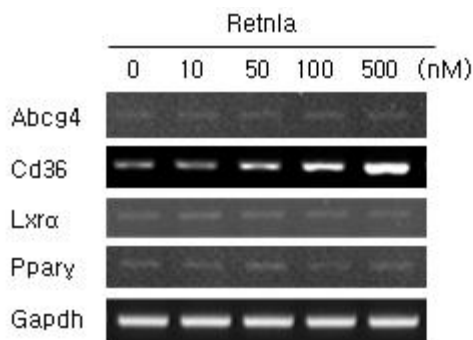


Fig. 4. RT-PCR analysis of cholesterol transport-related genes in RAW 264.7 cells treated with indicated concentration of Retnla for 12 hours. mRNA levels of Abcg4, Cd36, Lxra and Pparγ were determined by RT-PCR analysis of RNA from RAW 264.7 cells treated with indicated concentrations of purified Retnla protein.

Abcg4 유전자는 세포의 휴식(basal) 상태에서 보다 콜레스테롤 배출을 자극하는 상태에서 더 활성을 가질 수 있기 때문에 본 연구에서는 acLDL이 처리된 RAW 264.7 세포에서 Retnla의 영향을 확인해 보았다. 흥미롭게도 Fig. 5는 acLDL이 처리된 RAW 264.7 세포에 Retnla 단백질을 처리하였을 경우 Abcg4 유전자의 발현이 증가하는 것을 보여준다. 또한, Fig. 5는 Cd36의 발현이 acLDL이 자극된 RAW 264.7 세포에서도 Retnla에 의해 증가되는 것을 보여준다. 이와 같이 Retnla

는 세포 밖의 콜레스테롤을 세포내로 유입할 뿐만 아니라, 동시에 유입한 콜레스테롤을 세포 밖으로 유출을 촉진시킴으로써 동맥경화 진행과정에서 형성되는 대식세포의 포말화(foam cell) 과정을 억제하는 작용을 한다는 것을 알 수 있다. 그러나 Abcg4와 Cd36 유전자의 발현을 조절한다고 보고된 전사인자 Lxra와 Pparγ의 발현은 세포의 휴식 상태에서와 acLDL로 자극된 상태에서 모두 Retnla에 의해 조절되어지지 않았다.

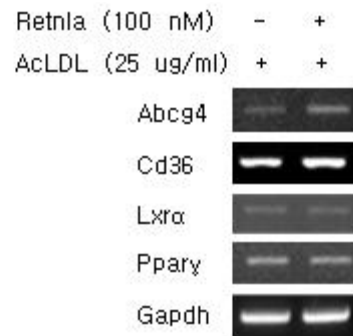


Fig. 5. RT-PCR analysis of cholesterol transport-related genes in RAW 264.7 cells incubated with acLDL in the presence or absence of Retnla. The cells were preincubated with growth medium containing acLDL (25 μg/ml) for 12 hours before treatment with purified Retnla protein (100 nM, 12 hours). mRNA levels of Abcg4, Cd36, Lxra and Pparγ were determined using RT-PCR analysis.

#### 5. Regulation of Abcg4 Expression by Retnla in Hepa1c1c7 Hepatocytes

간은 혈액 내 고밀도 지단백질 콜레스테롤의 주요 근원지이고 간의 Abca1, Abcg1, Abcg4, Srb1과 같은 유전자들은 고밀도 지단백질 콜레스테롤의 형성을 조절한다고 보고되었다 [22-23].

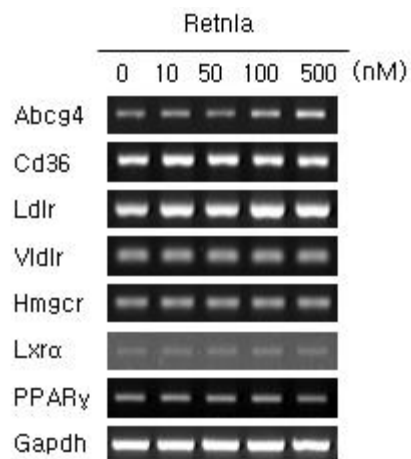


Fig. 6. RT-PCR analysis of lipid metabolism-related genes in Hepa1c1c7 cells treated with indicated concentration of Retnla for 12 hours. mRNA levels of Abcg4, Cd36, Ldlr, Vldlr, Hmgcr, Lxra and Pparγ were determined by RT-PCR analysis of RNA from Hepa1c1c7 cells treated with indicated concentrations of purified Retnla protein.

이중에서 본 연구의 마이크로어레이 분석 결과 Abcg4 유전자의 발현이 Retnla에 의해 조절 받는다는 사실을 알 수 있었는데, 이 결과를 Hepa1c1c7 간세포에서 확인해 보았다. Fig. 6에서는 Hepa1c1c7 세포에 Retnla 단백질을 처리하였을 때 마이크로어레이 결과와 동일하게 Abcg4 유전자의 발현이 증가하는 것을 보여준다.

그러나 RAW 264.7 세포에서의 결과와 다르게 Hepa1c1c7 세포에서는 Cd36의 발현이 Retnla에 의해서 조절되지 않았다. 또한, Retnla가 혈액내의 지질을 간으로 들여보내주는 저밀도 지단백질 수용체(Ldlr)의 발현을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

## V. Conclusions and Discussion

본 연구에서는 아디포카인 Retnla 과발현 마우스를 이용하여 이미란 외(2014)의 선행연구결과로서 보고된 Retnla의 항동맥경화 작용에 대한 새로운 경로를 발견하고자 하였다. Retnla 과발현 마우스와 대조 마우스의 간조직을 이용한 마이크로어레이 분석에 의해 고밀도 지단백질 콜레스테롤 형성에 유용한 Abcg4 유전자의 발현을 Retnla가 조절한다는 사실을 확인하였다. 이 결과를 재조합 Retnla 단백질을 정제하여 RAW 264.7 세포와 Hepa1c1c7 세포에 처리함으로써 확인하였는데 두 세포에서 모두 Retnla가 Abcg4 유전자의 발현을 조절하는 것을 관찰할 수 있었다. RAW 264.7 세포에서는 휴식상태에는 Retnla에 의해 Abcg4의 발현이 조절되지 않은 반면, acLDL로 콜레스테롤의 배출을 자극한 상태에서는 Retnla에 의해 Abcg4의 발현이 증가하였다. 이 결과를 통해서 Retnla는 동맥경화 초기 병변형성 과정 중에 대식세포 내부로 지질이 침착되어 형성되는 포말세포(foam cell)의 형성을 억제할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, Hepa1c1c7 세포에서 Abcg4의 발현을 Retnla가 조절할 수 있다는 점으로 미루어보아 Retnla는 혈중 고밀도 지단백질 콜레스테롤의 형성에서 중요한 역할을 할 수 있는 유전자일 것으로 사료된다. 이와 같이 Retnla가 간에서 콜레스테롤을 담즙산으로 분해하고 분변으로 배출한다는 사실을 밝힌 이미란 외(2014)의 선행연구 결과에 더하여 본 연구결과는 Retnla가 항동맥경화 작용을 할 수 있는 역콜레스테롤수송 3단계 경로 모두에서 주요한 작용을 할 수 있을 것이라는 가능성을 제시한다. 하지만, 이 작용을 검증하기 위한 후속 연구가 더욱 요구된다.

Retnla의 고콜레스테롤혈증과 동맥경화를 억제하는 효과 [13]에 더하여 본 연구 결과는 이들 질환에 대한 주된 원인 질환인 비만과 당뇨병 같은 만성 대사성 질환의 진행에서도 Retnla의 긍정적인 작용을 기대할 수 있게 한다. 따라서 고콜레스테롤혈증과 동맥경화에서 Retnla의 역할과 치료제로서의 효과를 명확히 파악하는 것이 발병 후 적절한 치료뿐만 아니라 비만과 당뇨병 같은 다양한 합병증에 대한 발병을 예방하는데 매우 중요할 것이라고 생각된다.

## REFERENCES

- [1] P. Libby, P. M. Ridker, and G. K. Hansson, "Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis", *Nature*, Vol. 473, No. 7347, pp. 317-325, May 2011.
- [2] F. Schaftenaar, V. Frodermann, J. Kuiper, and E. Lutgens. "Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells", *Current Opinion in Lipidology*, Vol. 27, No. 3, pp. 209-215, Jun. 2016.
- [3] S. J. Rho, H. M. Lee, and K. W. Oh, "Prevalence of hypercholesterolemia among adults over 30 years old in Korea, 2009-2013", *Public Health Weekly Report*, Vol. 8, No. 36, pp. 857-860, Sep. 2015.
- [4] Y. A. Kim, "Status of cholesterol level among adults in Korea, 2008-2011", *Public Health Weekly Report*, Vol. 7, No. 35, pp. 773-776, Aug. 2014.
- [5] S. L. Pinkosky, R. S. Newton, E. A. Day, R. J. Ford, S. Lhotak, R. C. Austin, and et al, "Liver-specific ATP-citrate lyase inhibition by bempedoic acid decreases LDL-C and attenuates atherosclerosis.", *Nature Communications*, Vol. 7, pp. 13457, Nov. 2016.
- [6] T. R. Pedersen, "The Success Story of LDL Cholesterol Lowering", *Circulation Research*, Vol. 118, No. 4, pp. 721-731, Feb. 2016.
- [7] J. S. Lee, S. H. Bok, Y. B. Park, M. K. Lee, and M. S. Choi, "4-hydroxycinnamate lowers plasma and hepatic lipids without changing antioxidant enzyme activities", *Annals of Nutrition and Metabolism*, Vol. 47, No. 3-4, pp. 144-151, May 2003.
- [8] Y. Matsuzawa, "Therapy insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease", *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, Vol. 3, No. 1, pp. 35-42, Jan. 2006.
- [9] I. N. Holcomb, R. C. Kabakoff, B. Chan, T. W. Baker, A. Gurney, W. Henzel, and et al. "FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family", *The EMBO Journal*, Vol. 19, No. 15, pp. 4046-4055, Aug. 2000.
- [10] X. Teng, D. Li, H. C. Champion, and R. A. Johns, "FIZZ1/RELMalpha, a novel hypoxia-induced mitogenic factor in lung with vasoconstrictive and angiogenic properties", *Circulation Research*, Vol. 92, No. 10, pp. 1065-1067, May 2003.
- [11] M. R. Lee, D. Shim, J. Yoon, H. S. Jang, S. W. Oh,

- S. H. Suh, and et al. "Retnla overexpression attenuates allergic inflammation of the airway", *PLoS One*, Vol. 9, No. 10, pp. e102666, Nov. 2014.
- [12] R. A. Johns, E. Takimoto, L. W. Meuchel, E. Elsaigh, A. Zhang, N. M. Heller, and et al. "Host lung immunity is severely compromised during tropical pulmonary eosinophilia: role of lung eosinophils and macrophages", *Journal of Leukocyte Biology*, Vol. 36, No. 1, pp. 124-144, Jan. 2016.
- [13] M. R. Lee, C. J. Lim, Y. H. Lee, J. G. Park, S. K. Sonn, M. N. Lee, and et al. "The adipokine Retnla modulates cholesterol homeostasis in hyperlipidemic mice", *Nature Communications*, Vol. 5, pp. 4410, Jul. 2014.
- [14] B. Blagoev, I. Kratchmarova, M. M. Nielsen, M. M. Fernandez, J. Voldby, J. S. Andersen, and et al. "Inhibition of adipocyte differentiation by resistin-like molecule alpha. Biochemical characterization of its oligomeric nature", *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 277, No. 44, pp. 42010-42016, Nov. 2002.
- [15] G. B. Moore, H. Chapman, J. C. Holder, C. A. Lister, V. Piercy, S. A. Smith, and J. C. Clapham, "Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 286, No. 4, pp. 735-741, Aug. 2001.
- [16] A. Munitz, L. Seidu, E. T. Cole, R. Ahrens, S. P. Hogan, and M. E. Rothenberg, "Resistin-like molecule alpha decreases glucose tolerance during intestinal inflammation", Vol. 182, No. 4, pp. 2357-2363, Feb. 2009.
- [17] N. Wang, D. Lan, W. Chen, F. Matsuura, A. R. Tall, "The E3 ubiquitin ligases, HUWE1 and NEDD4-1, are involved in the post-translational regulation of the ABCG1 and ABCG4 lipid transporters", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 290, No. 40, pp. 24604-24612, Oct. 2015.
- [18] M. Van Eck, J. Twisk, M. Hoekstra, B. T. Van Rij, C. A. Van der Lans, I. S. Bos, and et al. "Differential effects of scavenger receptor BI deficiency on lipid metabolism in cells of the arterial wall and in the liver", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, No. 26, pp. 23699-23705, Jun. 2003.
- [19] M. D. Wang, V. Franklin, M. Sundaram, R. S. Kiss, K. Ho, M. Gallant, and Y. L. Marcel. "Differential regulation of ATP binding cassette protein A1 expression and ApoA-I lipidation by Niemann-Pick type C1 in murine hepatocytes and macrophages", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 282, No. 31, pp. 22525-22533, Aug. 2007.
- [20] K. Isoda, S. Sawada, M. Ayaori, T. Matsuki, R. Horai, Y. Kagata, K. Miyazaki, and et al. "Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist deteriorates fatty liver and cholesterol metabolism in hypercholesterolemic mice", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, No. 8, pp. 7002-7009, Feb. 2005.
- [21] K. L. Ma, X. Z. Ruan, S. H. Powis, Y. Chen, J. F. Moorhead, and Z. Varghese, "Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice", *Hepatology*, Vol. 48, No. 3, pp. 770-781, Sep. 2008.
- [22] S. M. Grundy, "Scavenger Receptor B-1 Emerges as Anti-atherogenic Candidate", *Cell Metabolism*, Vol. 23, No. 5, pp. 755-757, May 2016.
- [23] Y. Gui, S. Yao, H. Yan, L. Hu, C. Yu, F. Gao, and et al. "A novel small molecule liver X receptor transcriptional regulator, nagilactone B, suppresses atherosclerosis in apoE-deficient mice." *Cardiovascular Research*, Vol. 102, No. 1, pp. 502-514, Oct. 2016.

## Authors



Mi-Ran Lee received the B.S. degree in Biomedical Laboratory Science from Inje University, Korea, in 2002. She received M.S. degree in Pathology from Chungnam National University, Korea,

in 2004 and Ph.D. degree in Life Science from Ewha Womans University, Korea, 2012. Dr. Lee joined the faculty of the Department of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University, in 2015. She is currently a Professor in the Department of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University. She is interested in health care, life sciences and clinical research.