

Research Article



고콜레스테롤 식이 섭취 쥐에서 quercetin의 간 AMPK 및 microRNA-21 조절을 통한 지질대사 개선 효과

이막순 ¹, 김양하 ^{1,2}

¹이화여자대학교 식품영양학과

²이화여자대학교 시스템헬스융합전공

Effects of quercetin on the improvement of lipid metabolism through regulating hepatic AMPK and microRNA-21 in high cholesterol diet-fed mice

Mak-Soon Lee ¹ and Yangha Kim ^{1,2}

¹Department of Nutritional Science and Food Management, Ewha Womans University, Seoul 03670, Korea

²Graduate Program in System Health Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 03670, Korea

OPEN ACCESS

Received: Sep 10, 2021

Revised: Sep 30, 2021

Accepted: Oct 20, 2021

Published online: Feb 9, 2022

Correspondence to

Yangha Kim

Department of Nutritional Science and Food Management, Ewha Womans University, 52, Ewhayeodae-gil, Seodaemun-gu, Seoul 03670, Korea.

Tel: +82-2-3277-3101

Email: yhmoon@ewha.ac.kr

© 2022 The Korean Nutrition 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.

ORCID iDs

Mak-Soon Lee

<https://orcid.org/0000-0002-7010-4185>

Yangha Kim

<https://orcid.org/0000-0002-7280-7597>

Funding

This study was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Korean Government (MSIT) (No. 2019R1A2C1002861).

Conflict of Interest

There are no financial or other issues that might lead to conflict of interest.

ABSTRACT

Purpose: Quercetin is a polyphenolic flavonoid abundant in many fruits and vegetables. It has potential health-beneficial properties, such as antioxidant, anti-obesity, anti-cancer, anti-diabetic and anti-inflammatory effects. The purpose of this study was to investigate whether the lipid metabolism improvement effect of quercetin affected the regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) activity and microRNA (miR)-21 expression in the liver of mice fed a high-cholesterol diet.

Methods: Male C57BL/6J mice were fed with normal diet, quercetin-free diet and diets containing 0.05% or 0.1% quercetin for six weeks. Hypercholesterolemia was induced by adding 1% cholesterol and 0.5% cholic acid to all diets. Serum and liver triglyceride (TG), and total cholesterol (TC) concentrations were analyzed using a commercial enzymatic colorimetric kit. AMPK activity was quantified using an AMPK kinase assay kit. The levels of miR-21 and genes involved in lipid metabolism were measured by real-time quantitative polymerase chain reaction.

Results: Supplementation of quercetin reduced serum and hepatic TG and TC levels without changing body weight and food intake. Dietary quercetin significantly inhibited the mRNA levels of hepatic sterol-regulatory element binding protein-1c, acetyl-CoA carboxylase 1 and fatty acid synthesis, which are involved in hepatic lipogenesis. Dietary quercetin enhanced AMPK activity and suppressed miR-21 expression, promoting hepatic lipid accumulation.

Conclusion: These results suggest that the lipid-lowering effect of quercetin on the serum and liver of mice may be partially mediated by the regulation of lipogenic gene expression, AMPK activity and miR-21 expression in the liver of mice fed a high-cholesterol diet.

Keywords: quercetin; AMP-activated protein kinase; microRNA; lipid metabolism

서론

혈중 콜레스테롤 수치의 증가는 전 세계적으로 사망 및 장애의 주요 원인인 죽상동맥경화증 및 심근경색증과 같은 심혈관 질환 (cardiovascular disease, CVD) 발병의 주요 위험 인자로 알려져 있다 [1,2]. 고콜레스테롤혈증은 특히 잘못된 식습관과 생활방식에 기인하는 경우가 많으며 혈액 내 높은 수준의 콜레스테롤, 중성지방 및 저밀도 지단백질 (low-density lipoprotein, LDL)-콜레스테롤로 인해 이상지질혈증을 유발할 수 있으며 이는 CVD의 주요 위험 인자로 간주된다 [3]. 따라서 CVD를 예방하고 치료하기 위해 이상지질혈증을 개선하는 것이 중요하다.

AMP-activated protein kinase (AMPK)는 세포의 adenosine triphosphate 수준이 감소할 때 활성화되는 세포 에너지 항상성 조절에 중요한 역할을 한다 [4,5]. AMPK는 생체 에너지 균형을 유지하기 위해 탄수화물과 지방 대사를 조절하는 인자이며 세포 성장 및 대사에 관여하는 다양한 표적 단백질을 인산화하는 것으로 알려져 있다 [6-8]. 특히 활성화된 AMPK는 지방 합성을 매개하는 sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c, acetyl-CoA carboxylase (ACC) 1, fatty acid synthase (FAS) 및 stearoyl-CoA desaturase (SCD) 1 등의 유전자 발현을 억제함으로써 간 세포 내 지방 축적을 감소시킨다 [9,10].

MicroRNA (miR)는 진핵 생물의 유전자 발현을 제어하는 약 22개의 염기로 이루어진 작은 내재성 RNA 분자로, 표적이 되는 mRNA의 3' UTR에 결합하여 mRNA를 분해시키거나 번역을 억제하여 유전자 발현을 조절한다 [11]. 그 중에서 miR-21은 간질환의 초기 단계에서 고도로 상향 조절되는 miRs에 포함되며, 비알콜성 지방간에서도 miR-21이 증가한다 [12]. 최근에는 간질환의 임상적인 바이오마커로 miR-21의 역할이 부각되고 있다 [13].

Quercetin은 폴리페놀계 화합물로서 많은 과일과 채소 등 천연 식물에 다량 존재하는 플라보노이드이다. Quercetin은 항산화, 항암, 항당뇨, 항비만 및 항염증 등의 여러 가지 생리활성 효과가 있는 것으로 알려져 있다 [14-18]. 최근 연구에서 quercetin은 고지방식이 유도 비만 마우스의 갈색지방 조직에서 AMPK 경로 활성화와 열생성 증가를 통해 몸무게 감소 효과를 나타낸다고 보고하였다 [19]. Eid 등 [20]은 배양된 간세포에서 quercetin이 직접적으로 AMPK를 활성화시키는 것으로 보고했다. 또 다른 연구에 따르면 quercetin은 cadmium chloride로 유발된 간 지방증 및 섬유증 쥐의 혈청과 간에서 miR-21 상향조절을 제어하는 것으로 나타났다 [21]. 담관 결찰로 유도된 간 섬유증 쥐의 간에서 miR-21 발현이 현저히 증가했지만, quercetin 처리 후 유의적으로 감소하여 섬유증의 진행을 예방할 수 있음을 보여주었다 [22]. 그러나 고콜레스테롤 식이를 섭취한 쥐의 간에서 quercetin에 의한 AMPK 및 miR-21의 역할은 규명된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 고콜레스테롤 식이를 섭취한 쥐에서 quercetin의 지질대사 개선에 미치는 효과를 확인하고 간의 지방대사에 관여하는 SREBP-1c, ACC, FAS의 유전자 발현, AMPK 활성화 및 miR-21 조절에 대한 작용기전을 규명하고자 한다.

연구방법

실험동물 사육 및 식이

실험동물은 생후 6주령의 수컷 C57BL/6J mouse를 두열바이오텍 (Seoul, Korea)에서 필요한 마리수로 구입하여 일정한 온도 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$)와 습도 ($55 \pm 5\%$)가 있는 12시간 명암 주기가 제어된 동물 사육실에서 물과 고형배합 사료를 제한 없이 먹이면서 1주일 동안 적응시켰다. 실험동물은 1주일 동안 환경에 적응시킨 후 6마리씩 4개의 군으로 나누었다. 실험식은 일반 식이 (normal diet, ND; 2018S Teklad Global 18% Protein, 6% Fat, Rodent Diet; Harlan Teklad, Madison, WI, USA), AIN-76 식이조성 [23]을 기본으로 1% 콜레스테롤과 0.5% cholic acid를 함유하는 고콜레스테롤 식이 (high-cholesterol diet, HC), 고콜레스테롤 식이에 저용량 (0.05%, quercetin low dose, QL)과 고용량 (0.1%, quercetin high dose, QH)의 quercetin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 6주 동안 자유 급식하게 하였으며, 식이조성은 Table 1과 같다. 모든 실험 절차는 이화여자대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인을 받아 수행하였다 (IACUC No. 16-047).

혈액과 간의 지질 농도

실험 종료 전 실험동물은 12-16시간 절식시킨 후 희생하였으며, 복부를 개복한 후 심장에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 혈청의 중성지방, 총 콜레스테롤과 고밀도 지질단백질 (high-density lipoprotein, HDL)-콜레스테롤 농도는 효소비색법을 이용한 상업용 분석 kit (EMBIEL, Gunpo, Korea)를 이용하여 분석하였다. LDL-콜레스테롤 농도는 Friedewald의 공식을 이용하여 구하였다 [24]. 간의 총 지질은 시료 0.5 g을 chloroform:methanol (2:1, v/v) 혼합 용매로 사용하여 Bligh와 Dyer의 방법에 따라 총 지질을 추출하였다 [25]. 추출한 간 지질에서 중성지방과 총 콜레스테롤 함량은 효소비색법을 이용한 상업용 분석 kit (EMBIEL)를 이용하여 분석하였다.

Table 1. Experimental diet composition¹⁾ (unit: g/kg diet)

Components	HC	QL	QH
Corn starch	150.0	150.0	150.0
Casein	200.0	200.0	200.0
Sucrose	485.0	485.0	485.0
Corn oil	50.0	50.0	50.0
Cellulose	50.0	50.0	50.0
Mineral mix ²⁾	35.0	35.0	35.0
Vitamin mix ³⁾	10.0	10.0	10.0
DL-Methionine	3.0	3.0	3.0
Choline bitartrate	2.0	2.0	2.0
Cholesterol	10.0	10.0	10.0
Cholic acid	5.0	5.0	5.0
Quercetin	-	0.5	1.0
Energy density (kcal)	3,579.7	3,579.7	3,579.7
Carbohydrate (% as kcal)	67.1	67.1	67.1
Protein (% as kcal)	20.3	20.3	20.3
Fat (% as kcal)	12.6	12.6	12.6

HC, high-cholesterol diet contained 1% cholesterol and 0.5% cholic acid; QL, HC + 0.05% quercetin; QH, HC + 0.1% quercetin.

¹⁾Diets were based on AIN-76 diet composition and given in powdered form. ²⁾AIN-76 Mineral mix. ³⁾AIN-76 Vitamin mix.

mRNA 발현 분석

간 조직의 총 RNA는 TRIzol 시약 (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)을 사용하여 추출하였고, 추출한 RNA로부터 complementary DNA (cDNA) 합성은 M-MLV reverse transcriptase (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 합성하였다 [26]. 합성된 cDNA는 2X SYBR Green PCR Master Mix (Bioneer)와 혼합한 후, Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research, Sydney, Australia)에서 real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)을 수행하였다. 사용된 primers의 염기서열은 다음과 같다. ACC, forward 5'-CAAGTGCTCAAGTTTGGCGC-3', reverse 5'-CAAGAACCACCCCGAAGCTC-3', FAS, forward 5'-CTGGCATTCTGTGATGGAGTC-3', reverse 5'-TGTTTCCCTGAGCCATGTA-3', SREBP-1c, forward 5'-GCCTGCTTGGCTCTTCTCTT-3', reverse 5'-AGGTCAGCTTGTGCGATG-3', β -actin, forward 5'-GGACCTGACAGACTACCTCA-3' reverse 5'-GTTGCCAATAGTGATGACCT-3'. 유전자 발현에 대한 상대적인 정량은 β -actin으로 표준화하고 delta-delta Ct 방법을 이용하여 분석하였다 [26].

miR 발현 분석

miR의 발현 수준을 분석하기 위해 miR cDNA는 miRNA cDNA synthesis kit with poly (A) polymerase tailing (ABM Inc., Richmond, BC, Canada)을 사용하여 합성하였다 [25]. 합성된 miR cDNA는 EvaGreen miRNA Master Mix (ABM Inc.)를 사용하여 증폭시켰다. qRT-PCR 증폭은 Rotor-Gene RG3000A (Corbett Research Sydney, Australia)을 사용하여 수행하였다. miR은 miR-21 및 U6의 specific primers (ABM Inc.)를 사용하여 정량 하였다. 발현된 miR-21 수준은 U6 snRNA로 표준화하고 delta-delta Ct 방법을 사용하여 분석하였다 [27].

AMPK 활성 측정

AMPK 활성은 제조업체의 지침에 따라 AMPK Kinase Assay kit (Cyclex, Nagano, Japan)를 사용하여 수행하였다 [28]. 시료는 mouse IRS-1에 해당하는 기질 펩티드로 코팅된 plate에서 30°C에서 30분 동안 배양하였다. AMPK 활성은 anti-mouse phospho-Ser 789 IRS-1 monoclonal antibody 및 peroxidase-coupled anti-mouse IgG를 사용하여 IRS-1에서 Ser 789의 인산화를 확인하였다. 흡광도는 microplate reader (Varioskan Flash; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 450 nm에서 측정하고 단백질 함량으로 표준화하였다. 단백질 함량은 bicinchoninic acid 단백질 분석 kit (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA)를 사용하여 결정하였다. AMPK 활성 값은 HC 그룹에 대한 fold change로 표시하였다.

통계 분석

모든 실험결과는 SPSS 25.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계 분석하였다. 분석 수치는 실험군 당 평균과 표준오차로 나타내고 그룹 간 (ND, HC, QL, QH)의 유의미한 차이는 일원배치 분산분석 (1-way analysis of variance)을 한 후 Tukey's multiple range test에 의하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과

체중, 식이섭취량 및 식이효율

고콜레스테롤 식이군 (HC) 및 0.05% (QL), 0.1% (QH) quercetin 식이를 6주간 섭취한 C57BL/6J

Table 2. Effects of quercetin on body weight and food intake in C57BL/6J mice

Variable	ND	HC	QL	QH
Initial body weight (g)	21.33 ± 0.33	21.34 ± 0.29	21.34 ± 0.29	21.37 ± 0.26
Final body weight (g)	25.90 ± 0.39	25.15 ± 0.15	24.71 ± 0.16	24.41 ± 0.34
Body weight gain (g per day)	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Food intake (g per day)	3.77 ± 0.08 ^b	4.74 ± 0.08 ^a	4.62 ± 0.11 ^a	4.64 ± 0.10 ^a
Food efficiency (g gain/food intake)	0.029 ± 0.003 ^a	0.019 ± 0.002 ^b	0.017 ± 0.002 ^b	0.016 ± 0.002 ^b

Values are expressed as mean ± SEM (n = 6). Different letters indicate statistically significant differences at p < 0.05. ND, normal diet; HC, high-cholesterol diet contained 1% cholesterol and 0.5% cholic acid; QL, HC + 0.05% quercetin; QH, HC + 0.1% quercetin.

생쥐의 체중, 식이섭취량 및 식이섭취효율을 확인하였다 (Table 2). 최종 체중과 체중 증가량은 정상식이군 (ND), HC, QL 및 QH군 사이에 유의적인 차이가 없었다. 식이섭취량 및 식이효율은 HC, QL 및 QH군 사이에 유의적인 차이가 없었으나, ND군은 HC군에 비해 식이섭취량이 유의적으로 감소하였고, 식이 효율은 유의적으로 증가하였다.

혈청 및 간의 지질 함량

ND, HC, QL 및 QH 식이를 6주간 섭취한 마우스의 혈청과 간 지질을 분석하여 그 결과들을 Table 3에 나타내었다. 혈청의 중성지방과 총 콜레스테롤 농도는 HC군이 ND군에 비하여 각각 1.77배 및 1.72배 유의적인 증가를 보였으며 QH군에서는 HC 대조군에 비해 각각 23.5% 및 12.1% 유의적으로 감소하였다. 또한 LDL-콜레스테롤과 동맥경화 지수는 QL군과 QH군 모두에서 유의적으로 감소하였다. 이에 반해 HDL-콜레스테롤은 실험군간 유의적인 차이가 없었다. 간의 중성지방과 총 콜레스테롤 함량은 HC군이 ND군에 비하여 각각 3.05배 및 3.32배 유의적으로 증가하였다. QL과 QH군에서의 간의 중성지방 함량은 HC 대조군에 비해 각각 30.6% 및 58.6% 유의적으로 감소하였다. 간의 총 콜레스테롤 함량은 HC 대조군에 비해 QH군에서 20.0% 유의적으로 감소하였다.

지질대사에 관여하는 유전자 발현

Quercetin의 혈청과 간의 지질 감소 효과가 간에서 지질대사에 관여하는 유전자 발현 조절에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 간에서 지방합성에 관여하는 유전자인 SREBP-1c, ACC 및 FAS의 발현은 RT-qPCR을 통해 분석하였다. SREBP-1c, ACC 및 FAS의 mRNA 수준은 HC 대조군에 비해 QH군에서 각각 48.8%, 28.2% 및 49.5% 유의적으로 감소하였으며 QL군에서는 SREBP-1c 및 FAS의 mRNA 수준이 각각 28.6% 및 34.2% 유의적으로 감소하였다 (Fig. 1).

Table 3. Effects of quercetin on lipid profiles in the serum and liver

Metabolite	ND	HC	QL	QH
Serum (mmol/L)				
TG	0.68 ± 0.03 ^c	1.20 ± 0.08 ^a	1.03 ± 0.07 ^{ab}	0.92 ± 0.05 ^{bc}
TC	2.73 ± 0.11 ^c	4.69 ± 0.14 ^a	4.37 ± 0.11 ^{ab}	4.12 ± 0.12 ^{bc}
HDL-C	2.01 ± 0.03 ^a	1.33 ± 0.03 ^b	1.39 ± 0.03 ^b	1.42 ± 0.05 ^b
LDL-C	0.51 ± 0.05 ^c	2.82 ± 0.10 ^a	2.52 ± 0.10 ^{ab}	2.29 ± 0.13 ^b
AI	0.36 ± 0.05 ^c	2.54 ± 0.08 ^a	2.16 ± 0.10 ^{ab}	1.93 ± 0.17 ^b
Liver (μmol/g)				
TG	3.41 ± 0.35 ^c	10.41 ± 0.71 ^a	7.22 ± 0.42 ^b	4.31 ± 0.57 ^c
TC	2.59 ± 0.17 ^c	8.61 ± 0.13 ^a	7.96 ± 0.20 ^b	6.89 ± 0.37 ^c

Values are expressed as mean ± SEM (n = 6). Different letters indicate statistically significant differences at p < 0.05.

AI = (total cholesterol - HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol.

HDL-C, high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; ND, normal diet; HC, high-cholesterol diet contained 1% cholesterol and 0.5% cholic acid; QL, HC + 0.05% quercetin; QH, HC + 0.1% quercetin; AI, Atherogenic index.

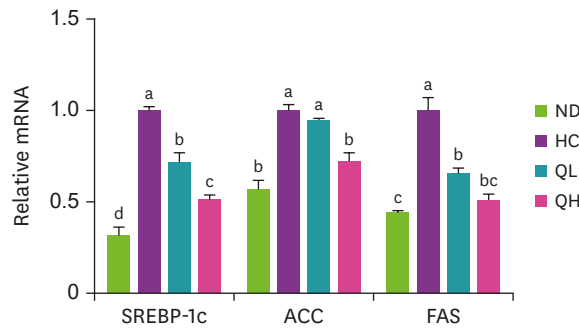


Fig. 1. Effects of quercetin on the expression of genes related to lipid metabolism in the liver.

The mRNA levels of SREBP-1c, ACC and FAS were measured by RT-qPCR and normalized to β -actin. Values are expressed as the fold change compared to the HC group (mean \pm SEM, n = 6). Different letters indicate statistically significant differences at p < 0.05.

ACC, acetyl-CoA carboxylase; FAS, fatty acid synthase; SREBP-1c, sterol regulatory element-binding protein-1c; ND, normal diet; HC, high-cholesterol diet contained 1% cholesterol and 0.5% cholic acid; QL, HC + 0.05% quercetin; QH, HC + 0.1% quercetin; mRNA, messenger RNA.

AMPK 활성화 및 miR-21 조절 기전

Quercetin을 섭취한 마우스의 간에서 에너지 대사에 중요한 역할을 하는 AMPK와 지질 축적에 관여하는 miR-21의 조절 효과를 확인하였다. AMPK 활성은 HC 대조군에 비해 QL군에서 1.30배 증가하였고 QH군에서는 1.74배 유의적으로 증가하였다 (Fig. 2). miR-21 발현 수준은 HC 대조군에 비해 QL군에서 9.5% 감소하였고 QH군에서는 30.5% 유의적으로 감소하였다 (Fig. 3).

고찰

고콜레스테롤 식이 섭취는 혈중 총 콜레스테롤, 중성지방 및 LDL-콜레스테롤 증가로 이상지질혈증을 나타내며 간 내 지질 축적 또한 현저히 증가시킨다 (Table 3). 본 연구 목적은 고콜레스테롤 식이를 섭취한 쥐에서 quercetin이 혈액과 간의 중성지방 및 콜레스테롤 수준에 미치는 영향을 확인하고, 간 지질대사에 관여하는 작용기전을 조사하기 위해 수행되었다. 본 연

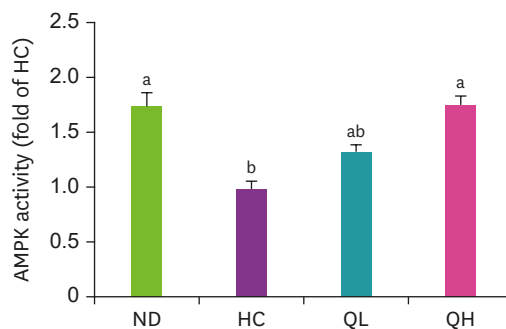


Fig. 2. Effects of quercetin on AMPK activity in the liver.

AMPK activity was measured using an AMPK kinase kit and normalized to total protein contents of each sample. Values are expressed as the fold change compared to the HC group (mean \pm SEM, n = 6). Different letters indicate statistically significant differences at p < 0.05.

AMPK, AMP-activated protein kinase; ND, normal diet; HC, high-cholesterol diet contained 1% cholesterol and 0.5% cholic acid; QL, HC + 0.05% quercetin; QH, HC + 0.1% quercetin.

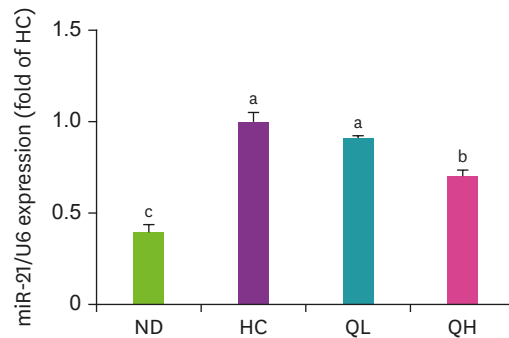


Fig. 3. Effects of quercetin on miR-21 expression in the liver.

The miR-21 level was analyzed using RT-qPCR and normalized to U6 snRNA. Values are expressed as the fold change compared to the HC group (mean ± SEM, n = 6). Different letters indicate statistically significant differences at $p < 0.05$.

miR, microRNA; ND, normal diet; HC, high-cholesterol diet contained 1% cholesterol and 0.5% cholic acid; QL, HC + 0.05% quercetin; QH, HC + 0.1% quercetin.

구에서 고콜레스테롤 식이를 6주간 섭취한 결과 정상군에 비해 혈청과 간의 중성지방과 콜레스테롤 농도가 유의하게 증가되어 이상지질혈증이 유도되었음을 확인할 수 있었다. 이에 반해 고콜레스테롤 식이와 함께 quercetin을 섭취한 경우에는 혈청과 간의 중성지방과 콜레스테롤 농도가 용량 의존적으로 감소하였다. Jia 등 [29]은 quercetin이 고지방식을 섭취한 apoE 유전자결핍 쥐 (apoE^{-/-} mouse)에서 혈청 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 수준을 낮추는 것으로 보고하였다. 유전적으로 제2형 당뇨병이 발생하는 쥐(db/db mouse)에서는 식이로 공급된 quercetin이 혈액의 중성지방과 콜레스테롤 농도를 감소시켰다 [30]. 이 결과들과 비슷하게 본 연구에서 quercetin은 혈액과 간의 중성지방과 콜레스테롤 수준을 감소시켜 지질대사를 개선할 수 있음을 보여주고 있다.

SREBP-1c는 간세포 지방 합성을 조절하는 핵심적인 전사 인자이며 SREBP-1c가 증가되면 ACC1, FAS 및 SCD1과 같은 유전자들의 발현이 유도되어 간 내 지방 합성이 촉진된다 [9,10]. 이전 연구에서 quercetin은 HepG2 간세포에서 SREBP-1c 및 FAS 유전자 발현 억제와 함께 간 지질 축적을 개선하였다 [31]. Quercetin과 카테킨 성분이 많은 차 품종 인 베니푸키 (benifuuki) 혼합물은 고지방 고콜레스테롤 식이를 섭취한 쥐에서 지방 생성 유전자 FAS와 SCD1 발현을 억제시켜 간 지방 축적을 감소시키는 것으로 나타났다 [32]. 본 연구 결과에서 quercetin은 고콜레스테롤 식이를 섭취한 마우스의 간에서 SREBP-1c, ACC1 및 FAS 유전자 발현을 억제시켰으며, 이는 이들 유전자들에 의해 매개되는 지방산 합성에 영향을 주어 간 지질 축적을 억제하는 것으로 생각된다.

AMPK는 세포내 에너지를 감지하는 센서로써 에너지 고갈에 의해 활성화된다 [5]. 활성화된 AMPK는 지방산생성(lipogenesis)을 조절하는 SREBP-1c의 표적 유전자를 감소시켜 간에서의 지방산 합성을 감소시킨다 [9,10]. 최근, isoquercetin은 당뇨병 유도 쥐의 골격근에서 AMPK 경로를 통해 SREBP-1c를 조절하여 고지혈증을 완화한다고 보고되었다 [33]. Quercetin은 streptozotocin과 함께 고지방식을 투여한 당뇨병 유발 죽상동맥경화증 쥐의 경동맥에서 AMPK/sirtuin 1/nuclear factor-κB 신호 전달 경로를 조절함으로써 죽상동맥경화증을 개선하는 것으로 나타났다 [34]. 또한 고콜레스테롤 식이에 의해 발생하는 뇌신경독성에 대한 quercetin의 보호 기전은 AMPK 활성화에 의해 매개됨이 보고되었다 [35]. 본 연구에서 고콜레

스테롤 식이 섭취로 인해 감소된 간의 AMPK 활성이 quercetin에 의해 용량 의존적으로 활성화되는 것을 확인하였다. 이 결과는 quercetin이 고콜레스테롤 식이에 의해 증가된 SREBP-1c, ACC1 및 FAS 발현을 억제하는 기전에 AMPK의 활성화가 관여함을 제시한다.

본 연구에서 주요 관찰 지표인 miRs는 비암호화 nucleotide로서 건강과 질병에 중요한 역할을 하는 중요한 전사 후 조절자이다 [11]. MiR-21은 암세포의 증식을 촉진하는 암 발생 (oncogenic) miR로 알려져 있으며, 비알콜성 지방간에서도 높게 발현된다 [12,36]. MiR-21가 억제된 db/db mouse에서 체중감소, 지방크기 및 중성지방 감소와 더불어 지방조직에서 leptin 단백질 수준의 감소가 나타났으며, 이는 miR-21이 지질대사에 관여한다는 것을 제시한다 [37]. Cao 등 [38]은 quercetin이 신장 상피세포 섬유화 과정에서 miR-21 발현 증가를 억제하는 것으로 보고하였다. 또한 전립선 암세포에서 quercetin과 hyperoside (quercetin-3-O-galactoside) 조합의 항암 효과는 miR-21 억제가 주요기전으로 보고되었다 [39]. 본 연구에서 고콜레스테롤 식이에 의해 증가된 miR-21 발현이 quercetin에 의해 감소된다는 사실을 처음으로 규명하였다. 이 결과는 quercetin에 의한 지질대사 개선 작용이 간의 miR-21 발현 억제와 관련이 있음을 시사한다.

결론적으로 본 연구의 결과를 통해, quercetin은 고콜레스테롤 식이를 섭취한 쥐의 혈액과 간에서 중성지방과 콜레스테롤 수준을 감소시키는 지질대사 개선 효과가 있음을 확인하였고, 이러한 결과의 일부는 간 세포 내 miR-21 발현 억제 및 AMPK 활성화를 통해 SREBP-1c, ACC1 및 FAS 같은 지방합성 효소 유전자의 발현 억제에 의해 매개되었을 것으로 보인다.

요약

Quercetin의 지질대사 개선 효과에 대한 작용기전을 확인하기 위해 C57BL/6J mouse를 사용하여 실험을 수행하였다. 고콜레스테롤혈증을 유도하기 위해 6주간 1% 콜레스테롤과 0.5% cholic acid를 함유하는 고콜레스테롤 식이를 급여하였으며, quercetin은 0.05%와 0.1%의 수준으로 고콜레스테롤 식이에 추가하여 같은 기간 동안 제공하였다. Quercetin은 혈청과 간의 중성지방 및 콜레스테롤 수준을 용량 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. 고콜레스테롤 식이를 섭취한 쥐의 간에서 지방 합성을 촉진하는 SREBP-1c, ACC1 및 FAS 유전자 발현이 quercetin 섭취에 의해 억제되는 것을 확인하였다. Quercetin은 간세포 내에서 에너지 대사를 조절하는 AMPK 활성을 증가시켰다. 이에 반해 암세포 증식을 촉진하고 지방간에서 높게 발현되는 miR-21 발현은 quercetin 섭취에 의해 감소되었다. 본 연구의 결과는 quercetin이 고콜레스테롤 식이 섭취 쥐에서 혈청과 간의 지질 수준을 낮추는 지질대사 개선 효과가 있으며, 이러한 효과의 일부는 간 내 지방합성 유전자 (SREBP-1c, ACC1 및 FAS) 발현, AMPK 활성 및 miR-21 조절을 통해 매개된다는 것을 시사한다.

REFERENCES

1. Wald NJ, Law MR. Serum cholesterol and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* 1995; 118 Suppl: S1-S5.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

2. Barquera S, Pedroza-Tobías A, Medina C, Hernández-Barrera L, Bibbins-Domingo K, Lozano R, et al. Global overview of the epidemiology of atherosclerotic cardiovascular disease. *Arch Med Res* 2015; 46(5): 328-338.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
3. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63(25 Pt B): 2889-2934.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
4. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 2009; 458(7241): 1056-1060.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
5. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(4): 251-262.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
6. Ojuka EO, Jones TE, Nolte LA, Chen M, Wamhoff BR, Sturek M, et al. Regulation of GLUT4 biogenesis in muscle: evidence for involvement of AMPK and Ca²⁺. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282(5): E1008-E1013.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
7. Makinde AO, Gamble J, Lopaschuk GD. Upregulation of 5'-AMP-activated protein kinase is responsible for the increase in myocardial fatty acid oxidation rates following birth in the newborn rabbit. *Circ Res* 1997; 80(4): 482-489.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
8. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* 2011; 13(9): 1016-1023.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
9. Foretz M, Carling D, Guichard C, Ferré P, Foufelle F. AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1998; 273(24): 14767-14771.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
10. Woods A, Azzout-Marniche D, Foretz M, Stein SC, Lemarchand P, Ferré P, et al. Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol* 2000; 20(18): 6704-6711.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
11. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-297.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
12. Loyer X, Paradis V, Hénique C, Vion AC, Colnot N, Guerin CL, et al. Liver microRNA-21 is overexpressed in non-alcoholic steatohepatitis and contributes to the disease in experimental models by inhibiting PPAR α expression. *Gut* 2016; 65(11): 1882-1894.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
13. Zhang J, Li D, Zhang R, Gao P, Peng R, Li J. The miR-21 potential of serving as a biomarker for liver diseases in clinical practice. *Biochem Soc Trans* 2020; 48(5): 2295-2305.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
14. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 2008; 585(2-3): 325-337.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
15. Reyes-Farias M, Carrasco-Pozo C. The anti-cancer effect of quercetin: molecular implications in cancer metabolism. *Int J Mol Sci* 2019; 20(13): 3177.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
16. Eid HM, Haddad PS. The antidiabetic potential of quercetin: underlying mechanisms. *Curr Med Chem* 2017; 24(4): 355-364.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
17. Dong J, Zhang X, Zhang L, Bian HX, Xu N, Bao B, et al. Quercetin reduces obesity-associated ATM infiltration and inflammation in mice: a mechanism including AMPK α 1/SIRT1. *J Lipid Res* 2014; 55(3): 363-374.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
18. Chen S, Jiang H, Wu X, Fang J. Therapeutic effects of quercetin on inflammation, obesity, and type 2 diabetes. *Mediators Inflamm* 2016; 2016(28): 9340637.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

19. Pei Y, Otieno D, Gu I, Lee SO, Parks JS, Schimmel K, et al. Effect of quercetin on nonshivering thermogenesis of brown adipose tissue in high-fat diet-induced obese mice. *J Nutr Biochem* 2021; 88: 108532.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
20. Eid HM, Nachar A, Thong F, Sweeney G, Haddad PS. The molecular basis of the antidiabetic action of quercetin in cultured skeletal muscle cells and hepatocytes. *Pharmacogn Mag* 2015; 11(41): 74-81.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
21. Alshammari GM, Al-Qahtani WH, AlFaris NA, Alzahrani NS, Alkhateeb MA, Yahya MA. Quercetin prevents cadmium chloride-induced hepatic steatosis and fibrosis by downregulating the transcription of miR-21. *Biofactors* 2021; 47(3): 489-505.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
22. Nozari E, Moradi A, Samadi M. Effect of atorvastatin, curcumin, and quercetin on miR-21 and miR-122 and their correlation with TGFβ1 expression in experimental liver fibrosis. *Life Sci* 2020; 259: 118293.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
23. American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 1997; 107(7): 1340-1348.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
24. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18(6): 499-502.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
25. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37(8): 911-917.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
26. Lee MS, Kim Y. Mulberry fruit extract ameliorates adipogenesis via increasing AMPK activity and downregulating microRNA-21/143 in 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 2020; 23(3): 266-272.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} method. *Methods* 2001; 25(4): 402-408.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
28. Lee MS, Kim Y. Chrysanthemum morifolium flower extract inhibits adipogenesis of 3T3-L1 cells via AMPK/SIRT1 pathway activation. *Nutrients* 2020; 12(9): 2726.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
29. Jia Q, Cao H, Shen D, Li S, Yan L, Chen C, et al. Quercetin protects against atherosclerosis by regulating the expression of PCSK9, CD36, PPARγ, LXRα and ABCA1. *Int J Mol Med* 2019; 44(3): 893-902.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
30. Jeong SM, Kang MJ, Choi HN, Kim JH, Kim JI. Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. *Nutr Res Pract* 2012; 6(3): 201-207.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
31. Li X, Wang R, Zhou N, Wang X, Liu Q, Bai Y, et al. Quercetin improves insulin resistance and hepatic lipid accumulation in vitro in a NAFLD cell model. *Biomed Rep* 2013; 1(1): 71-76.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
32. Kamohara T, Koshiguchi M, Maeda-Yamamoto M, Shinoda Y, Kametani N, Hirai S, et al. The combination of 'Benifuuki' with quercetin suppresses hepatic fat accumulation in high-fat high-cholesterol diet-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2019; 65(2): 196-201.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
33. Jayachandran M, Zhang T, Wu Z, Liu Y, Xu B. Isoquercetin regulates SREBP-1C via AMPK pathway in skeletal muscle to exert antihyperlipidemic and anti-inflammatory effects in STZ induced diabetic rats. *Mol Biol Rep* 2020; 47(1): 593-602.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
34. Zhang F, Feng J, Zhang J, Kang X, Qian D. Quercetin modulates AMPK/SIRT1/NF-κB signaling to inhibit inflammatory/oxidative stress responses in diabetic high fat diet-induced atherosclerosis in the rat carotid artery. *Exp Ther Med* 2020; 20(6): 280.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
35. Lu J, Wu DM, Zheng YL, Hu B, Zhang ZF, Shan Q, et al. Quercetin activates AMP-activated protein kinase by reducing PP2C expression protecting old mouse brain against high cholesterol-induced neurotoxicity. *J Pathol* 2010; 222(2): 199-212.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
36. Najjary S, Mohammadzadeh R, Mokhtarzadeh A, Mohammadi A, Kojabad AB, Baradaran B. Role of miR-21 as an authentic oncogene in mediating drug resistance in breast cancer. *Gene* 2020; 738: 144453.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

37. Seeger T, Fischer A, Muhly-Reinholz M, Zeiher AM, Dimmeler S. Long-term inhibition of miR-21 leads to reduction of obesity in db/db mice. *Obesity (Silver Spring)* 2014; 22(11): 2352-2360.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
38. Cao Y, Hu J, Sui J, Jiang L, Cong Y, Ren G. Quercetin is able to alleviate TGF- β -induced fibrosis in renal tubular epithelial cells by suppressing miR-21. *Exp Ther Med* 2018; 16(3): 2442-2448.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
39. Yang FQ, Liu M, Li W, Che JP, Wang GC, Zheng JH. Combination of quercetin and hyperoside inhibits prostate cancer cell growth and metastasis via regulation of microRNA-21. *Mol Med Rep* 2015; 11(2): 1085-1092.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)