



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

장 상피세포 LKB1 의 FGF15/19 생성 조절을
통한 담즙산 대사 조절에 관한 연구

LKB1 in intestinal epithelial cells regulates bile acid
metabolism by modulating FGF15/19 production

울산대학교 대학원

의 과 학 과

이 소 현

LKB1 in intestinal epithelial cells regulates bile
acid metabolism by modulating FGF15/19
production

지도교수 권미나

이 논문을 이학석사학위 논문으로 제출함

2022년 8월

울산대학교 대학원
의과학과
이소현

이소현의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원 강 민 지 (인)



심사위원 황 성 욱 (인)



심사위원 권 미 나 (인)



울 산 대 학 교 대 학 원

2022 년 8 월

요약

Liver Kinase B1 (LKB1)은 여러 조직에서 영양소를 감지하고, 지질 및 당 대사에 관여하는 주요한 상위 kinase 로 알려져 있지만, 장 상피세포에서 어떤 대사적인 역할을 할 수 있는지는 불분명하다. 본 연구는 장 상피세포에서 LKB1의 담즙산 항상성 조절에 관한 기능을 규명하는 것을 목표로 하였다.

장 상피세포 특이적으로 LKB1을 결손 시킨 마우스 ($LKB1^{\Delta IEC}$)에서 장 상피세포의 발달을 관찰하였을 때, 분비 계열 세포의 분화가 비정상적인 것을 확인하였다. 또한 $LKB1^{\Delta IEC}$ 마우스에서 담즙산 pool이 증가하였으며, 담즙산 합성을 억제하는 것으로 알려진 fibroblast growth factor 15/19 (FGF15/19)와 같은 farnesoid X receptor (FXR) 타겟 유전자가 소장의 회장 (ileum)에서 감소되었다. siRNA를 이용하여 사람의 장 상피세포 LKB1을 결손 시켰을 때, FGF15/19의 단백질 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 이처럼 $LKB1^{\Delta IEC}$ 마우스에서 FXR 타겟 유전자가 감소된 것은 Bile salt hydrolase (BSH) 생성 박테리아가 감소되어 담즙산 대사를 변화시켰기 때문이며, 특히 FXR의 antagonist (i.e., T- β MCA)가 증가하였기 때문이다. 또한 $LKB1^{\Delta IEC}$ 마우스의 회장에서 레티놀 (retinol)을 레티노산 (retinoic acid)으로 전환하는 과정이 저해되었으며, Vitamin A를 투여하였음에도 FGF15의 생성을 유도하지 못하였다. 따라서 장 상피세포의 LKB1이 결손 되면 레티놀 대사 장애가 유발되어 FGF15/19 신호 전달을 방해하는 것으로 생각한다. 또한 $LKB1^{\Delta IEC}$ 마우스에 고지방식을 투여하였을 때 당 내성 (glucose tolerance)이 개선되고, 에너지 소비 (energy expenditure)가 증가한 것을 확인하였다.

이와 같은 결과를 통해, 장 상피세포의 LKB1은 FGF15/19의 생성을 제어하여 담즙산의 항상성 조절에 기여하는 것으로 사료된다.

중심단어: LKB1; 장 상피세포; T- β MCA; Bile salt hydrolase (BSH), 레티노산

목차

요약	i
List of Figures	iii
List of Tables	v
서론	1
실험재료 및 방법	10
결과	19
1. 장 상피세포 LKB1의 결손은 장 줄기세포 증식과 분비 계열 세포의 분화에 영향을 미친다	19
2. LKB1 ^{ΔIEC} 마우스에서 <i>Akkermansia</i> 의 양이 증가하였다	29
3. 장 상피세포의 LKB1 결손은 담즙산 합성과 분비를 촉진한다	32
4. LKB1 결손은 FXR에 비의존적으로 FGF15/19의 분비를 감소시킨다	38
5. LKB1 ^{ΔIEC} 마우스에서 결합 담즙산이 축적되었고 BSH 생성 박테리아가 감소되었다	41
6. 장 상피세포의 LKB1 결손은 레티놀 대사를 저해하며 FGF15/19 생성에 영향을 미친다	46
7. 고지방식이를 투여한 LKB1 ^{ΔIEC} 마우스에서 당내성이 개선되고 에너지 소비가 증가하였다	54
고찰	61
결론	65
참고문헌	66
영문요약	74

List of Figures

Figure 1. LKB1/AMPK signaling	2
Figure 2. Bile acid metabolism pathway.....	4
Figure 3. The enterohepatic circulation of bile acids.....	6
Figure 4. Vitamin A metabolism pathway and FXR-RXR dimer as a transcription factor	8
Figure 5. General morphology of LKB1 ^{ΔIEC} mice	21
Figure 6. Abnormal morphology in the small intestine of LKB1 ^{ΔIEC} mice	22
Figure 7. LKB1 ^{ΔIEC} mice showed changes in gene expression in intestinal epithelial cells (IECs).....	23
Figure 8. LKB1 ^{ΔIEC} mice showed a loss of Paneth cell gene signature and a stronger goblet cell gene signature.....	24
Figure 9. Transcription factors of the secretory cell lineages were highly expressed in LKB1 ^{ΔIEC} mice.....	25
Figure 10. Gene expression of intestinal stem cells markers.....	26
Figure 11. Abnormal differentiation of secretory lineage cells in the colon of LKB1 ^{ΔIEC} mice	27
Figure 12. The organoid forming capacity of LKB1 ^{ΔIEC} mice.....	28
Figure 13. LKB1 ^{ΔIEC} mice have an increased abundance of <i>Akkermansia</i>	30
Figure 14. Change of microbiota composition and short-chain fatty acid in the cecum contents of LKB1 ^{ΔIEC} mice.....	31

Figure 15. LKB1 ^{ΔIEC} mice promoted the secretion of bile acid-related peptide hormones	34
Figure 16. Bile acid pool size was increased in LKB1 ^{ΔIEC} mice	35
Figure 17. FXR target genes were lowered in the SI ileum of LKB1 ^{ΔIEC} mice	36
Figure 18. Increased BA of the SI in LKB1 ^{ΔIEC} mice primarily accumulated in the SI lumen	37
Figure 19. OCA stimulates FGF15/19 production and inhibits abnormal BA production in LKB1 ^{ΔIEC} mice	39
Figure 20. LKB1 depletion in human IECs decreased FGF19 protein level in an FXR-independent manner	40
Figure 21. LKB1 ^{ΔIEC} mice exhibited altered SI and fecal BA composition	43
Figure 22. Microbiota composition in the SI of LKB1 ^{fl/fl} and LKB1 ^{ΔIEC} mice housed in two different cages	44
Figure 23. LKB1 ^{ΔIEC} mice had increased levels of conjugated BAs and reduced BSH-producing bacteria in the SI	45
Figure 24. The top 20 most enriched KEGG pathways	48
Figure 25. LKB1 ^{ΔIEC} mice showed impaired retinol conversion to retinoic acids in the SI	49
Figure 26. Gating strategy	50
Figure 27. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity decreased in the jejunum and ileum of LKB1 ^{ΔIEC} mice	51
Figure 28. Quantification of Retinoid and change of FXR target gene expressions in LKB1 ^{ΔIEC} after Vitamin A administration	52

Figure 29. LKB1^{ΔIEC} mice expressed a lower level of genes related to RA biosynthesis 53

Figure 30. Lipid profiles were not affected by intestinal LKB1 deletion..... 55

Figure 31. Comparison of body weight and food intake between LKB1^{fl/fl} and LKB1^{ΔIEC} which fed a high-fat diet..... 56

Figure 32. Bile acid pool size and FXR target gene expression were retained in LKB1^{ΔIEC} mice under high-fat diet conditions..... 57

Figure 33. LKB1^{ΔIEC} mice on a high-fat diet reduced BSH-producing bacteria in the cecum 58

Figure 34. LKB1^{ΔIEC} mice on a high-fat diet exhibited improved glucose intolerance... 59

Figure 35. LKB1^{ΔIEC} mice on a high-fat diet exhibited improved increased energy expenditure 60

List of Tables

Table 1. List of specific primer sets used for qPCR 12

서론

1. Liver Kinase B1

Liver kinase B1 (LKB1)은 serine-threonine kinase 11 (STK11)로도 알려져 있으며, 세포 내 에너지 조절자로 알려진 AMP-activated protein kinase (AMPK)의 상위 조절자이다 (Shackelford and Shaw, 2009) (그림 1). LKB1은 AMPK와 밀접하게 관련된 12개 kinase를 인산화 시키며, 세포 성장과 대사에 중요한 역할을 담당한다. 특히 LKB1은 근육, 간과 같은 다양한 대사 조직에서 당과 지질 대사를 조절하는 데 중요하다고 알려져 있으며, 간에서 LKB1은 포도당 신생합성 과정을 억제하고, 아미노산의 이화작용을 저해하는 역할을 한다 (Just et al., 2020; Shaw et al., 2005). 기존 논문에서 지방세포 특이적으로 LKB1을 결손 시켰을 때 갈색지방조직 (brown adipose tissue)이 증가되고, 고지방식이 (high-fat diet, HFD)로 유도된 비만이 예방되는 것을 확인하였다 (Shan et al., 2016). 또한 근육에서 LKB1은 지방산 산화, 인슐린 민감성, 포도당 항상성을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Jeppesen et al., 2013; Koh et al., 2006; Thomson et al., 2007). 소장은 영양소의 흡수 및 이동에 관여하고 (Kong et al., 2018), 신진대사를 조절하는데 관여하는 장호르몬을 분비한다 (Gribble and Reimann, 2019). 또한 장내 미생물은 에너지, 포도당, 지질 대사에 영향을 미친다 (Cani and Knauf, 2016). 이전 보고에 의하면, LKB1은 파네스 세포 (Paneth cell)와 술잔 세포 (goblet cell)의 세포질에서 높게 발현하고 있으며, 장 상피세포 특이적으로 LKB1이 결손 되었을 때, 소장의 파네스 세포와 술잔 세포의 과분화가 유도된다고 보고되었다 (Shorning et al., 2009). 또한 대장에서 LKB1이 결손되면 IL-18 및 항균성 펩타이드 (Antimicrobial Peptides, AMPs)의 분비가 감소된다고 보고되었다 (Liu et al., 2018). 그러나, 장 상피세포에서 LKB1이 물질대사에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바가 없다.

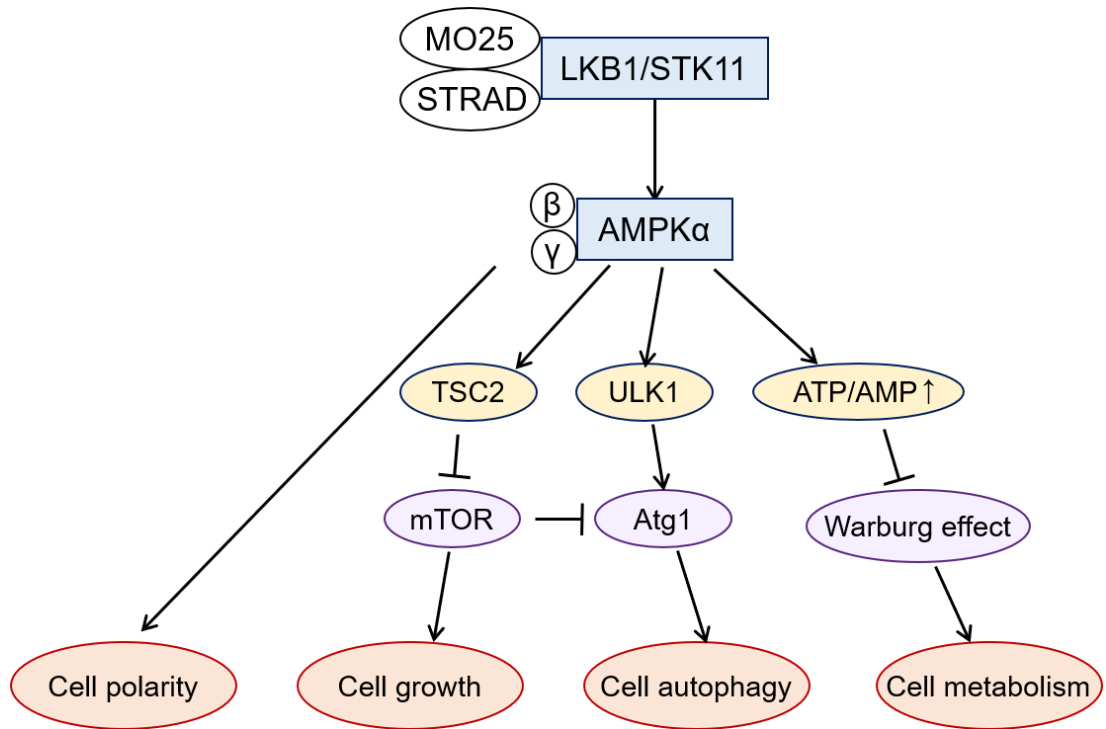


Figure 1. LKB1/AMPK signaling. Liver kinase B1 (LKB1), also known as serine-threonine kinase 11 (STK11), is an upstream regulator of AMP-activated protein kinase (AMPK) and 12 structurally related kinases. LKB1 is important in maintaining cell polarity and regulating cell growth and metabolism.

2. 담즙산

담즙산 (Bile acid, BA)은 친수성과 친유성을 모두 갖는 양극성 물질로 (Monte et al., 2009), 간에서 합성되어 소장으로 분비되며 지방의 소화와 흡수를 돕는다 (Hegyí et al., 2018) (그림 2). 담즙산은 일차 담즙산과 이차 담즙산으로 구분되는데, 일차 담즙산은 간에서 콜레스테롤로부터 cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7a1)에 의해 합성된 형태를 말하며, 합성된 일차 담즙산에 글라이신 (glycin)이나 타우린 (taurine)이 결합된 후 소장으로 분비된다 (Chiang, 2009). 이차 담즙산은 일차 담즙산의 하이드록실 그룹이 산화 또는 제거되는 변형 과정을 통해 생성되며, 이러한 대사 과정은 장 내강, 특히 대장에 존재하는 장내미생물에 의해 발생된다 (Chiang, 2009; McGlone and Bloom, 2019). 소장으로 분비된 담즙산의 95%는 회장을 통해 간으로 재흡수 된다 (Chiang and Ferrell, 2018). 담즙산 pool 크기는 장간 순환 즉, 간, 장, 쓸개 내에 있는 총 담즙산의 양으로 정의되며, 담즙산 양에 따라 간에서 새롭게 합성되는 담즙산의 양이 조절되는 negative feedback 을 통해 조절되고, 따라서 체내에서는 일정한 크기의 담즙산 pool 이 유지된다 (Chiang and Ferrell, 2018; Li and Chiang, 2012). 기존 연구에서 마우스 모델에 1형 당뇨병과 2형 당뇨병을 유발했을 때 담즙산 pool 크기와 조성이 변화된 것이 보고되었으며, 담즙산 pool 조성이 변화가 당 대사 장애에 영향을 미친다고 밝혔다 (van Waarde et al., 2002; Zhang et al., 2019). 또한 고지방식을 섭취한 마우스에 담즙산을 투여하였을 때, 갈색 지방 조직에서 에너지 소비가 증가되어 비만과 인슐린 저항성을 예방한다고 보고되었다 (Watanabe et al., 2006). 이처럼 담즙산은 지방의 소화와 흡수를 돕는 역할을 할 뿐만 아니라 체내에서 다양한 대사 작용을 조절하는데 중요한 역할을 한다. 따라서 담즙산 항상성이 조절되지 않으면 비만, 지방간, 2형 당뇨병을 유발할 수 있다 (Chiang and Ferrell, 2018; Staels and Fonseca, 2009; Tomkin and Owens, 2016).

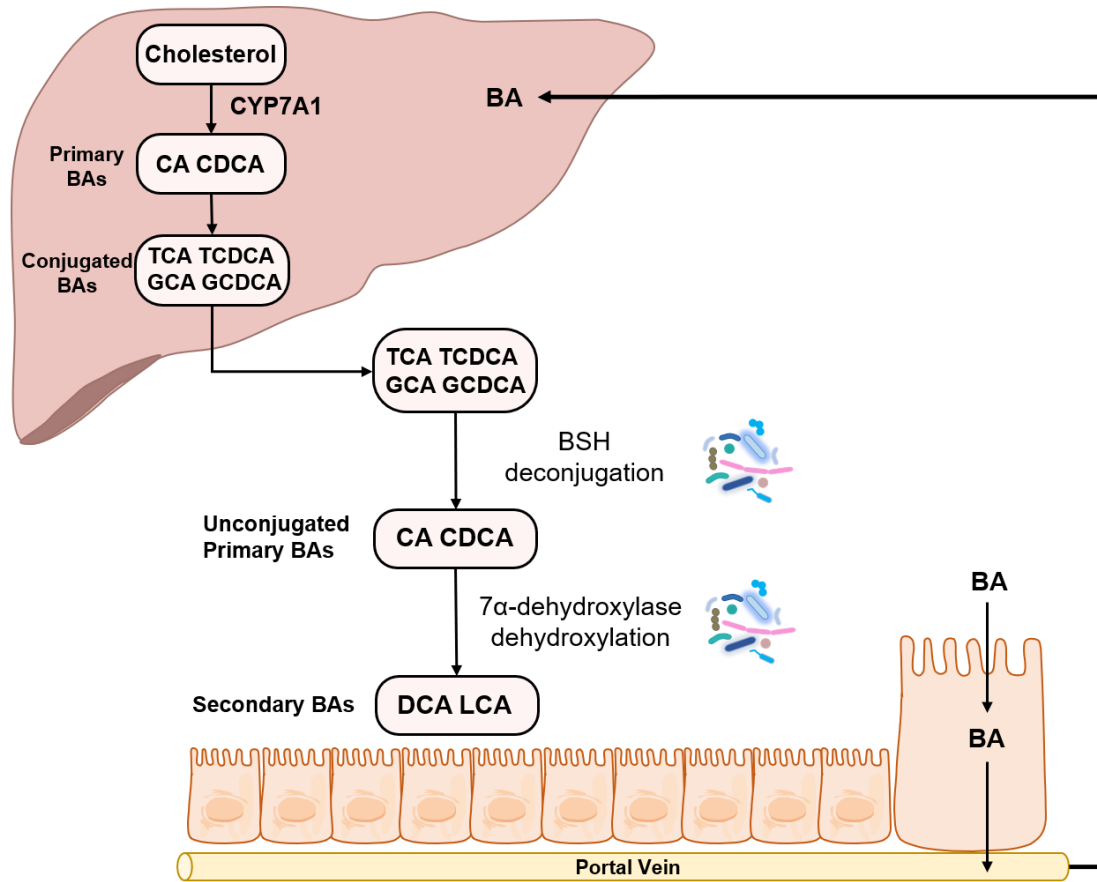


Figure 2. Bile acid metabolism pathway. Bile acids (BAs) synthesized in the liver are secreted into the SI to facilitate digestion and absorption of dietary lipids. Primary BAs are produced from cholesterol in the liver by cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7a1), and then conjugated to glycine or taurine. As gut microbiota metabolize BAs, including deconjugation of glycine or taurine by bile salt hydrolase (BSH) and transformation into secondary BA by 7 α -dehydroxylase.

3. Farnesoid X receptor (FXR)

장 항상성을 유지하기 위해서는 장의 담즙산 수용체 발현과 장내 미생물이 관여하는 담즙산 대사가 중요하다. FXR 은 간세포 (hepatocyte)와 장 세포 (enterocyte)의 담즙산 수용체로, 담즙산 합성을 조절하는 데 중요하다 (Kim et al., 2007; Li and Chiang, 2012) (그림 3). 간에 존재하는 FXR 은 담즙산에 의해 활성화되어 CYP7a1 의 발현을 억제한다 (Goodwin et al., 2000). 회장에 있는 FXR 이 활성화되면 fibroblast growth factor 15/19 (FGF15/19)의 발현이 증가되고, FGF15/19 가 간세포의 FGF receptor 4 (FGFR4)에 결합하여 활성화되면 CYP7a1 의 발현이 억제되며, 결과적으로 담즙산의 합성이 저해된다 (Inagaki et al., 2005). 담즙산의 종류에 따라 FXR 의 agonist 로 작용하거나, antagonist 로 작용할 수 있다. 장내 미생물은 Bile salt hydrolase (BSH)를 이용하여 글라이신이나 타우린 결합을 끊고, 7 α -dehydroxylase 을 이용하여 이차 담즙산을 만드는 등 담즙산을 대사 하는 역할을 한다 (Wahlstrom et al., 2016). 따라서 장내미생물은 FXR 의 활성인자 (activator) 혹은 억제인자 (inhibitor)의 균형을 조절함으로써 담즙산 합성을 조절할 수 있다 (Gonzalez et al., 2016). 예를 들어, BSH 생성 박테리아는 FXR 의 antagonist 로 알려진 tauro- β -muricholic acid (T- β MCA)의 양을 감소시킴으로써 담즙산 합성을 조절할 수 있다 (Li et al., 2013; Sayin et al., 2013). 또한 metformin 은 BSH 생성 박테리아를 감소시킴으로 결합 담즙산 (conjugated BA)를 증가시키고, 이는 FXR antagonist 로 작용하여 FXR 신호를 저해하고 대사질환을 완화할 수 있다고 알려져 있다 (Sun et al., 2018). 그러므로, 장의 FXR-FGF15/19 신호를 조절하는 것은 비만, 간, 대사질환의 잠재적인 치료 타겟 (therapeutic target)이 될 수 있을 것으로 사료된다 (Bozadjieva et al., 2018; Han, 2018).

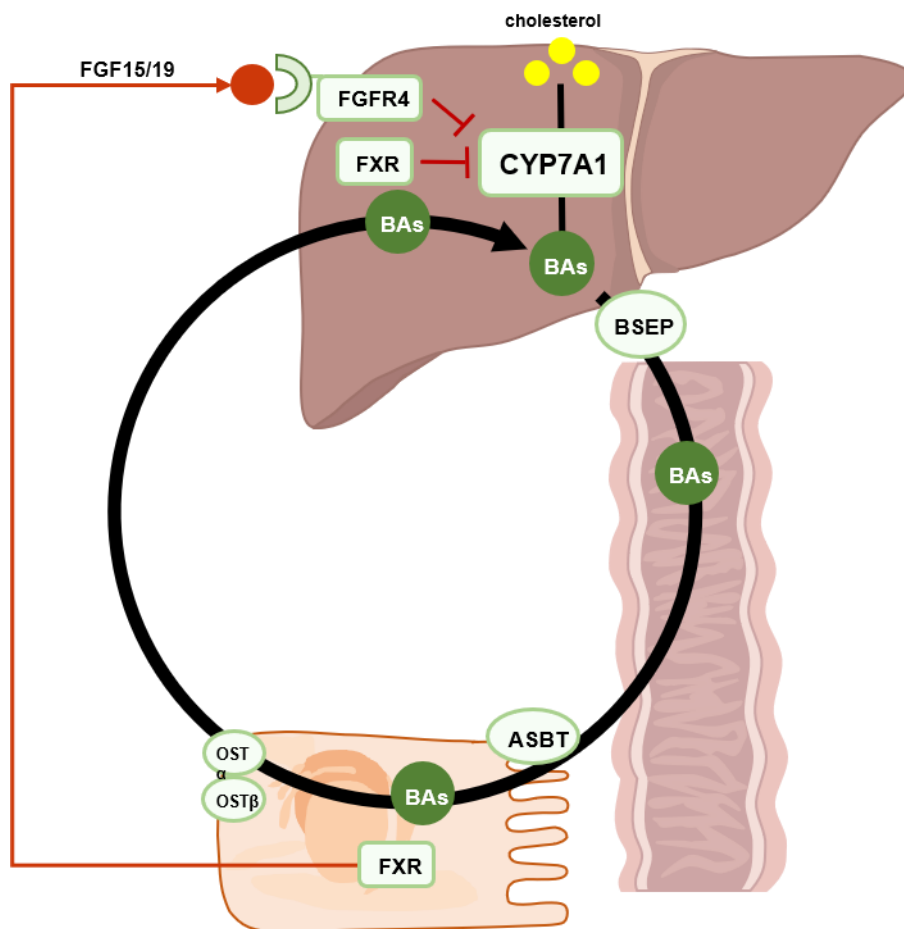


Figure 3. The enterohepatic circulation of bile acids. The FXR, a nuclear BA receptor in hepatocytes and enterocytes, is a key regulator of BA synthesis. Hepatic FXR activated by BAs suppresses CYP7a1 expression. Activated FXR in the SI ileum also inhibits BA synthesis through the secretion of FGF 15/19 (FGF15 and 19 in mice and humans, respectively), which reaches the liver and activates FGFR4 on hepatocytes, resulting in the repression of CYP7a1 expression. ASBT= Apical Sodium-dependent Bile salt Transporter, BSEP= Bile Salt Export Pump.

4. 비타민 A

비타민 A는 지용성 영양소로, 장 상피세포에 의해 흡수되며 체내에서 레티놀 (retinol), 레티날 (retinal), 레티노산 (retinoic acid, RA)의 형태로 존재한다 (그림 4). 비타민 A에서 유래한 레티놀이 retinol dehydrogenases (ADH, RDH)와 retinaldehyde dehydrogenases (ALDH, RALDH)에 의해 두 단계의 산화과정을 거치면, 레티노산이 생성된다 (Duester, 2008). 비타민 A 대사체는 각각 다른 생물학적 활성 (biological activity)을 갖는데, 그 중 레티노산이 가장 높은 생물학적 활성을 갖는다 (Huang et al., 2018). 레티노산은 체내에서 9-cis RA (9cRA)와 all-trans-RA (ATRA) 두 가지 형태로 주로 존재하며, 세포 핵 내 수용체에 결합하여 생리 작용을 가진다 (Pino-Lagos et al., 2010). 비타민 A 대사체가 결합하는 수용체에는 대표적으로 레티노산 수용체 (retinoic acid receptor, RAR)와 레티노이드 X 수용체 (retinoid X receptor, RXR)가 있으며, RXR은 FXR과 이종 이합체를 형성한다고 알려져 있다 (Saeed et al., 2017). 이전 연구에 의하면, 레티노산이 RXR α 에 결합하여 콜레스테롤, 중성지방, 담즙산의 양을 감소시킴으로 지질 항상성을 조절한다고 보고되었다 (He et al., 2013). 또한 레티노산이 RXR α 에 결합하여 FXR/RXR α 의 전사 활성 (transcriptional activity)을 활성화시킴으로써 담즙산의 합성을 저해한다고 보고되었다 (Cai et al., 2010). 따라서, 체내의 레티노산의 양을 조절하는 것이 지질 및 담즙산의 항상성을 조절하는 데 중요할 수 있다.

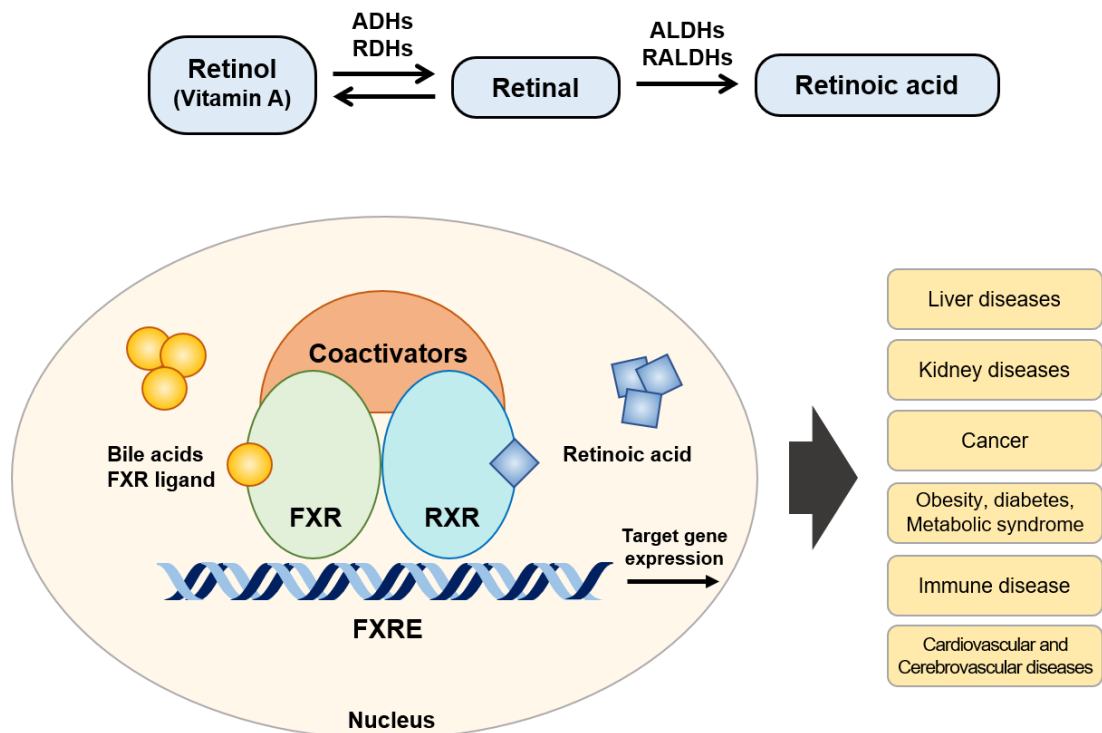


Figure 4. Vitamin A metabolism pathway and FXR-RXR dimer as a transcription factor.

Vitamin A is a fat-soluble nutrient, absorbed by intestinal epithelial cells. Vitamin A exists in the body in the form of retinol, retinal, and RA. RA regulates FGF15/19 expression through binding to the RXR, which forms a heterodimer with FXR.

LKB1 은 간과 근육과 같은 대사 조직에서 물질 대사를 조절하는 데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 기존 연구를 통하여 LKB1 의 상위, 하위 단계에 있는 SIRT1 과 AMPK 가 담즙산의 항상성을 조절한다는 것이 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서는 장 상피세포 특이적으로 LKB1 이 결손된 마우스(LKB1^{ΔIEC})를 이용하여 장 상피세포에서 LKB1 이 물질 대사 특히, 담즙산 항상성에 어떤 영향을 미치는 지 알아보려고 한다.

실험 재료 및 방법

마우스

LKB1^{ΔIEC} 마우스는 LKB1^{f/f} 마우스와 Villin^{Cre} 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)를 교배하여 생산하였으며, LKB1^{ΔIEC} 마우스는 대조군 (LKB1^{f/f})과 동일 케이지에서 사육하였다. 모든 마우스는 specific-pathogen-free (SPF)조건 하에서 케이지당 2-5 마리의 그룹이 유지되도록 사육하였다. 실험에 사용된 마우스는 6-12 주령이며, 안락사 4 시간 전 금식 시킨 후, ketamine (100 mg/kg)과 xylazine (20 mg/kg)를 혼합액을 복강 주사한 후 혈액과 조직을 채취하였다. 고지방식이 실험에서는 LKB1^{f/f} 와 LKB1^{ΔIEC} 마우스에 고지방식이를 8 주간 투여하였다. OCA (AdipoGen, San Diego, CA)는 10% DMSO (BioLife Solution, Bothell, WA)와 90% sunflower oil (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)에 녹인 후, 30 mg/kg 의 농도로 5 일간 경구투여 하였다. Vitamin A (retinyl palmitate, Sigma Aldrich, 100 mg/kg)는 sunflower oil 에 녹인 후 암주기의 시작과 끝 (안락사 16 시간, 4 시간 전)에 경구투여 하였다 (Schmidt et al., 2010).

병리 조직 염색 및 면역 형광 염색

소장과 대장 조직은 4% 파라포름알데히드 (PFA) 용액에서 고정한 후, 파라핀 블록을 제작하였다. 병리 조직학적 분석을 위하여, 조직을 hematoxylin 과 eosin (H&E)으로 염색하거나 Periodic acid-Schiff (PAS)염색하였다. 면역 조직 화학적 염색을 수행하기 위해 조직 절편에 xylene 을 처리하여 탈 파라핀 후, 에탄올로 재수화 하였다. 10 분 동안 97 °C의 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에 담가 항원결정기 손실을 방지한 후, 조직 절편에 0.5% Triton X-100 를 10 분간 처리하였다. 5% bovine serum albumin 으로 immunoglobulin 의 비특이적 부착을 방지하고, 1차 항체로 4 °C에서 12~16 시간동안 염색하였다. PBS 로 세척한 후 2차 항체를 실온에서 1시간동안 염색하였다. 실온에서 2분간 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE)로 염색한

다음 PermaFluor medium (Thermo Fisher Scientific)으로 마운팅하였다. 염색 후, LSM 710 confocal 현미경 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다. 1 차 항체는 rabbit anti-Lysozyme (clone EPR2994, Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-Chromogranin A (Abcam), rat anti-CD44 (clone IM7, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)를 사용하였고, 2 차 항체는 Alexa Fluor 488 donkey anti-rat IgG 또는 Alexa Fluor 546 donkey anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific)를 사용하였다.

RNA 분리 및 Quantitative PCR

조직, 오가노이드, 배양된 세포의 total RNA 는 RNeasy mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)을 사용하여 분리하였다. cDNA 는 Superscript II reverse transcriptase and oligo (dT) primer (Invitrogen, Camarillo, CA)를 이용해 합성하였으며, PCR primer (Table 1)로 cDNA 를 증폭하였다. Quantitative PCR (qPCR)은 PowerUP SYBR Green Master Mix 를 사용하였고, Applied Biosystems 7500 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific)으로 수행하였다. 결과값은 β -actin 또는 GAPDH 의 발현과 대비하여 타겟 유전자의 상대적인 발현 정도를 나타냈다.

Table 1. List of specific primer sets used for qPCR

Gene symbol	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
Mouse		
GCG	CACGCCCTTCAAGACACAG	GTCCTCATGCGCTTCTGTC
CCK	ACTGCTAGCGCGATACATCC	CCCCTACGATGGGTATTCCG
FXR	GAAAATCCAATTCAGATTAGTCTTCAC	CCGCGTGTTCTGTTAGCAT
VDR	CACCTGGCTGATCTTGTCAG	CTGGTCATCAGAGGTGAGGTC
TGR5	CAGGAGGCCATAAACTTCCA	GTCAGCTCCCTGTTCTTTGC
FGF15	GAGGACCAAAACGAACGAAATT	CAGTCCATTTCTCCCTGAA
Shp	TCTGCAGGTCGTCCGACTATTC	AGGCAGTGGCTGTGAGATGC
Ibabp	GGTCTTCCAGGAGACGTGAT	ACATTCTTTGCCAATGGTGA
Ost α	ATGCATCTGGGTGAACAGAA	GAGTAGGGAGGTGAGCAAGC
Ost β	TGACAAGCATGTTCCCTCCTG	TGCAGGTCTTCTGGTGTCTTCT
Asbt	GACTCGGGAACGATTGTGAT	GGTTCAATGATCCAGGCACT
CYP7a1	AACAACCTGCCAGTACTAGATAGC	GTGTAGAGTGAAGTCCTCCTTAGC
CYP8b1	CTGGCTTCCTGAGCTTATTC	CCCAGTAGGGAGTAGACAAA
B-actin	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG
Human		
LKB1	AACGGCCTGGACACCTTCT	CCCTTCCCGATGTTCTCAA
FGF19	CCGACGGCAAGATGCA	TCCTCCTCGAAAGCACAGTCT
Shp	CCCCAAGGAATATGCCTGCC	TAGGGCGAAAGAAGAGGTCCC
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	CATGGGTGGAATCATATTGGAA

RNA sequencing 분석

TruSeq mRNA Sample Prep kit (Illumina, San Diego, CA)를 이용하여 각 샘플마다 total RNA 1 ug 의 라이브러리를 준비하였다. RNA sequencing 실험은 이전에 보고된 방법으로 수행하였으며 (Kim et al., 2020), 마크로젠사 (Seoul, Korea)에서 데이터 프로세싱 및 통계분석을 수행하였다. HiSeq4000 platform (Illumina)를 이용하여 Poly A-selected RNA extraction, RNA fragmentation, random hexamer-primed reverse transcription, 100-nt paired-end sequencing 을 수행하였다. 라이브러리를 정량하기 위하여 qPCR 을 수행하였으며, qPCR Quantification Protocol Guide (KAPA Library Quantification kits)를 준수하였다. 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)로 라이브러리의 quality 를 측정 한 후, low-quality 를 가지거나 adaptor sequence, contaminant DNA, PCR duplicates 와 같은 artifacts 를 제거하는 전처리과정을 진행하였다. 전처리과정을 거친 reads 를 HISAT2 프로그램을 이용하여 reference genome 에 mapping 한 후, StringTie 프로그램으로 transcript 어셈블리를 진행하였고, 발현량을 비교하였다. 기존에 보고된 장 상피세포 계통과 관련된 유전자의 발현을 평가하기 위하여 GSEA 를 수행하였으며 (Gehart et al., 2019; Haber et al., 2017), GSEA ver. 4.1.0 프로그램으로 분석하였다 (Mootha et al., 2003; Subramanian et al., 2005). 모든 데이터는 NCBI (BioProject ID PRJNA744286)에 등록하였다.

장 상피세포 및 장 크립트 분리

장 상피 세포 분리 방법은 이전에 보고된 방법을 사용하였다 (Magness et al., 2013). 소장을 세로로 가른 후, 차가운 PBS 로 내용물을 세척하였다. 조직을 30 mM EDTA/PBS 에 넣고 20 분간 아이스에서 정치한 후, 조직을 새로운 30 mM EDTA/PBS 에 옮긴 후 8 분 동안 37 °C에서 배양하였다. 10 분간 조직을 흔든 후, 조직을 제거하고 1,000 x g 5 분간 원심 분리하여 cell pellet 을 얻었다. Single cell 을 얻기 위하여 TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific)을 넣고 37 °C에서 10 분간 배양하고 40 µm cell strainer 로 걸러 주었다. 분리된

세포는 Aldefluor assay 에 사용하였다. 오가노이드 배양을 위한 장 크립트를 분리하기 위하여 소장을 세로로 가른 후, PBS 로 세척한 후 1 cm 크기로 잘라주었다. 조직을 1 mM EDTA/PBS 에 넣고, 아이스 위에서 30 분동안 가볍게 흔든 후 조직을 5 mM EDTA 에 옮기고 1 시간 동안 아이스에서 정치하였다. 조직을 PBS 에 옮기고 2 분간 흔든 후, 100 μ m cell strainer 로 걸러주었다. 분리된 장 크립트는 250 x g 3 분간 원심 분리하였다 (Lee et al., 2018).

담즙산 분석

간, 소장, 대장, 맹장, 대변의 담즙산 (Bile acid, BA)을 추출하기 위하여, 각 샘플을 75% 에탄올에 넣고 50 $^{\circ}$ C에서 2 시간 동안 배양하였고, 쓸개는 0.5 ml PBS 을 넣어주었다. 담즙산은 total BA kit (Crystal Chem, Downers Grove, IL)을 사용하여 측정하였다. 담즙산 조성은 동결 건조한 소장 조직 또는 대변의 10 mg 을 50 % methanol (MeOH) 100 μ l 로 homogenate 하였다. 담즙산의 양을 측정하기 위하여 liquid chromatography (LC)/mass spectrometry (MS/MS) system 을 사용하였고, 1290 HPLC (Agilent, Santa Clara, CA)와 QTRAP 5500 (AB Sciex, Framingham, MA)로 분석을 수행하였다. 샘플 전처리와 분석은 이전에 보고된 방법으로 수행하였다 (Jang et al., 2017).

세포배양, 형질주입, Luciferase assay

본 실험에 사용된 장 상피세포 세포주인 Caco2 와 HT-29 세포는 한국 세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. Caco2 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% Antibiotic-Antimycotic (Thermo Fisher Scientific)을 포함한 Dulbecco's modified Eagles' s medium (DMEM)을 사용하였고, HT-29 세포는 complete RPMI (10% FBS, 1% penicillin-streptomycin)를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 로 유지된 배양기에서 배양하였다. 유전자를 knockdown 하기 위하여 세포에 Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 25 nM LKB1 siRNA (Sigma Aldrich) 또는 negative

control 인 siRNA (Bioneer, Daejeon, Korea)를 처리하였다. Overnight 배양 후 배지를 교체하고, transfection 48 시간 후 상등액과 세포를 얻었다. luciferase assay 를 위하여, LKB1 siRNA 를 transfection 한 Caco2 세포에 100 ng FXRE-luciferase reporter plasmid 를 처리하였다. Transfection 24 시간 후 FXR agonist [5 μ M GW4064 (Sigma Aldrich)] 를 24 시간 동안 처리하였다. Luciferase 활성은 Glomax 96 Microplate Luminometer (both from Promega Corporation, Madison, WI)로 측정하였다.

효소면역분석 (EIA, ELISA)

CCK EIA kit (Sigma Aldrich)를 사용하여 Serum CCK level 을 측정하였으며, FGF19 Quantikine ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 사용하여 세포 배양 상등액의 FGF19 protein 농도를 측정하였다.

Metagenomics 분석

마우스의 맹장과 소장의 내용물에서 QIAamp DNA stool mini kits (Qiagen)를 사용하여 DNA 를 추출하였다. 박테리아 16S rDNA sequencing 과 데이터 분석은 천랩 (Seoul, Korea)에서 수행하였으며, Trimmomatic 소프트웨어 (ver. 032)를 통해 품질 검사와 저 품질 (< Q25)을 필터링하였다. 품질 관리 통과 후, 기본 매개 변수와 함께 VSEARCH (ver. 2. 13.4)를 사용하여 paired-end 시퀀스 데이터를 병합하였다. 16s rRNA 를 인코딩하지 않는 비 특이적 앰플리콘은 HMMER 소프트웨어 (ver. 3. 2. 1)의 nhmmer 으로 확인하였다. EzBiocloud 16s rRNA 데이터베이스를 사용하여 분류하였다 (Yoon et al., 2017). 분류학적 cladogram 은 대수의 LDA 점수에서 임계 값이 2 이상인 LEfSe 를 사용하여 생성되었다 (Segata et al., 2011). 모든 sequence 는 NCBI (BioProject ID PRJNA744286)에 등록하였다.

BSH 활성 측정

소장 내용물을 0.05% L-cysteine HCl (Sigma Aldrich)가 함유된 PBS 로 모았다. BSH 활성을 조사하기 위해 BSH medium [MRS agar, 0.05% L-cystein HCl, 0.5% (w/v) sodium taurodeoxycholic acid (TDCA), 0.37 g/L CaCl₂ (Sigma Aldrich)]에 소장 내용물을 10 μ L 점적 하였으며, 37 $^{\circ}$ C에서 72 시간 배양한 뒤 흰색환의 직경을 측정하였다.

Aldefluor assay

장 상피세포의 aldehyde dehydrogenases (ALDH) 활성을 측정하기 위하여 Aldefluor kit (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada)를 사용하였으며, kit 의 제시된 방법에 따라 측정하였다.

레티놀 및 레티노산 정량

간과 소장 에 있는 레티노이드는 LC/MS-MS 분석법을 통하여 측정되었으며, 이전에 보고된 방법을 참고하였다 (Grizotte-Lake et al., 2018). 50~100 mg 의 조직에 5 배 부피의 PBS 를 넣고 내부표준물질 [10 μ M all-trans-retinol-d₅, 4 μ M all-trans-RA-d₅ (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada)]를 20 ul 넣고 잘 섞어주었다. liquid-liquid extraction 을 통하여 레티놀, 레티노산을 분리하였다. 레티노이드는 LC-MS/MS [1290 UHPLC (Agilent) 와 QTRAP 5500 mass spectrometer (AB Sciex)]로 분석하였고, 용매 A (0.1% 포름산이 포함된 H₂O)와 용매 B (0.1% 포름산이 포함된 acetonitrile)로 분리하였다. 유량은 400 μ L/min, column 온도는 23 $^{\circ}$ C로 유지되었다. LC gradient 는 다음과 같다: 레티놀, 레티노산 분석의 경우 처음에는 용매 B 의 농도가 70%로 3분간 유지되었다가 9분 동안 용매 B 의 농도를 70%에서 78%로, 0.5분 동안 78%에서 100%로 변화시킨 후, 용매 B 의 농도가 100%인 상태로 6.5분 동안 유지한 다음 초기 조건으로 돌아가도록 설정하였다. 이온화방식은 양이온 모드를 사용하였고 MRM (multiple

reaction monitoring) 방식으로 검출하였다. 각 레티노이드 교정 범위는 1-10,000 nM ($r^2 \geq 0.99$)이며, 데이터분석은 Analyst 1.7 을 사용하였다.

Western blot

배양된 cell pellet 과 소장 조직을 1% Halt protease 와 phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific)이 포함된 RIPA buffer [25mM Tris-HCl (pH 7.6), 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate]를 처리하여 단백질을 추출하였다. 단백질은 BCA assay kit (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 정량하였다. 단백질을 SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 분리하고, PVDF (polyvinylidene difluoride membrane; Millipore, Massachusetts)에 transfer 하였다. 단백질 검출에 사용된 1 차 항체로는 LKB1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), FGF19, phospho-AMPK α , or β -actin (all from Cell Signaling Technology, Danvers, MA)를 사용하였고, 2 차 항체는 anti-rabbit-HRP antibody (Cell signaling)를 사용하였다.

당내성 및 인슐린 내성 검사

마우스를 16 시간 금식 시킨 후 포도당 용액 (2 g/kg)을 복강 주사하고 0, 30, 60, 90, 120 분 후 마우스 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 마우스를 6 시간 금식 시킨 후, 인슐린 (0.75 U/kg, Sigma Aldrich) 용액을 복강 주사하고 0, 30, 60, 90, 120 분 후 마우스 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다.

Comprehensive laboratory animal monitoring system (CLAMS)

고지방식이를 6-7 주간 투여한 마우스를 각각 CLAMS (Columbus Instruments, Columbus, OH) 케이지에 넣고, 4 일 동안 모니터링하였다. 산소섭취량 (VO_2 ;

mL/kg/h), 이산화탄소배출량 (VCO₂; mL/kg/h), 호흡교환율 (respiratory exchange ratio, RER), heat (kcal/h)이 10 초 간격으로 기록되었다.

통계분석

통계분석에는 GraphPad Prism software (GraphPad, La Jolla, CA)를 이용하였다. 두 그룹 간의 유의적 차이를 비교하기 위하여 two-tailed unpaired *t*-test 로 분석하였으며, 여러 그룹 간의 비교를 위해서는 One-way, two-way ANOVA 로 처리하였고, 실험군들 간의 유의차를 알아보기 위한 다중비교방법으로 Tukey' s post-hoc test 검정을 실시하였다. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

결과

1. 장 상피세포 LKB1의 결손은 장 줄기세포 증식과 분비 계열 세포의 분화에 영향을 미친다.

LKB1^{f/f}와 villin^{Cre} 마우스를 교배하여 상피세포 특이적으로 LKB1이 결손된 마우스를 제작하였다 (LKB1^{ΔIEC}). LKB1^{ΔIEC} 마우스와 littermate 인 LKB1^{f/f} 마우스 사이의 체중 차이는 없었음에도 불구하고, LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 소장, 맹장, 대장의 무게가 유의하게 증가하였으며, 대장의 길이가 증가하였다 (그림 5a,b). 이전 연구에서 저자들은 장 상피세포의 LKB1 결손이 파네스 세포와 술잔 세포의 비 이상적인 발달을 유발한다고 보고하였다 (Shorning et al., 2009). Lysozyme 염색을 통하여 LKB1^{ΔIEC} 마우스 소장의 파네스 세포를 관찰하였을 때, 발현이 감소되고 분산된 형태를 띠는 등 비 이상적인 분포를 확인하였다 (그림 6a). 또한 술잔 세포를 PAS 염색을 통해 확인한 결과, LKB1^{f/f} 대비 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 회장에서 그 수가 증가한 것을 확인하였다 (그림 6b). LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 mucin (MUC2), chromogranin A (ChgA)의 mRNA 발현이 유의하게 증가하였다 (그림 7). 이와 대조하여, lysozyme (Lyz), defensinβ1, (Defb1), Wnt3와 같은 파네스 세포에서 발현되는 물질은 감소하였다 (그림 7). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 분석 결과 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 소장에서 술잔 세포 관련 유전자의 발현량이 증가하고, 파네스 세포 관련 유전자의 발현량이 감소한 것을 확인하였다 (그림 8). 또한 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 분비 계열 세포 분화와 관련된 전사 인자인 Spdef와 Gif1의 발현이 유의하게 감소하였다 (그림 9). 뿐만 아니라, Lgr5와 같은 장 줄기세포 마커의 발현이 유의하게 감소하였으며, 반면 CD44와 같은 Wnt 타겟 유전자의 발현이 유의하게 증가하였다 (그림 10). 대장에서도 동일한 표현형을 나타냈다 (그림 11a-c). 장 줄기세포의 오가노이드 형성 능력을 확인하기 위하여 소장의 크립트를 ENR과 WENR 배지에서 배양하였다. LKB1^{f/f} 마우스와 비교하여 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 분리한 소장의 크립트를 ENR 배지에 배양하였을 때, 형성된 오가노이드의 수와 크기가 감소하는 것을 확인하였다 (그림 12a,b). 그러나 WENR 배지에 배양하였을 때, 형성된 LKB1^{ΔIEC} 및 LKB1^{f/f} 유래 오가노이드의 수가 비슷하였다 (그림 12a,b). 이러한 차이는 LKB1^{ΔIEC}

마우스의 파네스 세포에서 생성되는 Wnt3 가 감소되었기 때문에 발생했다고 추정할 수 있다. 위와 같은 결과를 통해 장 상피세포의 LKB1 은 장 줄기세포 증식과 분비세포로의 분화에 관여하고 있음을 확인할 수 있다.

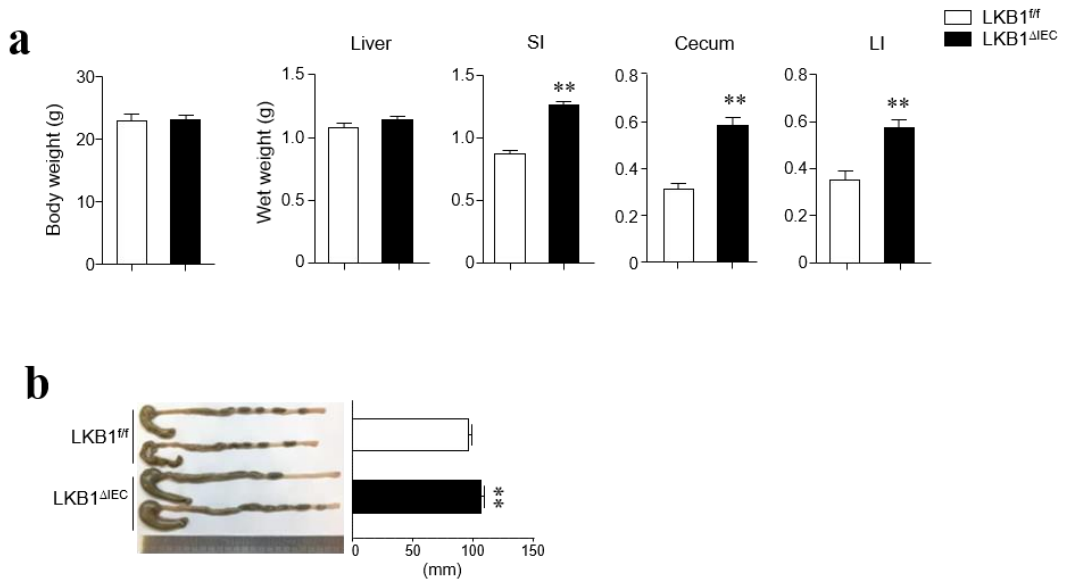


Figure 5. General morphology of LKB1^{ΔIEC} mice. (a) Weights of the body, liver, small intestine (SI), cecum, and large intestine (LI) of LKB1^{ff} and LKB1^{ΔIEC} mice at 12 weeks old (n = 6 / group). (b) Colon lengths of mice (n = 8 / group). Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test **p < 0.01.

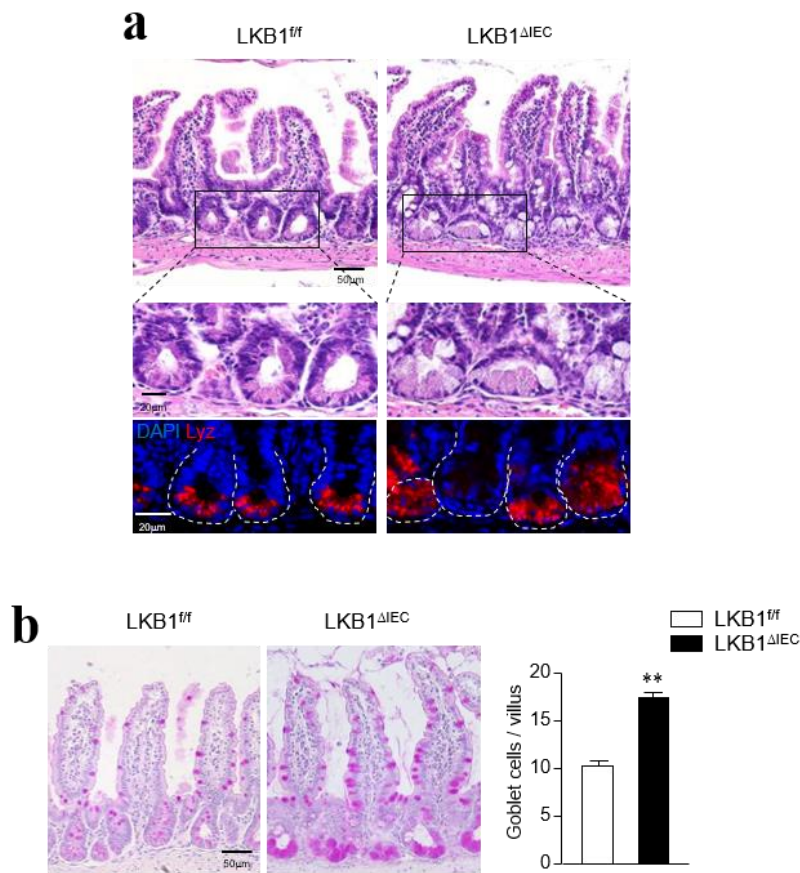


Figure 6. Abnormal morphology in the small intestine of LKB1^{ΔIEC} mice. (a) LKB1^{ΔIEC} mice have an abnormal morphology of the small intestine (SI). Representative bright field and confocal images of hematoxylin and eosin (H&E) and immunofluorescence (IF) staining for lysozyme (red). Bar = 50 μm (H&E) and 20 μm (IF). (b) Representative images of PAS staining and quantification of PAS-positive goblet cells per villus in SI ileum were shown (n = 3 / group). Bar = 50 μm. Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test **p < 0.01.

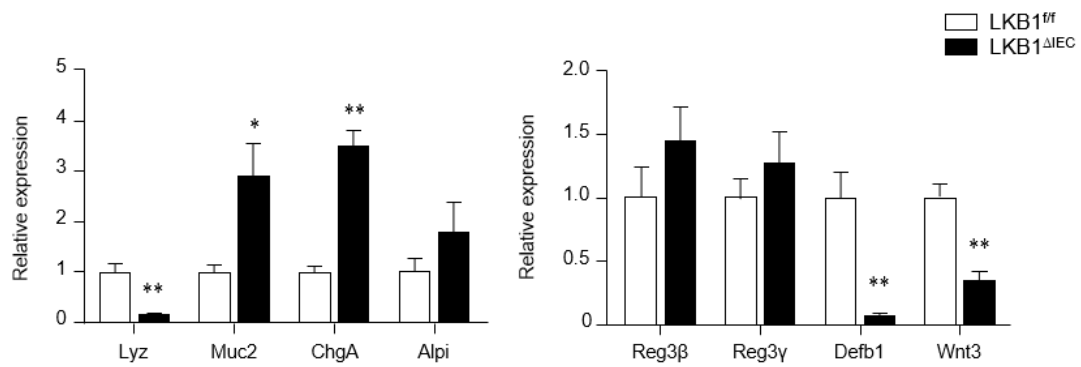


Figure 7. *LKB1^{ΔIEC}* mice showed changes in gene expression in intestinal epithelial cells (IECs). Gene expression for IECs and Paneth cell secretomes in the SI ileum were examined by qPCR (n = 5 / group). Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. *p < 0.05; **p < 0.01.

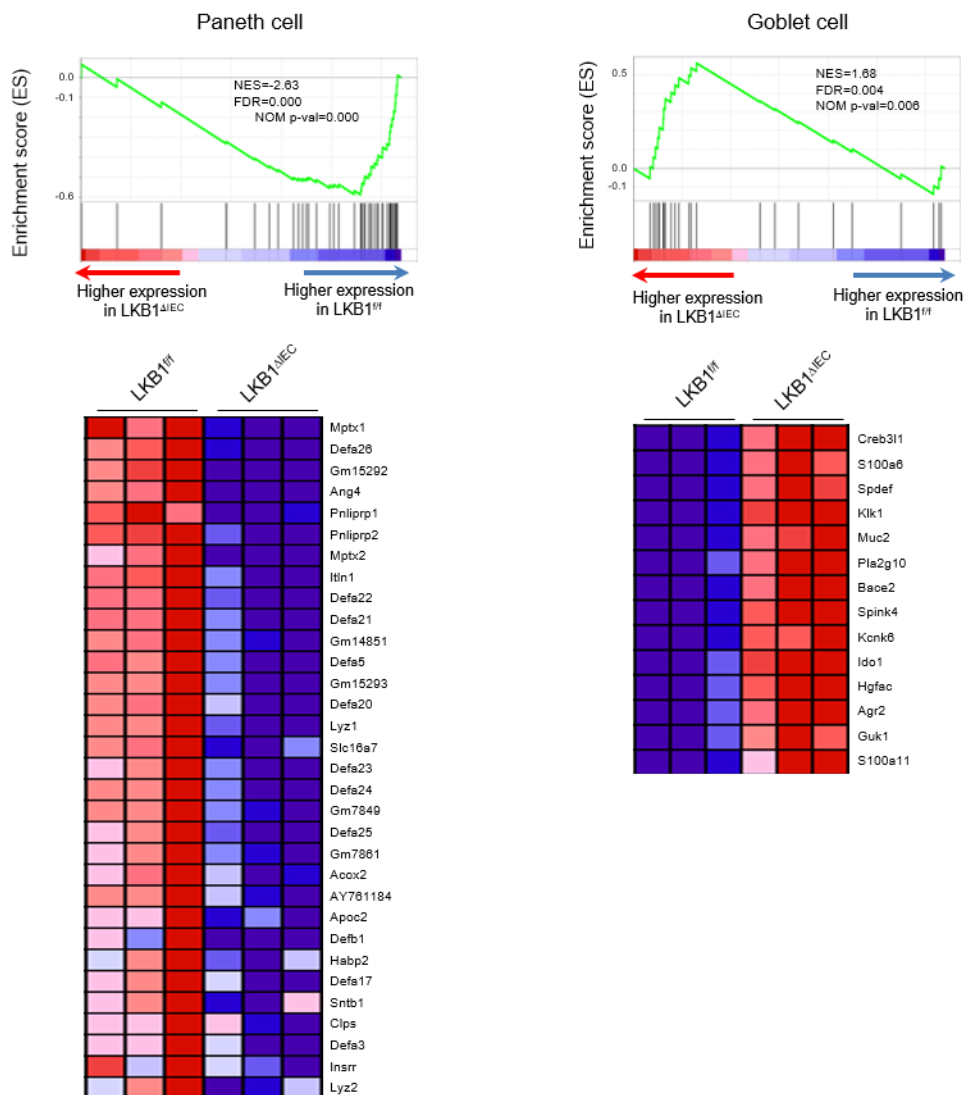


Figure 8. LKB1^{ΔIEC} mice showed a loss of Paneth cell gene signature and a stronger goblet cell gene signature. Gene Set Enrichment Analysis of RNA-seq data in the SI ileum. The heat map indicates the clustered genes in the leading edge subsets (n = 3 / group).

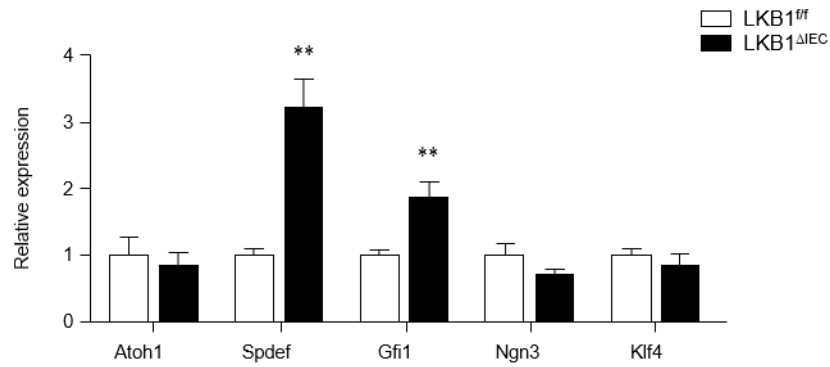


Figure 9. Transcription factors of the secretory cell lineages were highly expressed in LKB1^{ΔIEC} mice. mRNA levels of transcription factors for secretory lineage were assessed by qPCR (n = 5–8 / group). Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test **p < 0.01.

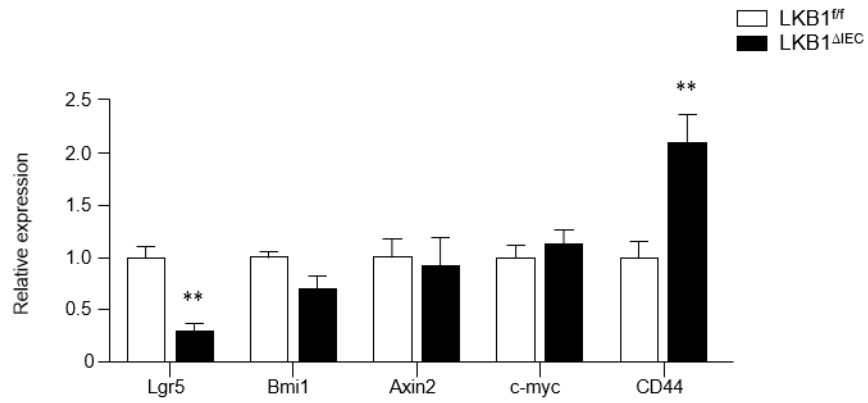


Figure 10. Gene expression of intestinal stem cells markers. Intestinal stem cells marker and Wnt target genes were assessed by qPCR (n = 5–8 / group). Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using one-way ANOVA with Tukey’s post-hoc test. **p < 0.01.

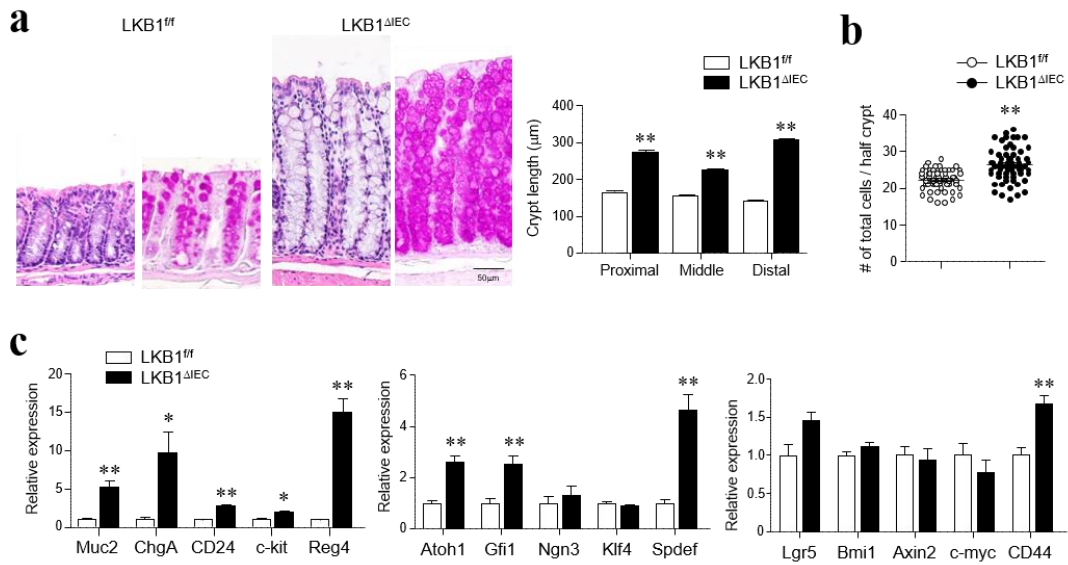


Figure 11. Abnormal differentiation of secretory lineage cells was observed in the colon of LKB1^{ΔIEC} mice. (a) Representative images of the colon stained with H&E and PAS, and quantification of crypt depth in the proximal, middle, and distal colon of LKB1^{fl/fl} and LKB1^{ΔIEC} mice (n = 3 / group). Bar = 50 μm (H&E) (b) Quantification of the number of cells per half crypt. (c) mRNA levels of intestinal epithelial cells (IECs) in the colon were evaluated by qPCR (n=4–5 / group). Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. *p < 0.05; **p < 0.01.

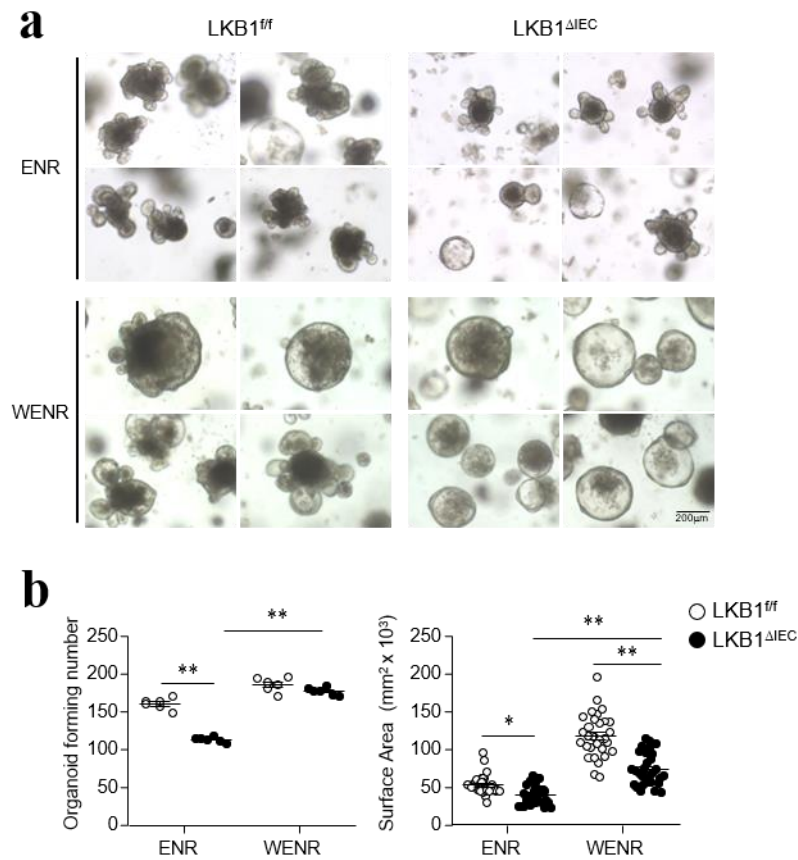


Figure 12. The organoid forming capacity of LKB1^{ΔIEC} mice. (a) Representative images of organoids and (b) quantification of organoid-forming number and organoid size under ENR or WENR conditions are shown. Bar = 200 μm. Data are representative of two independent experiments. Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. *p < 0.05; **p < 0.01.

2. LKB1^{ΔIEC} 마우스의 장에서 *Akkermansia*의 양이 증가하였다.

장 상피세포에서 LKB1이 결손 되었을 때, 장내 미생물의 변화를 확인하기 위하여 맹장 내용물 (cecum contents)에서 메타지노믹 분석을 수행하였다. LKB1^{f/f} 마우스와 비교하여 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 장에서 *Akkermansia*의 양 (abundance)이 증가하였다 (그림 13a). 이는, LKB1^{ΔIEC} 마우스의 mucin 과형성이 mucin 분해 박테리아인 *Akkermansia*의 증가에 영향을 미쳤을 것이라 생각된다. LKB1^{f/f} 마우스와 비교하여 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 장내 미생물의 다양성 (diversity)와 풍부도 (richness)가 감소하였다 (그림 13b). 또한, LKB1^{f/f}와 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 박테리아 군집 조성이 유의적으로 변화된 것을 확인하였다 (그림 14a,b). 장내 미생물 조성의 변화에도 불구하고, 맹장에 있는 단쇄 지방산 (Short chain fatty acid, SCFA)의 양에는 변화가 없었다 (그림 14c). 이후 진행되는 연구에서는 LKB1^{f/f} 마우스와 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 장내 미생물 영향을 최소화하기 위하여 코하우징 (co-housing)하였다.

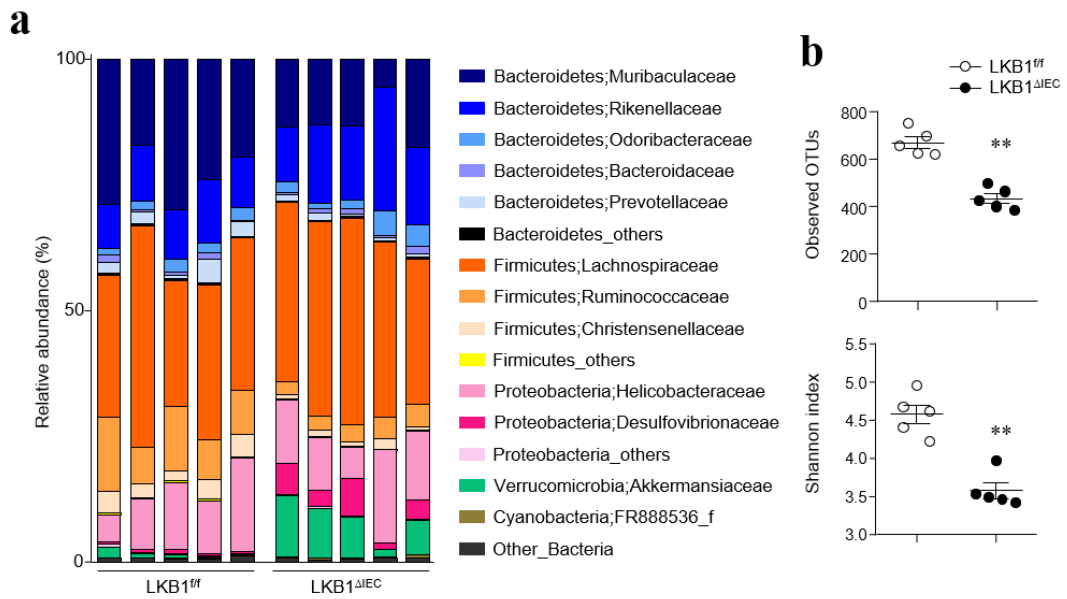


Figure 13. LKB1^{ΔIEC} mice have an increased abundance of *Akkermansia*. (a-b) 16S rDNA sequencing was performed in the cecum of LKB1^{fl/fl} and LKB1^{ΔIEC} mice that were housed separately after genotyping (n = 5/ group). (a) Relative abundance of operational taxonomic units (OTUs) at the family level. (b) Observed OTUs and Shannon diversity index were determined. Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. **p < 0.01.

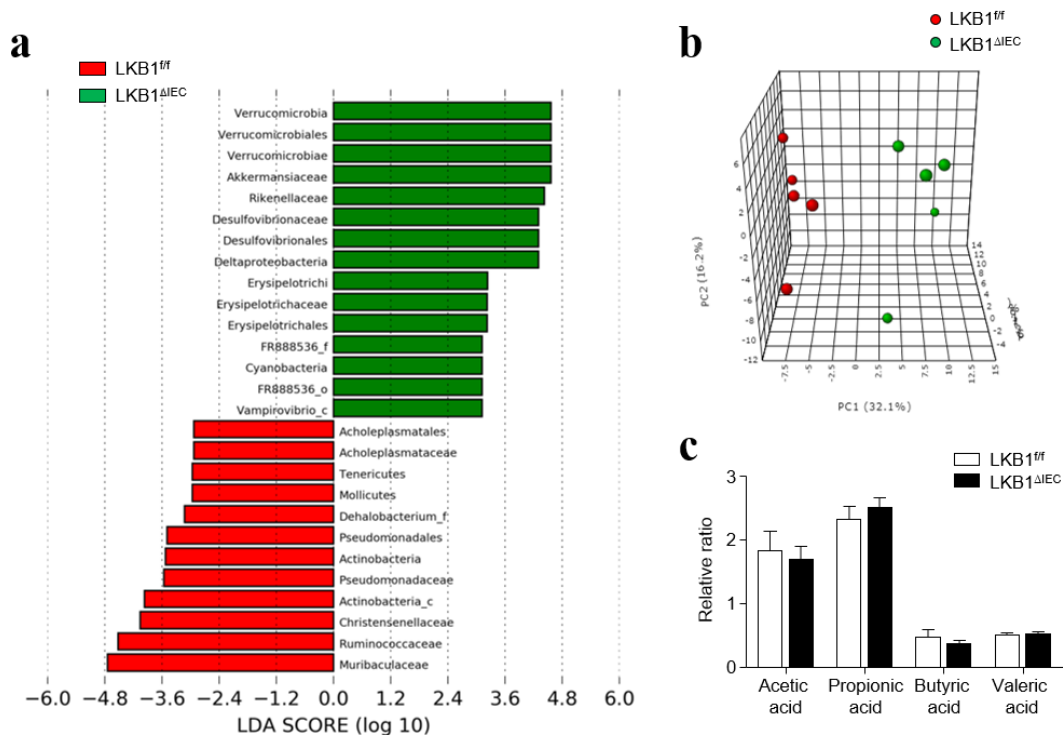


Figure 14. Change of microbiota composition and short-chain fatty acid in the cecum contents of LKB1^{ΔIEC} mice. (a) The histogram was generated by the LefSe (Linear discriminant analysis effect size) analysis. Differentially abundant taxa of microbiota that were enriched in LKB1^{fl/fl} (red) or LKB1^{ΔIEC} (green) mice. (b) PCoA of weighted UniFrac distances plot showing clustering between the two groups. (c) Levels of short-chain fatty acids in cecal content were analyzed using LC-MS/MS (n = 6 / group). Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test.

3. 장 상피세포의 LKB1 결손은 담즙산 합성과 분비를 촉진한다.

LKB1^{ΔIEC} 마우스의 소장에서 술잔 세포가 과 발현된 것과 더불어 장내 분비세포 마커인 ChgA 의 발현이 증가된 것을 확인하였다 (그림 15a). 또한, LKB1^{ΔIEC} 마우스의 소장에서 펩타이드 호르몬과 관련된 RNA-seq 데이터 중에서 glucagon (GCG), cholecystikinin (CCK)의 발현이 증가되었으며, Gastric inhibitory polypeptide (GIP)와 peptide YY (PYY)의 발현이 감소된 것을 확인하였다 (그림 15b). RT-PCR 을 통하여 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 십이지장과 회장에서 GCG 와 CCK 의 mRNA 양이 증가한 것을 확인하였다 (그림 15c). 또한 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 간문맥에서 분리한 혈청에서 CCK 의 양이 증가되었으며, 맹장의 색이 어두운 녹색을 띠며, 크기가 증가되어 있는 것을 관찰하였다 (그림 15d,e). 이전 연구에서 CCK 는 쓸개 수축을 유발하며 (Chandra and Liddle, 2007), 담즙 색소는 대변의 색을 어둡게 한다고 보고되었다 (Hundt et al., 2022). 그러므로, 4 시간 금식 시킨 마우스에서 간, 쓸개, 소장, 간문맥에서 분리한 혈청, 맹장, 대장을 분리하여 총 담즙산 양을 측정하였다. LKB1^{ΔIEC} 마우스의 소장에서 총 담즙산 양이 유의하게 증가하였으며, 장간 순환 내의 총 담즙산으로 정의되는 총 담즙산 pool (간, 쓸개, 소장의 담즙산의 합) 크기가 증가하였다 (그림 16). 반면, 간, 쓸개, 간문맥에서 분리한 혈청, 맹장, 대장, 대변의 담즙산 양에는 유의적인 차이가 없었다 (그림 16). 따라서, LKB1 결손이 담즙산의 배출에는 영향을 미치지 않으면서 소장에 담즙산을 축적시키는 데 영향을 미친다고 할 수 있다. 담즙산은 간과 장 내에 존재하는 담즙산 양에 따라 negative feedback 에 의해 합성되는 양이 조절된다(Gonzalez-Regueiro et al., 2017). 따라서 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 담즙산 pool 크기를 증가시키는 요인이 무엇인지 알아보기 위하여 장의 담즙산 feedback 경로와 관련된 유전자의 발현을 확인하였다. 담즙산 수용체 중에서 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 회장에서 TGR5 의 발현량이 유의하게 감소하였으나, FXR 과 비타민 D 수용체 (Vitamin D receptor, VDR)의 발현량은 변화가 없었다 (그림 17a). FXR 의 발현량에는 변화가 없음에도 불구하고 담즙산 합성과 이동과 관련되어 있는 FXR 의 타겟 유전자 (i.e., FGF15, Shp, Ibabp, Ostβ)의 mRNA 양이 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 낮아져 있었다 (그림 17b). 반면, 회장의 담즙산 재흡수와 관련되어 있는 Asbt 의 발현량에는 변화가 없었다 (그림 17c).

이전 연구에서 장 상피세포에서 점막 고유층(lamina propria)으로 담즙산을 이동시키는 데 관여하는 $Osta/\beta$ 의 발현이 감소되면 장 상피 세포에 담즙산을 축적시키고, 장의 형태를 변화시킨다고 보고하였다 (Ferrebee et al., 2018). 그러나, $LKB1^{\Delta IEC}$ 마우스의 소장에서 담즙산이 증가된 것은 주로 소장의 내강에 축적되었기 때문이며, 장 상피세포를 포함하는 소장 조직에서 담즙산 양에는 변화가 없었다 (그림 18a). $LKB1^{\Delta IEC}$ 마우스에서 FGF15의 발현량이 감소된 것과 간에서 CYP7a1의 발현이 유의하게 증가한 것을 확인하였다 (그림 18b). 따라서, 장 상피세포의 LKB1 결손은 CYP7a1과 FGF15가 매개된 feedback 조절을 방해함으로써, 담즙산의 합성을 증가시킨다.

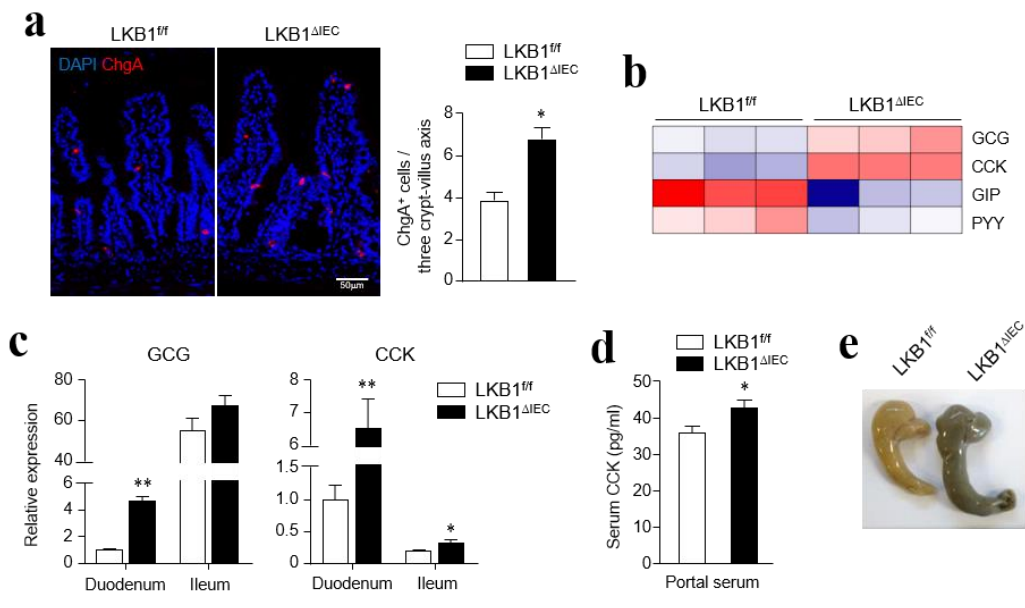


Figure 15. LKB1^{ΔIEC} mice promoted the secretion of bile acid-related peptide hormones.

(a) Representative images of IF staining for chromogranin A (red) and quantification of enteroendocrine cells per three crypt-villus axis in the SI (n = 3 / group). Bar = 50 μm. (b) The heat map of differentially expressed genes (DEGs; fold change ≥ 1.5, p < 0.05) of the gut hormones based on RNA-seq data of the SI ileum from LKB1^{fl/fl} and LKB1^{ΔIEC} mice. (c) mRNA levels of GCG and CCK in the duodenum and ileum (n = 4–5 / group). (d) CCK level was measured in serum from portal venous blood (n = 5 / group). (e) The representative image of cecum. Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. *p < 0.05; **p < 0.01.

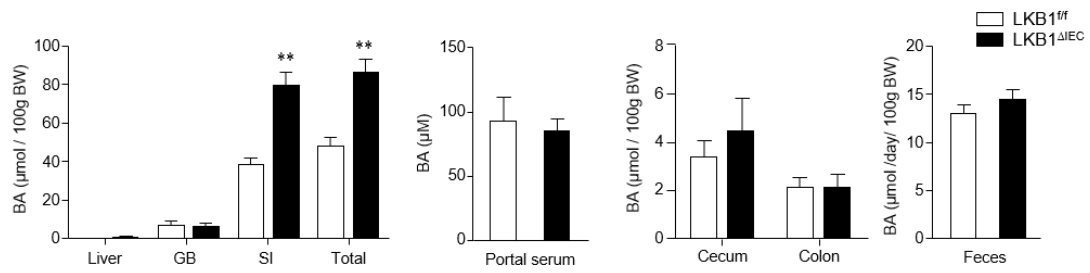


Figure 16. Bile acid pool size was increased in LKB1^{ΔIEC} mice. Total BA concentration in the liver, gallbladder (GB), SI, and total pool (liver + GB + SI) from mice fasted for 4 h (n = 6–7 / group). BA levels in the portal serum, cecum and colon, and feces (n = 6–9 / group). Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student’s t-test. **p < 0.01.

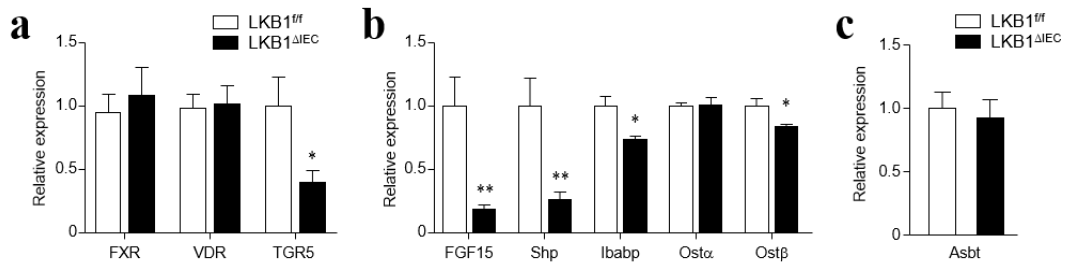


Figure 17. FXR target genes were lowered in the SI ileum of LKB1^{ΔIEC} mice. mRNA expression levels of BA receptors (a), FXR target genes (b), and BA transporter (Asbt; i) (c) in the SI ileum were measured by qPCR (n = 6 / group). Data are represented as mean \pm SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. *p < 0.05; **p < 0.01.

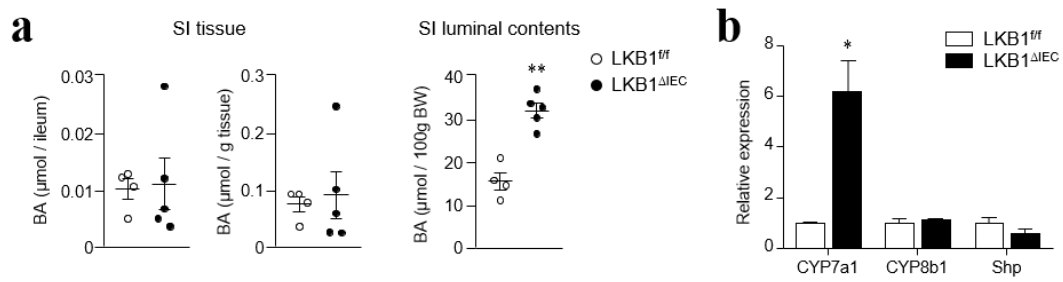


Figure 18. Increased BA of the SI in LKB1^{ΔIEC} mice primarily accumulated in the SI lumen. (a) Total BA concentration in the SI ileum tissue and SI luminal contents (n=4–5 / group). (b) Gene expression of enzymes involved in BA synthesis in the liver was assessed (n = 3–4 / group). Data are represented as mean \pm SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. *p < 0.05; **p < 0.01.

4. LKB1 결손은 FXR 에 비의존적으로 FGF15/19 의 분비를 감소시킨다.

LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 순환하는 총 담즙산 양이 증가했음에도 불구하고 FXR 하위 유전자의 발현은 감소하였다. LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 FXR 매개 신호 전달 과정이 작동하는 지 알아보기 위하여 FXR agonist 인 obeticholic acid (OCA)를 처리하였다. Vehicle (10% DMSO, 90% 해바라기유) 또는 OCA 를 5일간 경구투여 하였다. OCA 를 투여하였을 때, LKB1^{ΔIEC} 마우스의 소장에서 담즙산 양과 담즙산 pool 크기가 유의적으로 감소하였고 (그림 19a), 맹장의 크기 또한 감소하였다 (그림 19b). 또한 소장에서 Shp 와 FGF15 의 발현이 증가되었으며, 간에서 CYP7a1 과 CYP8b1 의 발현은 감소하였다 (그림 19c). 이를 통하여, LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 OCA 가 FGF15/19 의 생성을 자극하고, 비정상적인 담즙산 생성을 억제함을 확인하였다. 이러한 결과는 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 FXR 경로는 온전한 것을 의미한다. LKB1 knock down 이 장 상피세포의 FXR 경로와 FGF15/19 발현에 직접적으로 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 사람 장 상피세포 (i.e., Caco2, HT-29 cell line)에 LKB1 siRNA 를 형질주입 (transfection)하였다. siRNA 를 매개하여 장 상피세포에서 LKB1 knockdown (약 50-70%)시켰을 때 FXR, FGF19, Shp 의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았다 (그림 20a). 또한 장 상피세포에서 LKB1 을 결손 시켰음에도 FXR agonist (GW4064)를 처리했을 때, FXR 활성화에는 영향을 미치지 않는 것을 luciferase reporter assay 를 통해 확인하였다 (그림 20b). 이는 LKB1 이 직접적으로 FXR 경로를 조절하지 않는 것을 의미한다. 그러나, LKB1 siRNA 를 처리한 후 배양한 배지에서 FGF19 단백질 양이 유의하게 감소되는 것을 확인하였다 (그림 20c). western blot 을 통해 LKB1 이 결손되었을 때 FGF19 단백질 양이 감소된 것을 확인하였으며 (그림 20d), 이는 LKB1 결손이 세포 자율적 (cell-autonomous)이고, 전사와 관계없는 방식으로 FGF19 단백질을 조절한다는 것을 의미한다. 따라서 LKB1 결손이 FXR 에 비의존적으로 FGF15/19 의 분비를 감소시킨다고 생각된다.

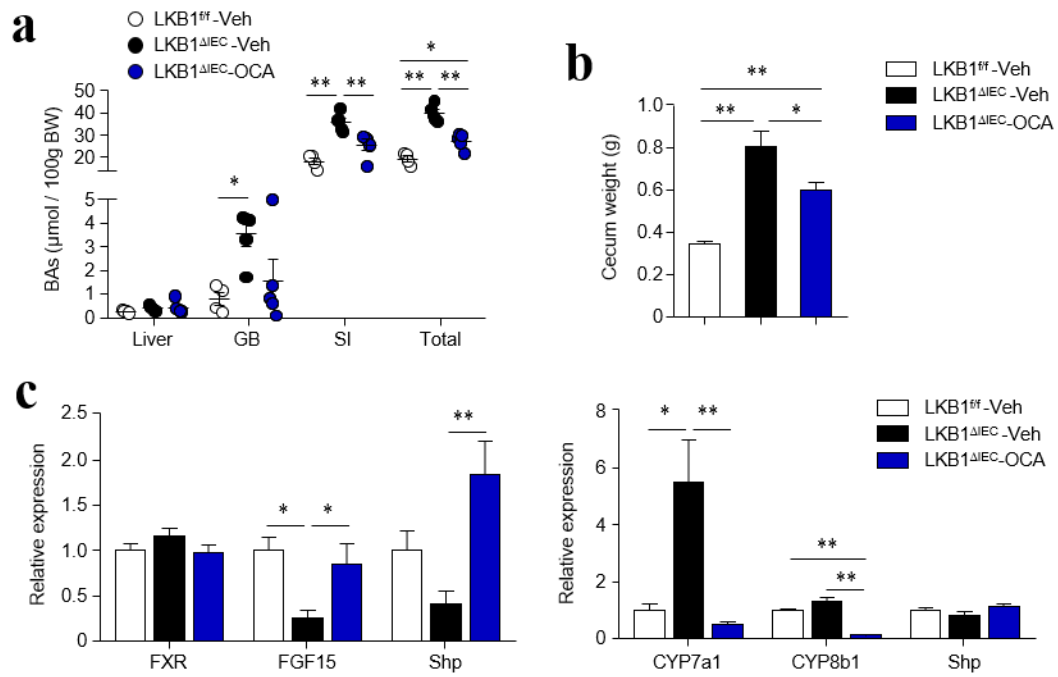


Figure 19. OCA stimulates FGF15/19 production and inhibits abnormal BA production in LKB1^{ΔIEC} mice. (a-c) Mice were administered vehicle (10% DMSO and 90% sunflower oil) or obeticholic acid (OCA, 30 mg/kg) by oral gavage (over 4 consecutive days and 4 h before euthanasia) (n = 4–5 / group) and euthanized after fasting for 4 h. (a) BA levels in the liver, GB, SI, and (b) cecum weight were measured. (c) mRNA expression levels in the SI ileum (left) and liver (right). Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using one-way ANOVA with Tukey’s post-hoc test. *p < 0.05; **p < 0.01.

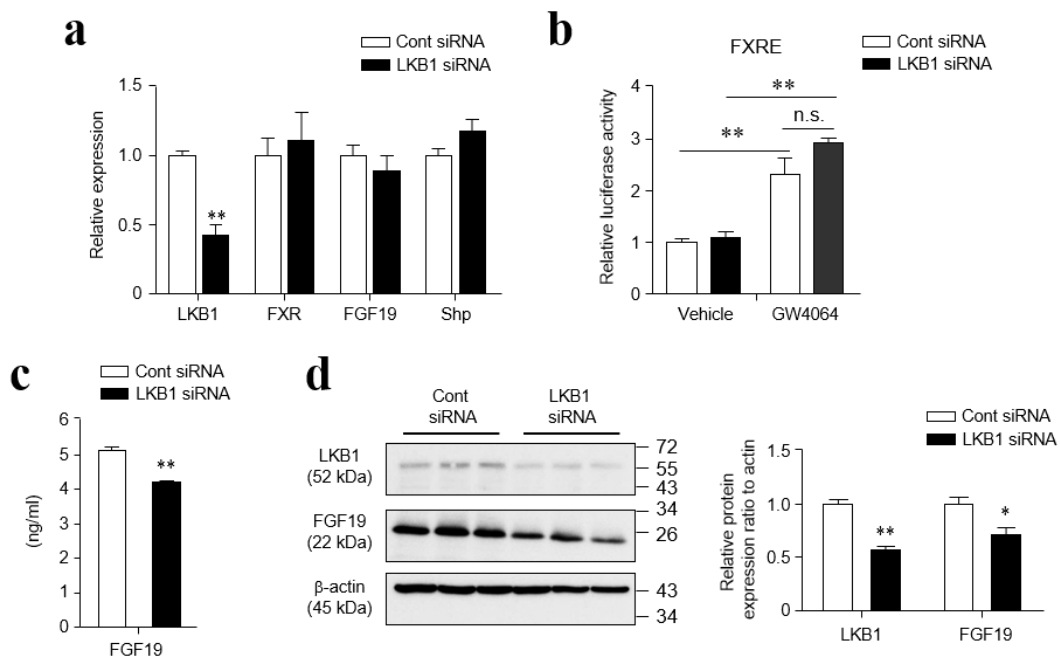


Figure 20. LKB1 depletion in human IECs decreased FGF19 protein level in an FXR-independent manner. (a) Caco2 cells were transfected with 10 nM scrambled control or LKB1 small interfering RNA (siRNA). Expression levels of LKB1, FXR, FGF19, and Shp were measured by qPCR at 48 h after transfection (n = 6 / group). (b) Caco2 cells transfected with FXR response element (FXRE) luciferase reporter and control or LKB1 siRNA (10 nM) were treated with GW4064 (5 μ M) or vehicle at 24 h post-transfection. After 24 h of treatment, luciferase activity was measured (n = 6 / group). (c and d) After siRNA (25 nM) transfection in HT-29 cells for 48 h, FGF19 protein level was measured with cell culture supernatants using ELISA (c, n = 4 / group), and with cell extracts by Western blot analysis (d). Data are representative of two independent experiments. Data are represented as mean \pm SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. *p < 0.05; **p < 0.01.

5. LKB1^{ΔIEC} 마우스는 결합 담즙산이 축적되었고, BSH 생성 박테리아가 감소되었다.

*In vitro*에서 장 상피세포의 LKB1 결손이 FXR 신호 전달에 영향을 주지 않는 것을 확인하였다. 그러나 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 FXR 타겟 유전자가 유의하게 감소하였기 때문에 이에 영향을 미치는 요인이 무엇인지 확인하였다. 담즙산은 FXR agonist 또는 antagonist 로써 작용하여 FGF15/19의 생성에 영향을 주기 때문에 담즙산 조성을 분석하였다. LKB1^{f/f} 마우스 대비하여 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 회장에서 cholic acid (CA), taurocholic acid (TCA), T-βMCA, deoxycholic acid (DCA)의 양이 높아져 있음을 확인하였다 (그림 21a). LKB1^{ΔIEC} 마우스의 회장에서 증가된 담즙산은 주로 결합 담즙산이다 (그림 21b). LKB1^{ΔIEC} 마우스의 대변에서 일차 담즙산은 낮아져 있고, 이차 담즙산은 증가되어 있었다 (그림 21c,d). 이러한 결과는 장 상피세포의 LKB1 결손이 담즙산 pool 크기를 증가시키고, 담즙산 조성을 바꾼다는 것을 보여준다. 다음으로, 장내 미생물이 담즙산 조성에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 소장의 장내 미생물 조성을 확인하였다. LKB1^{ΔIEC} 마우스와 그들의 대조군 littermate 를 코하우징 하였음에도, *Akkermansia* 가 높아져 있었다 (그림 22a). LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 OTU 수는 유의적인 차이가 없었으나, Shannon index 가 LKB1^{f/f} 마우스 대비하여 유의적으로 감소하였다 (그림 22b). Beta diversity 를 통하여 LKB1^{f/f} 마우스와 LKB1^{ΔIEC} 마우스 사이의 박테리아 조성이 유의하게 차이나는 것을 확인하였다 (그림 22c). 16S rRNA 프로파일을 기반으로 한 PICRUST (Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states) 예측 분석을 통하여 장내 미생물의 functional capacity 를 확인하였다. LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 BSH와 일차 담즙산을 생성하는 데 관여하는 유전자의 양이 유의하게 감소되었다 (그림 23a). 이와 관련하여 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 기존 보고되었던 BSH 활성을 갖는 *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Blautia* 등의 미생물 속 (genera)의 양이 유의하게 감소하였으며 (Dong et al., 2015; Song et al., 2019), 또한 *Lactobacillus*의 양도 감소하는 경향을 보였다 (그림 23b). 또한, LKB1^{ΔIEC} 마우스의 장 내용물에서 BSH 활성이 유의하게 감소하였다 (그림 23c). 그러므로, LKB1^{ΔIEC}

마우스에서 BSH 생성 박테리아의 감소가 담즙산 대사를 변화시키고, 특히 FXR antagonist 로 작용하는 T- β MCA 의 축적을 이끌었을 것으로 생각된다.

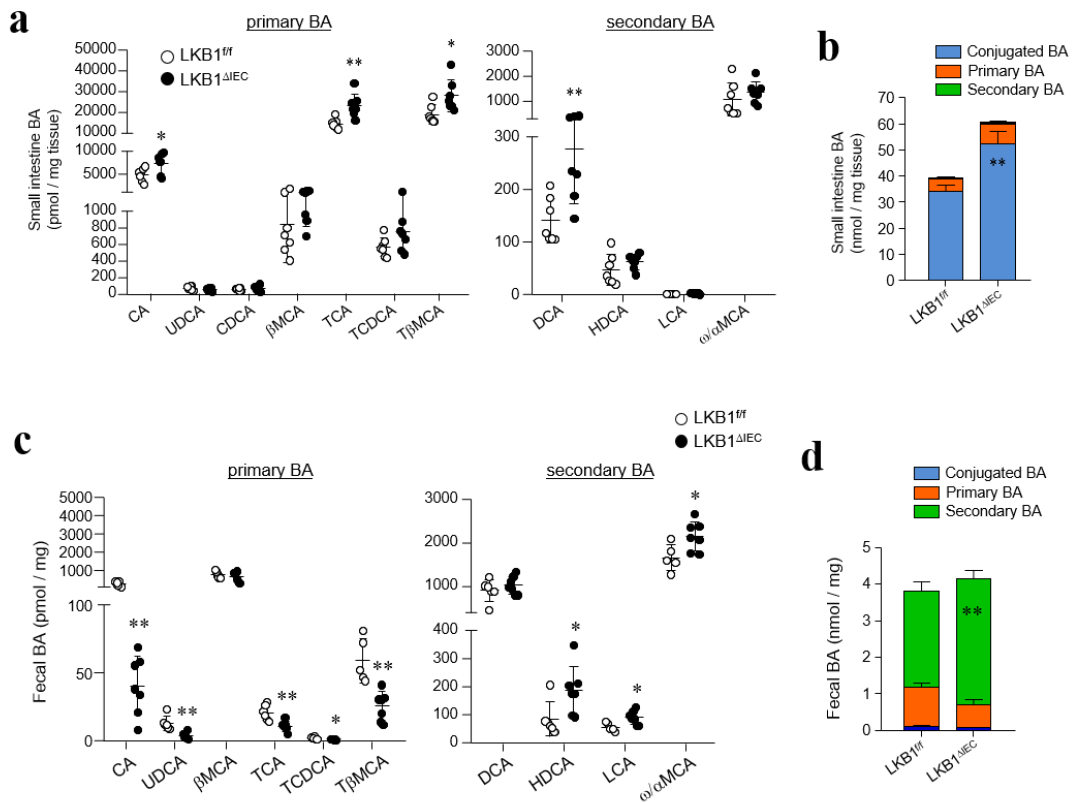


Figure 21. LKB1^{ΔIEC} mice exhibited altered SI and fecal BA composition. (a) BA profile of the SI and (b) the levels of conjugated, primary, and secondary BAs (n = 7 / group). (c) BA profile of the feces and (d) the levels of conjugated, primary, and secondary BA (n = 5–7 / group). Data are representative of two independent experiments. Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. *p < 0.05; **p < 0.01.

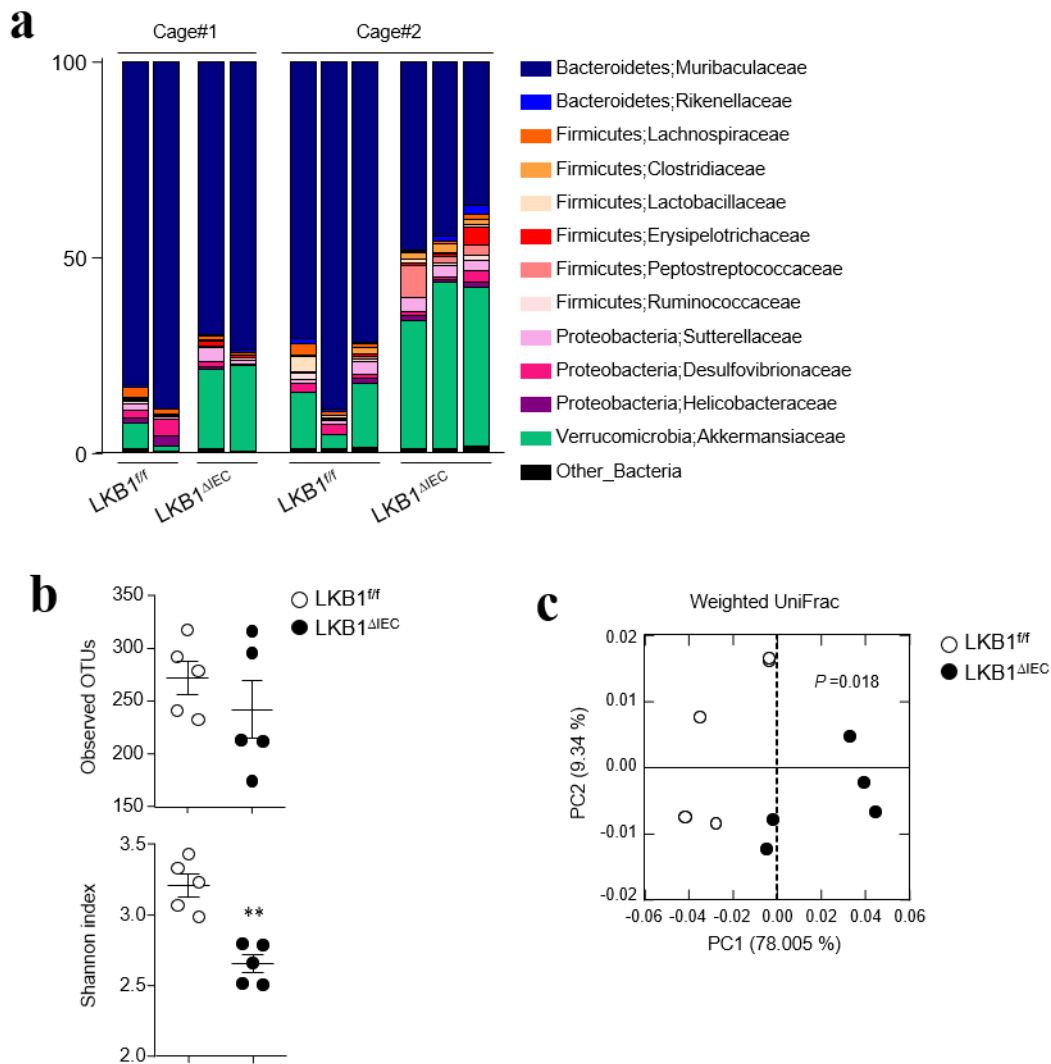


Figure 22. Microbiota composition in the SI of LKB1^{fl/fl} and LKB1^{ΔIEC} mice housed in two different cages. (a-c) 16S rDNA sequencing in the SI of LKB1^{fl/fl} and LKB1^{ΔIEC} mice housed in two different cages (n = 5 / group) was performed. (a) Relative abundance of OTUs at family levels. (b) Observed OTUs and the Shannon diversity index were determined. (c) PCoA of weighted UniFrac distances was conducted. Data are representative of two independent experiments and represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. *p < 0.05; **p < 0.01.

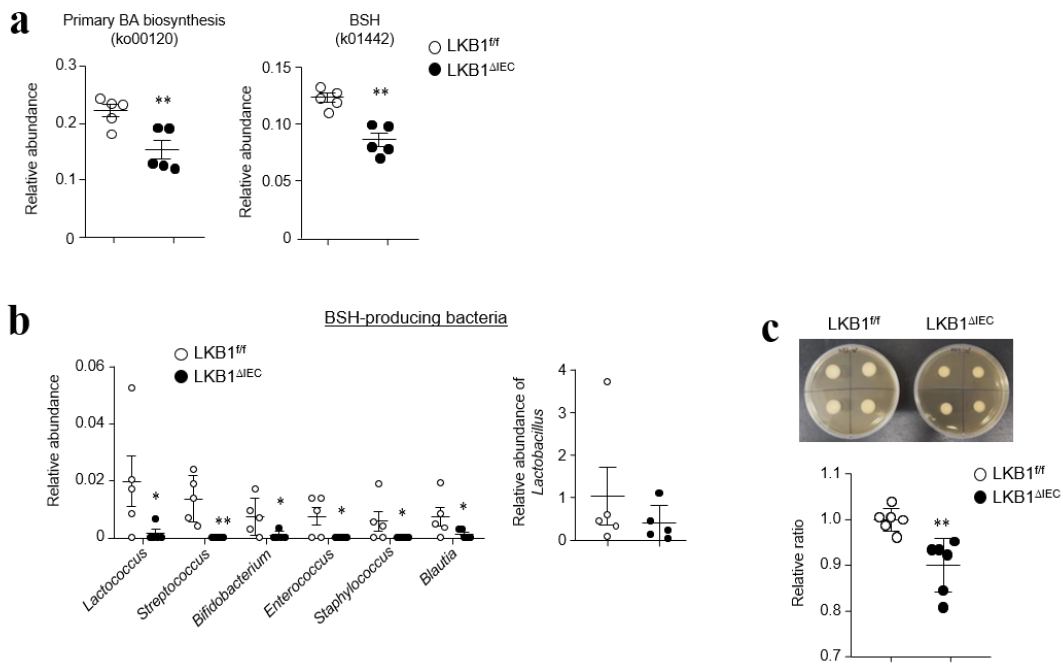


Figure 23. LKB1^{ΔIEC} mice had increased levels of conjugated BAs and reduced BSH-producing bacteria in the SI. (a-c) 16S rDNA sequencing in the SI of LKB1^{fl/fl} and LKB1^{ΔIEC} mice housed in two different cages (n = 5 / group) was performed. (a) Relative abundance of genes involved in primary BA biosynthesis (ko00120) and bile salt hydrolase (BSH; k01442) were estimated by Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt) prediction analysis. (b) Relative abundance of BSH-producing genera was calculated. (c) The BSH activity of SI content was examined using an agar plate assay. The size of white precipitate halos was measured (n = 6 / group). Data are representative of two independent experiments and represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. *p < 0.05; **p < 0.01.

6. 장 상피세포의 LKB1 결손은 레티놀 대사를 저해하며, 이는 FGF15/19 생성에 영향을 미친다.

레티노산은 FXR 과 이중 이합체를 형성하는 (He et al., 2013) 레티노이드 X 수용체 (retinoid X receptor, RXR)에 결합함으로써 FGF15/19의 발현을 조절한다 (Schmidt et al., 2010). KEGG 경로 enrichment 분석을 통해 LKB1^{f/f} 마우스와 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 소장에서 differentially expressed genes (DEGs)를 확인하였으며, 레티놀 대사에서 유의한 차이를 나타냈다 (그림 24). 또한, 레티놀을 레티노산으로 생합성하는 데 관여하는 유전자 (Adh1, Adh6a, Rdh7, Aldh1a1, and Aldh1a3)가 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 유의하게 감소되어 있었다 (그림 25a). 액체 크로마토그래피-질량분석기 (LC-MS/MS)로 소장과 간에서 레티놀과 레티노산의 양을 정량하였다. LKB1^{f/f} 마우스와 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 소장에서 레티놀과 atRA의 양에는 차이가 없었으며, 간에서 atRA의 양에는 차이가 없었으나, LKB1^{ΔIEC} 마우스의 간에서 레티놀의 양은 유의하게 증가되었다 (그림 25b). 이러한 결과는 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 레티놀 대사의 변화를 나타내는 증거를 제공한다. LKB1^{ΔIEC} 마우스의 공장(jejunum)과 회장에서 레티날을 레티노산으로 전환하는 데 중요한 역할을 하는 알데히드 탈수소효소 (Aldehyde dehydrogenases, ALDH)가 낮아져 있는 것을 확인하였다 (그림 26, 27) (Vasilou et al., 2000). 비타민 A를 투여하였을 때 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 회장 조직에서 9-cis retinoic acid (9cRA)가 유의적으로 감소되었으며 (그림 28a), 이는 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 회장에서 레티노산의 생합성이 감소되어 있음을 의미한다. 또한, 비타민 A를 투여하였을 때 LKB1^{f/f} 마우스에서 FGF15의 발현이 증가하였으나, LKB1^{ΔIEC} 마우스에서는 FGF15의 발현에 차이가 없었다 (그림 28b). 반면, LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 높게 발현되어 있던 간의 CYP7a1의 발현이 비타민 A를 투여함으로써 감소되었다(그림 28b). 이전에 연구에서 비타민 A를 투여하면 CYP7a1의 발현이 감소된다고 보고하였다(Schmidt et al., 2010). 따라서 비타민 A를 투여한 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 CYP7a1의 발현이 감소된 것은 장의 FXR-FGF15/19 신호 전달 경로의 활성화에 의한 것이 아니라, 추가적으로 투여한 비타민 A 매커니즘에 의한 것으로 추정된다. 또한 장 오가노이드를 사용하여 LKB1이 결손된 장 상피세포에서 레티놀과 레티노산이 FGF15의 발현을 자극하는 지 알아보았다.

LKB1^{f/f} 마우스 장 오가노이드 대비하여 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 장 오가노이드에서 레티노산의 생합성과 관련된 유전자의 발현이 낮아진 것을 확인하였다 (그림 29a). LKB1^{f/f} 마우스의 소장 오가노이드에 레티놀, 9cRA, atRA 를 처리하였을 때 FGF15 의 발현이 증가하였으나, LKB1^{ΔIEC} 마우스의 소장 오가노이드에서는 atRA 를 처리하였을 때에만 FGF15 의 발현이 증가하였다 (그림 29b). 이러한 결과는 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 레티놀을 레티노산으로 전환하는 과정의 장애가 FGF15/19 신호 전달을 방해하는 근본적인 매커니즘일 가능성을 제시한다.

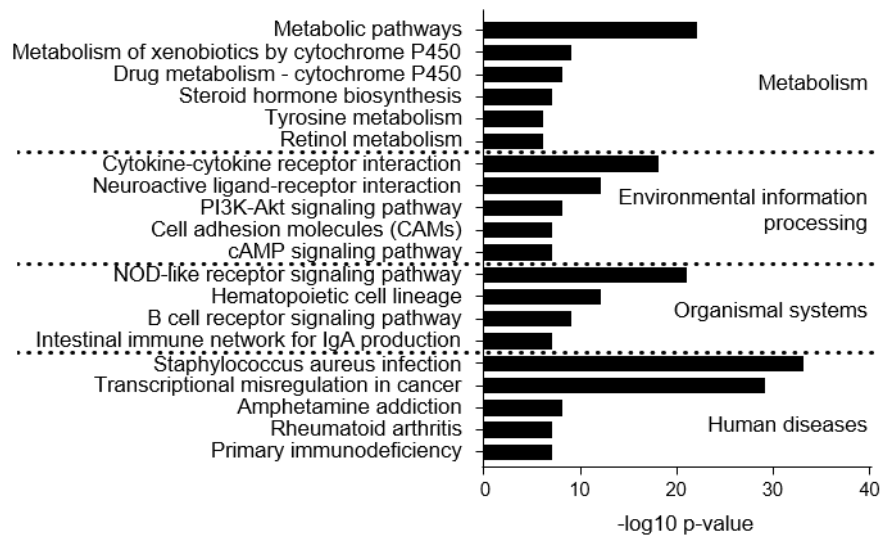


Figure 24. The top 20 most enriched KEGG pathways. The top 20 most enriched KEGG pathways of DEGs based on RNA-seq data of the SI ileum from LKB1^{f/f} and LKB1^{ΔIEC} mice (n = 3 / group).

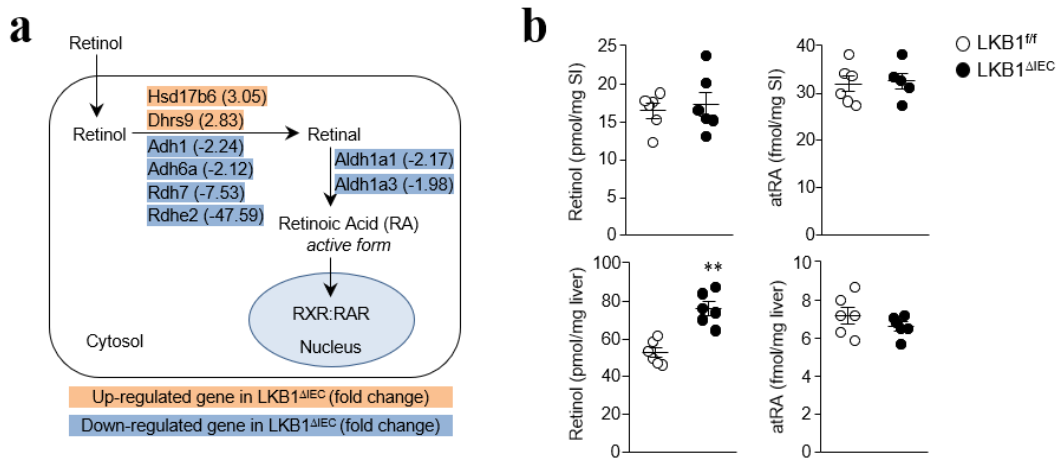


Figure 25. $LKB1^{\Delta IEC}$ mice showed impaired retinol conversion to retinoic acids in the SI.

(a) The partial scheme of retinol metabolism focuses on retinoic acid (RA) synthesis from retinol. DEGs along the pathway are shown in the boxes. Blue and red colors indicate downregulation and upregulation in the SI ileum from $LKB1^{\Delta IEC}$ mice compared with $LKB1^{fl/fl}$ mice, respectively. The numbers in brackets indicate fold change in RNA-seq ($n = 3 / \text{group}$).

(b) Quantification of retinol and all-trans retinoic acid (atRA) in the whole SI and liver of $LKB1^{fl/fl}$ and $LKB1^{\Delta IEC}$ mice was conducted using LC-MS/MS ($n = 6 / \text{group}$). Data are represented as mean \pm SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. $**p < 0.01$ compared with the control mice of the same treatment group.

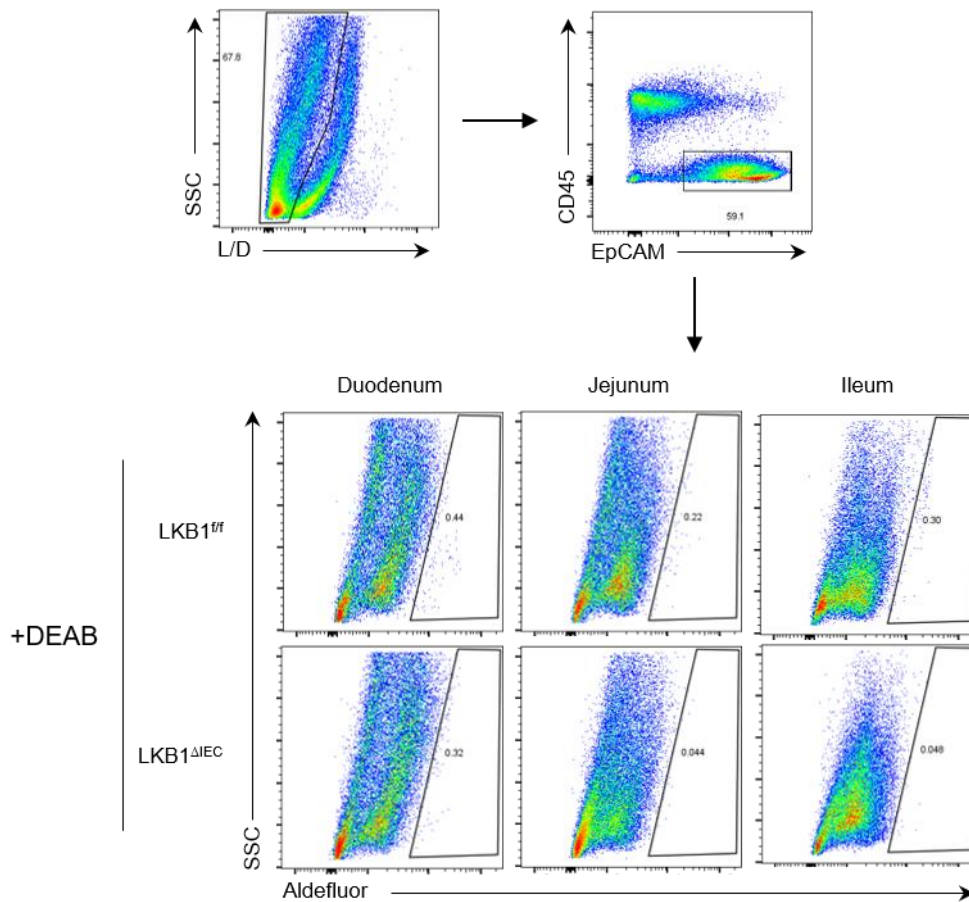


Figure 26. Gating strategy. Gating strategy and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in IECs from mice in the presence of the ALDH inhibitor DEAB (diethylaminobenzaldehyde).

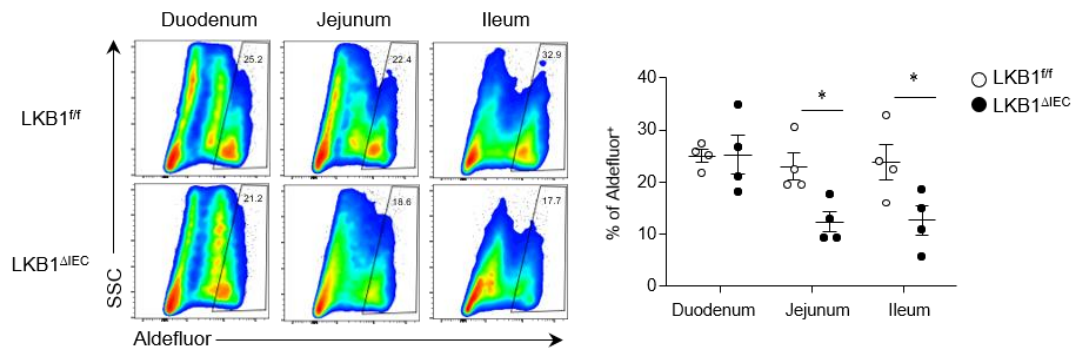


Figure 27. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity decreased in the jejunum and ileum of LKB1^{ΔIEC} mice. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in IECs was detected using the Aldefluor assay and measured by flow cytometry (n = 4 / group). Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. *p < 0.05; compared with the control mice of the same treatment group.

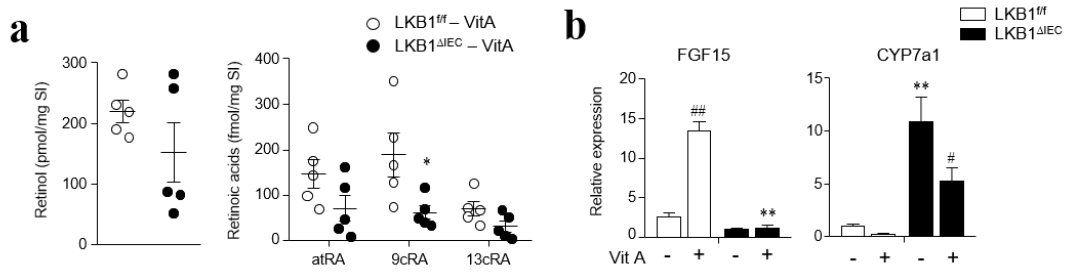


Figure 28. Quantification of Retinoid and change of FXR target gene expressions in LKB1^{ΔIEC} after Vitamin A administration. (a and b) LKB1^{fl/fl} and LKB1^{ΔIEC} mice were orally treated with vehicle or 100 mg/kg retinyl palmitate (Vit A) for 16 h. (a) Quantities of retinol and RAs, including atRA, 9-cis RA (9cRA), and 13-cis RA (13cRA), were measured in ileum tissues using LC-MS/MS (n = 5 / group). (b) Gene expression of FGF15 in the ileum and CYP7a1 in the liver was measured (n = 5–6 / group). Data are representative of two independent experiments. Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. *p < 0.05; **p < 0.01 compared with the control mice of the same treatment group. #p < 0.05; ##p < 0.01 compared with the vehicle of the same genotype.

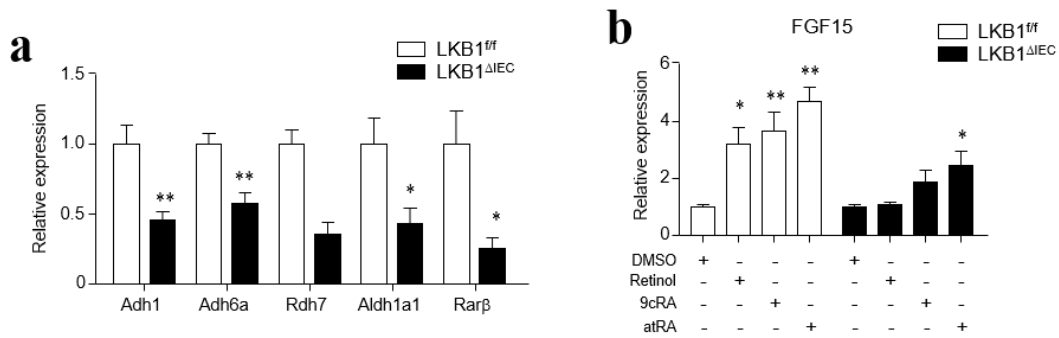


Figure 29. LKB1^{ΔIEC} mice expressed a lower level of genes related to RA biosynthesis. (a) mRNA expression levels of enzymes associated with retinol metabolism and Rarb, a gene positively regulated by RA, in the SI organoids were measured by qPCR (n = 5–6 / group). (b) SI organoids from LKB1^{fl/fl} and LKB1^{ΔIEC} mice were treated with DMSO, retinol, 9cRA, or atRA for 3 days. Fgf15 expression was measured by qPCR (n = 7 / group). Data are representative of two independent experiments. Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test and one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. *p < 0.05; **p < 0.01 compared with the control mice of the same treatment group

7. 고지방식이를 투여한 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 당내성이 개선되고, 에너지 소비가 증가하였다.

담즙산은 콜레스테롤로부터 합성되고 지질 흡수를 촉진시키기 때문에 (Stael and Fonseca, 2009), FXR, FGF15/19, CYP7a1의 변이는 혈중 지질을 바꾼다 (Li et al., 2011; Xu et al., 2016; Zhang et al., 2017). LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 순환하는 담즙산의 양이 증가했음에도 (그림 12), LKB1^{f/f} 마우스와 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 혈청 내 free fatty acids (FFA), triglyceride (TG), total cholesterol (TC)의 양과 대변의 FFA 양에는 차이가 없었다 (그림 30a,b). 올리브 오일을 투여한 후에도 혈청과 소장 TG 양에 차이가 없었으며 (그림 30c), 이는 식후 지방 흡수에는 LKB1이 관여하지 않음을 나타낸다. 이전 연구들은 장내 FXR 신호가 전신 대사에 관여할 수 있다고 보고하였는데 (Fang et al., 2015; Li et al., 2013), 이와 같은 사실을 확인하기 위해 장의 LKB1을 결손시켰을 때 숙주의 대사에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. LKB1^{f/f} 마우스와 LKB1^{ΔIEC} 마우스에 고지방식이를 투여하였을 때, 몸무게 변화와 식이 섭취량은 유사하였으나 (그림 31a,b), 고지방식이를 섭취한 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 소장의 담즙산 pool 과 총 담즙산 pool 이 증가하였다 (그림 32a). 또한 고지방식이를 섭취한 LKB1^{ΔIEC} 마우스는 LKB1^{f/f} 마우스와 대비하여 소장에서 FGF15의 발현이 감소하였고, 간에서 CYP7a1의 발현이 증가하였다 (그림 32b). 고지방식이를 섭취한 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 BSH 생성 박테리아가 감소하는 경향을 보였다 (그림 33). 고지방식이 LKB1^{ΔIEC} 마우스는 당내성 검사 (GTT)에서 LKB1^{f/f} 마우스보다 더 빠르게 체내 혈당을 조절하였으나, 인슐린 민감성 (ITT)은 유사하였다 (그림 34). 대사 분석을 통하여 명 주기 (light cycle)에는 고지방식이를 한 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 에너지, 산소 및 이산화탄소 소비량이 증가하였으며, 이는 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 휴식 대사량이 증가하였음을 보여준다. 하지만 암 주기 (dark cycle)에는 LKB1^{f/f} 마우스와 차이가 없는 것을 확인하였다 (그림 35a-c). 종합적으로, 장의 LKB1 결손은 고지방식으로 인해 유발된 당내성을 개선시키고 에너지 소비를 증가시킨다.

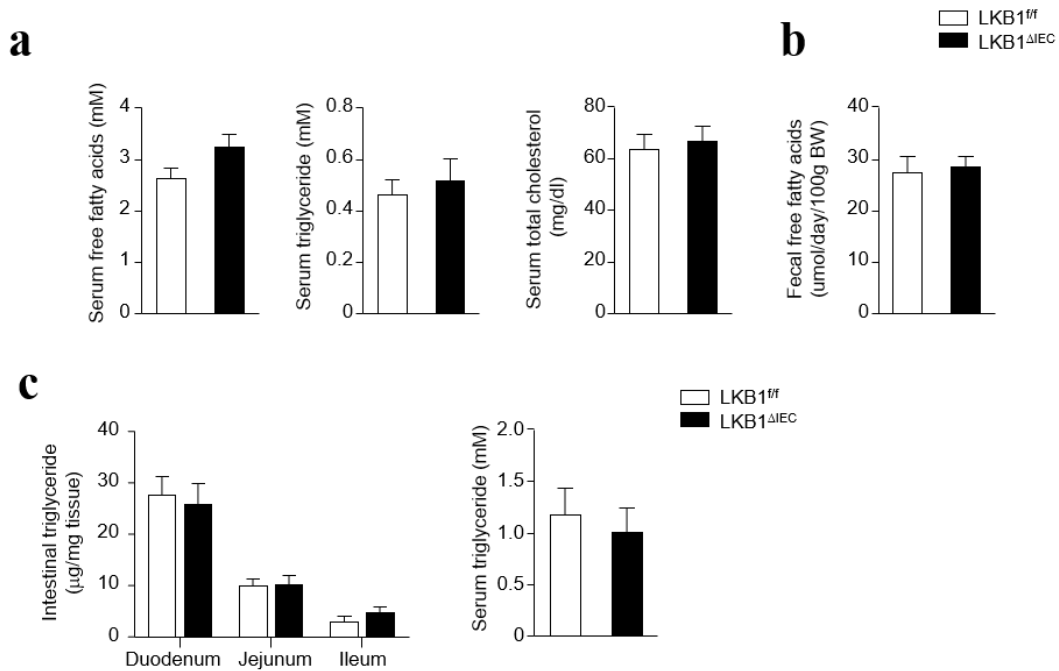


Figure 30. Lipid profiles were not affected by intestinal LKB1 deletion. (a) Serum levels of free fatty acids, triglyceride, and total cholesterol were assessed in 8 weeks of mice using colorimetric assay kits (n = 4–6 / group). (b) Levels of free fatty acids in feces were measured (n = 5 / group). (c) Triglyceride concentrations in the SI and serum were measured at 4 h after oral gavage of olive oil (10 μl / g of body weight) (n = 3 / group). Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test.

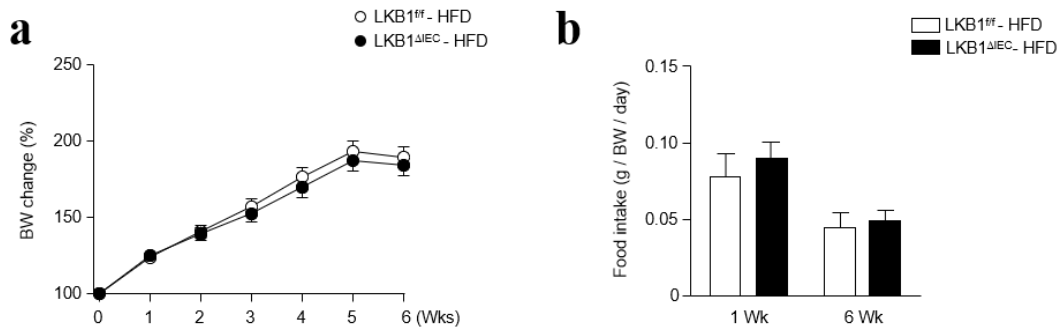


Figure 31. Comparison of body weight and food intake between LKB1^{fl/fl} and LKB1^{ΔIEC} which fed a high-fat diet. (a) Body weights of LKB1^{fl/fl} (n = 9) and LKB1^{ΔIEC} (n = 11) mice fed a high-fat diet (HFD) for 6 weeks. (b) Daily food intake for HFD-fed LKB1^{fl/fl} (n = 5) and LKB1^{ΔIEC} (n = 7) mice during Weeks 1 to 6. Data are representative of two independent experiments and represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test and two-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test.

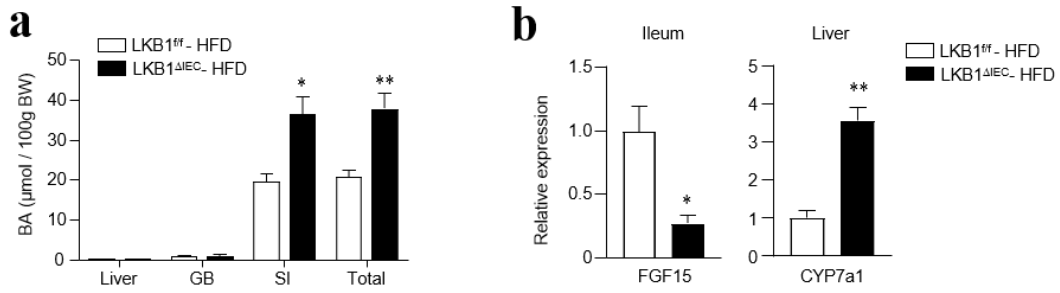


Figure 32. Bile acid pool size and FXR target gene expression were retained in LKB1^{ΔIEC} mice under high-fat diet conditions. (a) BA concentration in the liver, GB, SI, and total pool (liver + GB + SI) (n = 4 / group). (b) mRNA expression levels in the SI ileum (left) and liver (right) (n = 3–4 / group). Data are representative of two independent experiments and represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. *p < 0.05; **p < 0.01.

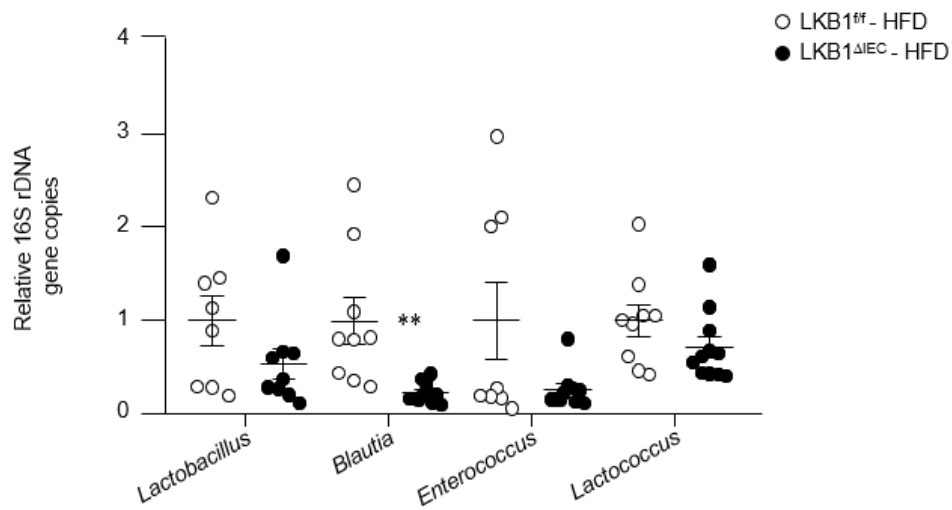


Figure 33. LKB1^{ΔIEC} mice on a high-fat diet reduced BSH-producing bacteria in the cecum. Quantification of BSH-producing bacteria 16s rDNA gene copies in the cecal contents by qPCR (n = 8–11 / group). Data are representative of two independent experiments and represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test. *p < 0.05; **p < 0.01.

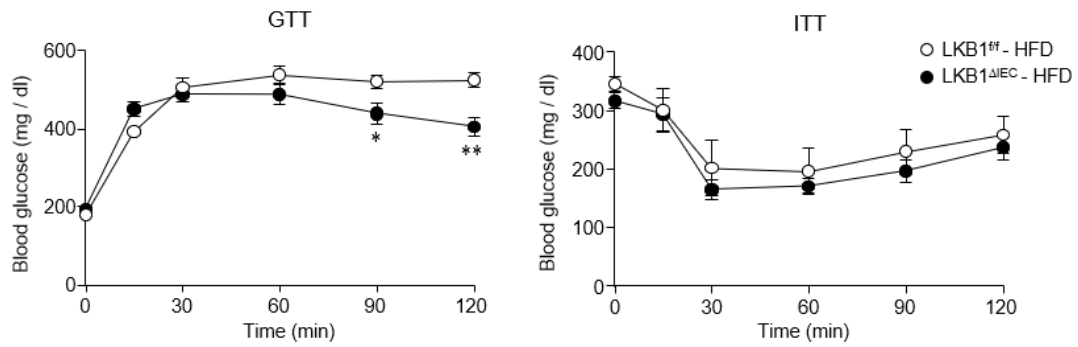


Figure 34. LKB1^{ΔIEC} mice on a high-fat diet exhibited improved glucose intolerance. Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed on mice fed an HFD for 6 and 8 weeks, respectively (n = 8 / group). Data are representative of two independent experiments and represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using two-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test. *p < 0.05; **p < 0.01.

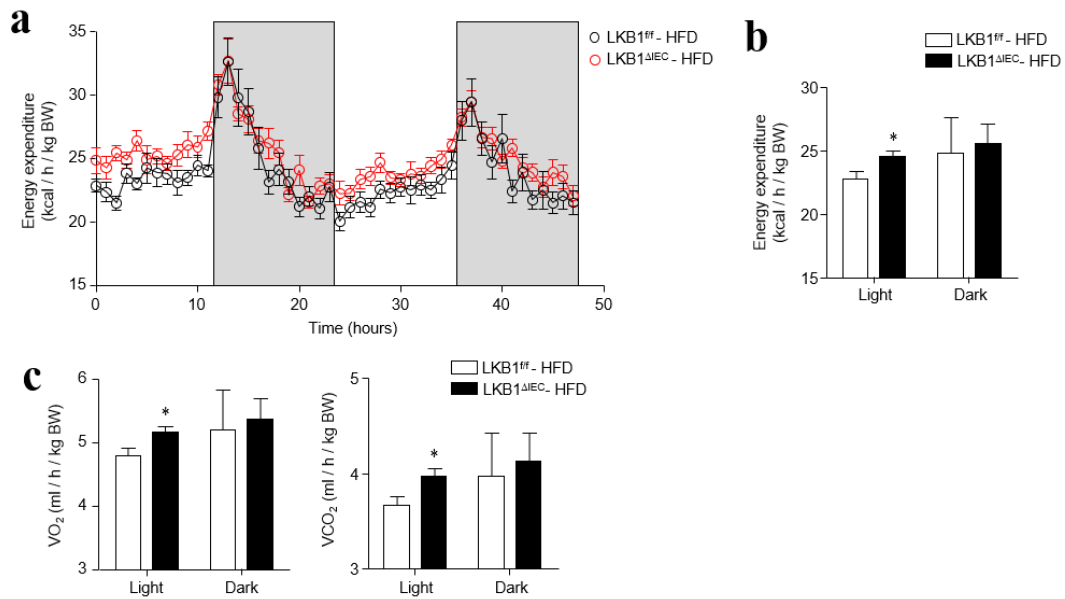


Figure 35. LKB1^{ΔIEC} mice on a high-fat diet exhibited improved increased energy expenditure. (a and b) Energy expenditure, and (c) O₂ consumption and CO₂ production rate were measured by the comprehensive laboratory animal monitoring system (CLAMS) after 7 weeks of HFD feeding. Bar graphs indicate the average value during the light and dark cycle (n = 7–8 / group). Data are representative of two independent experiments and represented as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using Student's t-test and two-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test. *p < 0.05.

고찰

본 연구에서 장 상피세포에서 LKB1 이 결손 되었을 때, FGF15/19 의 생성이 감소되었고 그 결과 간에서 CYP7a1 의 발현과 담즙산 pool 이 증가되었다. LKB1 의 결손은 FXR 과 관계없이 직접적으로 FGF15/19 의 분비를 감소시켰다. LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 FGF15/19 가 감소한 것은 BSH 생성 박테리아의 감소, T-βMCA 의 증가, 레티놀 대사 장애에 의해 나타난 것으로 생각된다. 이를 통하여, 장 상피세포의 LKB1 signaling 은 담즙산 대사를 통하여 숙주의 항상성을 유지하는데 필수적인 것으로 사료된다.

장 상피세포의 LKB1 은 분비 계열 세포의 분화와 성숙에 영향을 미친다. 최근 발표된 연구에서 LKB1 이 결손되면, pyruvate dehydrogenase kinase 4 가 증가되고 이는 분비 계열 세포 형성에 필수적인 Atoh1 의 발현을 증가시킨다고 보고되었다 (Gao et al., 2020). 본 연구에서 Atoh1 의 하위 유전자인 Gfi1 와 Spdef 의 발현이 증가하는 것을 확인하였는데, 이 유전자는 직접적으로 파네스 세포와 술잔세포 같은 분비계열의 세포로 분화하는 데 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Gregorieff et al., 2009; Shroyer et al., 2005). 장관 전층 (whole intestinal tract)에서 술잔세포의 과형성이 관찰되었고, 장 크립트의 파네스 세포에서는 세포의 크기 증가와 더불어 mucin 을 함유하는 형태학적 이상이 관찰되었다. 이전 연구에 따르면, 이러한 세포를 ‘intermediate’ 술잔, 파네스 세포라고 하였고 (Jackson et al., 2020; Shorning et al., 2009), Spdef 의 과발현은 직접적으로 술잔/파네스 세포의 전구 세포를 술잔 세포로 분화하게끔 유도하고 파네스 세포의 감소를 유발한다고 보고되었다 (Noah et al., 2010). 이를 통해 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서의 분비계열 세포의 비 정상적인 형태를 설명할 수 있다.

본 연구에서 우선적으로 LKB1^{ΔIEC} 마우스에서의 담즙산 대사에 초점을 맞추었는데, 이는 SIRT1 과 AMPK 가 각각 LKB1 의 상위, 하위 단계에 존재하며, 장애 존재하는 SIRT1 과 AMPK 가 담즙산의 항상성을 조절한다는 것이 기존에 보고되어있기 때문이다 (Kazgan et al., 2014; Lien et al., 2014). 장의 SIRT1 을 결손 시킨 마우스는 담즙산 합성과 CYP7a1 의 발현이 증가되어 있고, 담즙산

pool 크기는 변하지 않았으나 대변으로 배출되는 담즙산의 양은 증가되어 있다 (Kazgan et al., 2014). 저자들은 장에서 SIRT1 결손이 hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α) 신호 전달 경로를 손상시키고 FXR, Asbt 와 같은 하위 유전자의 발현을 감소시킨다고 보고하였다 (Kazgan et al., 2014). 본 연구를 통해 LKB1 결손이 이러한 유전자의 발현에는 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였으며, 이는 LKB1 이 HNF-1 α 신호 전달 경로에 영향을 미치지 않는 것을 의미한다. LKB1 $^{\Delta IEC}$ 마우스에서 담즙산 pool 이 증가하였지만, 대변으로 배출되는 담즙산의 양은 변하지 않았다. 이러한 결과는 GF 마우스에서 담즙산 pool 이 증가하였으나, 대변으로 배출되는 담즙산의 양이 감소하였다는 이전 연구 결과와 일치한다 (Sayin et al., 2013). 또한 마우스에 BSH 활성을 갖는 프로바이오틱스 (probiotics)를 투여하였을 때, 담즙산 배출량이 증가되었다고 보고되었다 (Degirolamo et al., 2014). 따라서, LKB1 $^{\Delta IEC}$ 마우스에서 대변으로 배출되는 담즙산 양의 변화 없이 소장에서 담즙산 pool 이 증가한 것은 회장 말단의 Asbt 에 의해 재흡수되는 결합 담즙산이 증가되었기 때문이라고 추정된다 (Chiang, 2013).

In vitro 실험에서 LKB1 의 발현을 억제하였을 때, FXR 에 비의존적으로 FGF15/19 의 단백질 발현이 유의적으로 감소되는 것을 확인하였다. 이전 연구에서 공초점 현미경을 이용한 면역 형광법과 면역 침강법 (co-immunoprecipitation)을 통해 Diet1 이 FGF15/19 단백질과 직접적으로 상호작용하는 것을 확인하였고, 이는 Diet1 이 FXR 과 관계없이 posttranslational modification 을 통해 단백질 수준에서 FGF15/19 의 양을 조절한다는 것을 증명하였다 (Vergnes et al., 2013). 그러므로, LKB1 또한 posttranslational modification 을 통해 FGF15/19 의 양을 조절할 수 있을 것으로 추정한다.

In vivo 에서 FXR 타겟 유전자가 크게 감소하였는데, 이는 간접적으로 FGF15/19 의 발현을 저해하는 다른 요소들이 있음을 시사한다. 이러한 결과는 LKB1 $^{\Delta IEC}$ 마우스 소장의 T- β MCA 가 증가하여 FXR 의 활성화를 억제한 것으로 추측된다. LKB1 $^{\Delta IEC}$ 마우스에서 BSH 생성 박테리아의 감소, 미생물의 다양성 (microbial diversity)과 군집 (community) 변화를 유발하였고, 이는 코하우징

하였음에도 개선되지 않았다. 이러한 특정 박테리아의 과증식과 변화된 조성은 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 특징적인 장내 환경 (defensin, mucin, bile acid)에 기인한 것으로 생각한다 (Menendez et al., 2010; Ridlon et al., 2014; Wu et al., 2018). 예를 들어, 높은 농도의 CA와 DCA는 막의 완전성 (membrane integrity)을 교란시킴으로 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*의 성장을 저해한다고 알려져 있다 (Kurdi et al., 2006). 따라서, LKB1^{ΔIEC} 마우스 소장에서 증가된 CA와 DCA가 이러한 박테리아의 abundance를 감소시켰을 것으로 생각된다.

장 상피세포의 LKB1의 결손은 불완전한 레티놀 대사를 유발하였으며, 또한 RXR을 통해서 FXR의 하위 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있다는 것을 확인하였다. LKB1^{ΔIEC} 마우스에 비타민 A를 처리하였을 때 9cRA와 FGF15가 감소된 것은 LKB1이 결손됨으로써, 비타민 A에서 생물학적 활성을 갖는 대사물질 (i.e., RA)로 합성되는 과정이 저해되었다는 것을 의미한다. 이처럼 LKB1이 레티놀 대사를 조절하는 역할을 한다는 것은 본 연구를 통해 처음 규명되었다. 이전 연구의 DEG 기반 전사체 분석 (transcriptome analysis)을 통해 LKB1 결손 유무에 따라 RXR 매개 신호 전달 경로 관련 유전자들이 유의적으로 변화되어 있는 것을 확인하였다 (Gan et al., 2010). 본 실험에서 레티노산에 의해 활성화되는 RXR 매개 경로에 대한 LKB1의 잠재적인 기능을 규명하였다.

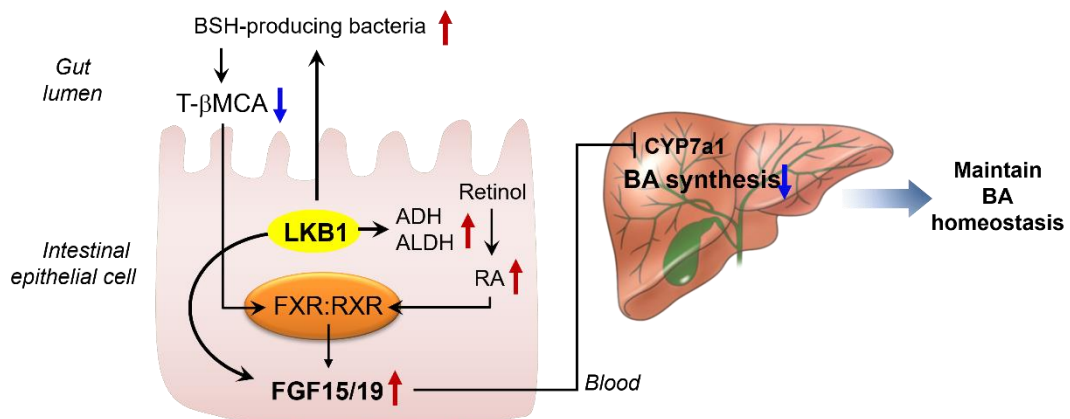
최근 연구에서, 고지방식을 투여한 AMPK^{ΔIEC} 마우스와 대조군 마우스의 당 내성, 에너지 소비를 비교하였을 때 차이가 없는 것을 확인하였다 (Olivier et al., 2021). 따라서, LKB1^{ΔIEC} 마우스에서 대사 개선이 나타난 것은 AMPK와 관련이 없을 것이라고 추측된다. 최근 논문에서 FXR signaling, 담즙산 pool 크기가 대사 변화 (metabolic change)에 영향을 줄 수 있다고 보고되었다. FXR agonist를 처리한 마우스는 고지방식으로 유도된 비만에 더 취약하며, 담즙산 pool 크기와 에너지 소비가 감소된 것을 확인하였다 (Watanabe et al., 2011). 반면, 마우스에 intestinal FXR inhibitor를 처리한 마우스와 CYP7a1을 과 발현시킨 transgenic 마우스에서는 담즙산 pool과 에너지 소비가 증가하였으며, 고지방식으로 유도한 비만에 저항성을 갖는 것을 확인하였다 (Jiang et al., 2015; Li et al., 2010). 따라서 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 대사 개선 효과는 담즙산

pool 의 증가에서 기인한 것으로 생각한다. 그러나 담즙산 pool 크기가 증가했음에도 불구하고 8 주간 고지방식이 먹었을 때, LKB1^{f/f} 마우스와 비교하여 체중에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 LKB1 이 에너지 대사를 조절하기 때문에 담즙산 이외에 다른 요인이 LKB1^{ΔIEC} 마우스의 비만을 유발하는데 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 장내 LKB1 이 FGF15/19 signaling 을 통해서 담즙산 합성과 항상성을 조절한다는 것을 규명하였다. 또한, LKB1 이 레티노산 대사를 조절하는 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다. LKB1, AMPK, SIRT1 은 대사 장애와 관련 있는 유전자이며, 이후 연구를 통해 담즙산 항상성을 유지하기 위한 상호작용에 대해 더 규명해야 할 것이다.

결론

본 연구를 통해 장내 LKB1 이 FGF15/19 signaling 을 통해서 담즙산 합성과 항상성을 조절한다는 것을 규명하였다. LKB1 결손이 FXR 에 비의존적으로 FGF15/19 의 분비를 직접 감소시켰다. BSH 생성 박테리아의 감소로 인하여 T- β MCA 의 증가된 것과 레티놀 대사 장애로 인한 FGF15/19 의 생성이 저해된 것을 확인하였다. LKB1, AMPK, SIRT1 은 대사 장애와 관련 있는 잠재성 높은 후보 유전자이기 때문에 이후 연구를 통해 담즙산 항상성을 유지하기 위한 기전 규명의 필요성이 높다고 할 수 있다.



(Image was created with BioRender.com)

Reference

- Bozadjieva, N., Heppner, K.M., and Seeley, R.J. (2018). Targeting FXR and FGF19 to treat metabolic diseases-lessons learned from bariatric surgery. *Diabetes* 67, 1720-1728.
- Cai, S.Y., He, H., Nguyen, T., Mennone, A., and Boyer, J.L. (2010). Retinoic acid represses CYP7a1 expression in human hepatocytes and HepG2 cells by FXR/RXR-dependent and independent mechanisms. *J Lipid Res* 51, 2265-2274.
- Cani, P.D., and Knauf, C. (2016). How gut microbes talk to organs: the role of endocrine and nervous routes. *Mol Metab* 5, 743-752.
- Chandra, R., and Liddle, R.A. (2007). Cholecystokinin. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14, 63-67.
- Chiang, J.Y. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 50, 1955-1966.
- Chiang, J.Y. (2013). Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol* 3, 1191-1212.
- Chiang, J.Y.L., and Ferrell, J.M. (2018). Bile acid metabolism in liver pathobiology. *Gene Expr* 18, 71-87.
- Degirolamo, C., Rainaldi, S., Bovenga, F., Murzilli, S., and Moschetta, A. (2014). Microbiota modification with probiotics induces hepatic bile acid synthesis via downregulation of the FXR-FGF15 axis in mice. *Cell Rep* 7, 12-18.
- Dong, Z., Zhang, J., Li, H., Du, G., Chen, J., and Lee, B. (2015). Codon and propeptide optimizations to improve the food-grade expression of bile salt hydrolase in *Lactococcus lactis*. *Protein Pept Lett* 22, 727-735.
- Duester, G. (2008). Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134, 921-931.
- Fang, S., Suh, J.M., Reilly, S.M., Yu, E., Osborn, O., Lackey, D., Yoshihara, E., Perino, A., Jacinto, S., Lukasheva, Y., *et al.* (2015). Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nat Med* 21, 159-165.
- Ferrebee, C.B., Li, J., Haywood, J., Pachura, K., Robinson, B.S., Hinrichs, B.H., Jones, R.M., Rao, A., and Dawson, P.A. (2018). Organic solute transporter alpha-beta protects ileal enterocytes from bile acid-induced injury. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 5, 499-522.

Gan, B., Hu, J., Jiang, S., Liu, Y., Sahin, E., Zhuang, L., Fletcher-Sananikone, E., Colla, S., Wang, Y.A., Chin, L., and Depinho, R.A. (2010). LKB1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature* *468*, 701-704.

Gao, Y., Yan, Y., Tripathi, S., Pentimikko, N., Amaral, A., Paivinen, P., Domenech-Moreno, E., Andersson, S., Wong, I.P.L., Clevers, H., *et al.* (2020). LKB1 represses ATOH1 via PDK4 and energy metabolism and regulates intestinal stem cell fate. *Gastroenterology* *158*, 1389-1401 e1310.

Gehart, H., van Es, J.H., Hamer, K., Beumer, J., Kretzschmar, K., Dekkers, J.F., Rios, A., and Clevers, H. (2019). Identification of enteroendocrine regulators by real-time single-cell differentiation mapping. *Cell* *176*, 1158-1173 e1116.

Gonzalez-Regueiro, J.A., Moreno-Castaneda, L., Uribe, M., and Chavez-Tapia, N.C. (2017). The role of bile acids in glucose metabolism and their relation with diabetes. *Ann Hepatol* *16*, S15-S20.

Gonzalez, F.J., Jiang, C., and Patterson, A.D. (2016). An intestinal microbiota-farnesoid X receptor axis modulates metabolic disease. *Gastroenterology* *151*, 845-859.

Goodwin, B., Jones, S.A., Price, R.R., Watson, M.A., McKee, D.D., Moore, L.B., Galardi, C., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Roth, M.E., *et al.* (2000). A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* *6*, 517-526.

Gregorieff, A., Stange, D.E., Kujala, P., Begthel, H., van den Born, M., Korving, J., Peters, P.J., and Clevers, H. (2009). The ets-domain transcription factor spdef promotes maturation of goblet and paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* *137*, 1333-1345 e1331-1333.

Gribble, F.M., and Reimann, F. (2019). Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nat Rev Endocrinol* *15*, 226-237.

Grizotte-Lake, M., Zhong, G., Duncan, K., Kirkwood, J., Iyer, N., Smolenski, I., Isoherranen, N., and Vaishnava, S. (2018). Commensals suppress intestinal epithelial cell retinoic acid synthesis to regulate interleukin-22 activity and prevent microbial dysbiosis. *Immunity* *49*, 1103-1115 e1106.

Haber, A.L., Biton, M., Rogel, N., Herbst, R.H., Shekhar, K., Smillie, C., Burgin, G., Delorey, T.M., Howitt, M.R., Katz, Y., *et al.* (2017). A single-cell survey of the small intestinal epithelium. *Nature* *551*, 333-339.

Han, C.Y. (2018). Update on FXR biology: promising therapeutic target? *Int J Mol Sci* *19*.

He, Y., Gong, L., Fang, Y., Zhan, Q., Liu, H.X., Lu, Y., Guo, G.L., Lehman-McKeeman, L., Fang, J., and Wan, Y.J. (2013). The role of retinoic acid in hepatic lipid homeostasis defined by genomic binding and transcriptome profiling. *BMC Genomics* *14*, 575.

Hegyí, P., Maleth, J., Walters, J.R., Hofmann, A.F., and Keely, S.J. (2018). Guts and gall: bile acids in regulation of intestinal epithelial function in health and disease. *Physiol Rev* *98*, 1983-2023.

Huang, Z., Liu, Y., Qi, G., Brand, D., and Zheng, S.G. (2018). Role of vitamin A in the immune system. *J Clin Med* *7*.

Hundt, M., Basit, H., and John, S. (2022). Physiology, bile secretion. In *StatPearls (Treasure Island (FL))*.

Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C.L., McDonald, J.G., Luo, G., Jones, S.A., Goodwin, B., Richardson, J.A., *et al.* (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* *2*, 217-225.

Jackson, D.N., Panopoulos, M., Neumann, W.L., Turner, K., Cantarel, B.L., Thompson-Snipes, L., Dassopoulos, T., Feagins, L.A., Souza, R.F., Mills, J.C., *et al.* (2020). Mitochondrial dysfunction during loss of prohibitin 1 triggers paneth cell defects and ileitis. *Gut* *69*, 1928-1938.

Jang, J.E., Park, H.S., Yoo, H.J., Baek, I.J., Yoon, J.E., Ko, M.S., Kim, A.R., Kim, H.S., Park, H.S., Lee, S.E., *et al.* (2017). Protective role of endogenous plasmalogens against hepatic steatosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* *66*, 416-431.

Jeppesen, J., Maarbjerg, S.J., Jordy, A.B., Fritzen, A.M., Pehmoller, C., Sylow, L., Serup, A.K., Jessen, N., Thorsen, K., Prats, C., *et al.* (2013). LKB1 regulates lipid oxidation during exercise independently of AMPK. *Diabetes* *62*, 1490-1499.

Jiang, C., Xie, C., Lv, Y., Li, J., Krausz, K.W., Shi, J., Brocker, C.N., Desai, D., Amin, S.G., Bisson, W.H., *et al.* (2015). Intestine-selective farnesoid X receptor inhibition improves obesity-related metabolic dysfunction. *Nat Commun* *6*, 10166.

Just, P.A., Charawi, S., Denis, R.G.P., Savall, M., Traore, M., Foretz, M., Bastu, S., Magassa, S., Senni, N., Sohler, P., *et al.* (2020). LKB1 suppresses amino acid-driven gluconeogenesis in the liver. *Nat Commun* *11*, 6127.

Kazgan, N., Metukuri, M.R., Purushotham, A., Lu, J., Rao, A., Lee, S., Pratt-Hyatt, M., Lickteig, A., Csanaky, I.L., Zhao, Y., *et al.* (2014). Intestine-specific deletion of SIRT1 in mice impairs DCoH2-HNF-1alpha-FXR signaling and alters systemic bile acid homeostasis. *Gastroenterology* *146*, 1006-1016.

Kim, I., Ahn, S.H., Inagaki, T., Choi, M., Ito, S., Guo, G.L., Kliewer, S.A., and Gonzalez, F.J. (2007). Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *J Lipid Res* *48*, 2664-2672.

Kim, Y., Hwang, S.W., Kim, S., Lee, Y.S., Kim, T.Y., Lee, S.H., Kim, S.J., Yoo, H.J., Kim, E.N., and Kweon, M.N. (2020). Dietary cellulose prevents gut inflammation by modulating lipid metabolism and gut microbiota. *Gut Microbes* *11*, 944-961.

Koh, H.J., Arnolds, D.E., Fujii, N., Tran, T.T., Rogers, M.J., Jessen, N., Li, Y., Liew, C.W., Ho, R.C., Hirshman, M.F., *et al.* (2006). Skeletal muscle-selective knockout of LKB1 increases insulin sensitivity, improves glucose homeostasis, and decreases TRB3. *Mol Cell Biol* *26*, 8217-8227.

Kong, S., Zhang, Y.H., and Zhang, W. (2018). Regulation of intestinal epithelial cells properties and functions by amino acids. *Biomed Res Int* *2018*, 2819154.

Kurdi, P., Kawanishi, K., Mizutani, K., and Yokota, A. (2006). Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria. *J Bacteriol* *188*, 1979-1986.

Lee, Y.S., Kim, T.Y., Kim, Y., Lee, S.H., Kim, S., Kang, S.W., Yang, J.Y., Baek, I.J., Sung, Y.H., Park, Y.Y., *et al.* (2018). Microbiota-derived lactate accelerates intestinal stem-cell-mediated epithelial development. *Cell Host Microbe* *24*, 833-846 e836.

Li, F., Jiang, C., Krausz, K.W., Li, Y., Albert, I., Hao, H., Fabre, K.M., Mitchell, J.B., Patterson, A.D., and Gonzalez, F.J. (2013). Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat Commun* *4*, 2384.

Li, T., and Chiang, J.Y. (2012). Bile acid signaling in liver metabolism and diseases. *J Lipids* *2012*, 754067.

Li, T., Matozel, M., Boehme, S., Kong, B., Nilsson, L.M., Guo, G., Ellis, E., and Chiang, J.Y. (2011). Overexpression of cholesterol 7 α -hydroxylase promotes hepatic bile acid synthesis and secretion and maintains cholesterol homeostasis. *Hepatology* 53, 996-1006.

Li, T., Owsley, E., Matozel, M., Hsu, P., Novak, C.M., and Chiang, J.Y. (2010). Transgenic expression of cholesterol 7 α -hydroxylase in the liver prevents high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Hepatology* 52, 678-690.

Lien, F., Berthier, A., Bouchaert, E., Gheeraert, C., Alexandre, J., Porez, G., Prawitt, J., Dehondt, H., Ploton, M., Colin, S., *et al.* (2014). Metformin interferes with bile acid homeostasis through AMPK-FXR crosstalk. *J Clin Invest* 124, 1037-1051.

Liu, X., Lu, J., Liu, Z., Zhao, J., Sun, H., Wu, N., Liu, H., Liu, W., Hu, Z., Meng, G., *et al.* (2018). Intestinal epithelial cell-derived LKB1 suppresses colitogenic microbiota. *J Immunol* 200, 1889-1900.

Magness, S.T., Puthoff, B.J., Crissey, M.A., Dunn, J., Henning, S.J., Houchen, C., Kaddis, J.S., Kuo, C.J., Li, L., Lynch, J., *et al.* (2013). A multicenter study to standardize reporting and analyses of fluorescence-activated cell-sorted murine intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305, G542-551.

McGlone, E.R., and Bloom, S.R. (2019). Bile acids and the metabolic syndrome. *Ann Clin Biochem* 56, 326-337.

Menendez, A., Ferreira, R.B., and Finlay, B.B. (2010). Defensins keep the peace too. *Nat Immunol* 11, 49-50.

Monte, M.J., Marin, J.J., Antelo, A., and Vazquez-Tato, J. (2009). Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 15, 804-816.

Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., *et al.* (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34, 267-273.

Noah, T.K., Kazanjian, A., Whitsett, J., and Shroyer, N.F. (2010). SAM pointed domain ETS factor (SPDEF) regulates terminal differentiation and maturation of intestinal goblet cells. *Exp Cell Res* 316, 452-465.

Olivier, S., Pochard, C., Diounou, H., Castillo, V., Divoux, J., Alcantara, J., Leclerc, J., Guilmeau, S., Huet, C., Charifi, W., *et al.* (2021). Deletion of intestinal epithelial AMP-activated protein kinase alters distal colon permeability but not glucose homeostasis. *Mol Metab* 47, 101183.

Pino-Lagos, K., Guo, Y., and Noelle, R.J. (2010). Retinoic acid: a key player in immunity. *Biofactors* 36, 430-436.

Ridlon, J.M., Kang, D.J., Hylemon, P.B., and Bajaj, J.S. (2014). Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* 30, 332-338.

Saeed, A., Hoekstra, M., Hoeke, M.O., Heegsma, J., and Faber, K.N. (2017). The interrelationship between bile acid and vitamin A homeostasis. *Bba-Mol Cell Biol L* 1862, 496-512.

Sayin, S.I., Wahlstrom, A., Felin, J., Jantti, S., Marschall, H.U., Bamberg, K., Angelin, B., Hyotylainen, T., Oresic, M., and Backhed, F. (2013). Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab* 17, 225-235.

Schmidt, D.R., Holmstrom, S.R., Fon Tacer, K., Bookout, A.L., Kliwer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2010). Regulation of bile acid synthesis by fat-soluble vitamins A and D. *J Biol Chem* 285, 14486-14494.

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., and Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 12, R60.

Shackelford, D.B., and Shaw, R.J. (2009). The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 9, 563-575.

Shan, T., Xiong, Y., Zhang, P., Li, Z., Jiang, Q., Bi, P., Yue, F., Yang, G., Wang, Y., Liu, X., and Kuang, S. (2016). LKB1 controls brown adipose tissue growth and thermogenesis by regulating the intracellular localization of CRTCL3. *Nat Commun* 7, 12205.

Shaw, R.J., Lamia, K.A., Vasquez, D., Koo, S.H., Bardeesy, N., Depinho, R.A., Montminy, M., and Cantley, L.C. (2005). The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310, 1642-1646.

Shorning, B.Y., Zabkiewicz, J., McCarthy, A., Pearson, H.B., Winton, D.J., Sansom, O.J., Ashworth, A., and Clarke, A.R. (2009). LKB1 deficiency alters goblet and paneth cell differentiation in the small intestine. *PLoS One* 4, e4264.

Shroyer, N.F., Wallis, D., Venken, K.J., Bellen, H.J., and Zoghbi, H.Y. (2005). Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev* 19, 2412-2417.

Song, Z., Cai, Y., Lao, X., Wang, X., Lin, X., Cui, Y., Kalavagunta, P.K., Liao, J., Jin, L., Shang, J., and Li, J. (2019). Taxonomic profiling and populational patterns of bacterial bile salt hydrolase (BSH) genes based on worldwide human gut microbiome. *Microbiome* 7, 9.

Staels, B., and Fonseca, V.A. (2009). Bile acids and metabolic regulation: mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration. *Diabetes Care* 32 Suppl 2, S237-245.

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., and Mesirov, J.P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15545-15550.

Sun, L., Xie, C., Wang, G., Wu, Y., Wu, Q., Wang, X., Liu, J., Deng, Y., Xia, J., Chen, B., *et al.* (2018). Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. *Nat Med* 24, 1919-1929.

Thomson, D.M., Brown, J.D., Fillmore, N., Condon, B.M., Kim, H.J., Barrow, J.R., and Winder, W.W. (2007). LKB1 and the regulation of malonyl-CoA and fatty acid oxidation in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E1572-1579.

Tomkin, G.H., and Owens, D. (2016). Obesity diabetes and the role of bile acids in metabolism. *J Transl Int Med* 4, 73-80.

van Waarde, W.M., Verkade, H.J., Wolters, H., Havinga, R., Baller, J., Bloks, V., Muller, M., Sauer, P.J., and Kuipers, F. (2002). Differential effects of streptozotocin-induced diabetes on expression of hepatic ABC-transporters in rats. *Gastroenterology* 122, 1842-1852.

Vasiliou, V., Pappa, A., and Petersen, D.R. (2000). Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem Biol Interact* 129, 1-19.

Vergnes, L., Lee, J.M., Chin, R.G., Auwerx, J., and Reue, K. (2013). Diet1 functions in the FGF15/19 enterohepatic signaling axis to modulate bile acid and lipid levels. *Cell Metab* 17, 916-928.

Wahlstrom, A., Sayin, S.I., Marschall, H.U., and Backhed, F. (2016). Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell Metab* 24, 41-50.

Watanabe, M., Horai, Y., Houten, S.M., Morimoto, K., Sugizaki, T., Arita, E., Mataki, C., Sato, H., Tanigawara, Y., Schoonjans, K., *et al.* (2011). Lowering bile acid pool size with a synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist induces obesity and diabetes through reduced energy expenditure. *J Biol Chem* 286, 26913-26920.

Watanabe, M., Houten, S.M., Mataki, C., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J.W., Ezaki, O., Kodama, T., *et al.* (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439, 484-489.

Wu, M., Wu, Y., Li, J., Bao, Y., Guo, Y., and Yang, W. (2018). The dynamic changes of gut microbiota in muc2 deficient mice. *Int J Mol Sci* 19.

Xu, Y., Li, F., Zalzal, M., Xu, J.S., Gonzalez, F.J., Adorini, L., Lee, Y.K., Yin, L.Y., and Zhang, Y.Q. (2016). Farnesoid X receptor activation increases reverse cholesterol transport by modulating bile acid composition and cholesterol absorption in mice. *Hepatology* 64, 1072-1085.

Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., and Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67, 1613-1617.

Zhang, F., Yuan, W., Wei, Y., Zhang, D., Duan, Y., Li, B., Wang, X., Xi, L., Zhou, Y., and Wu, X. (2019). The alterations of bile acids in rats with high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetes and their negative effects on glucose metabolism. *Life Sci* 229, 80-92.

Zhang, J., Gupte, J., Gong, Y., Weiszmann, J., Zhang, Y., Lee, K.J., Richards, W.G., and Li, Y. (2017). Chronic over-expression of fibroblast growth factor 21 increases bile acid biosynthesis by opposing FGF15/19 action. *EBioMedicine* 15, 173-183.

영문 요약

Liver kinase B1 (LKB1) is a master upstream protein kinase involved in nutrient sensing, and glucose and lipid metabolism in many tissues; however, its role in nutrient absorption in intestinal epithelial cells (IECs) remains unclear. We thus generated mice with IEC-specific deletion of LKB1 (LKB1^{ΔIEC}). LKB1 deletion resulted in abnormal differentiation of secretory cell lineages. Unexpectedly, bile acid (BA) pool size increased substantially in LKB1^{ΔIEC} mice. A significant reduction of the farnesoid X receptor (FXR) target genes including fibroblast growth factor 15/19 (FGF15/19), which is known to inhibit BA synthesis, was found in the small intestine (SI) ileum of these mice. We observed that LKB1 depletion reduced FGF15/19 in human IECs in vitro. Additionally, a lower abundance of bile salt hydrolase-producing bacteria and elevated levels of FXR antagonist (i.e., T-βMCA) were detected in the SI of LKB1^{ΔIEC} mice. Moreover, LKB1^{ΔIEC} mice showed impaired retinol conversion to retinoic acids (RA) in the SI ileum; therefore, vitamin A treatment failed to induce FGF15 production. Thus, LKB1^{ΔIEC} mice fed with high-fat diet showed improved glucose tolerance and increased energy expenditure. Overall, LKB1 in IECs manages BA homeostasis by controlling FGF15/19 production.