

Lovastatin이 human endothelial
nitric oxide synthase
유전자 표현에 미치는 영향

연세대학교 대학원
의 학 과
이 종 민

Lovastatin이 human endothelial
nitric oxide synthase
유전자 표현에 미치는 영향

지도 최 재 원 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2004년 6월 일

연세대학교 대학원
의 학 과
이 종 민

이종민의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004년 6월 일

감사의 글

미흡한 저를 기초 과학의 길로 인도하여 주시고 힘든 고비마다 저에게 힘과 지혜를 주신 나의 하나님께 먼저 감사를 드립니다. 본 논문이 세상에 나올 수 있도록 음과 양으로 모든 배려와 관심과 지원을 아끼지 않으신 최재원 교수님께 깊은 감사의 말씀을 드리며, 어려운 고비마다 조언을 아끼지 않으신 고창만 교수님, 제가 힘이 들때 따뜻한 위로의 말씀을 전해 주시던 박경선 교수님께도 감사드립니다. 많은 경험과 연륜으로 실험에 대한 조언을 아끼시지 않으시던 안성완 선생님께도 감사를 드리며, 약리학 교실의 분위기 메이커이며 제가 항상 용기와 웃음을 잃지 않도록 배려해 준 진호 형에게도 깊은 감사를 드립니다. 실험하는데 있어 불편함이 없도록 많은 지원을 해 주신 서상건 선생님과 정혜영 선생님께도 감사드립니다. 제가 전진하지 못하고 좌절할 때마다 항상 조언을 아끼지 않으신 4층의 조교 선생님들, 특히 손준형 선생님, 윤준호 선생님, 차승규 선생님께 감사 드리고 하나뿐인 동기 유진이 그리고 후배 미경이에게도 감사의 말을 전합니다.

제가 지금에 이르기까지 키워주시고 사랑을 베풀어주신 부모님께 감사드리고 사랑의 말씀을 전합니다. 사랑하는 누나와 저의 가장 소중한 은정과 이 작은 결실을 함께 나누고 싶습니다.

2004년 6월

저자 씀

차 례

그림차례	ii
국문요약	iii
제1장 서론	1
제2장 재료 및 방법	4
2.1. 세포 배양	4
2.2. RNA 분리와 cDNA 합성	4
2.3. Real time-polymerase chain reaction(PCR)	5
2.4. eNOS cDNA fragment subcloning	6
2.4.1. Construction of plasmid	6
2.4.2. Transformation	8
2.5. Transfection experiment	8
2.6. 사용 약물	8
2.7. 자료분석	9
제3장 결과	10
3.1. Lovastatin에 의한 eNOS mRNA 치의 변화	10
3.2. eNOS mRNA 치에 대한 sterol 및 isoprenoid들의 효과	13
3.3. eNOS mRNA의 반감기	13
3.4. Chimeric mRNA 치의 변화	16
제4장 고찰	19
제5장 결론	23
참고문헌	24
영문요약	29

표 차 례

표 1. Realtime PCR에 사용된 primer set	5
표 2. Chimeric DNA를 만드는데 사용된 primer set	7

그림 차 례

그림 1. Chimeric DNA의 구조	7
그림 2. Lovastatin 처치 후 배양시간에 따른 eNOS mRNA 치의 변화	11
그림 3. eNOS mRNA 치에 대한 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylben- zimidazole, cycloheximide, 25-hydroxy cholesterol, mevalonate 의 영향	12
그림 4. eNOS mRNA 치에 대한 여러 sterol 및 isoprenoid들의 영향	14
그림 5. eNOS mRNA 반감기	15
그림 6. Lovastatin이 chimeric mRNA들에 미치는 영향	17
그림 7. Geranylgeranyl pyrophosphate가 chimeric mRNA들의 발현에 미치는 영향	18

국 문 요 약

Lovastatin이 human endothelial nitric oxide synthase 유전자 표현에 미치는 영향

죽상경화증의 치료 및 예방에 널리 사용되는 statin계 약물은 세포내 cholesterol 생합성을 억제하여 혈중 LDL-cholesterol 합성을 감소시킨다. 과거에는 이들 약물의 작용이 단지 혈중 cholesterol을 낮추어서 나타나리라 생각되었으나, 최근들어 statin계 약물이 다양한 기전에 의해 죽상경화증을 예방함이 알려지고 있다. Statin계 약물은 nitric oxide의 유리를 증가시켜 혈관 내피세포의 기능을 회복시키며, 이는 endothelial nitric oxide synthase (eNOS)의 발현 증가와 밀접한 관련이 있다. eNOS 유전자 발현의 조절 기전에 대해서는 주로 전사단계에 대해 많은 연구가 이루어졌으며, 전사 후 단계에 의해서도 조절될 수 있음이 보고되고 있다. 본 연구에서는 lovastatin이 전사 후 단계에서 eNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 사람의 혈관내피세포에서 관찰하였다.

20 μ M의 lovastatin 처치 후 eNOS mRNA 치는 12시간에서 submaximal 치에 도달하였고 24시간 이후에는 plateau를 이루는 것을 알 수 있었다. 또한, 전사 억제제인 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole와 번역 억제제인 cycloheximide를 처리했을 경우 lovastatin에 의한 증가가 완전히 봉쇄됨을 알 수 있었다. Lovastatin의 작용은 25-hydroxycholesterol는 약 40%, cholesterol 생합성 과정의 중간 산물인 mevalonate는 약 50% 봉쇄하였다. Geraniol과 farnesyl pyrophosphate는 lovastatin 단독투여군보다 약 50%의 감소를, geranylgeranyl pyrophosphate는 mevalonate를 처리한 수준까지 감소하였다. 또한 eNOS mRNA 반감기는 25-hydroxycholesterol, mevalonate, geranylgeranyl pyrophosphate에 의해 감소하였다. eNOS cDNA를 4부분으로

나누어 pEGFP-C2 vector에 삽입하여 chimeric gene construct를 만든 후 transfection 실험을 시행하였다. 이중 3'-untranslated region을 포함한 pEGFP/heNOS_D 유전자 mRNA 치가 lovastatin에 의하여 유의미하게 증가하였고, geranylgeranyl pyrophosphate에 의하여 유의미하게 감소되었다.

위의 실험결과는 human eNOS 유전자 발현에 미치는 lovastatin 의 작용은 세포내 geranylgeranyl pyrophosphate의 결핍에 따른 mRNA 안정성 증가에 부분적으로 기인함을 제시하고 있다. 이 과정을 매개하는 *cis*-acting element는 eNOS mRNA의 3'-말단 부위에 있다고 생각된다.

핵심되는 말: eNOS, lovastatin, mRNA 안정성, 3'-UTR

Lovastatin이 human endothelial nitric oxide synthase 유전자 표현에 미치는 영향

<지도 최 재 원 교수>

연세대학교 대학원 의학과

이 종 민

제1장 서론

내피세포에서 유리되는 nitric oxide(NO)의 감소가 죽상경화증 병변 발생 과정의 주요 요인으로 제시되고 있다 (O'Driscoll 등, 1997). NO는 죽상경화증 병변의 발생을 억제시키며, 이 기전으로서 단핵구의 내피세포 표면 침착 억제, 혈소판 응집 억제, 혈관 평활근 세포의 증식 억제, 혈관 확장 등이 제시되고 있다. 또한 NO는 죽상경화증의 발생에 중요한 작용을 하는 oxidized low density lipoprotein (oxLDL)의 작용을 억제한다 (Cox 및 Cohen, 1996).

한편, 죽상경화증의 치료 및 예방에 널리 사용되는 statin계 약물은 cholesterol 생합성 과정의 속도 조절 효소인 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzymeA (HMG-CoA) reductase를 억제하여 세포내 cholesterol 생성을 억제한다. 이런 statin계 약물의 작용으로 낮아진 cholesterol 치는 low density lipoprotein (LDL) 수용체의 합성을 증가시키고 이에 의하여 LDL의 수용체 매개 세포내 이입이 증가되어 혈중 LDL-cholesterol이 감소된다 (Brown 등, 1997). 이러한 기전으로 인해 HMG-CoA reductase 억제제인 statin계 약물은 lipid-lowering drug로서 coronary heart disease 및 hypercholesterolemia의 치료에 사용되고 있다

(Gotto 등, 1999). 과거에는 이들 약물의 작용이 단지 혈중 cholesterol을 낮추어서 나타나리라 생각되었으나, 최근 들어 statin계 약물이 다양한 기전에 의해 죽상경화증을 예방함이 알려졌다. 예를 들면, Williams 등 (1998)은 *Cynomolgus* 원숭이에서 pravastatin이 혈중 cholesterol 치 변화가 없는 경우에도 동맥벽에 변화를 미침을 보고하였고, Treasure 등 (1995)은 statin계 약물들이 혈중 cholesterol 치가 낮아지기도 전에 혈관 내피세포의 기능을 회복시킴을 보고 하였다. 이러한 보고들은 statin계 약물들이 혈관내피세포의 기능에 직접적인 영향을 미칠 수 있음을 제시하고 있다.

Statin계 약물이 bovine endothelial cell에서 NO의 유리를 증가 시킨다는 것이 이미 여러 차례 보고된 바 있다. 이러한 NO의 증가는 endothelial nitric oxide synthase (eNOS)의 발현과 밀접한 관련이 있다. 그 예로 statin계 약물에 의한 NO의 생성증가가 eNOS의 발현량에 비례함이 혈관내피세포에서 보고 된 바 있으며 (Endres 등, 1998), NOS inhibitor인 L-nitro arginine methyl ester에 의해서 rosuvastatin에 의해 증가된 NO의 유리량이 다시 감소됨이 보고 된 바 있다 (Stalker 등, 2001). 이러한 보고들은 statin계 약물에 의한 NO의 생성 증가가 eNOS 단백질의 증가와 직접적으로 관련됨을 보여준다.

LDL cholesterol에 의하여 NO 생성이 변화될 수 있음이 보고된 바 있다 (Dobrucki 등, 2001). 사람의 배양된 혈관내피세포에서 낮은 농도의 oxLDL를 투여 했을 경우 eNOS mRNA 발현이 감소하며, 그 정도는 LDL cholesterol이 산화된 정도에 비례한다 (Liao, 1994). 또 산화되지 않은 LDL은 죽상경화증을 일으킬 수 있는 농도에서 eNOS mRNA를 LDL 양에 비례하여 감소시킴이 보고 된 바 있다 (Vidal 등, 1998).

eNOS 유전자 발현의 조절 기작에 대해서는 많은 연구가 이루어 졌으며, 이는 transcriptional level 뿐만 아니라, posttranscriptional level에 의해서도 조절될 수 있음이 알려져 있다. 특히 eNOS mRNA의 안정성이 각기 다른 다양한 자극과 요소들에 의해서 조절될 수 있다. 이런 요소들에는 tumor necrosis factor- α , bacterial lipopolysaccharide, thrombin, vascular endothelial growth factor, oxLDL, amphotericin B, albumin-derived glycosylation end product,

glucocorticoids, hypoxia, 그리고 세포의 분열 상태 등이 있다 (Li 등, 2002). mRNA의 안정성 조절 기전은 세포내 mRNA 치를 결정하는 중요한 과정이며, mRNA 내에는 세포내 단백질이 결합하여 mRNA의 안정성을 조절하는 특정한 염기서열들이 있을 것으로 여겨지고 있다. mRNA 내의 이러한 염기서열들은 주로 3'-untranslated region (3'-UTR) 내에 있으며, 최근 들어 eNOS mRNA에서도 3'-UTR에 이러한 염기서열이 존재함이 보고 된 바 있다(Miguel 등, 1999). Gonzalez-Fernandez 등 (2001)은 bovine aortic cell (BAEC)에서 tumor necrosis factor- α 에 의해 유도된 140 kDa의 세포내 단백질이 3'-UTR에 존재하는 특정 부위에 결합하고 이를 안정화시킴을 보고하였다. 또한 Searles 등 (1999)은 BAEC에서 51 kDa의 세포내 단백질이 eNOS mRNA의 특정 부위에 결합하여 이를 붕괴시킴을 보고하였다.

그 동안 본 실험실에서는 statin계 약물들의 약리작용을 분자 생물학적 수준에서 연구를 하였다. 이를 바탕으로 하여, 본 연구에서는 HMG-CoA reductase inhibitor인 lovastatin이 posttranscription level에서 eNOS의 유전자 발현에 미치는 영향을 사람의 혈관내피세포에서 관찰하고자 한다.

제2장 재료 및 방법

2.1. 세포 배양

EA.hy.926 세포는 60 °C에서 30분 동안 불활성화 시킨 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/ml)/streptomycin (100 µg/ml), 2 mM L-glutamine, 1×HAT(100 µM hypoxanthine, 0.4 µM aminopterin, 16 µM thymidine)이 포함된 high glucose (4500 mg/L)의 DMEM (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) 성장배지로 5% CO₂, 95% air, 37 °C 상태의 항온 항습기에서 배양하였다. 성장배지는 2~3일에 한번씩 갈아주고, 7일에 한번씩 계대 배양을 하였다. 필요에 따라서 EA.hy.926 세포를 5% delipidized FBS (DFBS)가 포함된 DMEM 배지에 25 µM Lovastatin을 넣고 배양하였다. DFBS은 Choi 및 Jung (1999)이 기술한대로 만들었다. Lovastatin은 중외제약에서 제공받았으며 Kita 등 (1980)이 기술한대로 준비했다.

2.2. RNA 분리와 cDNA 합성

이 실험에 사용된 RNA는 acid guanidine thiocyanate/phenol/chloroform extraction으로 분리하였고 DNase(Ambion, Austin, Tex, USA) 처리 후 실험에 사용하였다. RNA 500 ng, 25 mM MgCl₂ 용액 4 µl, 2.5 unit/µl reverse transcriptase (RTase) 1 µl, 2.5 µM oligo (dT)₁₆ primer 1 µl, 40 mM dNTP 2 µl, 10X PCR buffer 2 µl, 1 unit/ul RNAase inhibitor 1 µl를 총 부피 20 µl로 하여 42 °C에서 45분 동안 반응시킨 후 95 °C에서 5분 동안 reverse transcriptase을 불활성화시켜 cDNA를 합성하였다. 시약은 Applied Biosystems(Foster City, CA, USA)에서 구입하였다.

2.3. Real time-polymerase chain reaction(PCR)

RNA 6 ng에서 만들어진 cDNA와, SYBR-green PCR 2 × Master Mix (Applied Biosystems) 6 μl, forward primer (1 μM)와 reverse primer (1 μM) 각각 1.2 μl를 사용하여 총 부피 12 μl의 PCR 혼합액에서 Rota gene (Corbett research, Australia)를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR은 먼저 Hot Start Taq. polymerase를 95℃에서 10분간 활성화 시킨 후, denaturation step에서 94 °C 15 초, annealing step에서 60 °C 1분의 두 단계로 총 50cycle 동안 증폭하였다. Internal control은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였으며, cDNA를 10 배씩 serial dilution 하고 GAPDH mRNA 치를 측정하여 standard curve를 작성하였다. 결과는 comparative ΔCT method를 이용하여 분석하였다. Real time PCR에 사용된 primer 는 표 1과 같다.

Primer name	Sequence
GFP forward	5' ACA CCC TGG TGA ACC GCA T 3'
GFP reverse	5' CCA TGA TAT AGA CGT TGT GGC TGT T 3'
HMGR forward	5' TTC GGT GGC CTC TAG TGA GAT 3'
HMGR reverse	5' GGC CAT GCA TTC GAA AAA GT 3'
heNOS forward	5' CTC ATG GGC ACG GTG ATG 3'
heNOS reverse	5' ACC ACG TCA TAC TCC ATA CAC 3'
GAPDH forward	5' AAC AGC GAC ACC CAT CCT C 3'
GAPDH reverse	5' CAT ACC AGG AAA TGA GCT TGA CAA 3'

표 1. Realtime PCR에 사용된 primer set

2.4. heNOS cDNA fragment subcloning

사람의 eNOS (heNOS)의 전체 cDNA의 염기서열을 4부분으로 나누어 pEGFP/heNOS_A (28-686), pEGFP/heNOS_B (681-1712), pEGFP/heNOS_C (1693-2763), pEGFP/heNOS_D (1558-4077) 등 4개의 다른 부위를 포함하는 chimeric gene construct들을 만들었다. 각각이 포함하고 있는 heNOS의 cDNA 부위는 그림 1과 같다.

2.4.1. construction of plasmid

pEGFP/heNOS_A, pEGFP/heNOS_B, pEGFP/heNOS_C의 insert는 각각 heNOS의 cDNA를 주형으로 하여 각각에 해당하는 특정한 염기서열을 가진 primer를 이용해 PCR로 증폭하였다. 실험에 사용된 primer set는 표 2와 같다. 각각의 primer는 HindIII와 Xba I 제한효소의 절단부위를 포함하고 있다. 따라서 PCR을 통해 얻어진 insert를 HindIII와 Xba I 으로 처리한 후 pEGFP-C2/stop plasmid (Clontech, Palo Alto, CA, USA)의 HindIII와 Xba I 부위에 삽입하였다. pEGFP/heNOS_D는 heNOS cDNA를 BglII와 EcoR I 으로 자른 후 얻어지는 약 2.5 kb 의 fragment를 pEGFP-C2/stop의 BglII와 EcoR I 부위에 삽입하였다.

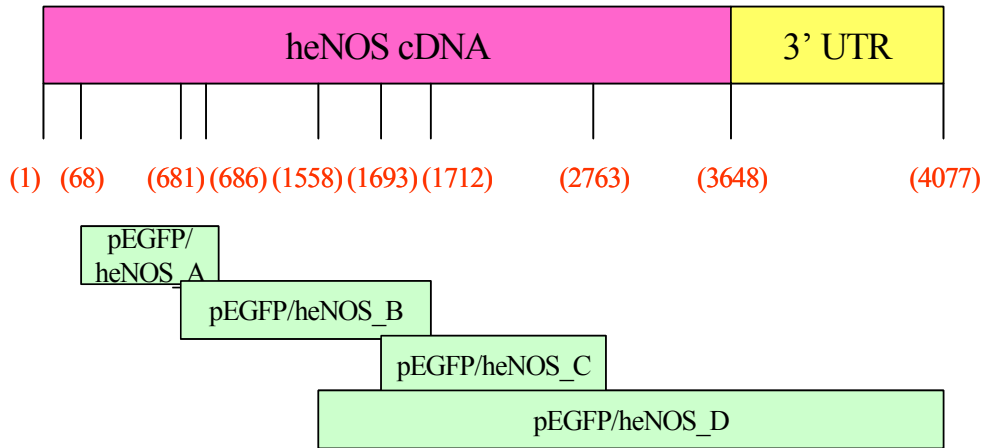


그림 1. Chimeric DNA의 구조

Primer name	Sequence (5' →3')
heNOS_A forward	TAG CAT GCA AGC TTA GAC GGA CGC ACA GTA ACA T
heNOS_A reverse	CGA TCG TAT CTA GAG GTT GCA GAT GTA GGT GAA C
heNOS_B forward	TAG CAT GCA AGC TTG CAA CCA CAT CAA GTA TGC C
heNOS_B reverse	CGA TCG TAT CTA GAA CTC ATC CAT ACA CAG GAC C
heNOS_C forward	TAG CAT GCA AGC TTG GTC CTG TGT ATG GAT GAG T
heNOS_C reverse	CGA TCG TAT CTA GAA ACC ACT TCC ACT CCT CGT A

표 2. Chimeric DNA를 만드는데 사용된 primer set

2.4.2. Transformation

Transformation은 calcium phosphate 법을 이용하여 competent cell을 만들어 수행하였다. Competent cell은 pEGFP-C2/stop의 Xba I 부위가 methylation 되어 있기 때문에 dam(-) strand인 GM2163 (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)을 사용하였다. 준비된 competent cell을 42°C에서 90초 동안 heat shock을 주어 transformation을 수행하였다. 10 mg/ml의 kanamycin이 포함된 LB/agarose 배지에서 키운 후 colony를 selection 하였다. transformation이 되었는지는 restriction enzyme digestion으로 확인하였다.

2.5 Transfection experiment

60 mm culture dish에 confluence가 약 90~95% 되었을 때 cell을 PBS로 닦은 후 serum free medium인 Opti-MEM (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)으로 갈아주었다. 준비된 각각의 chimeric DNA 1.5 µg과 3.75 µl의 Lipofectamine 2000 (Life Technologies)을 섞은 후 상온에서 20분간 반응케 하여 DNA-Liposome complex를 만들었다. 이를 직접 배지에 넣은 후 CO₂ incubator에서 4 시간 동안 반응시킨 후에 성장배지로 갈아주었다.

2.6. 사용 약물

Guanidium thiocyanate, penicillin/streptomycin, L-glutamine, DMEM, farnesol, geraniol, farnesyl pyrophosphate, trypsin-EDTA, fetal bovine serum, geranylpyrophosphate (GPP), geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB), 25-hydroxy cholesterol는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. GeneAmp RNA PCR kit 및 SYBR green PCR 2×Master Mix는 Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)에서 구입하였다. Opti-MEM 및

Lipofectamine 2000은 LifeTechnologies (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. DNase는 Ambion (Austin, Tex, USA)에서 구입하였다.

2.7. 자료 분석

모든 결과는 평균 \pm 표준오차 (S.E.M)로 표시하였다. 통계학적 분석은 Student's t-test, analysis of variance (ANOVA)를 이용하였고, p 값이 0.05이하 일 때를 유의한 차이가 있다고 간주하였다.

제3장 결 과

3.1. Lovastatin에 의한 eNOS mRNA 치의 변화

Lovastatin 처치 후 eNOS의 mRNA 치의 변화를 알아보기 위해서 human umbilical vein에서 기원한 혈관 내피 cell line인 EA.hy.926 cell에 20 μ M의 lovastatin을 처치한 후 real time PCR을 이용하여 lovastatin 처치 후 0, 6, 12, 24, 48 시간에서 각각의 eNOS mRNA 치를 측정하였다 (그림 2). 그 결과 lovastatin을 처치 후 12시간에서 submaximal 치에 도달하였고, 24 이후에는 plateau를 이루는 것을 알 수 있었다. Lovastatin 처치후 48시간 이후에는 internal control인 GAPDH의 mRNA 치가 감소되는 경향을 보였으며 이는 lovastatin에 의한 세포독성 때문으로 여겨진다. 이와 같은 heNOS mRNA 치의 증가가 transcriptional level에서 이루어지는 것인지 posttranscriptional에서 이루어지는 것인지를 알아보기 위해서 transcriptional inhibitor인 DRB와 translational inhibitor인 cycloheximide를 처리하여 보았다 (그림 3). 먼저 90 μ M의 DRB와 lovastatin을 같이 처치했을 경우 lovastatin을 단독으로 투여한 경우의 eNOS mRNA 치의 약 10% 였다. 또 10 μ g/ml의 cycloheximide를 처치한 경우에도 lovastatin 단독으로 투여한 경우의 eNOS mRNA 치의 약 10% 임을 알 수 있었다. eNOS mRNA의 변화가 lovastatin의 HMG-CoA reductase를 억제하는 효과와 관련 있는지를 알기 위해서 25-hydroxy cholesterol과 mevalonate를 투여 하였다 (그림 3). 0.5 μ g/ml의 25-hydroxy cholesterol 처치 시 eNOS mRNA 증가폭이 약 40%정도 감소하였다. 또 200 μ M의 mevalonate 처치 시에는 eNOS mRNA 증가폭이 약 50%정도 감소하는 것을 알 수 있었다.

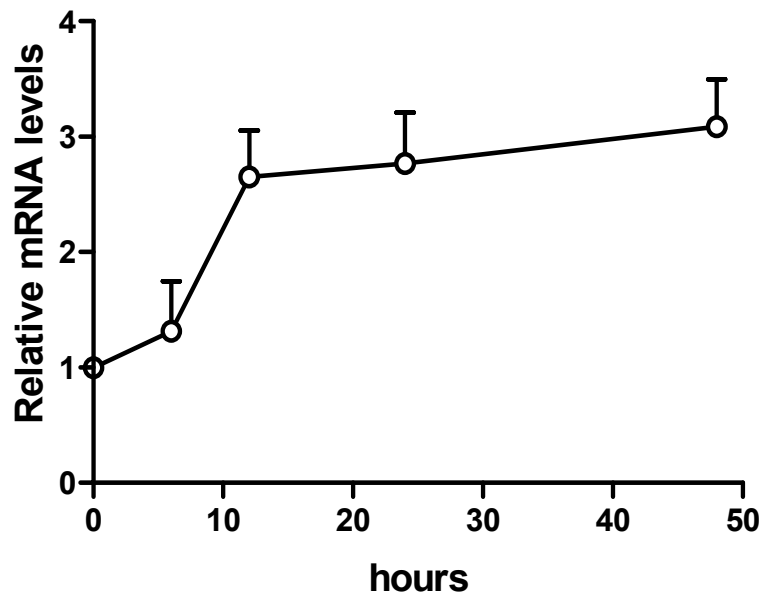


그림 2. Lovastatin 처치 후 배양시간에 따른 eNOS mRNA 치의 변화. EA.hy.926 세포에 25 μ M의 lovastatin을 처치한 후 0, 6, 12, 24, 48 시간에서 각각의 eNOS mRNA 치를 측정하였다. 값은 0 시간의 eNOS mRNA 치에 대한 비로 표시하였다. 실험 횟수는 3번이다.

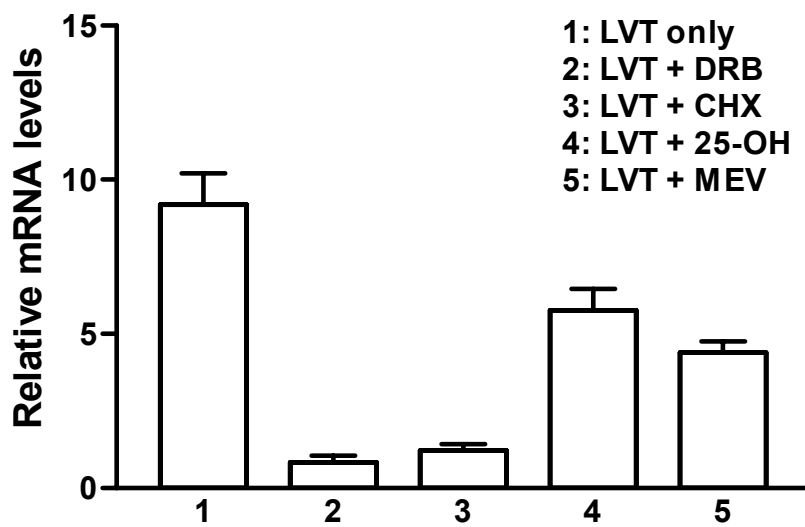


그림 3. eNOS mRNA 치에 대한 DRB, cycloheximide, 25-hydroxy cholesterol, mevalonate의 영향. Lovastatin과 각 실험군 별로 DRB (90 μ M), cycloheximide (10 μ g/ml), 25-hydroxy cholesterol (0.5 μ g/ml), mevalonate (200 μ M)를 각각 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. 값은 lovastatin을 처리하지 않았을 때의 eNOS mRNA 치에 대한 비로 표시하였다. 실험횟수는 3번이다.

3.2. eNOS mRNA 치에 대한 sterol 및 isoprenoid들의 효과

Lovastatin에 의해서 HMG-CoA reductase가 억제되어 mevalonate가 고갈되면 mevalonate에서 생성되는 isoprenoid들도 고갈되게 된다. Isoprenoid 존재 하에서 lovastatin이 eNOS mRNA 치에 미치는 영향을 살펴보았다. Geraniol, farnesol, GPP, FPP, GGPP 등을 각각 20 μ M의 농도로 lovastatin과 같이 투여하였을 때의 eNOS mRNA 치의 변화를 그림 4에 나타내었다. Farnesol과 GPP는 eNOS mRNA치를 lovastatin 단독으로 투여한 것과 비교하였을 때, 유의미한 변화를 보여주지 못했지만, geraniol과 FPP는 lovastatin 단독 투여군보다 약 50%의 감소를, GGPP는 25-hydroxy cholesterol과 mevalonate 처치한 수준으로까지 감소를 보여주었다(그림 4).

3.3. eNOS mRNA의 반감기

eNOS mRNA의 반감기를 lovastatin만 단독 투여한 군, 25-hydroxy cholesterol과 같이 투여한 군, mevalonate와 같이 투여한 군 그리고 GGPP와 같이 투여한 군으로 나누어 측정하였다 (그림 5). 새로이 전사되는 mRNA 생성을 막기 위해서 sterol 투여 2시간 전에 DRB 270 μ M을 처치하였다. eNOS mRNA 반감기는 세 군 모두 대조군에 비하여 감소하였다.

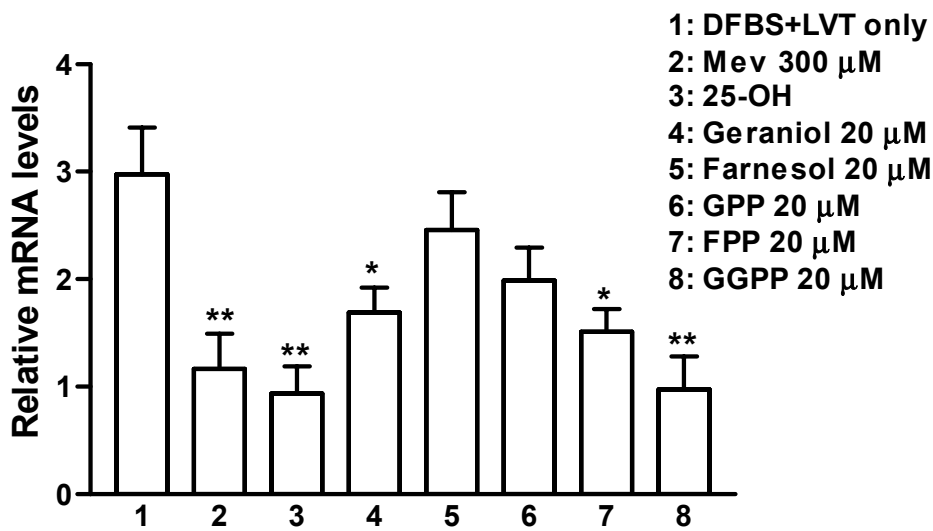


그림 4. eNOS mRNA 치에 대한 여러 sterol 및 isoprenoid들의 영향. Lovastatin (20 μ M)과 함께 각 실험군 별로 mevalonate, 25-OH cholesterol, geraniol, farnesol, GPP, FPP 및 GGPP를 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 값은 lovastatin을 처리하지 않았을 때의 eNOS mRNA 치에 대한 비로 표시하였다. 실험횟수는 3번이다.

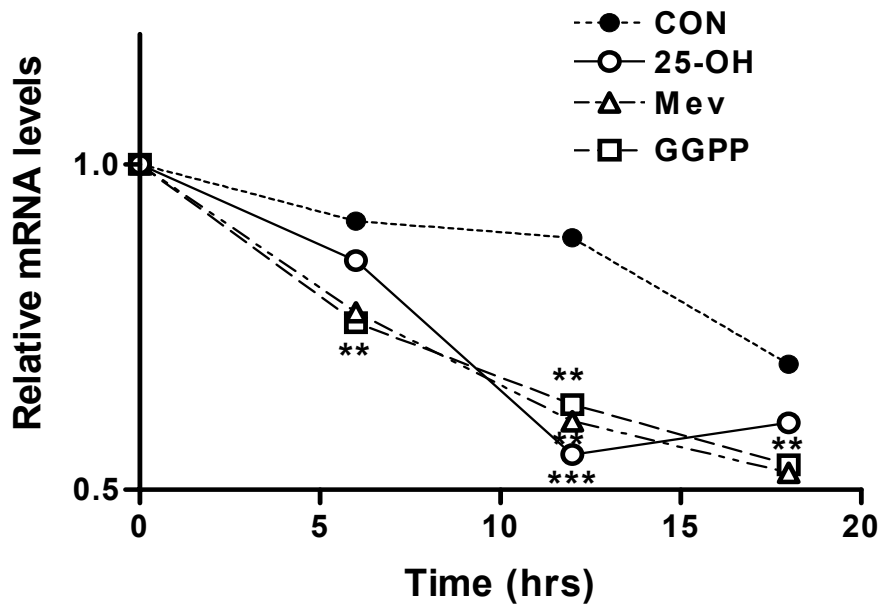


그림 5. eNOS mRNA 반감기. Lovastatin (20 μ M)과 DFBS를 처치한 다음 10시간 후 DRB를 2시간 전처치 하여 eNOS mRNA의 반감기를 측정하였다. 각 실험군 별로 0.5 μ g/ml 25-hydroxy cholesterol (○), 300 μ M mevalonate (Δ), 20 μ M GGPP (\square)를 같이 넣고 배양하여 0, 6, 12, 18 시간에 측정하였다. 값은 0 시간의 eNOS mRNA 치에 대한 비로 표시하였다. 실험 횟수는 3번이다.

3.4. Chimeric mRNA 치의 변화

각각의 mRNA 내에는 세포내 단백질이 결합하여 mRNA의 안정성을 조절하는 특정한 염기서열들이 있다. mRNA내의 이러한 염기서열들은 주로 3'-UTR내에 있다. 따라서 lovastatin에 의한 eNOS mRNA 안정성의 증가도 이러한 점과 연관시켜 생각해 볼 수 있다. eNOS mRNA의 안정성을 조절하는 부위를 찾기 위해서 eNOS cDNA의 전체 염기 서열을 4부분으로 나누어 chimeric DNA를 만든 후 EA.hy.926 세포에 transfection 하였다. 이후 lovastatin을 48 시간동안 처치한 후 GFP의 mRNA를 real time PCR로 측정했다. 그 결과 3'-UTR 부위를 포함하고 있는, pEGFP/heNOS_D (1558-4077)의 mRNA 치가 vector만 삽입시킨 대조군에 비해 유의미하게 증가됨을 확인 하였다(그림 6). 그리고 이러한 pEGFP/heNOS_D mRNA의 증가가 eNOS mRNA의 변화와 일치하는 것인지를 알기 위해 25-hydroxy cholesterol과 GGPP를 처치한 후 24시간에 GFP mRNA를 측정하였다. 그 결과 pEGFP/heNOS_A, pEGFP/heNOS_B, pEGFP/heNOS_C 에서는 유의미한 변화가 없었다. 그러나 pEGFP/heNOS_D에서는 lovastatin 처치후 나타나는 GFP mRNA 치의 증가가 GGPP에 의해 유의미하게 감소됨을 확인하였다(그림 7). 이것은 eNOS mRNA 치의 측정결과와 일치한다. 이상으로 미루어 생각해 볼 때, eNOS mRNA의 안정성 조절인자는 3'-UTR을 포함하는 pEGFP/heNOS_D부분에 있다고 생각됩니다.

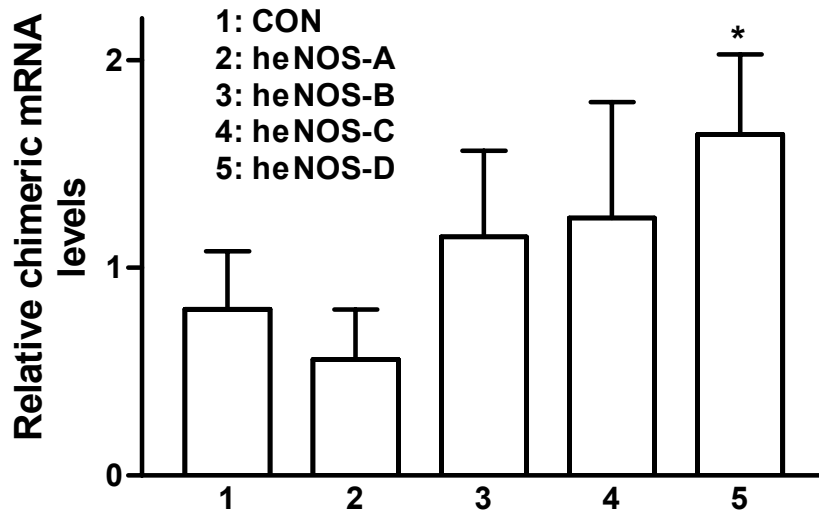


그림6. Lovastatin의 chimeric mRNA 들에 대한 영향. eNOS를 각각 4부분으로 나누어 lovastatin (20 μ M)을 48시간 처치 한 다음 GFP 치를 측정하였다. 낮은 lovastatin을 처치하지 않은 대조군의 eNOS mRNA 치에 대한 비로 표시하였다. 실험 횟수는 3번이다.

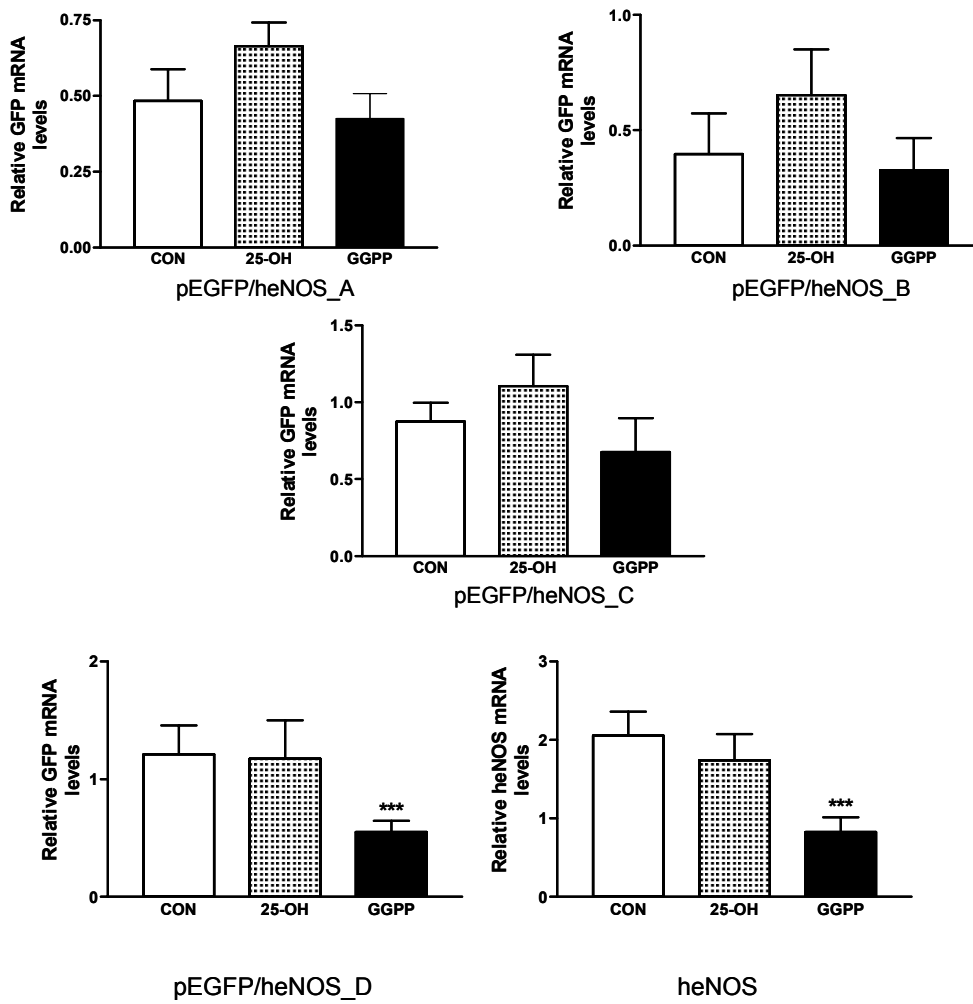


그림7. GGPP가 chmeric mRNA들의 발현에 미치는 영향. Lovastatin 처치 2시간 전에 270 μ M의 DRB를 전처치 한 다음 DFBS 및 lovastatin (20 μ M)과 각 실험군 별로 25-hydroxy cholesterol (0.5 μ g/ml)와 GGPP (20 μ M)를 처치하였을 때 GFP mRNA 치를 측정하였다. 값은 FBS 존재하에 배양한 대조군에 대한 비로 표시하였다. 실험 횟수는 3번이다.

제5장 고 찰

Statin 계 약물은 lipid-lowering 효과로 인해 고지혈증의 치료와 예방에 널리 사용되는 약물이다. 하지만 최근에 statin 계 약물이 cholesterol-lowering 효과와는 무관하게 약리작용이 나타남이 추가적으로 보고되었다(Williams 등, 1998, Treasure 등 1995). 이러한 효과는 statin 계 약물이 NO 생성에 영향을 미침으로써 나타날 것이라고 생각되어진다. 실제로 bovine aortic cell에서 lovastatin, atorvastatin, pravastatin, simvastatin 그리고 rosuvastatin등이 NO의 생성을 증가시키며 보고되었다 (Lauf 등, 1998). 혈관 내피세포에서 NO의 생성은 주로 eNOS에 의해서 조절된다. 이번 실험에서 우리는 사람의 혈관 내피세포에서 lovastatin을 투여 하였을 때 eNOS mRNA 치가 증가됨을 보여주었다. 우리의 실험은 지질을 제거한 serum을 사용하여 혈관 내피세포를 배양하였으므로 이러한 eNOS mRNA 치의 증가는 lovastatin의 lipid-lowering 효과와 무관하게 일어남을 알 수 있다.

HMG-CoA reductase는 HMG-CoA로부터 mevalonate를 합성한다. Lovastatin에 의한 eNOS mRNA 치의 증가가 mevalonate 첨가시 약 50%정도 감소하였다. lovastatin에 의한 eNOS mRNA 치의 증가는 lovastatin이 HMG-CoA reductase를 경쟁적으로 억제하여 일어나는 것이라 할 수 있다.

Mevalonate는 sterol과 nonsterol isoprenoid의 *de novo* synthesis에 있어서 중요한 역할을 하는 중간대사산물이다. 대다수의 mevalonate는 cholesterol로 전환되는데, cholesterol은 steroid hormon, bile acid, vitamin D 그리고 다양한 oxysterol 등의 전구물질이다. Mevalonate는 cholesterol의 전구물질일 뿐만 아니라 또한 nonsterol isoprenoid의 전구물질이기도 하다. Geraniol, farnesol, geraniol, GPP, FPP, GGPP 등이 여기에 속한다. 우리는 lovastatin에 의한 eNOS mRNA의 증가가 이러한 isoprenoid들과 연관이 있는지 알아보기 위해서 혈관내피세포에 lovastatin과 isoprenoid들을 같이 처리하여 보았다. 그 결과

eNOS mRNA의 증가에 영향을 미치는 것은 geraniol, FPP, GGPP 등임을 알게 되었다. 세포내 cholesterol 합성 과정 중 GGPP가 geraniol과 FPP보다는 하위 단계에서 생성되는 대사산물이다. GGPP는 Ras 그리고 Rho GTP 결합단백 등을 활성화 시키는데 필요한 membrane translocation을 일으킨다. Rho GTP 결합단백에는 Rho A, Rho B, Rac 그리고 Cdc42등이 있는데 이러한 단백질에서 geranylgeranylation에 의한 posttranslational modification이 발생한다. Rho 단백질은 GTP가 결합된 활성상태와 GDP가 결합된 불활성 상태로 크게 나뉜다. Rho는 세포질에 있다가 GGPP에 의해 geranylgeranylation이 일어나면 세포막쪽으로 translocation이 일어나 활성을 나타낸다. Rho는 actin cytoskeleton, 세포간 수송, gene transcription, mRNA 안정성 등에 영향을 준다 (Hall, 1998; Lauf 등, 2000). 따라서 Statin 계 약물들에 의한 eNOS mRNA 치의 증가는 statin 계 약물들에 의한 isoprenoid들의 감소 특히, GGPP의 감소로 인해 Rho와 같은 단백질의 isoprenylation이 억제되어 일어나는 것이라고 생각할 수 있다. 몇몇 보고들에 따르면, 세포질의 microfilament와 microtubule은 mRNA와 연결되어 mRNA가 세포질로 수송되고 특정 장소에 위치하게 되는데 필수적 역할을 한다고 한다 (Nasmyth 및 Jansen, 1997, Bassell 및 Singer, 1997). Rho와 같은 단백질은 mRNA에 결합되어 있는 cytoskeleton에 영향을 미침으로써 그것에 결합되어 있는 mRNA의 translation과 안정성에 영향을 미칠 수 있으리라 여겨진다 (Lauf 등, 2000). 따라서 Rho와 같은 단백질이 eNOS mRNA에 결합되어 있는 cytoskeleton에 영향을 미침으로써 eNOS mRNA의 translation과 안정성을 감소시킬것이라고 생각할 수 있다. 따라서 Statin계 약물에 의한 eNOS mRNA의 변화가 GGPP의 고갈로 인해 일어나는 것이라면 eNOS mRNA의 transcriptional rate을 조절하기 보다는 eNOS mRNA의 안정성을 조절하여 일어날 것이다. 전사 억제제인 DRB를 전처리 한 후 Mevalonate, 25-OH cholesterol, GGPP 등을 lovastatin과 같이 처리하여 eNOS mRNA의 반감기를 측정하였더니, 세균 모두 lovastatin 단독 처리군에 비하여 반감기가 짧은 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과들은 GGPP 고갈에 의하여 eNOS mRNA의 안정성이 증가 되었음을 입증할 수 있는 것으로 생각된다.

이후 eNOS mRNA에서 mRNA의 안정성에 영향을 주는 *cis*-element를 찾고자 했다. mRNA의 3'-UTR 부위는 세포내 단백질과 결합하여 mRNA의 안정성을 조절하는 역할을 한다고 알려져왔다 (Jackson 등, 1993). 또 최근들어 eNOS mRNA 내에도 3'-UTR에 세포내 단백질이 결합하여 mRNA의 안정성에 영향을 미치는 것이 여러차례 보고되었다 (Gonzalez-Fernandez 등, 2001; Searles 등, 1999). 또한 Miguel 등 (1999)은 혈관내피세포에서 TNF- α 에 의해서 세포내 단백질이 3'-UTR에 결합하여 eNOS mRNA의 안정성을 감소시키고 이러한 작용이 cycloheximide에 의해서 봉쇄되는 것을 보고하였다. 따라서 우리는 lovastatin에 의한 eNOS mRNA의 반감기 증가를 조절하는 *cis*-element의 존재 유무를 확인하기 위하여 eNOS cDNA를 4부분으로 나누어 pEGFP vector에 삽입한 후, lovastatin 처치 후 GFP/eNOS chimeric mRNA치의 변화를 측정하였다. 그 결과 3'-UTR을 포함하는 pEGFP/heNOS_D에서만 mRNA치가 증가함을 알 수 있었다. 이러한 증가가 eNOS mRNA 치의 변화와 일치하는 것인지를 확인하기 위하여 GGPP를 투여하여 보았더니, eNOS mRNA와 마찬가지로 pEGFP/heNOS_D에서도 lovastatin에 의한 mRNA치의 증가가 GGPP에 의하여 유의미하게 감소됨을 확인하였다. 이것은 mRNA의 안정성을 조절하는 mRNA-결합 단백질이 pEGFP/heNOS_D 부위에 결합하여 eNOS mRNA의 안정성을 조절함을 제시하고 있다. 또한, Rho와 같은 단백질은 이러한 mRNA-결합 단백질이 eNOS mRNA에 결합하는 것에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.

또 cycloheximide 처치시 lovastatin에 의한 eNOS mRNA치의 변화가 관찰되지 않는데, 이는 cycloheximide에 의하여 eNOS mRNA-결합 단백질이 생성되지 않아 일어나는 것이라고 생각할 수 있다.

요약하면, lovastatin에 의한 eNOS mRNA 증가는 lovastatin에 의해 GGPP가 고갈되어 일어남을 확인하였고, 그 방식은 eNOS mRNA의 안정성을 조절하여 일어나는 것임을 확인하였다. 그리고 이러한 mRNA의 안정성 증가는 eNOS mRNA의 3'-UTR 부위와 관련있음을 증명하였다. 앞으로의 실험에서 우리는 mRNA-결합 단백질이 3'-UTR내의 어느 특정한 부위에 결합하는지를 더욱 범위를 좁혀 알아 보고, 또한 이에 관련된 세포내 단백질을 동정하기 위하여 UV-cross linking assay

등을 수행할 예정이다.

제6장 결론

EA.hy.926 세포에서 lovastatin이 eNOS 유전자 표현에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. eNOS mRNA 치는 lovastatin 처치 후 12시간에 submaximal level에 도달한다.
2. Lovastatin에 의한 eNOS mRNA 치의 증가는 DRB 및 cycloheximide 에 의하여 봉쇄된다.
3. Lovastatin에 의한 eNOS mRNA 치의 증가는 25-hydroxycholesterol, mevalonate, geranylgeranyl pyrophosphate에 의하여 봉쇄된다.
4. eNOS mRNA 치의 반감기는 25-hydroxycholesterol, mevalonate, geranylgeranyl pyrophosphate에 의하여 감소된다.
5. eNOS mRNA의 3'-말단 부위에 있는 *cis*-acting element가 eNOS mRNA의 안정성에 관여한다.
6. *cis*-acting element에 의한 eNOS mRNA의 안정성 조절 과정은 세포내 geranylgeranyl pyrophosphate 치에 의해 조절된다.

Human endothelial nitric oxide synthase 유전자 발현에 미치는 lovastatin 의 작용은 세포내 geranylgeranyl pyrophosphate의 결핍에 따른 mRNA 안정성 증가에 부분적으로 기인한다. 이 과정을 매개하는 *cis*-acting element는 endothelial nitric oxide synthase mRNA의 3'-말단 부위에 있다고 생각된다

참 고 문 헌

Anderson T, Meredith I, Yeung A, Frei B, Selwyn A, Ganz P: The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N. Engl. J. Med.* 332:481-493, 1995

Bassell G, Singer RH: mRNA and cytoskeletal filaments: *Curr Opin Cell Biol.* 9(1):109-15,1997

Brown M, Goldstein J: The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of membrane-bound transcription factor. *Cell.*89:331-340, 1997

Choi J, Jung S: Lovastatin-induced proliferation inhibition and apoptosis in C6 glial cells. *JPET.* 289:572-579, 1999

Cox DA, Cohen ML: Effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular constriction and relaxation: clinical and pharmacological implications in atherosclerosis. *Pharmacol Rev.* 48:3-19, 1996

de Miguel LS, Alonso J, Gonzalez-Fernandez F, Osada J, Monton M, Rodriguez-Fdez JA, Guerra JI, Arriero MM, Rico L, Casado S, Lopez-Farre A: Evidence that an endothelial cytosolic protein binds to the 3'-untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: *J Vasc Res* 35:201-208, 1999

Dobrucki LW, Kalinowski L, Dobrucki IT, Malinski T: Statin-stimulated nitric oxide release from endothelium: *Med Sci Monit.* 7(4):622-7,2001

Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK: Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21:95(15):8880-5, 1998

Gonzalez-Fernandez F, Jimenez A, Lopez-Blaya A, Velasco S, Arriero MM, Celdran A, Rico L, Farre J, Casado S, Lopez-Farre A: Cerivastatin prevents tumor necrosis factor- α -induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase: role of endothelial cytosolic proteins: *Atherosclerosis* 155:61-70, 2001

Gotto AM, Grundy SM: Lowering LDL cholesterol: Questions from recent meta-analysis and subset analysis of clinical trial data issues from the interdisciplinary council on reducing the risk for coronary heart disease, ninth council meeting. *Circulation.* 99:E1-E7, 1999

Hall A: Rho GTPases and the actin cytoskeleton: *Science.* 23;279(5350):509-14, 1998

Jackson RJ: Cytoplasmic regulation of mRNA function: the importance of the 3'-untranslated region: *Cell* 74:9-14, 1993

Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK: Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *J. Biol. Chem.*

272:31725-31729, 1998

Laufs U, Liao JK: Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J. Biol. Chem.* 273(37):24266-24271, 1998

Laufs U, Liao JK: Targeting Rho in cardiovascular disease: *Circ. Res.* 87:526-528, 2000

Li H, Wallerath T, Forstermann U: Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 7:132-147, 2002

Liao JK: Inhibition of Gi proteins by low density lipoprotein attenuates bradykinin-stimulated release of endothelial-derived nitric oxide: *J Biol Chem.* 269(17):12987-92, 1994

Martin G, Duez H, Blanquart C, Berezowski V, Poulain P, Fruchart JC, Najib-fruchart J, Glineur C, Steals B: Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPAR α and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest.* 107:1423-1432, 2001

Nasmyth K, Jansen RP: The cytoskeleton in mRNA localization and cell differentiation: *Curr Opin Cell Biol.* 9(3):396-400, 1997

O'Driscoll G, Green D, Taylor R: Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1month. *Circulation.* 95:1126-1131, 1997

Searles CD, Miwa Y, Harrison DG, Ramasamy S: Posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase during cell growth: *Circ Res.* 1;85(7):588-95, 1999

Stalker TJ, Lefer AM, Scalia R: A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid: *Br J Pharmacol.*133(3):406-12, 2001

Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK: Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase: *J. Biol. Chem.* 273:24266-24271, 2002

Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, Zhang J, Boccuzzi SJ, Cedarholm JC, Alexander RW: Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease: *N Engl J Med.* 23;332(8):481-7, 1995

Vidal F, Colome C, Martinez-Gonzalez J, Badimon L: Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells: *Eur J Biochem.* 15;252(3):378-84, 1998

Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, Libby P: Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys: *J. Am. Coll. Cardiol.* 31:684-691, 1998

Yoshizumi M, Perella MA, Burnett JC, Lee ME: Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 270:319-324, 1993

Abstract

The effect of lovastatin on the expression of human endothelial nitric oxide synthase

Lee, Jong Min
Department of Medicine
The Graduate School
Yonsei University

Clinical benefits of cholesterol reduction have been established in large-scale primary and secondary intervention trials with HMG-CoA reductase inhibitors (statins). Although the beneficial effects of statins are primarily attributed to their lipid-lowering effects, it is suggested that there may be beneficial effects of these agents that are independent of serum cholesterol levels. Statins induce the release of nitric oxide (NO) and restoration of endothelial functions, which is closely related with the increase of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene expression. There are many reports concerning the regulatory mechanism of eNOS gene expression at both transcriptional and posttranscriptional levels. This study was aimed to investigate the effects of lovastatin on the expression of eNOS gene at the posttranscriptional level.

After treatment of 20 μ M lovastatin, eNOS mRNA levels reached submaximal levels at 12 hours and reached plateau at 24 hours. In the presence of 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole, a transcription inhibitor, or cycloheximide, a translation inhibitor, such effects of

lovastatin were blocked. Mevalonate or 25-hydroxycholesterol, metabolites of cholesterol biosynthetic pathway, blocked lovastatin's effects. Geraniol or farnesyl pyrophosphate partially blocked lovastatin's effect (50% of control, respectively). Geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) completely blocked the effects of lovastatin. Mevalonate, GGPP or 25-hydroxycholesterol decreased eNOS mRNA half-life significantly. We prepared the pEGFP vector containing a fragment of eNOS cDNA, and then we performed the transfection experiments. Treatment with lovastatin increased pEGFP/heNOS_D mRNA levels, which was completely blocked by GGPP treatment. pEGFP/heNOS_D contains the 3'-untranslated region of eNOS cDNA.

Based on these results, the effects of lovastatin on the expression of human eNOS are at least partially caused by the increased mRNA stability, which is attributed by the lack of cellular GGPP. Our data suggest that *cis*-acting elements mediating this process exist in the 3' end of the eNOS mRNA.

Key words: eNOS, lovastatin, mRNA stability, 3'-UTR
