

**특집 : 콜레스테롤과 현대인의 건강**

**콜레스테롤 대사와 관련 유전자의 발현조절**  
**Cholesterol Metabolism and Regulation of Related Genes**

박 용 복 (Yong Bok Park)

경북대학교 유전공학과

**혈장 지단백질 대사**

콜레스테롤은 세포막과 지단백질(lipoproteins)의 주요 구성성분이며, 담즙산과 스테로이드 호르몬 및 비타민 D<sub>3</sub>의 전구체 등으로서, 뇌 조직을 제외한 대부분의 조직에서 합성되며 간에서 가장 활발하게 일어난다. 외인성 및 내인성 콜레스테롤은 혈장 내에서 지단백질에 의해 말단조직 및 간으로 운반된다. 지단백질은 apolipoprotein, phospholipid(PL), free cholesterol(FC) 등의 친수성 외층과 triglyceride(TG), cholesteryl ester(CE) 등의 소수성 내층으로 구성된다. Lipoprotein은 밀도에 따라 chylomicrons, VLDL(very low-density lipoproteins), IDL(intermediate-density lipoproteins), LDL(low-density lipoproteins), 그리고 HDL(high-density lipoproteins)로 구분될 수 있으며 이들의 구성성분은 다르고(Table 1), 이러한 구성성분의 차이가 지질대사에 있어 각각의 특수한 기능을 수행하게 된다.

**Table 1. Chemical composition of normal human plasma lipoproteins**

	Surface components			Core lipids (%)	
	Chol	PL	Apo	TG	CE
Chylomicrons	2	7	2	86	3
VLDL	7	18	8	55	12
IDL	9	19	19	23	29
LDL	8	22	22	6	42
HDL	5	34	48	4	15

Chylomicron과 VLDL은 체내로 흡수되거나 체내에서 합성된 중성지방을 조직으로 운반하는 역할을 담당한다. 그리고 혈장내 VLDL로부터 전환된 입자인 LDL은 혈장 콜레스테롤을 말단조직으로 운반하며 말단조직에 있는 LDL 수용체는 LDL의 apolipoprotein B, E를 인식하여 세포내로 콜레스테롤을 들여보낸다(1). 말단조직에서 사용하고 남은 콜레스테롤은 FC 형태로 혈장에 배출되며 HDL이 이를 흡수하는데, HDL은 간에서 합성되어 nascent HDL 형태로 혈장에 배출되어 chylomicron과 VLDL로부터 PL, apo A-I, apo C를 획득하고 말단조직에서 배출된 FC를 흡수함으로써 mature HDL로 전환된다. 그 후 apo A-I에 의해 활성화되는 lecithin:cholesterol acetyltransferase에 의해 FC는 CE로 전환되어 HDL의 중심부로 이동한 후 간으로 운반된다(2).

Apolipoproteins는 지단백질의 외층에 분포하여 지단백질의 대사에 중요한 역할을 하며 각 지단백질에 따라 종류와 양에 차이를 보인다. 이들은 주로 지단백질 대사에 관여하는 효소의 활성화에 관여하며, 특히 apo B<sub>100</sub>, apo E는 LDL 수용체의 인식부위로서 조직내로 콜레스테롤을 보내는데 중요한 매개체로 작용한다(Table 2). 혈장 지단백질 대사는 몇가지 중요한 효소가 관여하게 되는데, lipoprotein lipase(LPL)은 VLDL과 chylomicron에 있는 TG를 가수분해하는 작용을 하며 활성 단백질(activator protein)로 apo C-II가 요구되어진다. Hepatic lipase(HPL)는 LDL 형성과정동안 VLDL과 LDL의 지방분해(lipolysis)와, HDL의 PL과 TG의 가수분해에도 관여한다(3). 이 효소의 활성화

**Table 2. Concentration and major function of plasma apolipoproteins in normal fasting humans**

	Plasma concentration	Distribution in lipoproteins (%)				Major function
	mg/dl	HDL	LDL	IDL	VLDL	
A-I	130~150	100				Activator of LCAT
A-II	30~40	100				Increase the lipid-binding apo A-I
B48	<1				100	Recognition site of LDL receptor
B100	80~100		88	6	6	Transport of chylomicron
C-I	6	97		1	2	Suppression of chylomicron remnant uptake
C-II	3	60		10	30	Activator of LPL
C-III	12	60	10	10	20	Suppression of chylomicron remnant uptake
E	3~7	50	10	20	20	Recognition site of LDL receptor

은 androgens에 의해 증가되며 estrogens에 의해 감소하는 특징을 가진다. Lecithin:cholesterol acyltransferase(LCAT)는 간에서 합성되어 혈액으로 분비되는데 혈장 콜레스테롤의 에스테르화(esterification)에 관여한다(4). HMG-CoA reductase는 HMG-CoA를 mevalonic acid로 변환시키는 반응을 촉매하며 반응의 마지막 산물인 콜레스테롤과 중간대사물인 26-OH-cholesterol에 의해 음성 되먹이기전(feedback inhibition)으로 조절됨으로써 콜레스테롤 항상성 기전을 제공한다.

혈중 콜레스테롤의 배출기작은 간에서 7 $\alpha$ -hydroxylase에 의해 담즙산으로 전환된 후 체외로 배출된다. 하지만 cholesteryl ester transfer protein(CETP)의 작용으로 간으로 전달되는 콜레스테롤의 일부를 다시 말단조직으로 되돌림으로써 원활한 콜레스테롤의 배출이 저해될 수 있다. CETP는 말단조직에서 효율적 콜레스테롤의 사용을 위해 잉여 콜레스테롤의 배출경로 즉 콜레스테롤 역수송 경로(reverse cholesterol transport)에서 HDL의 CE를 LDL로 옮겨 조직이 재사용할 수 있도록 하는 기능을 가진다(Fig. 1)(5). 간으로 운반된 혈장 콜레스테롤은 담즙산

생합성의 율속효소로 작용하는 7 $\alpha$ -hydroxylase에 의해 담즙산으로 전환되어 십이지장(duodenum)으로 배출된 후 일부는 콜레스테롤 흡수 기작에 사용되고 일부는 배설되기도 하나 대부분은 회장(ileum) 하부에서 재흡수되어 portal vein을 통해 간으로 돌아가는데 이를 장간 순환(enterohepatic circulation)이라고 한다.

## 콜레스테롤 대사이상 질환

### 동맥경화증과 산화 LDL

식생활 환경의 향상에 따른 과잉의 콜레스테롤 섭취는 세포의 요구를 충족시키고 남게된다. 여분의 콜레스테롤은 대부분 LDL 입자에 포함되어 혈장내에 존재하게 되고 혈장내의 LDL 수준의 증가는 혈관 내피세포에 단핵구의 접착력을 증가시키고 내피세포 하층으로 단핵구와 LDL의 이동을 촉진한다. 여기에서 LDL은 혈관 구성세포들인 내피세포, 평활근세포, 대식세포 등에 의해 산화되고, 혈관내막(intima)으로 이동한 단핵구는 산화 LDL(oxLDL)을

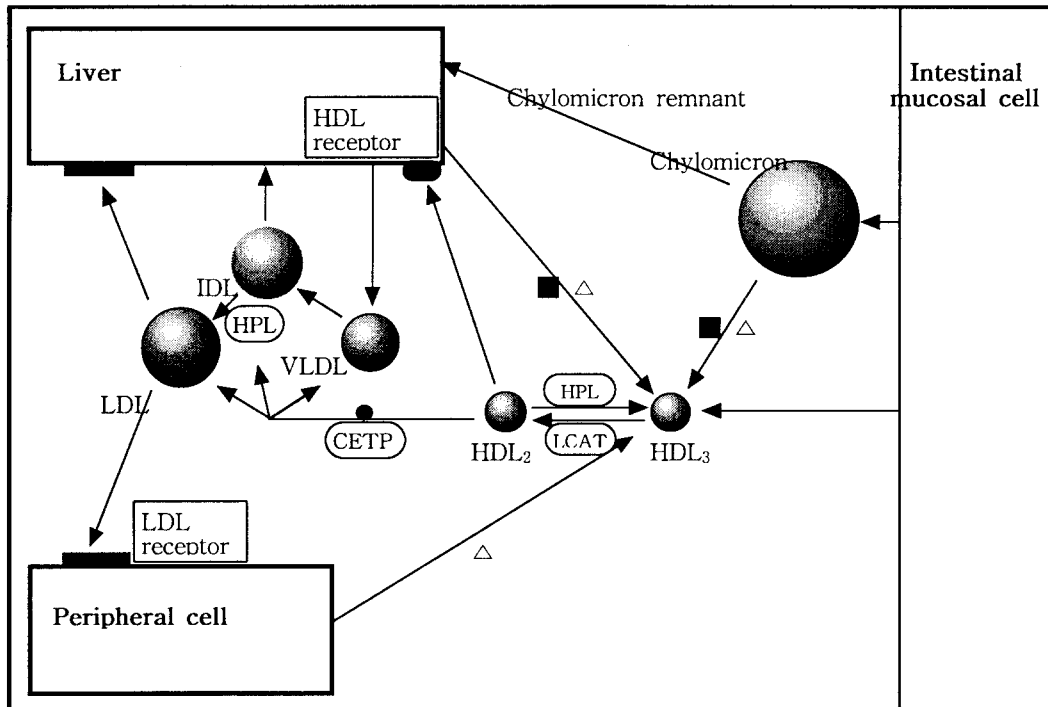


Fig. 1. Lipoproteins pathway in plasma.

Chylomicrons transport dietary lipids via lymph into plasma and then get degraded to remnant by extrahepatic lipoprotein lipase (LPL). Chylomicron remnants are then taken up by hepatic receptors which recognize the apo E on their surface. VLDL carry endogenously synthesized triglyceride from liver into plasma and degradation to IDL. They are further degraded to LDL which in turn undergoes catabolism via at least two major pathways by the LDL receptor. Nascent HDL particles initially form HDL<sub>3</sub> in plasma and converted to larger HDL<sub>2</sub> particles by the action of LCAT. The CETP transfer cholesteryl ester from HDL to LDL, IDL or VLDL. HPL, LCAT, and CETP to hepatic lipase, lecithin: cholesterol acyltransferase, and cholesteryl ester transfer protein, respectively. ■: phospholipids, △: free cholesterol, ●: cholesteryl ester.

흡수하여 다량의 콜레스테롤을 축적하게 됨으로써 포말 세포(foam cell)로 전환된다(6). Minimally-oxidized LDL (MM-LDL)은 단핵구의 혈관벽 접착과 침투를 증가시키며 내피세포의 monocyte chemotactic protein-1(MCP-1) 분비를 촉진시킨다(7). 또한 MM-LDL은 monocyte colony stimulating factor(M-CSF)의 분비를 촉진하여 단핵구를 조직내의 대식세포로 분화시키고 scavenger receptor A (SR-A)의 발현을 증가시킨다(8). 더욱 산화된 형태인 oxLDL은 단핵구에 대한 직접적인 chemotactic molecule로 작용하며 포말세포 형성에 관여하는 SR-A 등의 수용체에 대한 주된 ligand로 인식될 수 있다(Fig. 2). 이렇게 생성된 포말세포가 혈관내막에 축적되면서 내탄성막(internal elastic membrane)의 분열이 일어나고 평활근세포들이 증식하여 중막(media)에서 혈관내막으로 이동되기 시작함으로써 지방반(fatty streak)이 형성되어 동맥경화 병변이 시작된다(9). 이 후로 지방반은 혈관 협착으로 혈류를 방해하는 더욱 복잡한 동맥경화증을 유도하며 최종적으로는 이 병변이 심근경색증(myocardial infraction)을 야기하는 협심증으로 발전한다.

고지혈증(hyperlipidemia)의 유형과 약물치료

고지혈증은 크게 원발성과 속발성으로 나누어지며 원발성은 다시 고콜레스테롤혈증과 고트리글리세라이드혈증으로 분류된다. 원발성 고지혈증은 대부분이 콜레스테롤 대사에 관여하는 효소, 수용체 유전자의 결핍이나 돌연변이로 인해 발생하는 질환들이며 이들 유전자의 특성과 변이에 대해서는 본문 뒷편에서 다루도록 하겠다. 속발성 고지혈증은 여러 가지 질병, 호르몬 장애 등에 의해 발생되며 환경적, 체질적 영향에 대해 유전적 감수성이 높은 사람들에서 뚜렷한 경향을 나타낸다. 경구 피임약의 복용이 혈장 콜레스테롤과 TG 수치를 높일 수 있으며, 갑상선 기능의 저하로 고지혈증이 유발될 수 있다. 또한 당뇨병 등의 대사성 질환이 고지혈증을 동반할 수 있으며 신증후군이나 만성신부전 등의 신기능 이상 질환 또한 지질분해의 장애로 인해 고지혈증을 나타낼 수 있다. 이러한 고지혈증은 유형에 따라 몇 가지 형태로 나누어지는데 Table 3에 간략히 나타내었다.

지질강하제는 크게 TG 강하제와 콜레스테롤 강하제로 나누어 사용된다. TG 강하제는 3가지 종류가 있는데 fibrate,

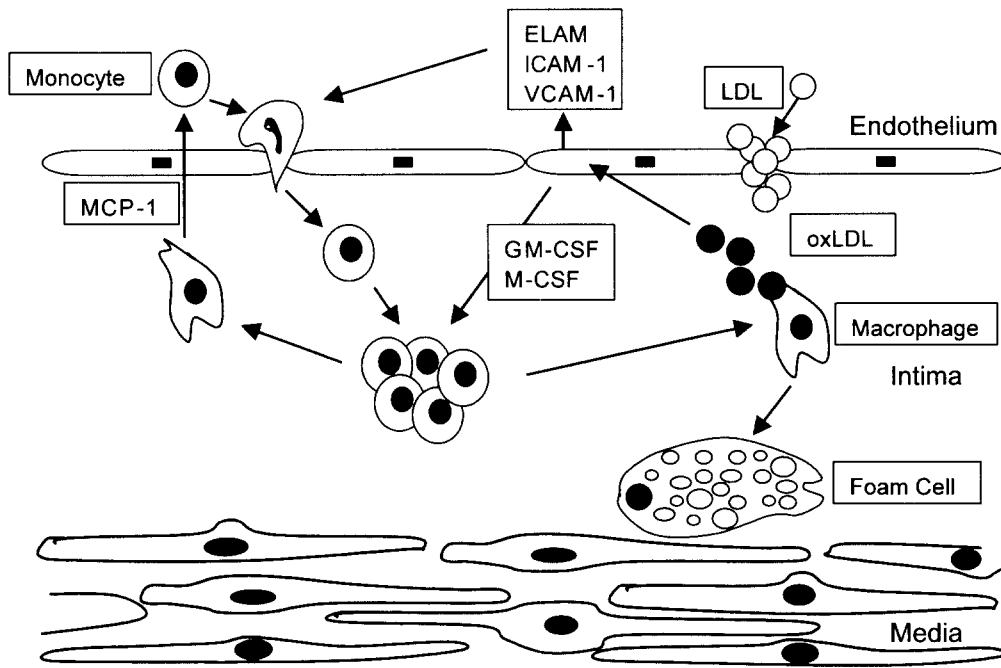


Fig. 2. Monocyte/macrophages in early events of atherogenesis.

LDL enters the subendothelial space, where it is retained by components of the matrix and oxidized by several different oxidants. Oxidized LDL stimulates the expression of adhesion molecules (ELAM-1, ICAM-1, and VCAM-1) on endothelial cells, is chemotactic, and inhibits the exit of macrophages from vascular wall, thereby increasing the number of leukocytes and the pro-inflammatory component of atherogenesis. The proliferation of intimal macrophages is induced by specific colony stimulating factors (GM-CSF and M-CSF). Thereafter, the monocytes differentiate into macrophages that secrete specific chemoattractants (MCP-1) for monocytes. Furthermore, the macrophages accumulate oxidized LDL via scavenger receptors, resulting in foam cell generation. ELAM, endothelial leukocyte adhesion molecule; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; ICAM-1, intercellular adhesion molecule; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; M-CSF, monocyte colony stimulating factor; VCAM-1, vascular adhesion molecule.

Table 3. Patterns and reasons of hyperlipidemia

Type	Pattern	Major reason
I	IDL ↓, HDL ↓, TG ↑, Chylomicron ↑	Deficiency of LPL
II	LDL ↑	Mutation of LDL receptor gene
III	VLDL ↑, chylomicron ↑	Disorder of hepatic receptor
IV	LDL-CE ↓, HDL-cholesterol ↓, Insulin ↑	Increase of VLDL
V	VLDL apo B ↑	Same as type I and IV

nicotinic acid compound와 fish-oil 제제 등이다. 이들은 모두 VLDL을 감소시키거나 종종 HDL 콜레스테롤을 증가시키므로 콜레스테롤 강하제의 보조약제로도 유용하다. 콜레스테롤 강하제는 LDL 콜레스테롤을 감소시키는 작용을 하며 주로 II형 고지혈증 치료에 사용된다.

### 1. TG 강하제

Fibrates 제제 중에서 colfibrate는 지방조직에서 유래되는 lipoprotein lipase를 증가시켜 지방분해를 자극한다. 하지만 담석을 유발하는 부작용과 더욱 안전하고 효과적인 fibrates 제제들의 출현으로 사용빈도는 줄어들고 있다. Bezafibrate는 지방산 합성과정에서 관여하는 acetyl-CoA carboxylase를 억제시킨다. 혈장 콜레스테롤 및 TG를 감소시키는 효과가 colfibrate보다 더욱 강력하며 주로 제 IV형 고지단백혈증에 사용되어진다. Gemfibrozil은 위의 두 약제와 비슷한 작용기전을 가지지만 halogen화되지 않아 장기투여에 의한 약물독성(long-term toxicity)면에서 장점을 가진다(10). Nicotinic acid compounds 제제는 fibrate와 같이 콜레스테롤과 TG 모두에 작용하여 항지방분해작용과 LDL 콜레스테롤 강하 효과를 가지며 또한 HDL 콜레스테롤을 높이는 기능을 가진다(11). Nicotinic acid와 그 유사약제의 부작용은 피부 혈관확장과 소화기 장애 등이 나타날 수 있다. Fish-oil 제제는 VLDL의 TG를 감소시키는 효과를 가진다(12). 특히 VLDL-apo B의 합성속도를 감소시키는 특징으로 인해 제 V형 고지혈증 환자에게 유용하다.

### 2. 콜레스테롤 강하제

Anion-exchange resins 제제들은 불용성 혼합물로서 장내에서 담즙산과 결합하여 담즙의 재흡수를 억제하고 대변의 배설을 증가시키는 작용을 한다. 그래서 담즙합성이 자극을 받아 간에서 콜레스테롤의 요구가 증가하게 되고 HPL의 활성이 증가되어 혈장으로부터 LDL제거가 촉진되는 효과를 볼 수 있는데, cholestyramine 제제는 장내에서 담즙산으로부터 염소이온을 교환시킴으로써 위의

효과를 얻지만 종종 변비와 소화불량 등의 부작용도 있다. Probucol은 중등도의 콜레스테롤 강하력을 가지고 있으면서, TG에는 영향을 미치지 않는 약제이다. 또한 항산화성질을 가지고 있어 대식세포에 의한 LDL의 탐식을 억제하여 죽상경화를 감소시킨다는 동물실험결과도 있다(13). HMG-CoA 억제제는 HMG-CoA reductase를 경쟁적으로 억제하여 mevalonic acid로 변환되는 것을 막는다. 그 결과로 콜레스테롤 합성이 저하되는데, 특히 담즙산 형성을 위한 기질로 콜레스테롤을 필요로 하는 간에서의 합성이 저하된다. 이 제제는 음이온 교환수지나 probucol보다 LDL 콜레스테롤 감소효과는 크나, 혈장 TG 감소효과와 HDL 콜레스테롤 증가효과는 fibrates보다 약하다.

## 콜레스테롤 대사 관련 유전자의 발현조절

### 콜레스테롤 대사 관련 유전자의 특징과 발현조절

Apolipoprotein 유전자는 5개의 chromosome에 걸쳐 분포하고 있음에도 불구하고 매우 유사한 구조를 가진다. Apolipoprotein에서 구조적으로 차이를 보이는 유전자는 apo B와 apo D이다. Apo B는 29개의 exon을 가지며 반복부위에서는 다른 apolipoprotein들과 많은 상동성을 보인다. Apo B 유전자는 단일 유전자에 의해 조절되는 apo B<sub>100</sub>과 apo B<sub>48</sub>의 두 형태로 존재하는데 apo B<sub>48</sub>은 mRNA editing에 의해 apo B<sub>100</sub>으로부터 만들어진다. LDL 수용체의 apo B<sub>100</sub>의 돌연변이는 세포내로 콜레스테롤의 도입을 불가능하게 하여 혈중 LDL 농도를 높이는 결과를 초래한다.

사람 lipoprotein lipase (LPL) 유전자는 8번 chromosome에 위치하며 길이는 약 30 kb이고 10개의 exon으로 구성되어 있다. 특히 exon 4는 지질결합부위로 확인된 serine 아미노산에 해당되는 부위를 가지며, exon 5는 HPL, pancreatic lipase와 높은 homology를 보인다. 이 유전자의 결핍은 고지단백혈증 제 I 형을 유발하는데 소아기부터 나타나는 심한 hypertriglyceridemia와 chylomicronemia가 특징적이다. Chylomicron의 제거속도를 결정하는 extrahepatic LPL 유전자의 결핍으로 chylomicron이 가수분해되지 않아 혈장내에 chylomicron의 축적이 일어난다.

Hepatic lipase(HPL) 유전자는 15번 chromosome에 위치하며 길이는 약 60 kb이고 9개의 exon으로 구성되어 있으며 androgens에 의해 활성이 증가되고 estrogens에 의해 HPL의 활성은 감소한다. 이 유전자의 결핍은 HDL<sub>2</sub>의 TG 가수분해가 부족하여 비정상적으로 큰 TG 입자가 존재함이 확인되었다.

혈장내에서 콜레스테롤 에스테르화(esterification)에 관여하는 LCAT 유전자의 결핍은 FC를 에스테르화 하지

못하여 FC와 lecithin의 지단백질 분획이 축적되고 HDL의 콜레스테롤이 감소되어 있는 경향을 나타낸다. LCAT의 활성화에는 몇몇 apolipoprotein이 cofactor로 작용하고 있는데 가장 큰 영향을 미치는 apo A-I을 비롯해 apo A-II, IV, apo C-II, III 등이 활성화에 관여하고 있다.

LDL 수용체 유전자는 19번 chromosome에 위치하며 18개의 exon으로 구성되어 있고 길이는 약 45 kb이다. 이 유전자의 돌연변이는 가족성 고콜레스테롤혈증을 유발하게 되며, 지금까지 LDL 수용체에 관한 다른 4가지의 돌연변이가 확인되었다. LDL 수용체는 세포내로 유입된 콜레스테롤의 양이 늘어나면 활성이 감소하며 HMG-CoA reductase 또한 세포내의 콜레스테롤에 의해 하향조절 받는다.

CETP 유전자는 16번 chromosome에 위치하며 길이는 약 25 kb이고 16개의 exon으로 구성되어 있다. LCAT 유전자와 매우 가깝게 위치하고 있으나 염기서열에 있어 상동성은 적다. 콜레스테롤, 호르몬, 비타민 등이 CETP 유전자의 발현조절인자로 알려져 있다.

#### 본 연구실에서 수행된 고콜레스테롤 대사 관련 유전자의 발현조절 연구

##### 1. 고콜레스테롤 식이에 의한 유전자의 발현변화

토끼에게 고콜레스테롤 식이를 급여하여 신장, 간 등의 조직에서 발현의 차이를 보이는 유전자를 선별하였다. 먼저 조직에서 RNA를 분리하여 Differential Display / Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(DDRT-PCR) (14) 방법으로 유전자를 선별하여 재증폭하였다. 이를 가지고 Northern blot 분석을 통해 각 조직에서 차이 나는 유전자를 재 선별하였다. 이 유전자들의 염기서열 분석을 수행하고 homology search를 통하여 유전자의 특성을 규명하였다.

신장조직에서는 DDRT-PCR 방법으로 50개의 유전자를 선별하였고 이를 Southern blot 분석으로 재검증하여 14개의 유전자를 선별한 후 CRGRK(cholesterol responding gene in rabbit kidney) 1-14로 명명하고 Northern blot 분석을 수행하였다. 이들 중 CRGRK 1, 2, 6, 12 유전자의 발현이 실험군의 신장에서 증가하는 것을 확인하였으며, 이들을 클로닝하여 염기서열을 분석하고 sequence homology search를 한 결과, CRGRK 1은 아직 알려지지 않은 유전자로 밝혀졌으며, CRGRK 2는 *O. anatinus* NADH dehydrogenase subunit 5 유전자 일부군과 72% 유사성을, CRGRK 6은 인간의 AK3 mRNA(adenylate kinase 3) 유전자 일부분과 67%, CRGRK 12는 인간의 mitochondrial phosphate carrier mRNA의 일부분과 93%의 유사성을 나타내었다. 이 중에서 CRGRK 12 유전자의 full length

cDNA를 pGEM-7Zf(+) vector에 제한효소 분석으로 sub-cloning을 하여 염기서열 분석을 수행하였다. CRGRK 12 유전자의 기능이 mitochondria 안의 산소호흡과 에너지 생산에 있어서의 중요한 역할을 고려 할 때 동맥경화 발생 과정에서 나타나는 비정상적 세포의 활성화나 이동, 증식의 유발에 필요한 과다한 에너지 수요와의 균형을 맞추기 위한 조직 특이적 현상이라 사료된다.

간조직에서의 결과는 GRC-RL(gene regulated by cholesterol in rabbit liver) 1-5로 명명되어진 5개의 유전자를 선별하였는데, GRC-RL-1, 3은 아직 알려지지 않은 유전자로 판명되었으며, GRC-RL 4는 human AHNAK nucleoprotein 유전자의 일부와 92% 이상의 유사성을, GRC-RL 5는 human threonyl-tRNA synthetase 유전자 일부와 99%의 유사성을 나타내었다. 또한 GRC-RL 2는 쥐, 개, 사람의 Rab7 유전자의 일부와 92% 이상의 유사성을 나타내었다. 이 유전자는 조직 특이적으로 간조직에서 정상보다 발현정도가 증가되지만, 대동맥에서는 정상보다 적게 발현되는 특징을 보이고 있다. 현재까지 알려진 바에 의하면 Rab7 단백질의 기능은 late endosome에서 lysosome으로의 물질 수송에 관여하는 것이다. 이러한 기능으로 유추해 볼 때, 과다한 혈중 콜레스테롤은 역수송경로를 통해 조절되는데 이러한 일부과정에 이 단백질이 관여하는 것으로 추정되며, 대동맥에서는 동맥경화 병변에서 나타나는 거품세포형성 과정에 관여하는 것으로 추정된다.

##### 2. 사람 단핵구 세포에 oxLDL 처리를 통한 유전자의 발현변화

사람 단핵구 세포주인 THP-1 세포에서 oxLDL의 처리에 의하여 발현의 변화를 나타내는 유전자들을 DDRT-PCR 방법으로 탐색하였다(15). THP-1 세포에 oxLDL과 대조군으로 PBS를 24 시간동안 처리하고 total RNA를 분리하여 총 24 종류의 primer 쌍으로 DDRT-PCR을 수행한 결과 3000여개의 cDNA band를 확인하였으며 전개된 gel 상에서 oxLDL 처리에 의하여 차이를 보이는 58종류의 cDNA 단편을 확보하여 LRGm(lipoprotein-responding gene in monocytic cells) 유전자로 명명하였다. 재증폭한 LRGm cDNA를 probe로 Northern blot 분석을 실시한 결과, 각 LRGm cDNA pool 내에는 한 종류 이상의 유전자가 존재함을 확인하였다. 이에 먼저 각 LRGm cDNA에 대하여 한 종류씩의 cDNA를 cloning하여 유전자를 확보하고 이 확보한 cDNA를 probe로 colony hybridization을 실시함으로써, 제 2의 유전자를 cloning하였다. Reverse Northern blot 분석과 Northern blot 분석으로 LRGm cDNA 단편들의 발현차이를 검증하여 최종적으로 oxLDL에 의하여 mRNA 수준이 크게 변하는 9 종류의 유전자를 확인하고 DNA 염기서열을 분석하여 homology search를 수행하였

다. 그 결과, 이들 중에서 6 종류의 유전자는 그 기능이 알려져 있었으며 각각 carbonic anhydrase II(CAII), CD24 signal transducer(CD24), non-muscle type cofilin(cofilin), ferritin light chain(L-ferritin), monocyte chemotactic protein-3(MCP-3), neurogranin(NR)과 histone H2A.2 mRNA에 대한 유전자들이었다. 그리고 나머지 2 종류의 cDNA 단편, 즉 LRGm38-5와 LRGm42-1은 그 기능과 cloning되지 않은 새로운 유전자(novel gene)로 밝혀졌다.

THP-1 세포에서 oxLDL에 의한 LRGm 유전자들의 발현을 보다 자세히 알아보기 위하여 처리시간과 처리농도를 변화시키면서 그 유전자들의 발현을 관찰하였다. OxLDL (25 $\mu$ g/ml)을 48시간까지 처리하며 Northern blot 분석으로 각 유전자의 mRNA 수준을 분석한 결과, L-ferritin, LRGm38-5, MCP-3 유전자는 처리시간에 따라 발현의 증가를 나타내었으며 CAII, cofilin, histone H2A.2, LRGm42-1, neurogranin 유전자는 발현이 감소하였다. 이러한 발현 변화는 통상 6시간만에 나타나기 시작하여 48시간동안 지속되었다. 또한 oxLDL의 농도를 변화시키며 24시간동안 처리하였을 때는 L-ferritin, LRGm38-5, MCP-3 유전자는 50  $\mu$ g/ml의 농도까지 처리농도에 따라 mRNA 수준이 증가하였으며 반대로 CAII, cofilin, histone H2A.2, LRGm42-1, neurogranin 유전자의 mRNA 수준은 감소하였다. 처리농도 5 $\mu$ g/ml 이상에서 유전자들의 mRNA 수준이 변화하였으며 50 $\mu$ g/ml의 농도에서 최고치를 나타내었다. 그리고, THP-1 세포를 PMA로 24시간동안 처리하여 대식세포로 분화시킨 후, oxLDL 처리에 의한 이들 유전자의 발현양상의 변화를 관찰하였다. 그 결과, CAII와 neurogranin의 mRNA 수준은 PMA에 의하여 분화와는 관계없이 같은 양상을 나타내었으나, L-ferritin, LRGm38-5, MCP-3 유전자의 mRNA 수준은 증가정도가, cofilin 유전자는 감소정도가 둔화되었다. 이러한 결과는 이들 유전자의 mRNA 수준의 변화는 THP-1 세포의 특정 분화단계에 한정될 수 있는 것을 의미한다.

다음으로 oxLDL의 어느 성분이 LRGm 유전자 발현에 영향을 주는가를 알아보기 위하여, oxLDL에서 추출한 지질분획과 단백질분획으로 THP-1 세포에 처리하고 각 유전자의 발현을 관찰하였다. 그 결과, 각 유전자의 mRNA 수준 변화는 대부분 지질성분을 처리한 세포에서 나타났으며 이는 이들 유전자 발현에 대한 oxLDL의 활성이 지질성분에 존재함을 의미한다. OxLDL에 존재하는 지질성분들 중에서 어떠한 지질이 이러한 결과를 나타내는가를 알아보았다. Cholesterol, oleate, cholesteryl oleate, 25-hydroxycholesterol(25-HC), 9-HODE, 13-HODE 등으로 THP-1 세포를 처리한 결과, 25-HC, 9-HODE, 13-HODE로 처리한 세포에서 oxLDL을 처리한 경우와 유사한

mRNA 수준 변화를 관찰하였다.

THP-1 세포에서 oxLDL이 LRGm 유전자의 발현에 관여하는 기작을 유추해 보기 위하여 다음과 같이 연구를 진행하였다. OxLDL에 의한 LRGm mRNA 수준의 변화가 새로운 단백질의 합성을 필요로 하는가를 알아보기 위하여, cycloheximide를 처리하여 단백질 합성을 저해한 상태에서 oxLDL을 처리하고 각 mRNA 수준을 Northern blot 분석으로 관찰하였다. Cycloheximide 처리에 의하여 oxLDL에 의한 발현 증가는 완전히 사라졌으며 이는 이들 유전자의 발현 변화에 새로운 단백질의 합성이 필요하다는 것을 의미한다. 또한 protein kinase C(PKC)와 tyrosine kinase(TK)의 저해제인 GF109203X와 genistein으로 각각 동일한 조건으로 관찰하였을 때는 그 발현양상의 변화는 관찰되지 않았다. 이는 적어도 PKC와 TK는 이들 유전자의 발현에 직접적으로 관여하지는 않는다는 것을 의미한다. 그리하여 본 연구자는 새로운 조절기작을 탐색하던 중에 최근 대식세포에서의 유전자 발현에 PPAR $\gamma$ 가 관여한다는 보고를 접하고 이 PPAR $\gamma$ 가 LRGm 유전자들의 발현에 관여하는 지를 알아보았다. PPAR $\gamma$ 의 특이적 ligand인 15d-PGJ2를 처리하고 처리시간 및 농도에 따른 L-ferritin, LRGm38-5, MCP-3 유전자의 mRNA 수준을 관찰하였다. 그 결과, oxLDL 처리와 동일하게 이들 유전자는 증가하는 양상을 나타내었으며 24 시간 그리고 3  $\mu$ M의 농도로 처리하였을 때 가장 큰 발현의 증가를 나타내었다. 이러한 결과들은 oxLDL을 처리하였을 때 PPAR $\gamma$  mRNA 수준의 변화가 이들 유전자의 경우와 동일한 양상으로 변화한다는 것과 또 다른 PPAR $\gamma$  ligand인 9-HODE와 13-HODE로 처리하였을 때도 이들 유전자의 mRNA 수준이 증가한다는 결과와 함께 THP-1 세포에서 PPAR $\gamma$ 가 L-ferritin, LRGm38-5, MCP-3 유전자의 발현에 관여할 수 있다는 것을 강력히 시사한다.

단백질 수준에서의 연구를 수행하기 위하여 CAII, CD24, L-ferritin, MCP-3 유전자에 대한 coding region을 RT-PCR로 확보하여 대장균에서 발현시킴으로써 각 유전자에 대한 단백질을 생산하고 이를 항원으로 하여 토끼에서 항체를 생산하였다. 이 항체를 이용하여 western blot 분석을 수행하여 THP-1 세포에서 oxLDL 처리에 의한 각 유전자에 대한 단백질의 변화를 관찰하였다. 그 결과, CAII는 oxLDL로 처리로 단백질의 감소를, L-ferritin은 증가를 나타내었으며 이 결과는 Northern blot 분석의 결과와 일치하였다.

THP-1 세포에서 oxLDL 처리에 의하여 mRNA 수준의 증가를 나타내는 L-ferritin과 MCP-3 유전자가 실제 동맥경화 병변에서 발현되는지를 관찰하였다. 고콜레스테롤 식이로 유발시킨 토끼의 동맥경화 병변과 동맥경화증 환

자의 목 경동맥에서 형성된 동맥경화 plaque를 시료로 이용하고 면역조직화학법(immunohistochemistry)과 *in-situ* hybridization 방법으로 확인하였다. 그 결과, L-ferritin과 MCP-3 유전자는 동맥경화 병변에서 특이적으로 발현하였으며 특히 병변에 분포하는 대식세포 및 포말세포에서 주로 발현하는 것으로 판명되었다. 이러한 발현 양상은 병변의 진행 정도에 따라서 차이를 나타내었다. 또한 U937 세포에서 실시한 MCP-3 promoter 활성분석에서는 -144와 -99 사이의 promoter 부위에 하나 이상의 positive element가 존재하며 이는 MCP-3 유전자의 전사과정을 촉진하는 것으로 확인되었다. 또한 -99와 +65 사이의 promoter 부위에 존재하는 전사인자는 oxLDL에 의한 MCP-3 유전자 발현에 관여하는 것으로 확인되었다.

본 연구를 통하여 oxLDL에 의하여 조절되는 사람 단핵구의 유전자들을 탐색하고 이들 LRGm 유전자 발현의 조절과정을 살펴보았다. LRGm 유전자들은 oxLDL 특히 oxLDL 지질성분에 의하여 THP-1 세포에서 특이적 발현양상을 나타내었으며 L-ferritin 및 MCP-3 유전자는 실제 동맥경화 병변에서도 발현수준의 증가를 나타내었다. 본 연구에서 사용한 model system에서는 oxLDL은 전사조절인자로 작용하는 PPAR $\gamma$ 를 통하여 그 신호를 전달하는 것으로 사료된다(Fig. 3).

### 3. 인체 CETP 유전자의 전사조절

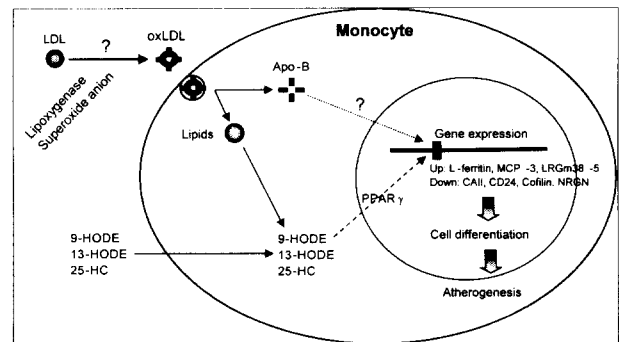
사람 태반에서 유래한 genomic DNA library에서 CETP 유전자 선별을 시도하여 5개의 phage clone을 확보하였으며, 이를 분석한 결과 CETP 유전자의 전체 구조 유전자를 완전히 수용할 수 있음을 확인하였다. 5개의 phage clone 중 한 개의 phage clone에는 CETP 유전자 promoter의 일부(약 3.4 kbp)가 포함되어 있음을 확인하고, 이를 이용하여 promoter 분석을 위한 reporter plasmid들을 구축하였다.

CETP 유전자 promoter를 분석한 결과, -57/-53 bp에 존재한다고 알려진 TATA box만으로는 CETP 유전자 발현에 충분한 기능을 수행할 수 없으며 -134/-66 bp 사이에 있는 조절인자가 CETP 유전자 발현 조절에 중요한 기능을 하고 있는 것으로 확인하였다. 그리고 -184/-134 bp 사이에도 -134/-1 bp에 의한 CETP 발현을 증가시킬 수 있는 전사인자가 있음을 확인하였다. 그래서 기존의 보고들에서 밝혀진 바 있는 TATA box(-57/-53)와 3개의 Sp1 (-149/-140 bp, -126/-113 bp, -75/-64 bp)가 CETP 유전자 발현에 중요한 역할을 할 것으로 확인하였다. Steroid hormone에 의한 CETP 유전자 발현 조절 기전을 연구하기 위하여 retinoic acid를 reporter plasmid들이 transfection된 세포에 처리한 결과 -184/-134 사이에 RARE가 있을 수 있음을 확인하였다. 이 DNA 단편에서 RARE로 작용

할 수 있는 부위를 확인하기 위하여 DNase I footprinting, EMSA 및 경쟁실험과 순수 분리된 RAR  $\gamma$ 를 이용한 EMSA 등을 수행한 결과 -190/-160 bp가 RARE로 작용할 수 있음을 밝혀내었다(16). 본 연구에서 발견한 RARE는 DR8으로 지금까지 발견된 DR5와는 구조적으로 차이가 있었으며, 이 DR8에 대한 기능 연구를 수행할 필요가 있을 것으로 생각한다.

또 다른 steroid hormone인 glucocorticoid가 CETP 발현에 미치는 영향을 조사한 결과 -160/-122 bp에 CETP 유전자 발현을 저해할 수 있는 GRE가 있음을 밝혔다. 이 결과는 Masucci-Magoulas 등(17)이 보고한 CETP promoter에 GRE가 있어 CETP 유전자 발현을 저해할 수 있다는 결과를 직접적으로 확인한 결과였다(Fig. 4).

그리고 CETP가 콜레스테롤에 의하여 발현이 조절될 수 있다는 연구 결과들을 확인하기 위하여 transfection된 세포에 LDL을 처리하여 promoter 분석을 한 결과, -350/-184 bp 사이에 SRE가 존재하는 것으로 확인되어 Oliveira 등(18)이 주장한 것과 같은 지역에서 SRE를 발견할 수 있었다. 그러나 이 SRE를 통하여 CETP 유전자는 콜레스테롤에 의해 발현이 저해되는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 밝혀낸 SRE의 기능은 Oliveira 등(18)이 주장



**Fig. 3. Regulation of LRGm gene expression in differentiation of monocytic cells.**

LDL enters the subendothelial space, where it is retained by components of the matrix and oxidized by several different oxidants such as lipoygenase and superoxide anion. Monocyte/macrophages allow the oxLDL internalize through a group of cell surface proteins termed scavenger receptors. Protein (apoB-100) and lipid components from internalized oxLDL can each recapitulate some of the effects of the intact particle. OxLDL and its lipid components may contribute to monocytic gene expression and monocyte differentiation. Especially, oxidized lipids, including 9-HODE, 13-HODE, and 25-HC, can work as important signaling molecules in monocyte differentiation. These components stimulate the expression of L-ferritin, LRGm38-5, and MCP-3 genes. However, these effectors suppress the expression of CAII, cofilin, and NRGN genes. Furthermore, the regulation of LRGm genes by oxLDL and its lipid components may involved in monocyte/ macrophage differentiation and foam cell formation during atherogenesis.

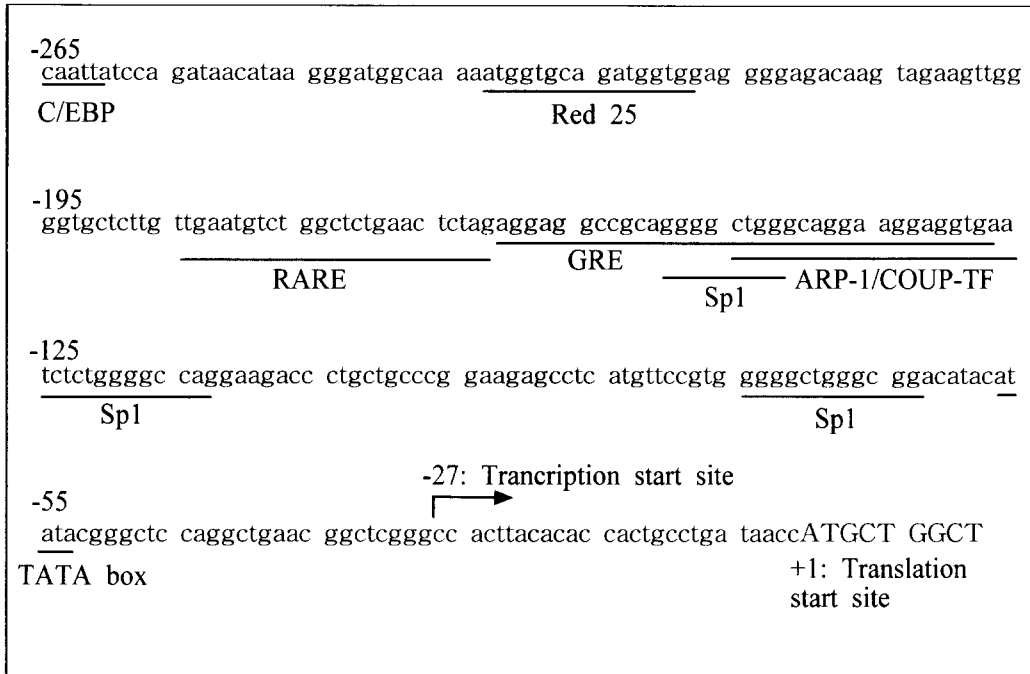


Fig. 4. Functionally important sequences in the human CETP proximal promoter.

Transcription start site is indicated by arrow and translation start site is indicated by capital letters. The TATA box is located at the -57/-53 region. Three Sp1 binding sites lie at -149/-140, -126/-113 and -75/-64 regions. The nuclear hormone receptor elements, RARE, GRE and ARP1/COUP-TF, are located at the -185/-160, -160/-127 and -145/-126 regions, respectively. The Red 25 which resembles the SRE found at the HMG-CoA reductase promoter is located at -232/-218 region and C/EBP binding site is at the -265/-259 region.

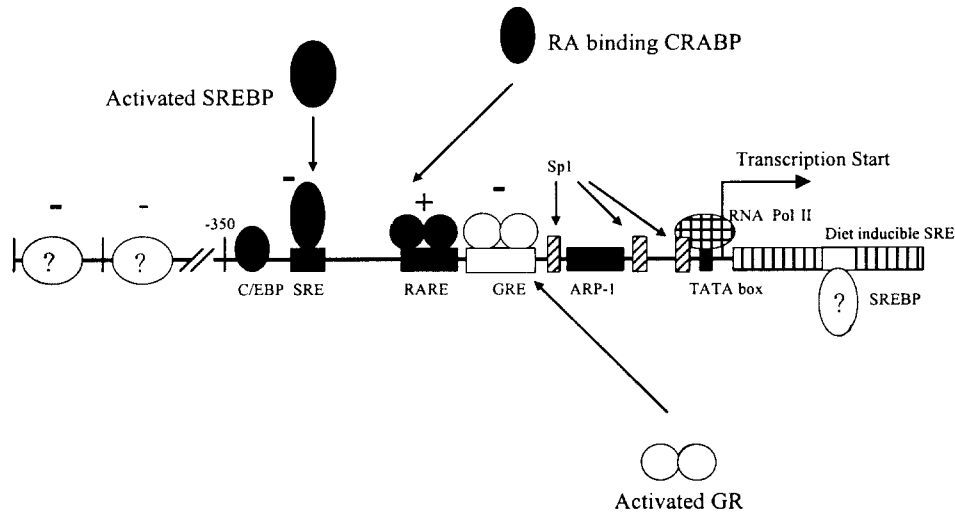
한 바 있는 SRE의 기능과는 반대의 효과가 있는 것으로 확인되었다. 그러나 이들은 최근 보고(19)에서 그들이 발견한 -230/-216에 있는 SRE는 *in vitro*에서는 작용을 하지 않으며 CETP 구조유전자에 다른 SRE가 있을 것으로 주장하고 있어 이에 대한 보충 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구를 통하여 밝혀낸 결과를 종합하면 HepG2 세포를 이용한 CETP 유전자의 발현은 retinoic acid에 의하여 -190/-160 bp에 있는 RARE를 통하여 증가되며, -160/-122 bp에 있는 GRE를 통해서 glucocorticoid에 의하여 발현이 저해되고 있으며, -230/-216 bp 사이에 CETP 유전자 발현을 저해하는 SRE가 있음을 확인하였다. 특히 -190/-122 사이에 여러 개의 nuclear hormone receptor element들이 인접하여 존재하는 것은 이들 사이에 상호작용에 의해 CETP 유전자 발현이 이루어지고 있음을 암시하고 있다(Fig. 5).

## 참 고 문 헌

1. Brown, M.S. and Goldstein, J.L. : How LDL receptor influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci. Am.*, **251**, 58(1984)
2. Eisenberg, S. : High density lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.*, **25**, 1017(1984)
3. Jackson, R.L. : Lipoprotein lipase and hepatic lipase. *The Enzymes.*, **16**, 141(1983)
4. Jonas, A. : Lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1084**, 205(1991)
5. Christopher, J.F. and Phoebe, E.F. : Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.*, **36**, 211 (1995)
6. Steinberg, D. : Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.*, **272**, 20963(1997)
7. Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J. and Fogelman, A.M. : Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein-1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5134(1990)
8. Rajavashisth, T.B., Parthasarathy, S., Fong, L.G. and Steinberg, D. : Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2995(1987)
9. Stary, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W. Jr., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D. and Wissler, R.W. : A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the committee on vascular le-





**Fig. 5. A hypothetical scheme of CETP gene regulation by steroid hormones and cholesterol.**

The expression of CETP gene might be regulated by several nuclear hormones (retinoic acid, glucocorticoid and unidentified hormone) through the nuclear hormone receptor elements (RARE, GRE and ARP-1/COUP-TF, respectively). Cholesterol could participate in the regulation of the CETP gene expression through SREBP. Three different of Sp1s (-149/-140, -126/-113 and -75/-64) could stimulate the expression of CETP gene by as interaction with TATA box (-57/-53). These Sp1 binding sites and TATA box are essential for regulation of CETP gene expression. Several negative transcription factors could bind at the -3434/-184 region of the CETP promoter. See details in the text. C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein; SRE, sterol regulatory element; SREBP, SRE binding protein; RARE, retinoic acid receptor element; CRABP, cellular retinoic acid binding protein; RA, retinoic acid; GRE, glucocorticoid receptor element; ARP-1, apo-AI regulatory protein-1 which is an orphan nuclear receptor.

sions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler. Thromb.*, **14**, 840(1994)

10. Illingworth, D.R : Drug therapy of hypercholesterolemia. *Clin. Chem.*, **34**, B123(1988)
11. Taskinen, M. and Nikkila, E.A. : Effects of acipimox on serum lipids, lipoproteins and lipolytic enzymes in hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*, **69**, 249(1988)
12. Thompson, G.R. : Lipids, fish and coronary heart disease. *Curr. Opin. Cardiol.*, **1**, 827(1984)
13. Kita, T., Nagano, Y., Yokode, M., Ishii, K., Ooshima, A., Yoshida, H. and Kawai, C. : Probuocol prevents the progression of atherosclerosis in watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5928 (1987)
14. Liang, P. and Pardee, A.B. : Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, **257**, 967(1992)
15. Jang, M.K., Choi, M.S. and Park, Y.B. : Regulation of ferritin light chain gene expression by oxidized low-density lipoproteins in human monocytic THP-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **265**, 577(1999)
16. Jeoung, N.H., Jang, W.G., Nam, J.L., Pak, Y.K. and Park, Y.B. : Identification of retinoic acid receptor element in human cholesteryl ester transfer protein gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **258**, 411(1999)
17. Masucci-Magoulas, L., Moulin, P., Jiang, X.C., Richardson, H., Walsh, A., Breslow, J.L. and Tall, A.R. : Decreased cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA and protein and increased high density lipoprotein following lipopolysaccharide administration in human CETP transgenic mice. *J. Clin. Invest.*, **95**, 158(1995)
18. Oliveira, H.C.F., Chouinard, R.A., Agellon, L.B., Bruce, C., M, L., Walsh, A., Breslow, J.L. and Tall, A.R. : Human cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter contains dietary cholesterol positive responsive elements and mediates expression in small intestine and periphery while predominant liver and spleen expression in controlled by 5'-distal sequence. *J. Biol. Chem.*, **271**, 31831 (1996)
19. Chouinard, R.A.Jr., Luo, Y., Osborne, T.F., Walsh, A. and Tall, A.R. : Sterol regulatory element binding protein-1 activates the cholesteryl ester transfer protein gene *in vivo* but is not required for sterol up-regulation of gene expression. *J. Biol. Chem.*, **273**, 22409(1998)