Rabbit Cyclooxygenase 2의 Cloning

고려의대 내과

조 원 용

Prostanoid

Prostanoid는 arachidonic acid 대사 결과 생산되는 물질이다. arachidonic acid는 주로 간장(liver)에서 linoleic acid로부터 만들어져서 세포막으로 편입되며, angiotensin II, vasopressin, endothelin, catecholamine, adenosin등 여러가지 호르몬의 영향을 받아 세포막으로부터 유리되어 prostanoid 생산에 참여하게 된다. arachidonic acid는 prostanoid 생산을 위한 세포 신호 전달계(signal transduction)의 2차 전달 물질(secondary messenger)로 작용한다[1, 2]. 1) 여러가지 호르몬에 의한 세포의 신호(extracellular signal)는 phospholipase A_2를 자극한다. 2) phospholipase A_2는 세포막 중의 arachidonic acid를 유리한다. 3) 유리된 arachidonic acid는 prostaglandin endoperoxide synthetase(PGHS) 혹은 cyclooxygenase(COX)의 작용을 받아 prostaglandin H_2로 된다. 4) prostaglandin H_2는 각세포에서 이형 효소(isomerase)의 작용으로 필요한 prostanoid로 전환된다. 생리학적으로 중요한 prostanoid로는 prostaglandin E_2(PG E_2), prostacyclin(PG I_2), thromboxane, prostaglandin $F_2\ \alpha$ 등이 있으며, 이들은 생산된 세포내에서 작용(autocrine effect)하거나 인접한 세포에 작용(paracrine effect)한다(Fig. 1).

prostanoid는 신체 각 부위에 광범위하게 분포되어 정상상태(physiologic status) 또는 병리상태(pathologic status)에서 다양한 역할을 하고 있는 물질이다. 정상적으로는 주로 조절(modulation)의 기능을 하며, 조직의 분화(differentiation)나 재생(regeneration)에도 관여하고 있다[3]. 신장은 prostanoid의 생산이 가장 왕성하게 일어나고 있는 장기로 그 역할 및 기능도 가장 많이 알려져 있다. 신 피질의 세동맥과 사구체 모세혈관에서는 prostacyclin(PG I_2)이 주로 생산되어 신혈관 장력(vascular tone)의 조절, 사구체 여과율의 유지, renin 분비 조절등의 역할을 하고 있다. 신세뇨관에서는 프로스타글란딘 E_2(PG E_2)가 생산되며, 특히 수집세뇨관에서 생산되어 Na 및 Cl의 이송, arginine vasopressin에 의한 물이송의 조절기능을 하고 있다[4](Table 1).

동일한 prostaglandin이 생산부위에 따라 각기 다른 작용을 나타내는 것은 서로 다른 receptor 와 결합하기 때문이다. prostaglandin E_2와 결합하는 것은 EP(E prostanoid) receptor로 현재 까지는 EP_1, EP_2, EP_3 및 EP_4 receptor가 알려져 있다. 이들 각 receptor는 현재 전부 cloning되어 그들의 RNA 및 단백구조가 알려져 있으며 G protein과 결합되어 작용한다. EP_1과 EP_2 receptor는 혈관 수축작용을 매개하며, EP_2와 EP_4 receptor는 혈관 확장작용을 매개한다[5](Fig. 2).

Cyclooxygenase

(Prostaglandin GH Synthetase, PGHS)

arachidonic acid는 세포막에서 유리된후 PGHS (cyclooxygenase)의 작용을 받아 PG G_2를 거쳐 PG H_2로 전환된다. PGHS는 cyclooxygenase와 hydroperoxidase 활성을 함께 가지고 있는 거대분자로 PGHS 1 및 PGHS 2의 2가지 이형체 (isoform)가 있다. PGHS 1은 종래에 알려져 있는 효소로 분자량 65500이며 576개의 아미노산으로 구성되어 있다. PGHS 2는 chicken fibroblast에서 v-src에 의해 유도된 물질로 처음 밝혀 졌으며, murine 3T3 세포에서 phorbol ester에 의해 유도된 TIS 10 이라는 immediate early gene product로 분리되었다. 그후 TIS 10 gene에 의해 발현된 단백산물이 cyclooxygenase와 peroxidase 활성을 가지고 있어 PGH

synthetase와 같은 기능을 하는 효소로 인정하게 되었다. PGHS 2는 PGHS 1과 아미노산 구조에서 75% 동일성을 가지며, 생체 반응결과 나타나는 산물은 PGHS 1에 의해 생산되는 prostanoid와 동일하다. mRNA 구조에서 PGHS 1과 PGHS 2는 유사하나 PGHS 1이 2.8kb 정도인데 반해 PGHS 2는 4kb

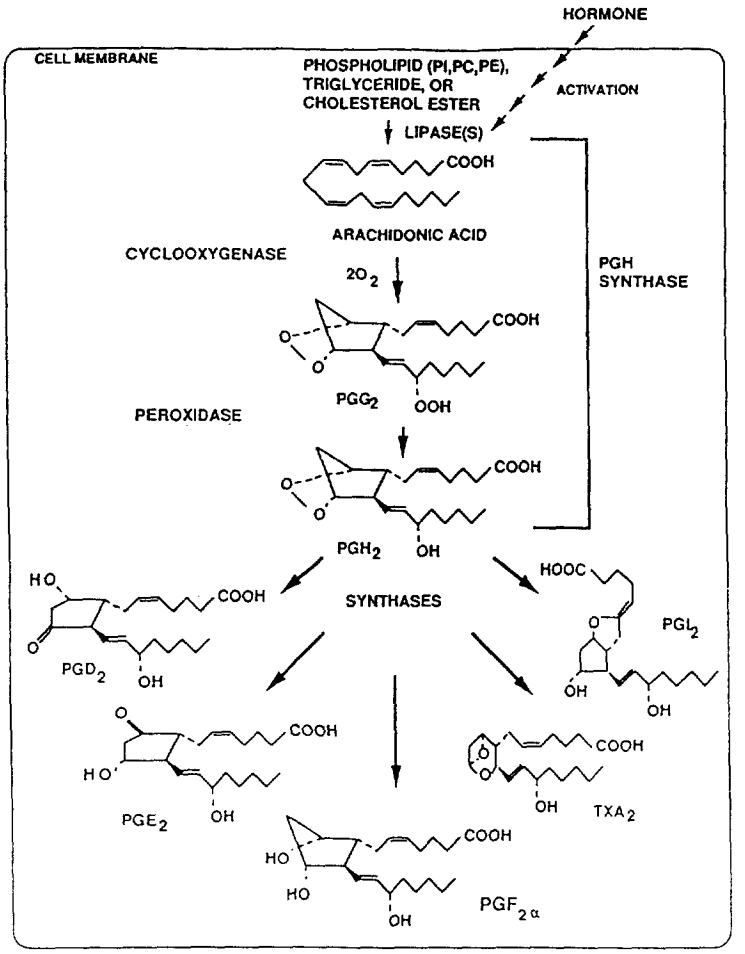


*Fig. 1. Arachidonic acid*의 대사.

Table 1. 신장의 각 부분에서 생산되는 PG의 기능

Site	Eicosanoid	Action
Arterioles	PGI_2, PGE_2	Vasodilation
Glomeruli	PGI_2>PGE_2(human) PGE_2>PGI_2(rat)	Maintain GFR
	TXA_2	Vasoconstriction
Tubules	PGE_2, $PGF_{2\alpha}$	Enhance NaCl and water excretion
Interstitial cells	PGE_2	Enhances NaCl and water excretion, influences regional blood flow
Juxtaglomerular apparatus	PGE_2, PGI_2	Stimulate renin release

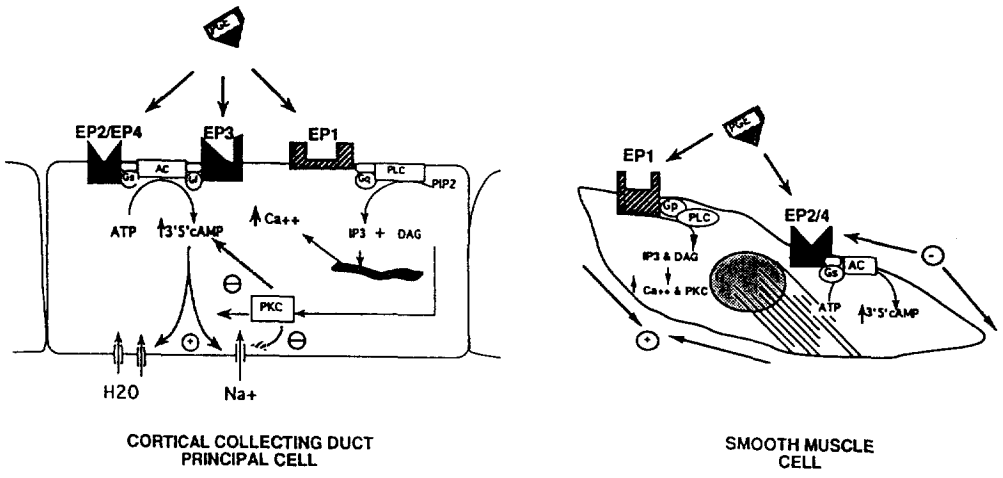


*Fig. 2. EP receptor*의 *subtype*과 신호전달 체계.

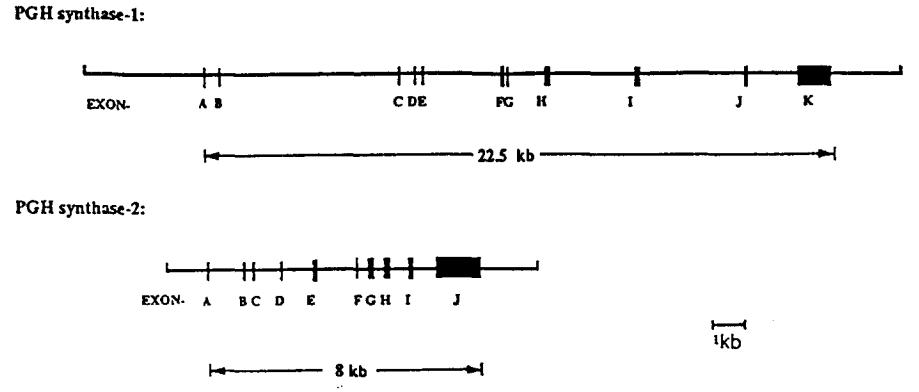


*Fig. 3-1. PGHS 1*과 *PGHS 2*의 유전자 구조.

정도이다. PGHS 1에 비해 3′ end에 untranslated region(UTR)를 가지고 있다. mRNA의 구조에 비하여 유전자 구조에서는 PGHS 1에 비하여 PGHS 2이 현저히 작아(22.5kb vs 8kb in mouse) PGHS 2가 immediate early gene 이라는 것을 뒷받침해 주고 있다.

PGHS 1은 체내에 고루 분포하고 있는 효소로 정상적 생리반응에 관여하고 있는 효소(constitutive)로 알려져 있다. 이에 반해서 PGHS 2는 역전사 효소 중합반응(RT PCR)으로 검색해 본 결과 brain, lung, stomach, kidney medulla 등에 광범위하게 분포되어 있는 것으로 밝혀져 있으나 정상상태에서는 매우 낮은 농도로 있어 탐지가 매우 어렵다. PGHS 2는 대부분 어떤 자극에 의해 생산이 증가되며(inducible) phobol esters, interleukin 1-β, epidermal growth facror, platelet derived growth factor(PDGF), cAMP 등에 의해 유도된다. 증가된 PGHS 2는 30분 이내에 발견되며 1~3시간에 최대치에 이르고 8~24시간 동안 지속된다고 한다.

이들 유도물질에 의해 PGHS 2의 생산이 증가되는 기전에 대해서는 의견이 많다. 유전자 수준에서 전사를 활성화하거나 mRNA splicing에 의한 조절 또는 세포질 내에서 PGHS 2 mRNA의 불안전성에 대한 안정화 작용등이 그 기전으로 제시되고 있다. PGHS 1과 PGHS 2 mRNA의 주된 차이는 2kb에 달하는 3′ untranslated region(3′ UTR)이며 이 부분은 AU-

UUA 구조가 많다. Rzymkiewicz등은 interleukin 1 β에 의한 rat mesangial cell에서의 PGHS 2의 증가가 1L 1β에 의해 생산된 어떤 factor가 3′ UTR에 결합하여 PGHS 2 mRNA를 안정화 시키기 때문이라는 주장을 하였으나 아직 확실하지는 않다[1,6](Fig. 3-1).

Rabbit Cyclooxygenase 2 Cloning

Cyclooxygenase mRNA 및 cDNA 구조는 mouse, rat, sheep, human 등에서는 밝혀져 있으나 rabbit에서의 구조가 밝혀지지 않아 cDNA library screening을 통한 rabbit cyclooxygenase 2 cloning을 시도 하였다.

1. Rabbit Cyclooxygenase 2(R cox 2) Probe의 작성

cDNA library screening을 위한 probe는 homology PCR을 이용하여 작성하였다. PCR을 위한 primer는 human cyclooxygenase의 염기서열을 이용해서 만들었으며 5′GTCTGATGATGT ATGCCACAATCTG(25mer sense oligonucleotide at position 848)와 5′GATGCCAGTGAT AGAGGGTGTTAAA(25mer antisense oligonucleotide at position 11[23])이다. PCR을 위한 template는 역전사 반응을 이용하여 만들었다. 토끼(NZW rabbit)의 brain mRNA를 random hexamer 와 결합 시킨후 superscript ribonucleare H reverse transcriptase를 이용해서 생산자 manual (Gibco BRL)에 따라 역전사 반응을 하고, 그 반응물(cDNA 포함)을 PCR 하였다. Thermal cycling program은 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 72℃에서 1분이며 35cycle후 270bp 정도의 cDNA를 얻었다. PCR 반응물은 Invitrogen사 PCR II cloning vector를 이용해서 cloning한 후, automatic sequencer를 통해 sequencing 하였다.

2. cDNA Library의 작성

Screening을 위한 cDNA library는 rabbit eye에서 만들었다. rabbit eye에 인위적인 조작으로 inflammation을 유도한후 rabbit eye의 Nothern analysis 결과 R cox 2 mRNA의 생산이 증가된 것을 확인한후 Stratagene 사의 ZAP ExpressTM cDNA Synthesis Kit를 이용하여 작성하였다.

3. cDNA Library Screening

Rcox 2 검색을 위한 library screening 시에는 10^5 plaque를 대상으로 human cyclooxygenase 2 probe를 이용해서 48℃에서 hybridization과 low stringency washing을 하였고, 42개의 positive plaque를 찾았다. 이후 2차~4차 screening은 이미 만들어진 Rcox 2 probe를 이용해서 58℃에서 hybridization 하였고 high stringency washing을 하였다.

4. in vivo Excision of PBK CMV Phagemid from ZAP Express Vector

phage에 포함된 R cox II cDNA insert를 추출하기 위해서 helper phage와 XLORL cell을 매개로하여 XL1 Blue MRF strain으로 cDNA를 옮기고 Quagen prep을 통해 대량의 plasmid를 얻었다. plasmid는 $EcoR_I$과 Xho 1으로 절단하여 전기 영동하여 3.3kb의 insert를 확인하였다.

임상적 응용

PGHS 2가 여러가지 염증상태나 종양형성과정에서 생산이 증가되어 어떤 역할을 하고 있다는 것은 잘 알려져 있다. 관절염에서 활액막에 증가하는 것이 주로 PGHS 2에 의한 prostaglandin 이며, colon Ca등에서도 PGHS 2가 증가하여 mitogenesis에 관여하고 있다고 한다. 즉 정상적 생리반응에서 신체 각 부위의 미세한 조절기능을 하는 것은 constitutive enzyme인 PGHS 1에 의하며, 병적인 상태에서 증가하는 prostaglandin은 PGHS 2에 의하는 것으로 알려져 있으나 증가된 prostaglandin의 정확한 작용은 아직 알려져 있지 않으며 각종 신기능 이상에서 PGHS 2의 역할에 대해서는 아직 알려져 있지 않다. 다만 Na depleted rat model에서 PGHS 2가 macula densa에서 증가되어 나타나고 저 칼륨식을 2주간 한 경우 뇨 삼투압이 저하되면서 신장 수질부, 특히 수질 간질세포(medullary interstitial cell)에서 PGHS 2의 발현이 증가되어 어떤 연관이 있으리라 생각된다. 급성

신부전에서 prostaglandin 생산이 증가되어 보상성 기전을 갖는 것은 잘 알려져 있으며, 실제적으로 obstruction에 의한 급성 신손상에서 신 prostaglandin 생산이 증가하고, 동시에 시행한 in situ hybidization 및 Northern blotting에서 신수질부에 PGHS 2가 현저히 증가한 양상을 보였다.

여러가지 원인으로 NSAID를 사용할 때 그 효과는 주로 PGHS를 억제하여 효과를 보인다. 그결과 prostaglandin 생산이 억제되어 antiinflammatory effect를 보이고 있다. 병적 상태에서 NSAID를 사용할때의 주된 target은 PGHS 2 이나 이때 PGHS 1가 함께 억제 됨으로써 신기능 장애, 위궤양 발생 등의 부작용이 발생할수 있다(Fig. 3-2).

최근의 많은 연구자들은 선택적으로 PGHS 2 만 억제할수 있는 약물의 개발에 관심을 가지고 있다[7, 8]. 지금까지 개발된 NSAID는 PGHS 1과 PGHS 2에 비선택적으로 작용 함으로써 생리적으로 필요한 prostaglandin까지 억제하고 있다(Table 2).

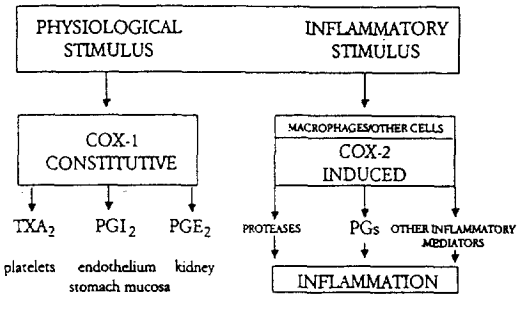


Fig. 3-2. PGHS 1과 PGHS 2의 체내 역활.

저자는 이제까지 밝혀지지 않았던 rabbit에서의 cyclooxygenase 2(PGHS 2)를 cloning하여 mRNA 구조 및 cDNA의 구조를 밝히었다. 향후 genetic DNA의 구조를 밝혀야 할 것으로 생각하며, rabbit에서 작성되는 각종 신장병 모델에서 PGHS 2의 역할에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1) Smith WL: *Prostanoid biosynthesis and mechanism of action. Am J Physiol 263:F181-F191, 1992*
2) Smith WL: *Prostanoid biosynthesis and mechanism of action. Biochem J 259:315-324, 1989*
3) Hershman HR: *Primary response genes inducd by growth factors and tumor promoters. Annu Rev Biochem 60:280-319, 1991*
4) Breyer MD, Badr KF: *Arachidonic Acid metabolite and the kidney. In Brenner BM ed. The Kidney. 5th ed Philadelphia WB Saunders PP 754-788, 1996*
5) Breyer RM, Breyer MD: *Renal prostanoid Receptors. In Schlondorf D. Bonrentre JV ed. Molecular Nephrology, New York. Marcel Decker PP 201-213, 1995*
6) Xie W, Robertson DL, Simmons DL: *Mitogen inducible prostaglandin G/H Synthetase: A new target for nonsteroidal antiinflammatory drugs.*

Table 2. 각종 NSAID의 PGHS 1과 PGHS 2에 대한 억제[a]

Specificity	Inhibitor	ID_{50} for PGHS-1 (μM)	ID_{50} for PGHS-2 (μM)	ID_{50}(PGHS-2)[b] / ID_{50}(PGHS-1)
Equipotent	Flurbiprofen	0.46-0.50	2.1-3.4	5.7
	(S)-Ibuprofen	8.9-14	7.2-8.2	0.672
	Meclofenamic acid	2.0-2.5	13-18	6.92
	Docosahexaenoic acid	11	13-17	1.36
$PGHS_{mu}$-1	Piroxicam	9.0-24	70-240	9.54
	Indomethacin	4.9-8.1	130-160	22.3
	Sulindac sulfide[c]	0.3-0.5	11-14	30.9
$PGHS_{mu}$-2	6-MNA[d]	200-280	15-55	0.14

[a] *Values presented represent the range of values obtained from individual experiments and not the statistical variance of a single measurement.*
[b] *Ratio of average ID50 values.*
[c] *The active metabolite of sulindac.*
[d] *6-MNA; 6-methoxy 2-naphthyl acetic acid, the active metabolite of nabumetone(Relafen.)*

Drug Dev Res 25:249-265, 1992

7) Masferrer JL, Zweifel BS, Maniring PT, Hauser SD, et al: *Selective inhibition of inducible cycloloxygenase 2 is antiinflammatory and nonulcerogenic, Proc Nath Acad Sci USA 91:3228-3232, 1994*

8) Futaki N, Takahashi S, I Yokoyama M, Arai I, et al: *NS 398, A new antiinflammatory agent, Selectively inhibits prostaglandin G/H synthetase/cyclooxygenase(Cox 2) activity in vitro. Prostaglandin 47:55-59, 1994*