

심바스타틴이 인체망막색소상피세포에서 카탈라아제 발현에 미치는 영향

The Effect of Simvastatin on the Expression of Catalase in Human Retinal Pigment Epithelial Cells

강민구 · 이소영 · 진희승

Min Gu Kang, MD, So Young Lee, Hee Seung Chin, MD, PhD

인하대학교 의과대학 안과학교실

Department of Ophthalmology, Inha University School of Medicine, Incheon, Korea

Purpose: To evaluate the effects of simvastatin on the catalase expression in human retinal pigment epithelium.

Methods: Retinal pigment epithelial (RPE) cells were incubated for 6 hours and 24 hours with various concentrations of simvastatin. In addition, RPE cells were incubated with 200 μ M of H_2O_2 and various concentrations of simvastatin. After incubation, real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed to examine the catalase messenger ribonucleic acid (mRNA) expression and a catalase assay was performed to examine the catalase activity in RPE. Intracellular reactive oxygen species (ROS) was measured using a fluorescence activated cell sorter (FACS).

Results: Simvastatin increased the amount of catalase mRNA and catalase activity at 10 μ M in RPE cells. Under oxidative stress (200 μ M of H_2O_2), 2.5 μ M of simvastatin increased the catalase mRNA expression and 5 μ M of simvastatin increased catalase activity in RPE cells. In addition, simvastatin reduced free radical formation but this effect was diminished in the presence of an irreversible catalase inhibitor, 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT).

Conclusions: Simvastatin exhibits anti-oxidative effects by inducing the catalase expression in human RPE cells. This anti-oxidative effect may be beneficial for preventing age-related macular degeneration induced by oxidative stress.

J Korean Ophthalmol Soc 2014;55(10):1535-1542

Key Words: Catalase, Oxidative stress, Retinal pigment epithelium, Simvastatin

연령관련 황반변성(Age-related macular degeneration, AMD)은 서양에서 비가역적인 시력 손실의 주된 원인으로 알려졌

다.¹ 미국에서 연령관련 황반변성 환자는 약 8,000,000명에 이르는 것으로 추산되고 있으며, 가장 최근에 이루어진(2005-2008) 연령관련 황반변성 유병률 연구(National Health and Nutrition Examination Survey, NAHNES)에 따르면 40세 이상 미국 인구의 6.5%가 연령관련 황반변성에 이환된 것으로 확인되었다.^{2,3} 또한 2050년에는 유병률이 97% 증가할 것으로 예상되고 있다.⁴ 국내의 경우 2008-2009년 국민건강영양조사 결과 40세 이상 성인에서 연령관련 황반변성의 유병률은 5.1%인 것으로 나타났다.⁵

망막색소상피세포는 망막과 맥락막모세혈관 사이에서 단 일층을 이루고 있고, 혈액-망막 장벽(blood-retinal barrier)을

■ Received: 2014. 4. 26. ■ Revised: 2014. 6. 10.

■ Accepted: 2014. 10. 3.

■ Address reprint requests to Hee Seung Chin, MD, PhD
Department of Ophthalmology, Inha University Hospital,
#27 Inhang-ro, Jung-gu, Incheon 400-711, Korea
Tel: 82-32-890-2400, Fax: 82-32-890-2417
E-mail: hschin@inha.ac.kr

* This study was presented as a poster at the 110th Annual Meeting of the Korean Ophthalmological Society 2013.

* This study was supported by Inha University Research Grant.

© 2014 The Korean Ophthalmological Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

형성하는 역할을 한다.⁶ 특히 연령관련 황반변성에서 시력 손실은 황반부의 망막색소상피세포 및 브루크막의 변성, 광수용체의 파괴에 기인한다.⁷

최근 연령관련 황반변성에 대하여 anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF)를 이용한 약물치료가 시도되고 있으나 연령관련 황반변성에 대한 확실한 치료는 아직 없는 상태이다.⁶ 망막은 만성적인 산화 스트레스에 노출되어 있으며, 만성적인 산화 스트레스는 망막색소상피세포의 기능을 손상시키고, 세포 사멸에 이르게 함으로써 연령관련 황반변성에 중요한 위험인자로 생각되고 있다.^{8,9}

산화스트레스에 대하여 스트레스 단백질을 활성화함으로써 세포를 보호하는 것은 일반적인 세포들의 반응이다.¹⁰ 망막색소상피세포 역시 산화스트레스에 대한 몇 가지 방어 효소를 생성한다.¹¹ 그중 하나인 헴산화효소(Hemeoxygenase, HO)의 산화스트레스에 대한 망막색소상피세포의 보호 작용은 이미 잘 알려졌다.¹² 또 다른 망막색소상피세포의 산화스트레스에 대한 방어 효소로 카탈라아제(catalase)가 있다.¹¹ Catalase는 과산화수소(H_2O_2)를 물(H_2O)과 산소(O_2)로 전환시키는 촉매 작용을 하며, 수산화 라디칼(Hydroxyl radical, OH)의 생성을 억제함으로써 항산화 작용을 하게 된다. Catalase는 산소 호흡을 하는 대부분의 세포에서 관찰되며, catalase 한 분자는 분당 6,000,000 분자의 과산화수소(H_2O_2)를 물(H_2O)과 산소(O_2)로 전환시킬 수 있다.^{13,14} 그러나 아직까지 망막색소상피세포에서는 catalase에 의한 항산화 작용에 대한 연구가 충분히 이루어지지 않은 상태이다.

고지혈증 치료에 널리 쓰이고 있는 스타틴은 3-hydroxy-methyl glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) 환원 효소를 억제함으로써 체내 콜레스테롤을 낮추는 역할을 한다.¹⁵ 스타틴은 관상동맥 질환을 앓고 있는 환자들에서 동맥경화의 진행을 늦추는 데 효과가 있으며, 심혈관 질환에 의한 사망률 감소에도 효과가 입증되었다.¹⁶ 또한 스타틴은 지질강화 효과 이외에 연령관련 황반변성의 발병에 중요한 역할을 하는 염증 반응, 산화스트레스, 신생혈관 생성을 억제하는 다양한 효과를 가지고 있다.¹⁷⁻²² 이에 본 연구는 심바스타틴이 인체 망막색소상피세포에서 항산화 효소인 catalase의 발현에 어떤 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

대상과 방법

세포주 배양

인체망막색소상피세포주(ARPE-19; ATCC No. CRL-2302)를 95%의 공기와 5%의 이산화탄소 환경의 습윤 배양기에서 37°C의 온도로 배양하였다. 배양액은 basal Dulbecco's modified Eagle's medium과 Ham's F12 medium의 1:1 혼합

배양액으로(DMEM/F-12) fetal bovine serum 10%와 penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL)을 함유하고 있다(penicillin-streptomycin, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). 3일마다 배양액을 교환하였다. 배양된 세포주의 5번째에서 6번째 계대배양된 세포를 실험에 사용하였다.

Catalase의 mRNA 발현

인체망막색소상피세포에서 심바스타틴과 H_2O_2 가 catalase의 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)을 시행하였다. 인체망막색소상피세포를 1×10^6 cell/dish로 희석한 후 100 mm dish에서 24시간 동안 배양하였다. PBS로 배양액을 2회 세척한 후 serum free media로 바꿔 주었다. 처리한 약물과 배양 시간을 달리하여 배양한 후 PBS로 2회 세척하였다. RNA는 Total RNA Purification kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 분리하였다. 분리된 RNA는 정량하여 Primer Script™ RT reagent kit (Takara, Dalian, China)를 이용하여 반응액을 합성하였다. KAPA SYBR FAST® qPCR Kit Master Mix (2X) ABI Prism™ (KAPABIOSYSTEMS, Boston, USA)에 합성한 cDNA와 catalase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primer를 각각 넣고 real-time PCR을 시행하였다. 본 실험은 3회 반복하여 실행하였다.

위의 방법으로 인체망막색소상피세포를 준비한 후 심바스타틴을 농도별로(0-10 µM) 처리하고 6시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에서 RNA를 분리하여 real time-PCR을 시행하였다.

같은 방법으로 준비된 인체망막색소상피세포에 1일 뒤 심바스타틴 10 µM을 처리한 후 각각 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에서 RNA를 분리하여 real-time PCR을 시행하였다.

준비된 인체망막색소상피세포에 H_2O_2 200 µM과 농도별 심바스타틴(0-10 µM) 처리한 후 6시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에서 RNA를 분리하여 real-time PCR을 시행하였다.

Catalase Assay

인체망막색소상피세포에서 심바스타틴과 H_2O_2 가 catalase의 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Catalase Assay Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 catalase assay를 시행하였다. 인체망막색소상피세포를 1×10^6 cell/dish로 희석한 후 100 mm dish에서 24시간 동안 배양하였다. PBS로 배양액을 2회 세척한 후 serum free media로 바꿔 주었다. 처리한 약물과 배양 시간을 달리하여 배양한 후 PBS로 2회 세척하였다. 100 µL의 Assay Buffer에

30 μL 의 methanol과 20 μL 의 sample solution을 첨가하여 반응액을 합성하였다. 반응액에 20 μL 의 H_2O_2 를 첨가한 후 상온에서 20분간 배양하였다. 반응을 종결시키기 위하여 30 μL 의 Potassium Hydroxide과 30 μL 의 Catalase Purpald (Chromagen)을 첨가한 후 상온에서 10분간 배양하고 10 μL 의 Catalase Potassium Periodate을 첨가한 후 상온에서 5분간 배양하였다. Microplate reader (Bio-Tek, Cambridge, MA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 실험은 3회 반복하여 실행하였다.

위의 방법으로 인체망막색소상피세포를 준비한 후 심바스타틴을 농도별로(0-10 μM) 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에서 catalase assay를 시행하였다.

같은 방법으로 준비된 인체망막색소상피세포에 1일 뒤 심바스타틴 10 μM 을 처리한 후 각각 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에서 catalase assay를 시행하였다.

준비된 인체망막색소상피세포에 H_2O_2 200 μM 과 농도별 심바스타틴을(0-10 μM) 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에서 catalase assay를 시행하였다.

활성산소종의 측정

인체망막색소상피세포에 심바스타틴 10 μM , 과산화수소

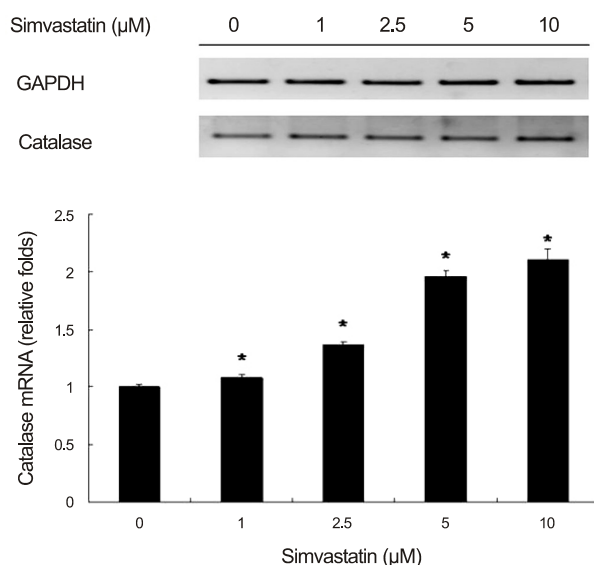


Figure 1. Expression of catalase mRNA in human retinal pigment epithelium increased with increasing concentrations of simvastatin. Human retinal pigment epithelium was cultured in various concentrations of simvastatin for 6 hours. Expression of catalase messenger ribonucleic acid (mRNA) was calibrated using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The experiments were performed 3 times independently and the data are shown as means \pm SD. * $p < 0.05$ versus the control.

200 μM 과 심바스타틴 10 μM 을 전처리 하였다. 배양액을 세척하고 20 μM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCFH-DA}$)로 표지하였다. $\text{H}_2\text{DCFH-DA}$ 는 세포 내에서 활성산소종에 의해 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)으로 전환된다. 37°C에서 30분간 세포를 배양한 후 HBSS로 세척하였다. 세포 내 활성산소종은 fluorescence activated cell sorter (FACS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.²³ 또한 catalase의 비가역적 억제제인 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT)을 심바스타틴을 처리하기 전 15분간 처리하였다.

통계 분석

3회의 독립된 실험 후 평균 \pm 표준편차로 실험 결과를 표시하였다. 통계는 통계 소프트웨어(IBM SPSS Statistics 19; SPSS INC., Chicago, IL, USA)를 이용하였고, 실험군과 대조군의 차이는 Kruskal-wallis test를 이용하였다. 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 정의하였다.

결 과

심바스타틴의 catalase 유도 효과

심바스타틴을 인체망막색소상피세포에 다양한 농도로(0, 1, 2.5, 5, 10 μM) 노출시킨 후 6시간 동안 배양하고, real-time PCR을 시행하여 catalase의 유전자 발현을 측정하였다. 인체망막색소상피세포가 심바스타틴에 노출되었을 때 10 μM 까지 catalase의 유전자 발현이 농도에 비례하여 증가하는 경향을 보였다($p < 0.05$) (Fig. 1).

다양한 농도의 심바스타틴을(0, 1, 2.5, 5, 10 μM) 인체망

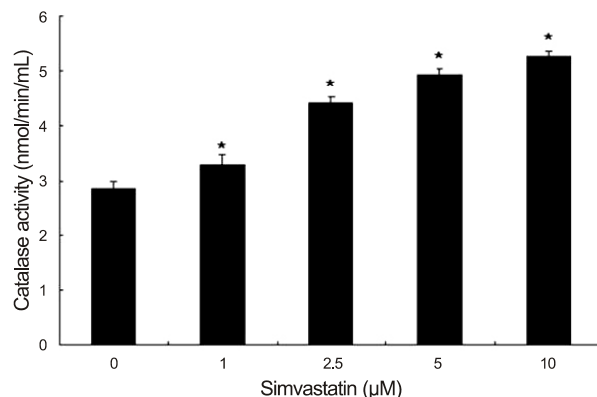


Figure 2. Catalase activity increased with increasing concentrations of simvastatin in human retinal pigment epithelium. Human retinal pigment epithelium was cultured with various concentrations of simvastatin for 24 hours. The experiments were performed 3 times independently and the data are shown as means \pm SD. * $p < 0.05$ versus the control.

막색소상피세포에 노출시킨 후 24시간 동안 배양하고 catalase assay를 시행하여 catalase의 활성도를 측정하였다. 인체 망막색소상피세포가 심바스타틴에 노출되었을 때 10 μ M까지 catalase의 활성도가 농도에 비례하여 증가하는 경향을 보였다($p<0.05$) (Fig. 2).

심바스타틴 10 μ M을 인체망막색소상피세포에 노출시킨 후 다양한 시간 동안 배양하고 real-time PCR과 catalase assay를 시행하여 catalase의 유전자 발현과 활성도를 측정하였다. 인체망막색소상피세포가 10 μ M의 심바스타틴에 노출

되었을 때 12시간까지 catalase의 유전자 발현이 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 인체망막색소상피세포가 10 μ M의 심바스타틴에 노출되었을 때 24시간까지 catalase의 활성도가 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보였다($p<0.05$) (Fig. 3).

산화스트레스하 심바스타틴의 catalase 유도 효과

인체망막색소상피세포에 산화제인 H_2O_2 (200 μ M)와 다양한 농도의 심바스타틴을 노출시킨 후 6시간 동안 배양하

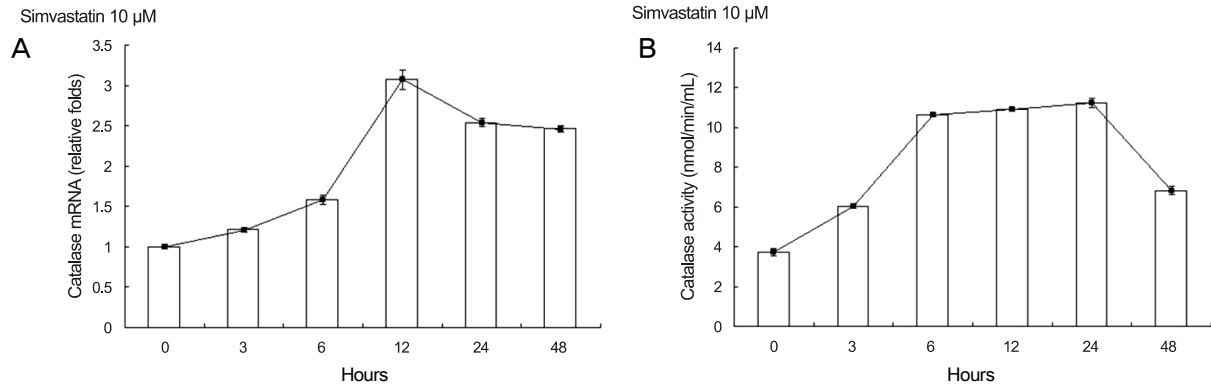


Figure 3. Expression of catalase increased as exposure time with simvastatin increased in human retinal pigment epithelium. (A) Expression of catalase mRNA increased as exposure time with simvastatin increased in human retinal pigment epithelium. Human retinal pigment epithelium was cultured in 10 μ M of simvastatin for various amounts of time. The highest level of catalase mRNA was expressed following 12 hours of culture and the effect lasted for at least 48 hours. (B) Catalase activity increased as exposure time with simvastatin increased in human retinal pigment epithelium. Human retinal pigment epithelium was cultured in 10 μ M of simvastatin for various amounts of time. Catalase activity increased significantly after 6 hours. Catalase activity reached highest levels at 24 hours and the increase lasted for at least 48 hours. The experiments were performed 3 times independently and the data are shown as means \pm SD.

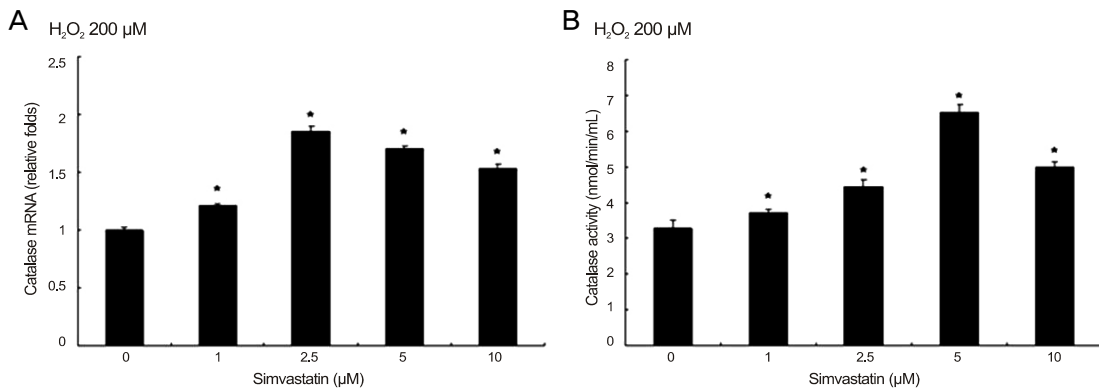


Figure 4. Expression of catalase increased as the concentration of simvastatin increased under oxidative stress (H_2O_2) in human retinal pigment epithelium. (A) Expression of catalase messenger ribonucleic acid (mRNA) increased as the concentration of simvastatin increased under oxidative stress in human retinal pigment epithelium. Human retinal pigment epithelium was cultured in 200 μ M of H_2O_2 and various concentrations of simvastatin for 6 hours. The highest level of catalase mRNA was expressed with 2.5 μ M of simvastatin and the effect lasted by 10 μ M of simvastatin. Expression of catalase mRNA was calibrated using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). (B) Human retinal pigment epithelium was cultured in 200 μ M of H_2O_2 and various concentrations of simvastatin for 24 hours. Catalase activity reached the highest levels with 5 μ M of simvastatin. The effects of catalase activity induced by simvastatin diminished with 10 μ M of simvastatin. The experiments were performed 5 times independently and the data are shown as means \pm SD.

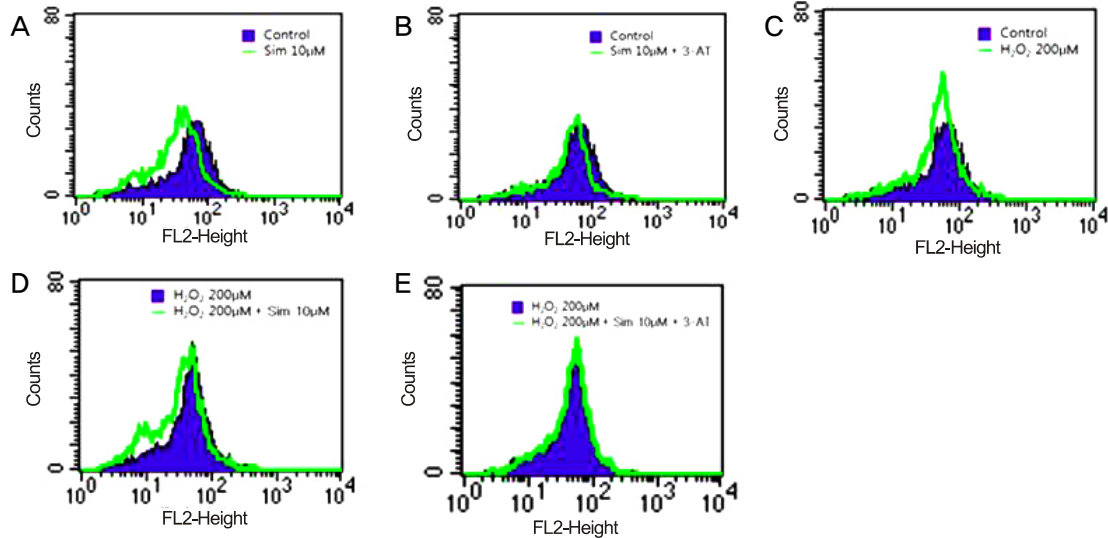


Figure 5. The effects of simvastatin on reactive oxygen species (ROS) formation in human retinal pigment epithelium. (A) Simvastatin inhibited ROS formation in human retinal pigment epithelial cells. (B) The anti-oxidative effect of simvastatin diminished in the presence of the catalase inhibitor, 3-AT. (C) ROS formation increased following exposure to H_2O_2 in human retinal pigment epithelial cells. (D) Simvastatin inhibited ROS formation in human retinal pigment epithelial cells under oxidative stress. (E) The anti-oxidative effect of simvastatin was diminished in the presence of the catalase inhibitor, 3-AT, under oxidative stress. The data are reported as means \pm SD of 3 experiments performed independently.

고, real-time PCR을 시행하여 catalase의 유전자 발현을 측정하였다. 인체망막색소상피세포가 산화스트레스하($200 \mu M$ H_2O_2) 심바스타틴에 노출되었을 때 catalase의 유전자 발현이 심바스타틴의 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였다. $2.5 \mu M$ 의 심바스타틴을 처리하였을 때 catalase의 유전자 발현이 가장 높게 증가하였으며, $10 \mu M$ 까지 그 효과는 지속되었다($p < 0.05$) (Fig. 4).

인체망막색소상피세포에 산화제인 H_2O_2 ($200 \mu M$)와 다양한 농도의 심바스타틴을 노출시킨 후 24시간 동안 배양하고, catalase assay를 시행하여 catalase의 활성도를 측정하였다. 인체망막색소상피세포가 산화스트레스하($200 \mu M$ H_2O_2) 심바스타틴에 노출되었을 때 catalase의 활성도는 $5 \mu M$ 에서 가장 높은 활성도 증가를 보였고, $10 \mu M$ 에서는 심바스타틴의 catalase 활성도를 증가시키는 효과가 감소되었다($p < 0.05$) (Fig. 4).

심바스타틴의 항산화작용

인체망막색소상피세포 내 산화스트레스를 정량화하기 위해, 활성산소종의 양을 FACS를 이용하여 측정하였다. 인체망막색소상피세포에 $10 \mu M$ 의 심바스타틴을 처리하였을 때, 활성산소종의 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 심바스타틴에 의한 활성산소종 생성 억제 효과는 catalase 억제제인 3-AT에 의해 억제되는 것을 확인할 수 있다

(Fig. 5B). 인체망막색소상피세포에 $200 \mu M$ 의 H_2O_2 를 처리하여 산화스트레스를 유도하였을 때 활성산소종이 증가하는 것을 확인할 수 있다(Fig. 5C). 인체망막색소상피세포에 $200 \mu M$ 의 H_2O_2 와 함께 $10 \mu M$ 의 심바스타틴을 처리하였을 때, H_2O_2 에 의해 증가된 활성산소종의 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있다(Fig. 5D). 심바스타틴에 의한 활성산소종 생성 억제 효과는 catalase 억제제인 3-AT에 의해 억제되는 것을 확인할 수 있다(Fig. 5E).

고 찰

연령관련 황반변성은 만성적인 산화스트레스에 대한 노출로 항산화 방어 기제가 약화됨으로써 유발된다.^{8,9} 이렇게 한 번 손실된 시력은 이후 적극적인 치료에도 불구하고 회복하는 것은 매우 어렵다.^{1,4} 따라서 연령관련 황반변성이라는 질병에 있어 치료 못지 않게 예방이 중요하다고 할 수 있다. Age-Related Eye Disease Study research group (AREDS)의 연구에 따르면 항산화 작용을 하는 비타민을 장기적으로 복용할 경우 연령관련 황반변성에 의한 시력 손실을 막고 질환의 진행을 늦출 수 있는 것으로 확인되었다.^{24,25} 이 연구 결과는 연령관련 황반변성이 예방 가능할 수 있는 질환임을 시사한다.

최근 혈중 지질 상태와 연령관련 황반변성의 관련성에 대

한 연구도 활발히 진행 중이다. 혈중 지질 수치가 낮을수록 연령관련 황반변성과 같은 안내 질환에 효과가 있다는 보고가 있으며, 이러한 연구 결과들은 스타틴이 안내 질환의 예방에 도움이 될 수 있다는 가설에 힘을 실어 준다. 즉, 스타틴은 맥락막모세혈관의 혈류량을 증가시켜 지질의 축적을 억제함으로써 연령관련 황반변성을 예방하거나 진행을 늦출 수 있을 것으로 기대된다.²⁶⁻³⁰ 실제로 최근 스타틴이 연령관련 황반변성의 예방에 도움이 된다는 연구 결과들이 발표되고 있다. 한 case-control 연구에서 대조군과 비교하여 스타틴을 복용하는 사람들에서 연령관련 황반변성에 대한 보호 효과가 있다는 보고를 한 바 있다.³¹ 또 다른 case-control 연구에서 스타틴이 습성 연령관련 황반변성에 대해 보호 효과가 있다는 보고가 있었다.³² 그러나 아직 스타틴의 연령관련 황반변성의 보호 효과에 대한 실험적, 임상적 근거는 부족한 상태이다.

드루젠(drusen) 역시 연령관련 황반변성의 위험 인자로 알려져 있으며 드루젠의 생성에 있어 염증반응과 면역반응의 관련성에 대한 보고가 있다.³³⁻³⁵ 따라서 스타틴이 가지고 있는 지질 강하 효과 이외의 항염증 작용 역시 병태생리적 측면에서 연령관련 황반변성을 예방할 수 있는 근거가 될 수 있을 것으로 생각한다.^{26,36-39}

또한 습성 연령관련황반변성이 있는 인체망막색소상피세포에서 HO-1과 catalase의 활성이 증가되고, 연령이 증가할수록 두 효소의 활성이 저하된다는 사실이 보고된 바 있다.⁴⁰ 이 연구에 따르면 인체망막색소상피세포가 만성 산화스트레스를 받을 경우 이에 대한 세포의 방어 기전으로 항산화 효소인 catalase를 발현시키게 되며, 노화가 진행될수록 항산화 효소인 catalase의 활성이 떨어짐으로써 산화 스트레스에 대한 방어 작용이 떨어지고 연령관련 황반변성의 발병 위험을 높이는 것으로 생각한다. 따라서 인체망막색소상피세포에서 catalase의 발현을 향상시키는 것은 연령관련 황반변성을 예방에 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

최근 catalase가 중추신경계 보호에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.^{41,42} 또한 catalase의 발현을 향상시킴으로써 알츠하이머병과 같은 중추신경계의 퇴행성 질환을 예방하는 방법을 찾는 연구도 활발하게 진행 중이다.⁴³ 따라서 catalase가 인체망막색소상피세포뿐만 아니라 시신경 보호 측면에서도 효과가 있을 것으로 기대된다.

스타틴은 지질강하 효과 이외에 항산화, 항염증 작용 등도 하는 것으로 알려지면서 이에 대한 연구들이 활발하게 진행 중이다.¹⁷⁻²² 스타틴은 체내에 항산화 작용을 하는 단백을 유도함으로써 항산화 작용을 하게 된다.¹² Catalase는 스타틴에 의해 유도되는 항산화 단백질 중 하나로 과산화수소(H_2O_2)를 물(H_2O)과 산소(O_2)로 전환시키는 촉매 작용을 하며, 수산화

라디칼(Hydroxyl radical, OH)의 생성을 억제함으로써 항산화 작용을 하게 된다.¹³ 스타틴은 여러 종류의 세포에서 catalase를 유도하는 것으로 알려졌는데, 특히, erythrocyte, vascular endothelium, vascular smooth muscle cell에서 catalase의 발현을 유도함으로써 항산화 작용을 하는 것으로 확인되었다.⁴⁴⁻⁴⁶ 또한 연령관련 황반변성에 있어 산화스트레스와 스타틴의 중요성이 높아지면서 인체망막색소상피세포에 대한 심바스타틴의 독성에 대한 연구가 이루어진 바 있다.¹² 이 연구에 따르면 심바스타틴 10 μM 이하의 저농도에서는 인체망막색소상피세포에 독성 작용이 없는 것으로 알려졌다. 이에 본 연구에서는 10 μM 이하 저농도의 심바스타틴이 인체망막색소상피세포 내 catalase의 유전자 발현 및 활성도를 향상시키고 이를 통한 항산화 효과를 확인할 수 있었다.

연령관련 황반변성 발병의 핵심 위험 인자로 알려진 산화스트레스를 줄이는 것은 연령관련 황반변성을 예방하는 데 도움이 될 수 있으며, 본 연구에서는 심바스타틴이 인체망막색소상피세포 내 catalase의 유전자 발현 및 활성도를 향상시키고 이를 통한 항산화 효과를 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 심바스타틴의 항산화 효과는 만성적인 산화스트레스에 의해 유발되는 연령관련 황반변성의 예방에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

REFERENCES

- 1) Friedman DS, O'Colmain BJ, Muñoz B, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. Arch Ophthalmol 2004;122:564-72.
- 2) Bressler NM, Bressler SB, Congdon NG, et al. Potential public health impact of Age-Related Eye Disease Study results: AREDS report no. 11. Arch Ophthalmol 2003;121:1621-4.
- 3) Klein R, Chou CF, Klein BE, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. Arch Ophthalmol 2011; 129:75-80.
- 4) Rein DB, Wittenborn JS, Zhang X, et al. Forecasting age-related macular degeneration through the year 2050: the potential impact of new treatments. Arch Ophthalmol 2009;127:533-40.
- 5) Yoon KC, Mun GH, Kim SD, et al. Prevalence of eye diseases in South Korea: data from the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2008-2009. Korean J Ophthalmol 2011;25: 421-33.
- 6) Folk JC, Stone EM. Ranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration. N Engl J Med 2010;363:1648-55.
- 7) Young RW. Pathophysiology of age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 1987;31:291-306.
- 8) Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD, Sternberg P. Oxidative damage and age-related macular degeneration. Mol Vis 1999;5:32.
- 9) Beatty S, Koh H, Phil M, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 2000;45:115-34.
- 10) Jäättelä M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. Ann Med

- 1999;31:261-71.
- 11) Tate DJ Jr, Miceli MV, Newsome DA. Phagocytosis and H2O2 induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1271-9.
- 12) Kim KJ, Kim KS, Kim NR, Chin HS. Effects of simvastatin on the expression of heme oxygenase-1 in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:6456-64.
- 13) Haque R, Chun E, Howell JC, et al. MicroRNA-30b-mediated regulation of catalase expression in human ARPE-19 cells. *PLoS One* 2012;7:e42542.
- 14) Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:192-208.
- 15) Shepherd J. Statins: is there a need for alternative or adjunctive therapy? *Br Heart J* 1995;74:13.
- 16) Brown G, Albers JJ, Fisher LD, et al. Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N Engl J Med* 1990;323:1289-98.
- 17) Chuo JY, Wiens M, Etminan M, Maberley DA. Use of lipid-lowering agents for the prevention of age-related macular degeneration: a meta-analysis of observational studies. *Ophthalmic Epidemiol* 2007;14:367-74.
- 18) Pruefer D, Scalia R, Lefer AM. Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2894-900.
- 19) Jialal I, Stein D, Balis D, et al. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation* 2001;103:1933-5.
- 20) Wassmann S, Laufs U, Müller K, et al. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:300-5.
- 21) Yamada K, Sakurai E, Itaya M, et al. Inhibition of laser-induced choroidal neovascularization by atorvastatin by downregulation of monocyte chemotactic protein-1 synthesis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:1839-43.
- 22) Dobrucki LW, Kalinowski L, Dobrucki IT, Malinski T. Statin-stimulated nitric oxide release from endothelium. *Med Sci Monit* 2001;7:622-7.
- 23) Qian J, Keyes KT, Long B, et al. Impact of HMG-CoA reductase inhibition on oxidant-induced injury in human retinal pigment epithelium cells. *J Cell Biochem* 2011;112:2480-9.
- 24) Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1417-36.
- 25) Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *JAMA* 2013;309:2005-15.
- 26) Peponis V, Chalkiadakis SE, Bonovas S, Sitaras NM. The controversy over the association between statins use and progression of age-related macular degeneration: a mini review. *Clin Ophthalmol* 2010;4:865-9.
- 27) Guymer RH, Dimitrov PN, Varsamidis M, et al. Can HMG Co-A reductase inhibitors ("statins") slow the progression of age-related macular degeneration? The age-related maculopathy statin study #ARMSS#. *Clin Interv Aging* 2008;3:581-93.
- 28) Friedman E, Rigas IK, Makar M. The relationship of statin use to the development of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:199.
- 29) Delcourt C, Michel F, Colvez A, et al. Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the POLA study. *Ophthalmic Epidemiol* 2001;8:237-49.
- 30) van Leeuwen R, Klaver CC, Vingerling JR, et al. Cholesterol and age-related macular degeneration: is there a link? *Am J Ophthalmol* 2004;137:750-2.
- 31) Drobek-Słowik M, Karczewicz D, Safranow K, et al. [Use of statins as a form of protection against age-related macular degeneration (AMD)]. *Klin Oczna* 2008;110:50-4.
- 32) Fong DS, Contreras R. Recent statin use and 1-year incidence of exudative age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2010;149:955-8.e1.
- 33) Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol* 2002;134:411-31.
- 34) Johnson LV, Leitner WP, Staples MK, Anderson DH. Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2001;73:887-96.
- 35) Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, Hageman GS. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J* 2000;14:835-46.
- 36) Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation /CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA* 2001;286:64-70.
- 37) Lopez PF, Sippy BD, Lambert HM, et al. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:855-68.
- 38) Simons M. Molecular multitasking: statins lead to more arteries, less plaque. *Nat Med* 2000;6:965-6.
- 39) Dichtl W, Dulak J, Frick M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:58-63.
- 40) Frank RN, Amin RH, Puklin JE. Antioxidant enzymes in the macular retinal pigment epithelium of eyes with neovascular age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 1999;127:694-709.
- 41) Olsen RH, Johnson LA, Zuloaga DG, et al. Enhanced hippocampus-dependent memory and reduced anxiety in mice over-expressing human catalase in mitochondria. *J Neurochem* 2013 Feb 5. [Epub ahead of print]
- 42) Gáspár T, Domoki F, Lenti L, et al. Neuroprotective effect of adenoviral catalase gene transfer in cortical neuronal cultures. *Brain Res* 2009;1270:1-9.
- 43) Milton NG. Inhibition of catalase activity with 3-amino-triazole enhances the cytotoxicity of the Alzheimer's amyloid-beta peptide. *Neurotoxicology* 2001;22:767-74.
- 44) Piechota-Polanczyk A, Goraca A, Demyanets S, et al. Simvastatin decreases free radicals formation in the human abdominal aortic aneurysm wall via NF-κB. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012; 44:133-7.

- 45) Wassmann S, Laufs U, Müller K, et al. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:300-5.
- 46) Broncel M, Koter-Michalak M, Chojnowska-Jezierska J. [The ef-

fect of statins on lipids peroxidation and activities of antioxidants enzymes in patients with dyslipidemia]. *Przegl Lek* 2006;63: 738-42.

= 국문초록 =

심바스타틴이 인체망막색소상피세포에서 카탈라아제 발현에 미치는 영향

목적: 심바스타틴이 인체망막색소상피세포에서 항산화 효소인 카탈라아제(catalase)의 발현에 어떤 영향을 미치는지 알아보고자 한다.

대상과 방법: 배양한 인체망막색소상피세포에 심바스타틴을 농도별로 각각 6시간, 24시간 동안 노출시킨 후 real-time PCR과 catalase assay를 통해 catalase의 mRNA의 발현 정도와 활성도를 관찰하였다. 인체망막색소상피세포에 과산화수소 200 μ M와 심바스타틴을 농도별로 노출시킨 후 real-time PCR과 catalase assay를 통해 catalase의 mRNA의 발현 정도와 활성도를 관찰하였다. 또한 형광이용세포분류기를 이용하여 세포 내 활성산소를 측정하였다.

결과: 인체망막색소상피세포에 심바스타틴을 노출시켰을 때 10 μ M까지 농도에 비례하여 catalase의 mRNA와 활성도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 과산화수소 200 μ M를 전처리한 인체망막색소상피세포에서는 2.5 μ M의 심바스타틴에 노출되었을 때 catalase의 mRNA가 가장 높게 증가하였고, 5 μ M의 심바스타틴에 노출되었을 때 catalase의 활성도가 가장 높게 증가하였다. 심바스타틴에 의한 활성산소 감소 효과는 catalase의 억제제인 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT)을 함께 처리하였을 때 복귀되었다.

결론: 인체망막색소상피세포에서 심바스타틴은 catalase의 발현을 증가시킴으로써 항산화 효과를 나타낸다. 이러한 심바스타틴의 항산화 효과는 산화스트레스에 의해 유발되는 연령관련 황반변성의 예방에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

〈대한안과학회지 2014;55(10):1535-1542〉
