

장기간 복막투석시 발생하는 섬유화에 대한 TGF- β 1 Antisense의 억제 효과

계명대학교 신장연구소, 의과대학 내과학교실, 대구카톨릭대학교 의과대학 병리학교실*
동국대학교 의과대학 내과학교실*

이진구 · 박성배 · 한승엽 · 황은아 · 박관규* · 이정호[#] · 김현철

Effect of TGF- β 1 Antisense Oligodeoxynucleotides on Fibrosis of Peritoneum in Peritoneal Dialysis Animal Model and Mesothelial Cells Cultured in High Glucose Media

Jin Gu Lee, Sung Bae Park, M.D., Seung Yeup Han, M.D., Eun Ah Hwang, M.D.,
Kwan Kyu Park, M.D. *, Jeong-Ho Lee, M.D. [#], Hyun Chul Kim, M.D.

*Dong San Kidney Institute and Department of Internal Medicine,
Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea
Department of Pathology, Catholic University of Daegu*, Daegu, Korea
Department of Internal Medicine, Dongguk University[#], Kyungju, Korea*

Abstract : Ultrafiltration failure is a major cause of dropout of long-term peritoneal dialysis (PD), and often related to peritoneal fibrosis. High glucose solution in dialysate has been implicated as a culprit of peritoneal fibrosis in long-term PD patients. We examined the protective effect of TGF- β 1 antisense on peritoneal fibrosis. Human peritoneal mesothelial cells (HPMCs) were isolated from omentum and divided into three groups as control, incubated with high glucose, and incubated with high glucose and transfected TGF- β 1 antisense groups. In animal experiment, Sprague-Dawley rats were divided into two groups as control PD group and TGF- β 1 antisense treated PD groups. The degree of fibrosis were assayed by RT-PCR, H&E stain, immunohistochemistry stain and Masson's Trichrome stain. The TGF- β 1 expression in vitro increased 1.6 times in the group treated with high glucose solution, and was normalized by the addition of TGF- β 1 antisense. In the animal model of PD, submesothelial thickening and depositions of collagen were seen under light microscopy. The degree of peritoneal fibrosis increased with the time on PD treatment. The addition of TGF- β 1 antisense into the dialysate reduced the deposition of collagen, however, it failed to show the protective effect against peritoneal thickening. In conclusion, the present study demonstrates that high glucose up-regulates TGF- β 1 expression in the cultured HPMCs, which is normalized by addition of TGF- β 1 antisense. The protective effect of TGF- β 1 antisense

on peritoneal fibrosis could not be demonstrated in the animal model of PD.

Key Words : Antisense oligodeoxynucleotide, Fibrosis, High-glucose, Peritoneal dialysis, Transforming growth factor- β 1

서 론

현재 말기 신부전증의 신대체요법으로 확고한 위치를 차지하고 있는 복막투석은 혈액투석에 비해 여러 가지 장점이 있으나 장기간 시행할 경우 복막의 섬유화로 인한 한외여과 부전을 초래하여 결국 복막투석을 더 이상 계속할 수 없는 문제점이 있다[1]. 복막의 섬유화로 인한 한외여과 부전은 복막염 및 복막투석액 자체에 의한 것으로 알려져 있다[2,3]. 현재 상용화되어 있는 복막투석액은 고농도의 포도당, 높은 삼투압 및 낮은 pH를 특징으로 하는 비생리적 용액으로 특히 고농도의 포도당은 복막 중피세포의 성장 및 재생을 억제하고, transforming growth factor (TGF)- β 1 유전자 발현의 증가, 산화성 손상 및 진행성 후기당화 산물(advanced glycosylation end products)의 생성을 증가시켜 복막 섬유화를 유발시키는 것으로 알려져 있다[4-6].

그 동안 복막의 섬유화를 방지하기 위해 복막 휴식[7], 생체 적합성 투석액의 개발[8], 투석액 내의 당분해산물 농도 감소[9], 포도당 중합체 투석액[10], 세포 내 유리기 제거 물질[11], 항섬유화 제제[12], 유전자 치료[13] 등이 시도되었으나 아직도 미흡한 실정이다.

저자들은 먼저 고농도의 포도당이 복막 중피세포에서 TGF- β 1의 발현을 증가시킨다는 것을 확인한 후 복막투석 동물모델을 이용하여 복막투석 시행 기간에 따른 복막의 조직학적 변화에 대한 관찰을 통해 고농도 포도당 투석액이 복막 섬유화에 미치는 영향을 관찰하고, TGF- β 1에 대한 antisense oligodeoxynucleotides(ODNs)를 투석액에 혼합 주입하여 TGF- β 1 mRNA의 발현을 억제함으로써 섬유화에 대한 억제효과를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. TGF- β 1 antisense ODNs 제작

TGF- β 1 antisense ODNs에 대한 적정 부위 선정은 전체 TGF- β 1 염기서열에 대해 DNAsis 프로그램(Hitach Software, CA, USA)을 사용하여 1개의 목적 부위를 갖는 antisense ODNs를 선정하였다. 그 염기서열은 다음과 같다: 5'-TGTGTGTGATGTCTTTGGTTTGTTCATAGATTGCGTTGTTGCGGTC-3' (TGF- β 1 site; 755-800). 둥근 형태의 2차 구조 형성을 위하여 5' 말단을 인산화시키고 BamHI 자리를 첨가시켜 58mer의 TGF- β 1 antisense ODNs를 바이오닉스사(Seoul, Korea)로부터 주문 제작하여 사용하였다. 58mer의 TGF- β 1 antisense ODNs를 혼합하여 95°C에서 3분 동안 열을 가한 후 실온에서 서서히 식히고 T4 DNA 연결효소를 첨가하여 16°C에서 16시간 반응시켜 연결시켰다. 연결 확인을 위하여 15% denaturing polyacrylamide gel에서 전기영동하여 원형 antisense ODNs의 형성을 확인한 후 실험에 사용하였다.

2. Hemagglutinating virus of Japan(HVJ)-liposome 제작

우선 수정란을 37°C에서 10일 간 배양한 후 HVJ 바이러스를 polypeptone에 희석하여 주입하고 35.5°C에서 3일 간 배양하였다. 4°C에서 1일 간 둔 후 수정란에서 바이러스 현탁액을 추출해 내어 4°C, 3,000 rpm에서 10분 간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 그리고 상층액을 다시 4°C, 15,000 rpm에서 50분 간 원심분리하여 침전물을 balanced salt

solution(BSS)에 녹여 HVJ 바이러스를 분리해서 사용하였다. HVJ-liposome을 만들기 위하여 egg yolk phosphatidylcholine(ePC), dioleoyl phosphatidylethanolamine(DOPE), egg yolk sphingomyelin(eSph), bovine brain phosphatidylserine(bPS), cholesterol(Chol)을 16.7 : 16.7 : 16.7 : 10 : 50의 비율로 튜브에 넣고 클로르포름에 녹여 진공상태에서 회전하면서 증발시켜 튜브벽에 얇은 지질막을 형성하게 하였다. 여기에 antisense ODNs와 자외선으로 비활성화시킨 HVJ 바이러스를 섞은 후 37°C에서 진탕배양을 통해 녹여서 0.2 μ m 필터를 이용해 찌거기를 제거하였다. 이렇게 얻은 용액을 30% sucrose 용액이 담긴 초고속 원심분리 용기에 서로 섞이지 않도록 조심스럽게 얹은 후 4°C, 25,000 rpm에서 2시간 동안 원심분리하여 중간에 띠를 형성한 층에서 HVJ-liposome에 둘러싸인 antisense ODNs를 회수하여 사용하였다.

3. 복막 중피세포의 배양

복막 중피세포는 Stylianou 등[14]이 기술한 방법을 이용하여 개복수술 환자로부터 제거된 장간막에서 분리하였다. 분리한 세포를 5% CO₂, 37°C에서

M199 배양액으로 24시간 배양한 후 배양액의 절반을 교환하고 이 후 72시간 마다 배양액을 교환해 주었다. 실험에 사용한 복막 중피세포는 계대 배양 3회 이내의 세포를 사용하였다. 복막 중피세포는 위상차 현미경으로 중피세포의 특징적 형태인 “조각돌” 형태를 관찰하고(Fig. 1), vimentin과 cytokeratin에 대한 면역화학염색을 시행하여 양성반응을 보임으로 확인하였다.

4. 복막 중피세포의 자극 및 TGF- β 1 antisense ODNs 핵산전달감염

고농도의 포도당이 복막 중피세포에서 TGF- β 1의 발현을 증가시키는가를 확인하기 위하여 100 mM 포도당을 함유한 배지에서 배양하여 RT-PCR로 확인하였다. 이후 고농도 포도당에 의한 TGF- β 1의 발현량 증가가 TGF- β 1 antisense ODNs에 의해 억제되는가를 조사하기 위하여 다음과 같이 실험하였다. 복막 중피세포를 지름 100 mm의 세포 배양 접시에서 혈청을 넣지 않은 배지로 36시간 동안 배양시켜 성장주기를 동일하게 맞춘 후, 각 군의 실험 조건에 따라 핵산전달감염 시행 및 10% 우태아혈청을 함유한 배지로 교환하고 다시 36시간 동안 배양

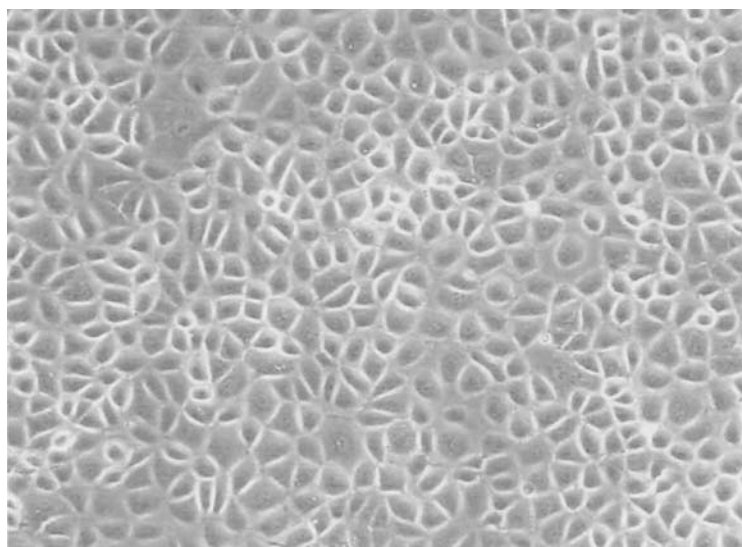


Fig. 1. Human mesothelial cell outgrowth from an explant of omentum. Cells have adopted the polygonal appearance characteristic at confluency (x 100).

하였다. 핵산전달감염은 Lipofectamin Plus Reagent(Invitrogen, CA, USA)를 사용하여 시행하였으며, TGF- β 1 antisense ODNs는 각 세포배양접시에 4 μ g을 사용하였다. 그리고 TGF- β 1 antisense ODNs가 복막 중피세포 내로 핵산전달감염되어진 것을 확인하기 위하여 TGF- β 1 antisense ODNs에 형광을 인지하여 핵산전달감염시킨 후 형광현미경으로 관찰하였다. 실험군은 복막 중피세포를 M199 배지에서 배양한 군, 100 mM 포도당을 함유한 M199 배지에서 배양한 군, 100 mM 포도당을 함유한 M199 배지에서 TGF- β 1 antisense ODNs를 핵산전달감염시켜 배양한 군으로 나누어 실험하였다. 각 조건에서 배양한 복막 중피세포에서 RNA-Bee(TEL-TEST, TX, USA)를 사용하여 total RNA를 추출한 후 분광광도계(Beckman, Peapack, USA)로 순도와 정제된 양을 측정하였으며, 추출한 RNA 2 μ g을 주형으로 역전사하여 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 주형으로 하고 Dakhama 등[15]이 사용한 것과 동일한 염기서열을 가지는 TGF- β 1 primer set(Table 1)를 첨가하여 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성시켰다. 그 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 56 $^{\circ}$ C에서 40초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 반응시키는 조건을 25회 반복하고 72 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 반응시켜 PCR을 시행한 후 1.5% agarose gel에서 전기영동하였다. TGF- β 1의 발현량은 LAS-3000 image analyzer(Fujifilm, Tokyo, Japan)로 띠의 밝기를 측정하여 정량하였으며, GAPDH의 양으로 보정하였다.

5. 복막투석 동물모델 및 복막의 섬유화양상 관찰

실험동물의 복막투석은 체중 280~300 g 정도의 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐의 복강에 도관을 삽입한 후 4.25% 포도당 투석액(Boryung, Seoul,

Korea)으로 매일 3회 교환하였다. 복막 도관 삽입은 우선 흰쥐를 흡입마취 시킨 후 검상돌기 하방에서 정중선을 따라 3 cm 가량 절개하고 복강에 둔절개를 통해 작은 구멍을 뚫었다. 이 구멍을 통해 Tenckhoff 관을 본 따 이중 커프를 부착한 실리콘 튜브(Cole-Parmer, IL, USA)를 복강 내로 삽입한 후, 내측 커프를 구멍 바로 위쪽에 봉합 고정시켰다. 투관침을 이용하여 견갑골 사이에 출구가 생기도록 피하터널을 만들어 도관을 빼낸 후 외측 커프를 출구 바로 아래쪽에 위치하도록 하여 도관을 고정시켰다. 출구 감염을 방지하기 위하여 15 G 주사바늘을 잘라 구멍을 막은 후 출구 마개로 사용하였으며, 복막염을 예방하기 위하여 복막투석액에 항생제(반코마이신 120 mg/L, 겐타마이신 32 mg/L)를 섞어서 사용하였다.

복막투석에 의한 복막의 섬유화 양상을 관찰하기 위하여 대조군은 복막투석을 시행하지 않은 흰쥐의 복막조직을 채취하였으며, 실험군은 1일 3회 투석액 교환을 6주, 8주, 12주 간 시행한 흰쥐를 두 마리씩 희생시켜 복막조직을 채취하였다.

6. 복막투석 동물모델에 TGF- β 1 antisense ODNs의 적용

3주 간 복막투석만 시행한 대조군(n=2)과 3주 간 복막투석을 시행하면서 매주 1회 즉, 1일, 8일, 15일째 TGF- β 1 antisense ODNs 50 μ g을 복막투석액에 섞어서 주입한 실험군(n=2)으로 나누어 실험하였다.

7. 복막조직 검사

채취한 조직은 복막의 두께 변화를 살펴보기 위하여 H&E 염색을 하였고, 아교질의 침착 부위 및 정

Table 1. Primer set of TGF- β 1 mRNA

Sequence		Product size (bp)
Sense	: 5'-GCCCTGGACACCAACTATTGC-3'	335
Antisense	: 5'-GCTGCACTTGCAGGAGCGCAC-3'	

도를 관찰하기 위하여 Masson's trichrome 염색을 시행하였다. 그리고 TGF- β 1의 발현 정도를 관찰하기 위하여 단클론성 항체를 사용하여서 면역조직화 염색을 시행하였다. 1차 항체로 항 TGF- β 1 항체를 37°C에서 30분간 반응시키고, 2차 항체로 biotinylated anti-mouse IgG(LSAB kit, DAKO, USA)로 37°C에서 15분간 반응시켰다. Streptavidin peroxidase(LSAB kit, DAKO, USA)로 37°C에서 15분간 반응시키고, DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 발색하여 관찰하였다.

결 과

1. 고농도 포도당으로 자극한 복막 중피세포에서 TGF- β 1 antisense ODNs가 TGF- β 1 mRNA의 발현에 미치는 효과

고농도 포도당으로 자극한 복막 중피세포에서 TGF- β 1 mRNA의 발현량이 대조군인 M199 배양액에 배양한 군에 비해서 1.6배 정도 증가하였다. 그리고 고농도 포도당으로 자극하여 TGF- β 1 antisense ODNs를 핵산전달감염시켜 배양한 군에서는 TGF- β 1 mRNA의 발현량이 대조군과 같은 수준으로 억제된 것을 관찰하였다(Fig. 2). Antisense ODNs의 복막 중피세포 내로의 핵산전달감염은 세포 내에서 형광 물질이 발광함으로 확인하였다(Fig. 3).

2. 복막투석 동물모델에서 복막투석에 의한 복막의 조직학적 변화

복막투석을 시행하지 않은 대조군 흰쥐 및 6주, 8주, 12주 간의 복막투석을 시행한 흰쥐에서 복막의 변화를 관찰하였던 바 대조군에서는 균일한 단일층 형태의 복막 중피세포층이 복벽에 얇게 덮여있음에 비해 투석을 실시한 실험군에서 복막이 비후되어 있었으며, 특히 투석기간이 길수록 중피하 간질조직이 두꺼워져 있었다(Fig. 4). TGF- β 1에 대한 면역조직화염색에서는 대조군에서 거의 관찰되지 않았

던 TGF- β 1의 발현이 8주 실험군의 복막 중피세포층에서 뚜렷이 증가하였으며, 12주 실험군에서 TGF- β 1의 발현량은 8주 실험군에 비해 감소하였으나 복막 중피세포층이 얇아지고 중피하 간질 조직이 두꺼워져 있었다(Fig. 5). 아교질의 침착부위 및 정도를 관찰하기 위한 Masson's trichrome 염색에서는 대조군에 비해서 투석기간이 길어질수록 아교질의 침착이 증가하였으며, 특히 12주 실험군에서는 중피하 간질 조직에 아교질의 침착이 증가되어 있었다(Fig. 6).

3. 복막투석 동물모델에서 TGF- β 1 antisense ODNs의 복막섬유화 억제 효과

3주간 복막투석만 시행한 대조군 흰쥐와, 3주간 복막투석을 시행하면서 매주 1회 TGF- β 1 antisense ODNs를 복막투석액에 섞어 주입한 흰쥐의 벽측 복막의 섬유화 정도를 평가하였다. H&E염색에서 양 군의 복막의 두께는 뚜렷한 차이없이 두꺼워져 있었다. TGF- β 1 antisense ODNs를 주입한 군에서 TGF- β 1의 발현이 감소한 경향이 있었으나 뚜렷한 차이는 없었다. Masson's trichrome염색에서는 아교질의 침착 부위와 침착 정도가 감소하였다(Fig. 7).

고 찰

장기간 복막투석을 시행하는 환자에서는 복막 손상으로 인해 기능적으로 용질에 대한 복막 투과도가 증가하여 투석액 내 포도당의 급격한 체내 흡수가 일어나 한외여과 부전이 발생하게 된다. 이 때 복막의 형태학적 변화로는 세포외기질의 축적, 신생혈관의 증가, 복막의 비후 등 복막 섬유화 소견이 나타난다[16,17]. 복막 섬유화의 주된 원인으로는 복막투석에 일반적으로 사용되고 있는 비생리적인 투석액의 사용과 복막염이 지목되고 있다[4-6]. 현재 사용되고 있는 복막투석액은 고농도의 포도당, 높은 삼투압 및 낮은 pH 등을 특징으로 하는 비생리적 투석액으로 이것이 복막 섬유화를 초래하는 것으로 알려져 있

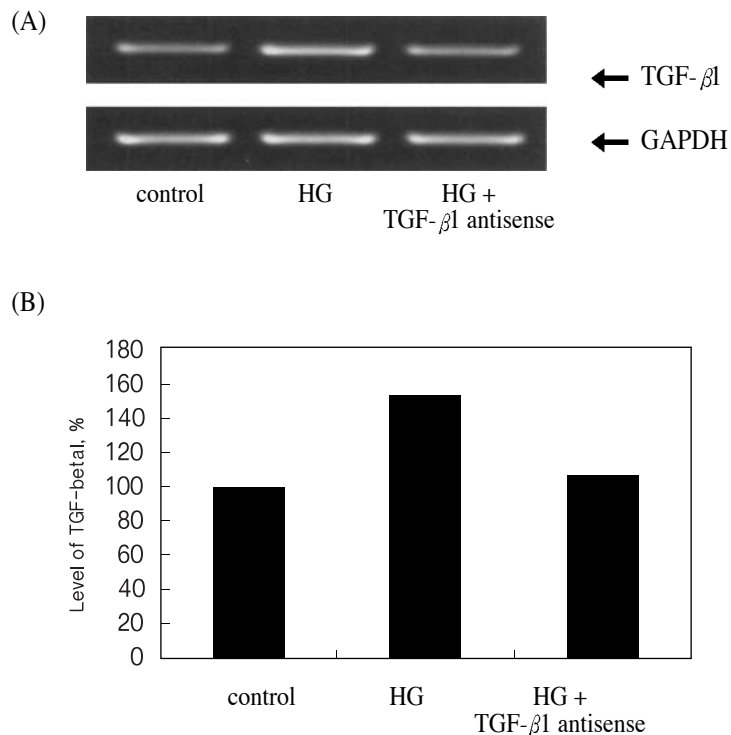


Fig. 2. The effect of TGF- β 1 antisense oligodeoxynucleotides (ODNs) on high glucose induced TGF- β 1 mRNA upregulation in human peritoneal mesothelial cells (HPMCs). After incubation of HPMC cells with control (5.6 mM glucose) or high glucose (HG, 100 mM glucose) for 36 hours, total RNA was isolated, reverse transcribed and amplified by polymerase chain reaction (A). TGF- β 1 level of each conditions was measured by LAS-3000 image analyzer (B).

다. 높은 삼투압은 그 자체만으로는 복막에 영향을 미치지 않지만[18], 낮은 pH를 장기간 반복적으로 사용하게 되면 복막의 투과성을 증가시키고 복막 섬유화를 초래하는 것으로 알려져 있다[19]. 특히 고농도의 포도당 용액은 복막의 손상에 가장 큰 영향을 주는 요소로서 복막 중피세포에서 세포외기질 단백질 뿐만 아니라 섬유화 유발 사이토카인인 TGF- β 1을 과다하게 생산함이 보고되어 있다[5].

TGF- β 1은 고농도의 포도당에 의한 세포외기질 단백질 생산의 최종 매개인자로 알려져 있다[20]. TGF- β 1의 활성화에는 MCP-1[21], PKC[22], protein tyrosine kinase, AP-1[23], SP-1 등 여러 인자들이 관여하는 것으로 알려져 있어 이러한 인자들의 조절을 통해 복막 섬유화를 억제하고자 하는 선행 연구들이 있어 왔다. 특히 유전자 치료에 대한

시도는 현재 전세계적으로 활발히 진행되고 있으며, 복강 내 염증반응의 억제를 위하여 interleukin (IL)-10, IL-1 receptor 길항제, nuclear factor- κ B (NF- κ B) antisense; 복막 투과도의 감소를 위하여 hyaluronan synthase (HAS), vascular endothelial growth factor (VEGF) 길항제; 복막 섬유화를 억제하기 위하여 tissue plasminogen activator (tPA), urokinase plasminogen activator (uPA), plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 antisense, TGF- β 길항제, heat shock protein 47 (HSP47) 등을 사용한 연구가 보고되어 있다[24]. 본 연구에서는 복벽 및 장 표면 모든 곳에 존재하며 복강 내의 여러 가지 생리적 활성화에 관여하고, 특히 TGF- β 1 및 세포외기질을 생성하여 섬유화에 깊이 관여하는 것으로 알려져 있는 복

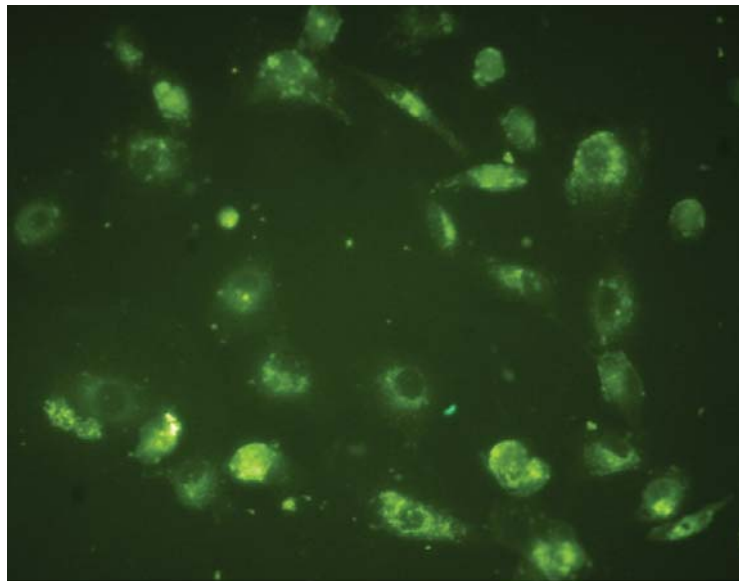


Fig. 3. The fluorescein labeled TGF- β 1 antisense oligodeoxynucleotides are transfected to human peritoneal mesothelial cells (x 100).

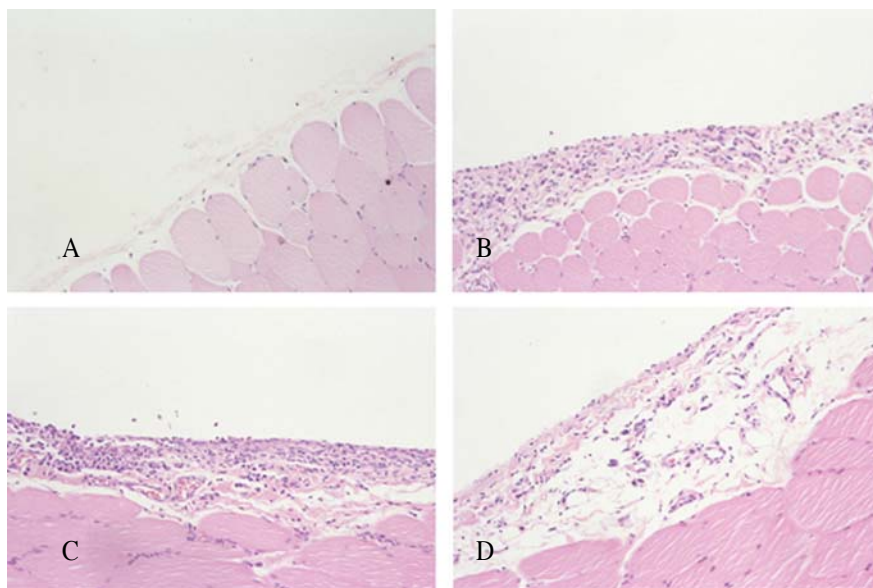


Fig. 4. The change in the thickness of peritoneum after peritoneal dialysis (PD). The peritoneum in the abdominal wall has thin and intact mesothelial cell layer in control (A). There is an increase in the peritoneal thickness after PD (B: PD for 6 weeks, C: PD for 8 weeks, D: PD for 12 weeks). There is a marked increase in the submesothelial thickness in D (H&E stain, x 100).

막 중피세포를 대상으로 하여 TGF- β 1 antisense ODNs를 이용한 유전자치료를 시도하였다.

Antisense ODNs는 목적하는 특정 유전자의 mRNA와 상보적으로 결합함으로써 RNase H의 활성을 유

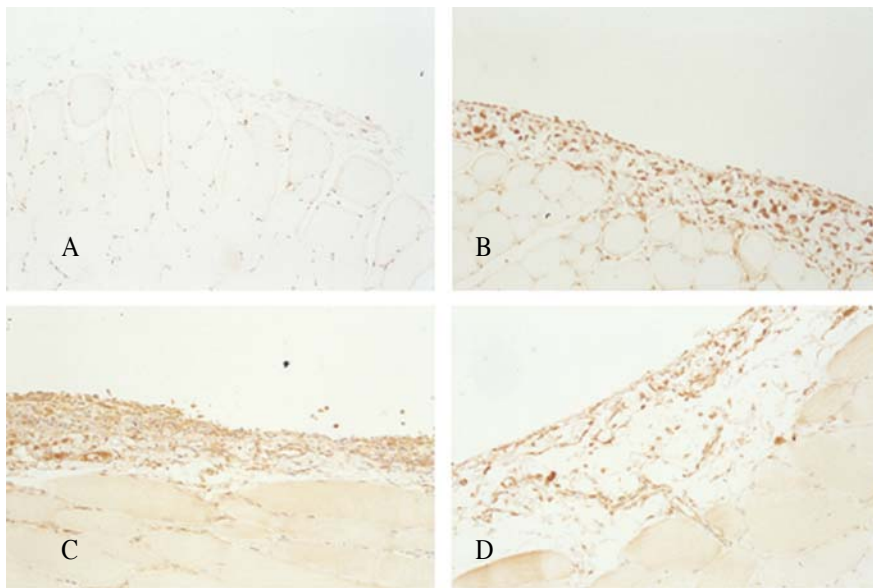


Fig. 5. The immunohistochemical stain for the expression of TGF- β 1 on peritoneum after peritoneal dialysis (PD). The increased TGF- β 1 expression is observed in the peritoneum after PD (A: control, B: PD for 6 weeks, C: PD for 8 weeks, D: PD for 12 weeks) (x 100).

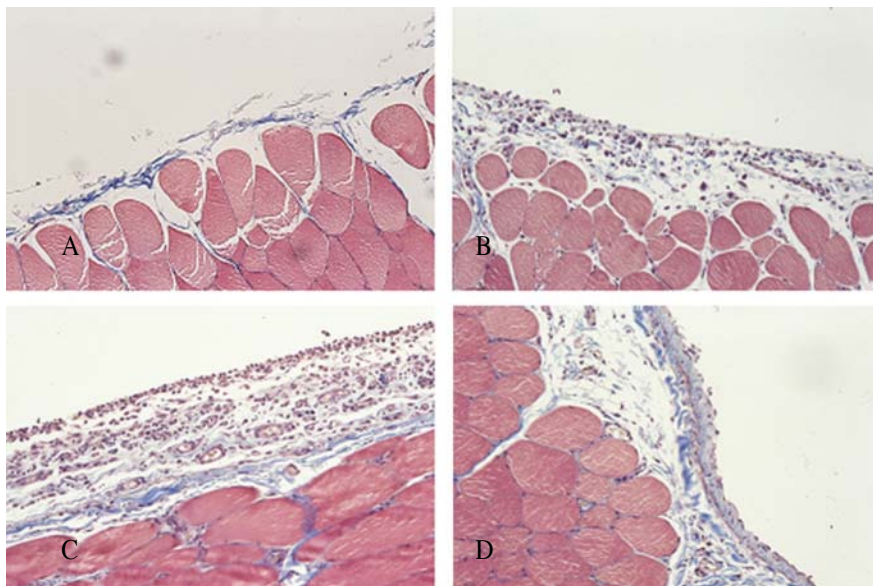


Fig. 6. The deposition of collagen on peritoneum after peritoneal dialysis (PD). The increased deposition of collagen is observed along with the period of PD (A: control, B: PD for 6 weeks, C: PD for 8 weeks, D: PD for 12 weeks) (Masson's trichrome stain, x 100).

도하고, 리보솜 복합체와의 결합을 저해함으로써 유전자의 발현을 억제한다. 그러나 antisense ODNs는

phosphorothioation이나 methylphosphonation 등과 같은 화학적인 방법에 의해 사용되어져 세포독성

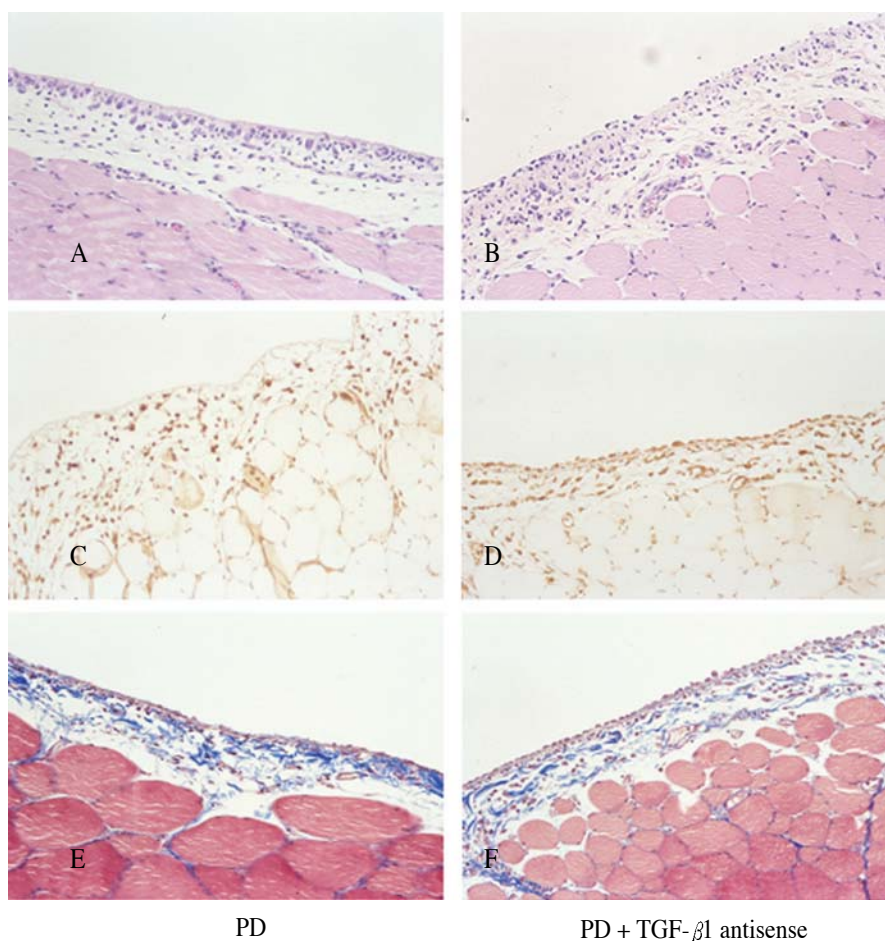


Fig. 7. The effect of TGF- β 1 antisense oligodeoxynucleotides (ODNs) on the fibrosis of the peritoneum in peritoneal dialysis (PD) rats. The thickening of peritoneum is observed similarly between two groups, but the deposition of collagen is suppressed in the group treated with TGF- β 1 antisense ODNs. A, C and E: control (PD for 3 weeks), B, D and F: PD for 3 weeks treated with TGF- β 1 antisense ODNs; A and B: H&E stain, C and D: TGF- β 1 immunohistochemical stain, E and F: Masson's Trichrome stain (x 100).

을 나타내고 핵산전달감염 효율이 매우 낮을 뿐만 아니라 또한 세포 내의 핵산분해효소에 의해 쉽게 분해되는 문제점이 있다[25,26]. 이러한 문제점을 극복하기 위해 본 연구에서는 세포독성과 면역반응이 낮고, 세포 내로의 antisense ODNs 핵산전달감염 효율이 높은 것으로 알려진 HVJ-liposome 방법[27]을 이용하였다.

본 연구에서 고농도의 포도당에 의한 복막 중피세포에서의 TGF- β 1 발현은 대조군에 비해 1.6배 증가하였고 TGF- β 1 antisense ODNs를 핵산전달

감염 시킨 군에서는 TGF- β 1 mRNA의 발현량이 대조군 수준으로 감소함을 관찰할 수 있었으며, 또한 형광현미경 검사를 통하여 TGF- β 1 antisense ODNs가 복막 중피세포 내로 핵산전달감염된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 복막투석 동물모델을 통해 복막투석 기간에 따른 복막 섬유화의 진행 과정을 관찰할 수 있었지만, TGF- β 1 antisense ODNs를 복강 내 주입한 동물실험에서는 복막에서의 TGF- β 1 발현 및 아교질의 침착은 감소하였으나, 복막 중피세포층의 두께는 대조군에 비해 유의한 차이가 없어 기

대한 바와 달리 섬유화 억제 효과가 뚜렷하게 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 먼저 TGF- β 1이 시험관 내에서는 복막 중피세포의 성장 및 분화를 촉진시키지만[28] 생체 내에서는 촉진시키지 않는다는 보고[29]에 비추어볼 때 생체 내에서 복막의 비후는 TGF- β 1의 영향이 아닌 fibroblast growth factor(FGF)-2, tumor necrosis factor(TNF)- α , platelet derived growth factor(PDGF) 등에 의해 발생할 가능성을 생각해 볼 수 있다. 그리고 IL-1 β 로 복막 중피세포를 자극하였을 때 TGF- β 1의 발현을 증가시켜 섬유결합소의 발현이 증가하지만 IL-1 β 로 자극하고 항 TGF- β 1 항체를 투여하여도 IL-1 β 에 의한 섬유결합소의 발현이 일부만 억제된다는 보고[30]가 있어 TGF- β 1과는 다른 경로를 통한 섬유결합소의 발현 가능성도 생각해 볼 수 있다. 그 외 TGF- β 1의 주요 발현부위가 복막 중피세포가 아닌 복막의 혈관 내피세포일 가능성, TGF- β 1 antisense ODNs를 복막투석액에 섞어 주입하는 방법이 TGF- β 1 antisense ODNs를 중피세포 내로 효과적으로 핵산전달감염시키지 못할 가능성 등도 생각할 수 있다. 향후 복막에서 TGF- β 1 발현부위의 확인 및 효과적으로 TGF- β 1 antisense ODNs를 복막으로 핵산전달감염시키는 방법 등에 대한 추가적인 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

이상의 연구 결과를 요약하면 고농도 포도당에 의해 복막 중피세포가 자극을 받아 TGF- β 1의 발현이 증가되며, TGF- β 1 antisense ODNs 투여로 TGF- β 1의 발현이 효과적으로 억제되었다. 복막투석 동물모델에서 복막투석 시행 기간이 길수록 복막 비후와 아교질 침착 증가 등 복막 섬유화의 진행이 관찰되었다. 그러나 TGF- β 1 antisense ODNs를 복강 내 주입한 동물실험에서는 복막 섬유화가 효과적으로 억제되지 않았다. 향후 복막투석 동물모델에서 TGF- β 1 antisense ODNs의 투여 경로의 변경 등을 포함한 추가적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

현재 상용화되어 있는 복막투석액을 장기간 사용

할 경우 투석액 내 고포도당은 복막 섬유화를 초래하며, 이는 복막의 한외여과능의 상실을 초래하여 복막 투석을 더 이상 실행할 수 없게 한다. 본 연구에서는 고포도당이 복막 중피세포(HPMC)의 생리학적 변화 및 복막의 형태학적 변화에 미치는 영향에 대해 관찰하고, TGF- β 1에 대한 antisense를 사용하여 항섬유화 효과를 관찰하였다.

HPMC는 개복수술환자의 장간막에서 분리한 후 정상배지, 고포도당 배지, 고포도당 배지에서 TGF- β 1 antisense 핵산전달감염시킨 세 가지 군으로 나누었다. Sprague-Dawley 흰쥐를 이용한 복막투석 동물모델에서는 복막투석만 시행한 군과 복막투석 시 TGF- β 1 antisense를 첨가한 군으로 나누어 실험하였다. 복막의 섬유화 정도는 RT-PCR 및 H&E, Masson's Trichrome, 면역조직화학 염색을 통해 평가하였다.

고포도당으로 자극한 HPMC의 TGF- β 1 발현이 대조군에 비해 1.6배 증가하였으며, TGF- β 1 antisense 투여로 발현이 억제되었다. 복막투석 동물모델에서는 투석 기간이 길수록 복막 비후와 아교질 침착이 증가하였다. 그러나 TGF- β 1 antisense를 복강 내 주입한 군에서 아교질 침착은 억제되었으나 복막 섬유화 억제효과는 뚜렷하지 않았다. 고포도당으로 자극한 HPMC에서 TGF- β 1 antisense는 TGF- β 1 발현의 증가를 억제하였으나 복강 내 TGF- β 1 antisense를 투여한 복막투석 동물모델에서는 기대한 섬유화 억제 효과가 나타나지 않았다.

참 고 문 헌

1. Di Paolo N, Garosi G. Peritoneal sclerosis. *J Nephrol* 1999;12:347-61.
2. Suzuki K, Khanna R, Nolph KD, Moore HL, Twardowski ZJ. Spontaneous peritonitis and peritoneal fibrosis in rats on peritoneal dialysis for 9 weeks. *Adv Perit Dial* 1995;11:52-6.
3. Tzamaloukas AH. Peritoneal toxicities of hypertonic dextrose dialysate. *Adv Perit Dial* 1999;15:217-21.
4. Gotloib L, Wajsbrot V, Shostak A, Kushnier R.

- Morphology of the peritoneum: Effect of peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 1995;15(Suppl 7):S9-12.
5. Kang DH, Hong YS, Lim HJ, Choi JH, Han DS, Yoon KI. High glucose solution and spent dialysate stimulate the synthesis of transforming growth factor-beta1 of human peritoneal mesothelial cells: effects of cytokine costimulation. *Perit Dial Int* 1999;19:221-30.
 6. Lamb EJ, Cattel WR, Dawney AB. *In vitro* formation of advanced glycation end products in peritoneal dialysis fluid. *Kidney Int* 1995;47:1768-74.
 7. Selgas R, Bajo MA, Castro MJ, Sanchez-Tomero JA, Cirugeda A. Managing ultrafiltration failure by peritoneal resting. *Perit Dial Int* 2000;20:595-7.
 8. Rippe B, Simonsen O, Wieslander A, Landgren C. Clinical and physiological effect of a new, less toxic and less acidic fluid for peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 1996;17:27-34.
 9. Wieslander A, Deppisch R, Svensson E, Forsback G. *In vitro* biocompatibility of a heat sterilized, low toxic and less acidic fluid for peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 1995;15:158-64.
 10. Lee JH, Reddy DK, Saran R, Moore HL, Twardowski ZJ, Nolph KD, *et al.* Advanced glycation end-products in diabetic rats on peritoneal dialysis using various solutions. *Perit Dial Int* 2000;20:643-51.
 11. Breborowicz A, Patrikarea A, Martis L, Oreopoulos DG. L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate and N-acetylcysteine as precursors of intracellular glutathione in human peritoneal mesothelial cells. *Blood Purif* 1996;14:1-7.
 12. Granat M, Tur-Kaspa I, Zylber-Katz E, Schenker JG. Reduction of peritoneal adhesion formation by colchicine: A comparative study in the rat. *Fertil Steril* 1983;40:369-72.
 13. Hoff CM, Shockley TR. Genetic modification of the peritoneal membrane: Potential for improving peritoneal dialysis through gene therapy. *Semin Dial* 1998;11:218-27.
 14. Stylianou E, Jenner LA, Davies M, Coles GA, Williams JD. Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 1990;37:1563-70.
 15. Dakhama A, Kraft M, Martin RJ, Gelfand EW. Induction of regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted (RANTES) and transforming growth factor-[beta]1 in airway epithelial cells by *Mycoplasma pneumoniae*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:344-51.
 16. Todd IS, Daugirdas JT, Gandhi VC. Peritoneal sclerosis in peritoneal dialysis patients. *Am J Nephrol* 1983;4:173-6.
 17. Higuchi C, Sanaka T, Sato T, Omata M, Watanabe M, Mine S, *et al.* The effect of the proliferation of peritoneal fibroblasts. *Adv Perit Dial* 1997;13:253-6.
 18. Kumano K, Schiller B, Hjelle JT, Moran J. Effects of osmotic solutes on fibronectin mRNA expression in rat peritoneal mesothelial cells. *Blood Purif* 1996;14:165-9.
 19. Miller FN, Nolph KD, Joshua IG, Wiegman DL, Harris PD, Andersen DB. Hyperosmolarity, acetate, and lactate: dilatory factors during peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1981;20:397-402.
 20. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor- β in tissue repair. *J Clin Invest* 1992;90:1-7.
 21. Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta 1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 1996;271:17779-84.
 22. Ha H, Yu MR, Lee HB. High glucose-induced PKC activation mediates TGF- β 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 2001;59:463-70.
 23. Verrecchia F, Vindevoghel L, Lechleider RJ, Uitto J, Roberts AB, Mauviel A. Smad3/AP-1 interactions control transcriptional responses to TGF-beta in a promoter-specific manner. *Oncogene* 2001;20:3332-40.
 24. Hoff CM, Shockley TR. Peritoneal dialysis in the

- 21st century: the potential of gene therapy. *J Am Soc Nephrol* 2002;**13**:S117-24.
25. Myers KJ, Dean NM. Sensible use of antisense: how to use oligonucleotides as research tools. *Trends Pharmacol Sci* 2000;**21**:19-23.
26. Moon IJ, Lee YG, Kwak CS, Lee JH, Choi KS, Schreiber AD, *et al.* Target site search and effective inhibition of leukaemic cell growth by a covalently closed multiple antisense oligonucleotide to *c-myc*. *Biochem J* 2000;**346**:295-303.
27. Kaneda Y, Saeki Y, Morishita R. Gene therapy using HVJ-liposome: the best of both worlds? *Molecular Medicine Today* 1999;**5**:298-303.
28. Gabrielson EW, Gerwin BI, Harris CC, Roberts AB, Sporn MB, Lechner JF. Stimulation of DNA synthesis in cultured primary human mesothelial cells by specific growth factors. *FASEB J* 1988;**2**:2717-21.
29. Mutsaers SE, McAnulty RJ, Laurent GJ, Versnel MA, Whitaker D, Papadimitriou JM. Cytokine regulation of mesothelial cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Cell Biol* 1997;**72**:24-9.
30. Yang WS, Kim BS, Lee SK, Park JS, Kim SB. Interleukin-1 β stimulates the production of extracellular matrix in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 1999;**19**:211-20.