

일측요로폐쇄 모델에서 TGF- β 1 단백질 과발현에 대한 RNA Interference 효과

대구가톨릭대학교 의과대학 병리학교실, 계명대학교 의과대학 신장내과*

김혜진 · 김현철* · 박관규

〈요약〉

목적 : 만성 신질환이 지속되면 투석이나 신이식과 같은 신대체 요법으로 치료를 하여야 한다. 그러나 투석은 근본적인 치료법이 될 수 없으며 신이식은 막대한 비용, 공여자의 부족, 신이식 후의 거부반응과 면역억제제의 사용에 따른 부작용 등 많은 문제점을 가지고 있다. 이에 따라 신조직의 섬유화에 관여하는 원인으로 알려진 TGF- β 1과 같은 특정 유전자 발현의 인위적인 제어가 만성 신질환 치료에 새로운 대안이 될 것이라 여겨진다. 본 연구는 RNA interference를 이용한 TGF- β 1 발현 억제로 사구체 간질세포 및 일측요로폐쇄의 동물 모델에 적용하여 TGF- β 1의 발현 억제정도를 확인하여 섬유화 방지에 미치는 효과 정도를 관찰하고자 하였다.

방법 : 먼저 TGF- β 1 mRNA 전체 염기서열에서 적절한 목적유전자 선정 후 DNA 벡터에 클로닝 하였고, 사구체 간질세포에서 RNA interference 효과를 확인한 뒤 일측요로폐쇄 모델 백서에 주입하여 시간경과에 따른 TGF- β 1 발현 억제정도를 살펴보았다.

결과 : 백터를 주입한 실험군과 주입하지 않은 대조군 백서의 신장을 1, 3, 7, 14일 간격으로 측출하여 TGF- β 1의 mRNA 및 단백질의 발현 억제정도를 관찰하여 본 결과 대조군에 비하여 실험군의 TGF- β 1의 발현이 현저하게 감소하였음을 확인하였다. 또한 면역조직화학염색과 같은 조직 염색을 통한 연구에서도 TGF- β 1 siRNA에 의해 TGF- β 1과 collagen 1형의 발현이 많이 감소되었음을 확인하였다.

결론 : 이상에서 요로 결찰 후 시간이 경과함에 따라 섬유화에 관련된 성장인자인 TGF- β 1의 합성이 증가되어 신 섬유화가 진행되고, 요로 결찰에 의해 신조직 내 증가된 TGF- β 1 mRNA 및 콜라겐 1의 발현을 TGF- β 1 siRNA가 효과적으로 억제함이 관찰되었다. 항후 TGF- β 1 siRNA를 이용한 장기간의 추가적인 연구는 만성 신질환에서 신조직 섬유화를 방지하는 새로운 치료법으로 부각될 수 있을 것으로 생각한다.

서 론

만성 신부전은 만성 사구체신염, 당뇨, 고혈압 등과

같은 여러 가지 원인에 의해 점진적이면서도 비가역적인 신기능 손상으로 인해 요독 물질이 체내에 축적되어 여러 장기에 기능 이상을 초래한다^{1,2)}. 만성 신질환이 진행하여 말기 신부전에 도달하게 되면 투석이나 신이식과 같은 신대체요법을 받지 않으면 생명을 유지해 나갈 수가 없다³⁾. 만성 신부전은 병리조직학적으로 주로 사구체 및 신간질의 섬유화에 의해 초래된다. 조직 손상의 초기 염증 반응은 단핵구나 대식세포의 침윤으로 시작되며, 활성화된 대식세포는 섬유화를 유발하는 주된 사이토카인인 transforming-

This work was supported by Korea Research Foundation Grant (KRF-2002-005-E00005).

접수: 2005년 3월 3일, 승인: 2005년 6월 2일

책임저자: 박관규 대구시 남구 대명4동 3056-6

대구가톨릭대학교 의과대학 병리학교실

Tel : 053)650-4149, Fax : 053)650-4834

E-mail : kkpark@cu.ac.kr

growth factor (TGF)- β 를 발현한다⁴⁾. TGF- β 는 체내 거의 모든 세포들의 성장, 분화, 및 기능을 조절하는 사이토카인으로 알려져 있고⁵⁾, 잠복기 형태로 분비되어 세포표면과 세포외기질에 저장되었다가 활성화되며⁶⁾, TGF- β 1, β 2, β 3, β 4, β 5의 아형이 있다⁵⁾. 그 중 TGF- β 1은 파이브로네틴, 콜라겐, 프로테오글리칸과 같은 새로운 기질단백의 형성을 자극하고 프로테아제의 합성을 감소시켜 기질분해를 억제함으로써 섬유결합소, 아교질 등과 같은 세포외기질의 축적을 유도한다. 또한 단백 분해효소의 합성을 감소시키고, 단백 분해효소 억제제의 합성을 증가시켜 기질분해를 억제한 후⁷⁾ 근섬유모세포를 섬유모세포로 전환하여 조직에 아교질의 축적과 섬유화를 유발하는 것으로 알려져 있다^{6,8)}. 현재 만성 신질환의 진행기전으로 사이토카인의 배출이나 성장인자의 발현과 밀접한 관계가 있고, 유전자치료법을 이용한 TGF- β 1의 발현을 막는 것이 신 섬유화 방지에 도움이 될 수 있음이 잘 알려져 있다⁹⁾.

유전자 치료란 유전자 발현체계를 이용해 치료 유전자를 질병 부위에 전달하여 이상 유전자를 대치하거나 그 부위에 치료용 단백질을 생산하게 하여 질병을 치료하는 것으로, 기존의 외과적 수술이나 화학요법이 가지고 있는 부작용을 피할 수 있다¹⁰⁾. 이러한 유전자치료법으로 antisense oligodeoxynucleotides (ODN), decoy, ribozyme, RNA interference (RNAi) 등의 방법이 연구되고 있다. 현재까지는 만성 신부전 동물모델에서 mRNA에서 단백합성차단을 위한 antisense ODN 같은 유전자치료법이 많이 연구되었으나¹¹⁾ antisense ODN 실험에서 많은 경우 대조군으로 사용한 sense strand에서도 목적 유전자의 발현이 억제되거나 목적 부위의 불일치, 핵산분해효소에 대한 불안정성, 세포내 투과성의 결여 및 비특이적 서열에 대한 활성 등 여러 가지 문제점들이 알려져 유전자치료에 적합하지 않은 것처럼 보인다^{12,13)}. 그러나 특정 유전자의 이중가닥 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)를 세포내로 주입하는 RNAi는 RNA-induced silencing complex (RISC)나 Dicer RNase III 같은 세포내의 효소들에 의해 그 유전자의 mRNA를 특이적으로 분해하여 유전자 발현을 억제하며, ribozyme이나 antisense ODN을 사용한 유전자치료보다 훨씬 더 효율적으로 목적하는 유전자의 발현을 억제시킬 수 있음이 보고되고 있다¹⁴⁾.

이에 따라 본 연구에서는 신 섬유화 방지를 위한 유전자치료로 RNAi 방법을 사용하였다. 본 실험에서 사용한 RNAi 방법은 억제하고자 하는 유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하여 그 유전자의 단백 발현을 제한함으로써 궁극적으로 유전자 발현을 억제하는 것이다. 이러한 RNAi는 세포내로 핵산전달감염되어졌을 때 small interfering RNA (siRNA)로 발현될 수 있도록 고안된 플라스미드 벡터에 클로닝하였는데, 이는 세포내에서 면역반응을 유도하지 않고, 자가 복제가 가능하며 독성이 없고 제조 및 대량생산이 용이한 장점이 있어 바이러스 운반체보다 널리 사용되고 있다¹⁵⁻¹⁷⁾. 본 연구는 선택한 TGF- β 1 siRNA 가 사구체 간질세포에서 TGF- β 1의 발현을 억제하는지를 살펴본 후, 일측요로폐쇄 동물모델¹⁸⁾에 적용하여 TGF- β 1의 발현 억제 정도를 확인하여 신조직의 섬유화 방지에 미치는 효과를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. TGF- β 1 siRNA 적정부위 선정 및 클로닝

TGF- β 1 전체 유전자 염기서열에서 siRNA 효과를 만족하게 해주는 21개의 상보적인 염기서열을 선정하였다. 목적부위가 A (아데노신)나 G (구아닌)로 시작하고, 다른 유전자와 상동성이 없으며, 2차 구조가 적고, GC 비율이 30-50%인 부위를 네 군데 선정하였다며 그 염기서열은 다음과 같다.

A : 5'-AAGTCAACTGTGGAGCAACAC-3'
B : 5'-GCTCGCTTTGTACAACAGCAC-3'
C : 5'-GACCGCAACAAACGCAATCTAT-3'
D : 5'-AACCAAGGAGACGGAATACAG-3'

(TGF- β 1 site : NM_021578)

벡터는 짧은 RNA를 전사하는 U6 RNA 중합효소 III 증진부위를 가지고 있는 플라스미드 벡터를 사용하였다. TGF- β 1 siRNA 염기서열 및 벡터는 Vectorcorea (벡터코아에이, 대전, 대한민국)로부터 주문제작하여 사용하였다 (Table 1).

2. 사구체 간질세포 배양

무게 100 g의 수컷 Sprague-Dawley 백서의 신장을 적출하여 phosphate buffered saline (PBS) (GIBCO, NY, USA)으로 충분히 세척한 후 캡슐을 벗기고, PBS로 한번 더 세척한 다음 면도칼로 잘게

Table 1. A siRNA Consisting of 21-mer Sense and Antisense Sequences of TGF- β 1 with a 9-mer Insert and Antisense 5Ts. The DNA Fragment was Digested with EcoRI and XbaI, and Then Cloned into the EcoRI and XbaI Site of pUC-U6-estra

	Sense	Insert	Antisense
A'	5'-CGGAATTCAAGTCAACTGTGGAGCAACACttcaagaga	GATATCTAGACA-3'	GTGTTGCTCCACAGTTGACTTTTTT
B'	5'-CGGAATTTCGCTCGCTTGTACAACAGCACttcaagaga	GATATCTAGACA-3'	GTGCTGTTGTACAAAGCGAGCTTTT
C'	5'-CGGAATTTCGACCGCAACAAACGCAATCTATttcaagaga	GATATCTAGACA-3'	ATAGATTGCGTTGTTGCGGTCTTTT
D'	5'-CGGAATTCAACCAAGGAGACGGAATACAGttcaagaga	GATATCTAGACA-3'	CTGTATTCCGTCTCCTGGTTTTT

나졌다. 잘게 다져진 신장에 PBS를 첨가하고, 85, 155, 80 순으로 mesh에서 걸러내었다. 마지막 mesh 위에 남아 있는 사구체 간질세포를 PBS를 이용하여 50 mL tube에 모은 후 4°C, 800 rpm에서 2분간 원심분리하고, 상등액을 제거하였다. RPMI-1640 (GIBCO, NY, USA) 배지로 세척한 다음 4°C, 800 rpm에서 2분간 원심분리하고 상등액 제거 후 collagenase를 넣고 37°C 항온수조에서 30분간 배양하였다. 상온의 원심분리기에서 2분간 800 rpm으로 원심분리한 후 상등액을 제거하고 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS) 20%와 Insulin transferrin sodium selenite media supplement (ITS) (Sigma, St Louis, USA) 1%가 들어간 RPMI-1640로 부유시켜 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 3회 정도 계대배양을 한 뒤에는 DMEM Low glucose (GIBCO, NY, USA) 배지에 FBS 10%와 항생제 1%가 들어간 배지를 사용하였다.

3. 사구체 간질세포로의 핵산전달감염

TGF- β 1 siRNA의 효과를 확인해 보기 위하여 사구체 간질세포를 60 mm의 세포 배양 접시에서 혈청을 넣지 않은 배지로 24시간 동안 배양시켜 성장주기를 동일하게 맞춘 후, 실험조건에 따라 핵산전달감염 시행 및 10% 우태아혈청을 함유한 배지로 교환하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 핵산전달감염은 Lipofectamine Plus Reagent (Invitrogen, CA, USA)를 사용하여 시행하였으며, TGF- β 1 siRNA를 가지는 플라스미드 벡터는 각 세포 배양 접시에 2 μ g 을 사용하였다. 실험군은 사구체 간질세포를 30 mM glucose에 FBS 10%와 Antibiotics 1%를 포함한

DMEM 배지에서 배양한 군, 동일한 배지를 사용하고 플라스미드 벡터만 핵산전달감염시켜 배양한 군과, 각각의 TGF- β 1 siRNA가 들어가 있는 플라스미드 벡터를 핵산전달감염시켜 배양한 대조군으로 나누어 실험하였다.

4. 실험동물

25-30 g 내외의 수컷 ICR 백서를 대상으로 하였다. 일축요로폐쇄는 포란 (중외제약, 서울, 대한민국)으로 흡입마취 한 후, 개복하여 좌측 신장의 요로를 상하로 세 군데 묶은 후 가운데를 잘라내고 복부를 봉합하였고, 각 군당 3마리를 두어 비교하였다.

5. 일축요로폐쇄 동물모델로의 핵산전달감염 효율과 위치확인

일축요로폐쇄 동물모델의 꼬리 정맥으로 핵산전달감염하였을 때 핵산전달감염의 효율과 위치를 확인하기 위하여 플라스미드 벡터에 MIRUS (MirusBio, WI, USA)로 형광을 표지하여 꼬리 정맥으로 주사하였다. 형광물질 주입 24시간 후 신장과 간, 비장을 적출하여 OCT 용액 (Sakura Finetechnical Co., Tokyo, Japan)에서 금속 냉각하여 4 μ m의 박편으로 절단하여 형광현미경으로 핵산전달정도의 효율을 관찰하였고, 핵 내로 들어갔는지 여부를 확인하기 위하여 Propidium iodide (Sigma, St Louis, USA)로 대조 염색을 하였다.

6. 일축요로폐쇄 동물모델에 TGF- β 1 siRNA 플라스미드의 적용

일축요로폐쇄 동물모델에서 TGF- β 1 siRNA의 효과를 관찰하기 위하여 아무런 치치를 하지 않은 백서

와 MIRUS (MirusBio, WI, USA) 리포좀을 사용하여 공ベ터 10 μg 을 꼬리 정맥으로 주사한 백서로 나누어 대조군을 선정하였고, 실험군은 siRNA 10 μg 을 주사하였다. 동물은 전 처치 후 1, 3, 7, 14일째에 각각 3마리씩 도살하여 좌측 신장을 적출하였다.

7. RNA의 분리 및 역전사-중합효소 연쇄반응

각 조건의 사구체 간질세포에 RNA-Bee (TEL-TEST, TX, USA)를 이용하여 전체 RNA를 추출한 후 분광광도계 (Beckman, Peapack, USA)로 순도와 정제된 양을 측정하였다. 추출한 RNA 1 μg 을 주형으로 역전사를 하여 cDNA로 합성을 하였으며, 이를 주형으로 0.5 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U/ μL 의 Taq polymerase를 첨가하여 95°C에서 5분간 변성시킨 후 TGF- β 1은 95°C에서 50초, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분간 반응시키는 조건을 30회 반복한 후, 72°C에서 10분간 반응시켜 중합효소의 역ガ를 최대로 하였다. 이와 같이 증폭된 DNA는 1% agarose gel로 전기영동하여 LAS-3000 image analyzer (Fujifilm, Tokyo, Japan)로 정량하였다. TGF- β 1 Primer는 전체 염기서열 중 GC의 비율이 50% 내외이고, sense, antisense의 GC값이 비슷한 22개의 염기를 가지는 부분을 선정하였다. 염기서열은 다음과 같다.

Sense : 5'-CCTGCTGCTTCTCCCTCAACC-3'

Antisense :

5'-CTGGCACTGCTTCCCGAATGTC-3'

8. 섬유화에 관련된 단백질의 Western blot 분석

-70°C에 보관하였던 신장에 변성용액 (IPH buffer, 50 mM pH8.0 Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 100 mM PMSF, 1 mg/mL leupeptin, 1 mg/mL aprotinin, 1 M DTT)을 첨가한 후 조직 분쇄기로 세포를 파괴시키고 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 전체 단백질을 분리하였다. 단백질 정량용 시약 (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)을 사용하여 분광광도계 (Beckman, Peapack, USA)로 전체 단백질을 정량하였고, 정량된 단백질 50 μg 을 취하여 TGF- β 1은 12%, 콜라겐 1은 6% SDS-Polyacrylamide gel에서 2시간 30분 동안 100 V로 전기영동을 한 후 15 V에서 12시간 동안 나일론 막으로 단백질을 전달하였다. 그 후 나일론 막은

TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)로 5%가 되게 만든 skim milk로 1시간 배양을 한 후에 항TGF- β 1 rabbit polyclonal IgG (santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 1:1,000으로 희석하여 1시간 30분간 붙인 후 TBS-T로 10분간 3번 세척하고, 항-토끼 또는 항-쥐 IgG (santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 1:2,000으로 희석하여 1시간 동안 결합시키고 TBS-T로 10분간 네 번 세척한 후 ECL 탐지장치 (Amersham, Buckinghamshire, UK)로 가시화하였다.

9. 면역조직화학염색

신조직에서 TGF- β 1과 콜라겐 1의 발현 억제 정도를 살펴보기 위하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 면역조직화학염색은 먼저 파라핀으로 포매된 신장의 생검조직을 회전형 박절기로 4 μm 두께로 잘라 부착제가 처리된 슬라이드에 붙이고 탈파라핀화 시킨 후 에탄올과 증류수를 사용해서 합수시켰다. 메탄올에 희석한 3% 과산화수소 용액에 30분간 처리하여 내인성 과산화효소에 대한 반응을 차단하고 증류수로 세척하였다. 미리 데워놓은 95°C Dako Epitope Retrieval Solution (0.01 mol/L citrate buffer, pH 6.0)에 조직절편이 충분히 잠기게 넣은 후 10분간 끓여 epitope retrieval 과정을 시행하고 실온에서 식힌 후 PBS로 세척하였다. TGF- β 1과 콜라겐 1에 대한 1차 항체를 4°C에서 16시간 동안 반응시키고, biotinylated anti-mouse IgG (DAKO, CA, USA)로 37°C에서 15분간 반응시켰다. Sepoavidin peroxidase (DAKO, CA, USA)로 37°C에서 15분간 반응시키고, DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 발색한 후 hematoxylin으로 대조 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. TGF- β 1 RNAi에 효과적인 염기서열 선정

사구체 간질세포로 A, B, C, D의 염기서열을 가지는 TGF- β 1 siRNA를 감염시켜 본 결과 염기서열 D가 처리된 실험군에서 TGF- β 1의 RNA 양이 가장 많이 줄었음을 확인하였다 (Fig. 1).

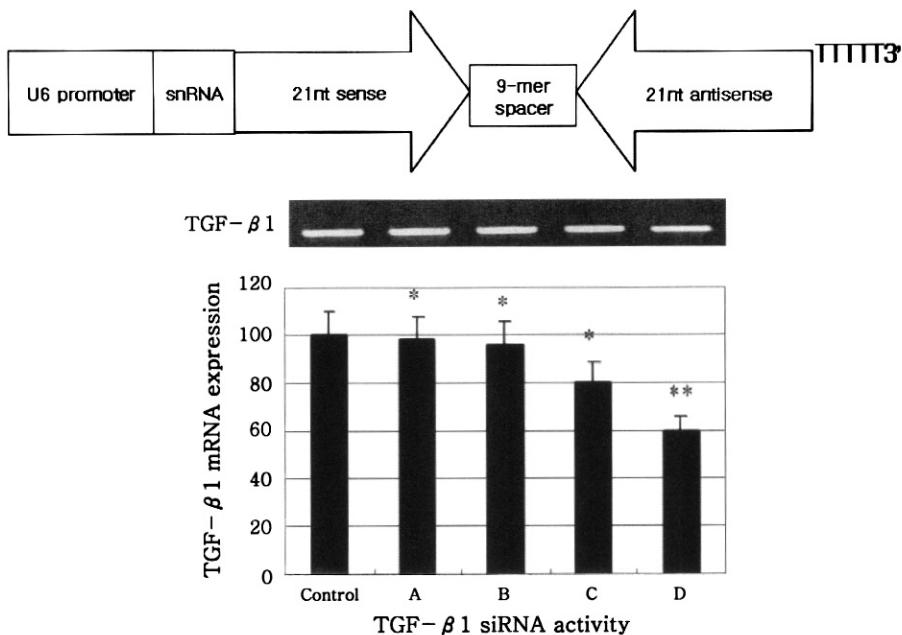


Fig. 1. Construction of U6 promoter-driven plasmid vector for siRNA and measurement of sequence specific siRNA activity in rat mesangial cells. A schematic illustration of the U6 promoter construction for hairpin siRNA (**A**). RT-PCR shows that TGF- β 1 mRNA expression is sequence-specifically decreased (**B**). Control is control vector. A, B, C and D is siRNA A', B', C' and D'. *p, **p<0.05 compared to control.

2. 일측요로폐쇄 동물모델로의 TGF- β 1 siRNA 플라스미드 벡터의 핵산전달감염 효율과 위치 확인

TGF- β 1 siRNA 플라스미드 벡터의 핵산전달감염 효율과 위치를 확인하기 위하여 TGF- β 1 siRNA에 형광을 붙여 일측요로폐쇄 동물모델 백서의 꼬리 정맥으로 주입하였다. 주입 24시간 후 조직을 적출하여 조직 단편을 4 μm 의 박편으로 절단하여 형광현미경으로 관찰하여 본 결과 신장 대부분의 관 상피세포의 세포질과 핵에서 형광이 관찰되었다 (Fig. 2A, 2B). 또한 간, 비장에서도 TGF- β 1 siRNA 플라스미드가 전달된 것을 확인하였다 (Fig. 2C, 2D).

3. TGF- β 1 siRNA의 TGF- β 1 mRNA 발현 억제 효과

일측요로폐쇄 백서에 TGF- β 1 siRNA 플라스미드를 주입한 후 1, 3, 7, 14일 되는 날 신장을 적출하여 RNA 발현의 변화 정도를 관찰하였다. 요로 결찰 후 시간이 경과함에 따라 TGF- β 1의 RNA 양이 많이 줄어

가됨을 확인할 수 있었고, 대조군에 비하여 TGF- β 1 siRNA 플라스미드를 주입한 백서에서는 TGF- β 1의 RNA 양이 50% 이상 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 3).

4. TGF- β 1 siRNA의 TGF- β 1 단백질 발현 억제 효과

일측요로폐쇄 백서에 TGF- β 1 siRNA 플라스미드를 주입 한 후 1, 3, 7, 14일 되는 날 신장을 적출하여 단백질 발현의 변화 정도를 관찰하였다. 요로 결찰 후 시간이 경과함에 따라 TGF- β 1 단백질의 발현이 급속히 증가됨을 확인할 수 있었고, 대조군에 비하여 TGF- β 1 siRNA 플라스미드를 주입한 백서에서는 TGF- β 1의 발현 정도가 50% 이상 감소된 것을 확인하였다 (Fig. 4).

5. 일측요로폐쇄 동물모델에서의 신장의 조직학적 변화

일축요로폐쇄 백서에 TGF- β 1 siRNA 플라스미드를 주입한 후 1, 3, 7, 14일 되는 날 신장을 적출하여

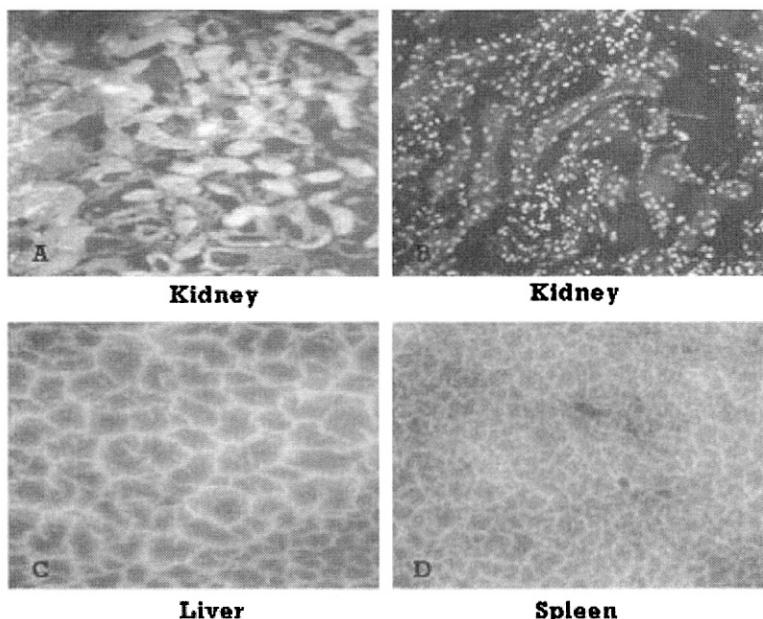


Fig. 2. Immunofluorescence demonstrates the distribution and transfection of TGF- β 1 siRNA by cationic liposomes within the unilateral ureteral obstruction (UUO) rat kidney by intravenous administration (A: Kidney, B: Kidney with Propidium iodide stain, C: Liver, D: Spleen) ($\times 200$).

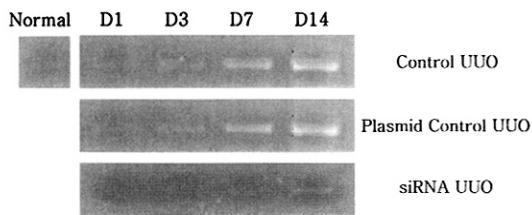


Fig. 3. RT-PCR demonstrates that the inhibitory effect of TGF- β 1 mRNA expression in UUO mouse kidney by TGF- β 1 siRNA (lane 1: day 1, lane 2: day 3, lane 3: day 7, lane 4: day 14).

면역조직화학염색을 시행하였다. 요로 결찰 후 3일이 경과하였을 때 대조군의 신장 대부분의 관상파세포에서 TGF- β 1의 발현이 눈에 띄게 염색되었으나 siRNA를 처리한 실험군은 TGF- β 1의 발현이 억제되었다. 요로 결찰 후 7일이 경과하였을 때 TGF- β 1은 간질쪽에서 많이 발현이 되었으며 역시 siRNA를 처리한 실험군은 TGF- β 1의 발현이 억제되었다. 그러나 14일 이후에는 조직이 많이 손상되어 siRNA의 효과정도를 관찰 할 수는 없었다. 콜라겐 1의 발현 역시 siRNA에 의해 TGF- β 1과 유의하게 억제되었다.

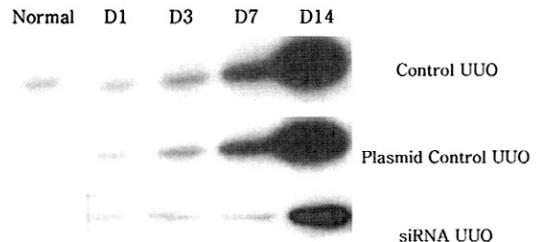


Fig. 4. Western blot demonstrates that the inhibitory effect of TGF- β 1 protein (25 KDa) expression in UUO mouse kidney by TGF- β 1 siRNA (lane 1: day 1, lane 2: day 3, lane 3: day 7, lane 4: day 14).

(Fig. 5, 6).

고 졸

RNAi는 1993년 Ambros 등^[19]의 연구팀이 *C. elegans*에서 발생과정을 조절하는 일련의 유전자들을 찾았는데, 이 중 일부는 단백질을 암호화하지 않는 크기가 작은 RNA로 밝혀져 작은 일시적인 RNA (small temporal RNA, stRNA)라고 명명되었다. 이

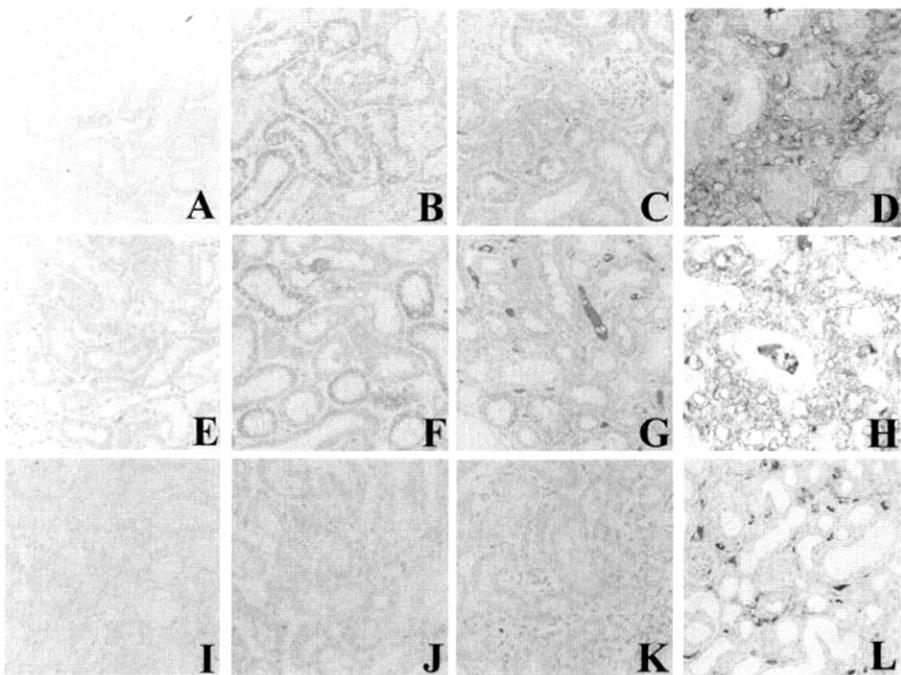


Fig. 5. Immunohistochemistry demonstrates that the expression of TGF- β 1 in mouse with UUO. Control of UUO mouse kidney (**A**), UUO kidneys treated with control vector (**E**), or TGF- β 1 siRNA plasmid vector (**I**). The time dependent TGF- β 1 expression is increased in UUO mice (**A** and **E**: day 1, **B** and **F**: day 3, **C** and **G**: day 7, **D** and **H**: day 14). In contrast, UUO mice treated with the TGF- β 1 siRNA exhibit a reduction of TGF- β 1 protein expression (**I**: day 1, **J**: day 3, **K**: day 7, **L**: day 14) (Immunohistochemistry, $\times 400$).

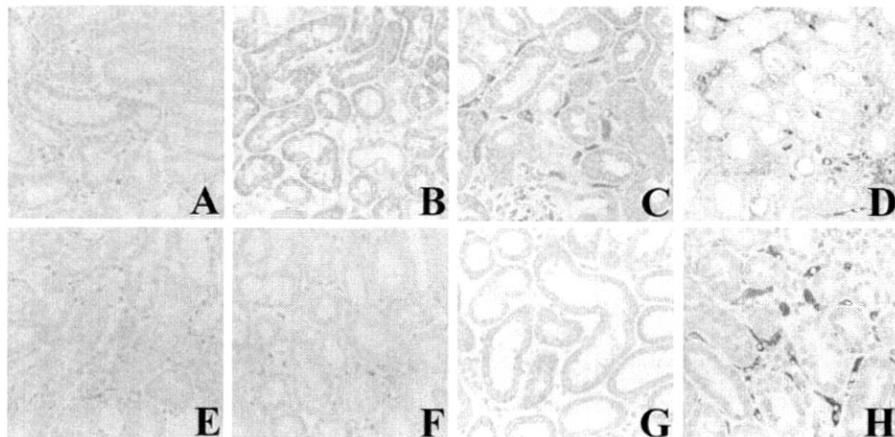


Fig. 6. Immunohistochemistry demonstrates that expression of type 1 collagen in mouse with UUO. Control is a UUO mouse kidney (**A**), UUO kidneys treated with TGF- β 1 siRNA plasmid vector (**E**). The time dependent type 1 collagen expression is increase in UUO mice (**A**: day 1, **B**: day 3, **C**: day 7, **D**: day 14). In contrast, UUO mice treated with TGF- β 1 siRNA exhibit a reduction of type 1 collagen protein expression (**E**: day 1, **F**: day 3, **G**: day 7, **H**: day 14) (Immunohistochemistry, $\times 400$).

어 2001년과 2002년에는 Tuschl, Bartel, Ambros, Dreyfuss 등 네 연구팀이 *C. elegans*, *drosophila melanogaster*, *homo sapiens*에서 150개에 이르는 기존에 알려진 mRNA 염기서열과 80~90%의 상보성을 나타내는 새로운 작은 크기 RNA의 유전자들을 동정하였고²⁰⁻²²⁾, stRNA를 포함해 이 RNA들을 micro RNA (miRNA)라고 명명하였다. 이러한 결과들로부터, miRNA가 진화적으로 보존된 새로운 분류의 유전자 발현조절물질임이 알려져 관심을 모으게 되었으며, 지난 수 년간의 연구결과 miRNA는 선구체 RNA (precursor RNA)로부터 pre-miRNA (80~90염기)를 거쳐²³⁾ 21-25염기의 작은 miRNA가 세포질에 존재하면서 진핵생물의 유전자 발현의 번역을 억제함이 알려지게 되었다²⁴⁻²⁶⁾. Fire 등²⁷⁾에 의해 특정 유전자의 염기서열에 해당하는 dsRNA를 *C. elegans*의 체내에 넣으면, 그에 상응하는 mRNA가 절단되어 유전자의 기능을 상실하고, 또한 투여하는 dsRNA의 양이 mRNA에 비해 극히 소량이어도 가능하다는 실험결과를 관찰하였다. 또한 RNAi는 선충에서만 적용되는 것이 아니라 식물에서의 전사 후 번역 억제, 곰팡이에서의 quelling 현상이 RNAi와 동일한 현상임이 밝혀져²⁸⁾, 다양한 생물종간에 보존되어 있는 핵산 차원에서의 방어 현상임이 밝혀졌다. 그러나 하등 생물체에서 적용하던 긴 dsRNA에 의한 염기서열 특이적 장해효과는 동물세포에서 비특이적 단백질합성 저해가 일어남으로써 하등 생물체에 적용하던 긴 dsRNA에 의한 염기서열 특이적 장애효과는 관찰되지 않음이 밝혀졌고²⁹⁾, 이를 근거로 21염기의 짧은 dsRNA를 이용하여 배양된 포유동물의 세포에서도 RNAi 현상이 일어남이 밝혀졌다³⁰⁾. 이러한 이론들을 바탕으로 신조직 섬유화에 관여하는 유전자 억제에 RNAi를 이용한다면 이전에 사용한 유전자치료법들 보다 훨씬 더 효율적으로 목적하는 유전자의 발현을 억제시킬 수 있을 것이다.

만성 신질환에서 신장조직 손상의 주된 요인인 신섬유화를 방지하기 위하여 TGF- β 1의 발현을 억제하는 많은 연구가 행해지고 있다⁹⁾. 이에 따라 본 연구에서는 신 섬유화 연구에 좋은 동물 모델인 일축요로폐쇄를 만들어 유전자치료법을 이용한 TGF- β 1 발현을 차단함으로써 신 섬유화를 억제해 보고자 하였다. 작은 dsRNA 조각을 직접 감염시킬 경우 세포 안에서 오랜 시간 동안 유전자의 발현억제가 어려운

점을 고려하여 siRNA가 안정적으로 세포내에서 합성될 수 있도록 고안된 플라스미드 벡터를 사용하였다¹⁵⁾. 플라스미드 벡터는 자가 복제가 가능하고 면역 반응을 유발하지 않으며, 독성이 없고 제조 및 대량생산이 용이한 장점이 있다^{16, 17)}.

먼저 TGF- β 1 mRNA 발현을 가장 효과적으로 억제하는 siRNA를 선정하기 위하여 사구체 간질세포로 핵산전달감염하여 염기서열 D를 가지는 siRNA가 TGF- β 1 mRNA의 발현을 가장 많이 억제함을 확인하였고, 이를 일축요로폐쇄 동물모델로 주입하여 보았다. 주입된 siRNA는 신장 대부분의 세뇨관 상피세포의 세포질과 핵, 그리고 간, 비장으로도 핵산의 감염이 관찰되어 본 실험에 사용한 플라스미드 벡터가 siRNA를 세포내에서 효과적으로 발현함을 확인하였다. 일축요로폐쇄 모델의 신장내 시간 경과에 따른 TGF- β 1 발현 억제에 대한 siRNA의 효과는 TGF- β 1, 콜라겐 1의 mRNA 및 단백질의 발현 억제 정도와 조직의 변화 정도로 관찰하였다. 일축요로폐쇄 백서는 시간이 경과하면서 신장에서 TGF- β 1 및 콜라겐 1의 mRNA와 단백질의 발현이 급속히 증가되어 유전자치료를 위한 목적 유전자로 TGF- β 1이 적절하였음을 알 수 있었다. 대조군에 비해 TGF- β 1 siRNA 플라스미드 벡터를 주입한 일축요로폐쇄 백서에서는 TGF- β 1 mRNA 및 단백질의 발현이 50% 이상 감소하여 본 실험에서 사용한 TGF- β 1의 염기서열이 사구체 간질세포 뿐만 아니라 일축요로폐쇄 백서에서도 TGF- β 1 RNAi 효과를 나타내는데 효과적이었음을 알 수 있었다. 또한 섬유화에 관련한 콜라겐 1도 TGF- β 1의 발현과 유사한 변화를 보였다. 면역조직화학염색을 통한 조직의 변화에서도 siRNA가 주입된 백서에서는 TGF- β 1이나 콜라겐 1 단백질의 발현이 많이 감소되었다. 그러나 일축요로폐쇄 수술 후 14일 이상 되는 백서는 신조직이 많이 손상되어 조직에서의 siRNA 효과를 관찰할 수 없었다. 향후 일축요로폐쇄모델에서 본 실험에서 사용한 TGF- β 1 siRNA로 14일 이후의 TGF- β 1 mRNA 발현 억제 정도 및 siRNA의 활성 정도를 살펴보는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 연구 결과를 요약하면 요로 결찰 후 시간이 경과함에 따라 TGF- β 1 mRNA와 같은 섬유화에 관련된 사이토카인이나 성장인자의 배출이 증가하게 되어 신 섬유화가 진행되고, 요로 결찰에 의해 증가된

TGF- β 1 mRNA의 발현을 TGF- β 1 siRNA가 효과적으로 억제함이 관찰되었다. 또한 면역조직화학염색을 통한 실험에서도 TGF- β 1 siRNA가 요로폐쇄 동물모델에서 신 섬유화를 효과적으로 억제함을 관찰할 수 있었다. 향후 추가적인 연구를 통하여 만성 신장질환 백서 모델에서 siRNA의 발현과 활성화 정도를 장기간 관찰하여 그 효과가 입증된다면 신조직 손상 진행 억제에 대한 새로운 치료법으로 부각될 수 있을 것으로 생각한다.

= Abstract =

The Effect of RNA Interference for TGF- β 1 Overexpression in Rat with Unilateral Ureteral Obstruction

Hyun Jin Kim, M.S., Hyun Chul Kim, M.D., Ph.D.*
and Kwan Kyu Park, M.D., Ph.D.

Department of Pathology, Catholic University School of Medicine, Daegu, Department of Nephrology*,
Keimyung University School of Medicine,
Daegu, Korea

Background : The progression of chronic renal diseases is an increasingly common condition, often leading to complete destruction of functional kidney tissue and dependency of affected individuals of life-long treatments with dialysis or renal allograft transplantation. The development of irreversible renal changes in tubulointerstitial fibrosis leads to a loss of kidney function. TGF- β 1 was found to play an important role in the accumulation of extracellular matrix in kidneys.

Methods : We introduced a RNA interference for TGF- β 1 in mice using the unilateral ureteral obstruction (UUO) model to attenuate interstitial fibrosis by injection of vector into tail vein. The effectiveness of siRNA (small interfering RNA) for TGF- β 1 mRNA sequence was also investigated in the cultured mesangial cells.

Results : The levels of TGF- β 1 mRNA was decreased in cultured mesangial cells treated with TGF- β 1 siRNA. TGF- β 1 mRNA was increased markedly in the interstitium of UUO kidneys. RT-PCR and Western blot analysis revealed that the levels of TGF- β 1 and type 1 collagen mRNA were lower in the obstructed kidneys treated with siRNA compared to control uuo kidneys.

Conclusion : These results demonstrate that the introduction of TGF- β 1 siRNA may be a potential

therapeutic maneuver for attenuating interstitial fibrosis. (*Korean J Nephrol* 2005;24(5):739-748)

Key Words : RNA interference, Chronic renal failure, TGF- β 1, Fibrosis, Unilateral ureteral obstruction

참 고 문 헌

- 1) Risdon R, Sloper J, Vardener H: Relationship between renal function and histologic changes found in renal biopsy specimens from patients with persistent glomerulonephritis. *Lancet* 2:363-366, 1968
- 2) Schainuck L, Striker G, Cutler R, Benditt E: Structural-functional correlations in renal disease. II. The correlations. *Hum Pathol* 1:631-641, 1970
- 3) Wolfe RA, Port FK, Webb RL, Bloembergen WE, Hirth R, Young EW, Ojo AO, Strawderman RL, Parekh R, Stack A, Tedeschi PJ, Hulbert-Shearon T, Ashby VB, Callard S, Hanson J, Jain A, Meyers-Purkiss A, Roys E, Brown P, Wheeler JR, Jones CA, Greer JW, Agodoa LY: Introduction to the excerpts from the United States Renal Data System 1999 Annual Data Report. *Am J Kidney Dis* 34:1-3, 1999
- 4) Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T: Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int* 59:1304-1314, 2001
- 5) Sporn MB, Roberts AB: Transforming growth factor- β : recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 119:1017-1021, 1992
- 6) Flamenhaft R, Abe M, Mignatti P, Rifkin DB: Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor beta in endothelial cells: regulation of plasminogen activator activity. *J Cell Biol* 118:901-909, 1992
- 7) Kreisberg JI, Hoover RL, Karnovsky MJ: Isolation and characterization of rat glomerular epithelial cells in vitro. *Kidney Int* 14:21-30, 1978
- 8) Eddy AA: Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 7:2495-2508, 1996
- 9) Sommer M, Eismann U, Deuther-Conrad W, Wendt T, Mohorn T, Funfstück R, Stein G: Time course of cytokine mRNA expression in kidneys of rats with unilateral ureteral obstruction. *Nephron* 84:49-57, 2000
- 10) Seufert J: Cell therapy and gene therapy in diabetes mellitus. *MMW Fortschr Med* 146:39-40, 2004

- 11) Ratajczak MZ, Hijiya N, Catani L, DeRiel K, Luger SM, McGlave P, Gewirtz AM: Acute- and chronic-phase chronic myelogenous leukemia colony-forming units are highly sensitive to the growth inhibitory effects of c-myb antisense oligodeoxynucleotides. *Blood* **79**:1956-1961, 1992
- 12) Wagner RW, Matteucci MD, Lewis JG, Gutierrez AJ, Moulds C, Froehler BC: Antisense gene inhibition by oligonucleotides containing C-5 propyne pyrimidines. *Science* **260**:1510-1513, 1993
- 13) Matsuda M, Park JG, Wang DC, Hunter S, Chien P, Schreiber AD: Abrogation of the Fc gamma receptor II A-mediated phagocytic signal by stem-loop Syk antisense oligonucleotides. *Mol Biol Cell* **7**:1095-1106, 1996
- 14) Dave RS, Pomerantz RJ: RNA interference: on the road to an alternate therapeutic strategy! *Rev Med Virol* **13**:3-85, 2003
- 15) Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ: Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:1443-1448, 2002
- 16) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R: A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**:550-553, 2002
- 17) Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR: Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* **20**:505-508, 2002
- 18) Yamate J, Okado A, Kuwamura M, Tsukamoto Y, Ohashi F, Kiso Y, Nakatsuji S, Kotani T, Sakuma S, Lamarre J: Immunohistochemical analysis of macrophages, myofibroblasts, and transforming growth factor-beta localization during rat renal interstitial fibrosis following long-term unilateral ureteral obstruction. *Toxicol Pathol* **26**:793-801, 1998
- 19) Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**:843-854, 1993
- 20) Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP: RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**:25-33, 2000
- 21) Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G: miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* **16**:720-728, 2002
- 22) Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD: A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* **17**:49-63, 2003
- 23) Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**:415-419, 2003
- 24) Hutvagner G, Zamore PD: A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**:2056-2060, 2002
- 25) Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D: MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol* **13**:807-818, 2003
- 26) Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U: Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**:95-98, 2004
- 27) Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806-811, 1998
- 28) Wang MB, Wesley SV, Finnegan EJ, Smith NA, Waterhouse PM: Replicating satellite RNA induces sequence-specific DNA methylation and truncated transcripts in plants. *RNA* **7**:16-28, 2001
- 29) Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD: How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**:227-264, 1998
- 30) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**:494-498, 2001