

편측성 요관 폐쇄모델에서 Transforming Growth Factor- β 1 mRNA에 대한 리본형 Antisense Oligodeoxynucleotide의 유전자 치료 효과

한상미 · 김은주 · 정효순 · 이병욱
이상숙 · 박관규 · 김현철¹

계명대학교 병리학교실, ¹신장연구소

The Effect of Ribbon-Type Antisense Oligodeoxynucleotides for Transforming Growth Factor- β 1 in Unilateral Ureteral Obstruction

Sang Mi Han, Eun Joo Kim, Hyo Soon Jeoung, Byung Yuk Lee, Sang Sook Lee
Kwan Kyu Park and Hyun Chul Kim¹

Departments of Pathology and ¹Kidney Institute, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

Background : In unilateral ureteral obstruction (UUO), the obstructed kidney is characterized by interstitial fibrosis and an increase in transforming growth factor (TGF)- β 1. Interstitial expression of TGF- β 1 is important in tubulointerstitial fibrosis. The objectives of this study is to make new ribbon-type antisense oligodeoxynucleotides (ODN) for TGF- β 1 which are resistant to exonuclease and to examine the effects of TGF- β 1 on reducing tubulointerstitial fibrosis of the kidney. **Methods :** We introduced a new ribbon-type antisense ODN for TGF- β 1 in rats using the UUO model to block interstitial fibrosis by tail vein injection. A combination of one antisense sequences for TGF- β 1 was adopted to construct a large antisense molecule with a loop and stem. Artificial viral envelope (AVE)-type hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposomes were used as a vector system for the delivery of antisense ODN. **Results :** The levels of TGF- β 1 mRNA was decreased more in the cultured mesangial cells treated with ribbon-type antisense ODN than in that of a linear-type antisense ODN for TGF- β 1. TGF- β 1 mRNA was increased markedly in the interstitium of untreated obstructed kidneys. Northern analysis revealed that the levels of TGF- β 1 mRNA were decreased in the obstructed kidneys treated with antisense ODN. The fibrosis of the obstructed kidneys treated with ribbon-type antisense ODN was dramatically less than that of the untreated group. **Conclusions :** These results demonstrate that the introduction of new ribbon-type antisense ODN for TGF- β 1 may be a potential therapeutic maneuver for preventing interstitial fibrosis.

Key Words : Models, Animal-Gene Therapy-Transforming Growth Factor-beta-Ureteral Obstruction

접 수 : 2002년 1월 14일
게재승인 : 2002년 3월 27일

책임저자 : 박 관 규
우 700-712 대구시 중구 동산동 194
계명대학교 병리학교실
전화: 053-250-7465
Fax: 053-250-7852
E-mail: park1234@dsmc.or.kr

*본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (R02-2000-00124) 지원으로 수행되었음.

인체 조직의 섬유화는 염증성 병변의 마지막 단계에 초래되는 과정으로서, 거의 모든 장기에서 말기 부전증의 중요한 원인이 된다.^{1,2} 신장의 섬유화는 사구체 및 기질에서 주로 진행되어 점차적으로 신기능이 떨어지며, 결국 말기 신부전증에 빠지게 된다. 손상된 조직의 재생에는 단핵구, 대식세포 등의 염증세포, 형질전환된 간질의 섬유모세포 및 근섬유세포 등이 생성되는 콜라겐 등의 세포외기질이 관여한다.³ 조직 손상의 초기 염증 반응은 단핵구나 대식세포의 침윤으로 시작되며, 활성화된 대식세포는 섬유화를 유발하는 주된 사이토카인인 transforming growth factor (TGF)- β 를 발현한다.⁴

TGF- β 는 섬유결합소, 콜라겐, 프로테오글리칸과 같은 세포외기질의 축적을 유도하며, 프로테아제의 합성을 감소시키고, 프로테아제 억제제의 합성을 증가시켜 기질의 분해를 억제한다.^{4,5} 섬유화과정에서 발견되는 주된 TGF- β 의 아형은 1형이라고 알려져 있으며, 이것은 섬유모세포를 근섬유모세포로 형질을 전환시키고 또한 원섬유 I과 III형 콜라겐의 발현을 유도하여 콜라겐의 축적과 섬유화를 유발하는 것으로 알려져 있다.^{6,7} 따라서 세포외기질의 증가는 조직에서 TGF- β 1의 발현이 증가되는 것을 의미하며, 이러한 TGF- β 1의 증가를 보이는 신질환들은 급성 사구체경화증, IgA 신증, 루프스 신염, 급진행성 사구체신

염, 당뇨병성 신증, 이식신의 거부반응 등이며, 신생검에서 발견되는 TGF- β 1의 양은 진행된 섬유화의 정도와 밀접한 관계가 있다.⁸

이와 같이 TGF- β 1이 여러 조직 및 세포에서 섬유화를 초래하는 주된 물질로 알려짐에 따라 이를 차단하여 섬유화를 방지하는 연구가 이루어지고 있다. 특히 antisense oligodeoxynucleotides (ODN)를 투여함으로써 직접 TGF- β 1의 합성을 억제하거나, decorin이나 수용성 chimeric TGF- β 1 수용체와 같이 TGF- β 1과 결합 관계에 있는 물질을 투여하는 간접적인 방법이 시도되고 있다.⁹⁻¹¹ 이러한 방법들 중 최근 동물 모델을 사용하여 암의 초기와 진전에 관여하는 특정 유전자를 제거하기 위한 antisense 제제 사용이 효과가 있음이 입증되었다.^{10,11} Antisense ODN 투여는 TGF- β 1 mRNA와 결합함으로써 TGF- β 1 단백질의 생성을 억제하고 세포외기질의 침착을 억제하는 것을 의미한다.^{12,13} 즉 TGF- β 1에 대한 antisense ODN을 투여한 유전자 치료가 TGF- β 1 mRNA의 발현을 억제하여 신장의 섬유화를 감소시킬 것으로 생각한다. 그러나 지금까지 사용되어 온 antisense ODN은 그 결과가 언제나 명백한 것은 아니었으며, 대상 세포의 불일치, 핵산분해효소에 대한 불안정성, 세포내 투과성의 결여 및 비특이적 서열에 대한 활성 등 몇 가지 문제점을 안고 있다.¹⁴ 이러한 문제점을 보완한 stem-loop 구조의 리본형 antisense ODN이 최근 보고되었다.^{12,15}

본 연구에서는 신장의 섬유화를 방지하기 위하여 TGF- β 1 mRNA의 대상으로 하여 그 발현 억제 효과가 더 크고 핵산분해효소에 대해 안정적인 리본형 antisense ODN을 제작하였다. 이것이 기존의 일자형 antisense ODN에 비교하여 더욱 효과적 인지를 알아 보기 위하여 배양된 신사구체 간질세포에 주입하여 TGF- β 1 mRNA의 발현 억제 효과를 살펴보고, 편측성 요관을 폐쇄한 동물 모델을 사용하여 신장의 섬유화를 유도한 후, TGF- β 1의 발현과 세포외기질의 침착 양상을 확인하여 섬유화 억제 효과를 관찰하고자 한다.

재료와 방법

리본형 TGF- β 1 antisense ODN 제작을 위한 적정 부위 선택

TGF- β 1 antisense ODN에 대한 적정 부위 선정은 전체 TGF- β 1 염기서열에 대해 DNAsis 프로그램(Hitach Software, CA, U.S.A.)을 사용하여 Moon 등¹²과 같은 방법으로 1개의 목적 부위를 갖는 antisense ODN을 선정하였다. 그 염기서열은 다음과 같다: 5'-TGTGTGTGATGTCTTTGGTTTTGTCATAGATTGCGTTGTTGCGGTC-3' (TGF- β 1 site; 755-800). 리본 형태의 2차 구조 형성을 위해 5' 말단을 인산화시키고 BamHI 자리를 첨가시켜 58 mer [5'-(p)GATCACGTTGTGTGTGATGTCTTTGGTTTTGTCATAGATTGCGTTGTT

GCGGTCACGT-3']의 TGF- β 1 antisense ODN을 바이오닉사(Bionics, Seoul, Korea)로부터 주문 제작하여 사용하였다. 58 mer의 TGF- β 1 antisense ODN을 혼합하여 95°C에서 3분 동안 열을 가한 후 실온에서 서서히 식히고 T4 DNA 연결효소를 첨가하여 16°C에서 16시간 반응시켰다. 연결 확인을 위해 15% denaturing polyacrylamide gel에서 전기영동하여 리본형 antisense ODN의 합성을 확인한 후 실험에 사용하였다.

신사구체 간질세포의 배양 및 TGF- β 1 antisense ODN 핵산전달감염(transfection)

Sprague-Dawley 백서를 pentobarbital 50 mg/kg로 마취시킨 후 개복하여 생리식염수로 양측 신장을 씻어낸 후 신장을 적출하였다. 신피질 부위를 채취하여 Kreisberg 등¹⁶과 같은 방법으로 신사구체 간질세포를 분리한 후, Happer 등¹⁷의 방법에 따라 항생제가 들어 있지 않은 0.5% FCS (fetal calf serum, HyClone, Logan, U.S.A.)가 첨가된 RPMI1640배지(Life Technologies, MD, U.S.A.)에 48시간 배양시킨 후 Opti-MEM 배양액으로 2회 세척하였다. 5×10^5 cells/mL의 세포 농도로 맞추는 후 6 well 배양 용기에 각기 TGF- β 1 antisense ODN을 Lipofectamine plus (Life Technologies, MD, U.S.A.)와 혼합하여 핵산전달감염시켰다. 5시간 배양 후에 17% FBS (fetal bovine serum, HyClone, Logan, U.S.A.)를 포함한 RPMI 1640배지로 교환하고 6시간 배양 후 세포를 수집하여 RNA를 분리하였다. 37°C의 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다.

mRNA의 분리 및 역전사-중합효소연쇄반응(Reverse transcription-Polymerase chain reaction: RT-PCR)

핵산전달감염된 신사구체 간질세포의 전체 RNA는 RNAzolB (TEL-TEST, Friendwood, U.S.A.)를 사용하여 추출하고 분광광도계(Beckman, Peapack, U.S.A.)로 RNA의 순도와 정제된 양을 구하였다. 분리한 RNA를 주형으로 1st Strand cDNA synthesis Kit (Boehringer Mannheim corp., IN, U.S.A.)를 이용하여 oligo dT primed 1st strand DNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 MgCl₂의 농도가 1.5 mM, dNTP 0.5 mM, 2.5 U/ μ L의 Tag polymerase의 PCR 완충액에 각기 25 pM의 TGF- β 1과 house keeping gene인 GAPDH를 PCR반응기(Perkin-Elmer Cetus, CT, U.S.A.)에서 증폭하였다. GAPDH의 primer는 백서의 유전자에서 고안하였으며, 5'-GTG GACATTGTTGCCATCAACG-3', 5'-GAGGGAGTTGTCATATTTCTCG-3'를 사용하여 351 bp의 산물을 얻었고, TGF- β 1의 primer는 5'-CCTGCTGCTTTCTCCCTCAACC-3', 5'-CTGGCACTGCTTCCCGAATGTC-3'를 사용하여 598 bp의 산물을 얻었다. PCR 시간 및 온도는 94°C에서 2분간 변성시킨 후 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 68°C에서 2분간 반응

시키는 조건으로 25회 수행하고, 68°C에서 7분간 반응시켰다. 이렇게 얻어진 증폭 산물은 2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

일본 적혈구 응집 바이러스(Hemagglutinating virus of Japan: HVJ) 리포솜 매개 antisense ODN 제작

일본 적혈구 응집 바이러스의 배양과 분리를 위해 수정된 지 10일이 경과된 닭의 수정란에, polypepton에 1:1,000으로 희석된 종자바이러스 0.1 mL을 접종한 후 35.5°C에서 3일간 배양하였다.⁹ 배양된 바이러스는 3,000 rpm으로 10분간 4°C에서 원심 분리한 후, 상청액을 원심분리용 시험관으로 옮겨 15,000 rpm으로 40분간 4°C에서 원심분리하였다. 상청액을 제거한 후 balanced salt solution (BSS)을 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 뒤, 바이러스를 조심스럽게 부유시켜서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상청액을 취하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

HVJ 리포솜은 egg yolk phosphatidylcholine (ePC; Sigma Chemical, MO, U.S.A.), dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE; AvantiPolar Lipid, AL, U.S.A.), egg yolk sphingomyelin (eSph; Sigma), bovin brain phosphatidylserine (bPS; Sigma)와 콜레스테롤(Sigma)을 16.7:16.7:16.7:10:50의 비율로 10 mg되게 혼합하여 질소 가스로 채워진 유리 용기에 넣어 클로로포름으로 녹이고, 증발기에서 증발시킨 후 사용하였다.

지질이 포함된 유리 용기에 10 µg의 리본형 TGF-β1 antisense ODN을 첨가하여 30초간 흔들어 섞어 주고, 37°C에서 30초간 배양을 8회 반복하였다. 그 후 0.45 µm 필터에 걸러낸 후 BSS를 0.5 mL 첨가하여 다시 0.2 µm 필터로 걸렀다. 정제된 바이러스는 사용 전 0.198 J의 자외선으로 불활성화시켰고, 25,000 적혈구 응집 단위의 불활성화된 바이러스를 지질과 ODN 혼합물에 첨가하여 얼음에서 10분간 반응시켰다. 초고속 원심분리기 용기에 30% 설탕물, 지질과 ODN, 바이러스혼합물의 순서로 넣은 후 4°C, 25,000 rpm으로 2시간 초고속 원심분리하여 리포솜 층을 조심스럽게 건져서 사용하였다.

실험 동물

200 g 내외의 웅성 Sprague-Dawley 백서를 실험 대상으로 하였다. 편측성 요관 폐쇄는 pentobarbital 50 mg/kg을 실험군과 대조군 모두 복강 내 주사하여 마취시키고, 개복하여 좌측 신장의 요관을 상하로 묶은 후 가운데를 잘라내고 복부를 봉합하였다. 대조군은 아무런 처치를 하지 않았고, 실험군은 10 µg의 리본형 TGF-β1 antisense ODN이 포함된 500 µL HVJ 리포솜을 꼬리로 정맥주사하였다. 동물은 전 처치 후 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50일째에 실험군과 대조군 각각 3마리,

정상 백서는 2마리씩 도살하고 좌측 신장을 적출하였다. 적출한 신장의 장경과 단경을 측정하였다.

TGF-β1 mRNA 발현에 대한 Northern blot 분석

-70°C에 보관하였던 신장은 변성용액(4 M guanidin thiocyanate, 0.5% lauryl sarcosyl, 25 mM sodium citrate, 0.7% β-mercaptoethanol)을 첨가한 후 조직 분쇄기로 세포를 파괴시키고 균질화시켰다. 전체 RNA는 Chomczynski 등¹⁸과 같은 방법으로 분리하였다.

Northern blot을 위하여 정량된 RNA를 20 µg 취하여 1% agarose-formaldehyde gel에서 전기영동한 후, 나일론 막(Hybond-N+; Amersham, Boston, U.S.A.)으로 전달하고 80°C에서 2시간 방치하였다. 부합화(hybridization)에 사용한 TGF-β1와 GAPDH cDNA probe는 다음과 같은 primer로 PCR하였고, probe labeling은 nonradioactive labeling으로 random primer법을 이용한 digoxigenin-high prime labeling kit (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany)를 사용하였다. 사용되는 primers: GAPDH: 5'-GTGGACATTGTTGCCATCAACG-3', 5'-GAGGGAGTTGTCATATTTCTCG-3', TGF-β1: 5'-CCTGCTGCTTTCTCCCTCAACC-3', 5'-CTGGCACTGCTTCCCGAATGTC-3'.

Prehybridization은 50°C에서 1% BSA, 7% SDS 및 1 mM EDTA를 포함한 0.5 M NaHPO₄ 완충액(pH 7.0)을 이용하여 2시간 시행하였고, 부합화는 digoxigenin-11-dUTP로 labelling된 probe를 넣고 50°C에서 하룻밤 동안 시행하였다. Hybridization 후 50°C에서 0.5% BSA, 5% SDS 및 1 mM EDTA를 포함한 40 mM NaHPO₄ 완충액을 사용하여 10분간 2회 세척하였고, 1% SDS 및 1 mM EDTA를 포함한 40 mM NaHPO₄ 완충액에서 4회 세척하였다. 세척된 막에 Kodak XAR-5 필름을 넣고 각각 적당한 시간 동안 노출시킨 후 현상하였다.

광학현미경 검사

실험군과 대조군에서 적출한 좌측 신장 생검조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고 계열 알코올로 탈수한 후, 침투 과정을 거쳐 파라핀 포매를 실시한 다음 2 µm 박절편을 만들어 HE 염색을 시행하였다.

면역조직화학 염색

TGF-β1의 단백 발현을 알아보기 위해 단클론성 항체를 사용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. 파라핀 포매된 신장생검조직을 2 µm 두께로 잘라서 부착제로 처리된 슬라이드에 붙이고 탈파라핀을 거쳐 함수하였다. 메탄올에 희석한 3% 과산화수소수 용액에서 30분간 처리하여 내인성 과산화효소에 대한 반

응을 차단하고 0.01 M 인산염 완충액에서 10분간 세척하였다. TGF- β 1에 대한 1차 항체인 TGF- β 1 (DAKO, Carpinteria, U.S.A.)을 37°C에서 30분간 반응시키고, biotinylated anti-mouse IgG (DAKO, Carpinteria, U.S.A.)를 2차 항체로 사용하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. Streptavidin peroxidase (DAKO, Carpinteria, U.S.A.)로 37°C에서 15분간 반응시키고 DAB (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 발색하였다. 헤마톡실린으로 대조염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

통계 분석

결과는 평균 표준오차로 표시하였다. 자료의 각 군들 간의 차이는 Duncan's multiple range test를 이용하였으며, p 값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

TGF- β 1 mRNA에 대한 리본형 TGF- β 1 antisense ODN의 제작

Exonuclease의 활성을 피하기 위해 동일한 stem-loop 구조의 TGF- β 1 antisense ODN을 BamHI로 처리한 후 연결 효소를 사용하여 리본형으로 연결하였다(Fig. 1). Exonuclease에

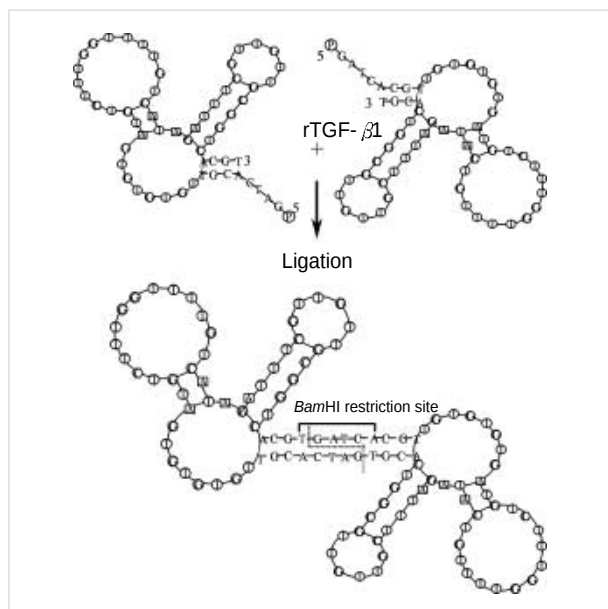


Fig. 1. Ribbon-type transforming growth factor (TGF)- β 1 antisense oligodeoxynucleotides (ODN). TGF- β 1 molecules is phosphorylated at the 5' end and harbors complementary sequences at both the 5' and 3' ends with single-stranded sequence of GATC at the 5' extreme end. Ribbon-type antisense ODN contains two loops with two antisense sequences and a stem region.

대한 안정성을 확인하기 위하여 연결하기 전의 일자형 ODN과 리본형 TGF- β 1 antisense ODN을 각기 exonuclease III로 처리한 후 페놀/클로로포름으로 추출하여 15% denaturing polyacrylamide gel에서 확인하였다. 리본형 TGF- β 1 antisense ODN은 exonuclease III에 안정하기 때문에 일자형 TGF- β 1 antisense ODN에 비하여 천천히 전개되었다. 반면 일자형 ODN은 완전히 exonuclease III에 의해 분해되었다.

신사구체 간질세포에서 TGF- β 1 mRNA 발현 억제 효과

TGF- β 1 antisense ODN에 의한 TGF- β 1 mRNA의 발현 억제 여부를 확인하기 위해, 배양된 신사구체 간질세포에 리본형 TGF- β 1 antisense ODN (1 μ g)과 연결하기 전 58 mer의 일자형 TGF- β 1 antisense ODN (1 μ g)을 각기 lipofectamin plus와 혼합하여 핵산전달감염한 후, 배양세포에서 RNA를 분리하여 TGF- β 1에 대한 RT-PCR을 시행하였다. 리본형 TGF- β 1 antisense ODN으로 처리된 배양세포에서는 TGF- β 1 mRNA의 발현이 거의 없었다. 또한 일자형 TGF- β 1 antisense ODN으로 처리된 세포에서도 TGF- β 1 mRNA의 발현은 대조군에 비하여 현저히 감소되었으나, 리본형을 처리한 배양세포에서의 발현양보다는 많았다(Fig. 2). 그러나 lipofectamin plus 없이 TGF- β 1 antisense ODN만을 배양세포에 핵산전달감염시켰을 경우, TGF- β 1 mRNA의 발현은 대조군 및 실험군에서 큰 차이 없이 발현되었다(Fig. 2).

TGF- β 1 mRNA 발현 억제 효과 관찰을 위한 Northern blot 분석

신섬유화를 유도하는 동물 모델로 편측성 요관을 폐쇄한 백서를 사용하여 신섬유화 방지에 대한 리본형 TGF- β 1 antisense ODN의 효과를 검증하였다. 편측성 요관을 폐쇄한 백서에 리본형 TGF- β 1 antisense ODN을 꼬리 정맥에 주사한 실험군과, 요관 폐쇄 후 아무런 처치를 하지 않은 대조군 및 수술을 하지

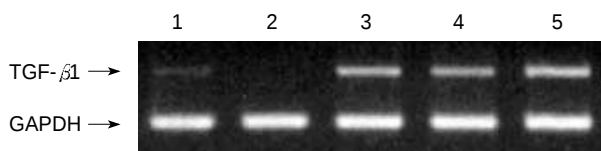


Fig. 2. Inhibition of transforming growth factor (TGF)- β 1 mRNA expression by antisense oligodeoxynucleotides (ODN). Mesangial cells are serum-starved for 48 hr and subsequently exposed to RPMI1640 containing 17% FBS. RNA is isolated from the cells and subjected to RT-PCR. Lane 1, linear type TGF- β 1 antisense ODN plus lipofectamin plus; Lane 2, ribbon-type TGF- β 1 antisense ODN plus lipofectamin plus; Lane 3, linear type TGF- β 1 antisense ODN; Lane 4, ribbon-type TGF- β 1 antisense ODN; Lane 5, control (without antisense ODN).

않은 정상 백서의 좌측 신장으로 부터 RNA를 분리하여 TGF- β 1 mRNA의 발현 양을 알아보기 위하여 Northern blot 분석을 시행하였다.

화상분석기를 이용하여 밴드의 양을 정량화하여, 정상 신장의 TGF- β 1 mRNA의 발현 양으로 교정한 후 대조군과 리본형 antisense ODN 투여군의 TGF- β 1 mRNA의 발현 결과를 분석하였다(Fig. 3). 대조군에서의 결과는 수술 후 3일, 5일, 7일에서 각각, 4.2, 6.92와 4.3배의 발현양의 증가를 보였으나, 리본형 TGF- β 1 antisense ODN 투여군에서는 1.57, 1.55 그리고 0.88배의 증가를 보였다. 리본형 TGF- β 1 antisense ODN 투여군은 대조군에 비하여 TGF- β 1 mRNA의 발현 억제에 있어 대조군과 유의한 차이를 보였다.

신장의 형태학 및 조직학적 소견

적출한 신장의 장경과 단경은 정상 백서의 크기에 대한 실험군과 대조군의 측정치와 각각 비교하여 평균치를 구하여 합한 후 신장 크기를 비교하였다. 좌측 신장의 요관을 폐쇄한 대조군은 수술 후 1일째부터 정상 신장보다 1.7배 정도 비대해지고, 5일째부터는 세뇨관 간질 조직의 확장과 함께 단핵세포들의 침윤을 관찰할 수 있었으며 신장의 크기는 정상 신장보다 3배 가량

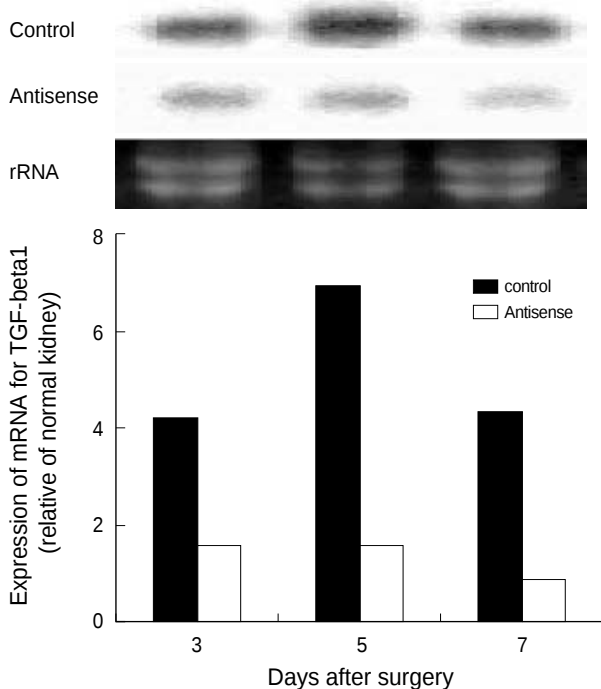


Fig. 3. Northern blot of transforming growth factor- β 1 mRNA in obstructed kidneys from rats treated with ribbon-type transforming growth factor (TGF)- β 1 antisense oligodeoxynucleotides or untreated disease control rats. 1, Three days after ureteral obstruction; 2, Five days after ureteral obstruction; 3, Seven days after ureteral obstruction.

비대해졌으며 수질부위가 심하게 망가져 얇아지기 시작하였다 (Fig. 4, 5). 이후 세뇨관 간질의 염증세포 침윤과 더불어 세뇨관 위축 및 간질의 섬유화가 관찰되었으며, 25일 이후 신장의 섬유화 정도가 매우 심하였다(Fig. 6).

리본형 TGF- β 1 antisense ODN을 투여한 실험군의 좌측 신장의 크기는 15일째까지는 크기에 있어서는 별 차이를 보이지 않았으며, 25일 이후 2배 가량 비대해지고 두께가 얇아지기 시작하였다(Fig. 4, 5). 대조군에 비해 리본형 TGF- β 1 antisense ODN 투여군에서는 25일 이후 섬유화가 약하게 관찰되었다 (Fig. 6).

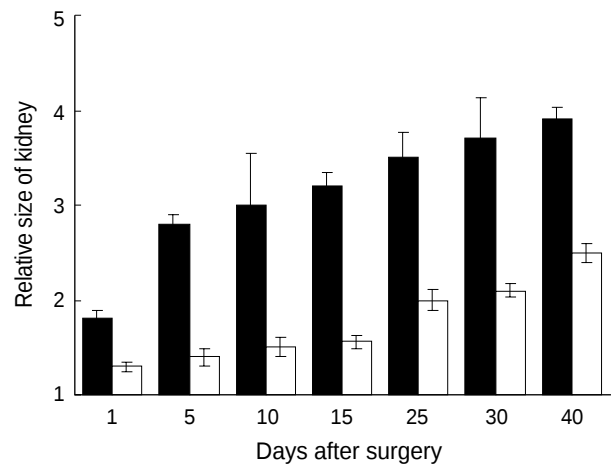


Fig. 4. The size variation of the kidneys after ureteral obstruction treated with ribbon-type transforming growth factor- β 1 antisense oligodeoxynucleotides is reduced compared to the untreated disease control rats.

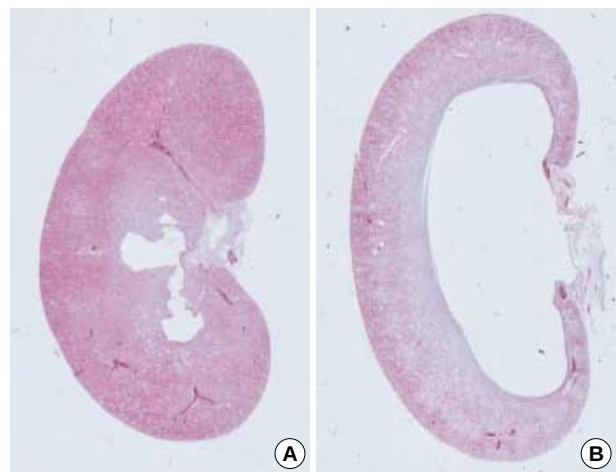


Fig. 5. Photographs of the kidneys 5 days after ureteral obstruction treated with ribbon-type transforming growth factor- β 1 antisense oligodeoxynucleotides (A) showed normal looking compared to the untreated disease control rats (B) having thinning parenchyma and hydronephrotic change.

TGF- β 1 단백질 발현 억제 효과 관찰을 위한 면역조직화학 염색

TGF- β 1의 단백질 발현은 대조군에서 모두 수술 후 5일째부터 세뇨관 세포에서 약하게 반응하여 25일째에는 세뇨관과 사구체

에서도 모두 강하게 반응하였다(Fig. 7). 그러나 리본형 TGF- β 1 antisense ODN 투여군 모두에서 TGF- β 1의 발현이 25일 이전에는 거의 발현되지 않았고, 이후 세뇨관 부위에서 약하게 관찰되었다(Fig. 7).

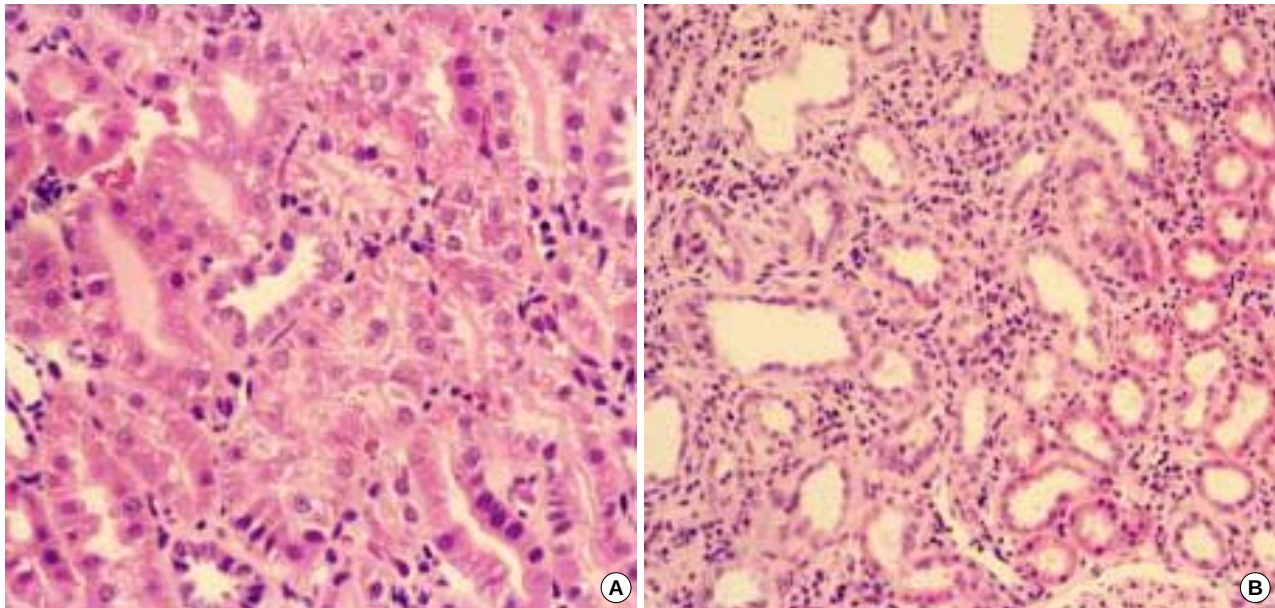


Fig. 6. Photomicrographs of the kidneys 25 days after ureteral obstruction treated with ribbon-type transforming growth factor (TGF)- β 1 antisense oligodeoxynucleotides (ODN) and untreated disease control rats. (A) Normal looking tubulointerstitium in rat with ribbon-type TGF- β 1 antisense ODN, but tubulointerstitial infiltration of inflammatory cells and fibrosis with tubular atrophy in rat with untreated disease control (B).

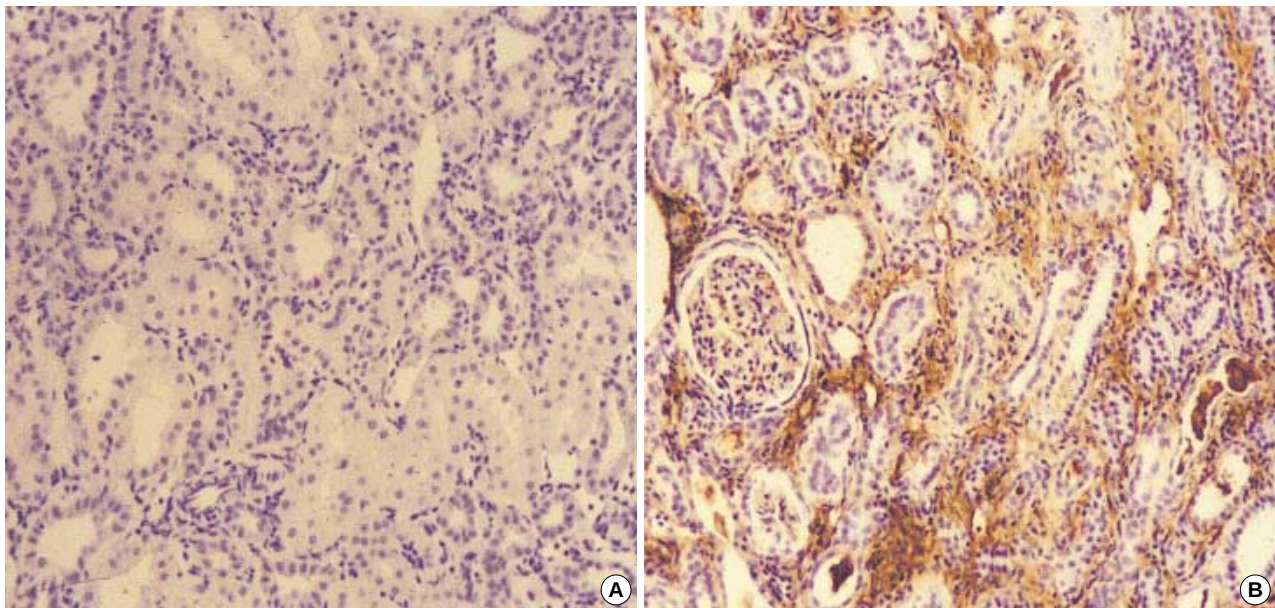


Fig. 7. Immunohistochemical stain for transforming growth factor (TGF)- β 1 protein shows negative reaction at 25 days after ureteral obstruction in rat with treated with ribbon-type TGF- β 1 antisense oligodeoxynucleotides (A) but strong positive reaction in rat with untreated disease control (B).

고찰

TGF- β 는 이황화물 결합에 의한 25 kDa의 이합체 단백질로서 섬유화를 유발하는 대표적인 사이토카인으로 알려져 있으며, 잠복기 형태로 분비되어 세포 표면과 세포외기질에 저장되었다가 활성화된다.^{3,19} TGF- β 는 TGF- β 1, β 2, β 3, β 4, β 5 등 5 종류의 아형들이 있고, 이들은 유사한 생물학적 작용을 갖는다.²⁰ 그 중에서 TGF- β 1은 손상된 조직에서 염증 반응에 동원된 활성화된 대식세포에서 분비되어 파이프록틴, 콜라겐, 프로테오글리칸과 같은 새로운 기질단백의 형성을 자극하고 프로테아제의 합성을 감소시켜 기질분해를 억제함으로써 세포외기질의 축적을 유도하고 섬유화를 유발한다.³ 백서에 TGF- β 1을 투여한 경우 신장, 간등의 직접 투여 부위에 현저한 섬유화를 비롯한 심각한 전신적 효과가 발생하며, 심한 악액질 및 전신 조직의 섬유화가 발생한다.^{4,5} 또한 사구체신염의 모델에서 정상에 비하여 TGF- β 1의 mRNA와 단백질의 발현이 증가하고 파이프록틴과 프로테오글리칸의 합성이 증가하며^{5,9}, 수주 내에 사구체의 경화와 간질의 섬유화가 발생하는 것으로 알려져 있다.^{8,19}

신장의 섬유화 연구에 좋은 동물 모델인 편측성 요관폐쇄에 의한 조직병리학적 특징은 다른 면역학적인 원인에 의한 사구체신염에서와는 달리 신사구체의 형태학적인 변화보다는 세뇨관 간질조직의 섬유화와 단핵세포의 침윤을 특징으로 한다.^{9,21} 본 연구에서도 요도 폐쇄 수술 후 3일째부터 세뇨관 간질조직의 확장하고 함께 단핵세포들의 침윤을 관찰할 수 있었으며 7일째 더욱 증가하는 경향을 보였다. TGF- β 1 mRNA 발현은 5일째 가장 많았고 이후 감소하는 경향을 보였으며, 단백질발현에 있어서는 수술 후 5일째부터 발현이 약하게 확인되고, 7일 이후 세뇨관 간질조직에서 강하게 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 세뇨관 내의 섬유화는 5일째 약하게 진행되기 시작하여 20일 이후에는 매우 심한 섬유화가 초래되었다.

섬유화의 유발인자인 TGF- β 1의 발현을 억제하기 위한 많은 연구가 행해지고 있다. 특히 TGF- β 1 mRNA에 대한 antisense ODN을 이용한 방법이 다른 항체 사용법보다 효율적이라고 알려져 있다.⁹ TGF- β 1에 대하여 HVJ 리보솜 매개 antisense ODN을 사구체신염 유발 실험 동물의 신장에 투여했을 때, TGF- β 1 mRNA 농도가 antisense ODN을 투여한 신장에서 현저히 감소되어 있고 세포외기질의 형성도 감소되어 있다.⁹ Antisense ODN은 목적하는 특정 유전자의 상보적인 mRNA와 결합함으로써 RNaseH의 활성을 억제하고 리보솜 복합체와 결합함으로써 생기는 입체 구조의 변형 등으로 유전자의 발현을 억제하며, 또한 합성과 제작 방법이 비교적 용이하여 최근 동물실험 모델에서 그 효율에 대한 우수성이 입증되고 있다.¹⁰ 따라서 antisense ODN 투여는 요관폐쇄로 인해 초래될 TGF- β 1 mRNA의 발현을 억제시킬 것으로 보인다. Antisense ODN의 투여는 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 선택적으로 TGF- β 1 유전자의 발현과 단백질 생성을 억제한다고 알려져 있다.^{9,18} 그러나 anti-

sense ODN의 결과가 언제나 명백한 것은 아니며 몇 가지 심각한 문제를 갖고 있다. 그것은 목적 부위의 불일치, 핵산분해효소에 대한 불안정성, 세포내 투과성의 결여 및 비특이적 서열에 대한 활성 등이다.²²⁻²⁴ 이러한 문제점을 보완하기 위해 본 연구에서 사용한 stem-loop 구조의 리본형 antisense ODN은 세포내 도입과 안정성에 있어 매우 우수한 것으로 알려져 있다.¹² 리본형 antisense ODN은 loop 구조를 형성함으로써 단축된 분자형태로 exonuclease III에 대해 매우 안정적이며, stem 구조로 인해 용해점이 높아짐에 따라 열과 S1 exonuclease에 대해서도 안정적이다. 또한 리본형 antisense ODN은 목적하는 특정 유전자에 대해 서로 다른 부위의 몇 개의 염기서열을 가질 수 있으며, 여러 개의 목적 유전자에 대한 antisense ODN도 가능하다. 또한 일자형 antisense ODN에 비하여 안정적이고 비특이적 서열에 대한 활성을 갖지 않으므로 리본형 antisense ODN은 소량 사용으로도 효과적이다. 리본형 antisense ODN은 phosphorothioate and methylphosphonate로 변형함으로써 RNaseH에 대해 좀 더 안정적인 구조를 형성할 수 있다.^{23,24}

본 연구에서도 TGF- β 1에 대한 리본형 antisense ODN을 제작하기 위해 stem-loop 구조를 형성할 수 있는 염기서열을 DNAsis 프로그램을 사용하여 찾아 제한효소자리를 첨가한 후 2개의 염기서열을 연결하였다. 두 개의 목적 부위와 stem-loop 구조를 갖는 리본형 TGF- β 1 antisense ODN과 일자형 TGF- β 1 antisense ODN를 각기 신사구체 간질세포에 핵산전달감염시킨 후 TGF- β 1 mRNA 발현 억제 효과에 있어 리본형 TGF- β 1 antisense ODN가 훨씬 효과적이었음을 확인하였다. 또한 exonuclease III에 대해서도 일자형 TGF- β 1 antisense ODN보다 리본형 TGF- β 1 antisense ODN이 매우 안정적이었음을 확인하였다.

유전자 치료에 있어서 유전자를 표적세포로 운반하는 방법은 매우 다양하나,²⁵ 대표적으로 많이 사용되는 방법은 retrovirus, adenovirus 등의 바이러스 운반체와²⁶ 양이온 지질분자, 고분자 등의 비바이러스 운반체이다.²⁷ 세포 전이율에 있어서는 바이러스가 단연 효율적이지만 면역성과 안전성의 문제로 인해 고농도 적용이나 반복 투여가 어렵다. 이를 보완하기 위하여 비바이러스 운반체가 관심을 받고 있으나, 세포내 도입효율, 세포핵으로의 이행률, 유전자 표현을 등에서 문제점을 갖고 있다. 본 연구에서는 이러한 점을 보완하기 위해 바이러스 및 비바이러스 방법을 혼합한 일본 적혈구 응집 바이러스 리보솜 매개 antisense ODN을 사용하였으며, 이는 세포내 흡수율을 증가시킴으로써 본 실험 모델에서 TGF- β 1 mRNA의 발현 및 단백질의 감소로 인한 섬유화 진행을 억제하는 데 효과적이었다.

본 연구에서 백서의 편측성 요관폐쇄 모델을 통한 신섬유화 유도는 TGF- β 1 mRNA의 발현양이 수술 후 3일부터 증가하여 5일째 크게 증가하였으며, TGF- β 1 mRNA 발현의 증가와 함께 섬유화가 빠르게 진행되고, 25일째에는 섬유화가 심각하게 초래되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 리본형 TGF- β 1 anti-

sense ODN을 투여했을 경우에는 TGF- β 1 mRNA의 발현양이 크게 증가하지 않았고, 섬유화 역시 매우 느리고 약하게 초래되었으며 이러한 섬유화 형성 감소는 리본형 TGF- β 1 antisense ODN의 투여로 인한 TGF- β 1 mRNA의 발현 억제에 기인하는 것으로 생각된다. 또한 본 연구에 사용한 리본형 TGF- β 1 antisense ODN은 일자형 TGF- β 1 antisense ODN과는 달리 exonuclease에 대해 매우 안정하였고, 유전자 운반체로 사용한 HVJ 리포솜이 리본형 TGF- β 1 antisense ODN을 세포 내로 운반하는 데 효과적이었다. 본 연구를 통해 섬유화 형성에 대한 TGF- β 1의 역할을 간접적으로 확인할 수 있었으며, TGF- β 1에 대한 리본형 antisense ODN이 TGF- β 1 mRNA 발현 억제에 좀 더 효과적이었다. 또한 편측성 요관을 폐쇄한 백서에서 HVJ 리포솜 유전자 전달체로 TGF- β 1에 대한 리본형 antisense ODN을 도입하여 TGF- β 1 mRNA의 발현을 억제함으로써 세뇨관의 섬유화 형성은 감소시킬 수 있음을 알게 되었다. 이러한 결과는 이 분야의 치료 방향을 제시하고, 섬유화 형성을 감소시키는 약제를 개발하는 데 기여할 것으로 생각한다.

참고문헌

- Risdon R, Sloper J, Vardener H. Relationship between renal function and histologic changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerulonephritis. *Lancet* 1968; 2: 363-6.
- Schainuck L, Striker G, Cutler R, Benditt E. Structural-functional correlations in renal disease. II. The correlations. *Hum Pathol* 1970; 1: 631-41.
- Flaumenhaft R, Abe M, Mignitti P, Rifkin DB. Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor β in endothelial cells: regulation of plasminogen activator activity. *M J Cell Biol* 1992; 118: 901-9.
- Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991; 64: 867-9.
- Terrell TG, Working PK, Chow CP, Green JD. Pathology of recombinant human transforming growth factor β 1 in rats and rabbits. *Int Rev Exp Pathol* 1993; 34: 43-67.
- Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 2495-508.
- Border WA, Noble NA. Transforming growth factor in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-92.
- Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF β 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 1994; 45: 916-27.
- Isaka Y, Tsujie M, Ando Y, *et al.* Transforming growth factor- β 1 antisense oligodeoxynucleotides block interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 2000; 58: 1885-92.
- Akagi Y, Isaka Y, Arai M, *et al.* Inhibition of TGF- β 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996; 50: 148-55.
- Isaka Y, Akagi Y, Ando Y, *et al.* Gene therapy by transforming growth factor- β receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999; 55: 465-75.
- Moon IJ, Choi KS, Choi YK, *et al.* Potent growth inhibition of leukemic cells by novel ribbon-type antisense oligonucleotides to *c-myc*1. *J Bio Chem* 2000; 275: 4647-53.
- Tsujie M, Isaka Y, Ando Y, *et al.* Gene transfer targeting interstitial fibroblasts by the artificial viral envelope type hemagglutinating virus of Japan liposome method. *Kidney Int* 2000; 58: 1972-80.
- Ratajczak MZ, Hijiya N, Catani L, *et al.* Acute- and chronic phase chronic myelogenous leukemia colony-forming units are highly sensitive to the growth inhibitory effects of *c-myc* antisense oligodeoxynucleotides. *Blood* 1992; 79: 1956-61.
- Kastan MB, Stone KD, Civin CI. Nuclear oncoprotein expression as a function of lineage, differentiation stage, and proliferative status of normal hematopoietic cells. *Blood* 1989; 74: 1517-24.
- Kreisberg JL, Hoover RL, Karnovsky MJ. Isolation and characterization of rat glomerular epithelial cells *in vitro*. *Kidney Int* 1978; 14: 21-30.
- Happer PA, Robinson JM, Hoover RL, Wright TC. Karnovsky. Improved method for culturing rat glomerular cells. *Kidney Int* 1984; 24: 246-8.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.
- Okuda A, Languino LR, Ruoslahti E, Border WA. Elevated expression of transforming growth factor- β and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis: possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. *J Clin Invest* 1990; 86: 453-62.
- Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor- β : recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 1992; 119: 1017-21.
- Eddy AA. Experimental insights into the tubulointerstitial disease accompanying primary glomerular lesions. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 1273-87.
- Flanagan WM, Wagner RW. Potent and selective gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Mol Cell Biochem* 1997; 172: 213-25.
- Matsuda M, Park, JG, Wang D, *et al.* Abrogation of the Fc gamma receptor IIA-mediated phagocytic signal by stem-loop *syk* antisense oligonucleotides. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 1095-106.
- Wagner RW, Matteucci MD, Lewis JG, *et al.* Antisense gene inhibition by oligonucleotides containing C-5 propyne pyrimidines. *Sci-*

- ence 1993; 260: 1510-3.
25. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, *et al.* T lymphocyte directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. Science 1995; 270: 475-80.
26. Imai E, Akagi Y, Isaka Y. Towards gene therapy for renal disease. Nephrologie 1998; 19: 397-402.
27. Imai E, Isaka Y, Akagi Y, Kaneda Y. Gene transfer into the glomerulus by the hemagglutinating virus of Japan-liposome method. Exp Nephrol 1997; 5: 112-7.
28. Rappaport J, Hanss B, Kopp J, *et al.* Transport of phosphothioate oligonucleotides in kidney: implication for molecular therapy. Kidney Int 1995; 47: 1462-9.