
백서의 혈관 평활근 세포 증식에 대한 E2F Decoy Oligodeoxynucleotides의 효과

김미정 · 김혜순 · 한성욱 · 이인규 · 박남희¹ · 최세영¹ · 김기식

계명대학교 의과대학 내과학교실, 흉부외과학교실¹

Effect of the E2F decoy Oligodeoxynucleotides in Rat Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation

Mi-Jung Kim, Hye-Soon Kim, Seong-Wook Han, In-Kyu Lee,
Nam-Hee Park¹, Sae-Young Cho¹, Kee-Sik Kim

*Department of Internal Medicine, Department of Chest Surgery¹,
Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea*

Abstract

Background : Excessive proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and neointimal formation are critical steps in the pathogenesis of restenosis after percutaneous transluminal angioplasty (PTCA). The transcription factor, E2F, plays a critical role in transactivation of several genes involved in cell cycle regulation. In the present study, we investigated the hypothesis that transfection of cis-element double-stranded decoy oligodeoxynucleotides (ODNs) corresponding to E2F binding sites inhibits the proliferation of VSMCs and neointimal hyperplasia.

Methods : We evaluated gene expression and proliferation in rat VSMCs under high D-glucose and serum, and after transfection of E2F decoy ODNs in vitro. And we also evaluated neointimal formation in vivo model of rat carotid injury.

Results : Transfection with E2F decoy ODNs inhibited VSMCs proliferation ($p<0.05$). Transfection of E2F decoy ODNs attenuated DNA binding activity ($p<0.001$) and promoter activity of E2F induced by high glucose and serum ($P<0.01$). E2F decoy ODNs also attenuated glucose- and serum-induced expression of cyclin A and PCNA genes ($p<0.01$). Administration of E2F decoy ODNs in vivo using the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome method virtually abolished neointimal formation after balloon injury to the rat carotid artery ($P<0.01$).

Conclusion : Conclusions: This study shows that transfection of E2F decoy ODNs may decrease cell cycle regulatory gene expression, cell proliferation and vascular lesion formation in vitro and in vivo. Our results provide a novel potential therapeutic strategy for the prevention of restenosis after angioplasty.

Key Words: E2F decoy, Neointimal formation, VSMC proliferation, Balloon injury

책임저자 : 김기식

대구시 중구 동산동 194번지 계명대학교 동산의료원 내과

Tel: 053)250-7379, Fax: 053)250-7434, E-mail: kks7379@dsmc.or.kr

서론

관상동맥 협착증의 치료 방법으로 경피적 관상동맥 확장술이 많이 시도되고 있다. 그러나, 시술 후 첫 6개월 이내에 발생하는 20~50%에 이르는 높은 재협착률은 아직 해결되지 않은 문제점이다¹. 이러한 재협착을 유발시키는 가장 큰 병인은 확장술 직후에 나타나는 혈관 내벽에서의 혈관 평활근 세포의 비정상적인 증식이다². 재협착을 방지하기 위하여 현재 시도되고 있는 방법은 경피적 관상동맥 확장술 시 병변 부위에 stent를 삽입하는 방법과 국소적 방사성동위원소 치료법 등이 있으며, 최근에는 분자생물학적 기술을 이용한 유전자 치료가 많이 시도되고 있다^{3,4}.

지금까지 시도되어진 유전자 치료 방법으로는 크게 gax, Rb, p27 또는 p21 (cdk inhibitor), E2F 등과 같은 세포주기와 관련된 유전자 발현을 조절하여 세포 증식을 억제하는 방법과 thymidine kinase, fas ligand, p53과 같은 세포고사(apoptosis)와 관련된 유전자를 도입하는 방법 등이 이용되어 왔다⁵⁻¹³.

E2F는 8개의 염기(5'-TTTCGCGC-3')로 이루어진 보존배열 (consensus sequence)을 가지는 전사 조절인자로서 double-stranded DNA에 높은 특이성과 친화성을 가지고 결합하여, 세포주기에서 G1기에서 S기로 진행되는 시기동안 유전자발현을 조절하는 중요한 역할을 한다¹⁴. c-myc, dihydrofolate reductase, c-mycb, thymidine kinase, cdc2, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), cyclin A 등은 세포주기가 진행하는데 필수적인 유전자들이며, 이들 유전자의 promotor 부분에 E2F 결합 부위를 가지고 있으며 E2F 전사인자가 이곳에 부착함으로써 전사가 시작된다¹⁵⁻¹⁹. 따라서, 이들 유전자의 프로모터 (protomor) 부분에 E2F decoy ODNs를 처리하여 E2F와 프로모터의 표적 부위 간의 결합을 저해함으로써 세포주기가 진행하는데 필요한 각종 유전자의 발현을 억제할

수 있고, 그 결과 세포주기의 진행이 억제되어 세포의 증식을 억제시킬 수 있다⁹.

저자들은 E2F에 대한 cis-element decoy 치료가 경피적 관상동맥 확장술 이후 혈관의 평활근 세포의 이상증식에 의해 혈관내벽이 좁아지는 혈관 재협착의 치료에 있어 중요한 유전자 치료법으로 사용될 수 있을 것으로 사료되어, 이를 규명하고자 이 연구를 시행하였다. 이 연구에서 E2F decoy ODNs를 이용하여 E2F 전사인자가 세포주기에 관여하는 cyclin A 유전자 및 PCNA 유전자 발현에 미치는 효과를 관찰하였고, in vivo에서 경동맥 풍선 확장술을 시행한 백서모델에서의 혈관 재협착에 미치는 효과를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

280~320 g의 9~10 주령, 수컷 Sprague-Dawley 백서 (효창, 대구, 한국)를 이용하였다. 온도 (22±2℃), 명암 (12시간 주기), 습도 45.5±5%로 조절된 환경에서 사육하였고, 물과 사료를 제한없이 공급하였다.

2. 세포 배양

백서의 흉부 대동맥을 적출하여 혈관평활근세포를 분리한 후 20% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA)에서 배양하였다. 혈관평활근세포의 순도는 smooth muscle-specific αactin monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA)를 사용하여 확인하였다. 3대에서 5대 계대 배양한 세포를 사용하였다.

3. Decoy ODNs 제작

염기서열
phosphorothioated E2F decoy ODNs (PS-ODNs)

5'-ATsTTAAGTTTCGCGCCCTTTCTCAsAs-3'
3'-sTsAAATTCAAAGCGCGGAAAGAGsTT-5'

Mismatched E2F ODNs (M-ODNs)

5'-ATsTTAAGTTTCGATTCTTTCTCAsAs-3'
3'-sTsAAATTCAAAGCTAAGGAAAGAGsTT-5'

4. HVJ-리포솜의 제작

Sendai 바이러스 (Hemagglutinating virus of Japan, HVJ)를 polypeptone 용액으로 1,000배 희석하여 사용하기 전까지 4°C에 보관하고 10일 배양한 수정란의 용모요막 (chorioallantoic membrane) 0.5 mm 상단부에 HVJ 주입부를 표시하여 요오드 (iodine)로 소독한 후 구멍을 뚫었다. 희석한 HVJ를 구멍을 통하여 주사기로 용모요막액 (choioallantoic fluid)에 0.1 mL 주사한 뒤 파라핀으로 주사 부위를 막았다. HVJ가 접종된 수정란을 35.5°C에서 3일간 배양한 후 4°C에서 하룻밤 냉장시켰다. 수정란 껍질을 부분적으로 제거하고 주사기로 용모요막액을 멸균된 병에 모았다. 이것을 4°C에서 30분 동안 1,000 g으로 원심분리하여 불순물을 제거하고 상층액만 모았다. 상층액을 4°C에서 30분 동안 27,000 g으로 원심분리하여 바이러스 입자를 침전시킨 후 balanced salt solution (BSS: 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6)을 첨가하여 4°C에서 하룻밤 정지한 후 조심스럽게 현탁하였다. 바이러스 입자 현탁액을 1,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 바이러스 입자가 포함된 상층액만 모으고, 540 nm에서의 흡광도와 HA (Hemagglutinating assay)로 바이러스 역가를 측정하였다.

리포솜 (liposome)을 만들기 위해서 cholesterol, dioleoylphosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, sphingomyeline, phosphatidylserine을 50:13.3:13.3:13.3:10의 무게비율로 혼합하였다. 지질 혼합물은 클로로포름 (chloroform) 제거 후 플라스크에 침전시켰다. 건조된 지질을 ODNs을 함유한 200 μ L balanced salt solution (BBS: 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6)에 녹

여서 사용하였다. 리포솜을 격렬히 혼합하였다. 정제된 HVJ는 사용 전 3분 동안 자외선 조사하였다. HVJ-리포솜 액에 2 mL BSS를 첨가하고 4°C에서 5분간 반응시킨 후 37°C, water bath shaker에서 30분 동안 정치하였다. sucrose 밀도 구배를 이용해 유리 HVJ를 제거한다. 원심분리 후 꼭대기 층을 회수하였다.

5. In vitro 유전자 주입

유전자 주입은 이전에 보고한 바와 같이 실시하였다²⁰. Lipofectin (Gibco BRL) (molar ratio:DNA:lipid = 1:3)과 decoy ODNs (100 nM)을 세포에 주입 후 37°C에서 5시간동안 반응시켰다. 10% FBS를 포함한 신선한 배지를 첨가 후 CO2 incubator에서 배양하였다.

6. 성장속도 분석

Lipofectin:decoy ODNs (100 nM)을 세포에 주입 후 37°C에 5시간동안 반응시켰다. 2~3일 배양 후 WST 세포 계측 키트 (Wako, Osaka, Japan)로 측정하였다.

7. 겔 지연 분석법 (Gel mobility shift assay)

혈관평활근세포에서 핵산 추출물 (nuclear extracts)을 추출하였다. 백서의 혈관 평활근세포가 80~90% 수준으로 배양되었을 때 차가운 PBS 용액으로 두 번 세척한 후 모았다. 이 세포들을 400 μ L의 ice-cold buffer A (10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 10 μ g/ μ L aprotinin과 10 μ g/ μ L leupeptin)에서 균질화시킨 후 얼음 위에 15분 동안 방치하였다. 이 세포를 NP-40 25 μ L로 처치 후에 buffer B (20 mmol/L HEPES, 0.4 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT와 1 mmol/PMAF)에 넣어서 10분 동안 12,000 g으로 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액은 핵산 추출물로 수집하였고 핵산 단백질의 양은 단백분석키트

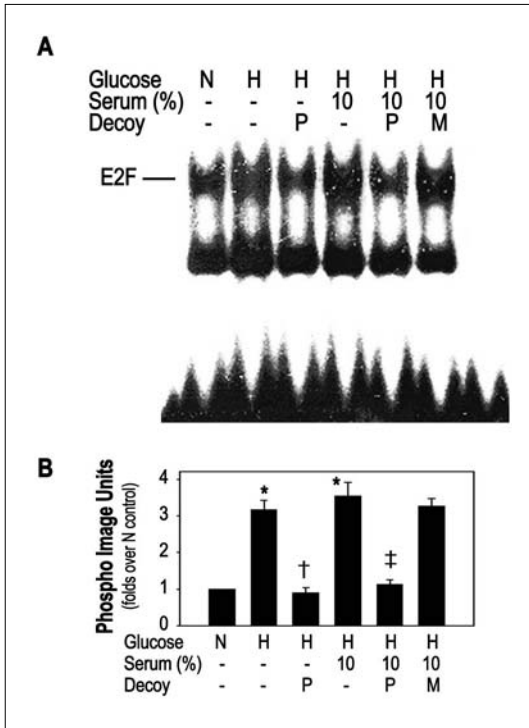


Fig. 1. Effects of ODNs on the DNA-binding activity of E2F. Typical gel sift assay is shown VSMCs transfected with E2F decoy ODNs. Culturing in conditioned media containing high glucose and serum significantly increased E2F binding activity. Transfection of PS-E2F ODNs significantly attenuated E2F DNA-binding activity induced by high glucose and serum. Abbreviations: N, VSMCs cultured with normal glucose (5.5 mmol/L D-glucose); H, VSMCs cultured with high glucose (25 mmol/L D-glucose); Decoy, VSMCs trasfected with 100 nmol/L E2F decoy ODNs: P, PS-E2F ODNs; M, mismatched E2F decoy ODNs. EMSA results are expressed as the mean \pm s.e.m of five independent experiments. Statistical significance was determined as *P < 0.001 compared to N, † P < 0.01 compared to H, ‡ P < 0.01 compared to H +10% serum.

(BioRad, Richmond, CA, USA)로 측정하였다.

E2F, mismatched decoy primer를 [γ -³²P] ATP와 T4 polynucleotide kinase를 이용하여 제작하였다. ³²P 표지 소식자는 NAPP-5 칼럼에서 정제하였으며 단백질-DNA 결합 반응은 20 μ L내에서 실온

에서 20분간 시행하였다. 반응 혼합물은 6 μ L 핵산 추출물, 100 μ L/mL poly dI:dC, 10 mM Tris/HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 4% glycerol, 60,000 cpm ³²P-labeled primer DNA로 조성하였다. 반응시킨 후 샘플을 0.5 \times Tris-borate-EDTA buffer내에서 4% 천연 폴리아크릴아마이드겔 (native polyacrylamide gel)에 접종한 후 150 볼트에서 2시간 동안 전기영동을 시행한 후 분석하였다.

8. Luciferase 분석법

프로모터 활성화에 대한 E2F decoy ODNs의 영향을 보기위해 cyclin A promoter luciferase constructs²¹와 E2F luciferase constructs를 이용하였다. 세포를 PBS로 2회 세척한 후 200 μ L Reporter lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA)를 가하여 세포추출물을 얻어 luminometer를 이용하여 luciferase 활성도를 측정하였다.

9. 노던 블롯 (Northern blot analysis)

PCNA와 cyclin A의 유전자 발현을 보기 위해 Northern blotting을 실시하였다. 총 RNA (10 μ g)를 1% 포름알데히드-아가로스 겔 (formaldehyde-agarose gel)에서 전기영동한 후 나일론 막으로 이동시켰다. 나일론 막을 방사선 표지 소식자와 함께 Express HybTM 용액에서 2시간 동안 65 $^{\circ}$ C에서 보합결합 (hybridization) 시킨 후 여러 번 세정하였다. 이 막을 24~48시간 동안 X-선 필름에 노출시킨 후 mRNA 발현을 밀도계측기 (densidomter)를 이용하여 분석하였다.

10. 백서의 혈관손상모델과 *in vivo* 유전자 전달

백서의 복강에 펜토바비탈 (pentobarbital)을 그람 당 0.9 μ L 투여하여 전신마취 시킨 후 경부 좌측의 피부를 절개하고 경동맥을 노출시켰다. 경동맥을 노출시킨 후 총경동맥 기저부와 내경동맥 원위부를 실을 이용하여 결찰하였다. 그 후

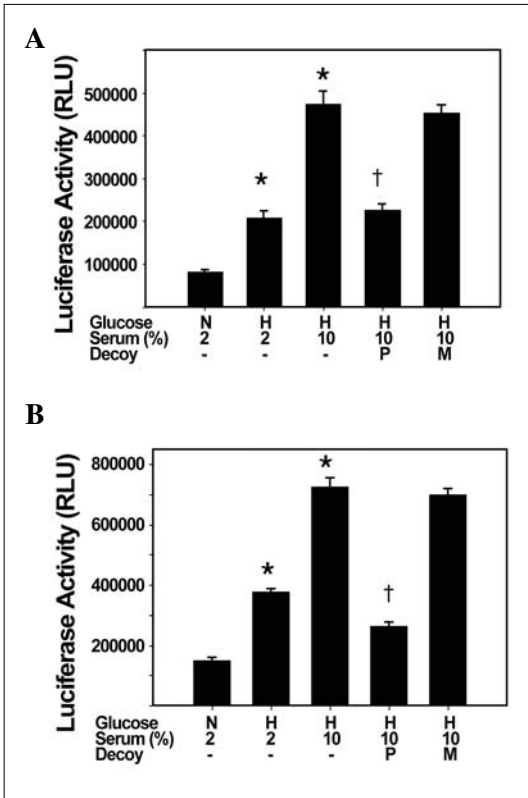


Fig. 2. Effects of E2F ODNs on promoter activity of cyclin A in smooth muscle cells. VSMCs were co-transfected with decoy ODNs (100 nmol/L) and cyclin A promoter luciferase constructs (A) or [E2F]x4-Luc (B) under high glucose and serum. E2F decoy ODNs markedly attenuated up-regulated luciferase gene expression by high glucose and serum. The values represent mean \pm s.e.m. of five independent experiments after normalization of β -galactosidase activity. Statistical significance was determined as * $P < 0.01$ compared to N, † $P < 0.01$ compared to H +10% serum. Abbreviations are same as Fig. 1.

외경동맥의 원위부를 묶고 근위부의 혈관을 부분적으로 절개한 후 2 French 풍선 카테타 (Baxter. Co. Irvine, CA, USA)를 절개부위를 통해 총경동맥 근위부까지 삽입하였다. 카테타에 0.4 mL의 생리식염수를 주입하여 풍선을 부풀린 후 천천히 당겨서 삽입 부위 직전까지 오도록 하고 3차례 혈관 손상을 일으킨다. 손상된 혈관 부위

를 일시적으로 결찰하였다. 풍선 확장술 손상 후 PS-E2F ODNs을 함유한 20 μ L HVJ-리포솜 혼합물을 실온에서 10분간 혈관 강 내 정치 (incubation)시켰다. 이후 주입 배관을 제거하였다. Transfection 후 결찰을 풀어 총경동맥의 혈류를 재개하였다. 이 과정동안 신경학적 부작용 혹은 혈관 이상을 보인 쥐는 없었다.

11. 조직학적 분석

유전자전달 2주 후 쥐를 희생하여 혈관을 얻어 4% 포르말데히드에 고정시켰다. 내막과 중막 면적은 digitizing system (model INTUOS 6x8, Wacom, Vancouver, WA, USA)을 사용하여 측정하였다. 면역조직학적 검사를 위해 절단면은 rabbit anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 항체를 이용하여 반응시켰다.

12. 통계처리

자료의 통계 분석을 SPSS 10.0을 이용하였으며, 결과는 평균 \pm 표준 오차로 나타내었다. 변수의 분석은 Duncan's test를 이용하였다. P값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. E2F decoy ODNs의 E2F 결합

고포도당 농도 (25 mmol D-glucose)와 혈청을 포함한 배지에서 배양했을 때, 대조 배지에서보다 E2F의 DNA 결합능이 증가되었다 ($P < 0.001$). phosphorothioated E2F decoy ODNs (100 nmol/L)을 유전자 주입 시켰을 때 고포도당과 혈청으로 증가되었던 E2F DNA 결합능이 감소되었다 ($P < 0.001$) (Fig. 1).

2. 혈관평활근세포의 프로모터 활성에 대한 E2F decoy ODNs의 영향

프로모터 활성도에 대한 E2F decoy ODNs의

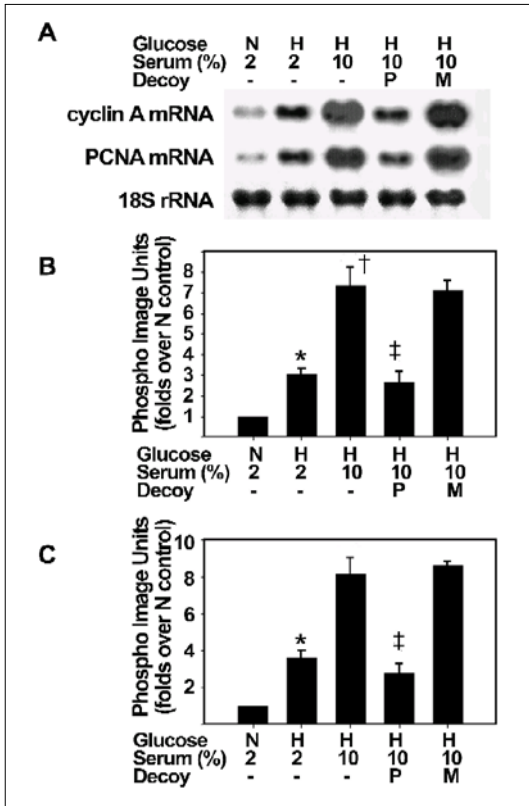


Fig. 3. Effects of E2F ODNs on gene expression in VSMCs. Gene expression of cyclin A (B) and PCNA (C) in rat VSMC was quantified with densitometric analysis. High glucose and serum stimulated the expression of cyclin A and PCNA genes in rat VSMCs (* $P < 0.05$, † $P < 0.01$). E2F decoy ODNs transfection resulted in the attenuation of gene expression of both PCNA and cyclin A (‡ $P < 0.01$). However, 18S rRNA expression was not affected by E2F decoy ODNs (A). Values represent the mean \pm s.e.m of five independent experiments. Abbreviations are same as Fig. 1. Statistical significance was determined ad * $P < 0.05$ compared to N, † $P < 0.01$ compared to H +2% serum, ‡ $P < 0.001$ compared to H +10% serum.

영향을 보기 위해 cyclin A promotor construct와 E2F를 포함한 reporter gene construct를 이용하였다. E2F decoy ODNs을 동시주입 (co-transfection) 시켰을 때 고포도당 (25 mmol D-glucose)과 혈청에 의해 증가되었던 luciferase 활성이 통계적으

로 유의하게 억제되었다 ($P < 0.01$). 그러나, mismatched E2F ODNs은 증가된 luciferase 활성도에 대한 영향을 보이지 않았다 (Fig. 2).

3. 혈관평활근세포의 세포주기 조절유전자 발현에 대한 E2F decoy ODNs의 영향

내인성 세포주기 조절유전자의 발현에 대한 E2F decoy ODNs의 영향을 보았다. 고포도당과 혈청은 쥐의 혈관평활근세포에서 cyclin A와 PCNA 유전자 발현을 증가시켰고 ($P < 0.05$), E2F decoy ODNs 유전자주입 시 cyclin A와 PCNA 유전자 발현이 유의하게 약화되었다 ($P < 0.01$) (Fig. 3A와 B). 그러나, 18S rRNA 발현은 E2F decoy ODNs에 영향을 받지 않았다 (Fig. 3).

4. in vitro에서 혈관평활근세포의 성장에 대한 E2F decoy ODNs의 억제 효과

고포도당과 혈청은 대조군에 비해 쥐의 혈관평활근세포의 증식을 촉진시켰다 ($P < 0.001$). E2F ODNs decoy를 유전자주입 시켰을 때 고포도당과 혈청에 의해 증가되었던 세포 증식이 억제되었다 ($P < 0.01$) (Fig. 4).

5. 쥐 경동맥에서 풍선확장술 후 신생내막 형성에 대한 E2F decoy ODNs의 영향

HVJ-리포솜 방법을 이용하여 쥐 경동맥에서 E2F decoy ODNs의 유전자주입 효과를 실험하였다. 쥐 경동맥에 풍선확장술에 의한 손상을 입히고 phosphorothioated E2F decoy ODNs을 주입 후 14일째 신생내막 형성을 보았을 때 신생내막 형성이 유의하게 감소되었다 ($P < 0.01$) (Fig. 5).

고찰

본 연구에서 풍선확장술로 혈관 손상 후 유발

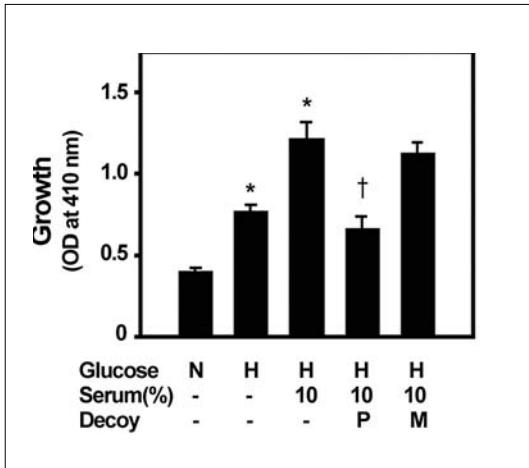


Fig. 4. Effect of E2F ODNs on cell proliferation in rat VSMCs. Proliferation activities are calculated as mean \pm s.e.m of sex separate measurements. Decoy (100 nmol) were transfected into smooth muscle cells. After transfection (2~3 days), an index of cell proliferation was determined with the use of a WST cell counting kit. High glucose and serum stimulated the growth of cultured primary rat VSMCs, compared to control cultures (* $P < 0.01$). Transfection of E2F decoy ODNs resulted in significant inhibition of cell growth stimulated by high glucose or serum ($\dagger P < 0.01$). Statistical significance was determined as * $P < 0.01$ compared to N, $\dagger P < 0.01$ compared to H +10% serum. Abbreviations are same as Fig. 1.

되는 신생내막의 형성을 E2F decoy ODNs을 유전자주입시킴으로써 예방할 수 있음을 보여주었다.

현재까지 세포주기 조절 유전자를 억제함으로써 손상된 혈관에서 혈관 평활근 세포의 증식과 신생내막 형성을 억제하고자하는 많은 연구가 진행되었다²²⁻²⁴. 그러나, 세포주기 조절의 단일 유전자의 억제만으로는 이러한 과정을 막는데 불충분한 것으로 사료된다.

E2F (E2 factor)는 1986년 Kovesdi 등이 E1a에 의해 활성화되는 세포 인자 (cellular factor)로서 adenovirus E2 프로모터의 활성화에 관련됨을 발견하여 명명하였다²⁵. E2F는 cdk2와 4, cyclins A,

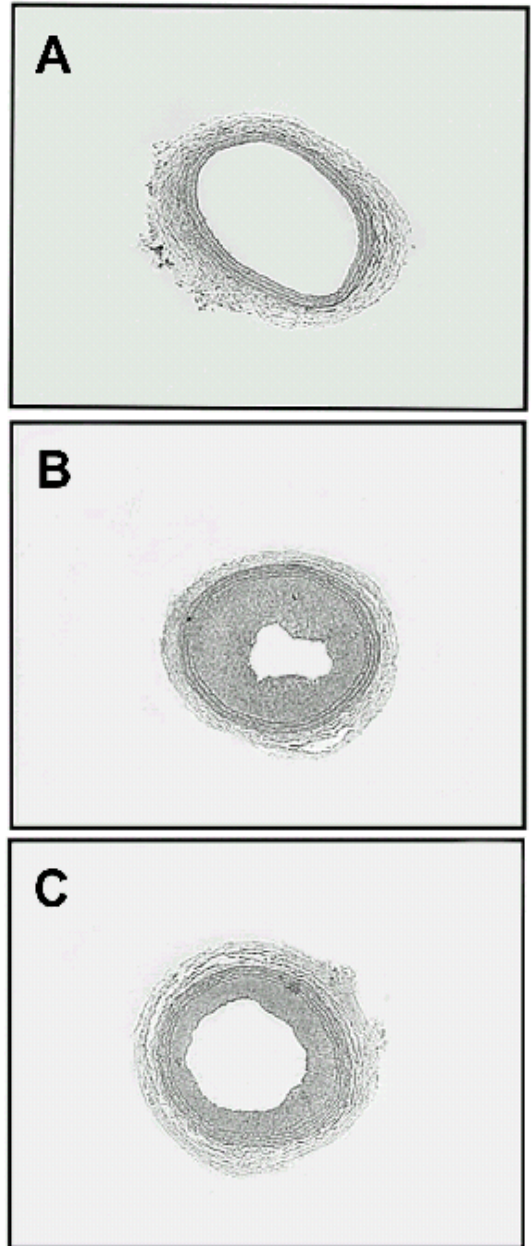


Fig. 5. Effect of E2F decoy ODNs on neointimal formation following balloon injury to rat carotid artery. A single administration of PS-E2F ODNs resulted in significant reduction of neointimal formation ($P < 0.01$). A representative cross-section of the left common carotid artery of control rat (A) is shown 14 days after balloon injury (B), 14 days after balloon injury with PS-E2F ODNs using the HVJ-liposome method (C).

D와 E 등의 세포주기를 조절하는 유전자와 PCNA, DNA polymerase α , ribonucleotide reductase 등의 DNA 합성과 관련된 유전자 등의 다양한 유전자 발현을 증가시키는데 관련이 있는 전사인자이다²⁶. 또한, retinoblastoma gene product (RB)의 항증식 효과는 이들의 E2F에 대한 결합능력에 의존하며, RB는 여러 유전자의 프로모터 내에서 E2F cis-element에 대한 결합을 방해하는 역할을 한다²⁵⁻²⁶.

전사인자인 E2F는 8개의 염기 (5'-TTTCGCGC-3')로 이루어진 보존배열을 가지는 전사조절인자로서 double-stranded DNA에 높은 특이성과 친화성을 가지고 결합한다²⁷. 여러 연구에서 목표가 되는 전사인자에 강한 친화력을 가지는 합성 double-stranded DNA를 decoy cis-element 형태로 세포내로 유전자주입하여 유전자의 전사를 변화시킬 수 있음을 보고하였다²⁸⁻²⁹. 이것은 최근 유전자억제 방법의 새로운 분류의 하나인 안티센스 (antisense)의 새로운 방법으로 보고되고 있다.

본 연구에서는 in vitro 뿐만 아니라 in vivo에서 E2F에 효과적으로 결합할 수 있는 E2F 결합 부위 (binding site)를 가진 decoy ODNs을 혈관평활근세포에 전달시킴으로써 세포주기조절에 필수적인 유전자의 활성화를 억제시키고, 따라서 혈관평활근세포의 증식과 신생내막 형성을 억제시킴을 보여주었다.

DNA를 세포 내로 전달하는 방법으로는 바이러스성 벡터 (viral vector)와 폴리머 (polymer), 양이온 리포솜 (cationic liposome) 등의 비바이러스성 벡터 (nonviral vector)를 이용하는 방법, 그리고 리포솜-바이러스 복합체 (liposome-viral conjugate)를 이용한 방법 등이 있다³⁰⁻³¹. 그러나, 바이러스성 벡터는 기존의 바이러스로부터 유전자 물질이 함께 전달되고 면역화를 일으키고 숙주 유전자 구조를 변형시킬 수 있어 안정상의 문제가 있다³⁰⁻³¹. 반면 비바이러스성 벡터는 독성과 면역성은 적으나 생체 내에서 유전자 전달 효율성이 떨어진다라는 문제점이 있다³⁰⁻³¹. Kaneda 등은 HVJ-리포솜 방법을 개발하고 여러 보고에서 유전자 전

달의 효율성이 높음을 보고하였다³². 이 방법은 먼저 DNA나 ODNs을 인지질과 콜레스테롤로 구성된 리포솜으로 감싸고 리포솜을 자외선 조사로 불활성화시킨 HVJ에 융합시켜 HVJ-리포솜을 만든 후, 세포막에 리포솜을 융합시킨 다음 세포 내로 유전자 물질을 전달시키는 것이다. 본 교실에서도 HVJ-리포솜 방법을 이용하여 fluorescein-labeled AP-1 decoy ODNs을 인간의 혈관평활근세포에 유전자를 전달시켜, 이전의 전통적인 방법들보다 유전자 전달이 더 용이함을 보고한 바 있다²⁰.

Hemagglutinating 바이러스 (HVJ, sendai virus)는 파라믹소 바이러스로 직경은 300 nm이고 외피에 두 개의 당단백질 즉, hemagglutinating neuraminidase와 융합 (fusion) 단백질질을 가지고 있다. 이 바이러스는 중성의 pH에서 세포막과 융합할 수 있어 lysosome에 의해 파괴되지 않고 DNA를 세포질 내로 직접 주입할 수 있다. 본 연구에서도 HVJ-리포솜 방법을 이용하여 decoy ODNs을 세포 내로 효과적으로 전달할 수 있음을 알 수 있었다.

또한, ODNs이 체액 내에서 DNase에 의해 분해되는 불안정을 해결하기 위하여 phosphorothioate로 ODNs 끝부분을 대치하여 phosphodiester back bone을 만들어 주어 이러한 문제를 해결하였다³⁴. 그러나, 이러한 화학적으로 변형된 ODNs의 경우 RNaseH에 불감성 (insensitivity), hydrolyzed modified nucleotide에 의한 돌연변이 가능성, 결합 특이성의 감소, 면역 활성화의 문제점이 있어 향후 해결해야 할 문제점으로 남아있다.

본 연구에서는 고혈당이 혈관평활근세포의 증식에 미치는 영향 또한 알 수 있었다. 고혈당은 당뇨병 환자에서 대혈관 합병증의 발생에 중요한 원인으로 생각되고 있으나, 고혈당이 혈관평활근 세포에 미치는 영향에 대한 연구는 일부에 불과하다^{35,36}. 본 연구에서 고혈당이 혈관평활근 세포의 증식을 촉진시킴을 볼 수 있었다. 또한, 고혈당이 E2F DNA 결합 활성도와 세포주기 조절유전자의 활성화에도 영향을 줌을 알 수 있었

는데, E2F DNA 결합 활성도와 luciferase 활성도가 고혈당을 투여한 혈관평활근세포에서 증가하였고 이러한 영향은 혈청을 첨가하였을 때 더욱 뚜렷하였다. 또한, cyclin A와 PCNA 같은 세포주기의 G1에서 S기로 진행하는데 필수적인 세포주기 조절유전자 발현이 고혈당과 혈청에 의해 증가되었으나, E2F decoy ODNs을 유전자전달로 억제되었고 혈관평활근세포 증식이 유의하게 감소함을 보여 주었다.

결론적으로 본 연구에서 *in vitro*와 *in vivo*에서 E2F decoy ODNs이 세포주기 조절유전자 발현과 혈관 평활근 세포증식을 효과적으로 억제함을 보여 주었다. 또한, decoy ODNs이 혈관확장술 후 발생하는 재협착을 방지하는 데 새로운 치료 방법으로 사용할 수 있음을 제시한 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Liu MW, Roubin GS, King SB III. Restenosis after coronary angioplasty. *Circulation* 1989;79:1374-1387
2. Pauletto P, Sartore S, Pessina AC. Smooth-muscle cell proliferation and differentiation in neointima formation and vascular restenosis. *clin Sci* 1994;87:467-479
3. Sasao H, Endo A, Hasegawa T, Ichikawa Y, Nod R, Oimatsu H, Takada T. Long-term follow-up after coronary stent implantation in patients with coronary artery disease. *Angiography* 2002;53:149-156
4. Jain D, Geist V, Katus HA, Richardt G. Intracoronary Beta radiation for in-stent stenosis in a patient with percutaneously treated hypertrophic cardiomyopathy and coronary artery disease. *J Invasive Cardiol* 2002;14:751-755
5. Witzenbichler B, Kureishi Y, Luo Z, Le Roux A, Branellec D, Walsh K. Regulation of smooth muscle cell migration and integrin expression by the Gax transcription factor. *J Clin Invest* 1999;104:1469-1480
6. Chang MW, Barr E, Seltzer J, Jiang YQ, Nabel GJ, Nabel EG, Parmacek MS, Leiden JM. Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product. *Science* 1995;267:518-522
7. Chang MW, Barr E, Lu MM, Barton K, Leiden JM. Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 1995;96:2260-2268
8. Chen D, Krasinski K, Sylvester A, Chen J, Nisen PD, Andres V. Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27(KIP1), an inhibitor of neointimal formation in the rat carotid artery. *J Clin Invest* 1997;99:2334-2341
9. Ehsan A, Mann MJ, Dell'Acqua G, Dzau VJ. Long-term stabilization of vein graft wall architecture and prolonged resistance to experimental atherosclerosis after E2F decoy oligonucleotide gene therapy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121:714-722
10. Guzman RJ, Hirschowitz EA, Brody SL, Crystal RG, Epstein SE, Finkel T. In vivo suppression of injury-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10732-10737
11. Luo Z, Sata M, Nguyen T, Kaplan JM, Akita GY, Walsh K. Adenovirus-mediated delivery of fas ligand inhibits intimal hyperplasia after balloon injury in immunologically primed

- animals. *Circulation* 1999;99:1776-1779
12. Yonemitsu Y, Kaneda Y, Tanaka S, Nakasima Y, Komori K, Sugimachi K, Sueishi K. Transfer of wild-type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Circ Res* 1998;82: 147-156
 13. Hart CE, Kraiss LW, Vergel S, Gilbertson D, Kenagy R, Kirkman T, Crandall DL, Tickle S, Finney H, Yarranton G, Clowes AW. PDGFbeta receptor blockade inhibits intimal hyperplasia in the baboon. *Circulation* 1999;99:564-569
 14. Blake MC, Azizkhan JC. Transcription factor E2F is required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 1989;9:4994-5002
 15. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Asorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 1992;11:961-971
 16. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974;71:1286-1290
 17. Weintraub SJ, Prater CA, Dean DC. Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 1992; 358:259-261
 18. Pagano MG, Draetta G, Durr J. Association of cdk2 kinase with the transcription factor E2F during S phase. *Science* 1992;255:1144-1147
 19. Resenblatt J, Gu Y, Morgan DO. Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during S and G2 phase of the cell cycle and associates with cyclin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:2824-2828
 20. Ahn JD, Morishita R, Kaneda Y, Lee KU, Park JY, Jeon YJ, Song HS, Lee IK. Transcription factor decoy for activator protein-1 (AP-1) inhibits high glucose- and angiotensin II-induced type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) gene expression in cultured human vascular smooth muscle cells. *Diabetologia* 2001;44: 713-720
 21. Yoshizumi M, Wang H, Hsieh CM, Sibinga NE, Perrella MA, Lee ME. Down-regulation of the cyclin A promoter by transforming growth factor- β is associated with a reduction in phosphorylated activating transcription factor-1 and cyclin AMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem* 1997;272:22259-22264
 22. Simons M. Antisense c-myc oligonucleotides inhibits intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo. *Nature* 1992;359:67-73
 23. Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Single transluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8474-8478
 24. Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T. In vivo transfection of cis element "decoy" against NFkB binding site prevented myocardial infarction as gene therapy. *Nat Med* 1997;3: 894-899
 25. Kovacs I, Reichel R, Nevins JR. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation cell. *Cell* 1986;45:219-228
 26. Black AR, Azizkhan-Clifford J. Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control. *Gene* 1999;237:281-302
 27. Hiebert SW, Lipp M, Nevins JR. E1A-dependent trans-activation of the human MYC promoter is mediated by the E2F factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3594-3598

28. Sullenger BA, Gallardo HF, Ungers GE, Gilboa E. Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication. *Cell* 1990;63:601-608
29. Beilinska A, Schivdasani RA, Zhang L, Nabel GJ. Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides. *Science* 1990;16:997-1000
30. Zuckerbraun BS, Tzeng E. Vascular gene therapy: a reality of the 21st century. *Arch Surg* 2002;137:854-861
31. Yla-Herttuala S, Martin JF. Cardiovascular gene therapy. *Lancet* 2000;355:213-222
32. Kaneda Y, Iwai K, Uchida T. Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science* 1989;243:375-378
33. Kaneda Y, Nakajima T, Nishikawa T, Yamamoto S, Ikegami H, Suzuki N, Nakamura H, Morishita R, Kotani H. Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Molecular Therapy* 2002; 219-226
34. Gao WY, Han FS, Storm C, Egan W, Cheng YC. Phosphorothioate oligonucleotides are inhibitors of human DNA polymerases and Rnase H: Implications for antisense technology. *Mol Pharmacol* 1992;41:223-229
35. Natarajan R, Scott S, Bai W, Yerneni KK, Nadler J. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle cells under high glucose condition. *Hypertension* 1999;33:378-384
36. Yasunari K, Kohno M, Kano H, Yokokawa K, Minami M, Yoshikawa J. Mechanisms of action of troglitazone in the prevention of high glucose-induced migration and proliferation of cultured coronary smooth muscle cell. *Circ Res* 1997;81:953-962