

Sp1 Decoy Oligodeoxynucleotides에 의한 사구체 혈관간세포 증식억제 효과

¹채 영 미 · ²김 성 영 · ¹박 관 규 · ¹장 영 채
¹대구가톨릭대학교 의과대학 병리학교실, ²안동과학대학 식품조리과
(접수 : 2004. 5. 30., 게재승인 : 2004. 9. 24.)

Sp1 Decoy Oligodeoxynucleotides Inhibit Serum-induced Mesangial Cell Proliferation

Young-Mi Chae¹, Sung-Young Kim², Kwan-Kyu Park¹, and Young-Chae Chang^{1†}

¹Department of Pathology, College of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu 705-034, Korea

²Department of Food Science, Andong Science College, Seohu-myon, Andong, Kyongbuk 760-822, Korea

(Received : 2004. 5. 30., Accepted : 2004. 9. 24.)

Mesangial expansion caused by cell proliferation and glomerular extracellular matrix accumulation is one of the earliest renal abnormalities observed at the onset of hyperglycemia in diabetes mellitus. Transcription factor Sp1 is implicated in the transcriptional regulation of a wide range of genes participating in cell proliferation, and is assumed to play an essential role in mesangial expansion, transforming growth factor (TGF)- β 1, plasminogen activator inhibitor (PAI)-1. We have generated a phosphorothioated double-stranded Sp1-decoy oligodeoxynucleotide that effectively blocks Sp1 binding to the promoter region for transcriptional regulation of TGF- β 1 and PAI-1. The Sp1 decoy oligodeoxynucleotide suppressed transcription of these cytokines and proliferation of primary rat mesangial cells in response to serum stimulation. These results suggest that the Sp1 decoy oligodeoxynucleotide could be a powerful tool in preventing the pathogenesis of renal hypertrophy.

Key Words : Transcription factor, Sp1 decoy, mesangial cell proliferation, transforming growth factor- β 1, plasminogen activator, inhibitor-1

서 론

신부전의 특징을 관찰하면 사구체간질 (mesangium)의 현저한 기질성분 축적과 사구체 기저막의 비후로 인한 사구체 모세혈관 벽의 비후 등을 들 수 있다(1). 사구체 간질의 확장은 주위의 사구체 모세혈관을 압박하여 여과를 위해 필요한 사구체 표면적을 감소시키고 이것이 진행되면 사구체간질의 거의 모든 사구체 모세혈관을 침범하여 사구체 경화에 이르게 되는데 대부분의 사구체는 정상적인 구조를 완전히 소실하게 되고 결국 신부전을 초래한다(2). 이러한 사구체간질의 기질축적과 확장은 사구체 혈관간세포의 증식과 관련이 있다. 또한 사구체 혈관간세포의 증식에는 TGF- β 1, PAI-1, PDGF, FGF, VEGF, IL-1 및 IL-6 등과 같은 세포 성장인자를 비롯한 사이토카인 등이 밀접하게

관여하는 것으로 밝혀졌다(3-5).

TGF- β 1는 섬유결합소, 콜라겐, 프로테오글리칸과 같은 세포외기질의 축적을 유도하며, 프로테아제의 합성을 감소시키고 프로테아제 억제제의 합성을 증가시켜 기질의 분해를 억제한다. 따라서 세포외기질의 증가는 조직에서 TGF- β 1의 발현이 증가되는 것을 의미하며, 이러한 TGF- β 1의 증가를 보이는 신 질환들은 루프스신염, 사구체 경화증, 급진행성 사구체신염, 당뇨병성 신증, 이식신의 거부반응 등이며 발현되는 TGF- β 1의 양은 진행된 섬유화의 정도와 밀접한 관련이 있다.

이와 같이 TGF- β 1이 여러 조직 및 세포에서 섬유화를 초래하는 주된 물질로 알려짐에 따라 이를 차단하여 섬유화를 방지하는 연구가 이루어지고 있다(6, 7). 최근 목적유전자의 발현을 저해하는 많은 새로운 기술들이 개발되었고, 이들을 이용한 다양한 질병에서의 치료효과를 조사하고 있다. 분자생물학 분야의 발달로 이러한 신장 섬유화와 관련된 유전자들의 발현을 인위적으로 제거하거나 불활성화 시키기 위한 방법으로 안티센스, 라이보자임, RNA interference, Decoy 등을 사용한 기법이 응용되면서 세포성

† Corresponding Author : Department of Pathology, College of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu 705-034, Korea
Tel : +82-53-650-4848, Fax : +82-53-650-4834
E-mail : ycchang@cu.ac.kr

장 인자를 비롯한 사이토카인 등의 세포증식 및 질병유발에 관여하는 인자들에 대하여 유전자 발현 단계에서 막아보려는 연구가 진행되고 있다(8-10). 그 중, 전사인자의 활성을 저해하고자 이들 전사인자가 결합하는 유전자의 프로모터지역에 존재하는 전사인자 결합부위의 염기서열을 가진 합성된 이중가닥의 염기서열을 세포내로 전달하는 기술이 개발되었다. 따라서 유전자 제어기술로 이용되는 double-stranded oligodeoxynucleotides (Decoy)를 이용한 치료법은 세포증식에 관련한 특정 전사인자의 전사활성을 저해하며 그 기전을 연구할 수 있는 장점을 점하고 있다. 또한 전사인자 저해분자에 대한 타겟 분자인 전사인자 Sp1은 TGF- β , PAI-1, Extracellular Matrix (ECM)을 비롯한 신증의 발병에 의해 발현이 증가하는 조절 단백질의 유전자를 활성화시키는 전사인자로 잘 알려져 있다(11-13).

본 연구에서는 10% 혈청 (FBS)에 의해 유도된 사구체 혈관세포에 phosphorothioated (PS)-Sp1 decoy를 도입한 후 TGF- β 1 및 PAI-1의 유전자 발현 및 전사활성 감소현상을 확인하고 혈관세포 증식억제 효과를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

사구체 혈관세포 분리 및 배양

Sprague-Dawley 흰쥐를 pentobarbital 50 mg/kg로 마취시킨 후 개복하여 생리식염수로 양측 신장을 씻어낸 후 신장을 적출하여 완충액 (phosphate buffered saline: PBS)에 넣고 멸균된 기구를 사용하여 신장의 피막을 제거하였다. 피질만을 취하여 체공 210 μ m, 150 μ m 및 75 μ m인 체를 이용하여 사구체를 분리한 후 1,500 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고, 0.2% collagenase로 침전물을 재 부유시켜 37°C의 shaking water bath에서 30분간 배양하였다. 동량의 trypsin-EDTA를 첨가하여 원심분리한 후 상층액을 제거하고 pellet을 20% 혈청 (fetal bovine serum: FBS), penicillin과 streptomycin을 함유한 RPMI1640 배양액을 이용하여 배양하였다. 배양액은 2-3일에 한번씩 교체해 주었으며 6-10 세대 배양한 사구체 혈관세포를 본 실험에 이용하였다.

Sp1 decoy ODN 제작

Phosphorothioated ODN과 Mutated ODN 염기 서열은 다음과 같다

PS-Sp1 decoy (note: consensus sequences are underlined),
 5'-AsTTACGGGGCGGGGCGAATsCs-3',
 3'-sTsAATGCCCGCCCCGCTTsAG-5';
 M-Sp1 decoy ODN,
 5'-AsTTACGGTACGGTACGAATsCs-3',
 3'-sTsAATGCCATGCCATCCTTsAG-5'.

이상의 oligomer를 T₄ DNA ligase를 사용하여 ligation하였다.

유전자 도입법

Sp1-decoy를 사구체 혈관세포에 트랜스펙션 하기 하루 전, 1% FBS/DMEM 배지에 배양하여 24시간 동안 serum starvation을 실시하였다. 그 후, Opti-MEM (GIBCO, BRL, Gaithersburg, MD)과 리포펙타민 플러스™ (Lipofectamine

Plus™, GIBCO, BRL, Gaithersburg, MD)를 이용하여 Sp1 decoy 유전자 도입을 시행하였다. 80-90% 배양한 사구체 혈관세포를 Opti-MEM로 세척한 다음 Opti-MEM를 5 ml 넣은 후 배양하였다. 질량비가 DNA : lipid = 1 : 3으로 리포펙타민 플러스™ (Lipofectamine Plus™, GIBCO, BRL, Gaithersburg, MD)에 decoy (PS-Sp1 decoy, M-Sp decoy)를 각각 섞어주고 실온에서 30분간 반응시켰다. 배양기에서 세포를 꺼내어 Opti-MEM를 제거한 후 위에서 만든 용액을 세포에 가하였다. 배양기 (CO₂ incubator)에서 5시간 동안 노출한 후, 각각 1% FBS 및 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교환 후 24시간 배양하여 실험하였다.

Gel Mobility Shift Assay

핵단백 (nuclear protein)은 사구체 혈관세포로부터 분리하여 80-90% 수준으로 배양되었을 때 PBS 용액으로 두 번 세척 후 모은다. 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 위에서 10분 동안 방치하였다. 사구체 혈관세포를 10% NP-40 25 μ l로 더한 후 buffer B (20 mmol/L HEPES, 0.4 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT와 1 mmol/L PMSF)에 넣어서 10분 동안 12,000 rpm로 원심분리 후 상층액은 nuclear extract로 이용하였다. Sp1에 대한 방사선 표지 소식자는 [³²P] ATP (Amersham, Little chalfont, UK)와 T₄ polynucleotide kinase (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하였다. ³²P 표지 소식자는 NAP-5 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden)에서 정제하였으며 단백질-DNA 반응은 20분 동안 실온에서 시행하였다. 반응물질은 nuclear extract 6 μ g, poly (dI:dC) 100 μ g/ml, Tris/HCl (pH 7.5) 10 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, EDTA 0.5 mmol/L, DTT 0.5 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, 4% glycerol과 20,000 cpm ³²P-라벨 탐침 DNA를 사용하였다. 반응을 시킨 후 0.5×TBE buffer (45 mM Tris, 45 mM Boric acid and 1 mM EDTA) 4% 폴리아릴아마이드 겔에 loading하여 150 volt에서 2시간동안 전기영동을 시행한 후 분석하였다.

Promotor assays

Sp1 decoy가 전사조절유전자 부위의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 루시페라제 발현 벡터를 이용하여 프로모터 활성을 측정하였다. Sp1-luciferase (Positive control)는 Dr. P.J. Farnham으로부터 제공받았으며(14), p3TP-lux (TGF- β 1 promoter construct)와 p800neo-luc (PAI-1 promoter construct)는 Dr. I. K Lee(15)로부터 제공받은 각각의 luciferase 유전자를 reporter gene로 이용하였다. 각각의 Reporter plasmid를 사구체 혈관세포에 Lipofectamin Plus 방법에 의해 트랜스펙션시킨다. 트랜스펙션 후 24시간이 지난 뒤 cell extract를 얻은 뒤 루시페라제 활성을 측정한다. 이때 internal control로서 β -gal plasmid를 사용하며, 그 활성을 측정하여 보정한다.

Northern Blot 분석

Northern Blot 분석에 사용되는 probe에 [³²P] dCTP로 표지한 후 probe는 NAP-5 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden)으

로 정제하였다. RNA는 RNAsol[®] (Life Technology, USA)를 이용하여 추출하였다. 추출한 RNA 10 µg을 MOPS buffer로 1% formaldehyde-agarose 겔에서 전기영동을 한 후, 20XSSC를 사용하여, Hybond-N nylon membrane (Amersham, Little Chalfont, UK)에 capillary transfer 방법을 이용하여 16시간동안 transfer하였다. 이 membrane을 6XSSC로 수 분간 세척한 후 RNA 시료를 UV cross-linker (120 mJ/cm²)에서 membrane 고정시키고 prehybridization을 실시하였다. Prehybridization된 membrane은 ³²P-labeled cDNA probe가 함유된 용액에 옮겨서 TGF-β1과 PAI-1 cDNA probe와 2시간동안 65°C에서 반응시키고 2XSSC/0.1% SDS 용액으로 membrane을 세척하였다. 세척한 Membrane은 상온에서 건조한 후 -70°C에서 24-48시간 동안 X-ray film에 감광시켰다. X-ray상의 band 밀도는 standard인 18S rRNA band 단위면적당 각 RNA band 밀도를 측정하여 각 균의 발현 정도에 대한 signal 세기 차이를 표시하였다.

사구체 혈관간세포의 growth assays

사구체 혈관간세포를 96-well에 배양하여 세포가 G₀상태로 되게 하였다. DNA : lipid = 1 : 3으로 LipofectAMINE PLUS (GIBCO, BRL, Gaithersburg, MD)에 decoy ODN (100 nM)을 well에 첨가하고 세포를 37°C에서 5시간 동안 배양하였다. 24~36시간 후, WST cell counting kit (Wako, Osaka, Japan)을 이용해 각 대조군간의 세포증식도를 비교 관찰하였다.

통계학적 분석

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험 군별로 표준차이가 있는가를 검증하기 위해 분산분석을 수행하였으며 다양성 분석은 Duncan's test에 의해 분석하였다. 통계처리 후 P 값이 0.05 미만일 경우 (p < 0.05) 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Sp1 decoy를 도입한 사구체 혈관간세포에서 핵단백질을 분리하여 전사인자 Sp1의 DNA 결합활성을 측정하기 위해 EMSA를 실험하였다. 그 결과, 10% 혈청 (FBS)에 의해 섬유화가 유도된 사구체 혈관간세포에서 대조군 (1% FBS)에 비해 Sp1 전사인자의 결합능 (binding activity)이 증가되는 것을 볼 수 있었다(p < 0.05). 또한 10% serum에 유도된 조건하에서 PS-Sp1 decoy를 트랜스펙션시킨 사구체 혈관간세포에서 Sp1 결합부위를 제거한 M-Sp1 decoy를 도입한 경우에 비해 Sp1의 결합능이 유의적으로 감소하였다(Fig. 1, p < 0.05). 따라서 혈청에 의해 유도된 사구체 혈관간세포에서 Sp1은 DNA-protein 상호결합에 특이적인 전사인자임을 알 수 있었으며 PS-Sp1 decoy가 혈청자극에 의해 증가된 전사인자 Sp1의 활성을 억제함이 관찰되었다.

Promoter assays

Sp1 decoy가 전사인자 Sp1에 의해 발현이 조절되는 대표적인 유전자들인 TGF-β1 및 PAI-1의 활성을 억제하는지를

확인하기 위하여, Sp1 decoy와 각각의 reporter gene을 사구체 혈관간세포에 트랜스펙션 시킨 후 루시페라제 활성을 측정하였다. Sp1(Sp1-luc, Fig. 2A), TGF-β1 프로모터(TGF-β1-luc, Fig. 2B), 및 PAI-1 프로모터(PAI-luc, Fig. 2C) 전사활성 사구체 혈관간세포 도입하여 각각의 활성을 조사한 결과, 10% serum 자극에 의해 이들 프로모터의 전사활성이 현저하게 증가되었다. 또한 10% serum에 의해 증가된 전사활성의 조건하에서 M-Sp1 decoy를 도입한 경우 전사활성의 변화가 나타나지 않았으나 PS-Sp1 decoy를 도입한 사구체 혈관간세포에서 루시페라제 활성이 유의적으로 감소하였다. 즉, M-Sp1 decoy에 비해 PS-Sp1 decoy가 효과적으로 Sp1 전사 조절 유전자 부위의 전사 활성을 억제함을 알 수 있었다.

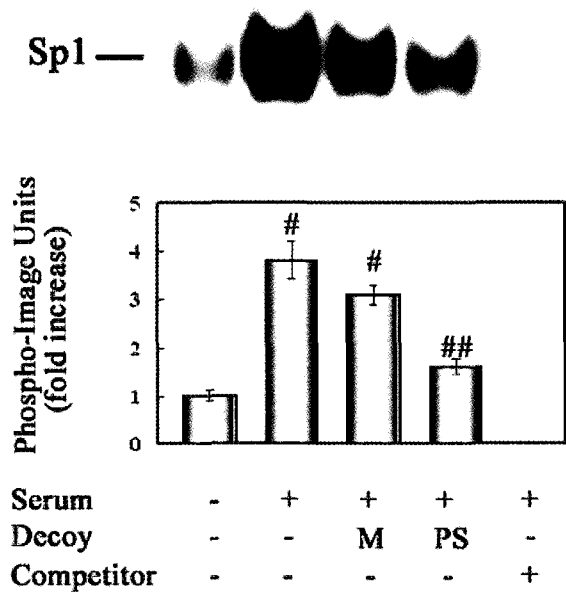


Figure 1. Effects of Sp1 decoy ODN blocks the serum-induced DNA binding activity of Sp1. Sp1 decoy ODN-transfected RMC (1x10⁶ cells/10 ml) cultured in the presence of 1% FBS or 10% FBS were harvested 24 h after transfection with decoy ODN. Nuclear extracts were prepared, and 6 µg of each extract was subjected to EMSA. A: a typical EMSA of nuclear extract from RMC transfected with Sp1 decoy ODN (100 nM). B: Densitometric analysis of EMSA results. Values are represented as mean ± SEM of triplicate experiments. #: p < 0.05 compared to 1% FBS; **: p < 0.05 compared to 10% FBS. M: M-Sp1 decoy ODN; P: PS-Sp1 decoy ODN.

Northern blot analysis

Sp1 decoy가 Sp1 전사인자의 활성을 억제하여 혈청에 의해 자극된 사구체 혈관간 세포에서 섬유화를 유발하는 주된 사이토카인인 TGF-β1과 PAI-1의 mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 노던 블롯 분석을 실험하였다. 1% 혈청 (FBS)에 유도된 세포에 비해서 10% 혈청으로 자극된 사구체 혈관간세포에서 TGF-β1과 PAI-1의 mRNA 발현이 증가되는 것을 볼 수 있으며 PS-Sp1 decoy를 도입한 사구체 혈관간세포에서 10% 혈청 (FBS)에 비해 TGF-β1과 PAI-1의 mRNA 발현이 각각 47%, 56%씩 현저히 억제되는 결과를 보였다 (Fig. 3, p<0.05). 따라서 Sp1 decoy가 섬유화의 주된 사이토

카인으로 알려진 TGF-β1 및 PAI-1의 mRNA level에서 유전자 발현을 효과적으로 억제함을 알 수 있었다.

외기질의 과도한 축적이 결국 사구체 경화와 말기 신부전증으로 이행하는 것으로 알려져 있다(16).

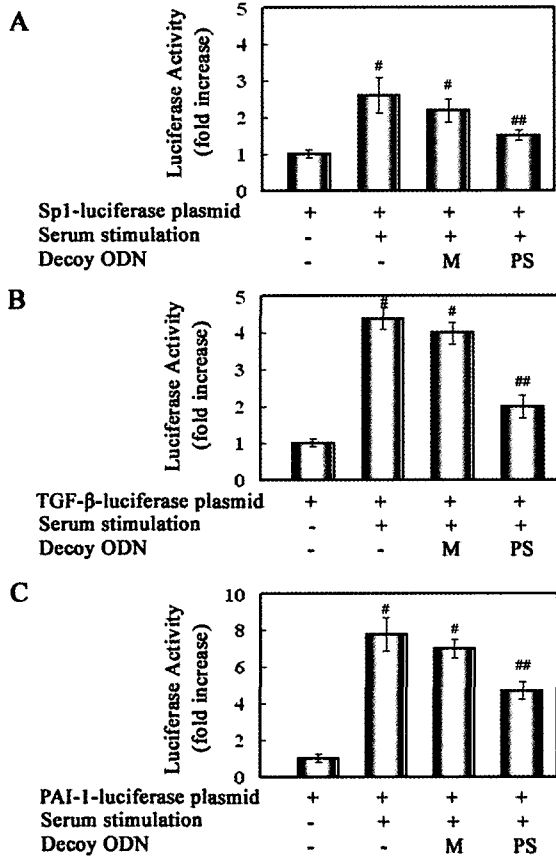


Figure 2. Effects of Sp1 decoy ODN on serum-induced promoter activities in RMC. RMC (3×10^5 cells/3ml) were cotransfected with Sp1 decoy ODN (100 nM) and Sp1-luc (A), 3TP-luc (B, TGF-1 promoter) or p800neo-luc (C, PAI-1 promoter), and cultured in the presence of 1% FBS or 10% FBS. Luciferase activity in the cell lysate was determined 24 h after transfection. Values are presented as mean \pm SEM of triplicate experiments. *: $p < 0.05$ compared to 1% FBS; **: $p < 0.05$ compared to 10% FBS. M: M-Sp1 decoy ODN; P: PS-Sp1 decoy ODN.

Growth assays of mesangial cell

Decoy를 도입한 사구체 혈관간세포에서 Sp1 decoy가 사구체 혈관간세포 증식을 억제하는지를 확인하기 위하여 growth assays를 측정하였다. 그 결과, 10% 혈청 (FBS)에 의해 유도된 사구체 혈관간세포에 비해 PS-Sp1 decoy를 도입한 사구체 혈관간세포에서 현저하게 증식이 억제되는 효과를 보였다 (Fig. 4, $p < 0.05$). 따라서 Sp1-decoy를 이용한 사구체 혈관간세포 증식의 효과적인 차단은 사구체 간질의 기질 축적과 확장을 억제할 수 있으리라 기대된다.

고 찰

신장의 섬유화 (fibrosis)는 염증성 및 면역성 질환의 말기 신부전증을 초래하는 중요한 원인이라고 알려져 있고 이러한 변화는 TGF-β1의 활성이 관여한다고 보고되고 있으며 세포

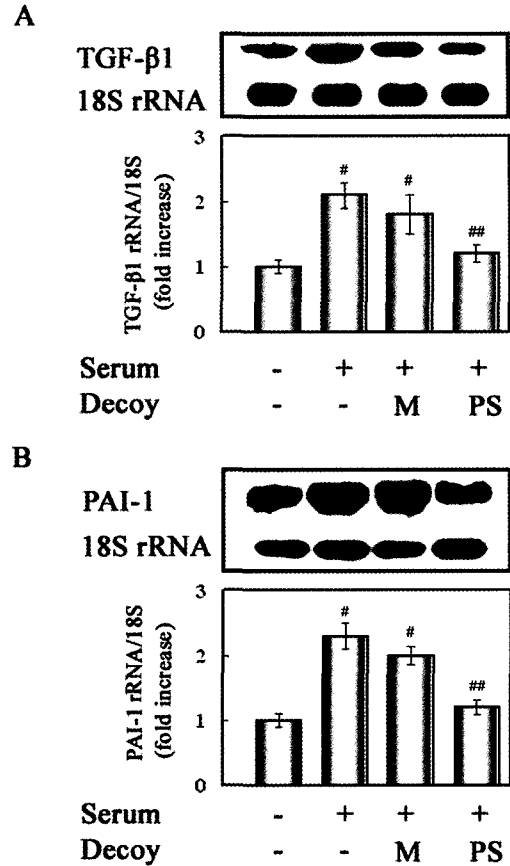


Figure 3. Effects of Sp1 decoy ODN on serum-induced mRNA expression of TGF-1 and PAI-1 in RMC. RMC transfected with Sp1-decoy ODN were cultured in medium containing 1% FBS or 10% FBS for 24 h, and total RNA was extracted from the RMC. mRNA expression of TGF-1 (A) or PAI-1 (B) was determined by Northern blot. Ribosomal RNA detected with ethidium bromide staining is shown as an internal control. Signal intensity was quantified by densitometric analysis. Values are presented as mean \pm SEM of triplicate experiments. *: $p < 0.05$ compared to 1% FBS; **: $p < 0.05$ compared to 10% FBS. M: M-Sp1 decoy ODN; P: PS-Sp1 decoy ODN.

또한 전사인자 Sp1은 AP-1, NF-κB, Egr-1, Egr-2 및 inflammation-repair 조절 및 유도에 관여하는 전사인자중의 대표적인 전사인자로 알려져 있으며 최근 신장의 섬유화에 따른 병인론에도 관여함이 밝혀지고 있다(17). 이와 관련된 연구로는 Ishibashi 등(18)이 Sp1 decoy가 carcinoma cell에서 vascular endothelial growth factor (VEGF)와 transforming growth factor (TGF)-β1 유전자 발현을 억제한다고 보고하였으며 Verrecchia 등(19)은 extracellular matrix gene 발현을 *in vitro* and *in vivo*에서 각각 억제한다고 밝혔다.

본 연구에서는 혈청에 의해 유도된 사구체 혈관간세포 (mesangial cell)에서 Phosphorothioated (PS)-Sp1 decoy가 사구체 세포 증식을 효율적으로 억제하는 것을 보여주었다. 먼저, Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)에 의해

DNA-protein 결합 활성을 확인한 결과 혈청에 의해 섬유화가 유도된 사구체 혈관간세포에서 Sp1이 중요 전사인자임을 알 수 있었으며 PS-Sp1 decoy가 전사인자 Sp1에 대한 DNA 결합 활성도를 대조군에 비해서 유의적으로 감소시켰다($p < 0.05$). PS-Sp1 decoy는 섬유화를 유발하는 주된 사이토카인인 TGF- β 1과 PAI-1의 유전자 발현을 보다 효과적으로 억제할 뿐만 아니라 혈청에 의해 유도된 사구체 혈관간세포의 증식을 유의적으로 억제하였다($p < 0.05$).

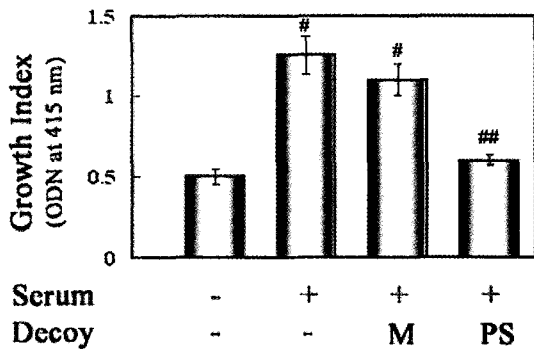


Figure 4. Sp1 decoy ODN suppresses serum-induced RMC proliferation. RMC transfected with Sp1-decoy ODN were cultured in medium containing 1% FBS or 10% FBS for 24 h, and the proliferation was determined by WST test. Values are presented as mean \pm SEM of triplicate experiments. *: $p < 0.05$ compared to 1% FBS; **: $p < 0.05$ compared to 10% FBS. M: M-Sp1 decoy ODN; P: PS-Sp1 decoy ODN.

그 중에서도 PAI-1은 세포기질단백의 분해와 섬유소 용해 과정에 중요한 Plaminogen/Plasmin system의 가장 중요한 조절인자로 직접적으로 단백분해효소, 즉 procollagenase, prometaholoprotease 등의 활성도를 떨어뜨려 결국 세포간질 단백질의 분해를 감소시킨다(3). 최근 PAI-1의 유전자의 promotor region에 Ap1, Sp1 등이 존재하고 이 유전자의 차이가 급성심근경색의 발생과 관련이 있다고 보고되면서 당뇨병성 신증에서 신장의 발생 및 진행, 그리고 대 혈관 합병증의 발생에 있어서 PAI-1의 역할도 강조되고 있다. 신장내 PAI-1 활성도와 신장질환의 진행과의 관계는 백서의 증식성 사구체신염의 진행에서 PAI-1 mRNA의 expression이 증가한다는 보고 등이 있으나 당뇨병성 신증의 진행과 PAI-1과의 관계는 잘 알려져 있지 않다(5).

TGF- β 1는 다양한 사구체 손상을 매개하는 중요한 역할을 하는 인자 중의 하나임을 고포도당을 처리한 쥐의 세포를 통해 확인되었다(20). 또 신장 사구체에서 TGF- β 1는 실험동물의 fibrosis 모델 및 당뇨병성 신증의 사구체 mesangial 확장의 주요한 매개체와 관련되어 있으며 PDGF, bFGF, epidermal growth factor (EGF) 등과 같은 성장인자에 의해 발현이 증가한다고 알려져 있다(21). 본 연구에서도 TGF- β 1와 PAI-1 promoter 지역에 Sp1 binding site가 존재하기 때문에 Sp1 기능을 억제하기 위하여 decoy를 이용하여 실험하였다. 그 결과 예상대로, PS-Sp1 decoy ODN이 효과적으로 혈청에 유도된 사구체 혈관간세포 증식을 억제하였던 것을 보였다.

최근 새로운 기술로 특정 유전자 발현을 조절 및 억제하는

방법이 개발되어지고 있으며 그 중에서도 전사인자 decoy를 이용하여 유전자 전사단계 및 전전사 단계에서 유전자 발현을 조절하고 나아가서 질병의 치료에 응용하고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 본 연구실에서도 novel E2F decoy ODN의 vascular smooth muscle cell (VSMC)의 proliferation 억제 효과와 종양세포의 증식 억제효과를 보고한 바 있으며 Ap1 decoy에 대한 세포증식 억제효과를 보고한 바 있다(15, 22-25).

이상과 같이 사구체 섬유 증의 병인에 관여하는 TGF- β 1과 PAI-1의 발현제어에 전사인자 Sp1이 중요한 역할을 담당하며 PS-Sp1 decoy가 혈청에 의해 증가된 Sp1의 전사활성과 TGF- β 1 및 PAI-1의 발현을 억제하였다. 이러한 결과 사구체 혈관간세포에 PS-Sp1 decoy의 도입은 신장 사구체 섬유화의 예방 및 치료에 응용할 수 있는 방법을 제공할 수 있을 것으로 예상된다.

요 약

사구체 혈관간세포 (mesangial cell)의 증식 및 세포외기질 (extracellular matrix)의 과도한 축적으로 인한 메산지움 (mesangium) 확장은 사구체 신증을 야기하는 원인인 신장 섬유화를 초래하는 대표적인 병리현상으로 잘 알려져 있다. 또한 전사인자 Sp1은 transforming growth factor (TGF)- β 1, plasminogen activator inhibitor (PAI)-1, Extracellular Matrix (ECM)을 비롯한 메산지움 확장의 발병에 의해 발현이 증가하는 조절 단백질의 유전자를 활성화시키는 전사인자이다. 본 연구에서는 신장 사구체의 섬유화를 억제하기 위한 유전자 치료를 위해, 전사인자 Sp1 결합 배열이 포함된 phosphorothioated (PS)-Sp1 decoy oligodeoxynucleotide (ODN)를 구축하여 사구체 혈관간세포에 도입한 결과 섬유화의 주된 사이토카인으로 알려진 TGF- β 1 및 PAI-1의 유전자 발현을 효과적으로 억제하였으며 사구체 혈관간세포의 증식이 현저하게 억제하는 효과를 나타내었다. 이러한 연구 결과, 사구체 혈관간세포에 도입된 Sp1 decoy가 전사인자 Sp1의 전사활성을 경쟁적으로 저해함으로써, 신부전 유발 인자로 알려진 TGF- β 1 및 PAI-1 등의 발현을 인위적으로 저해되었다. 또한 Sp1-decoy를 이용한 사구체 혈관간세포 증식의 효과적인 차단은 사구체 간질의 기질 축적과 확장을 억제하여 신장 섬유화의 진행을 막을 수 있는 방법으로서의 응용이 기대된다.

감 사

본 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원 (KRF-2002-005-C00016)에 의하여 연구되었습니다..

REFERENCES

- Guo, L. and C. Wu (2002), Regulation of fibronectin matrix deposition and cell proliferation by the PINCH-ILK-CH-ILKBP complex, *FASEB J.* **16**, 1298-1300.

2. Pugliese, G., F. Pricci, P. Mene, G. I. Romeo, Nofroni, S. Giannini, B. Cresci, G. Galli, C. M. Rotella, U. Di Mario, and F. Pugliese (1997), High glucose level unmasks a genetic predisposition to enhanced extracellular matrix production in mesangial cells from the Milan normotensive strain, *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**, 406-414.
3. Ziyadeh, F. N. (2004), Mediators of diabetic renal disease: the case for TGF-beta as the major mediator, *J. Am. Soc. Nephrol.* **1**, S55-57.
4. Massague, J. (1990), The transforming growth factor-beta family, *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 597-641.
5. Klahr, S. and J. Morrissey (2003), Obstructive nephropathy and renal fibrosis: The role of bone morphogenic protein-7 and hepatocyte growth factor, *Kidney Int. Suppl.* **87**, S105-112.
6. Border, W. A. and N. A. Noble (1994), Transforming growth factor beta in tissue fibrosis, *N. Engl. J. Med.* **331**, 1286-1292.
7. Ziyadeh, F. N., K. Sharma, M. Ericksen and G. Wolf (1994), Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta, *J. Clin. Invest.* **93**, 536-542.
8. Dzau, V. J. (2002), Transcription factor decoy. *Circ. Res.* **90**, 1234-1236
9. Morishita, R., T. Sugimoto, M. Aoki, I. Kida, N. Tomita, A. Moriguchi, K. Maeda, Y. Sawa, Y. Kaneda, J. Higaki, and T. Ogihara (1997), In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction, *Nat. Med.* **3**, 894-899.
10. Kawauchi, M., J. Suzuki, R. Morishita, Y. Wada, A. Izawa, N. Tomita, J. Kaneda, Y. Amano, T. Ogihara, S. Takamoto, and M. Isobe (2000), Gene therapy for attenuating cardiac allograft arteriopathy using ex vivo E2F decoy transfection by HVJ-AVE-liposome method in mice and nonhuman primates, *Circ. Res.* **87**, 1063-1068.
11. Udvardi, A. J., D. J. Templeton, and J. M. Horowitz (1995), Functional Interactions Between the Retinoblastoma (Rb) Protein and Sp-Family Members: Superactivation by Rb Requires Amino Acids Necessary for Growth Suppression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 3953-3957.
12. Li, J. M., M. B. Datto, X. Shen, P. P. Hu, Y. Yu and X. F. Wang (1998), Sp1, but not Sp3, functions to mediate promoter activation by TGF-beta through canonical Sp1 binding sites, *Nucleic Acids Res.* **26**, 2449-2456.
13. Zhang, X., Y. Li, C. Dai, J. Yang, P. Mundel, and Y. Liu (2003), Sp1 and Sp3 transcription factors synergistically regulate HGF receptor gene expression in kidney, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **284**, 82-94.
14. Slansky, J. E., Y. Li, W. G. Kaelin, and P. J. Farnham (1993), A protein synthesis-dependent increase in E2F1 mRNA correlates with growth regulation of the dihydrofolate reductase promoter, *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1610-1618.
15. Ahn, J. D., R. Morishita, Y. Kaneda, H. J. Kim, Y. D. Kim, H. J. Lee, K. U. Lee, J. Y. Park, Y. H. Kim, K. K. Park, Y. C. Chang, K. H. Yoon, H. S. Kwon, K. G. Park, and I. K. Lee (2004), Transcription factor decoy for AP-1 reduces mesangial cell proliferation and extracellular matrix production in vitro and in vivo, *Gene Ther. Epub ahead of print.*
16. Leechey, D. J., A. K. Singh, N. Alavi, and R. Singh (2000), Role of angiotensin II in diabetic nephropathy, *Kidney Int. Suppl.* **77**, 93-98.
17. Hata, Y., E. Duh, K. Zhang, G. S. Robinson, and L. P. Aiello, (1998), Transcription factors Sp1 and Sp3 alter vascular endothelial growth factor receptor expression through a novel recognition sequence, *J. Biol. Chem.* **273**, 19294-19303.
18. Ishibashi, H., K. Nakagawa, M. Onimaru, E. J. Castellanos, Y. Kaneda, Y. Nakashima, K. Shirasuna, and K. Sueishi (2000), Sp1 decoy transfected to carcinoma cells suppresses the expression of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor beta1, and tissue factor and also cell growth and invasion activities, *Cancer Res.* **60**, 6531-6536.
19. Verrecchia, F., J. Rossert, and A. Mauviel (2001), Blocking sp1 transcription factor broadly inhibits extracellular matrix gene expression in vitro and in vivo: implications for the treatment of tissue fibrosis, *J. Invest. Dermatol.* **116**, 755-763.
20. Derylo, B., T. Babazono, E. Glogowski, J. Kapur-Drezgic, T. Hohman, and C. Whiteside (1998), High glucose-induced mesangial cell altered contractility: role of the polyol pathway, *Diabetologia.* **41**, 507-515.
21. Holmgren, L., M. S. O'Reilly, and J. Folkman, (1995), Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression, *Nat. Med.* **1**, 149-153.
22. Ahn, J. D., R. Morishita, Y. Kaneda, H. S. Kim, Y. C. Chang, K. U. Lee, J. Y. Park, H. W. Lee, Y. H. Kim, and I. K. Lee (2002), Novel E2F decoy oligodeoxynucleotides inhibit in vitro vascular smooth muscle cell proliferation and in vivo neointimal hyperplasia, *Gene Ther.* **9**, 1682-1692.
23. Ahn, J. D., R. Morishita, Y. Kaneda, S. J. Lee, K. Y. Kwon, S. Y. Choi, K. U. Lee, J. Y. Park, I. J. Moon, J. G. Park, M. Yoshizumi, Y. Ouchi, and I. K. Lee (2002), Inhibitory effects of novel AP-1 decoy oligodeoxynucleotides on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo, *Circ. Res.* **90**, 1325-1332.
24. Park, K. K., J. D. Ahn, I. K. Lee, J. Magae, N. H. Heintz, J. Y. Kwak, Y. C. Lee, Y. S. Cho, H. C. Kim, Y. M. Chae, Y. Kim, C. H. Kim, and Y. C. Chang (2003), Inhibitory effects of novel E2F decoy oligodeoxynucleotides on mesangial cell proliferation by coexpression of E2F/DP, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 689-697.
25. Ahn, J. D., C. H. Kim, J. Magae, Y. H. Kim, H. J. Kim, K. K. Park, S. Hong, K. G. Park, I. K. Lee, and Y. C. Chang (2003), E2F decoy oligodeoxynucleotides effectively inhibit growth of human tumor cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 1048-1053.