

## 반흔형성 과정에서 Sp1 전사인자 조절에 의한 TGF-β1 및 CTGF의 발현

박동만<sup>1</sup> · 손대구<sup>1</sup> · 한기환<sup>1</sup> · 이선영<sup>2</sup> · 채영미<sup>3</sup> · 장영채<sup>3</sup> · 박관규<sup>3</sup>

계명대학교 의학과 성형외과학교실<sup>1</sup>, 경북대학교 의과대학 의학연구소<sup>2</sup>, 대구가톨릭대학교 의과대학 병리학교실<sup>3</sup>

### The Effect of the Transcriptional Regulation of Sp1 for TGF-β1 and CTGF Expression in Scar Formation

Dong Man Park, M.D.<sup>1</sup>, Dae Gu Sohn, M.D.<sup>1</sup>,  
Ki Hwan Han, M.D.<sup>1</sup>, Sun Young Lee, M.D.<sup>2</sup>,  
Young Mi Chae, M.D.<sup>3</sup>, Young Chae Chang, M.D.<sup>3</sup>,  
Kwan Kyu Park, M.D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea,

<sup>2</sup>Department of Medical Research Institute, Kyungpook National University, Daegu, Korea,

<sup>3</sup>Department of Pathology, College of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu, Korea

This study is to examine the relationship between TGF-β1 expression and CTGF expression, and to evaluate the effect of Sp1 blockade on the expression of TGF-β1, CTGF and extracellular genes, clones of fibroblasts stably transfected with Sp1 decoy ODN. R-Sp1 decoy ODN was highly resistant to degradation by nucleases or serum, compared to the linear or phosphorothioated-Sp1 decoy ODN. Skin wounds were created on the back of 36 anesthetized rats. They were divided into four groups-the rats with normal skin, with wounded skin without decoy, with wounded skin injected with R-Sp1 decoy, and with wounded skin injected with mismatched R-Sp1 decoy, respectively. Skins were collected at 3rd, 5th, 7th, 14th day after wounding. Cellular RNA was extracted by RT-PCR analysis. TGF-β1 and CTGF were deeply related with skin fibrosis during scar formation and it appeared that TGF-β1 may cause the induction of CTGF expression. R-Sp1 decoy ODN inhibited TGF-β1 and CTGF expression both in cultured fibroblasts and in the skin of rats. These results indicate that targeting Sp1 with R-type decoy efficiently blocks extracellular matrix gene expression, and suggest an important new therapeutic approach to control the scarring in normal wound healing and fibrotic disorders.

Key Words: Scar Formation, Sp1 decoy oligodeoxynucleotide

Received August 31, 2005

Revised November 29, 2005

Address Correspondence: Kwan Kyu Park, M.D., Department of Pathology, College of Medicine, Catholic University of Daegu, 3056-6 Daemyung 4-dong, Nam-gu, Daegu 705-034, Korea. Tel: 053) 650-4149 / Fax: 053) 650-4834 / E-mail: kkpark@cu.ac.kr

(ODN), Transforming growth factor(TGF)-β1, Connective tissue growth factor(CTGF)

### I. 서론

피부의 외상이나 심한 염증 후에 발생하는 반흔 형성은 심각한 문제이며, 이런 반흔의 교정 혹은 크기를 감소시키기 위한 노력은 지속되어 왔으나 아직도 완전히 해결할 방법은 없는 실정이다. 최근 반흔 형성과 연관된 조직 사이토카인(cytokine)의 상호 관계에 대한 많은 연구가 진행되면서 transforming growth factor-β1(TGF-β1) 및 connective tissue growth factor(CTGF) 등의 역할과 상호 관련에 관한 많은 연구가 진행되고 있다.<sup>1</sup> 이들 상호간의 발현 조절 및 섬유화 과정에서의 역할 등에 관한 연구는 반흔형성 방지를 위한 새로운 치료 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각한다.<sup>2</sup> 또한 최근 이들 사이토카인들의 DNA 발현 조절에 관여하는 전사인자(transcription factor)의 조절을 통한 섬유화 억제 연구도 시도되고 있다. 즉 유전자의 변화가 세포의 성장 및 질병 과정에서 중요한 기전으로 이해되고, 또한 유전자 조작 기술의 발달로 인해 DNA 차원에서 전사인자조절을 통한 유전자 발현의 조절이 매우 중요하고 매력 있는 유전자치료의 수단으로 이해되고 있기 때문이다.

TGF-β1은 세포의 성장, 분화 및 세포외기질 형성 등에 관여하고 있는 사이토카인으로 조직의 재생에 중요한 역할을 한다.<sup>3</sup> 또한 반흔, 켈로이드, 피부경화증 등의 병적상태에서 단핵세포나 섬유모세포의 이주와 활성화를 조장하여 만성염증을 일으키고 결국 섬유화를 초래한다.<sup>4</sup> TGF-β1이 섬유화를 초래하는 기전은 단백질분해효소의 분비를 억제하거나, 단백질분해효소 억제제를 생성함으로써 세포외기질의 파괴를 억제하는 것으로 보고되어 있다.<sup>5</sup> CTGF는 최근 TGF-β1과 관련되는 사이토카인으로 시험관실험을 통해 섬유모세포를 자극하여 세포외기질의 침착에 깊이 관련되고, 피부경화증 등에서 CTGF mRNA의 발현이 증가된다고 보고되고 있다.<sup>6,7</sup>

Decoy oligodeoxynucleotides(ODN)는 전사인자의 DNA 결합 부위가 decoy에 의해 결합함으로써 전사인자가 대상 유전자의 프로모터에 결합할 수 없도록 한다. Bielinska 등

은 가장 먼저 세포배양을 통해 그러한 decoy를 사용함으로써 전사인자의 역할을 조사하는 도구로 사용하였다. 그 후 NF-kB, Ap-1, E2F, cAMP-response element 등에서 유사한 decoy들이 유전자 발현을 억제하거나 혹은 증가시키는 유전자치료제로 시도되고 있다.<sup>8</sup>

Sp1 전사인자가 조절하는 시토카인들이 무엇인지는 아직 잘 알려져 있지 않지만 최근 조직 섬유화를 초래하는 시토카인으로 알려진 TGF-β1 발현에 관련된다는 보고가 있다.<sup>9</sup>

따라서 본 연구의 목적은 이와 같은 지식을 바탕으로 첫째, 반흔 형성 및 그 원인이 되는 세포외기질의 침착과 밀접한 관련이 있는 TGF-β1 및 CTGF 상호간의 발현에 대해 살펴보고, 둘째, 이들 TGF-β1 및 CTGF의 발현에 전사인자인 Sp1이 어떻게 작용하는지를 규명하고, 셋째, 이 Sp1 전사인자의 작용을 억제하기 위하여 새로운 형태인 ring (R)-type의 decoy를 제작해서 사용한 뒤 그 결과를 살펴보는 것이다. 이러한 연구는 조직 섬유화 및 반흔형성 방지를 위한 새로운 치료 방향을 제시할 것으로 생각한다.

**II. 재료 및 방법**

**가. Sp1 Decoy ODN의 제작**

R-Sp1과 mismatched-Sp1(M-Sp1) decoy 제작을 위한 염기서열은 R-Sp1 decoy: 5'-GGGGCGAGCTTTTGCTCGCC CCGCCCCGATCTTTTGATCGGGC-3' M-Sp1decoy: 5'-GGtaCGAGCTTTTGCTCGTACCGTACCGATCTTTGATCGGtaC-3' 여기서 Sp1 전사인자가 특이적으로 결합하는 염기서열은 밑줄 친 부분이며, Sp1 결합 부위를 돌연변이시킨 염기서열은 소문자로 나타난 부분이다. ODN은 95℃에서 3분 동안 열을 가한 후, 80℃에서 25℃로 3시간 동안 서서히 식했으며 T4 DNA 연결효소(TaKaRa, CA, U.S.A.)를 첨가하여 16℃에서 16시간 동안 반응시켜 연결하였다.

**나. 섬유모세포 배양**

인간 섬유모세포는 (주)한국세포주 은행으로부터 분양

받아 배양하였으며 Dulbecco's modified essential medium (DMEM; Gibco BRL, N.Y, U.S.A.) 배지에 10% 우태자혈청(fetal bovine serum, FBS; JRH, KS, U.S.A.)을 넣고 100 units/mL의 enicillin(Gibo BRL, N.Y, U.S.A.)과 100 mg/ mL의 Streptomycin(Gibco BRL, N.Y, U.S.A.)을 넣은 후 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.

**다. 세포 내로 Sp1 decoy의 핵산전달감염 (transfection)**

섬유모세포를 Lipofectamine Plus Reagent(Invitrogen, CA, U.S.A.)의 농도가 DNA : 지질을 1:3으로 사용하여 핵산 전달 감염시켰다. 세포는 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 3시간 동안 배양한 후 새 배지로 교환해서 실험에 사용하였다.

**라. Luciferase 분석**

TGF-β1 프로모터 벡터와 아교질 I 프로모터 벡터의 구조는 Table I과 같다. 핵산전달감염 시킨 후 10 ng/mL이 되게 TGF-β1(Sigma, St. Louis, U.S.A.)을 처리하였다. CTGF는 pCMV 벡터에 cDNA를 클로닝하여 핵산전달감염시켜 사용하였다. 24시간 동안 배양한 후 1 × Reporter lysis buffer(Promega, Madison, WI, U.S.A.)로 세포를 용해시킨 후 luciferase 활성을 조사하였다.

**마. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)**

RNA-Bee(TEL-TEST, TX, U.S.A.)를 사용하여 total RNA를 추출한 후 RNA 0.5 μg과 1 mM dNTP, 10 ng/μL oligo (dT)15 (Promega, Madison, WI, U.S.A.), 20 units RNasin (Promega, Madison, WI, U.S.A.), 그리고 50 units M-MLV reverse transcriptase(Promega, Madison, WI, U.S.A.)를 포함하는 RT buffer에서 cDNA 합성을 37℃에서 1시간 동안 수행하였다. 1 μL의 cDNA를 주형으로 0.25 mM dNTP, 5 pM primer set, 1.25 units Taq DNA polymerase (TaKaRa, CA, U.S.A.)를 포함하는 Taq polymerase buffer에서 증폭

**Table I.** Sequence of Primers for Human TGF-β1, CTGF, and GAPDH

Target		Sequence	Size (bp)
TGF-β1	Sense	5'-GCCCTGGACACCAACTATTGC-3'	335
	Antisense	5'-GCTGCACTTGCAGGAGCGCAC-3'	
CTGF	Sense	5'-TTCCAGAGCAGCTGCAAGTACCA-3'	329
	Antisense	5'-TTGTCATTGGTAACCCGGGTGGA-3'	
GAPDH	Sense	5'-CGTCTTCACCACCATGGAGA-3'	300
	Antisense	5'-CGGCCATCACGCCACAGTTT-3'	

**Table II.** Sequence of Primers for Rat TGF- $\beta$ 1, CTGF, and GAPDH

Target	Sequence	size (bp)
TGF- $\beta$ 1	Sense	5'-CCTGCTGCTTTCTCCCTCAACC-3'
	Antisense	5'-CTGGCACTGCTTCCCGAATGTC-3'
CTGF	Sense	5'-AGAAGTGTGCACGGAGCGTG-3'
	Antisense	5'-CTGACCATTTCAGAGACGAC-3'
GAPDH	Sense	5'-GTGGACATTGTTGCCATCAAGG-3'
	Antisense	5'-GAGGGAGTTGTCATATTTCTCG-3'

반응을 25 cycle 수행하였다. 이와 같이 증폭된 cDNA는 1% agarose gel에서 전기영동하여 LAS-3000 image analyzer(Fujifilm, Tokyo, Japan)로 띠의 밝기를 측정하여 GAPDH의 띠의 밝기로 보정하여 정량하였다. PCR 반응에 사용한 각각의 primer는 Table I에 기술한 바와 같다.

#### 바. 실험동물

실험동물로서 200 g 내외의 Sprague-Dawley 수컷 백서를 복강 마취한 후 견갑골 사이에서 하방 1 cm 위치에 지름 1 cm가 되게 원형으로 외피를 제거하였다. 제 1군은 정상 대조군, 제 2군은 외피를 제거한 대조군, 제 3군은 외피를 제거하고 M-Sp1 decoy를 처리한 군, 그리고 제 4군은 외피를 제거하고 R-Sp1 decoy를 처리한 군으로 나누어 실험하였다. Sp1 decoy의 처리는 10  $\mu$ g의 decoy를 lipofectamin (Invitrogen, CA, U.S.A.)를 사용하여 상처 부위에 피하 주사하였다. 실험동물은 3, 5, 7, 14일 째에 각 3 마리를 도살하여 피부조직을 채취하였다.

#### 사. 광학현미경 관찰

채취한 조직은 4% paraformaldehyde로 고정하고 계열 에탄올로 탈수한 후 파라핀 침투와 파라핀 포매과정을 거쳐서 4  $\mu$ m의 박절편을 만들어 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 아. 면역조직화학적 염색

파라핀 포매 된 피부조직을 4  $\mu$ m 두께로 잘라서 탈파라핀화 시킨 후 에탄올과 증류수를 사용해서 재 흡수시켰다. 이후 95 $^{\circ}$ C로 미리 데워진 Dako Epitope Retrieval Solution(0.01 mol/L citrate buffer, pH 6.0)에 40분 간 반응시킨 후 실온에서 20분 간 냉각시켰다. 3% 과산화수소 용액에 20분간 처리하고 0.01 M PBS에서 10분 간 세척하였다. TGF- $\beta$ 1(Cell sciences, MA, U.S.A.)과 CTGF(Abcam, MA, U.S.A.)에 대한 1차 항체를 각각 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고, biotinylated anti-mouse IgG(LSAB kit, DAKO, U.S.A)로 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시켰다. Streptavidin peroxidase

(LSAB kit, DAKO, USA)로 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시키고, DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 발색하여, Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

### III. 결 과

#### 가. 배양된 섬유모세포에서 TGF- $\beta$ 1과 CTGF 상호 관계

배양된 섬유모세포에 투여한 TGF- $\beta$ 1의 농도가 증가할수록 대조군과 비교하여 CTGF의 mRNA 양이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 1). 그리고 TGF- $\beta$ 1의 농도가 증가할수록 TGF- $\beta$ 1의 mRNA 양도 증가하는 것을 확인하였다. 이 결과를 전사단계에서 한 번 더 확인하기 위해 TGF- $\beta$ 1 프로모터 벡터를 사용하여 luciferase 분석을 수행하였다. TGF- $\beta$ 1을 처리하였을 때 자가 조절작용으로 TGF- $\beta$ 1의 전사가 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 2). 여기서 CTGF는 TGF- $\beta$ 1의 발현에 큰 영향을 주지 않았다. 실험의 결과에서 TGF- $\beta$ 1은 CTGF의 발현을 증가시키지만 CTGF는 TGF- $\beta$ 1에 큰 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다.

#### 나. TGF- $\beta$ 1, 아교질 I의 발현에 대한 Sp1 Decoy의 효과

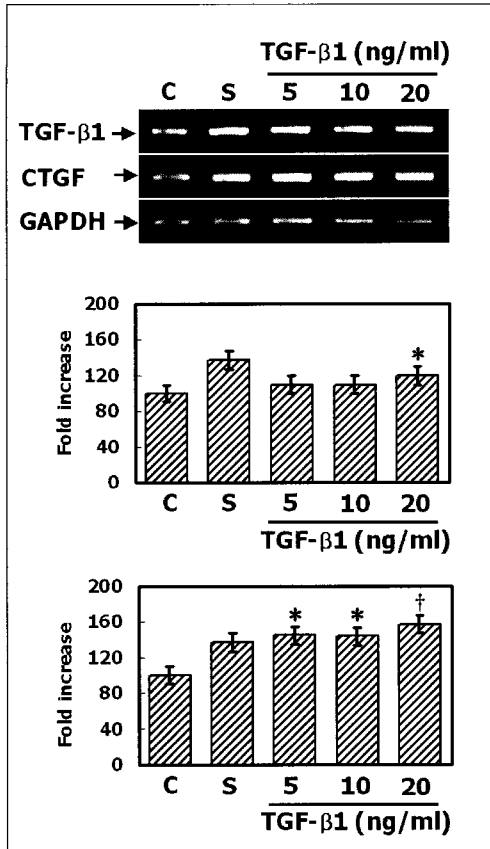
세포 내에서 decoy의 안전성을 확인한 결과 선형의 decoy보다 안정하다고 알려져 있는 PS-Sp1 decoy보다 R-Sp1 decoy가 S1 핵산분해효소(nuclease), exonuclease III, 사람 혈청 및 FBS에서 훨씬 더 안정하다는 것을 확인하였다(data not shown). 혈청 없이 발현되는 TGF- $\beta$ 1, 혈청에 의해 유도된 TGF- $\beta$ 1, 그리고 TGF- $\beta$ 1에 의해 자가 유도된 TGF- $\beta$ 1의 발현 각각에 대해 Sp1 decoy가 어떻게 효과가 있는지 조사하였다(Fig. 3A). 혈청을 처리하지 않았을 때 Sp1 decoy를 처리하면 1/2 정도로 TGF- $\beta$ 1의 발현양이 감소하는 것을 확인하였다. 그리고 혈청에 의해 유도된 TGF- $\beta$ 1의 발현 양에는 영향을 주지 않았다. 혈청 없이 발현되는 아교질 I, 혈청에 의해 유도된 아교질 I, 그리고 TGF- $\beta$ 1에

의해 유도된 아교질 I의 발현에 Sp1 decoy가 효과가 있는지 조사하였다(Fig. 3B). 혈청 없이 또는 혈청에 의해 유도된 아교질 I의 발현은 Sp1 decoy에 의해서 약간 감소하였

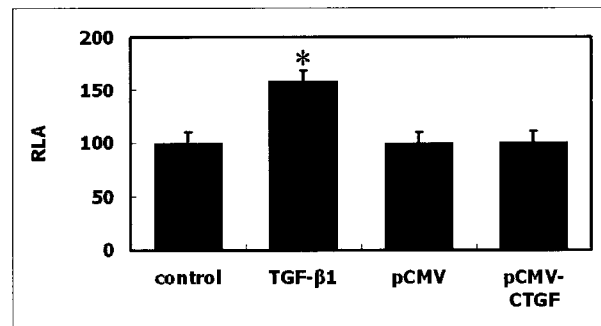
다. 그러나 TGF-β1에 의해서 유도된 아교질 I의 발현 양은 4배 정도 감소한 것을 확인하였다.

**라. 피부에서 TGF-β1와 CTGF의 발현에 대한 Sp1 Decoy의 효과**

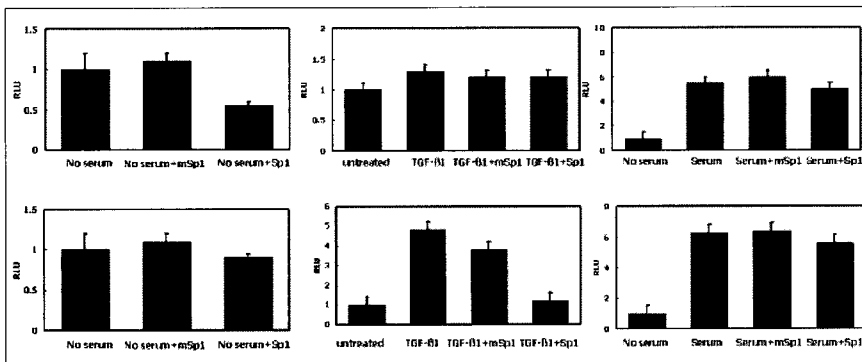
동물실험을 위해 Sp1 decoy가 피부로 전달되었는지 FITC를 사용하여 확인하였다. FICT의 형광이 대부분의 세포에서 확인된 것으로 보아 피부의 세포 내로 핵산전달감염이 잘 된 것을 확인하였다(Fig. 4). 창상치유 과정에서 TGF-β1과 CTGF의 발현에 Sp1 decoy의 효과를 조사하였다. 제 1군(control)과 비교했을 때 제 2군(wound)과 제 3군(wound + mSp1)에서는 TGF-β1의 발현 양은 증가하였고 제 4군(wound + Sp1)에서는 3일과 5일에서 mRNA의 발현 양이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 5A). CTGF 발현 역시 제 2군에서 증가하는 양상을 보였으며 Sp1 decoy를 처리하면 3일과 5일에서 mRNA의 발현 양이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 5B). 면역조직화학적 염색을 통한 TGF-β1 및 CTGF 단백질발현에서도 같은 소견이 관찰되었다(Fig. 6A, B). Sp1 decoy의 효과는 5일까지만 지속되는 것으로 관찰되었다. 그 이후에는 Sp1 decoy 효과가 없는 것으로 보아 Sp1 decoy가 가 세포 내에서 분해된 것으로 생각한다.



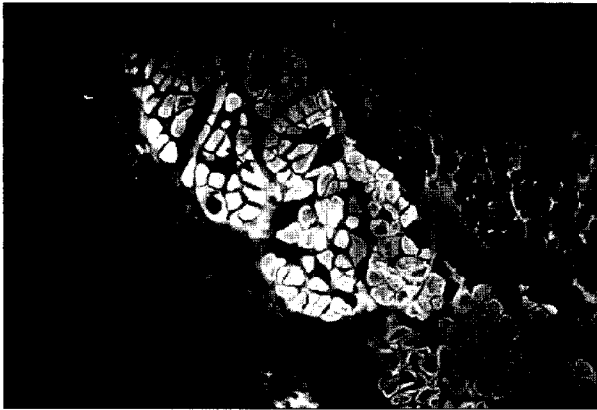
**Fig. 1.** Both TGF-β1 and CTGF mRNA are increased after treatment of TGF-β1 protein. (Above) mRNA expression of TGF-β1 and CTGF. (Center) Signal intensity of TGF-β1 was quantified by densitometric analysis. (Below) Signal intensity of CTGF was quantified by densitometric analysis. The values were presented as mean ± SEM of triplicate experiments. Statistical significance was determined as \*p<0.01 compared to Serum, p<0.05 compared to Serum. Abbreviations: C, control; S, Serum; 5, TGF-β1 5 ng/ml; 10, TGF-β1 10 ng/ml; and 20, TGF-β1 20 ng/ml.



**Fig. 2.** TGF-β1 upregulates TGF-β1 mRNA expression, but not CTGF expression in luciferase assay. Statistical significance was determined as \*p<0.01 compared to TGF-β1.



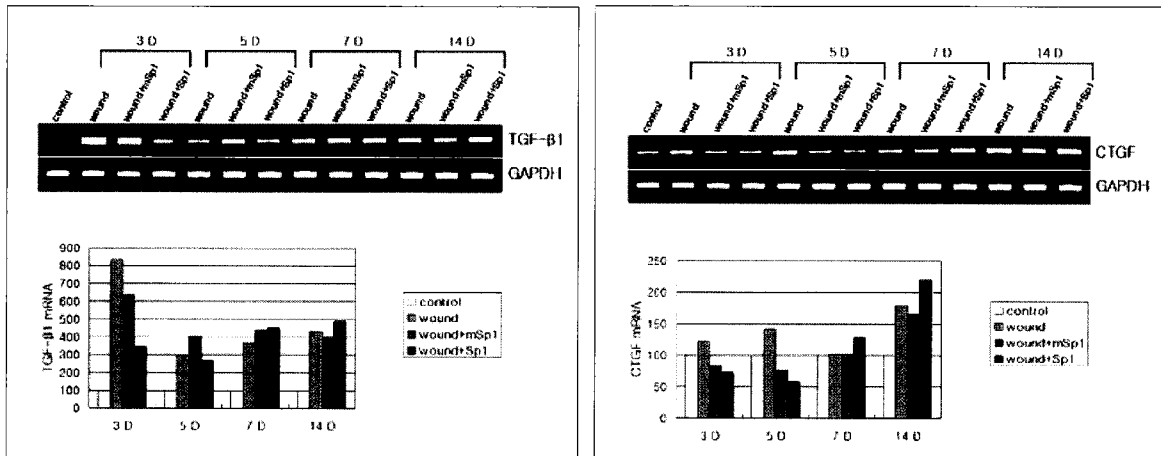
**Fig. 3.** TGF-β1 and Collagen gene expression in luciferase assay after treatment of Sp1 decoy ODN. (Above) TGF-β1 gene expression in luciferase assay after treatment of Sp1 decoy ODN. (Below) CTGF gene expression in luciferase assay after treatment of Sp1 decoy ODN. The values were presented as mean ± SEM of triplicate experiments. Abbreviations: mSp1, Mismatched Sp1-Decoy; Sp1, Ring Sp1-Decoy; RLA, Relative luciferase activity.



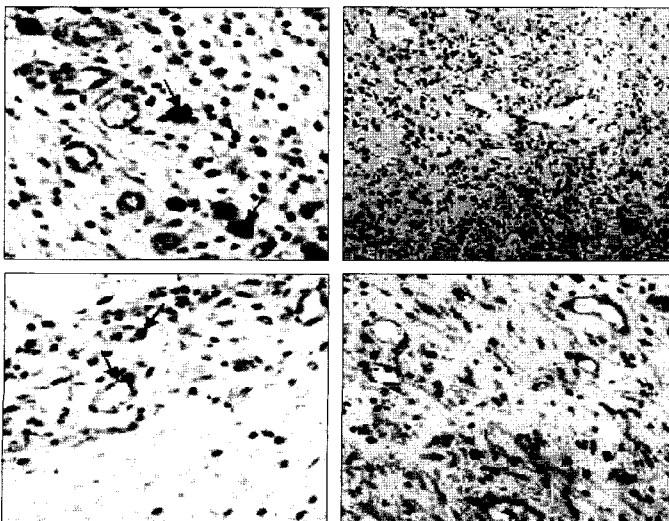
**Fig. 4.** FITC-labeled Sp1 decoy ODN was transfected to the skin of rat. Cells were transfected with FITC-labeled Sp1 ODN combined with LifectAMINE Plus and then examined by fluorescence microscopy( $\times 200$ ).

#### IV. 고 찰

창상치유 과정은 염증세포의 침윤, 세포의 증식, 세포의 이주, 혈관의 증식과 세포외기질의 형성 등을 포함하는 매우 복잡한 과정이다. TGF-β1은 이 모든 과정, 즉 염증세포에 대한 화학주성, 혈관증식, 세포외기질의 침착과 육아조직의 형성 등을 조절하여 창상치유의 촉진과 반흔형성에 관여한다.<sup>10</sup> 또한 TGF-β1은 활성화된 혈소판, 대식세포 및 림프구에서 분비되며, 생체 내에서 섬유모세포에 의한 아교질(collagen)과 섬유결합소(fibronectin)의 생성을 증가시켜 섬유모세포의 세포분열을 촉진한다.<sup>6</sup> 반흔형성의 과정에는 TGF-β1 뿐만 아니라 TNF-α, IFN, IL-2, -12 등의 제 1형 시토카인들과 IL-4, -5, -10, -13 등의 제 2형 사이토카인들도 서로 조절기전을 통해 직접 혹은 간접적으로 관여



**Fig. 5.** The expression of TGF-β1 and CTGF mRNA in the skin of rats. (Left) mRNA expression of TGF-β1. (Right) mRNA expression of CTGF. Signal intensity of CTGF was quantified by densitometric analysis. The values were presented as mean  $\pm$  SEM of triplicate experiments. Statistical significance was determined as \* $p < 0.01$  compared to wound.



**Fig. 6.** Immunohistochemical stain for TGF-β1, CTGF after 3 days of injury ( $\times 200$ ). (Above, left) Immunohistochemical stain for Control. (Above, right) Immunohistochemical stain for TGF-β1 after R-Sp1 decoy injection. (Below, left) Immunohistochemical stain for Control. (Below, right) Immunohistochemical stain for CTGF after R-Sp1 decoy injection.

한다. 이들 시토카인들의 상호 관계는 아직 완전히 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 특히 TGF- $\beta$ 1과 CTGF 간의 피부반흔에서의 상호 관련성 및 Sp1 전사인자조절을 통한 상호 관계를 조사하였다. 이러한 연구를 시행하는 것은 이들 상호간의 발현 조절 및 역할 등에 관한 이해가 있어야만 앞으로 섬유화의 조절 혹은 반흔형성 방지를 위한 새로운 치료제 개발이 가능할 수 있기 때문이다.

본 연구에서 시도된 전사인자에 대한 decoy 투여방법은 전사인자의 작용을 감소시켜서 특정 유전자의 발현을 감소시키기 위한 도구로 최근 시도되고 있다.<sup>11</sup> 따라서 이 decoy의 사용은 많은 난치성 질환들에게 있어서 새로운 치료도구로서 가능성을 보여주고 있다. 최근 Morishita 등은 쥐의 경동맥에 손상을 유발한 후 전사인자인 E2F에 대한 결합 부위를 가지는 ODN을 투여하였다. 비록 E2F의 6 아형(isoform)은 세포성장에서의 역할이 서로 다른 것으로 알려져 있지만, 세포주기 진행과정 상의 특정 시점에 E2F의 투여는 DNA 합성과 세포분열을 통해 다수의 유전자 발현을 증가시킨다.<sup>12</sup> 그런 이론으로 Morishita 등은 E2F에 특정한 decoy를 투여함으로써 손상받은 혈관에서 세포 증식에 의한 혈관폐쇄를 방지하고 여기에 관여하는 유전자의 발현을 억제하였다.<sup>13</sup>

본 연구에서는 Sp1을 대상으로 하였으며 이 Sp1 전사인자는 여러 문헌고찰 및 선행된 실험을 통하여 섬유화초래 질환에서 세포외기질의 축적을 감소시킬 수 있다고 보고되고 있다.<sup>14</sup> 즉, 섬유모세포의 배양을 통한 Sp1의 발현 억제는 아교질, proteoglycan 및 기타 세포외기질 관련 단백질 발현을 억제하며, 이들 유전자에 대한 발현 억제는 DNA 전사 과정의 감소를 통해 초래된다고 보고되었다. Sp1 전사인자의 또 다른 작용은 TGF- $\beta$ 1의 발현에 직접적으로 관련이 되어 있을지 모른다는 것이다. 즉 TGF- $\beta$ 1의 전사 과정 또한 프로모터의 GC가 풍부한 부위에 Sp1이 결합함으로써 시작된다는 것을 의미한다. TGF- $\beta$ 1은 세포외기질형성에 관련되는 유전자인  $\alpha$ 2 아교질, 섬유결합소 등의 전사를 유도하거나, 일부 세포외기질 단백질분해효소의 발현을 감소시키거나, 또는 PAI-1과 같은 세포외기질 단백질분해효소억제제의 발현을 증가시킴으로써 세포외기질의 형성을 증가시킨다. 따라서 섬유화와 관련된 TGF- $\beta$ 1의 작용에 Sp1이 관련될 수 있다는 것은 쉽게 추측할 수 있다.

본 연구에서 반흔형성 방지를 위하여 전사인자인 Sp1을 선택하고 그 기능을 감소시키기 위하여 decoy 방법을 사용하게 된 이유가 있다. 즉, Sp1 결합 부위는 TGF- $\beta$ 1과 그 수용체의 프로모터에 존재한다. 따라서 Sp1 decoy ODN에 의한 Sp1 전사방해는 TGF- $\beta$ 1의 발현을 억제하고, 그로 인해 섬유화는 초래되지 않을 것으로 생각한다. 아마도

Sp1은 염증-재생 과정에서의 조절 및 유도하는 작용이 있을 것으로 추측된다. 이 과정에 있어서 Ap-1을 포함한 NF- $\kappa$ B, E2F 등의 다른 전사조절 물질도 관련될 지도 모르며, 추후 이들의 상호 비교연구 등이 필요할 것으로 생각한다. 본 연구에서도 TGF- $\beta$ 1에 의해 자가유도된 TGF- $\beta$ 1의 발현은 Sp1 decoy를 처리하더라도 그 발현 양의 변화가 없는 것으로 보아 Sp1이 아닌 또 다른 전사인자가 관련되는 것으로 추측해 볼 수 있다.

최근 여러 전사인자들에 의한 decoy의 개발과 함께 이들의 효율성을 높이고 세포 내에서 쉽게 파괴될 수 있는 것을 방지하기 위한 여러 형태의 decoy ODN의 개발이 시도되고 있다. 이를 위한 대상 전사인자들로는 NF- $\kappa$ B superfamily, Ap-1, E3F, cAMP-response element, Sp1 등이 시도되고 있으며, 그 중 구조적으로 지금까지는 PS-type이 일반적인 선형에 비해 훨씬 안정하다고 보고되고 있다.<sup>15</sup> 그러나 본 연구에서는 보다 더 안정화된 decoy를 만들기 위하여 선형이나 PS-type이 아닌 R-type의 decoy를 개발하였다. 일반적으로 decoy ODN에 대한 안정성은 핵산분해효소에 의해 얼마나 분해되지 않고 안정성이 있는가로 검증한다. 본 연구를 통해 R-Sp1 decoy ODN은 exonuclease와 FBS에 대해서 PS-Sp1 decoy에 비해 훨씬 안정성이 있는 것으로 나타났다.

본 연구의 결과를 요약해 보면 반흔형성과정에서 TGF- $\beta$ 1은 CTGF의 발현을 유발하였다. 또한 TGF- $\beta$ 1 및 CTGF 모두 전사인자인 Sp1에 의해 그 발현이 조절되었으며, R-type의 decoy 투여에 의해 Sp1의 작용이 억제되었다. 본 연구에서 사용된 R-type의 decoy는 기존에 보고된 다른 유형의 decoy보다 훨씬 안정성이 있는 것이 확인되었다. 따라서 Sp1에 대한 R-type decoy의 적용과 함께 또 다른 전사인자들과의 상호 관계가 규명된다면 향후 조직 섬유화 및 반흔형성 방지를 위한 새로운 치료 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각한다.

## V. 결 론

반흔형성 과정에서 세포외기질의 침착과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 TGF- $\beta$ 1 및 CTGF 상호간의 발현이 어떻게 작용하는지 알아보하고자 하였으며, 이들 TGF- $\beta$ 1 및 CTGF의 발현에 전사인자인 Sp1이 어떻게 작용하는지를 보고 Sp1의 작용억제를 위하여 새롭게 제작된 R-type decoy의 효과를 살펴보았다.

섬유모세포 실험에서 TGF- $\beta$ 1은 CTGF의 발현을 증가시켰으며, 반대로 CTGF는 TGF- $\beta$ 1의 발현에 영향을 주지 않았다. 그리고 Sp1은 TGF- $\beta$ 1 및 CTGF의 발현을 조절하였다. 본 연구에서 사용된 R-type의 decoy는 기존에 보고된

다른 유형의 decoy보다 훨씬 안정성이 있는 것이 확인되었으며, R-type Sp1 decoy는 TGF- $\beta$ 1 및 CTGF의 발현을 억제하였다. 따라서 R-type Sp1 decoy는 세포외기질의 형성 방지를 위한 좋은 치료도구가 될 것으로 생각하며 향후 Sp1 및 다른 전사인자들과의 상호 관계가 더욱 규명된다면 조직 섬유화 및 반흔 형성 방지를 위한 새로운 치료 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각한다.

## REFERENCES

- Diaz BV, Lenoir MC, Ladoux A, Frelin C, Demarchez M, Michel S: Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. *J Biol Chem* 275: 642, 2000
- Mann MJ, Dzau VJ: Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides. *J Clin Invest* 106: 1071, 2000
- Shinozaki M, Kawara S, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takehara K: Induction of subcutaneous tissue fibrosis in newborn mice by transforming growth factor- $\beta$ : Simultaneous application with basic fibroblast growth factor causes persistent fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 292, 1997
- Peltonen J, Kahari L, Jaakkola S, Kahari VM, Varga J, Uitto J, Jimenez SA: Evaluation of transforming growth factor beta and type I procollagen gene expression in fibrotic skin diseases by in situ hybridization. *J Invest Dermatol* 94: 365, 1990
- Cox DA, Maurer T: Transforming growth factor- $\beta$ . *Clin Immunol Immunopathol* 83: 25, 1997
- Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Raines EW, Ross R, Sporn MB: Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6020, 1987
- Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Fujimoto M, Grotendorst GR, Takehara K: Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disease. *J Invest Dermatol* 106: 729, 1996
- Bielinska A, Shivdasani RA, Zhang LQ, Nabel GJ: Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides. *Science* 250: 997, 1990
- Geiser AG, Busam KJ, Kim SJ, Lafyatis R, O'Reilly MA, Webbink R, Roberts AB, Sporn MB: Regulation of the transforming growth factor-beta 1 and -beta 3 promoters by transcription factor Sp1. *Gene* 129: 223, 1993
- Quaglino D Jr, Nanney LB, Ditesheim JA, Davidson JM: Transforming growth factor-beta stimulates wound healing and modulates extracellular matrix gene expression in pig skin: Incisional wound model. *J Invest Dermatol* 97: 34, 1991
- Yamashita J, Yoshimasa T, Arai H, Hiraoka J, Tayaya K, Miyamoto Y, Ogawa Y, Itoh H, Nakao K: Identification of cis-elements of the human endothelin-A receptor gene and inhibition of the gene expression by the decoy strategy. *J Biol Chem* 273: 15993, 1998
- Verrecchia F, Rossert J, Mauviel A: 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, 2001
- Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, Ellison KE, Nakama M, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ: A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5855, 1995
- Poncelet AC, Schnaper HW: Sp1 and Smad proteins cooperate to mediate transforming growth factor-b1-induced  $\alpha$ 2(I) collagen expression in human glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* 276: 6983, 2001
- Kim Y, Ratzu V, Choi SG, Lalazar A, Theiss G, Dang Q, Kim SJ, Friedman SL: Transcriptional activation of transforming growth factor b1 and its receptors by the kruppel-like Factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1: Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J Biol Chem* 273: 33750, 1998