편측성 완전 요관폐색 생쥐모델에서 NF-kappa B Decoy Oligodeoxynucleotide 투여 효과

The Effect of Ring-type NF-kappa B (NF-kB) Decoy Oligodeoxynucleotide on the Kidney for an Experimental Unilateral Ureteral Obstruction in Mice

Young Gun Kwon, Young Guk Lee, Il Kang, Eun Suk Lee, Kwan Kyu Park[1], Yoon Seop Keum[1], Kyung Hyun Kim[1], Jae Shin Park

From the Departments of Urology and [1]Pathology, Daegu Catholic University College of Medicine, Daegu, Korea

Purpose: The transcription factor, NF-kB, is important in the coordinated expressions of various pro-inflammatory and adhesion molecules. Our hypothesis is that inhibiting the action of NF-kB using a synthetic decoy oligodeoxynucleotide (ODN) can block the underlying inflammatory response in glomerulonephritis.

Materials and Methods: Forty two male C57BL6 mice, weighting 25g, were divided into four groups; in group 1, 2 mice were used as normal controls; in group 2, a unilateral ureteral obstruction (UUO) was induced in 12 mice; in group 3, 20 UUO mice were treated using ring-type NK-kB decoy ODN; and in group 4, 8 UUO mice were treated using scramble type NF-kB decoy ODN. The mice were killed 1, 3, 5 and 7 days after the NF-kB decoy ODN injections, and the blood urea nitrogen (BUN), and expressions of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-β (IL-β), fibronectin, vascular cell adhesion molecule (VCAM) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), as well as the histopathological findings, analyzed in each group.

Results: The serum levels of BUN, TNF-α, IL-β, fibronectin, VCAM and MCP-1 were increased in group 2, but decreased in group 3. The histopathological findings of the kidneys in group 3 were most similar to those found in the control (group 1).

Conclusions: NF-kB decoy ODN treatment substantially inhibited the disease, with reductions in the histological damage and the renal expressions of inflammatory cytokines. (**Korean J Urol 2007;48:815-825)**

Key Words: NF-kappa B, Transcription factors, Ureteral obstruction

대한비뇨기과학회지
제 48 권 제 8 호 2007

대구가톨릭대학교 의과대학
비뇨기과학교실, [1]병리학교실

권영근 · 이영국 · 강 일 · 이은석
박관규[1] · 금윤섭[1] · 김경현[1] · 박재신

접수일자 : 2006년 10월 30일
채택일자 : 2007년 6월 25일

교신저자: 박재신
대구가톨릭대학교 의과대학
비뇨기과학교실
대구광역시 남구 대명 4동
3056-6
㉾ 705-034
TEL: 053-650-4662
FAX: 053-623-4660
E-mail: jspark@cu.ac.kr

서 론

신장의 섬유화는 염증성 병변의 마지막 단계에서 초래되며, 신장의 염증성 질환 혹은 폐색성 질환이 그 원인이다. 이러한 섬유화는 주로 사구체 및 세뇨관사이에서 발생하며 점진적으로 신장기능을 소실하게 하여, 결국 말기 신부전증에 빠지게 한다. 이 섬유화과정은 여러 가지 성장인자(growth factor)와 cytokine 등이 관여하는 매우 복잡한 과정이다. 최근에는 이들 세포매개물질들의 발현을 조절하는 전사인자 (transcription factor)에 관한 활발한 연구를 통해 그 기전이 조금씩 밝혀지고 있다. 이 과정에서 NF-kappa B (NF-kB)는 초기의 interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor-α (TNF-α) 및 세포유착물질 (cell adhesion molecule)의 발현에 관련하는 중요한 전사인자로 알려져 있다.[1-3]

신장의 섬유화 과정을 보여주는 폐색신장 모델은 일측요

관을 결찰한 신장에서 세뇨관 및 간질조직의 현저한 NF-kB의 증가를 보여준 실험에서 확인할 수 있다.[4]

최근 시도되고 있는 섬유화 억제 연구는 cytokine들의 DNA 발현 조절에 관여하는 전사인자의 조절을 통한 연구이다.[5,6] 원래 전사인자는 유전자발현 조절에 중요하게 관여하는 핵단백으로서 대상유전자의 프로모터 부위에 존재하는 특정 염기서열 (sequence)에 결합한다. 이론적으로 이들 전사인자의 활동을 억제할 수 있는데 그것은 전사인자를 유인할 수 있는 미끼로 작용하는 decoy oligodeoxynucleotide (ODN)를 세포 내로 주입하면 가능하다. 즉 전사인자의 DNA 결합 부위가 decoy에 의해 결합됨으로써 전사인자는 대상유전자의 프로모터에 결합할 수 없게 된다. 이러한 방법을 이용한 decoy의 사용은 난치성 질환들의 새로운 치료도구로서 그 가능성을 보여주고 있다.

본 연구의 목적은 일측요관을 결찰한 동물 모델에서 신장에 염증성 혹은 섬유화 병변을 유발시킨뒤 전사인자인 NF-kB의 활성을 억제시키기 위하여 NF-kB에 대한 decoy ODN을 제작 투여하여 관련 세포매개물질들의 발현억제 유무를 관찰하고자 하는 것이다.

대상 및 방법

1. NF-kB decoy ODN의 제작

NF-kB의 sequence와 같은 Ring (R)-type NF-kB와 Scramble type NF-kB decoy 제작을 위한 염기 서열은 다음과 같다.

R-type NF-kB (wt) decoy ODN:

5-TCCCTTCAAGAAAACTTGAAGGGATTTCCCTCCAGAAAACTGGAGGGAAA-3

Scramble type NF-kB (sm) decoy ODN:

5-GGTACGGCAAAAAAttgccgtacctgacttagcctAAAAAGGCTAAGTCA-3

여기서 NF-kB 전사인자가 특이적으로 결합하는 염기서열은 밑줄 친 부분이며, NF-kB 결합부위를 돌연변이 시킨 염기서열은 밑줄 친 소문자로 나타낸 부분이다. ODN은 50 mer로 바이오닉스사 (바이오닉스, 서울, 한국)로부터 주문 제작하여 사용하였다. ODN은 95°C에서 3분 동안 열을 가한 후, 80°C에서 25°C로 될 때까지 3시간 동안 서서히 식혔으며 T4 DNA 연결효소 (Takara, USA)를 첨가하여 16°C에서 16시간 동안 반응시켜 연결하였다.

2. 실험 동물

신장의 염증성 변화를 초래하기 위한 실험동물로서 25g 내외의 성년기의 수컷 C57BL6 mouse를 대상으로 하였다. 좌측 신장의 요관을 상하로 묶은 후 가운데 부분을 잘라 편측성 요관 폐색을 하였다. 제 1군은 아무런 처리도 하지 않은 정상 대조군 (2마리), 제 2군은 편측성 요관 폐색을 한 대조군 (12마리), 제 3군은 편측성 요관 폐색을 한 후 R-type NF-kB decoy를 처리한 군 (20마리), 제 4군은 편측성 요관 폐색을 한 후 Scramble type NF-kB decoy를 처리한 군 (8마리)으로 나누어 실험하였다. NF-kB decoy의 처리는 10 μg의 decoy를 MIRUS (MirusBio, USA) 리포좀을 꼬리정맥으로 주사하였다. 실험동물은 전 처치 후 1, 3, 5, 7일째에 도살하여 좌측 신장조직을 적출하였다.

3. 편측성 완전 요관폐색 생쥐모델로의 핵산전달감염 효율과 위치확인

편측성 완전 요관폐색 생쥐모델의 꼬리 정맥으로 핵산전달감염하였을 때 핵산전달감염의 효율과 위치를 확인하기 위하여 플라스미드 벡터에 MIRUS (MirusBio, USA)로 형광을 표지하여 꼬리 정맥으로 주사하였다. 형광물질 주입 24시간 후 신장과 간, 비장을 적출하여 OCT용액 (Sakura Finetechnical Co., Tokyo, Japan)에서 급속 냉각하여 4 μm의 박편으로 절단하여 형광현미경으로 핵산전달정도의 효율을 관찰하였고, 핵 내로 들어갔는지 여부를 확인하기 위하여 Propidium iodide (Sigma, St Louis, USA)로 대조염색을 하였다 (Fig. 1).

4. 생화학 검사

실험동물의 혈액 샘플을 채취하여 4°C, 10,000rpm에서 8분

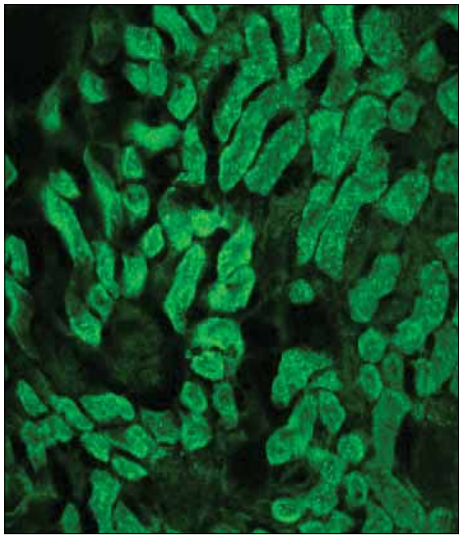

Fig. 1. Fluorescent microscopic view of the transfected NF-kappa B (NF-kB) decoy oligodeoxynucleotide (ODN) into the renal tubular cells.

간 원심분리하여 혈청을 추출하였다. 일측요관 결찰 후 비교적 짧은기간 동안의 변화를 보기위하여 혈중 요소 농도(blood urea nitrogen; BUN)를 측정하였다.

5. Western blot 분석

영하 70°C에 보관하였던 신장에 변성용액(IPH buffer, 50mM pH 8.0 Tris, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 100mM PMSF, 1mg/ml leupeptin, 1mg/ml aprotinin, 1M DTT)을 첨가한 후 조직 분쇄기로 세포를 파괴시키고 12,000rpm에서 30분간 원심분리하여 전체 단백질을 분리하였다. 단백질 정량용 시약(Bio-Rad Laboratories, USA)을 사용하여 분광광도계(Beckman, Peapeck, USA)로 전체 단백질을 정량하였고, 정량된 단백질 50 μg을 취하여 SDS-Polyacrylamide gel에서 3시간 동안 100V로 전기영동을 한 후 10V에서 12시간 동안 나일론 막(PVDF membrane, Millipore, UK)으로 단백질을 전달하였다. 그 후 나일론 막은 TBS-T (10mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20)로 5%가 되게 만든 skim milk로 1시간 배양을 한 후에 항Fibronectin mouse monoclonal IgG (Abcam, Cambridge, UK), 항MCP-1 goat polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA), 항 VCAM rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 3시간 붙인 후 TBS-T로 5분간 3번 헹구고, 양고추냉이 과산화물(horse-raddish peroxidase)이 결합되어 있는 항-토끼, 항-염소, 항-쥐 IgG (IgG-HRP) (Santa Cruz Biotechnology, USA)로 2시간동안 결합시키고 TBS-T로 10분간 3번 헹군 후 ECL 탐지장치 (Amersham, Buckinghamshire, UK)로 가시화하여 후지 이미지 분석기 (Ras 3000, Fuji, Japan)로 정량화하였다.

6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

영하 70°C에서 보관하였던 단백질에서 TNF-α와 IL-1β의 농도는 ELISA kits (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, USA)를 사용하여 측정하였다. 각각 TNF-α와 IL-1β와 반응하는 항체가 부착된 96 well plate에 먼저 반응용액을 50ml를 넣고 신장에서 분리한 단백질 또는 혈청 단백질을 50ml 첨가하여 2시간 상온에서 반응시켰다. 반응물을 제거하고 세척한 후, 효소가 부착된 항체를 100ml를 각 well에 첨가하여 2시간 상온에서 반응시키고 세척한 후 효소에 대한 기질을 50ml 넣고 30분간 빛을 차단하며 발색반응을 시켰다. 여기에 반응정지 용액을 첨가한 후 30분 내에 ELISA reader기를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 광학 현미경 관찰

채취한 조직은 10% formaldehyde로 고정하고 계열 에탄올로 탈수한 후 파라핀 침투와 파라핀 포매 과정을 거쳐서 4 μm의 박절편을 만들어 통상적인 염색을 실시하여 광학현미경으로 신장의 실질 내에 단핵세포의 침윤 소견과, 섬유화 유무를 관찰하기 위한 신장 실질의 확장 및 세뇨관 위축 정도를 관찰하였다.

8. 면역조직화학염색

먼저 파라핀으로 포매된 신장의 생검조직을 회전형 박절기로 4 μm두께로 잘라 부착제가 처리된 슬라이드에 붙이고 탈파라핀화 시킨 후 에탄올과 증류수를 사용해서 함수시켰다. 메탄올에 희석한 3% 과산화수소 용액에 30분간 처리하여 내인성 과산화효소에 대한 반응을 차단하고 증류수로 세척하였다. 미리 데워놓은 95°C Dako Epitope Retrieval Solution (0.01mol/l citrate buffer, pH 6.0)에 조직절편이 충분히 잠기게 놓은 후 10분간 끓여 epitope retriveal 과정을 시행하고 실온에서 식힌 후 PBS로 세척 해 주었다. TNF-α, Fibronectin, ICAM, VCAM, MCP-1에 대한 1차 항체를 4°C에서 16시간동안 반응시키고, biotinlyated anti-mouse IgG (DAKO, USA)로 37°C에서 15분 간 반응시켰다. Streptoavidin peroxidase (DAKO, USA)로 37°C에서 15분 간 반응시키고, DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 발색한 후 hematoxylin으로 대조 염색을 하여 광학현미경으로 임의로 10군데의 400배 현미경 시야에서 양성으로 인지되는 세포의 수를 세어 백분율하여 10% 이상을 양성으로 판정하였다.

9. 통계학적 분석

통계처리를 위해서 SPSS Release 9.0 (Statistical Package Service Solution soft ware, SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하였고 chi-square test 및 Student's t-test 검정을 사용하였으며, p값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 의미 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. R-type NF-kB decoy의 제작 및 안정성 확인

제작된 R-type NF-kB decoy는 두 개의 루프(loop)와 한 개의 대(stem)로 구성되고, 한 개의 NF-kB 결합자리를 포함한다 (Fig. 2A). R-type NF-kB decoy의 안정성을 조사하기 위하여 Linear type NF-kB decoy와 안정성을 비교하였다. Linear type NF-kB decoy보다 R-type NF-kB decoy가 exonuclease III에서 훨씬 더 안정하다는 것을 확인하였다 (Fig. 2B).

2. 혈중 요소 질소에 대한 NF-kB decoy의 효과

편측성 완전 요관폐색 생쥐모델에 NF-kB decoy를 주입 한

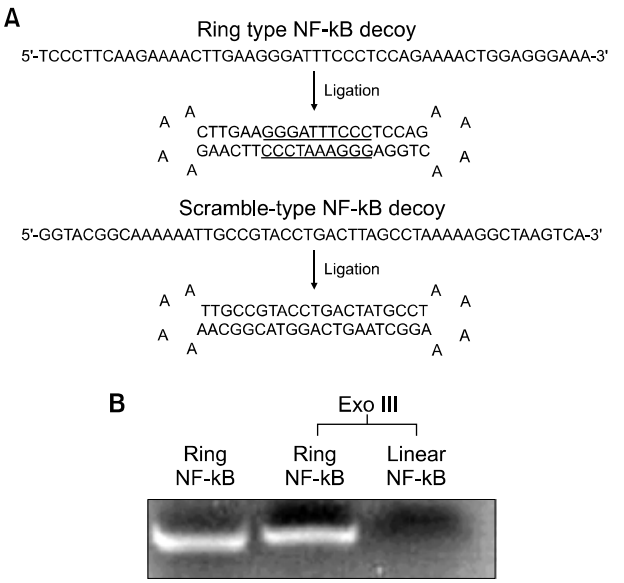

Fig. 2. Structure and molecular stability of a Sp1 decoy oligodeoxynucleotide (ODN). (A) Structure of a ring-type NF-kappa B (NF-kB) decoy ODN, the NF-kB binding site is underlined, (B) stability of a NF-kB decoy ODN in the presence of exonuclease III (Exo III). Linear NF-kB ODNs were completely digested after incubation for 24 hr in the presence of Exo III.

후 1, 3, 5, 7일 되는 날 생쥐에서 혈액을 채취하여 혈중 요소질소의 양을 측정한 결과, 정상 대조군에 비해 증가하였다. 하지만 제작한 R-type NF-kB decoy를 처리한 군에서는 혈중 요소질소의 양이 감소하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 3A).

3. NF-kB decoy에 의한 TNF-α, IL-1β의 발현 억제 (ELISA)

편측성 완전 요관폐색 생쥐모델에 NF-kB decoy를 주입한 후 1, 3, 5, 7일 되는 날 신장을 적출하여 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질을 이용하여 TNF-α, IL-1β의 ELISA를 실시하였다 (Fig. 3B, 3C). 요관 결찰 후 시간이 경과함에 따라 TNF-α, IL-1β의 양은 증가함을 확인할 수 있었고, 요관폐색군에 비하여 R-type NF-kB decoy를 주입한 생쥐에서는 TNF-α, IL-1β의 발현이 감소한 것을 확인하였다.

4. NF-kB decoy에 의한 Fibronectin, VCAM, MCP-1의 발현 억제 (Western blot)

편측성 완전 요관폐색 생쥐모델에 NF-kB decoy를 주입한 후 1, 3, 5, 7일 되는 날 신장을 적출하여 단백질 발현의 변화정도를 관찰하였다. 요관 결찰 후 시간이 경과함에 따라

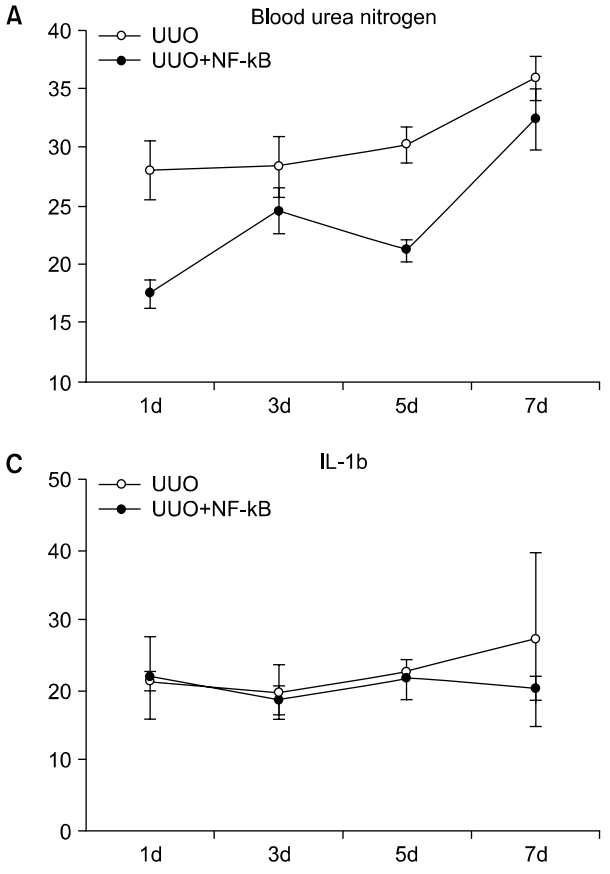

Fig. 3. Analysis of the effect of ring-type NF-kappa B (NF-kB) decoy oligodeoxynucleotide (ODN) on the function of the kidney using ELISA; showing biochemical analyses of the blood urea nitrogen (A), the serum levels of tumor necrosis factor-α (B) and interleukin-1β (C) from UUO and UUO mice treated with decoy ODN. UUO (n=12): unilateral ureteral obstruction, UUO+NF-kB (n=20): UUO mice treated with a decoy ODN injection. The UUO+NF-kB group was found to be significantly statistically different to the UUO group using the chi-square test ($p < 0.05$).

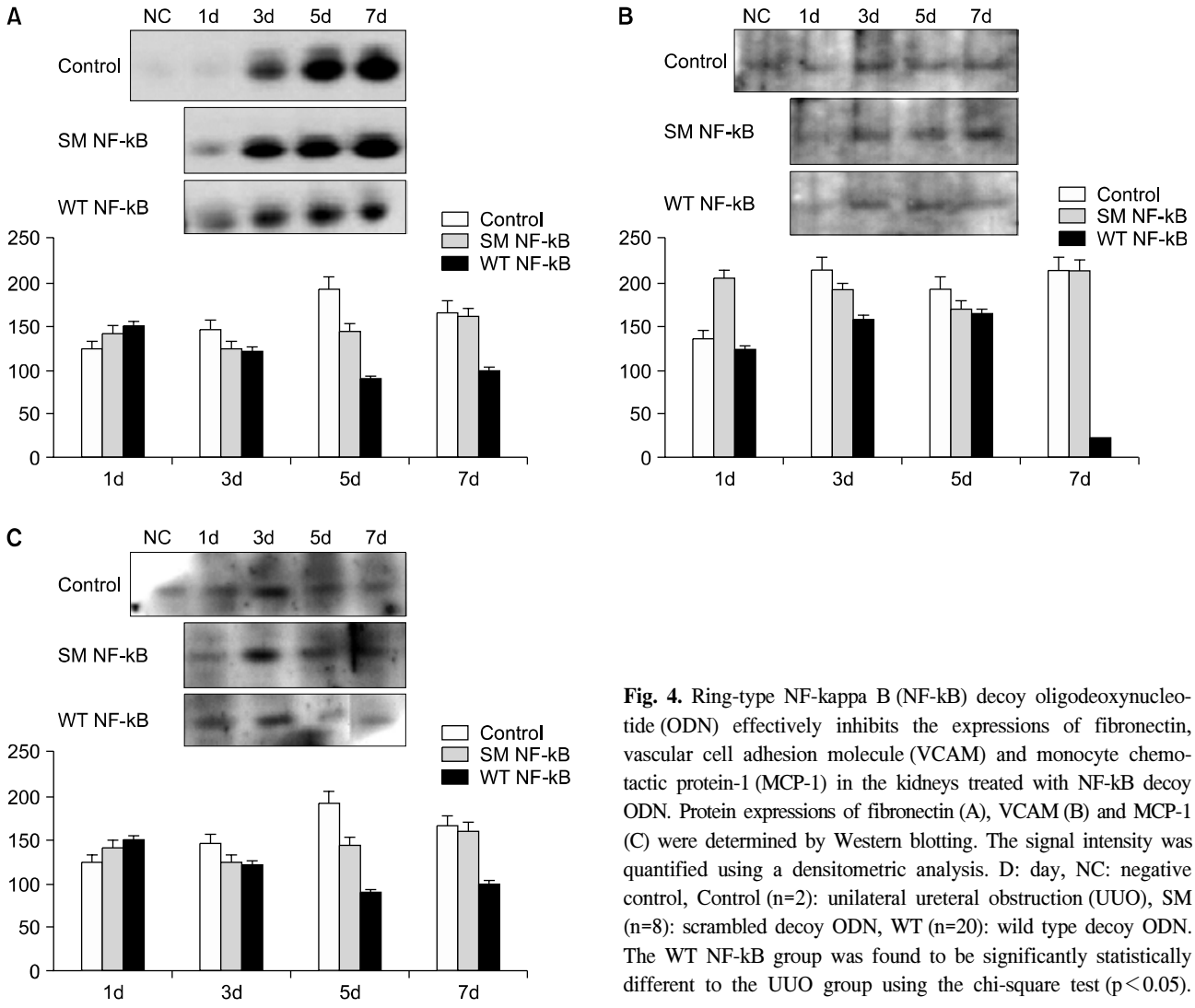

Fig. 4. Ring-type NF-kappa B (NF-kB) decoy oligodeoxynucleotide (ODN) effectively inhibits the expressions of fibronectin, vascular cell adhesion molecule (VCAM) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in the kidneys treated with NF-kB decoy ODN. Protein expressions of fibronectin (A), VCAM (B) and MCP-1 (C) were determined by Western blotting. The signal intensity was quantified using a densitometric analysis. D: day, NC: negative control, Control (n=2): unilateral ureteral obstruction (UUO), SM (n=8): scrambled decoy ODN, WT (n=20): wild type decoy ODN. The WT NF-kB group was found to be significantly statistically different to the UUO group using the chi-square test ($p < 0.05$).

Fibronectin, VCAM, MCP-1은 증가함을 확인할 수 있었고, 요관폐색군에 비하여 R-type NF-kB decoy를 주입한 생쥐에서는 Fibronectin, VCAM, MCP-1의 발현이 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 4).

5. 편측성 완전 요관폐색 생쥐모델에서 신장의 조직학적 변화

한쪽 요관을 결찰한 후 3일 째부터 적출된 신장은 세뇨관 간질 조직의 확장과 함께 단핵세포들의 침윤을 관찰할 수 있었으며 세뇨관 간질의 염증세포 침윤과 더불어 경한 세뇨관 위축 및 간질의 섬유화가 관찰되기 시작하였다 (Fig. 5). R-type decoy ODN을 투여한 실험군의 신장에서는 염증세포의 침윤정도나 섬유화 혹은 세뇨관 위축의 정도는 decoy ODN을 투여하지 않은 군에 비해서 정상대조군의 조직학적 변화와 유사하게 관찰되었다. 정량적인 분석을 거치지 않아서 대표적인 사진을 제시하였다 (Fig. 6).

6. NF-kB decoy ODN 투여 후의 면역조직화학적 염색

R-type decoy ODN 투여군에서는 decoy를 투여하지 않거나 scramble 투여군에 비해 시간이 경과할수록 TNF-α의 발현이 감소되었으며 특히 7일째 저명하게 감소되었다. 정량적인 분석을 거치지 않아서 대표적인 사진을 제시하였다 (Fig. 7-11). IL-1β, fibronectin, VCAM, monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)에서도 모두 그 발현이 감소되어 있었다. 따라서 NF-kB 전사인자는 이들 세포매개물질 모두의 발현에 관련이 있다고 보여진다.

고 찰

인체 조직에서의 섬유화는 어떤 형태의 손상 혹은 장기

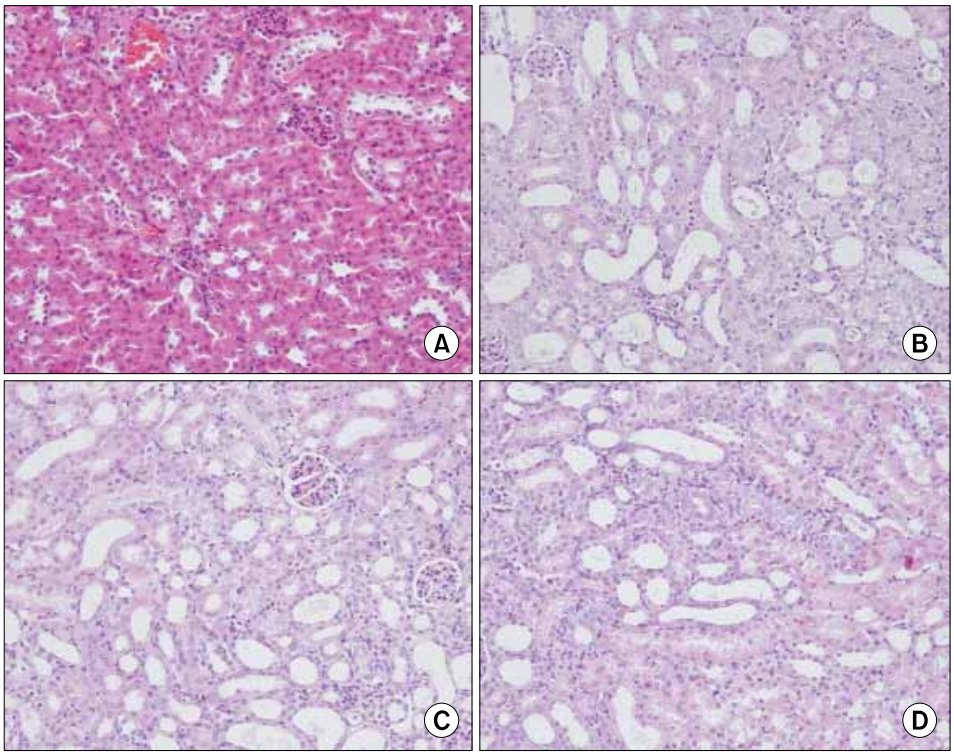

Fig. 5. The microscopic findings of the kidneys after UUO shows the infiltration of inflammatory cells and mild fibrosis, with tubular atrophy, compared with the negative control (A). The renal morphology of rats was determined using HE-staining at 3 (B), 5 (C) and 7 days (D) after the operation. UUO: unilateral ureteral obstruction.

에서 염증의 마지막 단계에서 초래될 수 있는 비가역적인 생체의 병적인 과정이다. 섬유화의 발생원인은 조직 내에 세포외기질의 침착이며 신장에서의 섬유화는 사구체, 세뇨관사이에서 주로 초래되어 점차적인 기능을 소실하게 되고 결국 말기 신부전증 (end-stage kidney)에 빠지게 된다. 섬유화 과정에는 TGF-β1, TNF-α, IFN, IL-2, -12 등의 제 1형 cytokine들과 IL-4, -5, -10, -13 등의 제 2형 cytokine들이 서로 조절기전을 통해 직접 혹은 간접적으로 관여한다.[2]

폐색성 요로병변은 흔한 비뇨기계 질환으로서 신장에서 신세뇨관의 위축과 간질의 염증성 변화, 간질의 섬유화에 이어 신실질의 감소를 가져오는 것으로 알려져 있다.[7] 신장의 편측성 요관폐색 동물모델은 섬유화 연구에 좋은 동물모델인데 이의 조직병리학적 특징은 다른 면역학적인 원인에 의한 사구체신염에서와는 달리 신사구체의 형태학적인 변화보다는 세뇨관간질조직의 섬유화와 단핵세포의 침윤을 특징으로 한다.[8,9] Morrissey 등[4]은 편측성 요관폐색 후 5일째부터 NF-kB의 증가를 보고하였고 Akira 등[10]은 편측성 요관폐색 후 7일째부터 NF-kB의 활성 및 신장 내 백혈구 침윤, 세포고사가 증가한다고 보고하였다. 본 연구에서도 요관 폐색 수술 후 3일째부터 세뇨관간질조직의 확장과 함께 단핵세포들의 침윤을 관찰할 수 있었으며 7일째 더욱 증가하는 경향을 보였다. 이러한 섬유화 과정에 중요하게 작용하는 NF-kB를 억제시키기 위한 여러 가지 연구가 시도되었다. Akira 등[10]은 편측성 요관폐색 후 dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ)를 투여하여 NF-kB의 작용을 억제시켰으며 glucocorticoids,[11] cyclosporin A, FK-50613도 NF-kB의 작용을 억제시킨다고 보고하였다. 하지만 이러한 약들은 NF-kB의 작용단계 중 어느 단계에서 영향을 미치는지 명확하지 않다.

본 연구에서 시도된 전사인자에 대한 decoy 투여방법은 전사인자의 작용을 감소시켜서 특정 유전자의 발현을 감소시키기 위한 도구로 최근 시도되고 있는 방법이다.[13-18] 유전자 치료는 유전자 발현체계를 이용해 치료 유전자를 질병부위에 전달하여 이상 유전자를 대치하거나 그 부위에 치료용 단백질을 생산케 하여 질병을 치료하는 것으로, 기존의 외과적 수술이나 화학요법이 가지고 있는 부작용을 피할 수 있다. 이론적으로 이들 전사인자의 활동을 억제하고자 하는 전략은 decoy ODN을 세포 내로 주입시키는 것을 의미하여 그것은 세포 내에서 대상되는 전사인자에 결합한다. 즉 전사인자의 DNA 결합 부위가 decoy에 의해 결합됨으로써 전사인자는 대상유전자의 프로모터에 결합할 수 없게 된다. 따라서 이 decoy의 사용은 많은 난치성 질환들에게 있어서 새로운 치료도구로서 가능성을 보여주고 있다. Bielinska 등[19]은 가장 먼저 세포 배양을 통해 그러한 decoy를 사용함으로써 전사인자의 역할을 조사하는 도구로 사용하였다. 또한 Morishita 등[20]은 쥐의 경동맥에 손상을 유발한

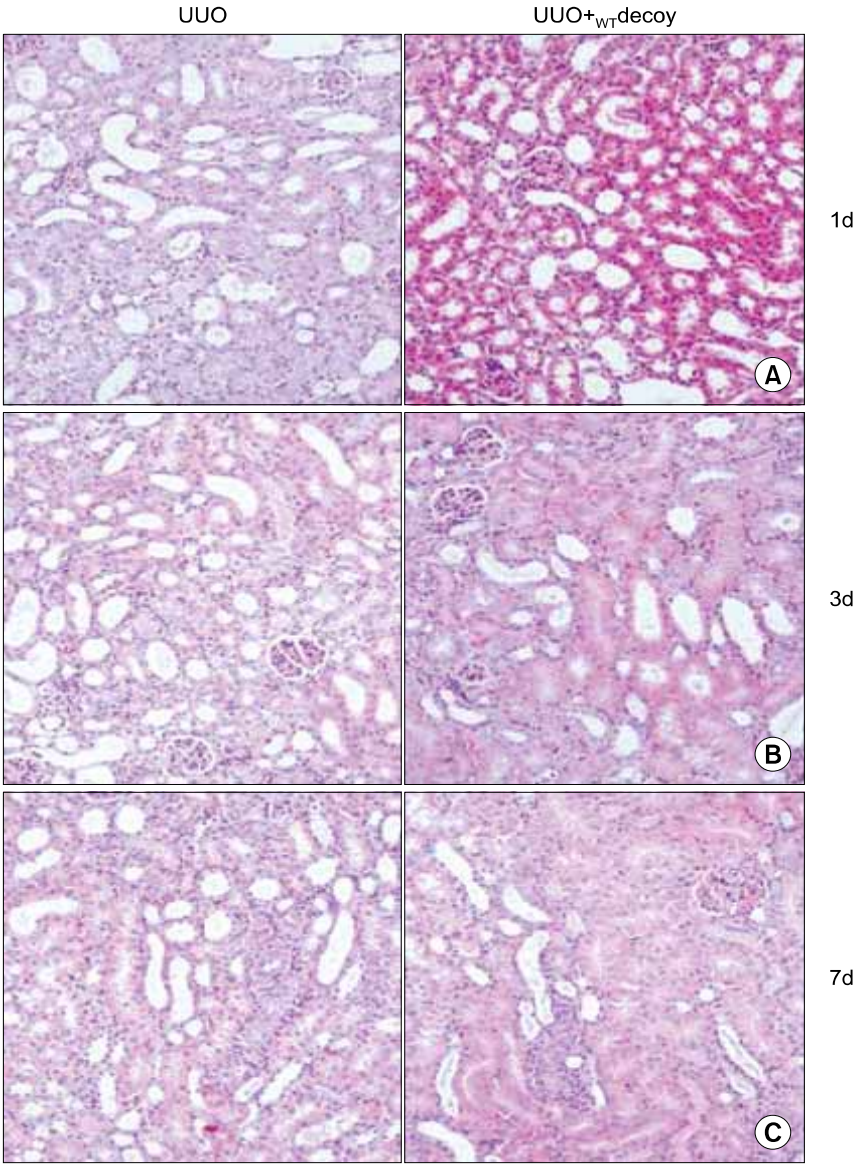

Fig. 6. Treatment with ring-type NF-kappa B (NF-kB) decoy oligodeoxynucleotide (ODN) suppresses interstitial inflammation and fibrosis. The renal morphology was determined using HE-staining at 1 (A), 3 (B) and 7 (C) days after the transfection of NF-kB decoy ODN. Left: kidney of UUO (n=12), Right: kidney of UUO treated with NF-kB decoy ODN (n=20), UUO: unilateral ureteral obstruction.

후 전사인자인 E2F에 대한 결합 부위를 가지는 ODN을 투여하였다. 비록 E2F의 6 아형 (isoform)은 세포성장에서의 역할이 서로 다른 것으로 알려져 있지만,[21] 세포주기 진행과정 상의 특정 시점에 E2F의 투여는 DNA 합성과 세포분열을 통해 다수의 유전자 발현을 증가시킨다. 그런 이론으로 E2F에 특정한 decoy를 투여함으로써 손상된 혈관에서 세포증식에 의한 혈관폐쇄를 방지하고 여기에 관여하는 유전자의 발현을 억제하였다.

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 Ap-1, E3F, cAMP-response element, Sp1 등이 시도되고 있으며,[5,14,15,22-24] 그중 구조적으로 지금까지는 PS-type이 일반적인 선형에 비해 훨씬 안정하다고 보고되고 있다.[25] 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-type NF-kB decoy ODN은 exonuclease와 FBS에 대해서 선형 NF-kB decoy에 비해 훨씬 안정성이 있는 것으로 나타났다.

본 연구에서 decoy ODN의 표적으로 삼고자하는 NF-kB는 면역과 염증반응에 관여하는 유전자의 enhancer 부위에 결합하여 그 유전자의 발현을 조절하는 인자로서, 염증성 질환의 진행과정에서 세포내 여러 다양한 신호전달과정에 중요한 역할을 하고 있다.[26,27] NF-kB에 의해 전사가 활성화

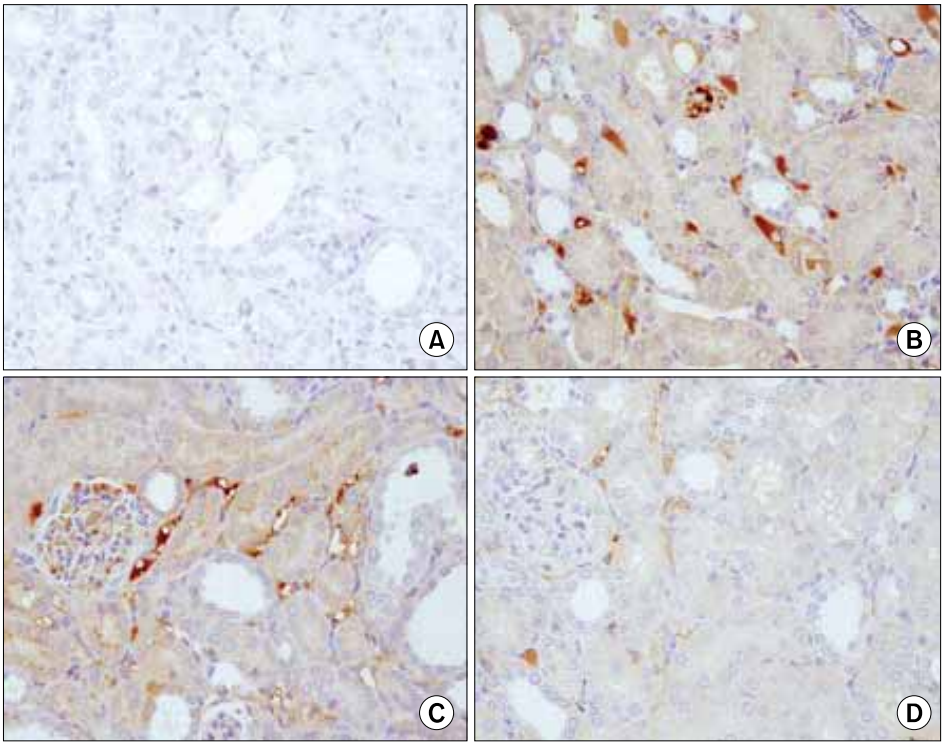

Fig. 7. Ring-type NF-kappa B (NF-kB) decoy oligodeoxynucleotide (ODN) prevents the UUO-induced expressions of NF-kB target genes 7 days after a ureteral obstruction. The kidney sections of NF-kB decoy ODN-treated rats were stained by antibodies for TNF-α. (A) Negative control (n=2), (B) kidney of UUO (n=12), (C) kidney of UUO treated with scrambled NF-kB decoy ODN (n=8), (D) kidney of UUO treated with NF-kB decoy ODN (n=20). UUO: unilateral ureteral obstruction.

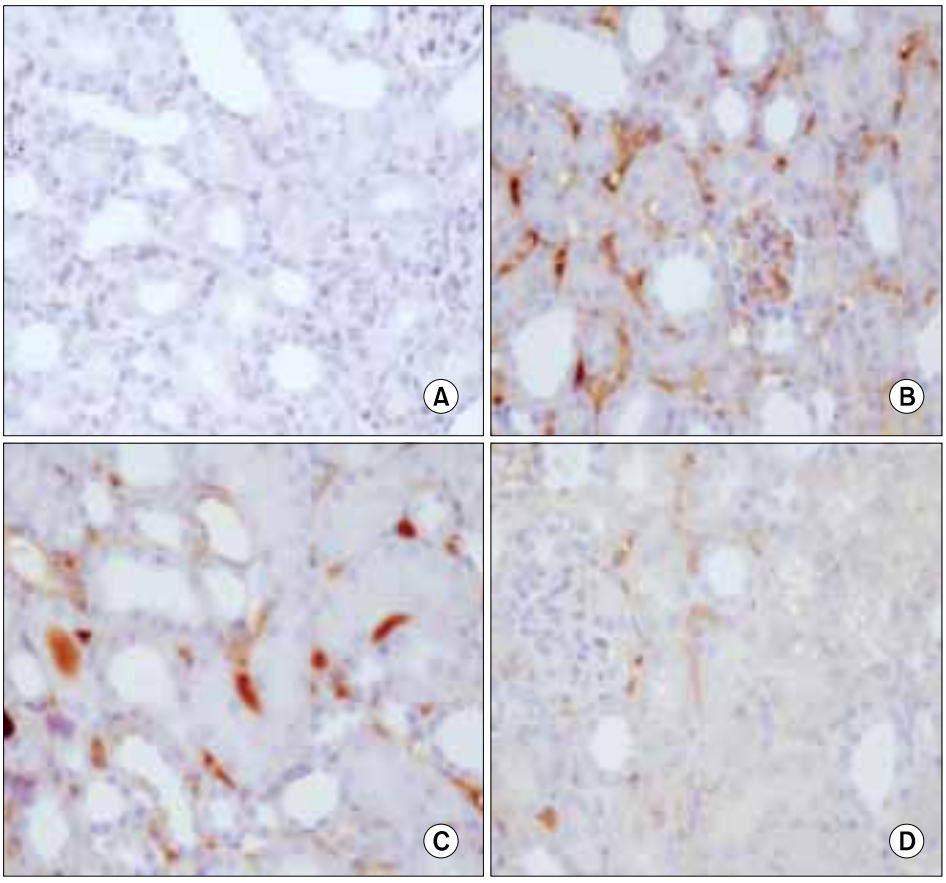

Fig. 8. Ring-type NF-kappa B (NF-kB) decoy oligodeoxynucleotide (ODN) prevents the UUO-induced expressions of NF-kB target genes 7 days after a ureteral obstruction. The kidney sections of NF-kB decoy ODN-treated rats were stained by antibodies for IL-1β. (A) Negative control (n=2), (B) kidney of UUO (n=12), (C) kidney of UUO treated with scrambled NF-kB decoy ODN (n=8), (D) kidney of UUO treated with NF-kB decoy ODN (n=20). UUO: unilateral ureteral obstruction, IL: interleukin.

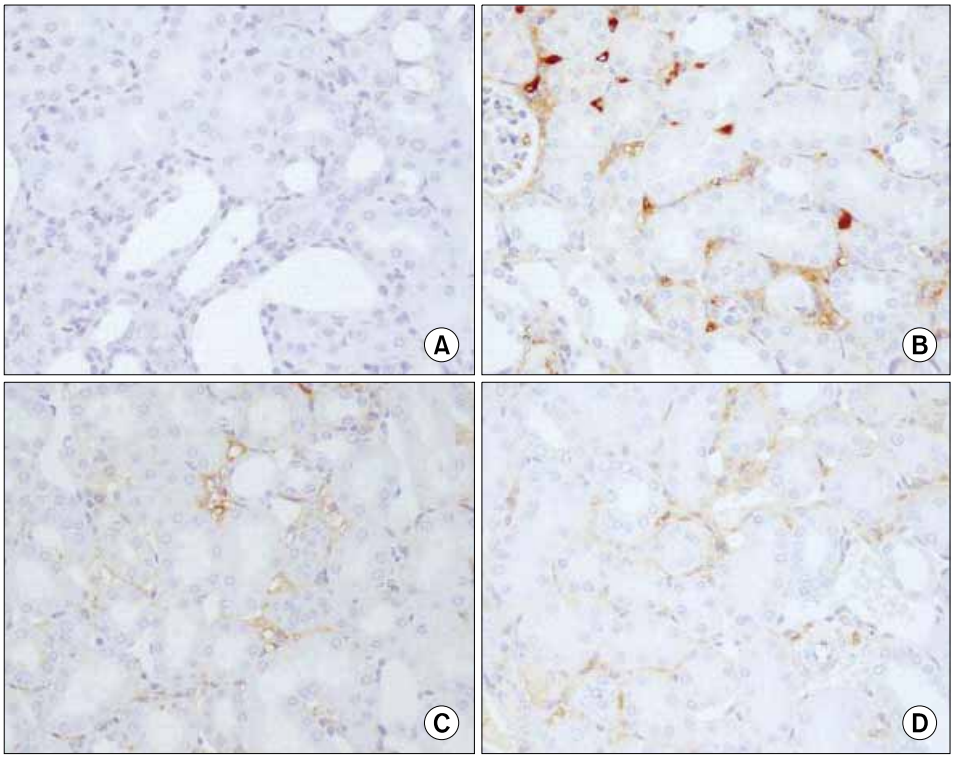

Fig. 9. Ring-type NF-kappa B (NF-kB) decoy oligodeoxynucleotide (ODN) prevents the UUO-induced expressions of NF-kB target genes 7 days after a ureteral obstruction. The kidney sections of NF-kB decoy ODN-treated rats were stained by antibodies for fibronectin. (A) Negative control (n=2), (B) kidney of UUO (n=12), (C) kidney of UUO treated with scrambled NF-kB decoy ODN (n=8), (D) kidney of UUO treated with NF-kB decoy ODN (n=20). UUO: unilateral ureteral obstruction.

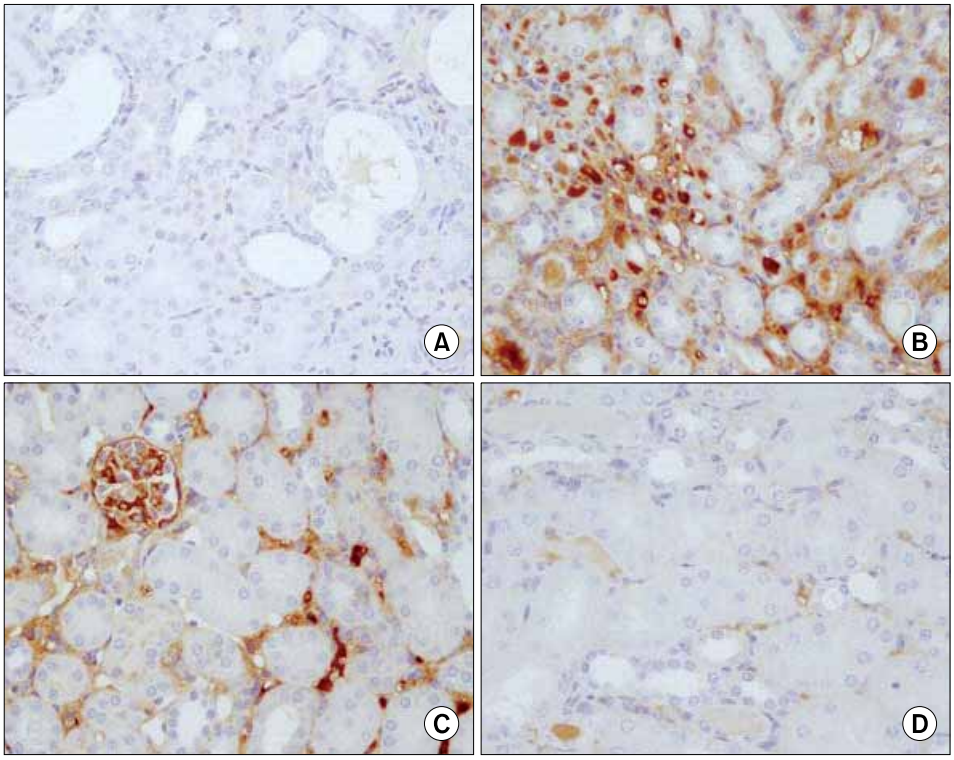

Fig. 10. Ring-type NF-kappa B (NF-kB) decoy oligodeoxynucleotide (ODN) prevents the UUO-induced expressions of NF-kB target genes 7 days after a ureteral obstruction. The kidney sections of NF-kB decoy ODN-treated rats were stained by antibodies for VCAM. (A) Negative control (n=2), (B) kidney of UUO (n=12), (C) kidney of UUO treated with scrambled NF-kB decoy ODN (n=8), (D) kidney of UUO treated with NF-kB decoy ODN (n=20). UUO: unilateral ureteral obstruction.

되는 표적유전자로는 세포내 다양한 생리적 변화에 중요한 cytokine 유전자, chemokine 유전자, 세포고착 관련 유전자, 세포사멸 조절 유전자, 및 산화관련 유전자 등이 있기 때문에 NF-kB의 비정상적인 조절은 다양한 질병을 유도하게 된다. 특히 NF-kB는 염증성 cytokine에 의한 유도성 유전자발현의 결정적인 조절인자이다. 따라서 NF-kB 조절 기전의

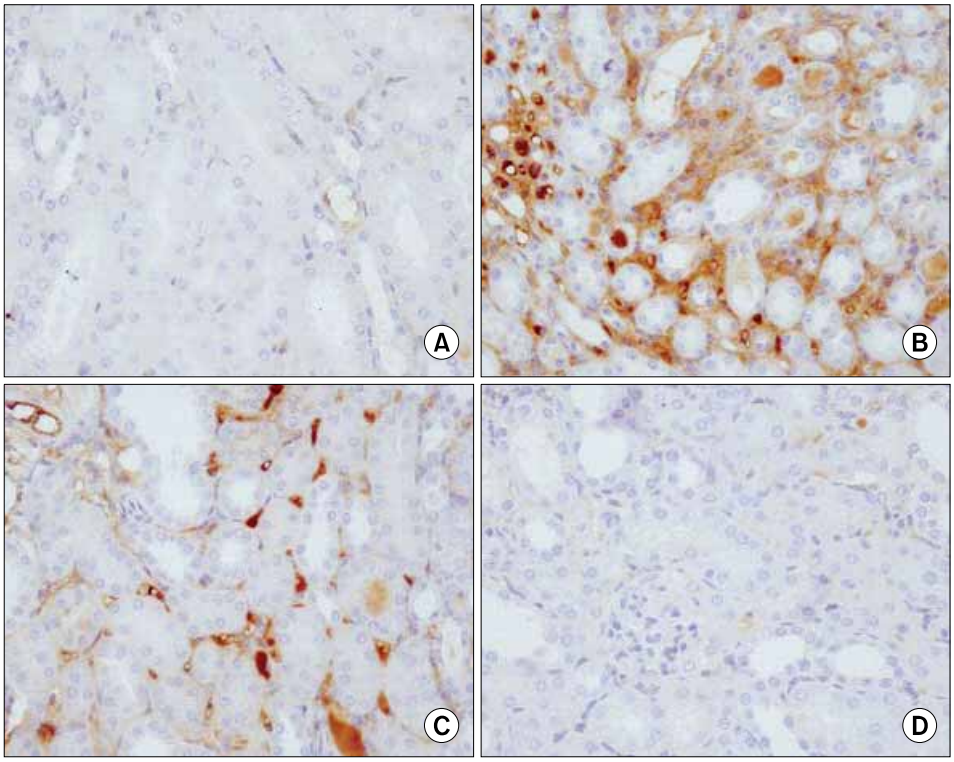

Fig. 11. Ring-type NF-kappa B (NF-kB) decoy oligodeoxynucleotide (ODN) prevents the UUO-induced expressions of NF-kB target genes 7 days after ureteral obstruction. The kidney sections of NF-kB decoy ODN-treated rats were stained by antibodies for monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1). (A) Negative control (n=2), (B) kidney of UUO (n=12), (C) kidney of UUO treated with scrambled NF-kB decoy ODN (n=8), (D) kidney of UUO treated with NF-kB decoy ODN (n=20). UUO: unilateral ureteral obstruction.

연구와 NF-kB 활성조절인자를 이용한 새로운 질병치료제 개발이 매우 중요하다.

유전자치료 방법에 있어서 유전자를 표적세포로 운반하는 방법은 매우 다양하나,[28] 대표적으로 많이 연구되는 방법은 retrovirus, adenovirus 등의 바이러스 운반계와[29] 양이온 지질분자, 고분자 등의 비바이러스 운반계이다.[30] 본 연구에서는 리포솜 매개 decoy ODN을 사용하였다.

본 연구의 결과를 요약해 보면 신장에서 한쪽 요관을 결찰하여 염증성 병변을 초래한 후 관련 세포매개 물질들로 추측되는 IL-1, TNF-α, fibronectin, MCP-1, VCAM 들을 관찰한 결과 이들 모두가 발현이 증가되었다. 또한 초기 염증과정에 관련이 있을 것으로 생각되는 NF-kB를 대상으로 핵산분해효소에 안정한 R-type NF-kB decoy ODN을 제작하여, 흰쥐의 꼬리 정맥으로 주입한 후 조직학적 및 분자생물학적인 방법으로 관찰하였다. 그 결과 이들 모두에서 조직학적으로는 염증 및 섬유화의 정도가 감소하였으며, 위의 세포매개물질들의 발현이 모두 감소하였다. 따라서 NF-kB는 초기 염증성 병변의 과정에서 광범위하게 관련 세포매개물질들에 대한 발현을 조절한다고 생각된다. 그들 상호관련성에 대한 연구는 추후 더욱 연구되어야 할 것으로 생각한다.

결 론

신장에서 한쪽 요관을 결찰하여 염증성 병변을 초래한 후 관련 세포매개 물질들을 관찰한 결과 이들 모두의 발현이 증가되었다. 초기 염증과정에 관련이 있을 것으로 생각되는 NF-kB를 대상으로 R-type NF-kB decoy ODN을 제작하여, 흰쥐의 꼬리 정맥으로 주입하였을 때 염증 및 섬유화의 정도가 감소하였으며, 세포매개물질들의 발현이 모두 감소하였다. 이는 NF-kB가 초기 염증성 병변에서 관련 세포매개물질들에 대한 발현을 조절하는 것을 보여주는 것이며 그들 상호관련성에 대한 연구는 추후 더 연구되어야 할 것으로 생각한다. 본 연구를 통해 전사인자 NF-kB 작용을 억제하기 위해 제작된 구형의 decoy ODN은 향후 신장의 염증성 병변 진행방지를 위한 연구에 좋은 모델이 될 수 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Cao CC, Ding XQ, Ou ZL, Liu CF, Li P, Wang L, et al. In vivo transfection of NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats. Kidney Int 2004;65:834-45
2. Guijarro C, Egido J. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. Kidney Int 2001;59:415-24
3. Lee JI, Burckart GJ. Nuclear factor kappa (B) important transcription factor and therapeutic target. J Clin Pharmacol 1998;38:981-93
4. Morrissey J, Klahr S. Transcription factor NF-kappaB regula-

tion of renal fibrosis during ureteral obstruction. Semin Nephrol 1998;18:603-11
5. Park DM, Sohn DG, Han KH, Lee SY, Chae YM, Chang YC, et al. The effect of the transcriptional regulation of Sp1 for TGF-beta1 and CTGF expression in scar formation. J Korean Soc Plast Reconstr Surg 2006;33:39-45
6. Mann MJ, Dzau VJ. Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides. J Clin Invest 2000;106:1071-5
7. Kim HG, Kwak C, Kim HH, Paick SH, Lho YS, Lee JW, et al. The serial microscopic changes of cell proliferative and apoptotic phenomenon in obstructed ureters in the rat. Korean J Urol 2005;46:495-501
8. Isaka Y, Tsujie M, Ando Y, Nakamura H, Kaneda Y, Imai E, et al. Transforming growth factor-β1 antisense oligodeoxynucleotides block interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction. Kidney Int 2000;58:1885-92
9. Eddy AA. Experimental insights into the tubulointerstitial disease accompanying primary glomerular lesions. J Am Soc Nephrol 1994;5:1273-87
10. Akira M, Takeo K, Kaori S, Tomohiko A, Kazuo U, Masamichi H. Novel nuclear factor kB activation inhibitor prevents inflammatory injury in unilateral ureteral obstruction. J Urol 2003;169:1559-63
11. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. Science 1995;270:286
12. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. J Clin Invest 2001;107:135
13. Yamashita J, Yoshimasa T, Arai H, Hiraoka J, Tayaya K, Miyamoto Y, et al. Identification of cis-elements of the human endothelin-A receptor gene and inhibition of the gene expression by the decoy strategy. J Biol Chem 1998;273:15993-9
14. Suzuki J, Morishita R, Amano J, Kaneda Y, Isobe M. Decoy against nuclear factor-kappa B attenuates myocardial cell infiltration and arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. Gene Ther 2000;7:1847-52
15. 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 2001;116:755-63
16. Chae YM, Park KK, Lee IK, Kim JK, Kim CH, Chang YC. Ring-Sp1 decoy oligonucleotide effectively suppresses extracellular matrix gene expression and fibrosis of rat kidney induced by unilateral ureteral obstruction. Gene Ther 2006;13:430-9
17. Ahn JD, Morishita R, Kaneda Y, Kim HJ, Kim YD, Lee HJ, et al. Transcription factor decoy for AP-1 reduces mesangial cell proliferation and extracellular matrix production in vitro and in vivo. Gene Ther 2004;11:916-23
18. Chae YM, Park KK, Magae J, Lee IS, Kim CH, Kim HC, et al. Sp1-decoy oligodeoxynucleotide inhibits high glucose-induced mesangial cell proliferation. Biochem Biophys Res Commun 2004;319:550-5
19. Bielinska A, Shivdasani RA, Zhang LQ, Nabel GJ. Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides. Science 1990;250:997-1000
20. Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, Ellison KE, Nakama M, Zhang L, et al. A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation in vivo. Proc Natl Acad Sci 1995;92:5855-9
21. Gaubatz S, Wood JG, Livingston DM. Unusual proliferation arrest and transcriptional control properties of a newly discovered E2F family member, E2F-6. Proc Natl Acad Sci 1998;95:9190-5
22. Cho-Chung YS, Park YG, Nesterova M, Lee YN, Cho YS. CRE-decoy oligonucleotide-inhibition of gene expression and tumor growth. Mol Cell Biochem 2000;212:29-34
23. Ishibashi H, Nakagawa K, Onimaru M, Castellanous EJ, Kaneda Y, Nakashima Y, et al. 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 2000;60:6531-6
24. Kawauchi M, Suzuki J, Morishita R, Wada Y, Izawa A, Tomita N, et al. 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 2000;87:1063-8
25. Khaled AR, Butfiloski EJ, Sobel ES, Schiffenbauer J. Use of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides to inhibit NF-kB expression and lymphocyte function. Clin Immunol Immunopathol 1998;86:170-9
26. Tomita N, Morishita R, Tomita S, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T, et al. Inhibition of TNF-α, induced cytokine and adhesion molecule. Expression in glomerular cells in vitro and in vivo by transcription factor decoy for NF-kB. Exp Nephrol 2001;9:181-90
27. Tomita N, Morishita R, Tomita S, Gibbons GH, Zhang L, Horiuchi M, et al. Transcription factor decoy for NF-kB inhibits TNF-α-induced cytokine and adhesion molecule expression in vivo. Gene Ther 2000;7:1326-32
28. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. Science 1995; 270:475-80
29. Imai E, Akagi Y, Isaka Y. Towards gene therapy for renal diseases. Nephrologie 1998;19:397-402
30. 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