

INTRA-PERITONEAL NF- κ B DECOY OLIGODEOXYNUCLEOTIDE DECREASES POSTOPERATIVE INTRA-ABDOMINAL ADHESION

Byul Nim Ahn, MD¹, Mi Hyun Song, MD¹, Ju Hyun Kim, MD¹, Kyung-Hyun Kim, PhD², Kwan-Kyu Park, MD², Youn Seok Choi, MD¹

Departments of ¹Obstetrics and Gynecology, ²Pathology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu, Korea

Objective

The objective of this study was to evaluate the effect of intra-peritoneal nuclear factor κ B (NF- κ B) decoy oligodeoxynucleotide on the prevention of postoperative intra-abdominal adhesion.

Methods

Forty female BALB/c mice were randomly assigned into 2 groups. The mice were anesthetized and then midline abdominal incision was made. Peritoneal injury was given using cytobrush until deperitonealization. The experimental group (n=20) received NF- κ B decoy oligodeoxynucleotide (NF- κ B decoy ODN) in the peritoneal cavity before abdominal closure, while the control group (n=20) received saline. At 2 weeks postoperation, after the mice were euthanized, the status of intra-abdominal adhesion was evaluated. The degrees of adhesion were graded into no (grade 0), mild (grade 1), moderate (grade 2), and severe adhesion (grade 3).

Results

Two mice in the experimental group and 3 mice in the control group were dead within 1 day postoperation. In the control group, 2, 2, and 13 mice showed mild, moderate, and severe adhesion, respectively. In the experimental group, 4 mice showed no adhesion, whereas, 6 and 8 mice showed mild and moderate adhesion, respectively. The difference of degrees of adhesion between the groups was statistically significant ($P<0.001$).

Conclusion

Intra-peritoneal NF- κ B decoy ODN reduced the severity of postoperative intra-abdominal adhesion.

Keywords: Adhesion; Inflammation; NF-kappa B; NF-kappa B decoy oligodeoxynucleotide

이전에 복강내 수술을 받았던 환자의 67%에서 복강내 유착이 발생하며[1], 개복수술 후 1년 이내에 1%의 환자에서 유착과 연관된 장 폐쇄를 경험하게 된다고 한다[2]. 소장 폐쇄로 인하여 수술을 받은 환자를 대상으로 한 연구결과에 따르면, 소장 폐쇄의 37%는 복강내 유착에 의한 것이며, 여성 환자의 경우는 유착의 원인 중 38%는 이전에 개복술을 통한 자궁절제술을 받았던 환자였다고 한다[3].

이러한 수술 후 복강내 유착을 줄이기 위하여 현재 임상에서 사용되는 유착 방지제로는 hyaluronic acid, Dextran-70, hyaluronic acid and carboxymethylcellulose, hydrogel, fibrin sealant, oxidized regenerated cellulose, expanded polytetrafluoroethylene 등이 있다[4,5]. 그러나 이러한 유착 방지제의 효과는 제재에 따라 결과에 차이가 있고, 효과가 입증된 경우에서도 유착의 중증도는 감소시키지만 유착의 발생빈도를 줄이지 못한다는 보고도 있고[6,7], 아예 효과가 없다는 보고도 있어서 유착 방지 효과가 아직은 확실하지 않아 보인다[5,8-17].

유착이 발생하는 기전으로 염증 반응이 연관되어 있고[18], 염증 반응에 비례하여 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현이 증가하기 때문

Received: 2011.11.1. Revised: 2011.12.27. Accepted: 2012.2.6.

Corresponding author: Youn Seok Choi, MD

Department of Obstetrics and Gynecology, Catholic University of Daegu School of Medicine, 33 Duryugongwon-ro 17-gil, Nam-gu, Daegu 705-718, Korea

Tel: +82-53-650-4087 Fax: +82-53-650-4078

E-mail: drcys@cu.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2012. Korean Society of Obstetrics and Gynecology

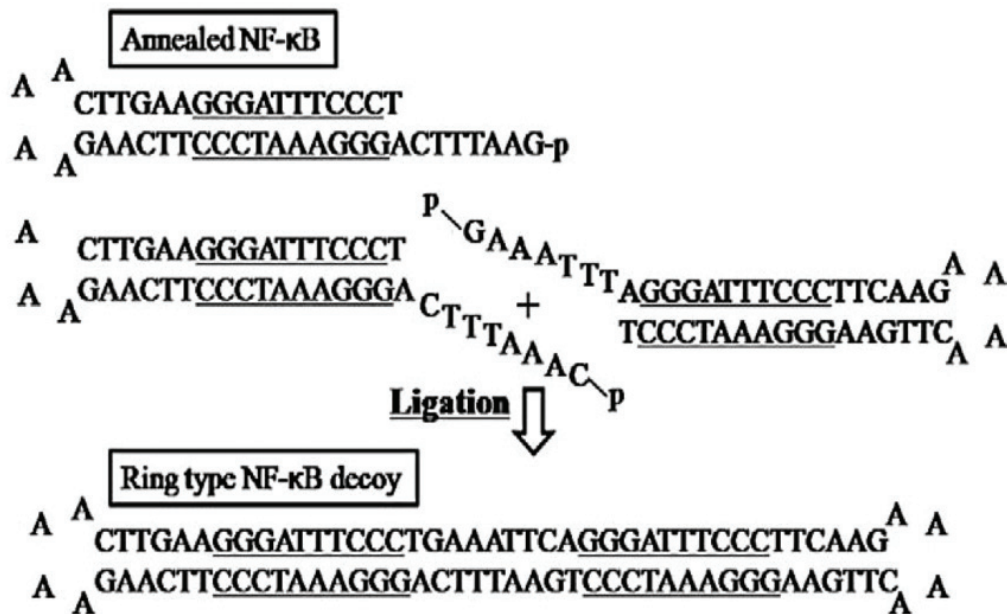


Fig. 1. Structure of ring type-nuclear factor -κB (NF-κB) decoy oligodeoxynucleotide (From Kim et al. [23] with permission from Elsevier).

에 염증 반응을 차단하여 수술 후 유착을 줄일 수 있을 것이라는 실험 결과들이 보고되었다[19-21]. 이러한 염증과 연관된 유전자의 전사(transcription)를 조절하는 가장 중요한 단백질 복합체는 nuclear factor κB (NF-κB)이며, 세포가 스트레스, 방사선, 시토카인(cytokine)과 같은 자극이 오면, NF-κB가 염증에 관여하는 DNA에 결합하여 전사를 활성화 시키게 된다. NF-κB decoy oligodeoxynucleotide (NF-κB decoy ODN)는 염증에 관여하는 유전자 대신 NF-κB와 결합하여, NF-κB에 의한 염증 유전자 활성화를 효과적으로 억제할 수 있다[22]. NF-κB를 차단하면 tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1β 등의 염증성 시토카인의 생성을 억제시킬 수 있을 뿐만 아니라, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM -1) 등과 같은 세포부착분자(cell adhesion molecules)의 생성 또한 억제시킬 수 있다[22,23].

본 연구는 이러한 배경을 토대로 ring type NF-κB decoy ODN를 이용하여 NF-κB의 작용을 차단함으로써 수술 후 유착 발생을 억제할 수 있는지를 알아보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. NF-κB decoy oligodeoxynucleotide 제작

양끝이 고리 모양으로 된 ring type NF-κB decoy ODN을 이전에 기술한 방법과 같이 제작하였으며, 염기 배열은 5'-GAAATTCAGG GAAATCCCTCAAGAAAACCTTG AAGGGATTTCCTT-3'로(밑줄 부분은 공통 배열[consensus sequence]이며, NF-κB 단백질과 결합하게 된다.) 제작하였다[22,23]. 간단히 다시 서술하면, 상기한 염기 배열의 ODN을 2시간 동안 80°C에서 25°C로 온도를 순차적으로 내리면서

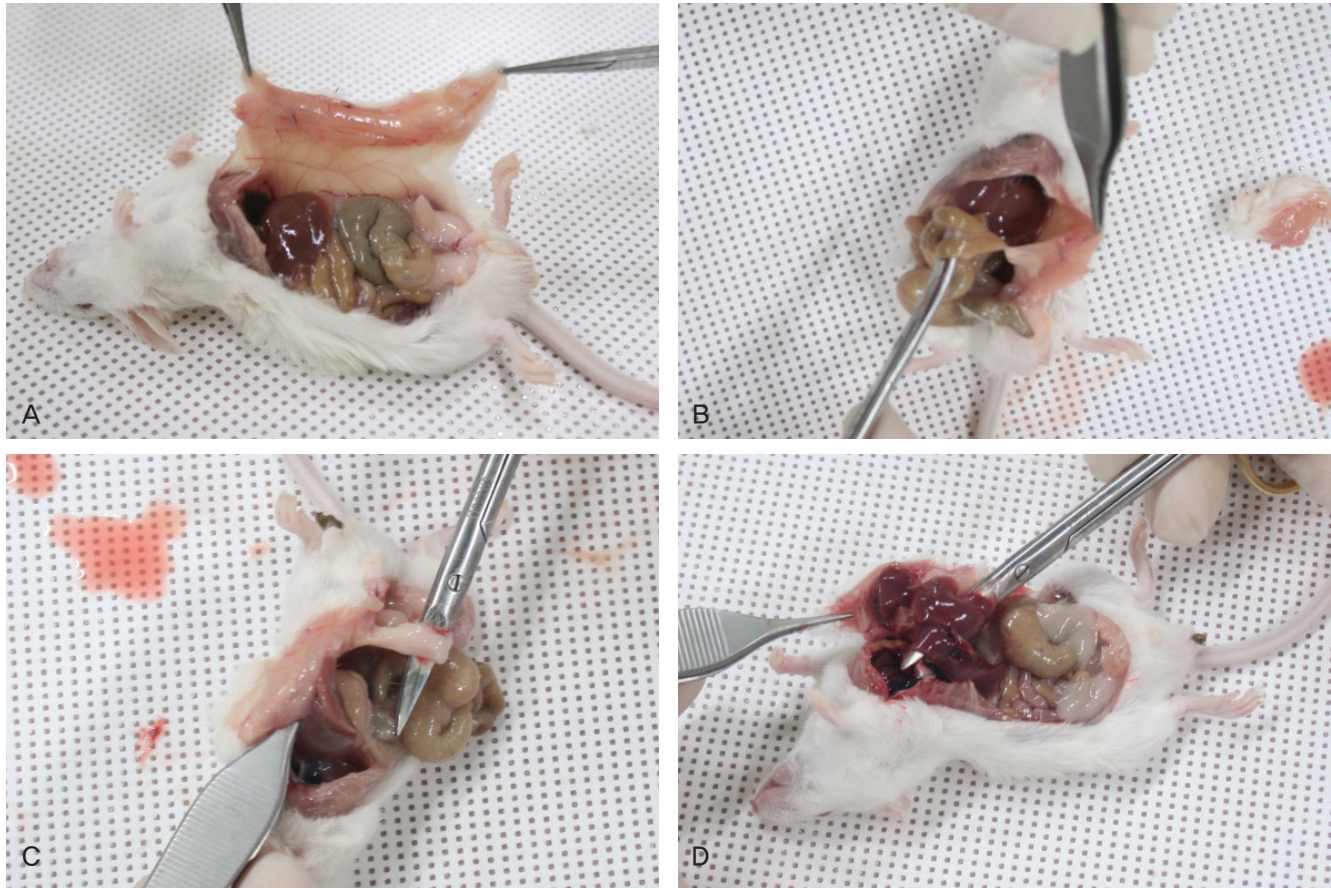
annealing 시킨 다음, T4 ligase (1U)를 첨가하여 16°C에서 18시간 동안 배양(incubation)하여 결합(ligation)시키면, 두 개의 ODN이 양끝이 고리 모양으로 된 머핀 구조(stem and loop structure)가 되어 ring type NF-κB decoy ODN이 만들어지게 된다(Fig. 1).

2. 동물 모델

생후 8주 정도의 암컷 BALB/c 생쥐를 이용하였으며 쥐의 몸무게는 약 20 g 전후의 것을 사용하였다. 대조군과 NF-κB decoy ODN 사용 군에(NF군) 각 20마리씩 배정하였다. 마취는 ketamine (100 mg/kg)과 xylazine (10 mg/kg)을 혼합하여 복강내 주사하여 시행하였다. 마취가 완료된 후 복벽을 검상돌기(xyphoid process)에서 치골(pubic area) 상부까지 정중앙 절개로 개복하고, cytobrush를 이용하여 양측 전 복벽(anterior abdominal wall)을 수차례 문질러서 복막이 벗겨지고 복부 근육이 노출될 때까지 복벽에 상처를 만들었다. 벗겨내는 복벽의 범위는 양측 복막 전체를 벗겨내는 것으로 실험군과 대조군 모두 동일한 조건이 되도록 하였다. 또한 모든 쥐에서 최대한 유사한 정도의 상처가 생길 수 있도록 한 명의 연구자가 시행하였다. 대조군은 상처를 만든 후 생리 식염수 500 μL를 복강내에 채우고 Nylon 4-0를 이용하여 연속 봉합술(continuous running suture)로 복부를 봉합하였다. NF군은 상기한 방법으로 제작된 ring type NF-κB decoy ODN을 Trans IT *in vivo* delivery solution (Mirus, Madison, WI, USA)을 이용하여 마리당 10 μg씩 500 μL로 복강내에 투여한 후 대조군과 같은 방법으로 복부를 봉합하였다. 본 연구는 대구가톨릭대학교부속의료원 윤리위원회(The Institutional Review Board of Daegu Catholic University Medical Center)의 승인을 얻었으며, 모든 실험 윤리 규정을 준수하였다.

Table 1. Adhesion score and vascularity grade description (From Yoldemir et al. [24] with permission from Elsevier)

Grade	Thickness-tenacity	Vascularity
0	No adhesion	No
1	Filmy, easily separable	No bleeding
2	Moderate, thick, moderate tension required	Petechial bleeding
3	Severe, cohesive, sharp dissection required	Bleeding that required suture

**Fig. 2.** The representatives of the each grade of intra-abdominal adhesion severity. (A) No adhesion (grade 0). (B) Mild adhesion (grade 1). (C) Moderate adhesion (grade 2). (D) Severe adhesion (grade 3).

3. 유착 판정

수술 후 2주째 되는 날 쥐를 안락사시키고, 복부를 ‘c’ 자 모양으로 개복하여 복막과 내장의 유착 정도를 판정하였다. 유착 정도의 등급 판정 방법은 Yoldemir 등[24]이 제안한 방법을 이용하였다(Table 1). 각 유착 정도를 보여주는 대표적인 예의 사진은 Fig. 2에 나타내었다.

4. 통계 방법

SPSS ver. 13 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였으며, 양 군의 유착 정도의 분포의 차이를 평가하기 위하여 chi-square test를 사용하였다. 양측성 검증을 사용하였고 P -value 0.05 미만을 통

계적으로 유의한 차이를 보이는 것으로 판정하였다.

결 과

수술 후 1일 이내에 대조군의 3마리 쥐가 사망하였고, 실험군의 2마리 쥐가 사망하였다. 사망의 원인은 마취약과 연관된 사망이거나, 수술 시 사용된 소독제의 증발로 인한 저체온증 때문일 것으로 추정된다.

수술 후 2주 뒤에 생존한 쥐를 개복하여 상기한 방법에 따라 유착의 정도를 평가하였고, Table 1에서 보여주는 것과 같이 NF군에서는 유착

Table 2. Grade of adhesion

Grade of adhesion	Control group (n = 17)	NF group (n = 18)	P-value ^a
Grade 0	0	4	<0.001
Grade 1	2	6	
Grade 2	2	8	
Grade 3	13	0	

NF group, the group treated with intra-peritoneal NF- κ B decoy oligodeoxynucleotide.

^aChi-square test.

의 정도가 통계적으로 유의하게 차이를 보였다. 특히 grade 3의 심한 유착은 NF군에서는 관찰되지 않았다(Table 2).

고 찰

유착의 기전은 아직 잘 알려져 있지 않지만, transforming growth factor- β 의 활성화와 metalloproteinase 활성이 연관되는 염증 반응에 의하여 세포부착분자와 섬유소(fibrin)가 형성되어 유착이 발생하려는 기전과, plasminogen과 plasminogen activator의 활성을 통한 섬유소 분해(fibrinolysis) 기전의 상호작용의 결과에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다[18]. 유착 형성의 초기 반응은 대식세포에 의해 유발되며, T 세포를 통한 후천성 면역 반응(adaptive immune response)도 연관된다고 한다[21]. 이러한 염증 반응은 상처가 나면 치유를 위하여 동반되는 과정이며, 이 과정에서 섬유 형성(fibrosis)으로 인하여 원하지 않는 장기끼리의 유착이 발생할 수 있다.

현재 시판되고 있는 유착 방지제들은 물리적 장벽(mechanical barrier)의 역할을 하는 것들이며 염증 반응을 억제시키는 기능을 가지고 있지는 않다. 유착 억제 효과가 입증된 연구 결과에서도 완벽하게 유착을 방지하는 제제는 없으며[5,9,11-17], 또한 일부 연구결과는 유착을 억제하는 효과가 없거나[8,10], 유착의 정도는 감소시키지만 유착의 빈도는 유사하다는 보고도 있어서[6,7], 유착 발생을 좀 더 효과적으로 차단할 수 있는 제형의 개발이 필요한 상황이다.

Guvenal 등[19]은 쥐모델을 이용하여 COX-2 억제제의 일종인 nimesulide를 수술 전에 근육 주사하거나, 수술 후 복강내 주입하는 것으로 복강내 유착을 줄일 수 있다고 보고하였다. 또한 인체 조직을 이용한 연구에서도 정상 복막 조직과 비교했을 때, 같은 환자의 복강내 유착부위에서 추출한 섬유아세포(fibroblast)에서는 COX-2 mRNA의 발현이 증가되어 있고 COX-2 단백질의 발현이 증가되어 있기 때문에, COX-2를 차단하는 방법으로 인체 내에서도 유착을 방지할 수 있을 것으로 판단된다[20]. 이러한 COX-2의 선택적인 억제제가 아니더라도, 아스피린이나 ibuprofen과 같은 비스테로이드성 소염제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 또한 수술 후 유착 발생 감소에 효과가 있는 것으로 보고되고 있기 때문에, 유착 발생에 염증 반응이 밀

접한 관계를 가지고 있다고 볼 수 있다[25-27].

염증 반응에서 세포가 시토카인 자극에 대한 염증 반응을 일으키기 위해서는 NF- κ B가 염증 유발 유전자에 결합하여 유전자 전사를 활성화 시켜야 한다. NF- κ B decoy ODN을 주입하면 NF- κ B promoter region의 cis-regulatory element에 결합되어, NF- κ B에 의한 염증 유발 유전자의 활성화를 차단하게 된다[23]. 본 연구에서 ring type NF- κ B decoy ODN을 사용한 이유는 NF- κ B decoy ODN을 이중 가닥의 DNA 형태로 사용하면 nucleotidase에 의해 쉽게 파괴되는 반면, 상기한 방법과 같이 양끝을 고리 모양으로 제작하면 생체 내 안정성이 향상되어 그 효과를 더 향상시킬 수 있기 때문이다[22,23]. Kim 등[22,23]의 연구 결과에 따르면 NF- κ B decoy ODN을 투여하면 TNF- α , IL-1 β 등의 시토카인의 생성을 억제시켜 염증 반응을 억제시키고, 그와 더불어 세포부착분자의 생성 또한 억제시키게 된다. 본 연구 결과에서 확인한 바와 같이 NF- κ B decoy ODN을 복강내에 사용하면 복강내 유착 형성이 현격하게 완화되며, 이는 유착 형성이 염증 반응과 밀접한 관계가 있다는 것을 시사하고, 또한 NF- κ B decoy ODN에 의한 세포부착분자의 감소도 유착 형성을 억제하는 데 관여할 것으로 추정된다.

그러나, 염증 반응을 억제하는 방법에 있어서 NSAIDs와 같이 COX-1과 COX-2를 같이 억제하는 방법, selective COX-2 inhibitor, 그리고 본 연구와 같이 NF- κ B의 기능을 억제하는 방법의 효과와 부작용의 차이는 아직 알 수 없다. 또한 복강내 국소도포하는 방법과 근육 주사나 정맥 주사와 같은 전신 투여 중에 어느 방법이 더 좋은지에 대해서도 아직 알 수 없는 상황이다. 국소도포가 효과적이라면, 기존의 물리적 장벽 역할을 하는 제제와 같이 사용하였을 때 더 좋은 효과를 가지는데에 대한 연구도 필요할 것이다.

또한 본 연구의 한계점은 NF- κ B를 차단하면 TNF- α , IL-1 β 등의 염증성 시토카인의 생성을 억제시킬 수 있을 뿐만 아니라, VCAM-1, ICAM-1 등과 같은 세포부착분자(cell adhesion molecules)의 생성 또한 억제시킬 수 있음을 기존 연구에서 보여주었지만[22,23], 이러한 기전이 반드시 유착 발생의 직접적인 원인이었는지에 대한 복강내 조직의 염증성 시토카인 농도 측정 등의 구체적인 실험이 이루어지지 않았다는 것이다.

본 연구결과는 수술 후 복강내에 ring type NF- κ B ODN을 도포하는 방법은 수술 후 유착 발생을 억제할 수 있음을 보여준다.

References

- Weibel MA, Majno G. Peritoneal adhesions and their relation to abdominal surgery. A postmortem study. Am J Surg 1973;126:345-53.
- Menzies D, Ellis H. Intestinal obstruction from adhesions: how big is the problem? Ann R Coll Surg Engl 1990;72:60-3.
- Al-Took S, Platt R, Tulandi T. Adhesion-related small-bowel obstruction after gynecologic operations. Am J Obstet Gynecol

- 1999;180:313-5.
4. Al-Jaroudi D, Tulandi T. Adhesion prevention in gynecologic surgery. *Obstet Gynecol Surv* 2004;59:360-7.
 5. Tulandi T. Effects of fibrin sealant on tubal anastomosis and adhesion formation. *Fertil Steril* 1991;56:136-8.
 6. Zeng Q, Yu Z, You J, Zhang Q. Efficacy and safety of Seprafilm for preventing postoperative abdominal adhesion: systematic review and meta-analysis. *World J Surg* 2007;31:2125-31.
 7. Vrijland WW, Tseng LN, Eijkman HJ, Hop WC, Jakimowicz JJ, Leguit P, et al. Fewer intraperitoneal adhesions with use of hyaluronic acid-carboxymethylcellulose membrane: a randomized clinical trial. *Ann Surg* 2002;235:193-9.
 8. Kayaoglu HA, Ozkan N, Hazinedaroglu SM, Ersoy OF, Koseoglu RD. An assessment of the effects of two types of bioresorbable barriers to prevent postoperative intra-abdominal adhesions in rats. *Surg Today* 2005;35:946-50.
 9. Diamond MP. Reduction of de novo postsurgical adhesions by intraoperative precoating with Sepracoat (HAL-C) solution: a prospective, randomized, blinded, placebo-controlled multicenter study. The Sepracoat Adhesion Study Group. *Fertil Steril* 1998;69:1067-74.
 10. Friedman H, Stonerock C, Lefavre J, Yost M. The effect of seprafilm and interceed on capsule formation around silicone discs in a rat model. *J Invest Surg* 2004;17:271-81.
 11. Keckstein J, Ulrich U, Sasse V, Roth A, Tuttlies F, Karageorgieva E. Reduction of postoperative adhesion formation after laparoscopic ovarian cystectomy. *Hum Reprod* 1996;11:579-82.
 12. Takeuchi H, Awaji M, Hashimoto M, Nakano Y, Mitsunashi N, Kuwabara Y. Reduction of adhesions with fibrin glue after laparoscopic excision of large ovarian endometriomas. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 1996;3:575-9.
 13. Sekiba K. Use of Interceed(TC7) absorbable adhesion barrier to reduce postoperative adhesion reformation in infertility and endometriosis surgery. The Obstetrics and Gynecology Adhesion Prevention Committee. *Obstet Gynecol* 1992;79:518-22.
 14. The efficacy of Interceed(TC7)* for prevention of reformation of postoperative adhesions on ovaries, fallopian tubes, and fimbriae in microsurgical operations for fertility: a multicenter study. Nordic Adhesion Prevention Study Group. *Fertil Steril* 1995;63:709-14.
 15. An expanded polytetrafluoroethylene barrier (Gore-Tex Surgical Membrane) reduces post-myomectomy adhesion formation. The Myomectomy Adhesion Multicenter Study Group. *Fertil Steril* 1995;63:491-3.
 16. Haney AF, Hesla J, Hurst BS, Kettel LM, Murphy AA, Rock JA, et al. Expanded polytetrafluoroethylene (Gore-Tex Surgical Membrane) is superior to oxidized regenerated cellulose (Interceed TC7+) in preventing adhesions. *Fertil Steril* 1995;63:1021-6.
 17. Diamond MP. Reduction of adhesions after uterine myomectomy by Seprafilm membrane (HAL-F): a blinded, prospective, randomized, multicenter clinical study. Seprafilm Adhesion Study Group. *Fertil Steril* 1996;66:904-10.
 18. Duron JJ. Postoperative intraperitoneal adhesion pathophysiology. *Colorectal Dis* 2007;9 Suppl 2:14-24.
 19. Guvenal T, Cetin A, Ozdemir H, Yanar O, Kaya T. Prevention of postoperative adhesion formation in rat uterine horn model by nimesulide: a selective COX-2 inhibitor. *Hum Reprod* 2001;16:1732-5.
 20. Saed GM, Munkarah AR, Diamond MP. Cyclooxygenase-2 is expressed in human fibroblasts isolated from intraperitoneal adhesions but not from normal peritoneal tissues. *Fertil Steril* 2003;79:1404-8.
 21. Binnebösle M, Klink CD, Serno J, Jansen PL, von Trotha KT, Neumann UP, et al. Chronological evaluation of inflammatory mediators during peritoneal adhesion formation using a rat model. *Langenbecks Arch Surg* 2011;396:371-8.
 22. Kim SJ, Park JH, Kim KH, Lee WR, Lee S, Kwon OC, et al. Effect of NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotide on LPS/high-fat diet-induced atherosclerosis in an animal model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010;107:925-30.
 23. Kim KH, Lee ES, Cha SH, Park JH, Park JS, Chang YC, et al. Transcriptional regulation of NF-kappaB by ring type decoy oligodeoxynucleotide in an animal model of nephropathy. *Exp Mol Pathol* 2009;86:114-20.
 24. Yoldemir T, Sagol S, Adakan S, Oztekin K, Ozsener S, Karadas N. Comparison of the reduction of postoperative adhesions by two barriers, one solution, and two pharmacologic agents in the rat uterine model. *Fertil Steril* 2002;78:335-9.
 25. Jarrett JC 2nd, Dawood MY. Adhesion formation and uterine tube healing in the rabbit: a controlled study of the effect of ibuprofen and flurbiprofen. *Am J Obstet Gynecol* 1986;155:1186-92.
 26. Muzii L, Brunetti L, Marana R, Margutti F, Vacca M, Mancuso S. Low-dose aspirin to prevent postoperative adhesion formation in the rabbit model. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 1996;3:S32-3.
 27. Muzii L, Marana R, Brunetti L, Margutti F, Vacca M, Mancuso S. Postoperative adhesion prevention with low-dose aspirin: effect through the selective inhibition of thromboxane production. *Hum Reprod* 1998;13:1486-9.

복강내 NF- κ B decoy oligodeoxynucleotide를 이용한 수술 후 복강내 유착 발생 감소대구가톨릭대학교 의과대학 ¹산부인과학교실, ²병리학교실안별님¹, 송미현¹, 김주현¹, 김경현², 박관규², 최윤석¹**목적**

쥐모델에서 nuclear factor κ B decoy oligodeoxynucleotide (NF- κ B decoy ODN) 복강내 주입을 이용한 수술 후 복강내 유착 발생 억제 효과를 알아보고자 하였다.

연구방법

40마리의 BALB/c 암컷 생쥐를 ketamine과 xylazine 복강내 주사를 이용하여 마취 후 개복하고 cytobrush를 이용하여 복막이 벗겨지는 상처를 입히고, 실험군은(n=20) NF- κ B decoy ODN (10 μ g, 500 μ L)을 복강내에 채우고, 대조군은(n=20) 생리 식염수 500 μ L를 복강내에 채운 후 봉합하고 2주 뒤에 유착 정도를 판정하였다. 유착 정도는 유착이 없는 0등급에서 심한 정도에 따라 경증, 중등도, 중증 등급(1-3 등급)으로 분류하였다.

결과

수술 후 첫날 실험군에서 2마리, 대조군에서 3마리의 생쥐가 사망하였다. 대조군은 경증과 중등도의 유착이 각각 2마리에서 관찰되었고 13마리에서 중증의 유착이 관찰되었으나, 실험군에서 4마리는 유착이 관찰되지 않았고, 6마리는 경증의 유착, 8마리는 중등도의 유착이 관찰되어 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다($P < 0.001$).

결론

NF- κ B decoy ODN를 복강내에 주입하여 NF- κ B 작용을 차단하는 방법은 수술 후 복강내 유착 정도를 줄일 수 있다.

중심단어: 유착, 염증, NF- κ B, NF- κ B decoy oligodeoxynucleotide