

## RNA Interference를 이용한 TNF- $\alpha$ 작용 억제 류마티스관절염의 활막 섬유모세포 및 연골 세포의 염증 반응에 미치는 영향

한림대학교 의과대학 내과학교실

김 현 아

= Abstract =

### The Blocking of TNF- $\alpha$ by RNA Interference and Its Influence on Synovial Fibroblast and Chondrocytes

Hyun Ah Kim, M.D., Ph.D.

*Department of Internal Medicine, Hallym University Sacred Heart Hospital, Anyang, Korea*

**Objective:** Small interfering RNA (siRNA) triggers RNA interference in mammalian somatic cells. TNF- $\alpha$  is a proinflammatory cytokine implicated in the pathogenesis of inflammatory arthritis including rheumatoid arthritis (RA). This study was to use TNF receptor 1 (TNFRI)-specific siRNA to inhibit the TNF- $\alpha$  mediated signaling in RA fibroblast like synoviocytes (FLS) and chondrocytes.

**Methods:** TNFRI specific siRNA was produced by targeting 3 nucleotide sequences at 474~494, 562~582 and 668~688. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were performed to optimize the silencing effects of TNFRI siRNA in cultured FLS and chondrocytes. The inhibition of TNF- $\alpha$  mediated signaling was determined by ELISA assay of metalloproteinase 1 secretion induced by TNF- $\alpha$ .

**Results:** The TNFRI siRNA inhibited the expression of TNFRI mRNA and protein in both RA FLS and chondrocytes. MMP-1 secretion induced by TNF- $\alpha$  was significantly downregulated by TNFRI siRNA.

**Conclusion:** TNFRI siRNA can inhibit the expression and signaling downstream of TNFRI

---

< 접수일 : 2007년 9월 20일, 심사통과일 : 2007년 10월 1일 >

※통신저자 : 김 현 아

경기도 안양시 동안구 평촌동 896

한림대학교 의과대학 성심병원 내과

Tel : 031) 380-1726, Fax : 031) 386-2269, E-mail : kimha@hallym.ac.kr

이 논문은 학술진흥재단 신진교수연구지원(No. E00119)의 지원으로 이루어짐.

in both RA FLS and chondrocytes efficiently. This suggests that RNA interference technique by siRNA could be considered as a potential therapeutic target for RA.

**Key Words:** Rheumatoid arthritis, siRNA, TNF- $\alpha$ , TNF receptor 1, Metalloproteinase-complementemia

## 서 론

류마티스관절염은 1%의 유병률을 가지는 가장 흔한 관절염의 하나로 자가면역 기전에 의해 유발되는 염증 반응으로 심하고 급격한 관절 파괴와 이에 상응하는 기능 장애를 가져오는 대표적인 난치성 질환이다. 류마티스관절염의 발병 원인은 아직까지 명확히 밝혀지지 않았고 따라서 그 치료도 질환 특이적 발생 기전에 작용하는 약제보다는 약성 종양과 같은 다른 질환의 치료에 이용되던 약제를 원용하여 왔다. 류마티스관절염의 가장 궁극적인 치료는 유발 항원의 정체를 밝히고 이에 대한 면역 반응을 직접 억제하는 것이나 현실적으로 유발 항원을 규명하는 것이 매우 어렵고 단일 항원이 작용하지 않을 가능성도 제시되고 있어 유발 항원 억제를 통한 치료적 접근의 가능성은 아직은 요원하다. 이런 현실에서 많은 연구자들은 염증 반응의 산물과 그 촉발 인자들에 관심을 돌려 왔고 염증성 사이토카인들, 특히 interleukin (IL)-1, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IL-6 등의 역할이 강조되고 있다 (1). TNF- $\alpha$ 는 다양한 생물학적 반응을 유발하는 강력한 염증성 사이토카인으로 단핵세포, 거대세포, B 림프구, T 림프구, 섬유모세포 등에 의해 생성되는데 류마티스관절염의 동물 모델인 type II collagen induced arthritis model에서 수용성 TNF 수용체 융합 단백질로 TNF- $\alpha$ 를 억제하는 경우 관절염의 발생을 예방할 수 있다 (2). 이와 같은 동물 실험 결과를 기본으로 다양한 TNF- $\alpha$  억제제의 개발이 시도되어 현재 환자의 치료에 이용되고 있고 뛰어난 임상 효과를 보이는 것이 확인되었다 (3,4). 현재 TNF- $\alpha$ 에 대한 특이적 억제제로는 단클론성 항체인 infliximab 과 adalimumab, 수용성 수용체인 etanercept가 대표적으로 사용되고 있고 모두 기존의 약제에 반응을 보이지 않는 불응성 류마티스관절염 환자에서 현저한 임

상적 호전과 관절 파괴의 억제를 가져온다. 그러나 이들 생물학적 제제에는 항원-항체 반응에 의한 약제 효능의 감소와 높은 생산 비용으로 인한 환자들의 접근성 제한 등의 문제점이 있기 때문에 임상적 이용에 제한이 따른다.

분자 생물학적 기법이 발달하면서 messenger RNA, transfer RNA, ribosomal RNA 뿐 아니고 기능이 불분명한 작은 non-messenger RNA가 발견되고 RNA는 단지 DNA가 가지는 유전 정보를 전달하는 중간자의 역할만을 갖는다는 고전적인 이론은 RNA가 다양한 생물학적 활성을 가지는 물질이라는 이론으로 대체되고 있다. RNA interference 현상은 double-strand의 구조를 갖는 짧은 RNA가 염기 서열 특이적으로 유전자 기능을 감소시키는 현상으로 선충류인 *Caenorhabditis elegans*에서 처음으로 규명되었다 (5). 특히 기존의 유전자 억제 물질인 anti-sense DNA에 비해 double-strand RNA mixture가 10배 이상의 유전자 억제 효과를 갖는 것이 밝혀지면서 RNA interference는 많은 관심을 받기 시작했다 (6). 포유류의 세포에서는 19~21 염기로 구성된 짧은 double-stranded RNA를 주입하는 경우 RNA interference를 유발할 수 있고 이러한 RNA 서열을 small interfering RNA (siRNA)라고 칭한다. siRNA는 세포질에 존재하는 RNA-inducing silencing complex(RISC)에 의해 세포 안으로 함입되며 상보 염기서열(complementary sequence)을 갖는 messenger RNA에 결합한 후 분해를 유발한다 (7). 이러한 특성 때문에 siRNA는 세포나 동물 실험에서 특이적으로 유전자의 기능을 분석하는 실험적 도구로 널리 이용되어 왔고 최근에는 질환의 치료제로 이용될 가능성도 제기되고 있다. 본 연구에서는 TNF- $\alpha$ 의 주 수용체인 TNF 수용체 1형(TNF receptor I, TNFRI)에 대한 siRNA의 RNA interference 현상을 이용하여 관절 조직의 중요한 세포들인 활막 세포와 연골 세포에서 TNF- $\alpha$  수용체 발현을 억제하고 이것이 관절염의 진행에 영향을 미치는 관절 파괴 매개

인자의 분비에 미치는 영향을 규명함으로써 새로운 류마티스관절염의 치료제 개발에 대한 단초를 제공하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연골 및 활막 섬유모세포의 분리

미국 류마티스관절염 학회의 진단 기준을 만족하는 류마티스관절염 환자의 인공 관절치환술을 통해 얻은 조직으로부터 이전에 보고된 방법대로 (8) 연골 및 섬유모세포를 분리하였다. 간단히 기술하면 연골의 경우 뼈로부터 연골 조직을 얇게 발라 잘게 썬 후 0.05% hyaluronidase와 0.8% protease를 넣은 DMEM 용액에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 0.2% collagenase를 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 마크네틱 바와 교반기를 사용하여 연골 조직을 녹였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 가라앉아 있는 연골 세포를 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, penicillin (100 unit/mL), streptomycin (100 µg/mL)를 가한 DMEM에 재부유시켜 10mm plate에 고농도로(5×10<sup>6</sup>/well)에 분주하였다. 연골 세포가 배양기에 증만되면 3×10<sup>5</sup>/well의 농도로 6 well plate에 분주하여 siRNA 전달 실험에 이용하였다. 활막 섬유모세포의 경우 활막 조직을 2~3 mm의 조각으로 잘게 썬 후 4 mg/ml 농도의 collagenase에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에 4시간 동안 배양하였다. 분리된 세포는 연골 세포 배양액과 동일한 배양액에 부유시켜 75-cm<sup>2</sup> flask에 분주하였다. 하루가 지난 후 세포를 세척하여 배양기에 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 10% FBS를 가한 DMEM에서 5% CO<sub>2</sub>와 37°C의 조건에서 배양하고 배양액은 매 3일마다 교환하였다. 플라스크 바닥의 90~95%가 활막 섬유모세포로 증만되면 신선한 배양액으로 1:3 희석하여 계대 배양하였다. 실험에는 4~8 계대의 활막 섬유모세포를 사용하였다. siRNA 전달 하루 전 3×10<sup>5</sup>/well의 농도로 6 well plate에 분주하여 siRNA 전달 실험에 이용하였다.

### 2. siRNA의 제작

3개의 후보 TNF RI siRNA를 Ambion에 의뢰하여 제작하였다. 각각의 염기 서열은 표 1과 같다. 21-mer

**Table 1.** The sequences of siRNA used in the experiment

siRNA	Sequence
TNFRI-seq1	5'-GGAGCTTACTTGTATGATGAT -3' (sense), 5'-GGAACCTACTTGTACAATGAC -3' (anti-sense)
TNFRI-seq2	5'-ACTATCTCAGATACTGTCTTA -3' (sense) 5'-ACCACCTCAGACACTGCCTCA -3' (anti-sense)
TNFRI-seq3	5'-GAGCTAGTATCGGTATTGTTG-3' (sense) 5'-GAACCAGTACCGGCATTATTG-3' (anti-sense)

의 염기 서열은 사람의 TNFRI의 염기서열 474~494, 562~582, 668~688에 해당한다. Negative control로 이용될 scrambled siRNA를 따로 제작하였다.

### 3. siRNA의 전달

15 ml tube에 혈청을 첨가하지 않은 DMEM을 600 µL 넣고 siRNA를 첨가하여 부드럽게 vortexing 해주었다. 이 후 혈청을 첨가하지 않은 DMEM을 600 µL 넣은 eppendorf tube에 lipofectamine 1.2 µL를 첨가하여 부드럽게 vortexing 해 주었다. Lipofectamine이 들어있는 용액을 siRNA가 들어있는 용액에 방울 방울 떨어뜨려 섞어 준 후 40분 동안 상온에서 배양하였다. 40분의 배양시간이 종료되기 15분 전에 세포를 혈청을 첨가하지 않은 DMEM으로 두차례 세척해준 후 lipofectamin을 섞은 siRNA를 600 µL씩 방울 방울 떨어뜨려 주었다. 용액이 plate에 골고루 퍼지도록 한 후 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 4시간, 8시간 배양하였다. 배양 시간 경과 후 siRNA함유된 배지를 완전히 제거해주고 10% FBS, 2 mM glutamine, penicillin (100 unit/mL), streptomycin (100 µg/mL) 함유 DMEM으로 배양액을 갈아주었다. 24시간 경과 후 mRNA, 48시간 배양한 후 단백질을 추출하였다.

### 4. TNFRI에 대한 RT-PCR

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 추출한 총 RNA 일정량을

SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR을 위한 반응 화합물은 총 20  $\mu$ L가 되도록 하였고 AccutePower® PCR PreMix (Bioneer, Taejeon, Korea)에 각각 D.W 12  $\mu$ L, 100pM TNFRI primer (sense, 5'-ctgcaggaagaaccagtacc-3', antisense 5'-gtgggtcctgagtcct-3'), 합성된 4  $\mu$ L의 cDNA를 첨가하여 증폭을 시행하였다. 증폭 조건은 96°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초로 25회였다. PCR 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동을 시행하여 PCR 산물의 양을 GAPDH PCR 양과 비교하였다.

#### 5. Western blot

전기영동은 12% SDS-PAGE에 100V로 시행하였다. 전기영동 후 분리된 단백질을 PVDF membrane을 사용하여 4°C 270 mA에서 70분 동안 젤에서 흡착지로 이동시켰다. 전기영동이 끝난 후 흡착지를 분리해내어 TBST (0.01% Tween 20 in Tris-buffered saline) 세척액으로 세척한 후 차단 용액(5% bovine serum albumin in Tris-buffered saline)에 담가 실온에서 1시간 반응시켰다. 차단 용액을 버리고 TBST 세척액으로 다시 세척하였다. 흡착지를 꺼내어 anti-mouse TNFRI (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK) 항체에 넣어 4°C에서 12~16시간 반응시키고 흡착지를 꺼내어 TBST 세척액으로 세척하였다. Horseradish peroxidase가 부착된 rabbit anti-mouse IgG (Cell signalling technology, Beverly, MA)를 1 : 1,000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 흡착지를 꺼내어 TBST 세척액으로 세척하고 enhanced chemiluminescence를 이용하여 항체 결합 신호를 확인하였다.

#### 6. Metalloproteínase (MMP)-1 ELISA

SiRNA를 전달한 후 12시간 동안 혈청 없는 DMEM에서 배양한 후 10 ng/mL 농도의 TNF- $\alpha$  (R&D, Minneapolis, MN)를 처리하였다. 24시간이 경과하여 세포 배양 상층액의 MMP-1 값을 ELISA kit (R&D)를 이용하여 측정하였다. 배양 상층액은 1/10로 희석하여 사용하였다.

#### 7. 통계학적 분석

실험군 간 비교는 Mann-Whitney U test를 이용하여 분석하였고 유의성 판정은 p값 0.05 미만으로 하였다.

### 결 과

#### 1. 연골 세포의 siRNA 전달

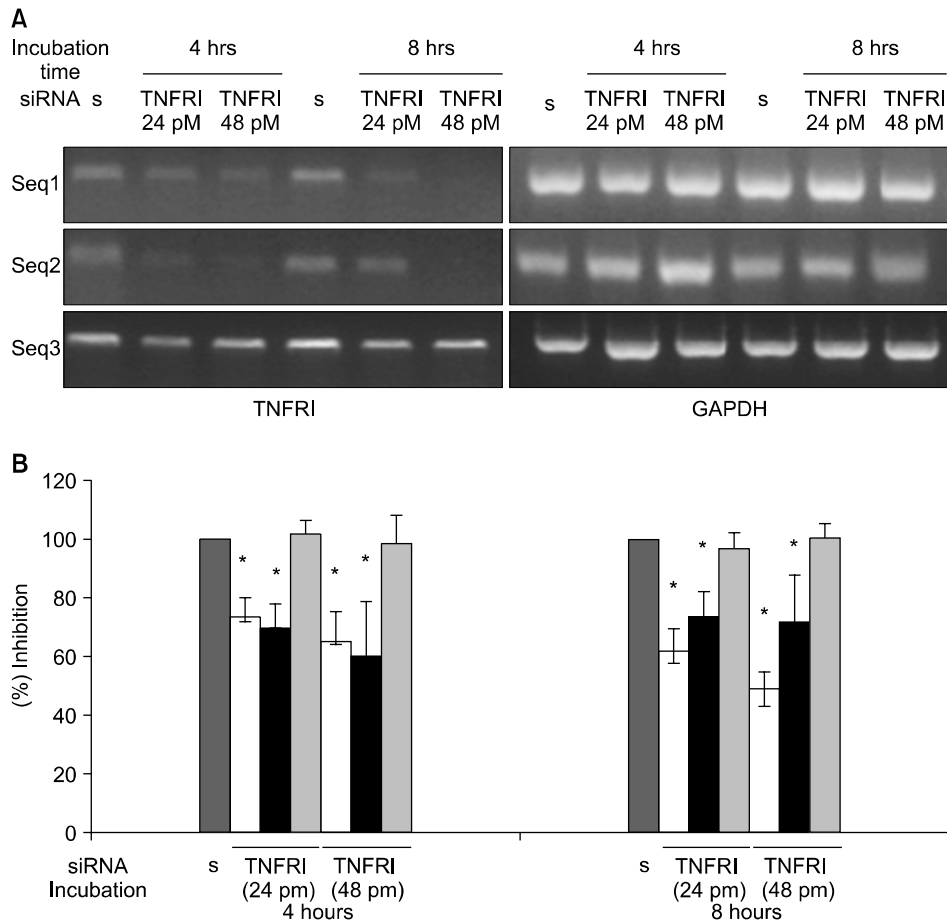
우선 연골 세포로의 siRNA전달 최적 조건을 정하기 위해 siRNA, lipofectamin을 각각 24, 48 pM, 1.2, 2.4  $\mu$ L 처리하고 배양 시간을 4시간, 8시간으로 달리 하여 실험하였다. siRNA 전달 후 24시간 지나 세포를 관찰한 결과 lipofectamin 2.4  $\mu$ L를 처리한 조건에서는 일부 세포사가 관찰되었다(데이터 보이지 않음). 나머지 조건들에서 RNA를 추출하여 TNFRI에 대한 RT-PCR을 시행한 결과 sequence 1과 sequence 2에서 4시간, 8시간 배양 시 24, 48 pM 모두에서 유의한 유전자 발현 억제가 관찰되었다(그림 1). siRNA의 mRNA 발현 감소가 단백질 감소로 이어지는지를 관찰하기 위해 siRNA 전달 후 48시간 지나 단백질을 분리하여 Western blot으로 TNFRI의 발현을 관찰하였다(그림 2). 결과 mRNA결과와 같이 siRNA전달 48시간 후 연골 세포의 TNFRI의 현저한 감소가 관찰되었다.

#### 2. 류마티스 활막 섬유모세포의 siRNA 전달

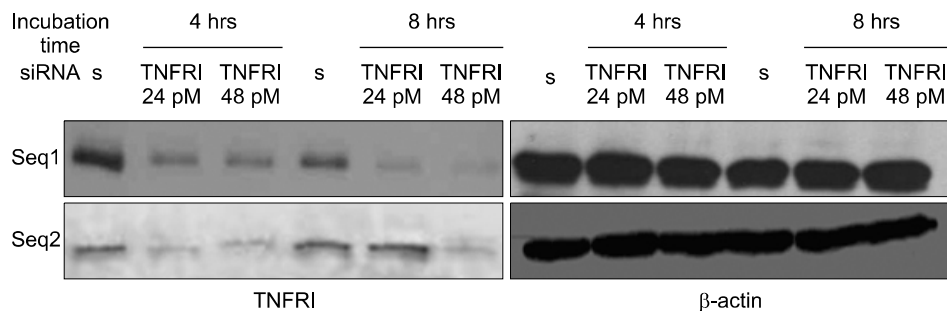
Sequence 1과 sequence 2를 이용하여 류마티스관절염 활막 섬유모세포로의 siRNA 전달을 시도하였다. 전달 방법은 연골 세포와 같은 조건으로 시행하였다. 활막 섬유모세포에서도 연골 세포와 같이 sequence 1,2 모두 유의한 TNFRI mRNA와 단백질의 감소가 나타났다(그림 3).

#### 3. 연골 세포와 활막 섬유모세포로 전달된 siRNA의 기능

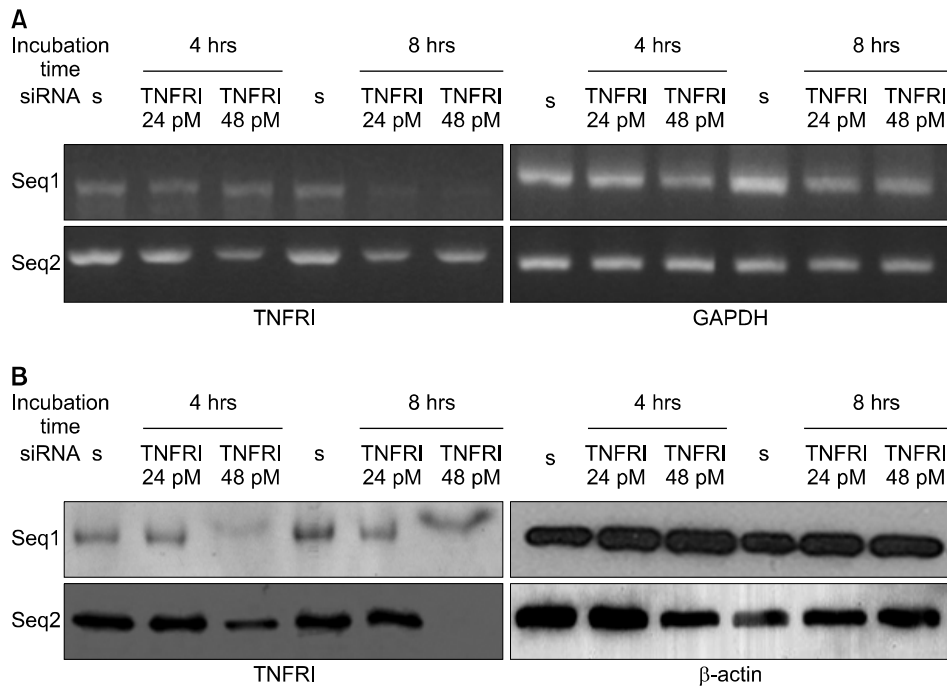
다음으로 연골 세포와 활막 섬유모세포로 전달된 siRNA가 TNF- $\alpha$ 의 기능을 억제하는지를 관찰하기 위해 두 세포에서 TNF- $\alpha$ 에 반응하여 TNFRI 특이적으로 유발되는 MMP-1에 대한 차단 효과를 관찰하기로 하였다. 위 1,2의 결과에서 연골 세포, 활막 섬유



**Fig. 1.** Inhibition of TNFRI mRNA by TNFRI specific siRNA in articular chondrocytes. (A) Expression of TNFRI mRNA in articular chondrocytes were detected by RT-PCR. Data represent samples from 3 different donors. (B) The band densities were quantified, the percent GAPDH density was calculated for TNFRI and the value for control was set at 100. \* $p < 0.05$  compared with control by Mann-Whitney U test. s: scrambled siRNA(negative control).



**Fig. 2.** Inhibition of TNFRI protein by TNFRI specific siRNA in articular chondrocytes. Expression of TNFRI protein in articular chondrocytes was detected by Western blot. Data represent samples from 3 different donors. s: scrambled siRNA.



**Fig. 3.** Inhibition of TNFRI mRNA and protein by TNFRI specific siRNA in RA fibroblast like synoviocytes (FLS). (A) Expression of TNFRI mRNA in RA FLS were detected by RT-PCR. Data represent samples from 5 different donors. (B) Expression of TNFRI protein in articular chondrocytes was detected by Western blot. Data represent samples from 4 different donors. s: scrambled siRNA.

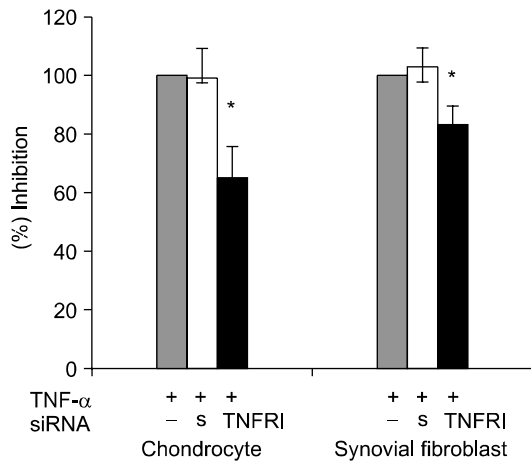
유모세포 모두 가장 높은 siRNA전달 효율을 보이는 48pM, 8시간 배양의 조건에서 실험을 시행하였다. 그림 4에서와 같이 TNFRI siRNA를 전달한 연골 세포에서는 TNF- $\alpha$ 에 반응하여 MMP-1의 생성이 유의하게 저하되었다.

## 고 찰

본 연구에서 관절염의 연골 세포와 활막 세포 모두에서 siRNA에 의해 유의하게 TNFRI 발현이 mRNA와 단백질 수준에서 감소되었고 이러한 감소는 TNF- $\alpha$ 에 의해 유발되는 연골 세포와 활막 세포의 염증 매개체의 발현을 억제하였다. 이는 siRNA 기법이 기초 연구에서 중요한 수단으로 이용될 뿐 아니라 관절염의 치료에도 이용될 수 있으리라는 가정을 가능하게 한다.

RNA interference의 기전은 아직 모든 것이 밝혀지

지는 않았으나 *Drosophila*와 같은 비포유류 세포에서는 긴 double stranded RNA가 RNAse III motif를 갖는 효소 Dicer에 의해 21~23 염기 서열의 siRNA로 분해되고 이렇게 생성된 siRNA는 RNA-induced silencing complex (RISC)로 합입되어 분해의 표적이 되는 상보 mRNA로 nuclease complex를 유도하는 역할을 하는 것으로 보고된다 (9). 포유류의 세포는 30개 염기 서열 이상의 긴 double stranded RNA에 노출되는 경우 강력한 항 바이러스 반응을 일으키기 때문에 siRNA 형태의 짧은 RNA를 이용해야 한다 (10). RNA interference의 효율은 아직까지 세포, 실험하는 동물의 종, 그리고 표적하는 유전자에 따라 크게 달라 일관성 있는 데이터를 얻기 어려운 경우가 많다. 이러한 다양성은 일부 표적 mRNA의 구조가 다양한 조절 단백질에 둘러싸여 있어 siRNA의 접근이 어려운 점에도 기인한다 (11). 본 연구에서 연골 세포와 활막 섬유모세포에서의 siRNA전이에 의한 mRNA의 감소는



**Fig. 4.** Inhibition of MMP-1 secretion induced with TNF- $\alpha$  by TNFRI siRNA. MMP-1 production was measured 24 hours after TNF- $\alpha$  treatment from the conditioned media by ELISA. Results are given as the mean and standard deviation of the mean percentage of TNF- $\alpha$  treatment alone (control, representative of duplicate experiments from 4 donors). \* $p < 0.05$  compared with control by Mann-Whitney U test. s: scrambled siRNA (negative control)

각각 최대 49%, 57%로 비슷한 효율을 보였으며 각 염기 서열에 따른 효율의 차이도 관찰되었다. 세포에 전달된 siRNA가 기능을 수행하려면 목표 유전자가 전사하는 단백질의 양도 함께 감소되어야 하는데 본 연구 결과 mRNA의 감소가 나타난 후 약 24시간 경과하여 단백질의 양이 함께 감소하는 것이 관찰되었다. 한편 전달된 siRNA의 기능이 언제까지 유지되는지도 중요한데 본 연구에서는 단백질의 경우 최대 96시간까지 감소가 관찰되지만 이후에는 다시 siRNA 전달 이전 수준으로 돌아오는 것이 관찰되었다(데이터 보이지 않음). 과거 연골 세포를 이용한 siRNA 전달 실험 결과는 많지 않으나 골관절염 연골 세포에 p16<sup>INK4a</sup>, NF- $\kappa$ B p65 siRNA를 전달한 결과 현저한 mRNA와 단백질의 억제를 가져 왔고 결과 골관절염 연골의 재생능이 증가되고 염증 반응이 완화되는 양상을 보였다는 보고가 있어 연골 세포로의 siRNA 전달의 유용성을 제시한다 (12,13). 한편 siRNA를 이용한 세포 실험에서 비특이적으로 siRNA가 다양한 신호 전달계를 활성화시킨다는 점을 유의하고 데이터

의 분석에 신중을 기해야 한다. 한 예로 classical 21-mer siRNA는 protein kinase R와 직접 결합하여 이를 강력하게 활성화하며 결과 p53, p38, NF- $\kappa$ B 신호계에까지 영향을 줄 가능성이 있다 (14). 이러한 siRNA 자체의 자극 효과는 siRNA의 염기 서열에 따라 그리고 세포에 따라 또 세포의 공여자에 따라서도 다르게 나타날 수 있어 실험 결과의 분석에 더욱 어려움을 초래한다. 본 연구에 이용한 scrambled RNA는 MMP-1의 분비에 있어서 TNF- $\alpha$  단독 자극보다 더 강한 분비를 초래하지는 않았다.

관절염의 치료에서 국소적인 유전자 치료는 비정상적인 면역, 염증 반응을 특이적으로 조절할 수 있는 새로운 치료법으로 관심을 모아 왔다. 해당 관절 부위에 직접 유전자를 주입하거나 관절 활막 조직을 채취하여 유전자를 전이시킨 후 생체에 다시 주입하는 방법들이 대표적인 국소 유전자 치료법들이다 (15). 그러나 치료 목적으로 이용될 후보 유전자를 세포에 전달하기 위해서 어떤 벡터를 이용할 것인지가 항상 문제의 초점이 되어 왔다. 바이러스 벡터는 바이러스가 자신의 유전자를 감염된 세포에 효율적으로 주입시킬 수 있는 능력을 이용하여 비 바이러스 벡터보다 높은 효율로 유전자를 전달할 수 있다. 그러나 감염성에 대한 위험이 항존하기 때문에 바이러스 증식에 필요한 유전자를 제거한 형태로 변형하여 이용하게 된다. 현재 adenovirus, adeno-associated virus, moloney murine leukemia virus, lentivirus 등이 이용된다. 비 바이러스 벡터로는 liposome이 가장 널리 이용되고 있는데 바이러스와 같은 감염의 위험은 낮지만 효율이 낮고 염증 반응을 유발하는 등의 문제가 있다. siRNA가 세포 실험에서 나아가 관절염의 동물 모델 혹은 인체에 적용되기 위해서는 유전자 치료와 마찬가지로 효율적인 조직 전이가 필수적이다. 류마티스관절염이나 퇴행성 관절염의 동물 모델에서 siRNA를 이용한 치료 효과를 관찰한 보고는 아직 많지 않고 일반적인 유전자 치료와 같은 vector의 제작의 문제점을 공통으로 갖는다. 최근의 한 보고에서 electroporation을 이용한 직접적인 조직내 siRNA 전달이 가능하다는 보고가 나와 관심을 모으고 있다. 즉 콜라겐 유발 관절염 모델에서 관절염 유발 후 8일 간격으로 10  $\mu$ g의 TNF- $\alpha$ 에 대한 siRNA를 주입하고 200 V/cm의 electroporation을 가하는 경

우 관절 특이적으로 siRNA가 발현되면서 관절염의 심한 정도가 감소하여 siRNA 기법이 바이러스 벡터를 이용하지 않는 새로운 관절염 치료제로 개발될 수 있는 가능성을 제시하였다 (16). 그러나 일반적으로 바이러스 벡터를 이용하지 않은 생체 내 siRNA의 전달의 효율은 매우 떨어지는 것으로 받아들여지고 있기 때문에 생체 siRNA 전달의 효율에 관한 좀 더 많은 연구들이 이루어져야 할 것으로 사료된다. 퇴행성 관절염에서는 NF-kB p65에 대한 siRNA를 표현하는 adenovirus를 쥐의 반월관 절제 모델에 슬관절 주사하여 치료 효과를 거두었다는 최근의 보고가 있지만 (17) 아직 생체 연골 내로 바이러스 벡터를 이용하지 않은 직접적인 siRNA의 전달은 보고가 없다. 본 연구에서 연골 세포와 활막 세포에서의 siRNA에 의한 mRNA와 단백질 발현 감소와 TNF- $\alpha$ 에 의한 MMP-1의 자극 효과 억제 차이는 관찰되지 않았다. 한편 RT-PCR과 Western blot으로 관찰한 TNFRI의 감소 정도에 비해 MMP-1 억제 효과는 낮은 경향이었는데 남아 있는 수용체에 의한 신호 전달, TNFRI siRNA 자체적인 MMP-1 자극 효과, 그리고 TNF- $\alpha$ 의 MMP-1 자극이 TNFRI이외의 수용체를 경유할 가능성 등으로 설명할 수 있다. 본 연구는 연골 및 활막 섬유아세포에서의 siRNA 억제를 관찰한 원칙 증명(proof of concept)차원의 연구로 이를 관절염의 치료에 적용하기 위해서는 더 많은 후속 연구가 필요할 것이다.

## 결 론

본 연구에서 류마티스관절염의 연골 세포와 활막 섬유아세포에서 TNFRI siRNA의 전달에 의한 목표 유전자와 단백질의 감소가 효율적으로 이루어짐을 관찰할 수 있었다. 이렇게 전달된 siRNA는 TNF- $\alpha$ 에 의해 매개되는 MMP-1의 분비를 억제하는 작용을 보임으로 siRNA가 관절염의 치료에 응용될 가능성을 제시하였다.

## REFERENCES

- 1) Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001;344:907-16.
- 2) Clark IA. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18:335-43.
- 3) Lipsky PE, van der Heijde DM, St. Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis: anti-tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study group. *N Engl J Med* 2000;343:1594-602.
- 4) Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, Bulpitt KJ, Fleischmann RM, Fox RI, et al. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N Engl J Med* 1999; 340:253-9.
- 5) Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418: 244-51.
- 6) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-8.
- 7) Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 2001;114:4557-65.
- 8) Kim HA, Kim S, Chang SH, Hwang HJ, Choi YN. Anti-arthritis effect of ginsenoside Rb1 on collagen induced arthritis in mice. *Int Immunopharmacol* 2007;7:1286-91.
- 9) Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363-6.
- 10) Manche L, Green SR, Schmedt C, Mathews MB. Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol* 1992; 12:5238-48.
- 11) Saito F, Yokota H, Sudo Y, Yakabe Y, Takeyama H, Matsunaga T. Application of RNAi inducible TNFRI knockdown cells to the analysis of TNFalpha-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro* 2006;20:1343-53.
- 12) Zhou HW, Lou SQ, Zhang K. Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16INK4a-specific siRNA in vitro. *Rheumatology* 2004;43:555-68.
- 13) Lianxu C, Hongti J, Changlong Y. NF-kappaB p65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1 beta-induced and TNF-alpha-induced chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:367-76.



- 14) Klatt AR, Klinger G, Zech D, Paul-Klaus B, Renno JH, Schmidt J, et al. RNAi in primary human chondrocytes: Efficiencies, kinetics, and non-specific effects of siRNA-mediated gene suppression. *Biologicals* 2007;35:321-8.
- 15) Robbins PD, Evans CH, Chernajovsky Y. Gene therapy for arthritis. *Gene Ther* 2003;10:902-11.
- 16) Schiffelers RM, Xu J, Storm G, Woodle MC, Scaria PV. Effects of treatment with small interfering RNA on joint inflammation in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:1314-8.
- 17) Chen LX, Lin L, Wang HJ, Wei XL, Fu X, Zhang JY, et al. Suppression of early experimental osteoarthritis by in vivo delivery of the adenoviral vector-mediated NF-kappaBp65-specific siRNA. *Osteoarthritis Cartilage* 2007 doi:10.1016/j.biologicals.2007.06.006.