

자연적으로 유발된 고혈압 백서에서 안지오텐신 전환효소를 억제하는 Small Hairpin RNA 투여 효과

홍영미¹, 이혜련¹, 김관창²

이화여자대학교 의과대학 목동병원 ¹소아과, ²흉부외과

Effect of Small Hairpin RNA Molecules Targeting Angiotensin-converting Enzyme Gene in Spontaneously Hypertensive Rats

Young Mi Hong, MD¹, Hye Ryon Lee, MD¹, Kwan Chang Kim, MD²

Departments of ¹Pediatrics, ²Thoracic and Cardiovascular Surgery, Ewha Womans University Mokdong Hospital, Ewha Womans University School of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: Interfering RNA (iRNA) represents a recent breakthrough in effective blocking of the target genes in mammalian cells. Angiotensin-converting enzyme (ACE) has been shown to play an important role in the pathogenesis of hypertension. The purposes of this study were to investigate the effects on blood pressure, myocardial hypertrophy and gene expressions of iRNA targeting ACE. **Methods:** Twelve week old male Wistar-Kyoto rats were grouped as follows: control group (C group), spontaneously hypertensive rat (SHR) group (H group), and ACE-iRNA group (A group) in which SHR was treated with recombinant lentiviral vectors carrying small hairpin RNA targeting ACE. Reverse transcription-polymerase chain reaction and western blot analysis of ACE, endothelin (ET)-1, angiotensin (AT) II receptor type 1A, neutrophil cytosolic factor, caspase 3, Bax, and Bcl-2 were performed in the heart tissues. Serum AT, ACE, and high sensitive-C reactive protein were estimated. **Results:** Systolic blood pressure was significantly decreased in the A group compared with the H group in weeks 3 and 5. Serum AT level was significantly lower on day 1, weeks 3 and 5 after ACE-iRNA treatment. ACE protein contents were significantly lower after ACE-iRNA treatment in week 5. ET-1 and Bcl-2 protein contents were significantly lower after ACE-iRNA treatment in weeks 3 and 5. Bax protein contents were significantly lower after ACE-iRNA treatment in week 3. **Conclusions:** Recombinant lentiviral vectors carrying shRNA targeting ACE prevented hypertension. Serum AT and gene expressions such as ACE, ET-1, Bax, and Bcl-2 were significantly decreased after ACE-iRNA treatment. (J Korean Soc Hypertens 2012;18(3):105-116)

Key Words: Hypertension; Small hairpin RNA; Lentivirus; RNA interference

서론

Small interfering RNA (siRNA)는 표적 유전자를 효과적으로 차단함으로써 작용할 수 있는 방법으로 최근 크게 각광받고 있다.¹⁾ siRNA는 이중 가닥의 RNA (double-stranded RNA)가 dicer에 의해 절단되어 생성되는 21-25 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA조각으로 상보적인 서

논문접수일: 2012.5.27, 수정완료일: 2012.7.30, 게재승인일: 2012.7.30
교신저자: 홍영미
주소: 서울시 양천구 안양천로 1071 이화여자대학교 의과대학 목동병원 소아과
Tel: 02) 2650-2841, Fax: 02) 2653-3718
E-mail: ymhong@ewha.ac.kr

열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 단백질 발현을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 이들의 존재는 1998년 Fire와 Mello에 의해 처음 확인되었는데, 외부 이중 가닥의 RNA를 선충에게 주입했을 때 상보적인 세포 내부의 mRNA와 서열 특이적으로 결합해 유전자 침묵(gene silencing)을 유도하는 기능을 확인했고, 이것을 interference RNA (iRNA)라고 부른다.²⁾ siRNA를 유전자 치료제로 이용하여 여러 질환 세포에서 특정 표적 유전자의 발현을 조절하게 되면 기존의 저분자 약물로 치료하지 못하는 암, 허혈성 질환, 바이러스성 질환과 같은 난치성 질환들을 치료할 수 있으므로 siRNA 기반 유전자 치료기술은 새로운 차세대 치료법으로 다양한 질환에 이용할 수 있다. RNAi 기작을 이용하여 고등동물 세포에서 표적 유전자의 발현을 억제하기 위해 21-23 뉴클레오타이드 정도 길이의 이중 가닥 RNA인 siRNA를 사용하게 된다.³⁾ 이러한 siRNA는 화학적, 혹은 효소에 의해 합성된 siRNA를 세포 내로 직접 도입하는 방법과 small hairpin RNA (shRNA)라고 하는 hairpin turn을 가진 RNA를 바이러스나 플라스미드 등과 같은 발현 벡터 시스템에 넣은 후 세포 내로 도입하는 방법이 있다. 이러한 shRNA는 세포핵에서 발현된 후 세포질로 이동한 후 siRNA로 전환되어 타겟 유전자 발현 억제를 유도할 수 있다.

렌티바이러스(lentivirus)는 레트로바이러스(retrovirus)의 일종으로 분열하지 않는 세포로 형질도입(transduction)이 가능하며 주입된 유전자는 수개월 이상 발현이 가능하므로 RNAi를 장기간 유지시키는데 유리한 장점을 가진다.^{4,5)} 또한 향후 약제개발의 한 방법으로 상기 제시한 환자의 유순도를 해결하는 큰 돌파구가 될 수 있을 것으로 생각된다.⁶⁾

고혈압의 발생기전은 매우 복잡하고 잘 알려져 있지 않으며 이 중 레닌안지오텐신 시스템(renin-angiotensin system, RAS)이 혈압조절에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다.⁷⁾ RAS는 중요한 안지오텐신 II를 통해서 혈압, 수분과 나트륨의 항상성, 심장, 혈관, 뇌와 신장의 손상 등을 줄 수 있다.⁸⁾ 결과적으로 RAS를 억제하는 것은 고혈압의 조절과 기관 손상을 치료할 수 있는 중요한 수

단이 될 수 있다. 안지오텐신 전환효소(angiotensin-converting enzyme, ACE) 억제제와 안지오텐신 II type 1 수용체 억제제는 혈압억제 이외에도 다른 많은 이익이 되는 효과를 가지고 있다. 결국 ACE 차단제는 안지오텐신 II 생성을 차단하고, 교감신경계를 억제하며 bradykinin 농도를 증가시켜 혈압을 떨어뜨리게 된다.⁹⁾ 특히 ACE 차단제는 단백뇨가 있는 신부전이나 심부전, 심근경색 후 표적 장기 손상에 효과적인 것으로 되어 있다.¹⁰⁾

본 연구의 목적은 자연적으로 유발된 고혈압 쥐(spontaneously hypertensive rat, SHR) 모델에서 ACE에 대한 shRNA가 주입된 렌티바이러스 벡터를 투여한 후 혈액학, 병리학적, 유전자 변화를 연구하고, 세포사멸에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

병원균이 없는 12주의 자성 성숙 Wistar-Kyoto rat (WKR)을 이 실험에 사용하였고 실험기간 동안 일반적인 동물사료와 물을 공급하여 12시간 낮 밤이 조절되는 사육실에서 관찰하였다. WKR을 대조군(C군, n=18)으로, SHR을 고혈압군(H군, n=18)으로 하였고, shRNA를 투여한 벡서를 치료군(A군, n=18)으로 하였다. shRNA 투여 후 21일, 35일에 도살하였다. 이 연구는 이화여자대학교 동물실험윤리위원회(approval no. ESM 11-0169) 동의 를 받아서 이루어졌다.

2. Small interfering RNA 투여방법

컴퓨터 알고리즘을 이용하여 ACE에 공통적으로 적용되는 target sequence 5개를 찾아서 9L cell line에서 효율 검정을 시행하여 가장 유전자 silencing이 잘 되는 target sequence를 찾았다. 우선 각 튜브에 10 nM 농도로 형질도입하기 위해서 5 µM 농도의 RNA stock을 최종 media volume 500 µL를 기준으로 1 µL를 넣어 주었다. 위의 튜브에 phosphate buffered saline 50 µL와 G-fectin 1 µL를 첨가하여 잘 섞은 후 10분 동안 배양하였다. 이후 10분

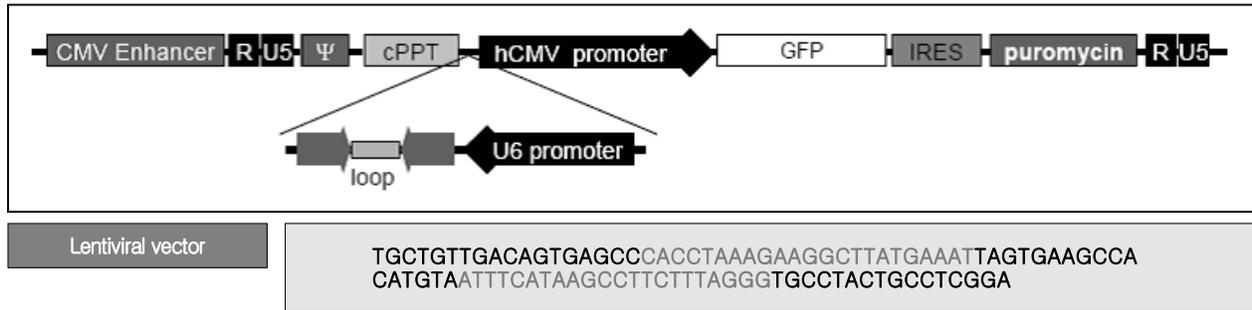


Fig. 1. Construction of shRNA-expression lentiviral vector for targeting rat angiotensin-converting enzyme (ACE). The shRNA-expression lentiviral vector for targeting rat ACE was constructed by inserting synthetic double strand oligonucleotides. CMV, cytomegalovirus; cPPT, central polypurine tract; hCMV, human cytomegalovirus; GFP, green fluorescent protein; IRES, internal ribosome entry site.

동안 24 well plate에 세포를 20-30% confluency로 plating하였다. 10분 후 형질도입 혼합물을 준비된 세포에 바로 넣어 주었다. 24시간 후 reverse transcription, polymerase chain reaction (PCR), dissociation의 과정을 거쳐서 시행하였다.

shRNA의 표적 서열은 컴퓨터 알고리즘으로 5개를 찾은 후 가장 유전자 silencing이 잘 되는 표적 서열을 사용하였다(Fig. 1). shRNA 투여는 렌티바이러스에 형질도입된 상태로 2×10^7 /mL 농도의 혼탁액 1 mL를 실험 시작일에 SHR의 꼬리에 정맥투여하였다. 대조군 벡터로 scrambled shRNA를 사용하였으며, 1.3×10^7 /mL 농도의 혼탁액 1 mL을 정맥투여하였다.

3. 혈액학적 검사 및 혈압측정

실험동물의 체중을 측정하였고, Zoletil (Virbac, Carros, France)과 Rompun (Bayer, Pittsburgh, PA, USA)을 이용하여 마취시킨 후 즉시 흉벽을 절개하여 심장과 대혈관의 기시부를 노출시킨 후 좌측 경동맥에 카테터를 삽입하여 혈압을 측정하였다.

4. 기관의 무게 측정

심장과 신장을 동시에 적출한 후 작은 가위를 이용하여 심장을 절개하여 우심실을 좌심실 및 심실벽으로부터 분리하고 우심실의 무게와 좌심실과 심실벽의 무게를 각각 측정하였고, 심장 무게/체중 및 좌심실 무게/심장 무게로

좌심실의 비후를 판단하였다.

5. 조직검사

광학 현미경적 검사를 위해 심장과 신장을 10% 중성 포르말린 용액으로 고정 후 절단하였다. 통상의 방법에 따라 수세, 파라핀 포매과정을 거쳐 $5 \mu\text{M}$ 의 연속 절편을 만든 후 hematoxylin-eosin 염색을 하였고, 탄력 섬유염색을 하기 위해 elastin 염색을 실시하였다.

6. 혈청학적 검사

검체 채취는 채혈하여 serum separation tube에 담고 30분간 응고되지 않게 하기 위해 실온 방치 후, 3,000 rpm 15분 동안 원심분리하였다. 상층액을 분리하여 분석 전까지 -80°C 에서 보관하였다. ACE는 ACE diagnostic kit (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA)와 COBAS MIRA (Roche, Basel, Switzerland)를 사용하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 법으로 측정하였다. 안지오텐신 II는 angiotensin diagnostic kit와 COBAS MIRA를 사용하여 ELISA 법으로 측정하였다.

7. 유전자검사

1) Microarray분석

Total RNA의 quality는 Agilent 2,100 Bioanalyzer (Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA)를 이용해 rRNA ratio (28s/18s)가 1.9 이상, RNA integrity number

가 8.0 이상 되는 것을 확인하였다. RNA를 검사한 후, 조직별로 각각 총 RNA를 정량/정성분석하였다. 합성된 Cy5 fluorescent cDNA는 single stand DNA의 농도에 따라서 같은 농도로 yeast tRNA 0.05 mg/mL를 첨가하고 95°C에서 2분간 변성을 실시하였다. 혼합된 시료는 간단히 원심분리를 실시한 후 45°C에서 20분간 배양을 실시하였다. Cy5 fluorescent cDNA가 혼합된 혼합물은 spotted 슬라이드 위에 부착된 HX12 hybridization mixer (BioMicro systems, Salt Lake City, UT, USA)에 기포가 생기지 않도록 하여 주입하였다. Hybridized slide glass는 MAUI hybridization 12-bay system (BioMicrosystem, Salt Lake City, UT, USA)에 넣고 건조를 방지하기 위하여 수분 cover를 덮어, 최종적으로 62°C의 배양기에서 12 시간 동안 hybridization을 실시하였다. Hybridization을 마친 슬라이드는 1차 wash buffer (0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS])에서 5분, 2차 wash buffer에서 5분, 그리고 3차 wash buffer에서 10분간 세척한 후 3,000 rpm에서 20 초간 원심분리하여 건조시켰다. Hybridization을 마친 슬라이드는 GenePix 4000B scanner (Axon instrument, Foster City, CA, USA)를 사용하여 scanning을 실시하였으며 scan image는 NimbleScan 2.4 (Roche NimbleGen, Madison, WI, USA)를 사용하여 분석하였다. Expression profiling, clustering, ontology와 관련된 분석은 GeneSpring GX ver. 7.3.1 (Agilent Technology) software를 사용하여 진행하였다. Micorarray 분석에서 2배 이상의 유전자 발현의 변화를 보인 7개의 유전자를 선정하였다.

2) Reverse transcription-polymerase chain reaction 분석

(1) First-strand cDNA 합성

떼어낸 심장조직에서 추출한 총 RNA는 역전사효소를 이용한 first-strand cDNA 합성을 위하여 사용되었다. 역전사 반응을 위하여 3 µg의 총 RNA에 4 µL의 반응 buffer (Promega, Madison, WI, USA), 5 µL의 dNTPs(각각 2 mM), 2 µL의 oligo (dT) primer (10 µM), 0.5 µL의 RNasin RNA 분해효소 저해제(40 U/µL, Promega), 1 µL

의 몰로니 설치류 육종 바이러스 역전사효소(200 U/µL, Promega)를 첨가하여 20 µL의 반응부피로 42°C에서 1.5 시간 동안 반응시켰다. 합성된 first-strand cDNA는 80 µL의 3차 증류수로 희석한 다음 Gene Fishing TM PCR을 위해 -20°C에 보관하였다.

(2) Reverse transcription-polymerase chain reaction 확인

First-strand cDNA는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 이용하여 보정하였으며 보정된 cDNA를 template로 사용하였다. 2-4 µL의 희석된 first-strand cDNA(약 50 ng)에 1 µL의 forward primer (10 µM), 1 µL의 reverse primer (10 µM), 10 µL의 2 Master Mix (Seegene, Seoul, Korea)를 첨가하여 20 µL의 반응부피로 PCR 반응을 수행하였다. 94°C에서 5분간 초기 변성 후 94°C에서 40초, 60°C에서 40초, 72°C에서 40초를 20-25 cycles 수행 후 72°C에서 5분간 최종 expansion 후 정지시켰다. 증폭된 PCR 산물은 ethidium bromide이 포함된 2% 아가로스 겔에서 전기영동을 통하여 분리하였다.

cDNA의 첫 번째 가닥의 결과는 GAPDH 유전자에 의해 표준화되었다. 그 표준화된 cDNA는 PCR과정에서 주형으로 사용되었다.

ACE를 위한 특정한 프라이머는 5'-GEE CAC CGA CTC TAC AAC AT-3' (forward)와 5'-ATG GGA CAC TCC TCT GTT GG-3' (reverse)이다. ET-1을 위한 특정한 프라이머는 5'-TCTCGGAGAG CAGAGACACA-3' (forward)와 5'-TGGACTTTGGA GTTTC TCCCT-3' (reverse)이다. angiotensin II receptor (AT II R)을 위한 특정한 프라이머는 5'-TGCGGTGATGTCACTATGG-3' (forward)와 5'-AAATGTCCTCGTGGTAGGGT-3' (reverse)이다. Neutrophil cytosolic factor (NCF)를 위한 특정한 프라이머는 5'-GGC CAA AGA TGG CAA GAA TA -3' (forward)와 5'- ACC CTT CTC GTA GTC AGC GA -3' (reverse)이다.

3) Western blot분석

조직을 pH 8.0의 0.5 mM ethylenediamine tetraacetic

acid, 0.25 M sucrose, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM Na₄VO₃와 protease inhibitor cocktail (Roche-Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)이 포함된 pH 7.4의 10 mM Tris HCl 완충용액을 사용하여 균질화하였다. 원심분리 후, 상층액을 도데실 황산나트륨 폴리 아크릴아미드 젤 전기영동(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)에 사용하였다. 샘플은 단백질의 함량을 25 µg 으로 동등하게 맞추었으며, 10%의 polyacrylamide gel을 사용하여 단백질의 크기별로 분리하였다. 단백질이 있는 아크릴아마이드 젤은 polyvinylidene difluoride (PVD) membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 이동시켰으며, 25 mM Tris와 192 mM glycine을 포함하는 pH 8.4의 transfer buffer를 사용하였다. PVD membranes은 5%의 탈지분유와 0.1%의 Tween 20이 포함된 tris buffered saline으로 실온에서 1시간 동안 차단하였고, ACE, endothelin (ET)-1, angiotensin II receptor (AT II R), NCF, caspase-3, Bax, Bcl-2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)의 1차 항체는 4°C에서 하룻밤 같은 온도로 유지시켰다. Membrane은 겨자무과산화효소 결합 2차 항체(Cell Signaling Technology)로 1시간 동안 실온에서 유지시켰다. 세척한 뒤, membrane은 ECL-detection kit system (Amersham Biosciences Biotechnology, Piscataway, NJ, USA)을 사용하여 화학발광반응에 의해 가시화되었다.

조직으로부터 가용화된 세포 용해물은 Pierce BCA reagents (Pierce, Rockford, IL, USA)와 섞어 30분 동안 37°C에서 유지하였다. 단백질의 함량은 Molecular Devices ELISA reader (Amersham Pharmacia Biotechnology, Sunnyvale, CA, USA)로 562 nm에서 소 혈청 알부민 표준곡선을 이용하여 정량하였다.

8. 통계학적 분석

결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였고, 군 간의 비교를 위해 ANOVA test와 Bonferroni 교정을 시행하였고, 통계는 SPSS ver. 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다. p-value 0.05 이하를 의미 있다고 하였다.

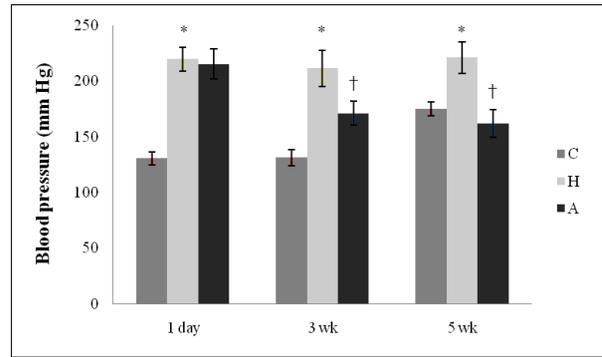


Fig. 2. Systolic blood pressure after angiotensin-converting enzyme (ACE)-interfering RNA (iRNA) treatment. Systolic blood pressure was significantly decreased in the A group compared with the H group in weeks 3 and 5. C, control; H, hypertension; A, ACE-iRNA group. *p < 0.05 significantly different C group vs. H group. †p < 0.05 significantly different H group vs. A group.

결 과

1. Angiotensin-converting enzyme-interfering RNA 치료 후 수축기혈압의 변화

수축기혈압은 H군이 C군에 비해 3주(131.3 ± 7.4 mm Hg vs. 211.5 ± 16.1 mm Hg), 5주(175 ± 6.2 mm Hg vs. 221.2 ± 14.2 mm Hg)째 증가하였고, A군에서 H군에 비해 3주(211.5 ± 16.1 mm Hg vs. 171.3 ± 10.8 mm Hg), 5주(221.2 ± 14.2 mm Hg vs. 162.0 ± 12.5 mm Hg)에 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

2. Angiotensin-converting enzyme-interfering RNA 치료 후 각 그룹 간에 체중과 장기무게 비교

체중은 H군에서 C군에 비해 3주(368.7 ± 27.0 g vs. 346.8 ± 3.9 g), 5주(392.8 ± 8.4 g vs. 353.3 ± 10.6 g)째에 유의하게 감소하였다. LH의 무게는 C군에 비해 H군에서 3주(0.74 ± 0.03 g vs. 1.0 ± 0.05 g), 5주(0.799 ± 0.06 g vs. 1.012 ± 0.02 g)째에 유의하게 증가하였다. A군에서 H군에 비해 적었으나 통계적으로 유의한 차이가 없었다. LH/TW의 비는 C군에 비해 H군에서 3주(0.2 ± 0.01 vs. 0.29 ± 0.01), 5주(0.2 ± 0.01 vs. 0.28 ± 0.01)에 유의하게 증가하였고 H군과 A군과는 유의한 차이가 없었다. 신장의 무게와

Table 1. Total weight, left heart weight, left heart/total weight, kidney weight, kidney weight/total weight after ACE-iRNA treatment

	TW (g)	LH (g)	LH/TW	Kd (g)	Kd/TW
3 wk					
C	368.7 ± 27.0	0.74 ± 0.03	0.2 ± 0.01	1.51 ± 0.09	0.041 ± 0.002
H	337.0 ± 12.3*	1.0 ± 0.05*	0.29 ± 0.01*	1.44 ± 0.09	0.042 ± 0.002
A	346.8 ± 3.9	0.98 ± 0.02	0.28 ± 0.05*	1.42 ± 0.05	0.042 ± 0.002
5 wk					
C	392.8 ± 8.4	0.799 ± 0.06	0.20 ± 0.01	1.57 ± 0.09	0.040 ± 0.003
H	353.3 ± 10.6*	1.012 ± 0.02*	0.28 ± 0.01*	1.54 ± 0.09	0.044 ± 0.003
A	355.2 ± 15.5	1.006 ± 0.03*	0.29 ± 0.01*	1.63 ± 0.01	0.046 ± 0.003

Values are presented as mean ± standard deviation.

TW, total weight; LH, left heart; Kd, kidney; C, control; H, hypertension; A, angiotensin-converting enzyme-interfering RNA group.

*p < 0.05 significantly different C group vs. H group.

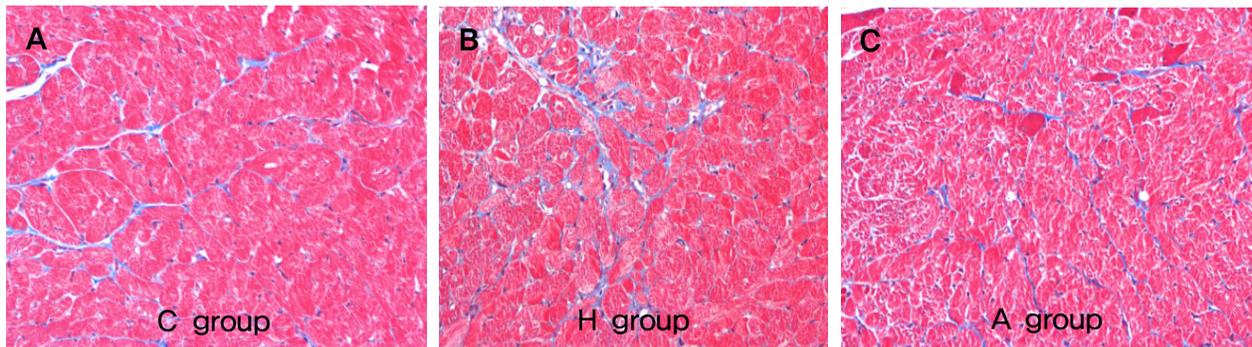


Fig. 3. Change of collagen by Masson's Trichrome staining after angiotensin-converting enzyme (ACE)-interfering RNA (iRNA) treatment (×200). (A, B) Collagen penetration in the H group was significantly higher than that in the C group. (C) There was no statistically significant difference between the H and the A group. C, control; H, hypertension; A, ACE-iRNA group.

신장/체중 비는 세 군 간에 유의한 차이가 없었다(Table 1).

3. Angiotensin-converting enzyme-interfering RNA 치료 후 조직학 검사 소견

콜라겐 penetration은 H군에서 C군에 비해 상당히 증가되었으나 A군과는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Fig. 3).

4. Angiotensin-converting enzyme-interfering RNA 치료 후 혈청 Angiotensin-converting enzyme치 비교

혈청 ACE치는 5주에 H군에서 192.3 ± 1.9 U/mL, C군에서 182.0 ± 1.4 U/mL로 H군에서 C군에 비해 약간 증가하였으나, 유의한 통계학적 차이는 없었다. A군과 H군 사이에도 유의한 차이가 없었다(Table 2).

Table 2. Serum angiotensin-converting enzyme levels after ACE-iRNA treatment (U/mL)

	ACE	C group	H group	A group
3 wk		231.7 ± 7.8	194.5 ± 8.1	196.0 ± 7.9
5 wk		182.0 ± 1.4	192.3 ± 1.9	190.8 ± 19.6

Values are presented as mean ± standard deviation. p > 0.05.

ACE, angiotensin-converting enzyme; iRNA, interfering RNA; C, control; H, hypertension; A, ACE-iRNA group.

5. Angiotensin-converting enzyme-interfering RNA 치료 후 혈청 안지오펜신치 비교

혈청 안지오펜신치는 C군에 비해 H군에서 1일(0.57 ± 0.34 pg/mL vs. 1.18 ± 0.23 pg/mL), 3주(0.59 ± 0.18 pg/mL vs. 3.66 ± 2.2 pg/mL), 5주(0.52 ± 0.16 pg/mL vs. 3.1 ± 1.78 pg/mL)째에 유의하게 증가하였고, A군은 H군에 비해

Table 3. Serum angiotensin levels after ACE-iRNA treatment (pg/mL)

Angiotensin	C	H	A
1 day	0.57 ± 0.34	1.18 ± 0.23*	0.68 ± 0.07†
3 wk	0.59 ± 0.18	3.66 ± 2.2*	0.44 ± 0.04†
5 wk	0.52 ± 0.16	3.1 ± 1.78*	0.77 ± 0.07†

Values are presented as mean ± standard deviation. ACE, angiotensin-converting enzyme; iRNA, interfering RNA; C, control; H, hypertension; A, ACE-iRNA group. *p < 0.05 significantly different C group vs. H group. †p < 0.05 significantly different H group vs. A group.

1일(1.18 ± 0.23 pg/mL vs. 0.68 ± 0.07 pg/mL), 3주(3.66 ± 2.2 pg/mL vs. 0.44 ± 0.04 pg/mL), 5주(3.1 ± 1.78 pg/mL vs. 0.77 ± 0.07 pg/mL)째에 유의하게 감소하였다(Table 3).

6. Angiotensin-converting enzyme-interfering RNA 치료 후 high sensitive C reactive protein 비교

High sensitive C reactive protein는 3주, 5주째 모두 세 군 간에 유의한 차이가 없었다(Table 4).

7. Western blot분석 결과

ACE와 ET-1 단백질 농도는 3주, 5주에 H군에서 C군에 비해서 유의하게 증가하였고, A군에서 H군에 비해 5주에 유의하게 감소하였다(Fig. 4A, B). AT II R과 NCF는 3주와 5주에 H군에서 유의하게 증가하였고, A군에서는 H군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 5A, B). Caspase-3는 3주와 5주에서 H군에서 유의하게 증가하였고, A군에 비해 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Fig. 6A). Bax는 ACE-interfering RNA (iRNA) 치료 후 3주에 유의하게 감소하였다(Fig. 6B). Bcl-2는 3주, 5주에 H군에서

Table 4. hs-CRP levels after ACE-iRNA treatment (mg/L)

hs-CRP	C	H	A
3 wk	0.59 ± 0.04	0.61 ± 0.01	0.61 ± 0.04
5 wk	0.65 ± 0.03	0.63 ± 0.04	0.61 ± 0.04

Values are presented as mean ± standard deviation. p > 0.05. hs-CRP, high sensitive C reactive protein; ACE, angiotensin-converting enzyme; iRNA, interfering RNA; C, control; H, hypertension; A, ACE-iRNA group.

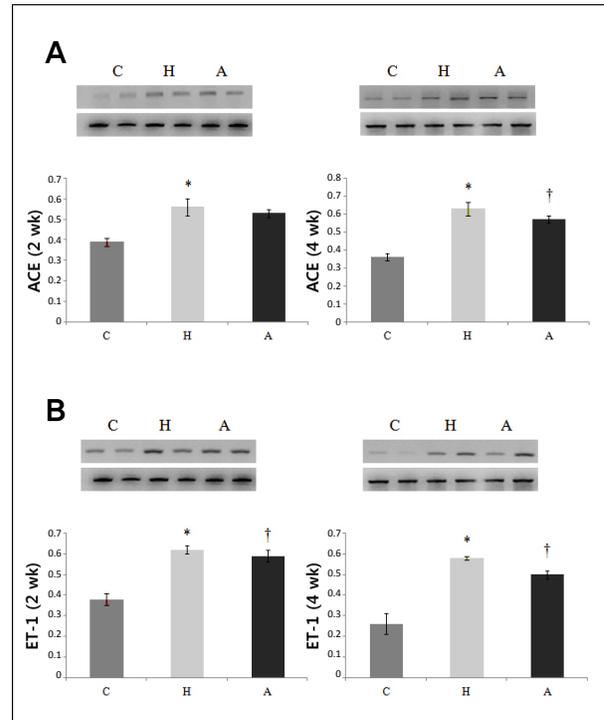


Fig. 4. Angiotensin-converting enzyme (ACE) and endothelin (ET)-1 protein content were significantly higher in the H group compared with that in the C group in weeks 3 and 5. (A) ACE protein contents were significantly lower in the A group compared with the H group in week 5. (B) ET-1 protein contents were significantly lower in the A group compared with the H group in weeks 3 and 5. C, control; H, hypertension; A, ACE-interfering RNA group. *p < 0.05 significantly different C group vs. H group. †p < 0.05 significantly different H group vs. A group.

C군에 비해 유의하게 증가하였고, A군에서 H군에 비해 유의한 감소를 보였다(Fig. 6C).

고 찰

RAS는 고혈압 조절의 주요한 타겟으로 임상적으로 고혈압 치료제로 ACE 억제제나 안지오텐신 수용체 차단제가 많이 사용되고 있다. 이러한 약제들은 심혈관계뿐만 아니라 다른 여러 기관에도 강압 효과 이외의 다른 기전에 의해 기관 보존의 효과를 보이고 있다. 그러나 짧은 반감기 때문에 환자들은 매일 한두 차례 약을 복용해야 되는 문제점이 있으며 이것이 환자들의 유순도를 떨어뜨리

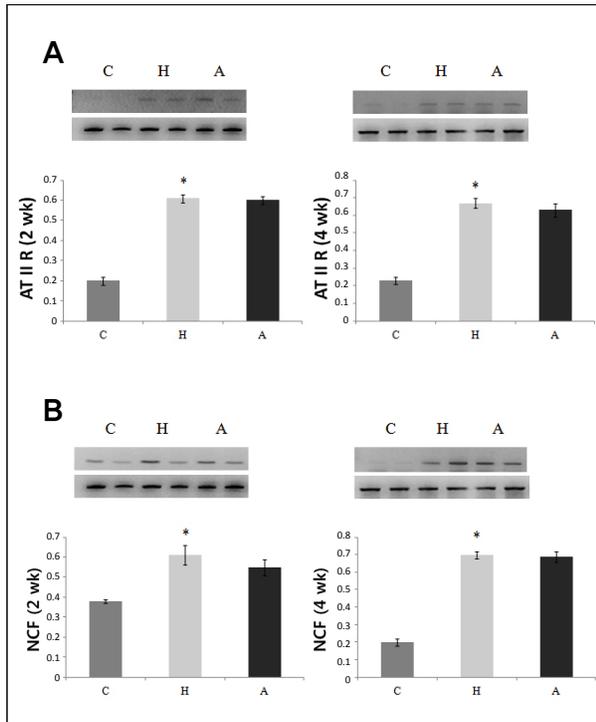


Fig. 5. (A) Angiotensin II receptor (AT II R) type 1A and (B) neutrophil cytosolic factor (NCF) 1 protein levels were significantly higher in the H group compared with the C group in weeks 3 and 5 ($p < 0.05$) and not significantly different in the A group compared with the H group in weeks 3 and 5. C, control; H, hypertension; A, angiotensin-converting enzyme-interfering RNA group. * $p < 0.05$ significantly different C group vs. H group.

고, 치료의 효과를 반감시키는 주요한 이유로 작용하고 있다.^{11,12} 이에 대하여 한번 치료로 장기적으로 유지될 수 있는 새로운 치료법의 개발이 절실한 상태이다.¹³

본 연구에서는 고혈압의 기전에 중요하게 작용하는 ACE를 shRNA를 이용하여 유전자 레벨에서 억제하고자 하며 생체 내에서 수 주 내지 수개월간 지속될 수 있는 렌티바이러스 벡터를 이용함으로써 이러한 문제점을 해결하고자 하였다. 본 연구에서 SHR에 ACE를 차단하는 shRNA를 렌티바이러스를 통해서 투여한 후 시기에 따라서 혈액학적인 변화, 조직학적인 변화, 시기별 유전자 발현의 변화를 연구함으로써 이러한 치료가 현재 사용되는 고혈압 치료를 대체할 새로운 치료법으로 사용될 수 있는지 알아보려고 하였다.

렌티바이러스 벡터 내에 ACE를 타겟으로 하는 iRNA

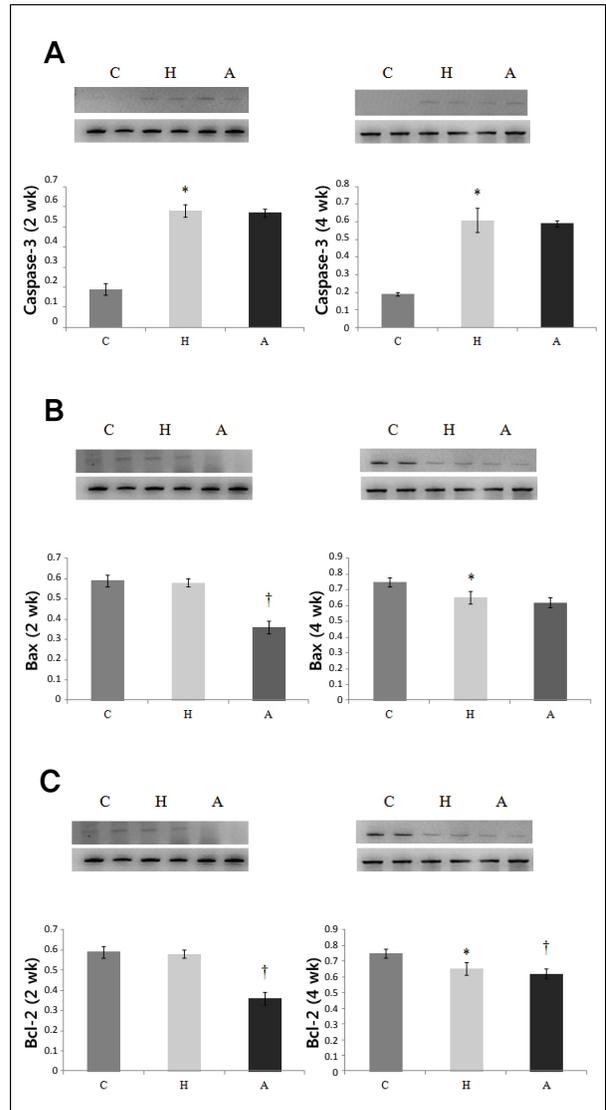


Fig. 6. Caspase-3, Bax, and Bcl-2 protein contents by western blot analysis after angiotensin-converting enzyme (ACE)-interfering RNA (iRNA) treatment. (A) Caspase-3 protein contents were significantly higher in the H group compared with that in the C group in weeks 3 and 5 and not significantly different in the A group compared with the H group in weeks 3 and 5. (B) Bax protein contents were significantly lower in the A group compared with the C group in week 3. (C) Bcl-2 protein contents were significantly higher in the H group compared with that in the C group in weeks 3 and 5 and significantly lower in the A group compared with the A group in weeks 3 and 5. C, control; H, hypertension; A, ACE-iRNA group. * $p < 0.05$ significantly different C group vs. H group. † $p < 0.05$ significantly different H group vs. A group.

를 제작하여 변형시켜 그 유전자 발현을 억제하였다.^{4,5)} ACE는 안지오텐신 II를 안지오텐신 I으로 변환시키는 역할과 bradykinin을 불활성 단백질로 변환시키는 역할을 한다. 혈압을 상승시키는 역할을 하는 안지오텐신 I치를 증가시키고, 혈압을 감소시키는 역할을 하는 bradykinin치를 감소시키므로 결과적으로 ACE는 혈압을 증가시킨다. 그러므로 ACE의 단백질 발현을 감소시키려는 시도에 의해 혈압이 감소되는 효과를 기대할 수 있다. 제작한 렌티바이러스의 shRNA는 타깃 세포의 핵에서 발현되어 세포질로 나와 ACE의 mRNA와 상보적인 서열을 가지므로 서로 결합하여 이중 가닥을 형성하게 된다.²⁾ 이중 가닥 RNA는 dicer에 의해 분해되므로 유전자 침묵이 일어난다.¹³⁾ 이 과정에서는 바이러스의 유전자가 타깃 세포에 들어가는 효율이 실험결과에 큰 영향을 미치게 된다. 또한 이 shRNA가 세포 내의 다른 유전자들에 영향을 미치지 않아야 하고, 다른 유전자들에 영향을 미칠 경우 발암 유전자가 될 수 있다.

이번 연구에서 SHR에서 혈압, 혈청 안지오텐신치, ACE, ET-1, AT I R, NCF, caspase-3 Bax, Bcl-2 단백질 농도가 유의하게 증가하였고, ACE-iRNA 치료 후 혈압, 혈청 안지오텐신, ACE, ET-1, Bcl-2 Bax 단백질 발현이 유의하게 감소함을 알 수 있었다. Bax/Bcl-2 단백질 농도비의 감소도 관찰되었다.

안지오텐신 II는 혈압 외의 심혈관계 조절에 많이 관여하고 있다. 이것은 동맥벽에 있는 평활근세포 증식을 촉진하고¹⁴⁾ 콜라겐 축적을 증가시키고, 기질 성분에 영향을 미친다.¹⁵⁾ 동맥벽 구조와 두께를 변화시킨다. ET-1을 자극하고,¹⁶⁾ nitric oxide와 내피기능 bioavailability에 영향을 미친다.¹⁷⁾ 본 연구에서는 ACE-iRNA 치료 후 혈중 안지오텐신치를 낮추므로 혈압의 감소를 초래하였고, ET-1 유전자 발현의 감소를 초래하였다.

Fortuno 등¹⁸⁾은 다 자란 SHR에서 세포사멸 증가와 ACE의 과활동과의 관련이 있음을 발표하였다. SHR에서 Bcl-2와 Bax의 유전자 발현이 증가되었고, Losartan 치료 후 Bcl-2와 Bax의 유전자 발현과 Bcl-2/Bax 비는 유의하게 감소하였다.¹⁹⁾ 본 연구에서도 SHR에서 caspase 3,

Bax, Bcl-2의 세포사멸 관련 유전자 발현이 유의하게 증가하였고, ACE-iRNA 치료 후에 Bax, Bcl-2 유전자들의 발현이 감소함을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 좌심실비대가 동반된 SHR 쥐에서 심근세포사멸의 증가가 보고된 다른 논문¹⁹⁾의 결과와 일치하였다. 세포사멸은 심근세포 질량의 감소와 관련된 기전이고 간질 섬유화와 안정된 보상에서 고혈압 심질환으로의 전환을 동반한다.¹⁹⁾

본 연구자는 선행 연구에서 SHR 쥐에서 ACE, AT II R, NCF 단백질 발현이 대조군에 비해서 유의하게 증가하였고, losartan 치료 후 ACE 와 AT II R IA 단백질 발현이 유의하게 감소함을 알 수 있었다.²⁰⁾

siRNA와 shRNA는 생체에 존재하는 내재 핵산분해효소에 의해 쉽게 분해되어 약효 지속성이 떨어질 뿐만 아니라, 강한 음전하를 띠고 있어서 세포막을 쉽게 투과하기 어려운 단점이 있기 때문에 표적세포에 효과적으로 침투하고 지속적으로 발현할 수 있는 약물 전달체가 중요하다.^{1,3)} 그러나 약물 전달체 중에서 많은 연구가 이루어지는 플라스미드는 세포분열을 하지 않거나 느리게 진행되고 있는 세포에 쉽게 도입할 수 없는 단점이 있어서 이를 극복하기 위해 바이러스 벡터가 개발되었다.^{1,2)}

아데노바이러스는 효과적으로 세포 내로 투입되고 고역가로 생산될 수 있는 장점이 있으나 면역반응을 초래하고 안정적으로 숙주 유전체에 통합이 되지 않아 그 작용기간이 짧은 단점이 있다.²¹⁾ He 등²¹⁾은 자연적으로 유발된 고혈압 쥐에서 아데노바이러스 벡터를 이용하여 안지오텐신 전환효소 유전자를 억제하여 그 효과를 입증했으나 지속적인 효과를 보기 위해 2주 간격으로 shRNA를 재투여하였다. 이에 반해 렌티바이러스 벡터는 기존의 레트로바이러스 벡터와는 달리 분열하지 않는 세포에도 높은 효율로 유전자 전달이 가능하며, 전달된 유전자를 장기간 발현시킬 수 있다는 장점이 있다.⁶⁾ 이러한 장점을 근거로 본 연구에서는 렌티바이러스 벡터를 사용하였으며 현재까지 렌티바이러스를 이용하여 고혈압에서 RNAi를 이용한 방법은 보고되지 않았다.

한편 중국의 He 등²¹⁾에 의해 수행된 아데노바이러스를 이용한 ACE-iRNA 연구에서는 혈청 ACE와 심근, 동맥

신장, 폐에서의 ACE mRNA 발현량도 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 수축기혈압도 감소하였으며, ACE-iRNA 투여에 의한 효과로 감소된 혈압이 14일간이나 유지되었으나 장기적으로 혈압을 감소시키지 못했다. 본 연구와 차이점을 보면 recombinant 아데노바이러스 벡터를 사용하여 항고혈압 효과는 2주 정도 밖에 유지되지 못했다. 본 연구에서는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 5주간 항고혈압, 혈청 안지오텐신치의 감소, 여러 유전자(ACE, ET-1, Bax, Bcl-2) 발현의 감소 효과가 지속됨을 확인할 수 있었다. ACE-iRNA 치료 후 심근세포사멸이 감소됨을 알 수 있었다.

렌티바이러스를 벡터로 이용하여 주입된 유전자는 수개월 이상 발현이 가능하므로 RNAi를 장기간 유지시킬 수 있는 유리한 장점을 가진다. 본 연구에서 shACE target 수와 투여 횟수를 증가시키면 해부학적, 유전자 발현의 변화에 더 좋은 연구결과가 나올 것으로 생각한다.

Vazquez 등²²⁾의 연구에서는 중국 hamster 난소세포에 AT1a receptor (AT1aR)를 타겟으로 하는 dsRNA를 형질 주입시킨 결과 AT1aR의 발현을 최고 80%까지 감소시킬 수 있었다.

Phillips 등²³⁾은 antisense 뉴클레오타이드 기법을 이용하여 고혈압 쥐에서 AT1aR의 발현을 억제하여 뚜렷하게 혈압이 떨어지는 효과를 증명하였다. 그러나 이러한 방법은 낮은 성공률과 높은 비용, 그리고 무엇보다 짧은 지속 시간과 만족스럽지 못한 특이성 때문에 적용하는데 문제점으로 지적되고 있다. 그러나 이에 반해서 최근에 많은 각광을 받고 있는 RNAi 기법은 낮은 비용에 높은 특이성을 가지고 지속시간이 길기 때문에 포유동물의 유전자 연구, 바이러스질환, 종양 연구 등 다양한 분야에서 광범위하게 사용되고 있다.²⁴⁾

최근 보고된 한 연구에 의하면, 심혈관질환 환자들은 줄기세포 치료와 유전자 치료를 동시에 하는 것이 더 이익이라고 하였다.²⁵⁾ 후속 연구로서 ACE-iRNA를 이용한 유전자 치료와 줄기세포 치료를 동시에 진행하면 더 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이다.

결론적으로 본 연구의 결과는 ACE silencing은 의미 있는 항고혈압, 혈청 안지오텐신치의 감소, 여러 유전자

(ACE, ET-1, Bax, Bcl-2) 발현의 감소 효과가 지속됨을 확인할 수 있었다.

본 연구의 제한점은 shACE target sequence 5개를 찾았으나 유전자 억제를 50% 정도 밖에 하지 못했고, shRNA 제작비가 비싸서 1회 투여했다. 쥐꼬리 정맥으로 1 mL 이상을 투여할 수가 없어서 주입하는 shRNA 양의 제한점이 있었다. 투여 용량을 증가시키고 투여 횟수를 증가시키면 항고혈압 작용, 조직학적 변화, 유전자 발현의 변화가 좀 더 뚜렷할 수 있을 것으로 생각한다.

사용하는 바이러스 벡터에 따라 항고혈압, 유전자 발현에 미치는 영향이 다르므로 바이러스 벡터에 대한 후속 연구가 더 필요할 것으로 생각된다. 고혈압에 관련된 유전자 종류가 많아서 관련 유전자를 같이 silencing하는 방법도 고려되어야 할 것이다.^{26,27)}

결론적으로 본 연구는 이러한 연구는 많은 장점과 그 활용 범위가 광범위함에도 불구하고 국내는 물론 해외에서도 많은 연구가 시도되지 못한 실정이므로 이와 같은 연구결과는 향후 약물개발에 큰 도움이 될 수 있을 뿐 아니라 유전자 치료를 위한 기초자료로도 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: RNA interference는 이중 가닥의 RNA (double-stranded RNA)가 dicer에 의해 절단되어 생성되는 21-25 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA조각으로 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 단백질 발현을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 본 연구에서는 자연적으로 유발된 고혈압 쥐(spontaneously hypertensive rat, SHR) 모델에서 안지오텐신 전환효소(angiotensin-converting enzyme, ACE)에 대한 small hairpin RNA (shRNA)가 주입된 렌티바이러스 벡터를 투여하여 혈역학적, 해부학적 변화를 알아보고, 이와 같은 조절 효과가 조직학적 변화 또는 유전자 수준에서 어느 시기에 어느 정도 일어나는지를 규명하고자 하였다.

방법: 12주의 자성 성숙 Wistar-Kyoto 백서를 대조군으로 SHR을 고혈압군(H군)으로 shRNA가 주입된 렌티바

이러스 박터를 투여한 치료군을 ACE-interfering RNA (iRNA) (A군)으로 하였다. shRNA 투여는 렌티바이러스에 형질주입된 상태로 1 mL를 실험 시작일에 SHR의 꼬리에 정맥투여하였다. 대조군 및 실험군 모두 21일, 35일에 도살하였다. 혈청 알도스테론, ACE, 안지오텐신치를 측정하였고, reverse transcription-polymerase chain reaction과 Western blot분석을 이용하여 endothelin (ET)-1, ACE, angiotensin II receptor (AT II R) 1A, neutrophil cytosolic factor (NCF), caspase-3, Bax, Bcl-2 유전자 발현을 측정하였다.

결과: 혈압은 H군에서 유의하게 증가하였고 A군에서 유의하게 감소하였다. 혈청 안지오텐신치는 H군에서 유의하게 증가하였고, A군에서 유의하게 감소하였다. ACE 농도는 세 군 간에 유의한 차이가 없었다. ACE 농도는 5주에, ET-1와 Bcl-2 단백질 농도는 ACE-iRNA 치료 후 3주, 5주째 유의하게 감소하였다. Bax 단백질 농도는 ACE-iRNA 치료 후 3주에 유의하게 감소하였다. AT II R, NCF, caspase-3 단백질 농도는 ACE-iRNA 치료 후 유의한 감소가 없었다.

결론: ACE에 대한 shRNA가 주입된 렌티바이러스 박터는 항고혈압 효과가 뚜렷하였고, ACE, ET-1, Bax, Bcl-2 유전자 발현의 감소를 초래하였다. 향후 shRNA 주입 양을 증량시킨 연구가 추후에 이루어져야 할 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 2010년 대한고혈압학회 연구비 수혜로 이루어졌다.

이해상충: 해당사항 없음.

References

1. Matzke M, Matzke AJ, Kooter JM. RNA: guiding gene silencing. *Science*. 2001;293:1080-3.
2. Hannon GJ. RNA interference. *Nature*. 2002;418:244-51.
3. Zamore PD. RNA interference: big applause for silencing in Stockholm. *Cell*. 2006;127:1083-6.
4. Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2010;58:107-19.
5. Trittibach P, Barker SE, Broderick CA, Natkunarajah M, Duran Y, Robbie SJ, et al. Lentiviral-vector-mediated expression of murine IL-1 receptor antagonist or IL-10 reduces the severity of endotoxin-induced uveitis. *Gene Ther*. 2008;15:1478-88.
6. Jazwa A, Jozkowicz A, Dulak J. New vectors and strategies for cardiovascular gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2007;7:7-23.
7. Navar LG, Kobori H, Prieto MC, Gonzalez-Villalobos RA. Intratubular renin-angiotensin system in hypertension. *Hypertension*. 2011;57:355-62.
8. Ferreira AJ, Murca TM, Fraga-Silva RA, Castro CH, Raizada MK, Santos RA. New cardiovascular and pulmonary therapeutic strategies based on the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor axis. *Int J Hypertens*. 2012;2012:147825.
9. Gunaruwan P, Maher A, Williams L, Sharman J, Schmitt M, Campbell R, et al. Effects of bradykinin on venous capacitance in health and treated chronic heart failure. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116:443-50.
10. Sink KM, Leng X, Williamson J, Kritchevsky SB, Yaffe K, Kuller L, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and cognitive decline in older adults with hypertension: results from the Cardiovascular Health Study. *Arch Intern Med*. 2009;169:1195-202.
11. Martinez MV, Matulevicius S, Chin K. The association of right ventricular function and pulmonary arterial compliance in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(13 Suppl):E1605.
12. Arif H, Aijaz B, Islam M, Aftab U, Kumar S, Shafqat S. Drug compliance after stroke and myocardial infarction: a comparative study. *Neurol India*. 2007;55:130-5.
13. Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, et al. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*. 2001;107:465-76.
14. Freeman EJ, Ferrario CM, Tallant EA. Angiotensins differentially activate phospholipase D in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Am J Hypertens*. 1995;8:1105-11.
15. Lopez B, Gonzalez A, Varo N, Laviades C, Querejeta R, Diez

- J. Biochemical assessment of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Hypertension*. 2001;38:1222-6.
16. An SJ, Boyd R, Wang Y, Qiu X, Wang HD. Endothelin-1 expression in vascular adventitial fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290:H700-8.
 17. Yokoyama H, Averill DB, Brosnihan KB, Smith RD, Schiffrin EL, Ferrario CM. Role of blood pressure reduction in prevention of cardiac and vascular hypertrophy. *Am J Hypertens*. 2005;18:922-9.
 18. Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC, Diez J. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT1 blockade with losartan. *Hypertension*. 1998;32:280-6.
 19. Fortuno MA, Zalba G, Ravassa S, D'Elom E, Beaumont FJ, Fortuno A, et al. p53-mediated upregulation of BAX gene transcription is not involved in Bax-alpha protein overexpression in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;33:1348-52.
 20. Cha JH, Lee HR, Kim KC, Cho MS, Hong YM. Changes of gene expressions in spontaneously hypertensive rat model after losartan treatment. *Korean Circ J*. In press 2012.
 21. He J, Bian Y, Gao F, Li M, Qiu L, Wu W, et al. RNA interference targeting the ACE gene reduced blood pressure and improved myocardial remodelling in SHR. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116:249-55.
 22. Vazquez J, Correa de Adjoulian MF, Summers C, Gonzalez A, Diez-Freire C, Raizada MK. Selective silencing of angiotensin receptor subtype 1a (AT1aR) by RNA interference. *Hypertension*. 2005;45:115-9.
 23. Phillips MI, Mohuczy-Dominiak D, Coffey M, Galli SM, Kimura B, Wu P, et al. Prolonged reduction of high blood pressure with an in vivo, nonpathogenic, adeno-associated viral vector delivery of AT1-R mRNA antisense. *Hypertension*. 1997;29(1 Pt 2):374-80.
 24. Puddu GM, Cravero E, Ferrari E, Muscari A, Puddu P. Gene-based therapy for hypertension: do preclinical data suggest a promising future? *Cardiology*. 2007;108:40-7.
 25. Gupta R, Tongers J, Losordo DW. Human studies of angiogenic gene therapy. *Circ Res*. 2009;105:724-36.
 26. Shim TJ, Choi EJ, Park KJ, Kim YJ, Kim SJ, Lee SY, et al. Establishment of a eNOS gene therapy model using PLGA nanosphere in spontaneous hypertensive rat. *J Korean Soc Hypertens*. 2010;16:28-38.
 27. Kim SJ, Kim MG, Choue CW, Kim KS, Song JS, Bae JH, et al. Association of angiotensin converting enzyme, angiotensinogen, and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms with left ventricular hypertrophy in Korean hypertensive patients. *J Korean Soc Hypertens*. 2005;11:44-52.