

# 메산지움 세포에서 Transforming Growth Factor-β1 Antisense를 이용한 섬유화 물질의 억제

아주대학교 의과대학 신장내과학교실

신규태·김흥수

## 〈요 약〉

**배 경**: 당뇨병성 신증에서 transforming growth factor-β1 (TGF-β1)이 메산지움 세포에서 증가되고, 이렇게 증가된 TGF-β1은 신사구체에서 세포의 기질을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 메산지움 세포 자체도 고농도의 당에 배양하면 TGF-β1이 증가되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 adenovirus vector를 이용하여 antisense TGF-β1 유전자를 고농도의 당에 배양한 메산지움 세포에 전달하고, 이렇게 하는 것이 TGF-β1을 비롯한 여러 섬유화 물질에 어떠한 영향을 미치는 지를 관찰하고자 하였다.

**방 법**: TGF-β1 mRNA의 start codon을 중심으로 -162에서 +168까지의 330 bp의 DNA를 분리하고, 이를 antisense 및 sense방향으로 adenovirus vector에 삽입한 다음, 이 adenovirus를 고농도의 당 (450 mg/dL)에 배양한 메산지움 세포에 넣은 후, TGF-β1 및 다른 여러 섬유화 물질의 mRNA 발현을 Reverse transcription-polymerase chain reaction으로 관찰하였다.

**결 과**: TGF-β1 antisense로 처리한 메산지움 세포에서는 TGF-β1이 의미있게 감소하였으며, 또한 collagen, fibronectin, PDGF-B와 같은 다른 물질도 이차적으로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

**결 론**: 본 연구에서는 adenovirus vector를 이용한 TGF-β1 antisense치료가 고농도의 당에 배양된 메산지움 세포에서 TGF-β1을 비롯한 여러 섬유화 물질을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 관찰하였다.

## 서 론

만성 신부전은 신조직에 세포외 기질 (extracellular matrix)이 축적되어 조직의 섬유화가 일어나면서 지속적으로 악화되는 질환으로서, 당뇨병성 신증이 가장 많은 원인으로 알려져 있다. 최근 여러 연구에 의해 만성 신부전의 진행에 대한 여러 기전이 점차 밝혀지고 있으며, 그 중 transforming growth factor-β1

(TGF-β1)이 신조직의 섬유화를 일으켜 신부전을 진행시킨다는 것이 가장 잘 확립되어 있다<sup>1)</sup>. 또한 여러 연구에서 메산지움 세포를 고농도의 당에서 배양하면 TGF-β1을 비롯한 여러 신부전 진행에 관여하는 물질들이 증가하는 것으로 알려져 있고<sup>2-4)</sup>, 이러한 현상이 당뇨병성 신증이 진행되는 기전으로 알려져 있다.

본 연구에서는 고농도의 당에 노출된 메산지움 세포에 adenovirus vector를 이용하여 TGF-β1 antisense 유전자를 주입하고, 그 결과로 생성된 TGF-β1 antisense RNA가 만성 신부전 진행에 관여하는 여러 물질들에 어떠한 영향을 미치는 지를 관찰하고자 하였다.

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2001-003-F00076).

접수: 2003년 3월 3일, 승인: 2003년 6월 25일

책임저자: 신규태 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5

아주대학교병원 신장내과

Tel: 031)219-5133, Fax: 031)219-5109

E-mail: gtshin@ajou.ac.kr

## 재료 및 방법

### 1. 메산지움 세포 분리 및 배양

Wistar 백서에서 메산지움 세포를 다음과 같이 분리 배양하였다<sup>5-7)</sup>: 150-200 gram의 Wistar 백서의 신장을 적출 후 신피질을 분리하였고, 신피질을 잘게 분쇄한 다음 180, 150, 75  $\mu$ m 크기의 조직 분리용 체 (Sigma, MO, USA)를 이용하여 신사구체를 분리하였다. 신사구체를 Type IV collagenase (Sigma, MO, USA)로 처리한 다음, 세포를 10% FBS, 100 mg/dL glucose, 5 g/mL bovine insulin 및 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin을 함유한 DMEM (GibcoBRL, MD, USA)에 배양하여 메산지움 세포를 얻었다. 메산지움 세포는 특징적인 형태 및 desmin 및 vimentin에 양성, cytokeratin에 음성인 immunocytochemistry로 확인하였다. 본 실험에서는 4-5번 계대 배양한 세포를 사용하였다.

### 2. TGF- $\beta$ 1의 antisense RNA 디자인

Antisense RNA 생산은 목적하는 물질의 DNA sequence를 역 방향으로, 즉 3'-5'으로 promoter의 downstream에 cloning함으로써 이루어진다. 전체 cDNA나 혹은 전 open reading frame이 필요한 것은 아니나, 5' untranslated region 혹은 start codon을 antisense에 포함시키는 것이 효과를 높이는 한 방법이다<sup>8)</sup>. 또한 antisense RNA가 RNA processing, 특히 splicing을 차단하는 효과를 얻기 위해, exon과 intron의 연결부 sequence, 혹은 exon 부위에 근접한 intron sequence를 포함시키는 방법이 있다<sup>9)</sup>. 본 실험에서는 5' untranslated region과 start codon, coding sequence 일부를 포함하도록 antisense를 디자인하였고 (Fig. 1), 백서 신장조직 cDNA를 template로 PCR을 하여 계획된 DNA 절편을 분리하였다. Anti-

sense의 forward primer에는 KpnI, reverse primer에는 XbaI restriction sequence를 각 primer 5' end에 부착하여, start codon을 중심으로 -162에서 +168의 330 bp sequence를 PCR로 증폭한 후 전기영동으로 분리하였다 (Table 1). Sense fragment의 forward primer에는 XbaI, reverse primer에는 KpnI restriction sequence를 각 primer 5' end에 부착하여 같은 방법으로 DNA를 얻었다 (Table 1).

### 3. Recombinant Adenoviral vector 생산

CMV promoter를 가진 pShuttle vector (Clontech, CA, USA) multicloning site의 XbaI-KpnI 부위를 잘라낸 후 앞에서 분리한 antisense와 sense fragment를 cloning 하였다 (Fig. 2). 이렇게 하여 제작한 pShuttle-sense와 pShuttle-antisense를 PI-SceI과 I-CeuI 제한효소로 double digestion하여 antisense와 sense fragment를 가진 절편을 얻고, 이것을 pAdeno-X vector (Clontech, CA, USA)의 동일한 restriction site에 cloning하여 pAd-CMV-TGFsense 및 pAd-CMV-TGFAS를 만들었다 (Fig. 2). pAdeno-X는 replication에 필수 불가결한 E1 gene이 제거된 상태이므로 E1에서 생성되는 물질을 공급해 줄 수 있는 세포, 즉 adenovirus 5 transformed HEK 293 같은 세포에서만 replication 할 수 있다. 따라서 다음 단계로 pAd-CMV-TGFsense 혹은 pAd-CMV-TGFAS를 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 HEK 293 세포에 transfection 시킨 후 세포를 7-10일 배양하였다. 80-90% 정도의 세포가 virus에 infection되었을 때, 세포를 15 mL tube에 모아 원심 분리를 하고 PBS에 넣은 후 냉동-해동 과정을 3회 반복하여 세포를 용해시켜 rAdTGF $\beta$ 1S 혹은 rAdTGF $\beta$ 1AS virus를 분리하였다. 이렇게 얻은 virus를 다시 HEK 293 세포에 transfection 시켜 양을 증폭하였다. 4-5회 증폭한 후

Table 1. Primers Used for Cloning Antisense and Sense TGF- $\beta$  Fragments

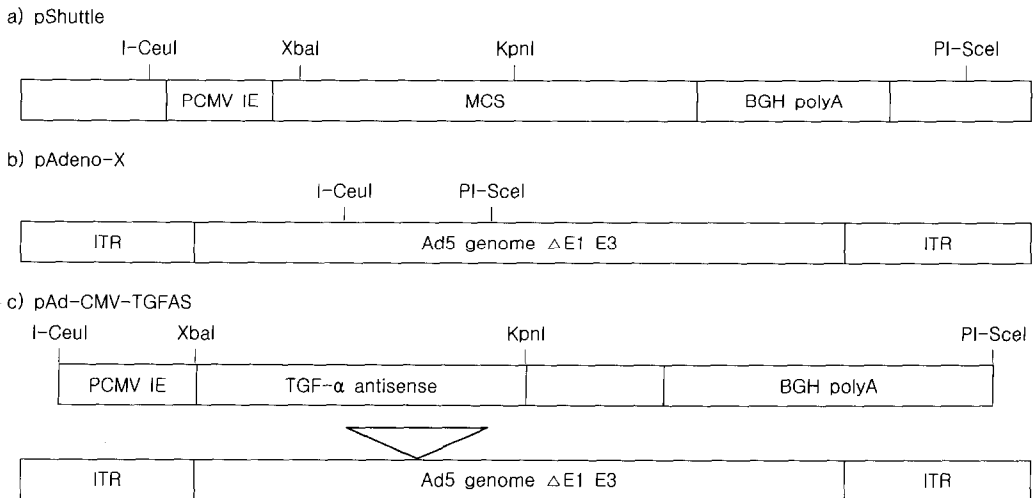
Primers	Sequences	Location (Genbank)
TGF- $\beta$ antisense	F 5'-CGGGGTACCCCGCCTGCTGCTTTCTCCCTCAA-3'	251-270
	R 5'-TGCTCTAGAGCATTTGGACAGGATCTGGCCAC-3'	561-580 (NM_021578)
TGF- $\beta$ sense	F 5'-TGCTCTAGAGCACCTGCTGCTTTCTCCCTCAA-3'	251-270
	R 5'-CGGGGTACCCCGTTTGGACAGGATCTGGCCAC-3	561-580 (NM_021578)

Underlined: attached restriction sequences, F: forward, R: reverse

```

1 accgcctccc gcaaagactt caccocaaag ctggggcgca cccttgcac gccaccctcc
61 ccccagcctg ctctcttgat ccccgcgcat ccaggaccct ctctctcttg ggaggccgat
121 ctccctcgga cctgctggca atagcttctt atttaagaac accccacttt tgggtcccag
181 agagcgctca tctcgatttt tatcccggtg gcatactgag acactctggt gtcagagcgt
241 caccgagact cctgctgctt tctccctcaa cctcaaatta ttcaggacta tcacctacct
301 ttccttggga gaccccaccc caccccacaa gccctgcagg ggcggggcct ccgcatccca
361 cctttgcccg gggttcgctc tctccgaagt tccgtggggc gccgcctccc ccatgcccgc
421 ctcggggctg cggtgctg cgcttctgct ccactccc tggcttctag tgctgacgcc
481 cgggaggcca gccgcgggac tctccacctg caagaccatc gacatggagc tggtgaaacg
541 gaagcgcatc gaagccatcc gtggccagat cctgtccaaa ctaaggctcg ccagtccccc
601 gagccagggg gaggtaccgc cgggcccgtt gcccgaggcg gtgctcgtt tgtacaacag
661 caccgcgac cgggtggcag gogagagcgc tgaccgggag cccgagcccg aggcggacta
721 ctacgccaaa gaagtcaccc cgtgtctaata ggtggaccgc aacaacgcaa tctatgacaa
781 aaccaaagac atcacacaca gtatatatat gttcttcaat acgtcagaca ttcgggaagc
841 agtgccagaa ccccattgc tgtcccgtgc agagctgcgc ctgcagagat tcaagtcaac
901 tgtggagcaa cacgtagaac tctaccagaa atatagcaac aattcctggc gttaccctgg
961 taaccggctg ctgaccccca ctgatacggc tgagtggctg tcttttgacg tcaactggagt
1021 tgtccgcgag tggctgaacc aaggagacgg aatacagggc tttcgttcca gtgctcaactg
1081 ctcttgtgac agcaaagata atgtactcca cgtggaaatc aatgggatca gtcccaaacg
1141 tcgaggtgac ctgggcacca tccatgacat gaaccgaccc ttcctgctcc tcatggccac
1201 ccccctggaa agggctcaac acctgcacag ctcaggcacc cggagagccc tggatacca
1261 ctactgcttc agctccacag agaagaactg ctgtgtacgg cagctgtaca ttgaacttag
1321 gaaggacctg ggttggagt ggatccacga gcccaagggc taccatgcca acttctgtct
1381 ggggccctgc ccctacattt ggagcctgga cacacagtac agcaaggctc ttgccctcta
1441 caaccaacac aaccggggtg cttccgcac accgtgctgc gtgccgcagg ctttggagcc
1501 actgccatc gtctactacg tgggtgcaa gcccaaggtg gagcagttgt ccaacatgat
1561 cgtgcgctcc tgcaagtgca gctga
    
```

**Fig. 1.** Sequence of rat TGF- $\beta$  1 gene (Genbank Accession no. NM\_021578). Bold type: cloned sequence (251-580). Underlined: start codon.



**Fig. 2.** Construction of recombinant adenoviral vector. PCMV IE: cytomegalovirus immediate early promoter, MCS: multicloning site, BGH polyA: bovine growth hormone polyadenylation signal, ITR: inverted terminal repeats, Ad5: adenovirus type5,  $\Delta$ E1 E3: deleted E1 and E3 region.

virus를 Adeno-X virus purification kit (Clontech, CA, USA)를 이용하여 정제하고 NMWL50,000 Cen-

tricon concentrator (Milipore, MA, USA)로 농축한 다음 PBS에 넣어 사용 때까지  $-70^{\circ}\text{C}$  보관하였다.

Virus titer (pfu/mL)는 다음과 같이 Plaque assay를 하여 결정하였다: 6 well plate에 HEK293 세포를 70% confluence 정도로 배양한 후 연속적으로 희석한 virus particle을 넣고 0.5% agarose/DMEM에서 14일 정도 배양하면 virus plaque를 (Fig. 3) 볼 수 있는데 이 plaque 숫자로 plaque forming unit (pfu/mL)을 계산하였다.

#### 4. Multiplicity of Infection (MOI) 결정 실험

12 well plate에 백서 메산지움 세포를 plating 하고, 다음날 rAdlacZ를 multiplicity of infection (MOI, pfu/cell) 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200의 단위로 transduction 하였다. 48시간 후  $\beta$ -galactosidase 세포 염색을 하여 MOI에 따른 lacZ gene의 발현 정도를 평가하였는데, 1에서 5 MOI에서 대부분의 세포에 transduction이 일어나며, 또한 세포 viability에도 영향이 없는 가장 적합한 결과를 보였다 (Fig. 4). Nahman NS<sup>10</sup> 등에 의하면 인간 메산지움 세포에서는  $\beta$ -galactosidase activity가 MOI 100에서 100%에 도달하고 transduction 7일까지 계속 증가한다고 한다.  $\beta$ -galactosidase 염색은 다음과 같이 하였다: Chamber slide를 넣은 12 well plate에 메산지움 세포를 배양 후 rAdlacZ를 infection시키고 48시간 후 세포를 PBS로 3회 세척한 다음 2% paraformaldehyde/0.2% glutaraldehyde/100 mM pH 7.3 PBS로 15분 동안 고정시켰다. 1 mg/mL X-gal, 3 mM ferricyanide, 1.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM pH7.3 PBS 성분의 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-D galactoside, Roche, IN, USA) 용액으로 37°C에서 2시간

염색한 다음 현미경으로 관찰하였다.

#### 5. 메산지움 세포 배양 실험

6 well plate에 메산지움 세포를 10% FBS, 100 mg/dL glucose, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin을 함유한 DMEM (GibcoBRL, MD, USA)에서 100% confluent 할 때까지 배양하였다. 그 다음 0.5% FBS 배지에서 24시간 동안 배양한 후 450 mg/dL의 고당 배양액으로 교환한 다음, rAdTGF  $\beta$  1S 혹은 rAdTGF  $\beta$  1AS virus를 앞의 실험에서 결정한 MOI의 양으로 메산지움 세포에 넣었다. 24시간 후 배양액을 교환하고 이후 48시간마다 배양액을 교환하였다. 대조군은 virus를 넣지 않고 100 mg/dL glucose 혹은 450 mg/dL glucose가 포함되어 있는 배양액에서 같은 방법으로 배양을 하였다. rAdTGF  $\beta$  1S 혹은 rAdTGF  $\beta$  1AS로 처리한지 6일째 되는 날 각 well에 Trizol 용액 (Invitrogen, CA, USA) 1 mL을 넣어 세포를 용해시켜 채취하였다.

#### 6. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Trizol 용액 (Invitrogen, CA, USA)에 용해된 세포를 chloroform으로 RNA를 분리하고, isopropanol, 75% ethanol로 침전 및 세척한 다음 Tris-EDTA 용액에 용해 보관하였다. 1 g RNA를 DNaseI으로 반응시킨 후 200 U MMLV reverse transcriptase, 각각 0.5 mM의 dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)와 100 ng random hexanucleotide primer가 포함된 반응 용액에서 37°C로 1시간 reverse transcription 하

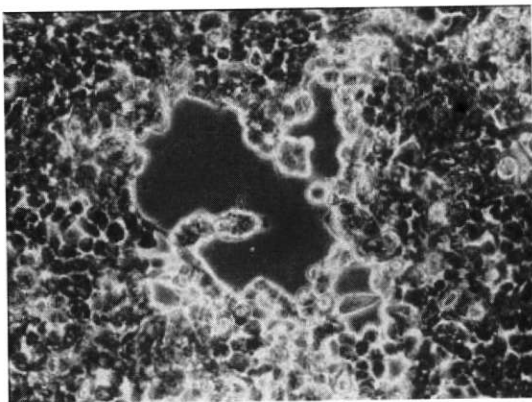


Fig. 3. A plaque formed by adenovirus vectors.



Fig. 4. Rat mesangial cells infected with Adenovirus with LacZ gene.

**Table 2. Primers Used in PCR**

Primers	Sequences (expected size)	Location (Genbank)
TGF- $\beta$	F: 5'-GGATACCAACTACTGCTTCAG-3' R: 5'-ACGATCATGTTGGACAACTGC-3' (312 bp)	1252-1272 1543-1563 (NM_021578)
GAPDH	F: 5'-TGTTCCAGTATGACTCTACCC-3' R: 5'-TCATGAGCCCTTCCACGATG-3' (390 bp)	980-1000 1350-1369 (AF 106860)
Fibronectin	5'-CACTGGAAACACTTACAAAGTG-3' 5'-CAGACACAAACACTCCAACATA-3' (208 bp)	513-534 699-720 (X 15906)
Collagen I	5'-TGTATGCTTGATCTGTATCTGC-3' 5'-AGCAAAGTTTCCTCCAAGACC-3' (310 bp)	141-162 430-450 (Z 78279)
Collagen III	5'-CCAAGGCTGCAAGATGGATG-3' 5'-TGGCCTGATCCATGTAGGCA-3' (302 bp)	1141-1160 1423-1442 (AJ 005395)
PDGF-B	5'-CGTAATCGCCGAGTGCAAGA-3' 5'-GGTCACTGTGGCCTTCTTGA-3' (238 bp)	33-52 251-270 (L 40991)

여 cDNA를 생성한 다음, 65°C에서 10분 동안 가열하여 MMLV를 불활성화 하였다. 일정 양의 cDNA를 67.5  $\mu$ M dNTP, 2U Taq polymerase, GAPDH 혹은 TGF- $\beta$ 1, collagen type I, collagen type III, fibronectin, PDGF-B primer (Table 2)가 포함된 반응용액에 넣고, Perkin Elmer 9600 기계로 PCR을 하였다. TGF- $\beta$ 1 primer는 antisense 및 sense fragment와의 구분을 위하여 cloning된 gene 바깥에 위치하도록 하였다. Antisense 및 sense mRNA의 생성을 알기 위해서는 primer 하나는 cloned fragment 내에, 다른 하나는 pShuttle에 위치하도록 디자인하였다. PCR 조건은 denaturation은 94°C에서 20초, annealing은 57°C에서 30초, primer extension은 72°C에서 20초이며, 30 cycle을 시행하였다. Agarose gel에서 전기영동을 한 후 DNA band를 densitometer로 측정하여 농도를 알아내었다. 각 물질 농도는 GAPDH 농도로 보정하였다.

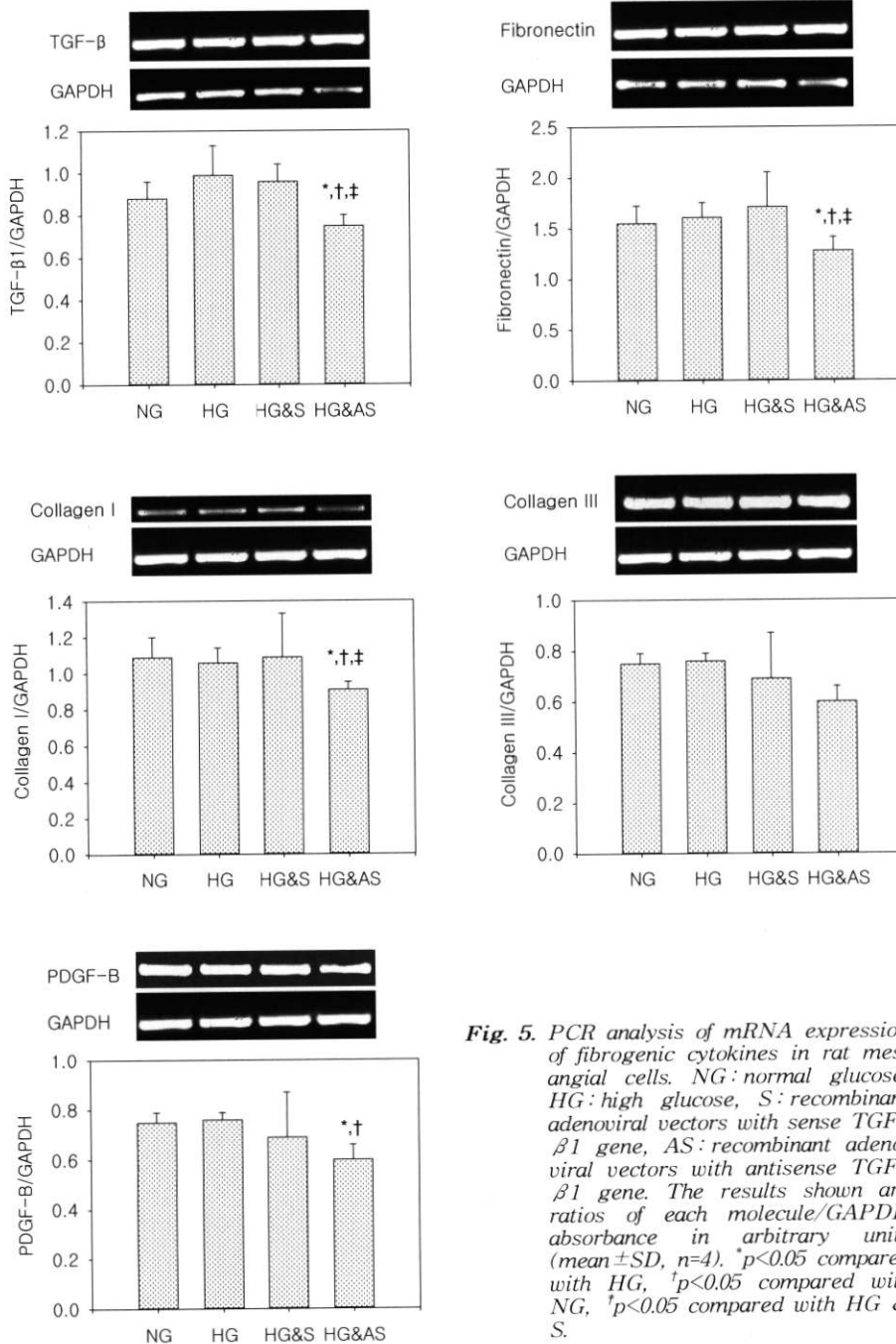
## 결 과

메산지움 세포의 TGF- $\beta$ 1/GAPDH 농도비는 100 mg/dL glucose 배양액과 비교할 때 450 mg/dL glucose 배양액에서 좀 더 높았으나 통계학적 의미는 없었다 (평균 $\pm$ 표준편차, 0.88 $\pm$ 0.08 vs. 0.99 $\pm$ 0.14, p=0.24) 그러나 rAdTGF $\beta$ 1AS virus로 TGF- $\beta$ 1 antisense gene을 transduction 한 메산지움 세포에서는 타 군 보다 의미있게 TGF- $\beta$ 1 mRNA 발현이 감소되어 있었고 (0.75 $\pm$ 0.05 vs 각 군 p<0.05, Fig. 5), 이러한 변화는 TGF- $\beta$ 1 sense gene을 transduction

한 rAdTGF $\beta$ 1S 군에서는 보이지 않았다 (0.96 $\pm$ 0.08) (Fig. 5). Fibronectin, collagen type I 및 PDGF-B 등의 다른 섬유화 물질도 TGF- $\beta$ 1와 동일한 결과를 보였다 (Fig. 5). 그러나 collagen III는 각 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (Fig. 5). 이러한 결과는 같은 조건으로 PCR을 3회 반복하여 확인하였다. 각 군간의 비교는 unpaired t-test로 하였다.

## 고 찰

만성 신부전 진행에 관여하는 물질로 현재까지 가장 잘 확립되어 있는 것이 TGF- $\beta$ 1이며, 특히 당뇨병성 신증 model에서 가장 연구 결과가 많이 있다<sup>11)</sup>. TGF- $\beta$ 1는 혈소판, T 임파구, 단핵구/대식세포, 메산지움 세포, 파골세포, 조골세포 등을 포함하는 많은 세포계에서 분비가 되며, 분비가 된 후 latency associated peptide가 떨어져 나감으로써 활성화가 되고, 이런 활성화된 형태는 분자량 25 KDa 정도의 disulfide linked dimeric protein으로 존재한다. TGF- $\beta$ 1은 T, B 임파구와 NK 세포의 증식 억제, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-3의 생성 억제, endothelin-1과 plasminogen activator inhibitor의 생성 촉진 등의 수많은 다양한 기능을 가지고 있으며, 그 중 가장 잘 알려진 기능 중의 하나가 섬유화를 유도하는 것이다<sup>1)</sup>. 이러한 섬유화 유도는 fibronectin, collagen, proteoglycan 같은 세포외 기질 성분 및 integrin의 생성 촉진과, matrix degrading protease의 생성 억제를 통하여 이루어진다고 알려져 있다<sup>12)</sup>. Yamamoto



**Fig. 5.** PCR analysis of mRNA expression of fibrogenic cytokines in rat mesangial cells. NG: normal glucose, HG: high glucose, S: recombinant adenoviral vectors with sense TGF-β1 gene, AS: recombinant adenoviral vectors with antisense TGF-β1 gene. The results shown are ratios of each molecule/GAPDH absorbance in arbitrary units (mean ± SD, n=4). \*p<0.05 compared with HG, †p<0.05 compared with NG, ‡p<0.05 compared with HG & S.

등은 당뇨병성 신병증, IgA 신병증, 루프스 신병증 등의 섬유화 경향이 높은 질환에서 TGF-β1의 발현이, 섬유화를 일으키지 않는 다른 종류의 신병증 즉, 미세변화신증후군이나 비박성 기저막신병증에서 보다 현

저히 더 강하게 나타남을 보고하였다<sup>13, 14)</sup>. 특히 당뇨병성 신증에서는, 질환의 초기에서부터 TGF-β1의 mRNA 발현이 강하게 나타나는 것으로 알려져 있다<sup>15)</sup>. 세포배양실험에서도 신장 근위세뇨관세포 혹은 메

산지움 세포를 고농도의 당이 있는 배양액에 넣으면 수일 내로 TGF- $\beta$ 1의 생성이 증가함을 관찰할 수 있었다<sup>2-4)</sup>. 이러한 사실에 기초하여 TGF- $\beta$ 1를 억제함으로써 만성신부전의 진행을 억제하고자 하는 여러 연구가 있어 왔고 합성된 antisense oligodeoxynucleotide를 이용하거나<sup>16-18)</sup>, TGF- $\beta$ 1항체<sup>19)</sup> 혹은 proteoglycan으로서 TGF- $\beta$ 1 생성을 억제하는 decorin<sup>20)</sup>을 이용하는 방법 등을 그 예로 들 수 있다. TGF- $\beta$ 1를 억제하는 또 다른 방법으로는 본 연구에서 시도된 것과 같이 TGF- $\beta$ 1 antisense RNA를 이용하는 방법을 생각해 볼 수 있으나<sup>21)</sup> 신장 질환 분야에서는 아직 발표된 연구가 없다. Antisense RNA는 억제하고자 하는 물질의 RNA와 상보적인 (complementary) RNA를 일컫는다. Watson-Crick 이론에 의하면 상보적인 염기 배열을 가진 DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-RNA는 서로 결합할 수 있는 바, antisense RNA는 목표하는 물질의 RNA에 결합하여 억제 효과를 나타낸다. 이러한 antisense RNA의 결합은 pre-mRNA의 splicing 억제 혹은 mRNA의 세포질로의 이동 억제<sup>22, 23)</sup>, ribosome 결합 차단<sup>24)</sup> 등에 의해 효과를 나타내는 것으로 추정하고 있다. 본 연구에서는, 고농도의 당에 메산지움 세포를 배양하면서 TGF- $\beta$ 1 antisense 유전자를 adenovirus vector를 이용하여 주입하고, 그 결과로 생성된 TGF- $\beta$ 1 antisense RNA가 TGF- $\beta$ 1 및 섬유화에 관계하는 여러 물질들에 어떠한 영향을 미치는 지를 관찰하고자 하였다. 실제 본 연구에서 TGF- $\beta$ 1 antisense를 가진 adenovirus vector는 메산지움 세포에서 TGF- $\beta$ 1 mRNA 발현을 의미있게 감소시켰고, 또한 collagen, fibronectin, PDGF-B와 같은 다른 섬유화 물질도 이차적으로 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 본 실험에서 고농도의 당에서 여러 섬유화 물질들이 예상과는 달리 명확히 증가하지 않았는데 이에 대한 이유는 분명치 않으나, 고농도의 당에 배양된 기간에 따라 차이는 나는 게 아닌가 생각된다. 이에 대한 것은 추후 연구로 규명되어야 할 것으로 본다.

본 실험에서는 유전자 전달 수단으로 adenovirus vector를 사용하였는데 MOI 1에서 5 정도의 적은 양으로도 대단히 효율적으로 유전자가 세포에 전달됨을 관찰할 수 있었다. Adenovirus vector는 삽입하고자 하는 gene에 대한 공간이 협소하고, 면역 반응

을 유발하고, 세포 염색체내로 gene이 삽입되지 않아 장기간 발현이 되지 않고, transduction을 위해 고농도가 요구되는 등의 몇 가지 제약이 있는 것이 사실이다<sup>25)</sup>. 그러나 현재까지 adenovirus vector 만이 신사구체에 transduction 될 수 있고, viral coding region을 전부 제거하여 일부 문제점을 해결하는 등의<sup>26)</sup> 개선 발전되고 있는 점을 고려하여, 본 연구에서 사용하기로 했다.

요약하면, 본 연구에서는 adenovirus vector를 이용하여 TGF- $\beta$ 1 antisense 유전자를 배양된 메산지움 세포에 전달함으로써 TGF- $\beta$ 1를 비롯한 여러 섬유화 물질을 억제하였고, 이러한 결과는 향후 동물 실험 등을 포함한 더 많은 연구를 통하여 검증, 발전되어야 할 것이다.

= **Abstract** =

### Attenuation of the Expression of Fibrogenic Molecules by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Antisense in Cultured Rat Mesangial Cells

Gyu Tae Shin, M.D. and Heungsoo Kim, M.D.

Department of Nephrology, Ajou University  
School of Medicine, Suwon, Korea.

**Background:** The diabetic milieu augments the expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in mesangial cells, which, in turn, stimulates the accumulation of extracellular matrix in glomeruli. Accordingly, mesangial cells have been shown to produce increased amount of TGF- $\beta$ 1 when exposed to high glucose concentrations in vitro.

**Methods:** In the present study, we examined the effects of antisense TGF- $\beta$ 1 gene transfer on the expressions of several cytokines implicated in kidney fibrosis. The DNA fragment containing bases -162 to +168 of rat TGF- $\beta$ 1 sequence was isolated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from rat kidney tissue. This PCR product was ligated in the *xbal*-*KpnI* restriction sites of a shuttle vector in forward and reverse orientations and replication defective recombinant adenoviral vectors containing either the sense or antisense TGF- $\beta$ 1 genes under the control of a cytomegalovirus promoter - rAdTGF $\beta$ 1S and rAdTGF $\beta$ 1AS, respectively - were generated. Rat mesangial cells infected with recombinant adenoviruses were grown in normal (NG, 100 mg/dL) or high glucose (HG, 450 mg/dL)

media for six days, and mRNA expressions of the monolayers were evaluated by RT-PCR.

**Results :** An adenoviral vector containing the antisense TGF- $\beta$ 1 gene significantly downregulated the gene expressions of TGF- $\beta$ 1, collagen, fibronectin and PDGF-B in cultured rat mesangial cells.

**Conclusion :** The expression of fibrogenic molecules were significantly attenuated by adenoviral vectors with antisense TGF- $\beta$ 1, and such results should be confirmed in the future study of animal models of diabetic nephropathy or chronic kidney diseases. (**Korean J Nephrol** 2003;22(4):349-357)

**Key Words :** Adenoviral vector, TGF- $\beta$ 1 antisense, Mesangial cells

### 참 고 문 헌

- 1) Border WA, Noble NA, Ketteler M : TGF- $\beta$  : a cytokine mediator of glomerulosclerosis and a target for therapeutic intervention. *Kidney Int* 47 (Suppl 49):S59-S61, 1995
- 2) Hoffman BB, Sharma K, Zhu Y, Ziyadeh FN : Transcriptional activation of transforming growth- $\beta$ 1 in mesangial cell culture by high glucose concentration. *Kidney Int* 54:1107-1116, 1998
- 3) Clarkson MR, Murphy M, Gupta S, Lambe T, Mackenzie HS, Godson C, Martin F, Brady HR : High glucose-altered gene expression in mesangial cells. Actin-regulatory protein gene expression is triggered by oxidative stress and cytoskeletal disassembly. *J Biol Chem* 277:9707-9712, 2002
- 4) Kim SI, Han DC, Lee HB : Lovastatin inhibits transforming growth factor- $\beta$ 1 expression in diabetic rat glomeruli and cultured rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 11:80-87, 2000
- 5) Ishimura E, Sterzel RB, Budde K, Kashgarian M : Formation of extracellular matrix by cultured rat mesangial cells. *Am J Pathol* 134:843-855, 1989
- 6) Mohaupt MG, Fischer T, Schwobel J, Sterzel RB, Schulze-Lohoff E : Activation of purinergic P2Y2 receptors inhibits inducible NO synthase in cultured rat mesangial cells. *Am J Physiol* 275(1 Pt 2):F103-110, 1998
- 7) Harper PA, Robinson JM, Hoover RL, Wright TC, Karnovsky MJ : Improved methods for culturing rat glomerular cells. *Kidney Int* 26:875-880, 1984
- 8) Wu W, Welsh MJ, Kaufman PB, Zhang HH : Gene under expression in cultured cells and animals. In: *Methods in Gene Biotechnology*. NY CRC Press, 1997
- 9) Munir MI, Rossiter BJF, Caskey T : Antisense RNA production in mammalian fibroblasts and transgenic mice. In: *Antisense RNA and DNA* edited by Murray JAH. NY Wiley-Liss, Inc. 1992
- 10) Nahman NS Jr, Clark KR, Sferra TJ, Urban KE, Troike AE, Kronenberger J, Sedmak DD : Successful DNA transfer in cultured human mesangial cells using replication deficient recombinant adenovirus. *J Investig Med* 46:204-209, 1998
- 11) Yamamoto T, Noble, Miller DE, Border WA : Sustained expression of TGF- $\beta$ 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 45:916-927, 1994
- 12) Border WA, Noble NA : Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331:1286-1292, 1994
- 13) Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Rouslahti E, Border WA : Expression of transforming growth factor  $\beta$ 1 is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1814-1818, 1993
- 14) Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, Border WA : Expression of transforming growth factor  $\beta$  isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int* 49:461-469, 1996
- 15) Iwano M, Kubo A, Nishino T, Sato H, Nishioka H, Akai Y, Kurioka H, Fujii Y, Kanauchi M, Shiki H, Dohi K : Quantification of glomerular TGF- $\beta$ 1 mRNA in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int* 49:1120-1126, 1996
- 16) Akagi Y, Isaka Y, Arai M, Kaneko T, Takenaka M, Moriyama T, Kaneda Y, Ando A, Orita Y, Kamada T, Ueda N, Imai E : Inhibition of TGF- $\beta$ 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 50:148-155, 1996
- 17) Isaka Y, Tsujie M, Ando Y, Nakamura II, Kaneda Y, Imai E, Hori M : Transforming growth factor- $\beta$ 1 antisense oligodeoxynucleotides block interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 58:1885-1892, 2000
- 18) Han DC, Hoffman BB, Hong SW, Guo J, Ziyadeh FN : Therapy with antisense TGF- $\beta$ 1 oligodeoxynucleotides reduces kidney weight and matrix mRNAs in diabetic mice. *Am J Physiol*



- Renal Physiol* **278**:F628-634, 2000
- 19) Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E: Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor- $\beta$  1. *Nature* **346**:371-374, 1990
  - 20) Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E: Natural inhibitor of TGF- $\beta$  1 protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* **360**:361-364, 1992
  - 21) Fakhrai H, Dorigo O, Shawler DL, Lin H, Mercola D, Black KL, Royston I, Sobol RE: Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor  $\beta$  antisense gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:2909-2914, 1996
  - 22) Helene C, Toulme JJ: Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigen nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* **1049**:99-125, 1990
  - 23) Munroe SH: Antisense RNA inhibits splicing of pre-mRNA in vitro. *EMBO J* **7**:2523-2532, 1988
  - 24) Ch'ng JL, Mulligan RC, Schimmel P, Holmes EW: Antisense RNA complementary to 3' coding and noncoding sequences of creatine kinase is a potent inhibitor of translation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:10006-10010, 1989
  - 25) Favre D, Ferry N, Moullier P: Critical aspects of viral vectors for gene transfer into the kidney. *J Am Soc Nephrol* **11**(Suppl 16):S149-S153, 2000
  - 26) Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, Chen HH, Chan S, Caskey CT: A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and  $\beta$ -galactosidase. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:5731-5736, 1996