

고포도당 배지로 배양한 복막중피세포에서 Stem-loop형 TGF- β 1 Antisense Oligodeoxynucleotide를 이용한 TGF- β 1 발현의 억제 효과

계명대학교 의과대학 병리학교실 및 신장연구소, 내과학교실 및 신장연구소*
동국대학교 의과대학 내과학교실†

이진구 · 김현철* · 박성배* · 한승엽* · 황은아* · 한상미 · 노혜정 · 이정호[†] · 박관규

목 적 : 복막투석환자에서 복막의 섬유화는 복막기능의 상실로 이어져 복막투석을 더 이상 실시할 수 없게 하는 매우 중요한 합병증 중의 하나이다. 현재까지 알려진 바로는 산성의 고장성 비생리적 용액인 복막투석액에 포함된 고포도당이 복막의 섬유화에 중요한 영향을 미치는 원인 중 하나로 보고되고 있다. 복막의 섬유화는 병리학적으로 collagen 및 fibronectin (FN), laminin 같은 세포의 기질의 축적이 동반된 상태로서 복막중피세포가 이 과정에 깊이 관여하는 것으로 알려지고 있다. 특히 TGF- β 1은 고포도당에 의한 세포외기질 단백 생산의 최종 매개 인자로 알려져 있다. 본 연구에서는 배양한 복막중피세포 내로 TGF- β 1에 대한 stem-loop형 antisense oligodeoxynucleotide (ODN)를 트랜스펙션 시켜 TGF- β 1 mRNA에 상보적으로 결합시킴으로써 TGF- β 1 단백 발현을 제한하여 섬유화 억제 효과를 관찰하고자 하였다.

방 법 : TGF- β 1에 대한 antisense ODN은 nuclease에 의해 세포 내에서 쉽게 분해되는 선형보다 안정적으로 장기간 작용할 수 있는 stem-loop형을 제작하여 실험에 사용하였고, 복막중피세포는 개복수술 환자에서 채취한 장간막에서 분리 배양하여 실험에 사용하였다. 실험군은 대조군으로서 5.6 mM/L glucose 농도의 배지에서 배양한 군 (제1군), 100 mM/L glucose 농도의 배지에서 배양한 군 (제2군), 100 mM/L glucose 농도의 배지에서 TGF- β 1 antisense ODN을 트랜스펙션 시켜 배양한 군(제3군)으로 나누었다. 복막중피세포는 혈청을 넣지 않은 배지로 48시간 동안 배양시켜 성장주기를 동일하게 맞춘 후, 각 군의 실험조건에 따라 트랜스펙션 시행 및 배지를 교환하고 다시 48시간 동안 배양하였다. 그 후 northern blot, western blot 및 면역조직화학 염색을 시행하여 TGF- β 1의 발현 정도를 측정 및 관찰하였다.

결 과 : Northern blot 결과 제2군에서의 TGF- β 1 mRNA는 제1군과 비교하여 증가하였고, TGF- β 1 antisense ODN을 처리한 제3군에서는 TGF- β 1 mRNA의 발현이 제2군에 비해 유의있게 저해된 것을 관찰할 수 있었다. Western blot 결과에서도 TGF- β 1 antisense ODN을 처리한 제3군에서 TGF- β 1 단백질의 생성이 제2군에 비해 유의있게 억제된 것을 관찰할 수 있었다. 면역조직화학 염색 결과 역시 제1군에 비해 제2군에서 TGF- β 1 단백질 발현이 증가되어 있었고, 제3군에서는 TGF- β 1 antisense ODN에 의해 TGF- β 1 단백질 발현이 억제된 것을 관찰할 수 있었다.

결 론 : 이상의 결과를 통해 복막중피세포에서 고포도당에 의해 증가된 TGF- β 1이 stem-loop형 antisense ODN에 의해 발현이 억제되는 것을 관찰할 수 있었으며, TGF- β 1에 대한 stem-loop형 antisense ODN은 복막투석 과정에서 복막의 섬유화를 효과적으로 억제시킬 수 있을 것으로 생각한다.