

간성상세포의 활성에서 siRNA를 이용한 TGF- β 1의 전사조절

오훈규 · 김경현 · 금윤섭 · 조창호
박재복 · 박관규

대구가톨릭대학교 의과대학 병리학교실

접수 : 2009년 1월 30일
제재승인 : 2009년 6월 24일

책임저자 : 박관규
우 705-718 대구광역시 남구 대명동
3056-6
대구가톨릭대병원 병리과
전화: 053-650-4151
Fax: 053-650-3050
E-mail: kkpark@cu.ac.kr

*본 연구는 대한병리학회 연구비 제06-01호
의 지원으로 이루어진 것임.

Transcriptional Regulation of Hepatic Stellate Cell Activation by siRNA for TGF- β 1

Hoon-Kyu Oh, Kyung-Hyun Kim, Yoon-Sup Keum, Chang-Ho Cho, Jae-Bok Park and Kwan-Kyu Park

Department of Pathology, College of Medicine, Daegu Catholic University, Daegu, Korea

Background : The cytokine-induced activation of hepatic stellate cells (HSC) plays a major role in liver fibrosis. Quiescent HSCs undergo phenotypic transformation called “transdifferentiation” in response to viral, chemical or immune insults to the liver. The cytokine TGF- β 1 plays a key role in progressive liver fibrosis. Since small interfering RNA (siRNA) is a powerful tool for silencing gene expression post-transcriptionally, the present study aimed to determine whether synthetic TGF- β 1 siRNA down-regulates the expression of the TGF- β 1 gene in immortalized and activated rat HSCs (HSC-T6s). The study examined whether synthetic TGF- β 1 siRNA prevents rat HSCs activation and extracellular matrix (ECM) production. **Methods :** TGF- β 1 siRNA or a control (pU6) siRNA was added to HSC-T6 culture media. We then performed RT-PCR and western blot analyses for TGF- β 1 and ECM components (fibronectin, type-I collagen, and TIMP-1). **Results :** TGF- β 1 siRNA significantly down-regulated expression of TGF- β 1 mRNA and protein and attenuated mRNA and protein expressions of type-I collagen, fibronectin, and TIMP-1, as compared to the control. **Conclusions :** TGF- β 1 siRNA can effectively down-regulate the expression of TGF- β 1 in rat HSC, resulting in significant inhibition of HSC activation and of ECM production. These data indicate that synthetic TGF- β 1 siRNA can be a useful treatment modality to prevent liver fibrosis.

Key Words : Transforming growth factor-beta; Small interfering RNA; Hepatic stellate cell; Liver fibrosis

간섬유화는 알코올, 바이러스, 약물, 간독성 물질 등 많은 원인에 의해 초래되는 간세포 손상에 대한 반응으로 쿠퍼세포와 염증 세포에서 분비되는 사이토카인들과 다른 용해성 물질에 의한 염증반응과 섬유생성반응의 결과로 생긴다. 또한 간섬유화는 만성간 손상에 따르는 수복과정으로 간성상세포의 활성화와 과도한 세포외기질의 생산을 특징으로 한다. 간손상이 오래 지속되면 결국 간세포는 기능을 상실하고 섬유화에 의해 간의 구조는 변하게 되며 결절이 형성되는 비가역적 변화인 간경화로 진행하게 된다.¹ 휴지기 상태의 간성상세포는 간세포가 손상될 때 또는 배양접시와 같은 딱딱한 표면에서 배양될 때 세포내의 지방과 레티노이드 성분을 잃고 알파 민무늬근육액틴(α -SMA)을 발현하는 증식성의 근섬유모세포(myofibroblast)로 바뀌게 되는데 이런 과정을 변환분화(transdifferentiation)라고 한다. 변환분화된 근섬유모세포는 세포외기질뿐만 아니라 섬유화에 관련된 다양한 종류의 사이토카인과 케모카인들을 분비하게 된다.²⁻⁴

간세포의 손상으로 야기되는 염증 반응은 휴지기의 간성상세포를 활성화하여 세포외기질 물질과 다양한 사이토카인 및 케모카인들을 분비하게 하고 기질 메탈로프로테인아제(matrix metalloproteinase)와 그 억제제인 tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)의 분비도 촉진하게 한다. 또한 간성상세포는 섬유화를 촉진하면서 섬유융해작용(fibrolysis)도 담당한다.⁵⁻⁷

Transforming growth factor- β (TGF- β)는 많은 세포들에서 강력한 성장억제제로 작용하고 실질 세포에서는 아포프토시스의 조절에 주요한 역할을 하며 세포외기질의 생성을 자극하기도 한다. 특히 간섬유화에서 간성상세포의 근섬유모세포로의 변환분화의 시작과 촉진 그리고 진행에 주요한 역할을 담당하는데, 섬유화 과정에서 TGF- β 1이 활성화되면 간성상세포에서 콜라겐의 생성과 축적이 증가하여 섬유화가 진행되고 간의 기능을 앓게 된다.⁸ 따라서 TGF- β 1의 생성과 신호전달과정을 차단하여 간섬유화의 진행을 막기 위해 다양한 동물실험이 행해지고 있다.⁹⁻¹²

Small interfering RNA (siRNA)는 특정 유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하여 그 유전자의 단백발현을 억제, 전사단계에서 유전자의 발현을 억제하는 RNA간섭(RNAi)의 한 방법이다.^{13,14} 또한 유전자의 이중가닥 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)를 세포 내로 주입하는 RNAi는 RNA-induced silencing complex (RISC)나 dicer RNase III 같은 세포내 효소들에 의해 그 유전자의 mRNA를 특이적으로 분해하여 유전자의 발현을 억제하는 방법이다. 이들은 ribozyme이나 antisense ODN을 이용하는 유전자 억제방법보다 훨씬 더 효율적으로 목적하는 유전자의 발현을 억제시킬 수 있어 최근 들어 다양한 실험 연구와 치료 방법에 응용되고 있다.¹⁵⁻¹⁸

저자들은 사염화탄소로 유도된 쥐의 간경화 모델에서 TGF- β 1 siRNA를 이용하여 TGF- β 1의 발현이 억제되고 섬유화 관련 단백인 제1형 콜라겐과 알파 민무늬근육액틴의 발현이 낮아지는 것을 관찰하였으며, TGF- β 1 siRNA가 효과적으로 항섬유화 작용을 하는 것을 관찰하였다.¹⁹ 그러나 동물 모델에서는 간 손상과 섬유화 과정에 관여하는 여러 유형의 간 내 세포들 중 어느 세포가 섬유화 과정에 중요한 작용을 하는지는 알 수 없었다. 따라서 이번 연구에서는 간섬유화 과정에 핵심세포로 작용하는 간 성상세포에서 TGF- β 1의 작용을 TGF- β 1 siRNA를 이용하여 차단함으로써 siRNA를 이용한 유전자 치료가 항섬유화 치료의 방법으로 유효한 것인지 알아 보기 위해 이 실험을 시행하였다.

재료와 방법

간성상세포(Hepatic stellate cell) 배양

표현형과 생화학적 특성이 활성화된 쥐의 불멸화(immortalization) 간성상세포(rat HSC-T6)를 분양받아 실험에 사용하였다. 간성상세포는 10% 우태혈청(Gibco, Grand Island, NY, USA)과 페니실린(100 U/mL, Gibco), streptomycin (100 mg/mL, Gibco)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium, (DMEM, Gibco) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂를 함유하는 배양기에서 배양하였다. 그리고 배양된 세포는 10 mm 접시에 2×10⁵ cells/mL씩 나누어 37.8°C, 5% CO₂를 함유하는 배양기에서 계대배양하여 사용하였다.

TGF- β 1 siRNA 적정 부위 선정 및 플라스미드 벡터 클로닝

TGF- β 1 전체 유전자 염기서열에서 siRNA 효과를 만족하게 해주는 21개의 상보적인 염기서열을 선정하였다. 즉 목적 부위가 A (아데노신)나 G (구아닌)로 시작하고 다른 유전자와 상동성이 없으며, 2차 구조가 적고 GC 비율이 30-50%인 부위를 선정하였다. 그 염기서열은 다음과 같다: 5'-AACCAAGGAGA-CGGAATACAG-3' (TGF- β 1 site: NM_021578). 또한 벡터

는 짧은 RNA transcript를 전사하는 U6 RNA 중합효소 III 증진 부위를 가지고 있는 플라스미드 벡터를 사용하였는데, TGF- β 1 siRNA 염기서열 및 벡터는 Vectorcorea (벡터코아에이, 대전, 대한민국)로부터 주문 제작하여 사용하였다.

TGF- β 1 siRNA 간성상세포 핵산 전달감염(transfection) 및 확인

간성상세포에서 TGF- β 1 siRNA의 효과를 확인해 보기 위해 간성상세포를 60 mm의 세포 배양 접시에 2×10⁵ cells/mL씩 동일하게 나누어 혈청을 넣지 않은 배지로 24시간 동안 배양시켜 성장 주기를 동일하게 맞추어 배양하였다. 핵산 전달 감염은 Lipofectamine Plus Reagent (Invitrogen, CA, USA)를 사용하여 시행하였으며, TGF- β 1 siRNA를 가지는 플라스미드 벡터와 대조군 pU6 벡터는 각 세포 배양 접시에 3 μg씩 사용하였다. 이때 정상대조군은 활성화된 간성상세포를 사용하였고, 실험군과 대조군은 12시간 동안 핵산 전달감염시킨 후 회수하였다. 또한 간성상세포에서 TGF- β 1 siRNA의 핵산 전달 감염을 확인하기 위하여 Label IT nucleic acid labeling kit (MirusBio, WI, USA)로 TGF- β 1 siRNA에 형광물질을 표지하였다. 이때 표지된 TGF- β 1 siRNA는 Lipofectamine plus reagent (Invitrogen)를 사용하여 핵산 전달 감염을 시행한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

RNA 분리 및 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcriptase polymerase chain reaction)

각 실험군의 배양 세포 배양액을 제거한 후 1×PBS로 세척하고, TRIzol 용액 1 mL로 처리하였다. 그런 후 0.2 mL의 클로로포름을 첨가하여 3분간 상온에서 반응시키고 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 생긴 상층액 600 μL를 새 튜브로 옮긴 후, 450 μL의 이소프로필알코올을 첨가하여 섞어준 다음 다시 상온에서 10분간 반응시키고 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 이렇게 원심 분리하여 생긴 침전물에 75%의 알코올 1 mL을 첨가하여 7,500×g에서 5분간 원심 분리하였다. 그리고 침전물을 공기 중에서 말린 후 각각의 튜브마다 50 μL의 RNase free water를 첨가하여 녹인 다음 원액을 1/100로 희석, 260 nm 파장에서 정량하였다. 그리고 분리한 RNA 중 500 ng의 RNA를 사용하여 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)로 역전사 반응을 시켜 cDNA를 합성하였으며, 합성된 cDNA를 이용하여 TGF- β 1, type I collagen, fibronectin, TIMP-1의 primer를 이용, PCR을 수행하였고 생성된 product는 1% agarose gel로 전기 영동하여 ethidium bromide과 결합, 가시화하여 결과를 확인하였다. RT-PCR을 위해 사용한 각각의 primer 서열은 Table 1과 같다.

단백질의 분리 및 western blot 분석

각 실험군의 배양 세포 배양액을 제거한 후 1×PBS로 세척하고, 세포를 scraper로 긁어 모아 4°C, 12,000 rpm으로 5분간 원심 분리한 후 상층액은 제거하고 변성 용액(IPH buffer, 50 mM pH8.0 Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 100 mM PMSF, 1 mg/mL leupeptin, 1 mg/mL aprotinin, 1M DTT)으로 혼탁시켰다. 그런 후 4°C에서 30분 동안 용해시키고 12,000 rpm에서 20분 동안 원심 분리한 후, 세포 용해물로부터 단백질을 분리하였다. 그리고 단백질 정량용 시약(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)을 사용하여 분광광도계(Beckman, Peapack, USA)로 전체 단백질을 정량하였다. 정량된 단백질 50 μ g은 DTT가 첨가된 2×SDS loading buffer(Tris-Cl [pH6.8] 100 mM, glycerol 20%, bromophenol blue 0.2%, SDS 4%, dithiothreitol 200 mM)와 섞여 98°C에서 5분간 가열한 후 TGF- β 1은 12%, type I collagen은 6%, fibronectin은 10%, TIMP-1은 12%로 SDS-polyacrylamide gel에서 2시간 30분간 100 V로 전기 영동하고, 15 V에서 12시간 동안 나일론 막으로 단백질을 전달하였다. 그 후 나일론 막은 TBS-T buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) 5% 탈지유로 1시간 동안 배양한 후 일차 항체 anti-TGF- β 1 (R&D systems, CA, USA), anti-type I collagen (Abcam, Cambridge, UK), anti-fibronectin (Abcam), anti-TIMP-1 (Santa Cruz, CA, USA)으로 3시간 반응시키고, TBS-T buffer로 10분간 3번 헹구었다. 그런 후 horseradish peroxide (HRP)가 결합되어 있는 anti-rabbit 또는 anti-mouse IgG (IgG-HRP) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)로 1시간 동안 결합시키고, TBS-T buffer로 10분간 네 번 헹군 후 enhanced-chemiluminescence 용액(Amersham, Buckinghamshire, UK)으로 가시화하였다.

통계처리

RT-PCR과 western blot의 발현치는 GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)와의 상대적인 발현량을 정

Table 1. Primers sequences of TGF- β 1, type I collagen, fibronectin and TIMP-1

Target	Primer sequence
TGF- β 1	sense: 5'-TCTCTCCGACCTGCCACAGA-3' antisense: 5'-GATCGCGCCCCTCTAGGTT-3'
Type I collagen	sense: 5'-TGGTGCCAAGGGTCTCACTGGC-3' antisense: 5'-AGGCCTTGTACACCACGTTCAACC-3'
Fibronectin	sense: 5'-TGTGACAACGTGCCGTAGACC-3' antisense: 5'-GACCAACTGTCAATTGAGG-3'
TIMP-1	sense: 5'-CTGGCATCCTCTTGTTGCTA-3' antisense: 5'-AGGGATCTCCAGGTGCACAA-3'

량화하였고, 각 실험을 3번 시행하여 평균값을 사용하였다. 이 때 Student's t-test에서 $p<0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

TGF- β 1 siRNA 플라즈미드 벡터의 핵산 전달 감염 확인

TGF- β 1 siRNA 플라즈미드 벡터의 핵산 전달 감염 효율과 위치를 확인하기 위하여 TGF- β 1 siRNA에 형광을 붙여 간성상세포에 핵산 전달 감염을 시켰다. 전달 감염 12시간 후 간성상세포를 형광 현미경으로 관찰하여 본 결과 배양된 대부분의 간성상세포의 세포질과 핵에서 형광이 관찰되었다(Fig. 1). 이를 토대로 간성상세포에 TGF- β 1 siRNA 플라즈미드 벡터가 효과적으로 전달됨을 확인하였다.

활성화된 간성상세포주에서 TGF- β 1 mRNA 발현 억제

활성화된 간성상세포주에서 TGF- β 1 siRNA 플라즈미드를 주입하여 12시간이 경과한 후 mRNA를 추출, mRNA 발현의 변화 정도를 관찰하였다. 그 결과 활성화된 간성상세포와 pU6 promoter를 핵산 전달 감염시킨 대조군에서 TGF- β 1의 mRNA 발현을 확인하였고, 대조군에 비하여 TGF- β 1 siRNA 플라즈미드를 핵산 전달 감염시킨 실험군에서는 TGF- β 1 mRNA 발현량이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이로써 TGF- β 1 siRNA 플라즈미드가 활성화된 간성상세포 내로 전달되어 TGF- β 1의 전사 단계를 효과적으로 차단하였음을 확인하였다.

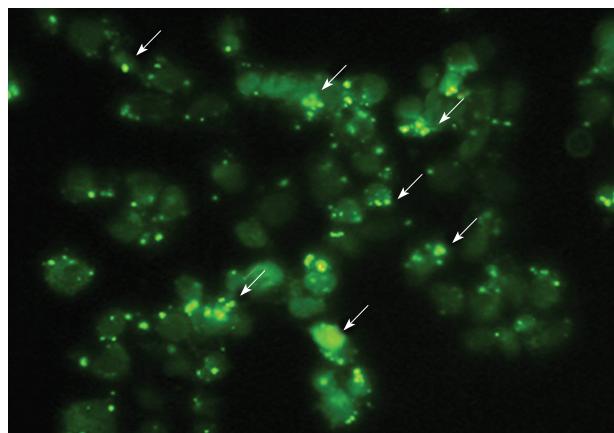


Fig. 1. Immunofluorescence of intracytoplasmic and intranuclear transfection of TGF- β 1 siRNA (arrows) in cultured HSC-T6 cells.

활성화된 간성상세포주에서 세포외기질 관련 유전자의 mRNA 발현 억제

활성화된 간성상세포주에서 TGF- β 1 siRNA 플라스미드를 주입한 후 세포외기질 관련 유전자의 mRNA 발현을 관찰하였다. 이때 활성화된 간성상 세포와 pU6 promoter를 핵산 전달 감염 시킨 대조군에서는 세포외기질 관련 유전자인 type I collagen, fibronectin, TIMP-1의 발현을 확인하였고, TGF- β 1 siRNA 플라스미드를 핵산 전달 감염시킨 실험군에서는 type I collagen, fibronectin, TIMP-1의 발현이 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 따라서 활성화된 간성상세포에서 TGF- β 1 siRNA 플

라스미드 처리는 TGF- β 1 자체의 발현을 억제시킬 뿐만 아니라 세포외기질 관련 단백의 mRNA 발현도 억제시킴을 확인할 수 있었다.

활성화된 간성상세포에서 TGF- β 1 siRNA 플라스미드로 인한 TGF- β 1과 세포외기질 단백의 발현 감소

본 연구에서는 활성화되어 있는 간성상세포를 사용하여 간경화 상태에서의 간성상세포 활성과 동일하게 세포의 활성을 유지하였으며, 세포 배양을 통해 획득한 단백질로 western blotting 을 이용, TGF- β 1 단백과 세포외기질 단백의 발현을 확인하였

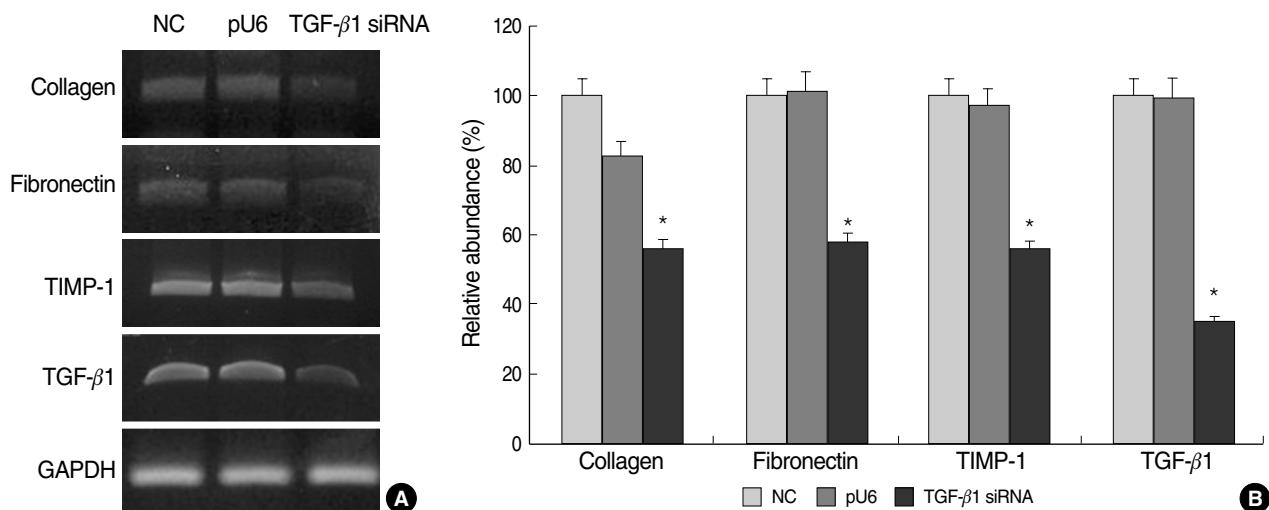


Fig. 2. RT-PCR analysis shows inhibitory effects of TGF- β 1, collagen type 1, fibronectin and TIMP mRNA expression in cultured HSC-T6 cells by TGF- β 1 siRNA (A). (B) Decreased expression of TGF- β 1, collagen type 1, fibronectin and TIMP-1 mRNA in TGF- β 1 siRNA treated cultured HSC-T6 cells (TGF- β 1 siRNA) than normal control (NC) and pU6 treated control group (pU6). The values are means with standard deviations from three independent experiments. *p<0.05.

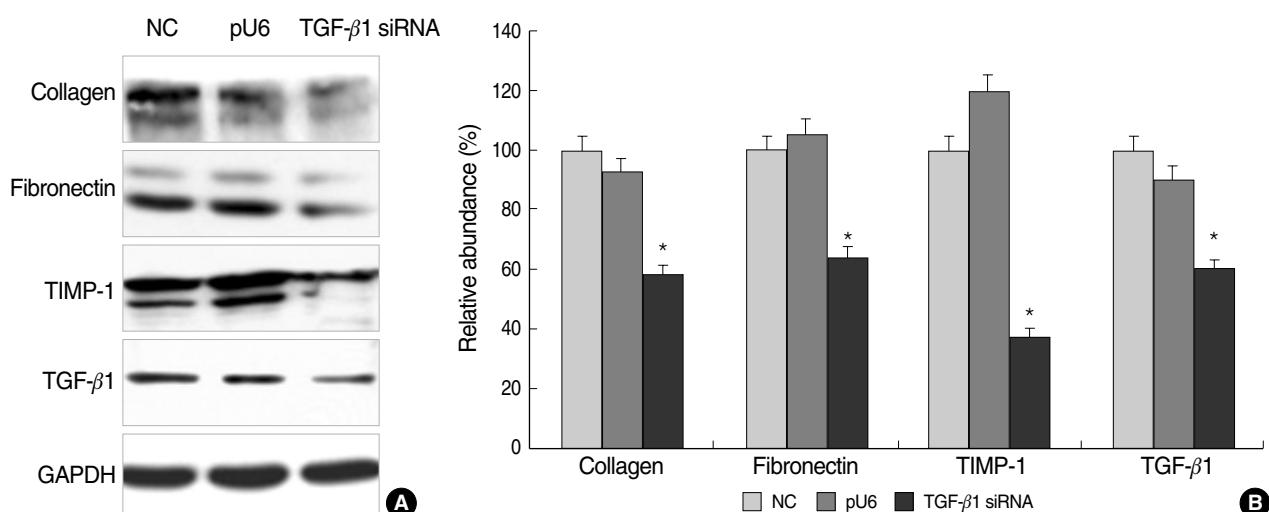


Fig. 3. Western blot analysis shows inhibitory effects on the expression of TGF- β 1, collagen type 1, fibronectin and TIMP-1 protein in cultured HSC-T6 by TGF- β 1 siRNA (A and B). *p<0.05.

다. 그 결과, 활성화된 간성상세포와 pU6 promoter 플라스미드를 처리한 경우 TGF- β 1, type I collagen, fibronectin, TIMP-1 단백의 발현을 확인할 수 있었다. 또한 TGF- β 1 siRNA 플라스미드를 처리한 실험군에서는 TGF- β 1, type I collagen, fibronectin, TIMP-1 단백의 발현이 TGF- β 1 siRNA 플라스미드에 의해 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

고찰

간섬유화를 방지하기 위해 TGF- β 1의 발현을 억제하기 위한 많은 연구가 행해지고 있다.^{9-12,19} 이에 따라 본 연구에서도 간섬유화의 핵심 역할을 담당하는 간성상세포에서 siRNA를 이용, TGF- β 1 발현을 차단함으로써 간섬유화를 억제해 보고자 하였다. 이때 작은 dsRNA 조각을 직접 감염시킬 경우 세포 안에서 오랜 시간 동안 유전자의 발현 억제가 어려운 점을 고려하여 siRNA가 안정적으로 세포 내에서 합성될 수 있도록 고안된 플라스미드 벡터를 사용하였다.²¹ 플라스미드 벡터는 자가 복제가 가능하고 면역 반응을 유발하지 않으며, 독성이 없고 제조 및 대량생산이 용이한 장점이 있다.^{22,23}

TGF- β 1 siRNA가 간성상세포에 핵산 전달되는 것을 확인하기 위해 실험군과 대조군에서 TGF- β 1 mRNA의 발현을 전달 감염시키고 12시간 후 관찰한 결과, 실험군의 간성상세포에서 유의하게 감소하는 것을 발견할 수 있었으며, 이를 통해 본 실험에 사용한 플라스미드 벡터가 siRNA를 간성상 세포 내에서 효과적으로 전달하는 것을 확인하였다.

TGF- β 1은 간 손상에서 아주 중요한 전섬유생성인자(pro-fibrogenic factor)로 작용하며,²⁴⁻²⁶ 일반적으로 모든 간 손상에서 TGF- β 1의 생성이 증가한다. TGF- β 1은 간세포 및 간의 기질 세포들 뿐만 아니라 림프구, 단핵구, 텁식구와 같은 염증세포와 활성화된 간성상세포에서도 생성되는데^{27,28} 간 손상을 일으키는 많은 원인들은 결국 간섬유화를 유발한다. 간성상세포는 간 손상 초기에 손상된 간세포와 간의 조직탐식구인 쿠페 세포에서 방출된 TGF- β 1에 의해 휴지기 동안 활성화된다. 이때 활성화된 간성상세포는 증식능과 섬유 생성이 가능한 수축력이 있는 근섬유모세포(myofibroblast)의 형태로 변환분화(transdifferentiation)되어 간섬유화를 일으키게 된다.²⁴

불멸화 HSC-T6세포는 정상 쥐의 간성상세포에 Rous sarcoma virus promoter (SV40)를 전달 감염시켜 만들어지는데,⁴ HSC-T6 세포는 게대배양을 거듭하면 세포 내의 지방과 레티노이드 성분을 잃고 α -SMA, desmin, vimentin 등과 같은 세포 골격 단백을 발현하며 섬유모세포와 같은 모양과 높은 증식능을 보이는 활성화된 근섬유모세포의 특성을 보인다.⁴ TGF- β 1에 의한 간성상세포의 활성은 쿠페세포 등으로부터 주변 분비(paracrine) 자극과 간성상세포 자체의 자기분비(autocrine) 자극에 의해 이루어진다.^{22,25} 본 실험에서 TGF- β 1 siRNA는 활성화

된 간성상세포에서 TGF- β 1의 mRNA와 단백의 발현을 억제하여 간성상세포에서 TGF- β 1의 자기분비 기능을 억제하는 것으로 생각하였다.

간성상 세포는 TGF- β 1과 혈소판 성장인자- β (PDGF- β) 등과 같은 성장 인자와 사이토카인에 의해 활성화된다. 특히 TGF- β 1은 간성상세포의 근섬유모세포로의 변환에 아주 중요한 역할을 하는데,²³ TGF- β 는 세포막 표면에 존재하는 두 개의 TGF- β 수용체에 결합하여 이형접합체를 형성. 세포 내 신호 전달 물질인 smad를 인산화하여 콜라겐 등의 세포외기질의 생성을 촉진한다.²⁹ Liu 등³⁰은 휴지기의 간성상세포에서는 smad2가 그리고 활성화된 간성상세포에서는 smad3이 섬유화를 유발하는 세포 내 신호 전달 물질로 작용한다고 하였다. TGF- β 1은 세포외기질의 분해 효소인 기질 메탈로프로테인아제(matrix metalloproteinase)의 발현을 감소시키고, 그 저해제인 TIMP-1의 발현을 증가시켜 섬유화를 더욱 가속시키는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁷

본 실험 결과 활성화된 간성상세포에서 TGF- β 1 단백과 간섬유화의 주요한 세포외기질인 collagen type I, fibronectin 그리고 TIMP-1 단백과 mRNA의 발현이 대조군에 비하여 현저하게 감소됨으로써 TGF- β 1 siRNA가 간성상 세포에서 TGF- β 1의 발현뿐만 아니라 세포외기질의 발현도 효과적으로 차단하는 것을 알 수 있었다.

이상의 연구 결과를 요약하면 TGF- β 1 siRNA는 활성화 간성상세포에서 TGF- β 1의 자기분비 자극을 효과적으로 억제함으로써 간성상세포의 활성화와 세포외기질의 생성을 감소시키는데, 이는 만성 간섬유화에서 활성화 간성상세포의 TGF- β 1 활성을 조절할 수 있는 유효한 방법이라고 생각한다. 향후 추가적으로 간섬유화 동물모델에서 TGF- β 1 siRNA의 발현과 활성화 정도를 장기간 관찰하여 그 효과를 입증한다면 만성 간질환의 새로운 치료법으로 사용할 수 있을 것으로 생각한다.

참고문헌

- Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside. J Hepatol 2003; 38 (Suppl 1): S38-53.
- Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liver fibrosis. Front Biosci 2002; 7: d808-26.
- Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- β as major players and therapeutic targets. J Cell Biol Med 2006; 10: 76-99.
- Vogel S, Piantedosi R, Frank J, et al. An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism in vitro. J Lipid Res 2000; 41: 882-93.
- Aberman K. The perisinusoidal cells of the liver: a historical account. Histochem J 1986; 18: 279-305.
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest 2005; 115: 209-18.
- Gressner AM. Perisinusoidal lipocytes and fibrogenesis. Gut 1994;

- 35: 1331-3.
8. Sanderson N, Factor V, Nagy P, *et al.* Hepatic expression of mature transforming growth factor β 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2572-6.
 9. George J, Roulot D, Koteliansky VE, Bissell DM. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor β type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12719-24.
 10. Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2345-9.
 11. Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor β prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2000; 32: 247-55.
 12. Arias M, Sauer-Lehnen S, Treptau J, *et al.* Adenoviral expression of a transforming growth factor- β 1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC Gastroenterology* 2003; 3: 29.
 13. Dave RS, Pomerantz RJ. RNA interference: on the road to an alternate therapeutic strategy? *Rev Med Virol* 2003; 13: 3-85.
 14. 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.
 15. Shackel NA, Rockey DC. Intrahepatic gene silencing by RNA interference. *Gastroenterology* 2004; 126: 356-8.
 16. Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herwiger H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 2002; 32: 107-8.
 17. Song E, Lee SK, Wang J, *et al.* RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003; 9: 347-51.
 18. Zender L, Hutter S, Liedtke C, *et al.* Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 7797-802.
 19. Kim KH, Kim HC, Hwang MY, *et al.* The antifibrotic effect of TGF- β 1 siRNAs in murine model of liver cirrhosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 1072-8.
 20. Yun HS, Do SH, Jeong WI, *et al.* Cytotoxic effects of the conjugated linoleic acid isomers t10c12, c9t11-CLA and mixed form on rat hepatic stellate cells and CCl4-induced hepatic fibrosis. *J Nutri Biochem* 2008; 19: 175-83.
 21. Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 1443-8.
 22. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-3.
 23. Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 505-8.
 24. Jeong KS. Therapeutic target for chronic liver fibrosis by regulation of transforming growth factor-beta. *Basic Appl Pathol* 2008; 1: 56-60.
 25. Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1995; 96: 447-55.
 26. Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 2001; 34: 859-67.
 27. Gao C, Gressner G, Zoremba M, Gressner AM. Transforming growth factor beta (TGF-beta) expression in isolated and cultured rat hepatocytes. *J Cell Physiol* 1996; 167: 394-405.
 28. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-50.
 29. Dooley S, Delvoux B, Streckert M, *et al.* Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during *in vitro* progression to myofibroblasts. TGF beta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001; 502: 4-10.
 30. Liu C, Gaca MD, Swenson E, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor- β (TGF- β) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF- β -independent. *J Biol Chem* 2003; 278: 11721-8.