

폴리에틸렌이민 및 그들의 리포솜이 중재된 Plasmid DNA의 운반

韓仁淑* · 全美淑[†] · 李甲龍[†]

계명대학교 의과대학연구소

[†]대구효성카톨릭대학교 화학과

(1998. 10. 14 접수)

Polyethylenimine Mediated Gene Delivery with Various Liposomal Formulations

Insook Han*, Misook Jun[†] and Kab-Yong Lee[†]

Institute for Medical Science, Keimyung University, Taegu 700-712, Korea

[†]Department of Chemistry, Catholic University of Taegu-Hyosung, Kyongsan 712-702, Korea

(Received October 14, 1998)

요 약. 다가 양이온성 고분자인 polyethylenimine(PEI)를 이용한 plasmid DNA의 세포 전이를 검색했다. 먼저 agarose assay에 의한 2, 10, 25, 및 50KD PEI와 DNA의 중화복합체의 최적비율은 분자량에는 영향을 받지 않았고, 최적의 PEI nitrogen/DNA phosphate 중화 비율은 1.5-2.0(nmol/nmol)로 나타났다. 이 복합체들을 이용한 COS1 세포전이에서는 2KD를 제외하고는 naked DNA에 대비 전이가 증가했고, 이 중에서 특히 25KD PEI는 적정 전이조건에서 DEAE-dextran 혹은 lipofectin 보다 다소 증가된 전이율을 보였다. *In vitro* 세포전이의 최적 PEI/DNA 비는 7.6-13.3(nmol/nmol)이었고 최적 중화복합체를 이루는 비율보다 높게 나타났다. 용액의 pH에 따른 전이율의 변화는 크게 없었으나 산성일때가 약간 더 증가했다. 세포 표적전이의 독성감소를 위해 인지질분자를 사용한 liposome formulation을 PEI/DNA계에 도입하였다. 그 결과, PC/PE 중성 리포솜이 도입된 경우는 25KD를 제외하고는 PEI 단독일 때 혹은 리포솜 단독일 때 보다 전이율이 2-2.5 배씩 증가했다. 그러나 PEI와 같은 양이온성의 DOTAP/PE 리포솜 도입은 charge repulsion 작용으로 오히려 DOTAP/PE 단독계 보다 전이가 감소하는 역효과를 보였다. Liposomal PEI계의 세포독성은 PEI 단독일 때 보다 % cell survival이 10-20% 정도 증가했다. 이 결과들은 PEI가 단독으로도 좋은 전이제로 작용 할 뿐 아니라 세포표적 운반이 가능한 중·음성 리포솜의 효과적인 DNA 응축제로도 이용 될 수 있음을 증명했다.

ABSTRACT. The transfection efficiency of plasmid DNA was inspected using multi-cationic polymer, 5, 10, 25 and 50KD polyethylenimine (PEI). The optimal neutralization ratio of PEI/DNA complexes by agarose assay was 1.5-2.0 (nmol/nmol) without much difference in molecular weight of PEI. *In vitro* transfection assay, most of PEI-mediated plasmid delivery was better compared to the naked DNA. Especially, 25KD PEI at optimal condition gave higher transfection rather than the standard assay of DEAE-dextran or Lipofectin. To enhance the cell targeting delivery, the liposome formulations were introduced using phospholipids. As a result, PC/PE liposomes increased 2-2.5 times of the transfection efficiency of PEI single or PC/PE single delivery, but not the case of 25KD PEI. Moreover, the DOTAP/PE-introduced PEI delivery reduced the transfection of DOTAP/PE single delivery. All these results proved that the PEI can be used not only good transfectants and but also good DNA condensing agents in neutral/anionic liposome for cell targeting delivery.

nmol amine nitrogen에 해당한다. β -galactosidase를 발현할 plasmid DNA는 대량추출하여 전조시키고 물에 녹여 80 μ g/ml의 저장 수용액을 만든다. 1 μ g의 DNA는 3 nmol phosphate에 해당한다. 각각 준비된 고분자와 DNA 용액을 PBS 혹은 Opti-MEM으로 단계적으로 희석한다. 연이어 희석된 PEI와 DNA를 섞어 PEI/DNA 복합체를 만들고 약 20분간 실온에 둔 후 사용한다.

고분자/DNA 복합체에 리포솜 도입. 구성 인지질 분자를 정해진 비율대로 섞고 저장용매인 클로로포름을 원심분리기로 제거하고, 동결건조기에서 감압하에 하룻밤 완전히 건조시킨다. 건조된 lipid film에 2)에서 만들어진 균일한 고분자/DNA 복합체를 넣고 vortexing하여 리포솜 서스펜션을 만들고 이를 원심분리기에서 5,000 rpm, 20분간 원심분리하여 윗층의 리포솜 부분을 조심스럽게 수거한다. 이렇게 제조된 리포솜의 크기, 모양 및 균일성은 전자현미경으로 확인한다.

복합체의 세포독성 검색(MTT assay). PEI/DNA 복합체의 *in vitro* 독성검사는 MTT dye reduction assay로 한다. COS1 세포를 96-well plate에 1×10^5 cells/ml 농도로 분주하고 하룻밤 배양한다. 제조된 PEI/DNA 혹은 liposomal PEI/DNA 복합체를 다양한 조건으로 세포에 6시간 노출한 뒤 PBS로 3회 씻는다. 새로운 배양액을 넣고 20시간 더 배양한 뒤 MTT dye와 dimethyl sulfoxide로 살아있는 세포를 염색하여 570 nm에서 흡광도를 읽어 대조군과 비교한다.

전이를 검색(β -gal assay). 5% CO₂, 37°C, 10% FBS 그리고 항생제가 든 DMEM 배양액에서 COS1 세포를 유지시키고 Opti-MEM1(Life Tech) 배양액에서 전이를 시행한다. 96 well plate에 세포를 20,000 cells/well로 깔고 하룻밤 둔다. 세포를 Opti-MEM1 액으로 한 번 씻어내고 만들어진 PEI/DNA 혹은 liposomal PEI/DNA 복합체를 세포에 6시간 전이시킨다. 6시간 후, 전이용액을 조심스럽게 걸어내고 PBS로 1-2회 씻고, Opti-MEM1액을 첨가한다. 4시간 후 10% FBS가 첨가된 Opti-MEM1 배양액을 첨가하여 계속 배양한다. 48시간 후, 배양액을 걸어내고 PBS로 1-2회 씻고, lysis 용액을 넣어 세포를 용해하고 연달아 기질용액 ONPG를 첨가하여 30분-1시간 발색시킨 후 420 nm에서 β -galactosidase 활동도를 측정한다.

결 과

고분자/DNA 복합체 제조와 β -gal assay. 평균분자량 2, 10, 25, 50KD PEI의 10 mM 저장용액(1 μ l PEI stock=10 nmol nitrogen)과 pSV- β -galactosidase plasmid DNA의 80 μ g/ml(1 μ g plasmids=3 nmol phosphate) 저장용액을 만들었다. 세포전이를 실시하기전 PEI와 DNA를 PBS와 Opti-MEM1 배양액으로 희석하고 적정비율대로 혼합하여 약 20분간 둔 후 agarose assay를 실시했다(Fig. 2). DNA 5 μ g(15 nmol of DNA phosphate)에 대해 첨가되는 PEI 양이 많아질수록 DNA의 중화 응축도가 높아졌으며, 분자량에 크게 상관없이 20 nmol의 PEI nitrogen에서

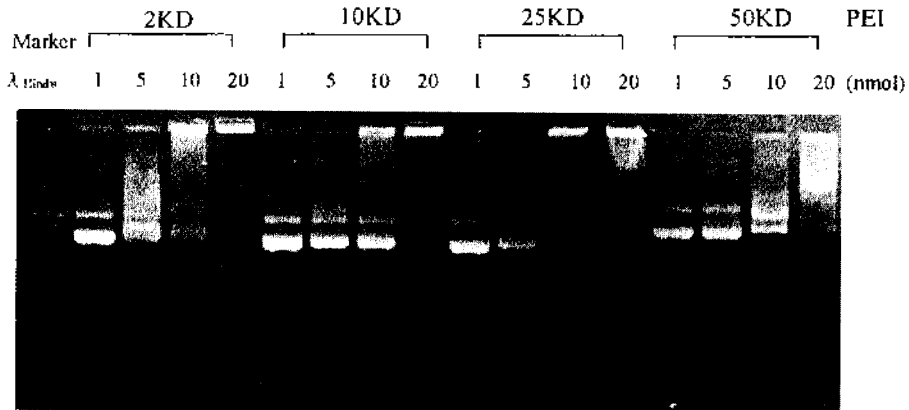


Fig. 2. Agarose assay of various PEI/DNA complexes. Various PEI/DNA complexes were produced by 'Materials and Methods' and analyzed by 1% agarose assay.

대부분 응축된, 즉 DNA의 음이온과 PEI의 양이온이 서로 중화된 PEI/DNA 복합체를 만들었다. PEI 분자량은 DNA 음전하 중화능력에 크게 영향을 끼치지 않으나 plasmid의 남은 양과 감소하는 형태로 볼 때 25KD PEI가 가장 우수한 PEI/DNA 복합체를 만들 수 있다. 25와 50KD PEI의 30 nmol에서 해당하는 PEI/DNA 복합체를 만들어 전기영동한 결과 DNA를 완전히 중화시켰다. 결과적으로 agarose assay에서 PEI nitrogen/DNA phosphate 비율이 PEI의 분자량에 크게 상관없이 1.5-2.0(nmol/nmol)이었을 때가 중화의 최적조건이었다.

위에서 언급한 방법으로 다양한 PEI/DNA 비율의 복합체를 제조, COS1 세포주에서 plasmid DNA를 전이시키고 48시간 배양한 후 β-gal assay를 실시했다. PEI/DNA 복합체의 배양액 속에서의 안정도검사는 시간에 따른 agarose assay를 실시한 결과 복합체 제조 6시간 이후에도 응축된 복합체는 대체로 안정하였다. 20 nmol PEI nitrogen 농도에 대응한 다양한 DNA 비율에 따른 세포전이 결과(Fig. 3)에서는 전반적으로 25, 50KD가 5, 10KD보다 전이율이 높았으며, 5, 10 25KD는 DNA양이 2-1-0.5 μg(6-3-1.5 nmol phosphate)으로 감소할수록 전이율이 계속 증가했으나 50KD는 증가하다가 감소했다. 즉 5, 10, 25KD에서는 최적 세포전이를 위한 PEI/DNA 비율은 13.3(20 nmol nitrogen/1.5 nmol phosphate)이었고, 50KD는 6.7로 나타났다. 이 PEI/DNA 비율 수치는

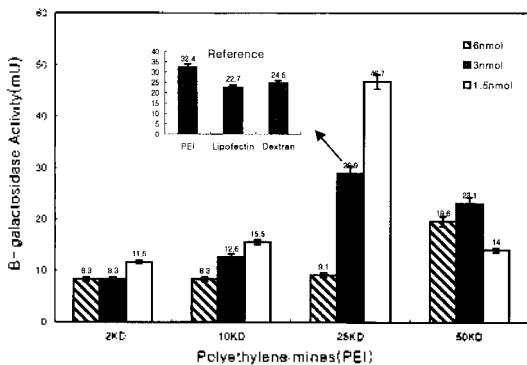


Fig. 3. Comparisons of various PEI-mediated transfections of COS1 cells. Cells were transfected with the plasmid DNA complexed to various PEIs. DEAE-dextran and Lipofectin were used as standard assay. All data are presented as means ±SD from at least five separate experiments.

최적 중화 조건 비율보다 높은 것으로 세포전이는 여전히 PEI의 양이온이 중요한 역할을 한다는 것이 입증되었다. 아울러 PEI를 이용한 전이율의 대조군으로 Lipofectin과 Dextran-DEAE를 이용한 결과와 비교하였고, PEI가 중화된 DNA 운반제도 이들 대조군에 대비 손색이 없었다. 특히 20 nmol의 25KD PEI는 1.5 nmol DNA 농도였을때는 월등하게 높은 전이율을 보였다. 그러나 세포독성을 비교해 본 결과 25KD PEI가 이들 commercial kit보다 약 1.5-2배 정도 더 강한 것으로 나타났다. 상용 kit인 Lipofectin과 Dextran-DEAE의 % cell survival은 90-95인데 반해, PEI의 % cell survival은 60-70으로 나타났다(Fig. 5). 그리고 세포전이에 미치는 25KD PEI 용액의 pH 영향을 살펴보기 위해 최적의 조건에서 용액의 pH를 5.0, 6.0, 7.0, 그리고 8.0으로 조절한 후 세포전이를 실시한 결과, 산성의 경우가 조금 높았으나 전반적으로 pH의 영향은 없었다.

고분자/DNA 복합체의 리포솜 도입. 먼저 선행결과에서 최적 세포전이를 기록한 PEI/DNA 비율에서 세포표적 전이율 향상과 PEI로 인한 세포독성 감소를 위해 인지질 분자를 이용한 리포솜 제조를 도입했다. 사용된 지질은 DOTAP, DOPC, OPPC, 그리고 DOPE 이며 양이온성 리포솜으로 DOTAP/PEI를 중성 리포솜으로 DOPC/PEI 및 OPPC/PEI 시스템을 도입했다. DOPC와 OPPC는 같은 PC계열 분자이나

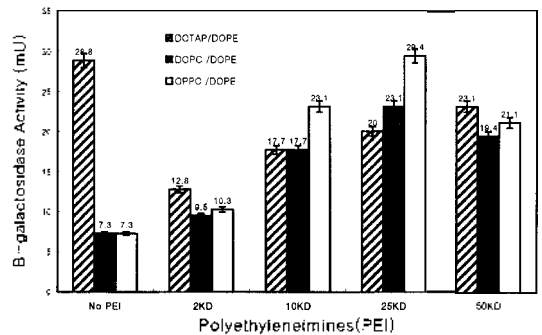


Fig. 4. Effects of various liposomal PEI/DNA-mediated transfections of COS1 cells. Liposomal PEI/DNA complexes using DOTAP/DOPE, DOPC/DOPE, and OPPC/DOPE systems were prepared as described in 'Materials and Methods'. β-Galactosidase activity was determined by absorbance at 420 nm after transfections with various liposomal PEI/DNA complexes and coloring with ONPG. All data are presented as means ±SD from at least three separate experiments.

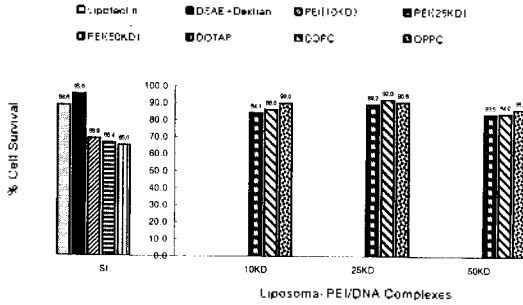


Fig. 5. % Cell survival of COS1 cells with various liposomal PEI/DNA. Cytotoxicity was determined by the MTT assay following a 6h exposure of liposomal PEI/DNA complexes and 42h postincubation. All data are presented as means \pm SD from at least three separate experiments.

2개의 인지방성 사슬의 불포화도가 DOPC는 각각 1개씩, OPFC는 한쪽은 1개 다른 한쪽은 포화가 된 상태이다. 실험재료 및 방법에서 언급된 것과 같이 liposomal PEI/DNA 복합체를 제조하고, COS1에서 같은 조건으로 세포전이를 실시했다. Liposomal PEI/DNA 복합체가 증재된 전이올과 그것의 대조군인 단독 리포솜과의 비교결과를 Fig. 4에 나타내었다.

리포솜을 도입한 결과 양이온성인 DOTAP/PE의 경우는 단독일 때보다 대부분 감소했으나, 중성인 PC/PE계는 10, 25와 50KD PEI에서 오히려 리포솜 단독일 때보다 크게 증가되었다. 2KD PEI는 크게 영향을 받지 않았다. PEI 단독계일 때와 비교해 보면, 전반적으로 리포솜 도입으로 향상되었으나 최적 조건의 25KD PEI계는 오히려 감소되었다. 정리하면, PEI/DNA 복합체에 도입한 리포솜 효과에서 양이온성(DOTAP/PE)은 역효과를, 그러나 중성(PC/PE)은 전이올을 향상시켰다. 리포솜이 도입된 계의 세포 독성은 그렇지 않은 PEI/DNA 단독계와 비교해 볼 때 약 10-20%의 감소효과를 보였으나 commercial kit에 대비 여전히 약 5-10% 더 유독했다(Fig. 5). 세 가지의 리포솜 시스템이나 PEI의 분자량에 따른 일관성 있는 영향은 관찰 할 수 없었다.

고 찰

평균분자량 2, 10, 25, 50KD의 PEI를 이용한 plasmid DNA 전이연구에서 특히 25KD PEI는 Lipofectin과 Dextran-DEAE의 대조군에 대비 손색이 없는

저렴하고 효과적인 고분자가 증재된 DNA 운반을 이루었다. 나아가 세포표적 전이효율과 유전자 발현을 증가시키고자 도입한 리포솜은 고분자를 plasmid DNA의 응축물질로 사용하고자 할 때 기초연구자료가 될 것이다. 현재 실험세포전이계에 주로 사용되고 있는 양이온 리포솜계는 인위적인 양이온성 지질분자가 만드는 것으로 전이올은 좋은 편이나, 비적절한 DNA 응축, 그 결과 상대적으로 큰 입자 크기, 이로 인한 세포특이성 저하와 생체환경의 부적합성등이 문제가 되고 있다. 이에 비해 세포 특이운반과 생체 적응이 뛰어난 중·음이온성의 리포솜들은 poor entrapment로 사용에 제한이 되어 왔다. 이에 25KD PEI의 경우, 고분자 자체만으로도 전이올이 뛰어난 DNA 운반에 단독으로 쓰일 수도 있으나, 이들의 뛰어난 DNA 응축능력으로 compact core를 이루고 이를 천연 리포솜으로 싸서 효과적인 세포특이 운반을 이룰수 있으면 더욱 특이성 있는 유전자 치료가 가능할 것이다. 이러한 의도들을 겨냥한 본 liposomal PEI/DNA 연구의 결과는 가장 최적 조건하의 25KD PEI를 제외하고는, 대부분의 PEI/DNA에 리포솜이 도입된 시스템이 PEI 단독 일때보다 전이올이 2-2.5배 증가했다. 그리고 응축된 PEI/DNA 복합체와 그렇지 않은 유독물질의 분리가 어려워 세포독성의 문제가 리포솜 도입으로 10-20% 정도로 향상되었다. 그러나, 리포솜 도입으로 PEI 운반계의 세포독성이 감소되었음에도 불구하고 여전히 commercial kit에 대비 약 5-10% 더 유독했다. 이는 더욱 정밀한 정제와 멸균으로 극복 할 수 있을 것이며, 그래서 세포독성 문제가 해결된다면 더욱 효율적인 전이 시스템이 될 것이다. 이 리포솜 도입에서, 양이온성 리포솜 DOTAP/PE는 음이온인 DNA를 응축하고도 충분히 남은 PEI의 양이온과 charge repulsion으로 리포솜이 제대로 형성되지 못했고, 그 이유로 전이올이 DOTAP/PE 단독계보다 더 떨어지는 역효과를 냈다. 반면에 전자반발 효과가 없는 중성의 PC/PE 리포솜에서는 PEI 단독 혹은 PC/PE 단독일 때보다 전이올이 훨씬 증가된 효과를 보여 주었다. 이는 PEI 자체의 질소의 양전하들이 plasmid DNA의 음전하를 충분히 응축시키고도 여전히 양이온을 뒀고 있다는 증거를 보여주었다.

PC/PE계가 DOTAP/PE계 보다 PEI가 응축된 DNA 운반에 더 효과적이었다는 것은 실제 세포 표면의 membrane은 대부분 PC, PS, PE 등의 natural

lipids로 구성되어 있기 때문에 합성물 DOTAP 보다는 PC/PE계가 더욱 더 생체적 세포표적 전이에 적합하다는 결론을 유도할 수 있다. 그러므로 PEI 자체는 plasmid DNA 응축물질로 탁월하고, 이에 PC/PE계의 리포솜을 도입하여 세포표적 전이율 향상과 세포 독성 감소 등을 이루는 실질적인 liposomal PEI/DNA 운반체가 될 것이다. 이 결과는 앞으로 어떤 분자나 단백질이 DNA 운반 시스템의 응축물질로 사용될 때 기초 연구자료로 쓰일 것이며, plasmid DNA가 중재된 유전자 치료 및 백신개발에도 실제 적용할 수 있을 것이다.

본 연구는 1998년도 과학재단 국산기가 활용과제 연구비지원과 1997년도 계명대학교 부설연구소 연구비 지원으로 이루어진 것입니다.

인 용 문 헌

1. Wolff, J. A.; Malone, R. W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P. L. *Science* **1990**, *247*, 1465.
2. Zhu, N.; Liggitt, D.; Liu, Y.; Debs, R. *Science* **1993**, *261*, 209.
3. Yang, J. P.; Huang, L. *Gene Therapy* **1996**, *3*, 542.
4. Crystal, R. C.; McElvaney, N. G.; Rosenfeld, M. A.; Chu, C. S.; Hay, J. G.; Brody, S. L.; Jaffe, H. A.; Daniel, C. *Nat. Genet.* **1994**, *8*, 42.
5. Kotin, R. M. *Hum. Gene Ther.* **1994**, *5*, 793.
6. Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. S.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielson, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7413.
7. Gao, X.; Huang, L. *Gene Therapy* **1995**, *2*, 710.
8. Hofland, H. E. J.; Shephard, L.; Sullivan, S. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 7305.
9. Behr, J. P.; Demeneix, B.; Loeffler, J. P.; Perez-Mutul, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 6982.
10. Vitiello, L.; Chonn, A.; Wasserman, J. D.; Duff, C.; Worton, R. G. *Gene Therapy* **1996**, *3*, 396.
11. Trubeskoy, V. S.; Torchilin, V. P.; Kennel, S.; Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta.* **1992**, *1131*, 311.
12. Mack, C. D.; Rosemary, W.; Zeldis, J. B. *Am. J. Med. Sci.* **1994**, *307*, 138.
13. Planck, C. J. *Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12918.
14. Kamata, H.; Yagisawa, H.; Takahashi, S.; Hirata, H. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 536.
15. Tomita, N.; Morishita, R.; Higaki, J.; Aoki, M.; Kaneda, Y. *Gene Therapy* **1996**, *3*, 477.
16. Mann, M. J.; Morishita, R.; Gibbons, G. H.; Leyen, H. E.; Dzau, V. J. *Mol. Cell Biochem.* **1997**, *172*, 3.
17. Pinnaduwege, P.; Huang, L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *985*, 33.
18. Thierry, A. R.; Tanto, L. I.; Bryant, J. L.; Rabinovich, P.; Gallo, R. C.; Mahan, L. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9742.
19. Puyal, C.; Milhaud, P.; Bienvenue, A.; Philippot, J. R. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228*, 697.
20. Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7297.
21. Abdallah, B.; Hassan, A.; Benoist, C.; Goula, D.; Behr, J. P.; Demeneix, B. A. *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7*, 1947.
22. Kukowska-Latallo, J. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4897.
23. Bielinska, A.; Kukowska-Latallo, J. F.; Johnson, J.; Tomalia, D. A.; Baker, J. R. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2176.