

플라스미드 유전자 함유 혈구 세포 입자의 제조

변항민¹ · 박상은¹ · 김정목² · 고정재¹ · 오유경^{1†}

¹포천 중문 의과대학교, ²한양대학교 의과대학
(2002년 6월 3일 접수 · 2002년 7월 8일 승인)

Encapsulation of Plasmid DNA in Erythrocyte Ghosts

Hyang-Min Byun¹, Sang-Eun Park¹, Jung Mogg Kim², Jung Jae Ko¹ and Yu-Kyoung Oh^{1†}

¹College of Medicine, Pochon CHA University, Pochon, Kyonggi-do 487-800

²College of Medicine and Biomedical Research Institute, Hanyang University, Seoul, Korea

(Received June 3, 2002 · Accepted July 8, 2002)

ABSTRACT—This study reports the encapsulation of plasmid DNA in erythrocyte ghosts. The plasmid DNA was encapsulated into erythrocyte ghosts using three methods; osmotic shock, electroporation in isotonic medium, and electroporation in hypotonic medium. Of three methods, electroporation in hypotonic medium resulted in the highest encapsulation efficiency of plasmid DNA. The morphology of erythrocyte ghosts prepared by electroporation in hypotonic medium was similar to that by osmotic shock alone. The circulation time of plasmid DNA in mice was prolonged by administration in erythrocyte ghost-encapsulated forms. These results indicated the potential of erythrocyte ghosts for biocompatible nonviral delivery system of therapeutic genes for hematological diseases.

Keywords—Erythrocyte ghosts; Gene delivery system; Cytokine plasmid DNA

최근, 유전자 전달 기술분야에서는 비 바이러스성 유전자 전달체로서 양이온성 인지질(cationic lipid)을 이용하여 제조된 양이온성 리포솜(cationic liposome)이나 폴리 라이신(poly-L-lysine), 폴리에틸렌이민(polyethylenimine)등의 양이온성 고분자(cationic polymer)들이 중점적으로 연구되고 있다. 이러한 비 바이러스성 유전자 전달체 들은 면역 항체 생성 유도능이 단백질에 비하여 매우 낮은 지질이나 고분자를 소재로 사용하여 치료용 유전자의 반복투여가 가능한 장점이 있다. 그러나, 현재 비 바이러스성 수송체의 주요 구성인자로 사용되는 대부분의 양이온성 고분자나 양이온성 lipid류는 세포 독성 등으로 생체내 안전성이 확립되지 않은 문제점이 있다.¹⁾ 기존의 비 바이러스성 유전자 전달기술의 문제점으로는 양이온성 인지질 수송체를 사용하여 유전자를 실험동물에 전신 투여시 폐 조직에서의 염증반응이 관찰된 바 있으며,²⁾ 양이온성 리포솜과 유전자의 복합체를 정맥투여 시 여러 가지의 양이온성 인지질의 종류와 관계 없이 leukopenia, thrombocytopenia, 혈중 transaminase 농도 증가 등의 급성 독성이 보고된 바 있다.³⁾

따라서 양 이온성 유전자 수송체를 사용하여 치료효과를

나타내는 정도의 유전자를 전신 투여시 가장 큰 한계점중의 하나는 유전자 수송체의 독성 문제를 들 수 있으며 최근 유전자 수송체 분야에서는 세포 독성이 감소된 유전자 수송체의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다. 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민(polyethylenimine)의 경우, 그 분자량을 감소시켜 세포독성을 감소시키려는 연구가 최근 발표되었다.⁴⁾ Silica 성분의 미립자를 사용하여 세포독성을 감소시킨 유전자 수송체를 개발하려는 연구도 보고된 바 있으며,⁵⁾ 양이온성 잔기(side chain)를 변화시킨 고분자를 새로 합성하여 세포 독성을 감소시키려는 연구도 발표되었다.⁶⁾ 또한 기존 기술의 입자성 비 바이러스성 수송체들은 세포독성 외에도 수송체들의 입자 크기로 인하여 전신 투여시 다량의 유전자들이 단 시간내에 간(liver)이나 세망 내피계(reticuloendothelial system)로 분포되므로⁷⁾ 혈중 체류시간이 매우 짧은 문제점이 있다.

혈구 세포중 적혈구를 이용한 수송체(erythrocyte ghost particle)는 천연 생체막 성분의 혈구 세포입자를 이용한 것으로서 체내 독성이 없으며 생분해성인 장점이 있다. 혈구세포의 이러한 장점을 이용하여 혈구세포 내부의 물질을 모두 제거한 혈구 세포입자(ghost particle)를 저분자량의 약물을 수송할 수 있는 수송체로서의 가능성이 연구되어 왔다.⁸⁾ 적혈구 수송체는 항암제인 doxorubicin 수송체,⁹⁾ enalaprilat 수송체¹⁰⁾로서 보고된 바 있다. 적혈구 수송체의 또다른 장점

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 031)542-6671, E-mail : ohykcha@hanmail.net

은 세포내에 약물이나 효소를 봉입시키고 다시 혈중으로 전신투여한 경우에도 혈중 체류시간이 다른 입자성 수송체에 비하여 현저히 길다는 것이다. 그러나, 이제까지의 혈구세포 봉입 방법은 대부분이 분자량 1,000 이하의 저 분자량의 물질에 대하여 적용된 기술로서, 현재 분자량 50만 이상의 고 분자량 물질인 유전자를 혈구세포 내로 봉입하는 효과적인 방법에 대한 연구는 아직 활발하지 않다.

본 연구에서는, 생체 독성이 심각한 비 바이러스성 유전자 수송체의 문제점들을 해결하기 위하여 혈구 세포에 단시간의 자극을 주어 형성한 미세공(pore)내부로 유전자를 도입하는 방법을 개발하였으며 상기 방법으로 유전자를 봉입한 혈구세포를 체내에 투여한 결과 유전자의 혈중 농도 지속시간이 현저히 증가하는 것을 관찰하였다.

실험방법

혈구 세포 입자로의 유전자 봉입방법

Erythrocyte ghost에 유전자를 봉입하는 방법으로서 삼투압 충격 방법, 전기적 충격 방법, 저장액 상의 전기적 충격 방법을 사용하였다. 삼투압 충격만을 사용하는 경우의 봉입 방법으로는 mice의 혈액에서 적혈구 세포를 분리하고 3회 수세(washing)한 다음 삼투압이 낮은 hypotonic lysing buffer 100 μ l(5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 40 mOsm)내에 다양한 농도의 유전자(0.25-4 mg)와 혈구세포를 가하고 ice bath에서 10분간 반응을 진행한 다음 삼투압을 290 mOsm로 증가시키는 NaCl 성분의 resealing buffer를 가하고 37°C에서 30분간 incubation 하고 3회 수세(washing)하여 유전자가 봉입된 혈구세포를 분리하였다.

혈구 세포에 전기적 충격만을 가하여 유전자를 봉입한 경우에는 ICR mice의 혈액에서 적혈구 세포를 분리한 다음 3회 수세하고 여러농도의 유전자와 혈구세포를 electroporator (BioRad Gene Pulser II)의 cuvette(0.2 cm electrode gap)에 가하고 0.3 voltage, 0.25 capacity 의 조건으로 전기자극을 가하였다. 전기자극 과정이 끝난 다음 세포를 수회 수세하여 유전자가 봉입된 혈구세포를 분리하였다.

혈구 세포에 삼투압 충격 및 전기적 충격을 모두 가하여 유전자를 봉입한 경우에는 mice의 혈액에서 적혈구 세포를 분리한 다음 3회 수세하고 삼투압이 낮은 hypotonic lysing buffer 100 μ l(5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)내에 유전자(0.25-4 mg)와 혈구 세포를 가하고 electroporator(BioRad Gene Pulser II)의 cuvette(0.2 cm electrode gap)에서 0.3 voltage, 0.25 capacity의

조건으로 전기 자극을 가하였다. Electroporation이 끝난 다음 NaCl을 첨가하여 용액을 등장화 한 다음 37°C에서 1시간 방치하여 세포막을 안정화시킨 다음 수회 원심분리기(10,000 rpm, 5분)로 수세하여 유전자가 봉입된 혈구세포를 분리하였다.

Erythrocyte ghost 입자로의 유전자 봉입효율 측정방법

이상과 같이 다양한 제조 방법의 유전자 봉입 효율을 측정하기 위하여 유전자가 봉입된 erythrocyte ghost에서 유전자를 다음의 방법으로 추출하였다. 유전자가 봉입된 erythrocyte ghost 100 μ l를 1 ml의 증류수에 분산시키고 100°C에서 가열하여 세포막을 파괴한 다음 원심 분리하여 상층액을 수득하였다. 상층액 중으로 방출되어 나온 봉입 유전자의 총량을 제조시 가하여준 유전자의 양(loading dose)에 대하여 나누어 준 값을 %로서 계산하여 각 봉입 방법에 따른 봉입효율을 비교하였다.

혈중 유전자 농도 측정

Erythrocyte ghost 입자에 봉입된 유전자와 미봉입된 유전자를 각각 동일한 양으로 ICR mice의 꼬리 혈관(tail vein)내부로 정맥 투여하였다. 시간에 따라 30 μ l의 혈액을 capillary tube를 사용하여 채혈하고 serum을 얻은 다음, 보고된 방법¹¹⁾에 따라 boiling하여 혈액중에 존재하는 유전자 분해효소를 불활성화한 다음, 1 μ l의 검체를 내부 표준 물질 유전자로서 173 bp가 소실된 mutant plasmid DNA인 1 μ l의 pVAXdmIL-2와 같이 혼합한 다음 중합효소 연쇄반응을 수행하였다.¹²⁾ 검체 중의 목적 유전자의 농도를 정량하기 위하여 여러 가지 기지 농도의 내부 표준 물질 유전자와 정량하려는 검체 일정량을 각각 혼합하고 이에 대해 정량성 중합 효소 연쇄반응(quantitative and competitive polymerase chain reaction)을 수행하고 중합효소 연쇄반응의 산물을 2% 아가로오즈 젤 상에서 분리한 다음 이미지 분석기(Vilber Lourmat, 프랑스)를 이용하여 젤 상에서의 DNA 밴드의 밀도(density)를 측정하고 검량선을 작성하였다. 검량선에 기초하여 검량선의 X-축 절편과 만나는 점을 계산하여 검체중 pVAXmIL-2의 농도를 정량적으로 계산하여 유전자의 혈중 농도 변화를 측정하였다.

결과 및 고찰

혈구 세포 입자 내부로의 유전자 봉입 방법

혈구 세포 입자 내에 목적하는 유전자를 효율적으로 봉입할 수 있는 봉입 조건을 확립하기 위하여 혈구 세포 내부로

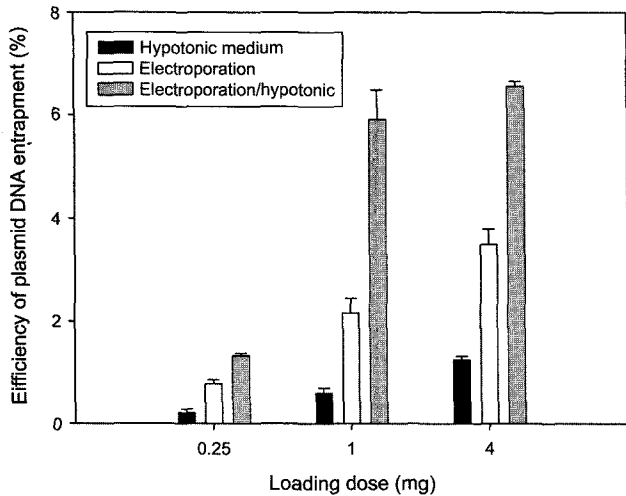


Figure 1-Erythrocyte ghost내로 유전자를 봉입하는 방법에 따른 봉입효율 비교(n=4).

삼투압 충격만을 주어 유전자를 봉입시킨 경우와, 전기적 충격만으로 유전자를 봉입시킨 경우, 그리고 저장액 하에서 삼투압 충격 및 전기적 충격을 동시에 단시간 가하여 유전자를 봉입시킨 경우를 비교하였다. Figure 1에서 나타나는 것처럼 삼투압 충격만을 이용하여 유전자의 봉입율을 증가시키는 방법은 삼투압 충격시 medium중에 존재하는 유전자의 농도를 단순히 증가시키는 방법으로는 한계가 있었다. 또한, 삼투압 충격이나 전기적 충격을 단독으로 각각 사용하는 것 보다는 두 방법을 같이 병용하는 기술을 이용하여 소량의 유전자를 가지고도 보다 높은 양의 유전자를 효율적으로 봉입시킬 수 있었다. 각 제조 방법에 대하여 봉입 초기에 가하여 준 유전자의 양에 따른 봉입효율 비교 결과, 1 mg의 유전자를 loading dose로 사용하고 저장액 중에서 전기적 충격을 가하는 방법이 가장 효과적인 것으로 평가되어 나머지 실험에서는 상기 조건으로 제조된 혈구 세포 입자를 이용하였다.

또한 혈구 세포 입자 내로 봉입된 유전자가 원래의 크기를 유지하는지 확인하기 위하여 분리한 유전자를 1% agarose gel에 전기영동하고 형광물질인 ethidium bromide로 염색(staining)하여 3.5Kb의 유전자 크기를 평가하였다. Figure 2는 봉입 유전자가 분해되지 않고 안정한 상태로 ghost 입자 내부에 존재함을 제시해준다.

제조 방법에 따른 혈구 세포 입자의 형태

혈구세포에 삼투압 충격만을 주어 유전자를 봉입한 경우와 삼투압 충격 및 전기적 충격을 주어 유전자를 봉입한 경우의 혈구 세포 입자의 형태를 위상차 현미경하에서 관찰하였다(Figure 3). 삼투압이나 전기적 자극을 가하지 않은 혈

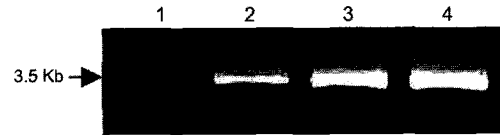


Figure 2-각 방법으로 erythrocyte ghost내로 봉입된 유전자의 전기영동 사진. Lane 1, 유전자가 도입되지 않은 erythrocyte ghosts; lane 2, 삼투압 충격만으로 유전자를 도입한 경우; lane 3, 등장액 하에서 electroporation으로 유전자를 도입한 경우; lane 4, 저장액 하에서 electroporation으로 유전자를 도입한 경우.

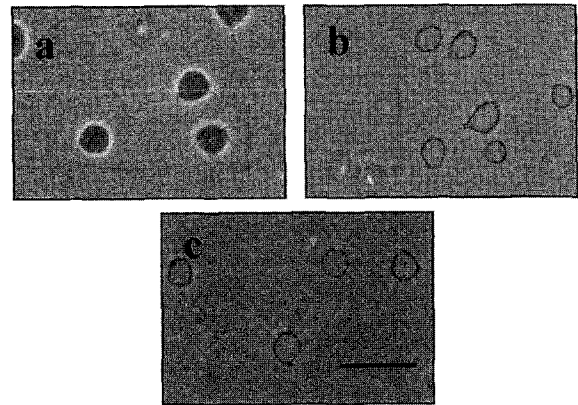


Figure 3-Erythrocyte ghost 입자의 morphology. (a) 삼투압 충격이나 electroporation 수행하기 전의 erythrocyte; (b) 삼투압 충격만으로 유전자를 봉입한 혈구세포; (c) 삼투압 충격 및 전기적 충격을 병행하여 유전자를 봉입한 혈구세포. 표기된 Bar는 1 μm를 나타냄. Phase contrast microscopy (× 1,000).

구세포(Figure 3a)에 비하여 혈구 세포 입자는 입자 내부가 유전자 함유 용액으로 치환되어 있어 세포막 부분 만이 현미경 하에서 관찰 가능하였다. 또한 삼투압 충격만을 사용한 경우(Figure 3b)와 저장액 하에서 전기적 충격을 사용한 경우(Figure 3c) 모두 그 형태(morphology)가 보존되는 구형의 ghost 입자가 생성되는 것이 관찰되었다. Figure 3c는 저장액과 전기적 충격으로 단시간 손상을 입은 세포막이 등장액 중에서 다시 sealing되어 erythrocyte ghost 입자를 형성할 수 있음을 보여준다.

혈구 세포 입자에 봉입된 형태로 투여된 유전자의 혈중 농도 변화

혈구 세포 입자에 봉입된 형태로 유전자가 투여된 경우 미 봉입된 상태로 투여된 유전자 보다 혈중 체류 시간이 현저히 증가하는 것이 관찰되었다(Figure 4). 미 봉입 상태의 유전자와 혈구 세포 입자에 봉입된 상태로 투여된 유전자의 혈중 농도 곡선하 면적(area under the curve)을 trapezoidal method를 사용하여 계산하였다. 그 결과, 미 봉입 상태로 투여된 유전자의 경우 혈중 농도 곡선하 면적(0-150분)이 993 ± 645 ng/ml·min이었으며, erythrocyte ghost를 이용하여 투

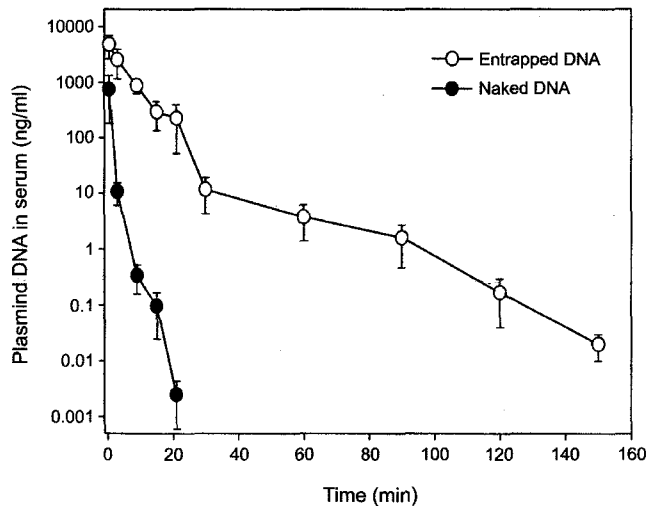


Figure 4. Erythrocyte ghost형으로 투여한 유전자와 미봉입 유전자의 혈중 농도 변화. 혈구 세포에 봉입된 형태의 유전자와 미 봉입 유전자를 각각 실험용 생쥐(mice)에 50 μ g 투여한 다음 시간에 따라 blood를 채혈하여 유전자의 혈중 농도를 quantitative PCR로 정량하였다(n=5).

여한 경우의 혈중 농도 곡선하 면적(0-150분)은 $26091 \pm 4405 \text{ ng/ml} \cdot \text{min}$ 로서 미봉입된 상태로 투여된 경우의 유전자 보다 26배 정도 증가한 것을 관찰하였다.

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 연구의 혈구 세포 입자는 유전자의 수송체로서 천연 생체막 성분의 입자를 사용하는 것이므로 기존에 사용되고 있는 바이러스성 수송체 및 비바이러스성 수송체에서 지적되고 있는 체내 안전성의 문제를 해소할 수 있는 장점이 있으며, 혈중 체류시간이 긴 혈구 세포의 특징을 이용하여 기존의 비 바이러스성 수송체에서 한계점으로 지적된 짧은 혈중 체류시간의 단점을 보완시킬 수 있다. 또한, 혈구세포 입자 내부에 목적하는 유전자를 함유하여 이를 체내로 수송하므로 체내 투여된 유전자가 유전자 분해효소에 의하여 신속히 분해되는 현상을 방지하고 수송된 유전자의 안정성을 증가를 기대할 수 있을 것으로 추정된다. 혈구 세포 입자에 봉입된 상태로 투여된 유전자의 혈중 체류 시간의 증가는 혈액관련 유전질환이나 기존의 비 바이러스성 입자들이 주로 분포되는 세망내피계 이외의 장기로 목적하는 치료용 유전자를 수송하려는 경우에 생체막 성분의 혈구 세포 입자가 수송체로서 유용하게 응용될 수 있는 가능성을 제시한다.

감사의 말씀

본 연구는 보건 복지부 보건 의료기술 연구개발 사업(과제번호 01-PJ1-PG3-21500-0008) 지원으로 수행되었음.

문 헌

- 1) R.K. Scheule, J.A. St. George, R.G. Bagley, J. Marshall, J.M. Kaplan, G.Y. Akita, K.X. Wang, E.R. Lee, D.J. Harris, C. Jiang, N.S. Yew, A.E. Smith and S.H. Cheng, Basis of pulmonary toxicity associated with cationic lipid-mediated gene transfer to the mammalian lung. *Hum. Gene Ther.*, **8**, 689-707 (1997).
- 2) N.S. Yew, K.X. Wang, M. Przybylska, R.G. Bagley, M. Stedman, J. Marshall, R.K. Scheule and S.H. Cheng, Contribution of plasmid DNA to inflammation in the lung after administration of cationic lipid:pDNA complexes. *Hum. Gene Ther.*, **10**, 223-234 (1999).
- 3) J.D. Tousignant, A.L. Gates, L.A. Ingram, C.L. Johnson, J.B. Nietupski, S.H. Cheng, S.J. Eastman and R.K. Scheule, Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid:plasmid DNA complexes in mice. *Hum. Gene Ther.*, **11**, 2493-2513 (2000).
- 4) T. Bieber and H.P. Elsasser, Preparation of a low molecular weight polyethylenimine for efficient cell transfection. *Biotechniques*, **30**, 74-81 (2001).
- 5) C. Kneuer, M. Sameti, U. Bakowsky, T. Schiestel, H. Schirra, H. Schmidt and C.M. Lehr, A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica-nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro. *Bioconjug. Chem.*, **11**, 926-932 (2000).
- 6) D. Putnam, C.A. Gentry, D.W. Pack and R. Langer, Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1200-1205 (2001).
- 7) Y.K. Oh, J.P. Kim, H. Yoon, J.M. Kim, J.S. Yang and C.K. Kim, Prolonged organ retention and safety of plasmid DNA administered in polyethylenimine complexes. *Gene Ther.*, **8**, 1587-1592 (2001).
- 8) S. Grimaldi, A. Lisi, D. Pozzi and N. Santoto, Attempts to use liposomes and RBC ghosts as vectors in drug and antisense therapy of virus infection. *Res. Virol.*, **148**, 177-180 (1997).
- 9) P.R. Mishra and N.K. Jain, Reverse biomembrane vesicles for effective controlled delivery of doxorubicin HCl. *Drug Deliv.*, **7**, 155-159 (2000).
- 10) H. Tajerzadeh and M. Hamidi, Evaluation of hypotonic preswelling method for encapsulation of enalaprilat in intact human erythrocytes. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **26**, 1247-1257 (2000).
- 11) M. Zerbini, G. Gallinella, E. Manaresi, M. Musiani, G. Gentilomi and S. Venturoli, Standardization of a PCR-ELISA in serum samples. *J. Med. Virol.*, **59**, 239-44 (1999).
- 12) Y.K. Oh, D. Suh, J.M. Kim, H.G. Choi, K.S. Shin and J.J. Ko, Polyethylenimine-mediated cellular uptake, nucleus trafficking and expression of cytokine plasmid DNA. *Gene Ther.*, (in press) (2002).