

혈구세포 수송체로 투여된 트레일 유전자의 혈중 발현 지속 효과

변항민 · 권경애* · 신지영 · 오유경†

포천중문 의과대학교, *(주) 한독약품
(2003년 8월 22일 접수 · 2003년 9월 22일 승인)

Prolonged Gene Expression Following Erythrocyte-Mediated Delivery of TRAIL Plasmid DNA

Hyang-Min Byun, Kyoung-Ae Kwon*, Jee-Young Shin and Yu-Kyoung Oh†

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

*Handok Pharmaceutical Co., LTD., Korea

(Received August 22, 2003 · Accepted September 22, 2003)

ABSTRACT—Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a recently identified member of the tumor necrosis factor cytokine superfamily. TRAIL has been shown to induce apoptosis in a number of tumor cells whereas cells from most of normal tissues are highly resistant to TRAIL-induced apoptosis. These observations have raised considerable interest in the use of TRAIL in tumor therapy. In this study we report the biodistribution fates and serum expression pattern of plasmid DNA encoding TRAIL (pTRAIL) delivered in erythrocyte ghosts (EG). pTRAIL was loaded into EG by electroporation in a hypotonic medium. The mRNA expression of pTRAIL was prolonged following delivery in EG-encapsulated forms. EG containing pTRAIL showed significant levels of mRNA expression in the blood over 9 days. The organ expression patterns of pTRAIL delivered via EG, however, did not significantly differ from those of naked pTRAIL, indicating that the expression-enhancing effect of EG containing pTRAIL was localized to the blood. These results suggest that pTRAIL-loaded EG might be of potential use in the treatment of hematological diseases such as TRAIL-sensitive leukemia.

Key words—Erythrocyte ghosts, TRAIL, Non-viral gene delivery, Expression

TRAIL(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)은 최근에 밝혀진 tumor necrosis factor cytokine superfamily의 일종이다.¹⁾ 종양괴사인자(tumor necrosis factor) 계열 사이토카인(cytokine)의 일종인 FasL과 TRAIL은 캐스페이지(caspase) 활성화를 통하여 세포 사멸(apoptosis)을 유도한다고 알려져 있다.²⁾ TRAIL은 종양괴사인자 수용체 superfamily 내의 서로 다른 subgroup의 형태를 갖는 4개의 세포 수용체와 상호 작용한다. TRAIL 수용체 1(TRAIL-R1, or DR4)과 TRAIL 수용체 2(TRAIL-R2, DR5, TRICK2, or KILLER)는 cytoplasmic death domain과 함께 apoptosis, NF- κ B 활성화를 위한 신호를 받는다.³⁾ 이러한 기전으로 TRAIL 단백질은 다양한 악성 종양 세포 주에 세포 사멸을 일으키지만 대부분의 정상적인 세포에 대해서는 독성이 없는 것으로 보고 되어져 왔다.⁴⁾ 이와 같은 보고는 TRAIL이 선택적인 종양치료에 획기적인 치료 수단이 될 것이라 보고 되어져 왔고 그러한 이유로 최근에 많은 주목을 받고 있다.

그러나, TRAIL을 단백질로 체내에 투여할 경우 생체내 짧은 반감기로 인하여 반복적인 투여 치료요법은 한계점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 시도로서는 TRAIL을 유전자 형태로 투여하여 체내에서 유전자의 발현을 지속적으로 유도하는 것이 기대된다. 치료용 유전자를 생체내로 전달시키는 방법으로는 플라스미드 DNA 자체(naked DNA)를 병소에 직접 투여하는 방법,^{5,6)} 폴리라이신과 콤플렉스를 형성한 플라스미드 DNA를 투여하는 방법,⁷⁾ 폴리 에틸렌이민(polyethylenimine), 또는 리포솜(liposome)^{8,9,10)}과 같은 비 바이러스성 유전자 수송체를 사용하는 방법이 있다. 그러나 현재 비 바이러스성 수송체의 주요 구성인자로 사용되는 대부분의 양이온성 고분자나 양이온성 리피드류(cationic lipid)는 세포 독성 등으로 생체내 안전성이 확립되지 않은 문제점이 있다.¹¹⁾

반면 비 바이러스성 유전자 전달 방법 중 적혈구 고스트(erythrocyte ghost; EG)를 이용한 수송체로서의 장점은 내생 물질(endogenous) 생체막 성분이기 때문에 생체 내 독성이 없다는 것과 체내 잔류시간이 다른 비바이러스성 벡터보다 상대적으로 길고 혈중 체류 시간이 연장될 수 있다는 장점

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 031)542-6671, E-mail : ohyk@cha.ac.kr

을 가지고 있다.¹²⁾ 또한, 적혈구는 혈액으로부터 단시간 내에 분리하여 실험적으로 조작할 수 있고 또한 약물을 봉입하여 생체내로 분포시킬 수 있다.¹³⁾

본 연구는 중앙 치료에 선택적인 치료 효능이 있다고 보고된 TRAIL 유전자를 비 바이러스성 수송체인 적혈구를 이용하여 생체내 투여한 경우의 혈중 발현 및 장기 발현을 측정하여 적혈구의 TRAIL 수송체로서의 이용가능성을 평가하였다.

실험 방법

시약 및 기기

시약제조에 사용한 대부분의 분말 시약은 USB(미국)나 Sigma(St. Louis, 미국) 제품을 사용하였고 실험에 사용된 완충액 및 시약은 모두 증류수를 사용하여 제조하였으며, 증류수는 Milli-Q(Millipore Co., 미국)를 통과시켜 제조하였다. Taq polymerase는 바이오니아사(한국)에서 구입하였으며, TRIzol은 Gibco BRL(미국)에서 구입하였다. 역전사(reverse transcription) 키트는 바이오니아사(한국)에서 구입하였다. Electroporator는 Bio-Rad사(미국)의 Gene Pulser II를 사용하였다. 분광광도계(spectrophotometer)는 Kontron사(미국) 제품을 사용하였다. 또한 polymerase chain reaction (PCR)은 Perkin Elmer사(미국)의 GeneAmp PCR system 2400을 사용하였다. PCR에 사용한 primer는 제노텍(한국)에서 주문 제작하여 합성된 것을 사용하였다. EG를 mice에 정맥주사로 투여할 때 사용한 인슐린 주사기(Becton Dickinson, 미국)는 30 게이지 바늘을 사용하였다.

혈구 세포로의 TRAIL 유전자 봉입

적혈구 수송체로서 EG를 만드는 저 삼투압의 투석(hypotonic dialysis)방법은 적혈구에 생물 물리학적, 면역학적인 인자에 최소한의 영향을 주며, *in vivo*에서 정상적인 생존을 할 수 있게 한다.¹⁴⁾ 본 연구에서는 이미 보고된 바와 유사한 방법으로 TRAIL 유전자를 봉입하였다.¹⁵⁾ ICR 암컷 생쥐의 배대 정맥에서 1 ml의 혈액을 채취하여 10 ml의 1× PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) 로 3회 세척하였다. 이러한 세척과정을 거친 적혈구를 ice-cold hypotonic solution (5 mM NaH₂PO₄ · H₂O, 5 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 5 mM MgCl₂ · 6H₂O)에 10 분간 방치하고 이 기간중에 alkaline lysis 방법으로 분리한 TRAIL 플라스미드를 1 mg 첨가하였다. 이렇게 osmotic shock을 받은 적혈구를 electroporator (Bio-Rad Gene Pulser II)의 cuvette으로 옮겨서 0.3 voltage, 0.25 capacity로 전기

충격을 가하였다. Osmotic shock과 electric shock으로 적혈구 막이 손상된 것을 재 봉입(sealing)하기 위하여 4.5% NaCl을 적량 첨가하여 등장액을 만들어 준 후 실온에서 한 시간 방치하였다. 적혈구안에 유전자가 삽입된 것만을 분리하기 위해 인산완충용액으로 3차례 세척하였다.

TRAIL 유전자의 혈액 내 발현

100 µg의 TRAIL 유전자가 봉입된 EG를 암컷 ICR mice에 꼬리 정맥으로 투여하였다. 투여 후 일정한 시간에 쥐의 꼬리에서 혈액을 채취하여 TRIzol 시약을 사용하여 지시된 방법에 따라 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA 1 µg을 reverse transcription 키트를 사용하여 cDNA를 획득하였다. 상기 cDNA를 일정량 취하여 Taq polymerase로 PCR을 진행하여 대량 증폭시켰다. TRAIL 유전자를 증폭하기 위해 사용한 forward 프라이머는 5'-TCA CCA ACG AGA TGA AGC AGC-3' TRAIL, reverse 프라이머는 5'-CTC ACC TTG TCC TTT GAG ACC-3'로서 PCR 생산물의 뉴클레오타이드 수는 513 bp이었다. 이때 사용한 PCR 조작 조건은 92°C에서 5분 후에 94°C에서 30초, 57°C에서 30초, 72°C에서 2분을 28번 반복하고 마지막으로 72°C에서 5분을 처리 해주었다. House keeping gene으로는 GAPDH를 사용하였고 프라이머는 다음과 같다. GAPDH (F) 5'-ATC ACC ATC TTC CAG GAG C GAPDH (R) 5'-AGA GGG GCC ATC CAC AGT CTT C-3' (생산물의 뉴클레오타이드 수: 360 bp).

TRAIL 유전자의 조직 내 발현

100 µg의 TRAIL 유전자가 봉입된 EG를 암컷 ICR mice에 꼬리 정맥으로 투여하였다. 투여 후 1, 3일째 되는 날 각 장기를 적출하여 장기별 무게를 측정한다. 다음, 각 장기에서 50 mg만을 잘라서 homogenizer(Heidolph, 독일)로 조직을 갈아 주고 TRIzol 시약을 사용하여 공지된 방법으로 RNA를 분리하였다. 분리한 1 µg의 RNA를 reverse transcription 키트를 사용하여 cDNA를 얻었다. 이 cDNA를 취하여 Taq polymerase로 PCR을 진행하여 대량 증폭시켰다. 이때 사용한 프라이머는 혈중의 TRAIL 및 GAPDH 발현 측정에 사용한 것과 동일한 것을 사용하였다.

데이터 분석

혈액 및 조직에서의 유전자 발현을 정량하기 위하여, PCR 산물을 2%의 아가로스 겔에 전기 영동 시켜서 각 샘플의 밴드 패턴 이미지를 얻었다. 이것을 이미지 분석기 및 Bio1D software (Vilber Loumat, 프랑스)를 사용하여 각 밴

드의 진한 정도를 수치화시키고 이 수치를 바탕으로 유전자의 발현양을 상대적으로 비교 정량하였다.

결과 및 고찰

최근 분자 생물학 기술의 발전과 더불어서 이들 고분자 생리활성 물질을 최소한의 부작용으로 생체 내 투여하는 효과적인 수송체 개발에 관심이 집중되고 있다. 이들 수송체 중 적혈구는 천연 생체막 성분으로서 혈중 체류시간이 길고 독성이 적은 장점이 있어서 수송체로서의 여러 잠재적인 활용 가능성을 가지고 있다.¹²⁾

EG에 봉입된 형태로 투여된 TRAIL유전자의 혈액 내 발현 양상

EG에 봉입한 형태로 투여된 항암 치료유전자 TRAIL은 naked form으로 투여된 유전자에 비하여 혈중에서 높은 발현 지속시간을 나타내었다. TRAIL 유전자를 naked form 또는 EG에 봉입된 형태로 정맥주사한 다음 혈액에서 TRAIL mRNA의 발현 정도는 house keeping gene과 비교하여 상대적 발현양으로 나타내었다(Figure 1). EG로 투여한 경우, TRAIL 유전자는 3일째 가장 높은 농도로 발현되었다가 이 시기 이후부터 발현양이 감소하기 시작하였다. 그러나 투여 후 9일째 까지도 초기 1일째의 발현 농도 보다 높은 농도로 치료유전자인 TRAIL이 지속적으로 발현됨을 알 수 있었다. 반면 naked DNA는 1일째부터 basal level로 발현

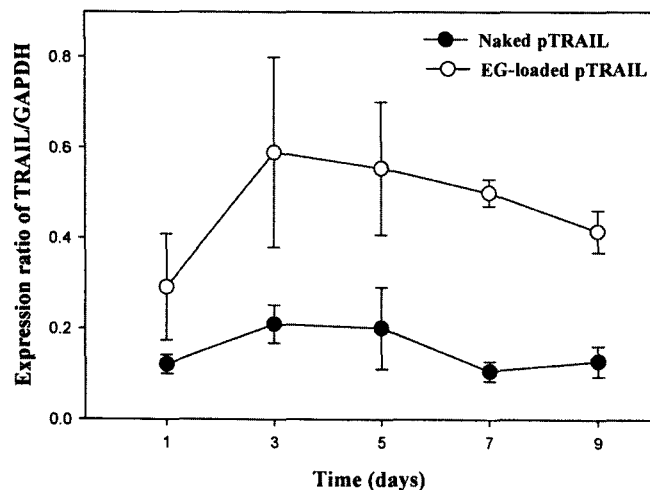


Figure 1—*In vivo* expression level of naked TRAIL and TRAIL-loaded EG in the blood (n=4). Naked TRAIL or TRAIL-loaded EG were intravenously administrated into mice. At various time points, the expression levels of TRAIL in the blood were determined by semi-quantitative RT-PCR. The results are expressed as the mean±SE (n=4).

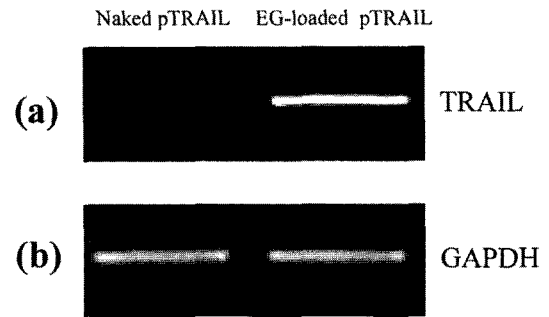


Figure 2—Representative electrophoresis pictures of TRAIL expression. Electrophoresis pictures of TRAIL mRNA expression at day 9 after single intravenous administration. (a) Expression of TRAIL following delivery in naked form or EG-encapsulated form. (b) Expression of GAPDH following delivery in naked form or EG-encapsulated form.

되며 발현양의 최대값이 EG에 봉입된 TRAIL 유전자의 발현양의 최소값 보다도 현저히 적은 것이 관찰되었다.

Figure 2는 naked TRAIL 유전자 또는 TRAIL 유전자가 봉입된 EG를 투여 후 혈액에서 뽑은 RNA를 semi-quantitative RT-PCR을 실시하여 얻은 전기 영동 대표 사진이다. Figure 2a에서 볼 수 있듯이 naked TRAIL 유전자보다 TRAIL 봉입된 EG에서 더 많이 TRAIL이 발현됨을 밴드의 밀도(density)로 알 수 있었고 또한 이러한 발현양의 차이는 reverse transcription에 쓰인 RNA양의 차이에 기인한 것은 아니라는 사실은 house keeping gene인 GAPDH를 동시에 PCR한 결과(Figure 2b)로 알 수 있다. 결국 같은 양의 total RNA가 reverse transcription에 쓰였음에도 naked TRAIL 유전자보다 EG에 봉입된 TRAIL 유전자를 투여했을 때 더 많은 양의 TRAIL유전자가 혈액 내에서 발현된 것임을 밴드 사진으로 알 수 있었다.

따라서 플라스미드 유전자 자체보다 EG에 봉입시켰을 때 혈액에서 장시간 치료유전자가 발현될 수 있으며 플라스미드 DNA 자체보다 상대적으로 더 많은 양이 혈액에서 발현되어 진다는 것을 알 수 있었다. 이것으로 EG에 봉입된 치료유전자 TRAIL은 혈액 질병을 치료하는데 있어 다른 수송체 보다 높은 우위를 가질 수 있을 것으로 사료된다.

EG에 봉입된 TRAIL유전자의 조직별 발현 양상

EG로 투여된 TRAIL유전자는 혈액에서는 naked 유전자보다 높고 지속적인 발현 양상을 나타내었으나 조직별 발현 양상은 naked 유전자와 큰 차이를 보이지 않았다. Figure 3은 TRAIL 유전자를 naked form 또는 EG에 봉입된 상태로 투여하고 1일 경과후의 조직 발현 양상을 분석한 결과이다. TRAIL을 EG에 봉입해서 유전자를 수송한 경우와 플라스미

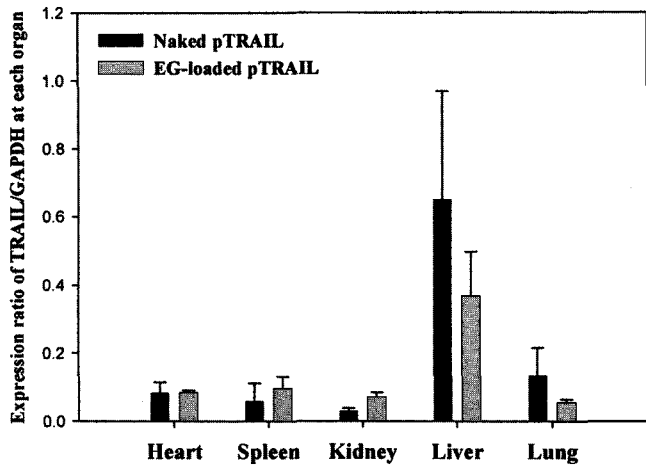


Figure 3—Organ distribution and expression of plasmid TRAIL. At 1 day post-dose, the mice were sacrificed and RNA was extracted from each organ sample. The relative expression levels of TRAIL were determined by semi-quantitative RT-PCR. The results are expressed as the mean±SE (n=4).

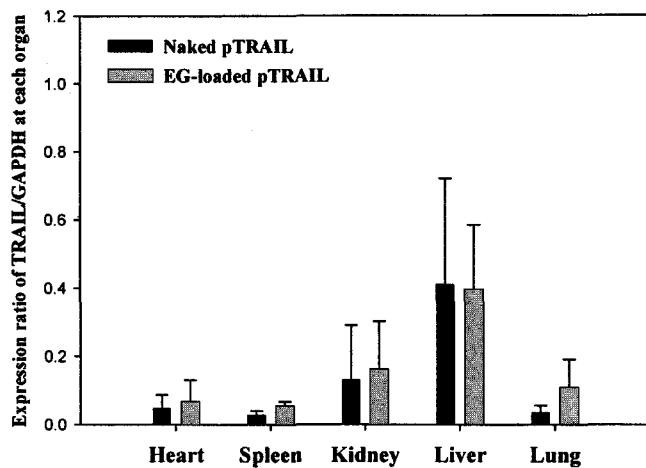


Figure 4—Organ distribution and expression of plasmid TRAIL. At 3 day post-dose, the mice were sacrificed and RNA was extracted from each organ sample. The relative expression levels of TRAIL were determined by semi-quantitative RT-PCR. The results are expressed as the mean±SE (n=4).

드 TRAIL만을 자체 투여한 것과 모든 조직에서 거의 비슷한 정도로 유전자가 발현됨을 알 수 있었다. 이 결과는 TRAIL을 EG에 봉입시켜 생체내 투여한 경우, 유전자가 특정 장기로 선택적으로 수송된다고는 혈액으로 더 많이 집중되어 발현된다는 것을 나타낸다. Figure 3의 데이터는 각 조직의 무게를 감안하여 계산한 값을 그래프로 나타낸 것이다. 따라서 다른 장기보다 간에서 TRAIL의 발현이 높게 나온 것은 간 조직이 TRAIL을 선택적으로 많이 발현하는 것이 아니라 다른 장기보다 무게가 10배 정도가 더 크기 때문인 것으로 사료된다. Figure 4는 TRAIL 유전자를 봉입한

EG를 투여 후 3일째 각 조직을 적출하여 TRAIL의 발현을 알아본 결과이다. 3일째 결과에서도 볼 수 있듯이 각 조직에서 TRAIL의 발현양은 naked form으로 투여한 경우와 EG에 봉입한 형태로 TRAIL을 투여한 경우가 유의성 있는 차이가 나지 않음을 알 수 있다. 또한 본 논문에서는 별도의 데이터로 나타내지 않았으나, Figure 3과 4의 결과에서 조직의 전체 무게가 아닌 조직의 단위 무게 당 TRAIL의 발현양을 비교하여 분석한 경우에도 naked form으로 투여한 경우와 EG에 봉입한 형태로 TRAIL 유전자를 투여한 경우 간에 유의성 있는 차이가 나타나지 않는 것이 관찰되었다.

따라서 이러한 결과에 따라 TRAIL을 봉입시킨 EG는 조직으로의 수송보다는 혈액으로의 수송이 뛰어나기 때문에 혈액 질병을 치료하기 위한 수단으로 사용할 수 있는 잠재적 가능성이 있을 것으로 예측된다. 특히, TRAIL이 정상 사람의 hematopoiesis에는 영향을 주지 않으면서 초기 primary leukemia의 성장을 억제시킨다는 연구결과가 보고된 바 있어¹⁶⁾ TRAIL의 혈액 관련 종양에서의 치료 응용성은 높을 것으로 기대된다. 이러한 연구들에 근거해 볼때, 본 연구는 혈액 종양 치료에 효과를 지니고 있는 TRAIL 유전자를 바이러스성 수송체인 적혈구를 수송체로 이용하여 혈중에서 장기간 지속하여 발현시켜서 백혈병과 같은 혈액 종양 치료에 이용할 수 있는 가능성을 제시한다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(과제번호 R01-2002-000-00024-0) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) A.E. Tollefson, K. Toth, K. Dronin, M. Kuppaswamy, O. A. Dronina, D.L. Lichtenstein, T.W. Hermiston, C.A. Smith and W.S. Wold. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis and forced internalization of TRAIL receptor 1 by adenovirus proteins. *J. Virol.*, **75**, 8875-8887 (2001).
- 2) Q. Chen, S. Ray, M.A. Hussein, G. Srkalovic and A. Almasan. Role of Apo2L/TRAIL and Bcl-2-family proteins in apoptosis of multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma*, **44**, 1209-1214 (2003).
- 3) A.K. Simon, O. Williams, J. Mongkolsapaya, B. Jin, Xu XN, H. Walczak and G.R. Screaton. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in T cell development: sensitivity of human thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **98**, 5158-5163 (2001).
- 4) T. Naka, K. Sugamura, B.L. Hylander, M.B. Widmer, Y.M. Rustum and E.A. Repasky. Effects of tumor necrosis factor-

- related apoptosis-inducing ligand alone and in combination with chemotherapeutic agents on patients' colon tumors grown in SCID mice. *Cancer Res.*, **62**, 5800-5806 (2002).
- 5) R.W. Malone, M.A. Hickman, K. Lehmann-Bruinsma, T.R. Sih, R. Walzem, D.M. Carlson and J.S. Powell. Dexamethasone enhancement of gene expression after direct hepatic DNA injection. *J. Biol. Chem.*, **269**, 29903-29907 (1994).
 - 6) M.A. Hickman, R.W. Malone, K. Lehmann-Bruinsma, T.R. Sih, D. Knoell, F.C. Szoka, R. Walzem, D.M. Carlson and J.S. Powell. Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum. Gene Ther.*, **5**, 1477-1483 (1994).
 - 7) G.Y. Wu and C.H. Wu. Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J. Biol. Chem.*, **263**, 14621-14624 (1988).
 - 8) Y.K. Oh, D. Suh, J.M. Kim, H.G. Choi, K. Shin and J.J. Ko. Polyethylenimine-mediated cellular uptake, nucleus trafficking and expression of cytokine plasmid DNA. *Gene Ther.* **9**, 1627-1632 (2002).
 - 9) S.F. Alino, J. Crespo, M. Bobadilla, M. Lejarreta, C. Blaya and A. Crespo. Expression of human alpha 1-antitrypsin in mouse after *in vivo* gene transfer to hepatocytes by small liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**, 1023-1030 (1994).
 - 10) T. Hara, Y. Aramaki, S. Takada, K. Koike, and S. Tsuchiya. Receptor-mediated transfer of pSV2CAT DNA to mouse liver cells using asialofetuin-labeled liposomes. *Gene Ther.*, **2**, 784-788 (1995).
 - 11) R.K. Scheule, St J.A. 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).
 - 12) M. Magnani, L. Rossi, A. Fraternali, M. Bianchi, A. Antonelli, R. Crinelli and L. Chiaranti. Erythrocyte-mediated delivery of drugs, peptides and modified oligonucleotides. *Gene Ther.*, **9**, 749-751 (2002).
 - 13) M. Magnani, A. Casabianca, A. Fraternali, G. Brandi, S. Gessani, R. Williams, M. Giovine, G. Damonte, A. De Flora and U. Benatti. Synthesis and targeted delivery of an azidothymidine homodinucleotide conferring protection to macrophages against retroviral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **93**, 4403-4408 (1996).
 - 14) J.R. DeLoach, and R. Droleskey. Preparation of ovine carrier erythrocytes: their action and survival. *Comp. Biochem. Physiol. A.*, **843**, 441-445 (1986).
 - 15) 변향민, 박상은, 김정목, 고정재, 오유경. 플라스미드 유전자 함유 혈구 세포 입자의 제조. *한국약제학회지*, **32**, 181-184 (2002).
 - 16) M. Plasilova, J. Zivny, J. Jelinek, R. Neuwirtova, J. Cermak, E. Necas, L. Andera and T. Stopka. TRAIL (Apo2L) suppresses growth of primary human leukemia and myelodysplasia progenitors. *Leukemia*, **16**, 67-73 (2002).