

레트로바이러스(retrovirus)의 NIH 3T3 세포로의 유전자 전달효율을 증가시키기 위한 적절한 조건들

원자력병원 소아과

이준아 · 이강민 · 이현재 · 이윤정 · 김동호 · 임중섭 · 박경덕

The optimal conditions to improve retrovirus-mediated transduction efficiency to NIH 3T3 cells

Jun Ah Lee, M.D., Kang-Min Lee, M.D., Hyun Jae Lee, M.D., Yun Jeong Lee, M.D.
Dong Ho Kim, M.D., Jung Sub Lim, M.D. and Kyung-Duk Park, M.D.

Department of Pediatrics, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

Purpose : We tried to assess the optimal conditions to improve low transduction efficiency and their effect on target cells.

Methods : Cultured NIH 3T3 cells were incubated with retroviral vectors bearing an enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene. We varied the ratio of viral vectors to target cells (1:1-1:8) and the number of transfections ($\times 1$, $\times 2$), and compared transduction efficiencies. Also, the effects of polybrene on transduction efficiency and viability of target cells were assessed. Transduction of the eGFP gene was evaluated by observing NIH 3T3 cells under a fluorescence microscope and efficiencies were measured by the percentage of eGFP positive cells using FACscan.

Results : As the ratio of retroviral vectors to target cells increased, transduction efficiency was greatly improved, from 7% (1:1) to 38% (1:4). However, transduction efficiency did not increase any more when the ratio increased from 1:4 to 1:8. Cells transfected twice showed higher transduction efficiencies than cells transfected once, at a ratio of 1:8. The eGFP gene transduced to NIH 3T3 cells sustained its expression during repeated passages. However, after the third passage (day 9), the percentage of eGFP positive cells began to decline. The degree of this decline in eGFP expression was lower in cells transfected twice than in cells transfected once ($P < 0.05$). The addition of polybrene did not have any toxic effect on NIH 3T3 cells and greatly increased transduction efficiency ($P = 0.007$). In addition to vector component, transduction efficiency was very sensitive to culture confluence. Cells cultured and transfected in 24-well plate showed higher transduction efficiency, although cells cultured in 6-well plate proliferated more ($P = 0.024$).

Conclusion : Our data could be used as a basis for retrovirus-based gene therapy. Further study will follow using human cells as target cells. (Korean J Pediatr 2007;50:1011-1017)

Key Words : Retrovirus, Transduction efficiency, NIH 3T3, Gene therapy

서 론

외부로부터 유전자를 주입하여 결손된 유전자를 교정하거나 세포에 새로운 기능을 제공하는 유전자 치료는 미래의 치료법으

로 기대를 받고 있다. 유전자 치료가 성공하기 위해서는 다음의 과정들을 단계적으로 거쳐야 한다. 첫 번째, 주입하고자 하는 목적 유전자를 지닌 전달백터를 제조하는 과정, 두 번째, 제조된 유전자 전달백터를 표적세포에 삽입하는 과정, 그리고 백터에 의해 표적세포로 전달된 유전자가 안정적으로 발현하는 것이 마지막 단계이다. 유전자 전달매체로 비바이러스성 벡터 혹은 바이러스 벡터 중 어느 것을 선택할 것인지, 효율적인 바이러스 벡터의 제조에 따른 문제 등 각 단계별로 난항이 있어 왔으나 수많은 시행착오 끝에 근래 들어 많은 진보를 이루었다^{1,2)}.

성공적인 유전자 치료를 위해서는 적절한 전달백터와 유전자

접수 : 2007년 6월 20일, 승인 : 2007년 8월 1일

이 연구는 한국혈우재단의 연구비 지원으로 이루어졌음.

책임저자 : 이준아, 원자력병원 소아과

Correspondence : Jun Ah Lee, M.D.

Tel : 02)970-2350 Fax : 02)970-2403

E-mail : junahlee@kcch.re.kr

가 안정적으로 발현될 수 있는 표적세포의 선택이 중요하다. 레트로바이러스(retrovirus)는 아데노바이러스(adenovirus)와 함께 유전자 전달매체로 가장 많이 사용되는 벡터로 아데노바이러스와 비교하였을 때 면역반응을 일으키지 않으며 전달된 유전자가 표적세포의 유전자에 통합(integrate) 되어 안정적으로 발현되는 것이 장점이다. 하지만 레트로바이러스는 분열 중인 세포에만 주입이 되며 확산속도가 느려서 표적세포에 도달하기 전 상당수의 바이러스 입자들이 불활성화되어 만족할만한 수준의 유전자 전달효율을 얻지 못하는 것이 문제점이다^{3,4)}. 레트로바이러스 벡터의 문제점인 낮은 유전자 전달효율을 극복하기 위하여 표적세포에 대한 바이러스 입자의 수를 늘려 접촉확률을 높이는 기본적인 방법으로부터 원심분리, flow-through transduction 등의 다양한 방법이 고안되었다⁵⁻⁸⁾. 그러나 이와 같은 방법들은 대규모 실험에서 이용하는데 한계가 있기 때문에 유전자 전달과정 중 polybrene, protamine sulfate 등의 양이온 복합체를 첨가하여 표적세포와 레트로바이러스의 전기적 반발력을 제거하는 방법이 주로 이용되고 있다^{5,9)}.

레트로바이러스를 벡터로 이용하는 유전자 치료의 연구에서 위에 언급한 과정들을 단계적으로 연구하여 기초자료를 확보하는 것이 필수적이다. 본 연구에서는 유전자 치료의 두 번째 단계인 바이러스 벡터를 표적세포에 삽입하는 과정의 효율을 향상시키기 위한 조건을 알아보고자 하였다. 표적세포로는 실험의 편의를 위하여 분열속도가 비교적 빠른 쥐의 섬유아세포인 NIH 3T3를 선택하였다. 저자들은 표적세포에 대한 벡터의 비율과 transfection 횟수를 변화시켰을 때, 양이온 복합체인 polybrene을 첨가하였을 때 유전자 전달효율의 변화를 분석하여 레트로바이러스를 전달매체로 하는 유전자 치료의 기초적인 자료를 확립하고자 하였다.

대상 및 방법

레트로바이러스 벡터와 표적세포인 NIH 3T3의 비율(1:1, 1:2, 1:4, 1:8), 전달감염(transfection) 횟수(1회, 2회), polybrene 첨가에 따른 유전자 전달효율의 변화를 분석하였으며 각 실험은 5회씩 반복하였다.

1. NIH 3T3 세포주의 배양

NIH 3T3(ATCC, Rockville, MD, USA)는 Dulbecco's Minimum Essential Medium(DMEM), 4 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin, 0.25 µg/mL, amphotericin B, 10% fetal bovine serum(FBS)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂의 환경에서 배양하였다. 배양액은 3일마다 교환하였으며 매주 2회 계대배양을 시행하였다.

2. 레트로바이러스 벡터

Enhanced green fluorescent protein(eGFP)을 표지 유전자

로 하는 레트로바이러스 벡터를 바이로메드(ViromedR, Seoul, Republic of Korea)로부터 구입하여 실험에 사용하였으며 제조 과정은 다음과 같다. eGFP 서열을 레트로바이러스 MIN에 클로닝 한 다음 IRES-neo 카세트를 포함하는 BamHI-XhoI 분절을 제거하여 MT-eGFP벡터를 구성하였다. MT-eGFP 플라스미드를 pVM-GP, pVM-AE 플라스미드와 함께 293T 세포에 calcium phosphate 침전법으로 전달감염 시켰다. 이로부터 얻은 바이러스 부유액을 PG13 세포에 형질도입(transduction) 한 후 14일 후에 eGFP 발현이 가장 높은 클론을 선택하여 바이러스 부유액을 수확하여 실험에 사용하였다. MT-eGFP의 바이러스 농도는 HT 180세포를 표적으로 하여 real-time quantitative PCR 방법으로 측정하였으며 대략 3106 colony forming units/mL이었다.

3. 레트로바이러스 벡터의 유전자 전달과정

10% FBS-DMEM 배지에 부유한 NIH 3T3 세포를6-well plate(9.6 cm²)에 well당 1×10⁵, 24-well plate(1.9 cm²)에는 well당 2×10⁴개씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ 환경에서 세포가 배양접시 바닥에 안정적으로 고착할 수 있도록 하였다. 24시간 후 레트로바이러스 벡터와 polybrene(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 4 µg/mL의 농도로 첨가하고 같은 조건에서 72시간 배양하였다. 두 번 전달감염을 시행하는 경우는 첫 번째 레트로바이러스 벡터를 첨가한지 24시간 후 동량의 벡터와 polybrene을 첨가하였다.

4. 유전자 전달효율의 확인

상기 방법으로 레트로바이러스 벡터를 전달감염 시킨 후 NIH 3T3의 세포수와 trypan blue exclusion 방법을 이용하여 세포 생존도를 분석하였다. 표적세포로 레트로바이러스 벡터에 의해 eGFP 유전자가 전달되었는지 확인하기 위하여 형광 현미경하에서 녹색빛의 발현을 관찰하였다. 그리고 약 5×10⁶의 NIH 3T3 세포를 phosphate buffered saline(PBS)-1% bovine serum albumin(BSA)으로 2회 세척, 원심분리(1,000 g, 5분)하고 4% formaldehyde-1% BSA 1 mL로 고정시킨 후 FACscan(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)을 이용하여 eGFP 양성 세포의 비율을 측정하고 이를 유전자 전달효율로 정의하였다.

5. 통계

각 실험조건에 따른 유전자 전달효율의 변화는 Mann-Whitney test를 시행하여 P 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. NIH 3T3 세포 레트로바이러스 벡터의 비율에 따른 유전자 전달효율의 변화

NIH 3T3 세포에 대한 레트로바이러스 벡터의 비율이 높아짐에 따라 FACScan 에서 eGFP 양성세포의 비율이 상승하였고

형광 현미경하에서 녹색빛을 발하는 세포의 수가 증가하며 녹색 빛이 더 밝고 강하게 관찰되어 유전자 전달효율이 상승하는 것을 알 수 있었다. 표적세포에 대한 레트로바이러스의 비율을 1:1 에서 1:2, 1:2에서 1:4로 증가시켰을 때 eGFP 양성세포의 비율이 각각 3배, 1.9배 상승하였지만 1:4에서 1:8로 변화시켰을 때에는 차이가 없었다(Fig. 1).

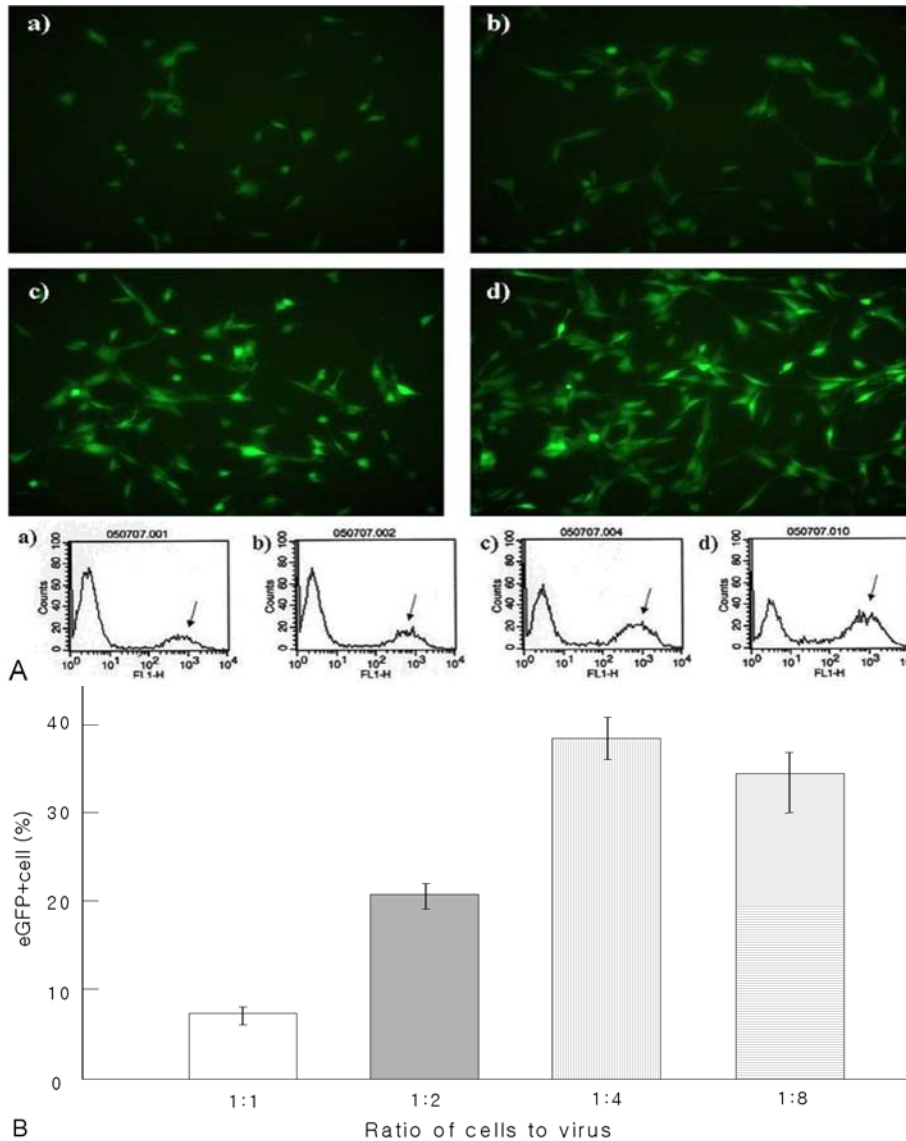


Fig. 1. Expression of eGFP gene at various ratios of retroviral vector to NIH 3T3 cells. (A) Transduction of eGFP gene was confirmed by observing cells under fluorescence microscope and by measuring cells positive for eGFP using FACScan. As the ratio of viral vectors to NIH 3T3 cells increased, number of cells emitting green light increased and the intensity became stronger. a) 1:1, b) 1:2, c) 1:4, d) 1:8 (Magnification 400). (B) Transduction efficiencies showed twofold-increases as the ratio of viral vectors to target cells increased. However transduction efficiency did not increase any more when the ratio increased from 1:4 to 1:8.

2. 레트로바이러스 벡터의 전달감염 횟수에 따른 유전자 전달효율의 변화

레트로바이러스 벡터를 두 번 전달감염 시키는 경우 배양기간이 24시간 더 연장되었지만 한 번 하는 경우와 비교하여 NIH 3T3 세포수의 증식정도에 차이는 없었다. NIH 3T3에 대한 벡터의 비율이 1:1, 1:2, 1:4인 경우에는 전달감염을 두 번 반복해도 유전자 전달효율이 별다른 변화가 없었다. 표적세포에 대한 레트로바이러스의 비율이 1:8인 경우는 eGFP 양성세포의 비율이 35.7%에서 59.1%로 상승하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 2).

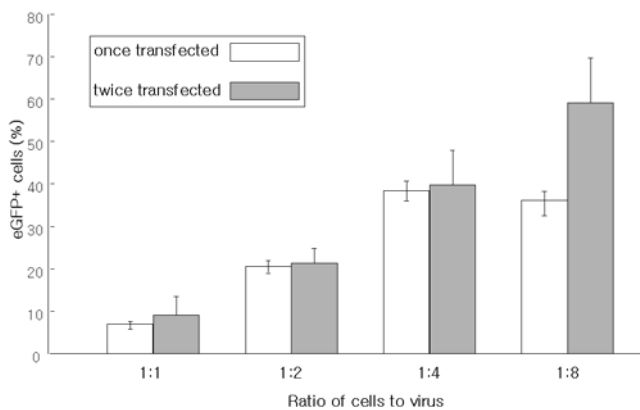


Fig. 2. Effect of transfection frequency on retroviral transduction. Cells transfected twice at ratio of 1:8 showed higher transduction efficiency than cells transfected once, but this was not statistically significant.

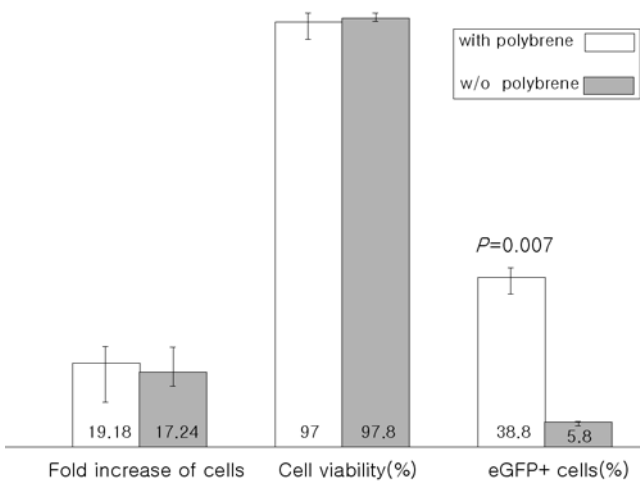


Fig. 3. Effect of polybrene on cell proliferation, viability and transduction efficiency. Addition of polybrene greatly increased transduction efficiency, from 5.8% to 38.8%. Cells transfected with polybrene did not have any differences in fold increase of cells and viability from cells transfected without polybrene.

3. Polybrene 첨가에 따른 변화

표적세포에 대한 레트로바이러스 벡터의 비율 1:4에서 polybrene의 첨가에 따른 유전자 전달효율을 비교하였다. Polybrene 없이 전달감염을 하였을 때 eGFP 양성세포의 비율은 평균 5.8%이었지만 polybrene을 첨가한 경우에는 평균 38.8%로 약 7배 증가하였다(*P*=0.007). Polybrene이 표적세포에 독성을 미치는지 확인하기 위하여 polybrene 투여군과 투여하지 않은 군의 세포수 증가정도와 생존도를 비교하였으나 두 군 사이에 차이는 없었다(Fig. 3). 또한 레트로바이러스 전달감염을 두 번 시행하는 경우에는 첨가되는 polybrene의 양이 두 배인데 한 번 전달감염한 경우와 비교하여 세포 생존도에 차이가 없어 polybrene이 NIH 3T3 세포에 독성을 미치는 않는 것으로 판단되었다.

4. 배양접시의 크기에 따른 유전자 전달효율의 차이

배양접시의 크기에 따라 유전자 전달효율이 차이가 있는지 알아보기 위하여 6-well plate와 24-well plate에 NIH 3T3 세포를 분주하고 레트로바이러스 벡터를 전달감염 시킨 후 유전자 전달효율을 비교하였다. 6-well plate(9.6 cm²)에는 각 well 당 1×10⁵의 세포를 5 mL의 배양액에 부유하여 분주하고 24-well

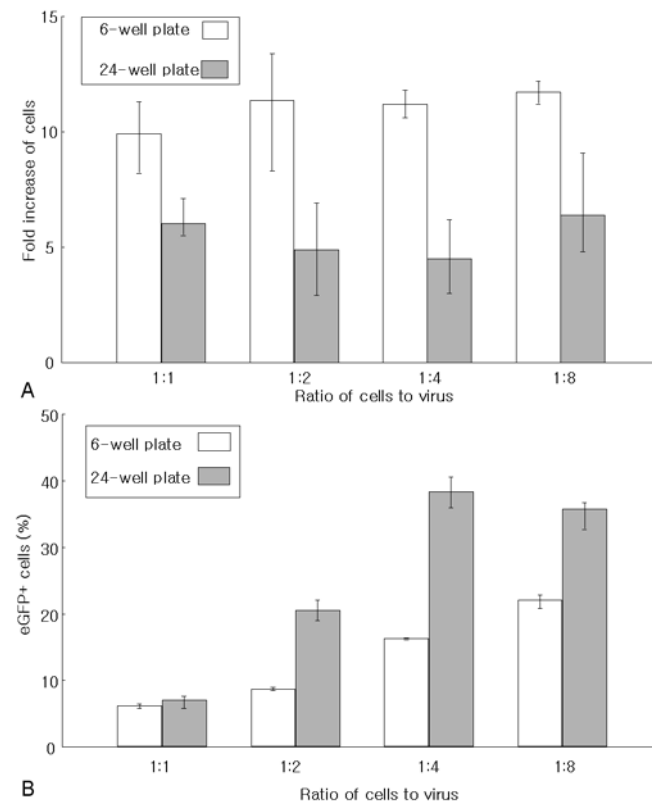


Fig. 4. Influence of culture confluence on transduction efficiency. Although the number of cells cultured in 6-well plate increased more (A), cells transfected in 24-well plate expressed more eGFP gene (B).

plate(1.9 cm²)에는 각 well 당 2×10⁴의 세포를 2 mL의 배양액에 부유하여 분주하였다. 레트로바이러스를 전달감염 시킨 지 72 시간 후 세포수의 증가와 eGFP 양성세포의 비율을 비교하였다. 벡터와 표적세포의 비율에 따라 약간의 차이는 있으나 NIH 3T3 세포수는 6-well plate에서 9.9-11.73배, 24-well plate에서는 4.5-6.38배 증가하였다. eGFP 양성세포의 비율은 6-well plate에서 6.1-20.0%, 24-well plate에서 7.0-35.7%으로 24-well plate에서 유전자 전달효율이 더 높게 나타났다. 특히 벡터와 표적세포의 비율이 1:2, 1:4인 경우 이 차이는 더욱 뚜렷하게 관찰되었다($P=0.024$)(Fig. 4)

5. 계대배양에 따른 eGFP 양성세포 비율의 변화

레트로바이러스 벡터로 한 번 전달감염한 NIH 3T3 세포를 3 일 간격으로 4회 계대배양하며 eGFP 양성세포 비율의 변화를 추적 관찰하였다. 3번째 계대배양(제 9일)까지 eGFP 양성세포의 비율이 증가하였는데 벡터와 표적세포의 비율과는 상관없이 배양시작일의 eGFP 양성세포의 비율을 1로 기준하였을 때 3일 간

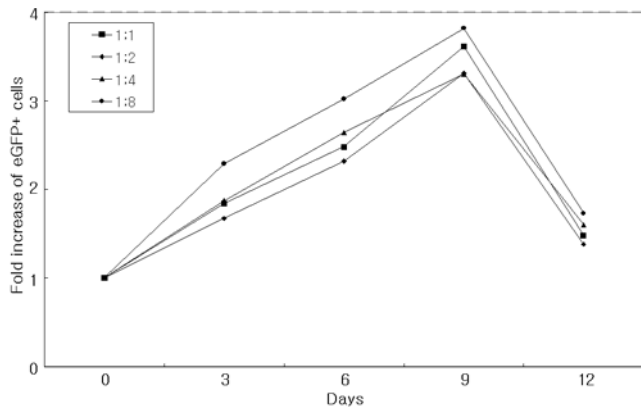


Fig. 5. Change of eGFP expression during repeated passages of transfected NIH 3T3 cells. Until the third passages, eGFP expression increased more than three times, regardless of the ratio of viral vectors to target cells.

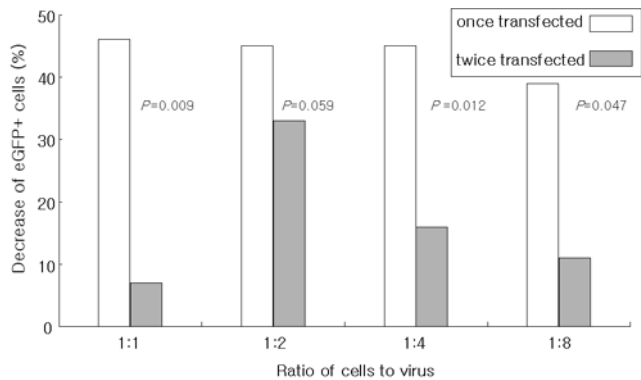


Fig. 6. Decrease of eGFP expression after third passage of NIH 3T3 cells. The degree of eGFP decline was most prominent at ratio 1:1.

격으로 각각 2, 2.5, 3배 증가하였다. 그러나 12일째에 eGFP 양성세포의 비율은 39-46% 감소하였다(Fig. 5). 레트로바이러스 전달감염 횟수에 따른 eGFP 양성세포 비율의 감소를 비교하였을 때 벡터와 표적세포의 비율에 상관없이 전달감염을 한 번 시행한 경우에 두 번 시행한 경우보다 더 크게 감소하였다. 레트로바이러스 벡터와 표적세포의 비율 1:2에서 eGFP가 33%, 비율 1:1, 1:4, 1:8에서는 각각 7, 16, 11%씩 감소하여 두 번의 전달감염에 의해 유전자의 지속기간이 연장된 것을 알 수 있었다($P < 0.05$)(Fig. 6).

고 찰

최근까지도 유전자 치료의 연구분야에서 유전자 전달효율의 극대화가 중요한 현안이다⁸⁾. 레트로바이러스 벡터의 문제점인 낮은 유전자 전달효율을 극복하기 위하여 표적세포에 대한 벡터 입자의 수를 늘려 접촉확률이나 횟수를 높이거나 유전자 전달과정에 양이온 복합체를 처리하여 표적세포와 바이러스 벡터의 전기적 반발력을 제거하려는 화학적 방법들이 사용되고 있다. 본 연구는 레트로바이러스 벡터를 매체로 eGFP 유전자를 쥐의 섬유아세포인 NIH 3T3로 주입할 때 유전자 전달효율을 향상시킬 수 있는 조건들을 살펴보고자 표적세포 NIH 3T3에 대한 레트로바이러스 벡터의 입자 수를 변화시키고(1:1-1:8), 접촉횟수를 증가시켰을 때(1회, 2회) 유전자 전달효율의 변화를 살펴보았다. 표적세포에 접촉하는 바이러스 벡터의 수가 늘어날수록 유전자 전달효율이 증가해야 할 것으로 생각되지만 벡터와 표적세포의 비율 1:4와 1:8사이에 eGFP 양성세포의 비율은 차이가 없었다. 레트로바이러스 벡터의 유전자 전달효율은 벡터와 표적세포에 존재하는 수용체 사이의 상호작용에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다^{3, 10)}. 따라서 이와 같은 결과는 NIH 3T3 세포의 바이러스 벡터에 대한 수용체가 포화 되었거나 수용체를 표현하는 세포의 수가 한정되어있기 때문일 것으로 생각된다. 혹은 바이러스 부유액에 섞여있는 바이러스 외피(envelope) 잔해가 레트로바이러스와 경쟁적으로 표적세포와 결합했을 가능성도 있다. 최근 바이러스 부유액에 포장세포에서 떨어져 나온 속이 비어있는(empty) 바이러스 입자가 존재한다는 실험결과 들도 보고되고 있다¹¹⁾. 이러한 경우는 벡터와 표적세포의 비율을 높여도 유전자 전달 효율은 상승하지 않을 것이다. 레트로바이러스 벡터가 분열 중인 세포에만 주입된다는 점을 고려할 때 전달감염 횟수가 많아지면 분열주기에 있는 세포들이 벡터와 접촉할 기회가 많아지므로 유전자 전달효율이 상승할 것이다. 본 연구에서 벡터와 표적세포의 비율 1:4까지는 차이가 없지만 비율 1:8에서는 전달감염을 두 번 시행하는 경우에 유전자 전달효율이 더 높았다. 전달감염을 두 번 시행한 경우가 한 번 시행한 경우보다 계대배양시에 eGFP 양성세포의 비율이 감소되는 정도가 작은 것으로 보아 전달감염의 빈도는 유전자 전달효율의 증가효과보다는 주입된 유전자의 지속적인 발현에 더 영향을 미치는 것으로 생각된다

다.

본 연구에서 NIH 3T3세포의 증식정도는 6-well plate가 더 컸지만 유전자 전달효율은 24-well plate에서 더 높았다. 배양접시 단위면적 당 NIH 3T3 세포수가 약 1,104으로 동일하였지만 6-well plate에서 전달감염 시 배양액의 부피는 24-well plate의 2.5배이었다. 이러한 결과는 레트로바이러스 벡터가 효율적으로 전달되기 위해서는 표적세포가 활발히 분열하는 것도 중요하지만 벡터와 표적세포의 접촉확률을 높이기 위해 밀집된 전달감염 환경을 조성하는 것이 매우 중요하다는 것을 시사한다. 따라서 앞으로 레트로바이러스 벡터를 이용한 유전자 전달실험을 체외에서 시행할 때 가능한 최소한의 부피와 면적조건에서 전달감염을 시행하는 것이 유전자 전달효율을 향상시키는 데 도움이 될 것으로 생각된다.

양이온 복합제인 polybrene과 protamine sulfate는 표적세포와 바이러스 입자표면 사이의 음이온에 의한 반발력을 중화함으로써 바이러스 입자가 표적세포에 부착하는 것을 향상시켜 유전자 전달을 촉진하지만 약제 자체의 독성에 대한 우려가 있다. 특히 protamine sulfate는 혈관신생과 세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 그러나 이들 약제가 세포증식을 억제하는 농도는 80-800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도이기 때문에 통상적으로 사용하는 농도인 4-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 세포에 독성을 나타내지 않을 것으로 생각된다⁹⁾. 본 실험에서도 polybrene(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 첨가가 NIH 3T3 세포의 생존도나 증식정도에 영향을 미치지 않았다.

본 연구에서 레트로바이러스 벡터에 의해 전달된 eGFP 유전자는 표적세포가 3회 분열할 때까지는 높은 수준으로 발현하였다. NIH 3T3 세포의 성장속도가 인간 섬유아세포 보다 빠른 점을 감안한다면 레트로바이러스 벡터를 이용하여 인간 섬유아세포에 전달된 유전자는 한 달 정도는 높은 수준의 발현을 보일 것으로 생각된다. 이론적으로 레트로바이러스 벡터는 표적세포에 유전자를 통합(integration)시키므로 주입된 유전자는 지속적으로 발현하고 표적세포의 분열에 따라 그 발현의 정도도 증가해야 할 것이나 현재까지 보고된 실험결과들에 의하면 주입된 유전자의 발현이 지속적이지는 않다²⁾. 유전자의 발현에는 단순히 유전자의 전달여부 외에도 epigenetics, proteomics 등이 관여하기 때문에 이에 대한 더 많은 연구가 필요할 것이다. 본 연구에서는 유전자 전달효율을 eGFP 양성세포의 비율로 측정하였지만 eGFP의 발현이 항상 바이러스 벡터에 의한 것만은 아니며 표적세포에 함입되지 않은 것에 의해서도 FACScan에서 양성으로 나타날 수 있으므로 이것만으로 유전자 전달효율을 단정하기는 문제가 있다. 따라서 유전자 전달효율을 정확하게 확인하기 위해서는 neomycin에 대한 저항 유전자와 같은 다른 방식으로 유전자 전달효율을 평가할 수 있는 표지 유전자를 함께 사용하는 것이 좋을 것으로 생각된다^{13, 14)}.

근래 들어 바이러스 벡터들의 성능이 개선되어 유전자 전달효율의 문제는 상당부분 해결이 되어가고 있으므로 앞으로는 유전자 전달 이후의 문제들, 즉 전달된 유전자가 안정적으로 발현을

하고 생물학적으로 활성화되는지의 여부, 바이러스 벡터들의 독성 등에 대하여 연구의 초점을 두어야 할 것으로 생각된다. 본 연구결과 저자들은 레트로바이러스 벡터를 이용한 NIH 3T3세포로의 유전자 전달효율을 향상시킬 수 있는 실험자료들을 얻었으며 이는 향후 유전자 치료에 필요한 기초 자료로 이용될 수 있을 것이다.

요 약

목적 : 쥐의 섬유아세포인 NIH 3T3와 eGFP 유전자를 표지로 하는 레트로바이러스 벡터를 이용하여 유전자 전달효율을 향상시킬 수 있는 조건들을 살펴보고자 하였다.

방법 : 표적세포에 대한 벡터의 비율과(1:1-1:8) 전달감염 횟수를 변화시켰을 때(1회, 2회), 양이온 복합제인 polybrene(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 첨가하였을 때 유전자 전달효율의 변화를 분석하였다. eGFP 유전자의 발현을 확인하기 위하여 형광 현미경 하에서 녹색빛을 내는 세포들을 관찰하고 FACscan으로 eGFP 양성세포의 비율을 측정하였다.

결과 : 유전자 전달효율은 벡터와 표적세포의 비율 1:1에서 7%, 1:4에서 38%로 표적세포에 대한 레트로바이러스 벡터의 비율이 높을수록 상승하였지만 비율 1:4와 1:8사이에서는 차이가 없었다. 전달감염을 두 번 시행하는 것이 벡터와 표적세포의 비율 1:4까지는 유전자 전달효율에 영향을 미치지 않았지만 비율 1:8에서는 유전자 전달효율을 증가시켰다. 전달감염 후 eGFP 유전자의 발현은 3회 계대배양까지 약 3배 가량 증가하였지만 이후에는 감소하였는데 이와 같은 감소 정도는 전달감염을 한 번 시행한 경우가 두 번 시행한 경우보다 더 커서 전달감염을 반복하는 것이 유전자 전달효율의 증가효과보다는 주입된 유전자의 지속발현에 더 영향을 미치는 것으로 판단되었다. Polybrene을 첨가하였을 때 유전자 전달효율은 5.8%에서 38.8%로 대폭 상승하였으며 독성반응은 관찰되지 않았다. 배양접시의 크기에 따른 유전자 전달효율을 비교하였을 때 NIH 3T3세포의 증식정도는 6-well plate가 더 컸지만 eGFP 양성세포의 비율은 24-well plate에서 더 높았다.

결론 : 이번 연구결과를 기초로 삼아 유전자 치료의 연구를 발전시키고 특히 전달된 유전자의 안정적인 발현과 바이러스 벡터들의 독성 등에 대하여 향후 연구의 초점을 두어야 할 것으로 생각된다.

References

- 1) Verma IM, Somia N. Gene therapy promises, problems and prospects. Nature 1997;389:239-42.
- 2) Cavazzana-Calvo M, Thrasher A, Mavilio F. The future of gene therapy: balancing the risks and benefits of clinical trials. Nature 2004;427:779-81.
- 3) Zhong Q, Kolls JK, Schwarzenberger P. Retrovirus molecular

- conjugates. A novel, high transduction efficiency, potentially safety-improved, gene transfer systems. *J Biol Chem* 2001; 276:24601-7.
- 4) Chen M, Li W, Fan J, Kasahara N, Woodley D. An efficient gene transduction system for studying gene function in primary human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Clin Exp Dermatol* 2003;28:193-9.
 - 5) Davis HE, Morgan JR, Yarmush ML. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem* 2002;97:159-72.
 - 6) Morgan JR, LeDoux JM, Snow RG, Tompkins RG, Yarmush ML. Retrovirus infection: effect of time and target cell number. *J Virol* 1995;69:6994-7000.
 - 7) Palsson B, Andreadis S. The physico-chemical factors that govern retrovirus-mediated gene transfer. *Exp. Hematol* 1997;25:94-102.
 - 8) Paya M, Segovia JC, Santiago B, Galindo M, del Rio P, Pablos JL, et al. Optimising stable retroviral transduction of primary human synovial fibroblasts. *J Virol Methods* 2006; 137:95-102.
 - 9) Seitz B, Baktanian E, Gordon EM, Anderson WF, LaBree L, McDonnell PJ. Retroviral vector-mediated gene transfer into keratocytes: In vitro effects of polybrene and protamine sulfate. *Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998;236:602-12.
 - 10) Orlic D, Girard LJ, Anderson SM, Do BK, Seidel NE, Jordan CT, et al. Transduction efficiency of cell lines and hematopoietic stem cells correlates with retrovirus receptor mRNA levels. *Stem cells* 1997;15 Suppl 1:23-8.
 - 11) Slingsby JH, Baban D, Sutton J, Esapa M, Price T, Kingman SM, et al. Analysis of 4070A envelope levels in retroviral preparations and effect on target cell transduction efficiency. *Hum Gene Ther* 2000;11:1439-51.
 - 12) Neufeld G, Gospodarowicz D. Protamine sulfate inhibits mitogenic activities of the extracellular matrix and fibroblast growth factor, but potentiates that of epidermal growth factor. *J Cell Physiol* 1987;132:287-94.
 - 13) Mok HP, Lever A. A method to estimate the efficiency of gene expression from an integrated retroviral vector. *Retrovirology* 2006;3:51.
 - 14) Nash KL, Lever AML. Green fluorescent protein: green cells do not always indicate gene expression. *Gene Ther* 2004;11: 882-3.