Nucl Med Mol Imaging
Vol. 41, No. 3, Jun 2007

ORIGINAL ARTICLE

다약제내성 암세포에서 shMDR과 Sodium/Iodide Symporter 유전자의 이입에 의한 Doxorubicin 감수성과 방사성옥소 섭취의 증가

경북대학교 의과대학 핵의학교실[1], 내분비내과학교실[2]
안손주[1] · 이용진[1] · 이유라[1] · 최창익[1] · 이상우[1] · 유정수[1] · 안병철[1] · 이인규[2] · 이재태[1]

Increases in Doxorubicin Sensitivity and Radioiodide Uptake by Transfecting shMDR and Sodium/Iodide Symporter Gene in Cancer Cells Expressing Multidrug Resistance

Sohn Joo Ahn, M.S.[1], Yong Jin Lee, Ph.D.1, You La Lee, M.S.[1], Chang Ik Choi, B.S.[1], Sang-Woo Lee, M.D.[1], Jeongsoo Yoo, Ph.D.[2], Byeong-Cheol Ahn, M.D., Ph.D.1, InKyu Lee, M.D., Ph.D.[3], and Jaetae Lee, M.D., Ph.D.[1]

Department of Nuclear Medicine[1], Internal Medicine[2], School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

Purpose: Multidrug resistance (MDR) of the cancer cells related to mdr1 gene expression can be effectively treated by selective short hairpin RNA for mdr1 gene (shMDR). Sodium/iodide symporter (NIS) gene is well known to have both reporter and therapeutic gene characteristics. We have co-transfected both shMDR and NIS gene into colon cancer cells (HCT15 cell) expressing MDR and Tc-99m sestamibi and I-125 uptake were measured. In addition, cytotoxic effects of doxorubicin and I-131 therapy were also assessed after transfection. **Material and Methods:** At first, shMDR was transfected with liposome reagent into human embryonic kidney cells (HEK293) and HCT cells. shMDR transfection was confirmed by RT-PCR and western blot analysis. Adenovirus expressing NIS (Ad-NIS) gene and shMDR (Ad-shMDR) were co-transfected with Ad-NIS into HCT15 cells. Forty-eight hours after infection, inhibition of P-gycoprotein (Pgp) function by shMDR was analyzed by a change of Tc-99m sestamibi uptake and doxorubicin cytotoxicity, and functional activity of induced NIS gene expression was assessed with I-125 uptake assay. **Results:** In HEK293 cells transfected with shMDR, mdr1 mRNA and Pgp protein expressions were down regulated. HCT15 cells infected with 20 MOI of Ad-NIS was higher NIS protein expression than control cells. After transfection of 300 MOI of Ad-shMDR either with or without 10 MOI of Ad-NIS, uptake of Tc-99m sestamibi increased up to 1.5-fold than control cells. HCT15 cells infected with 10 MOI of Ad-NIS showed approximately 25-fold higher I-125 uptake than control cells. Cotransfection of Ad-shMDR and Ad-NIS resulted in enhanced cytotoxic by doxorubicin in HCT15 cells. I-131 treatment on HCT15 cells infected with 20 MOI of Ad-NIS revealed increased cytotoxic effect. **Conclusion:** Suppression of mdr1 gene expression, retention of Tc-99m sestamibi, enhanced doxorubicin cytotoxicity and increases in I-125 uptake were achieved in MDR expressing cancer cell by co-transfection of shMDR and NIS gene. Dual therapy with doxorubicin and radioiodine after cotransfection shMDR and NIS gene can be used to overcome MDR. (Nucl Med Mol Imaging 2007;41(3):209-217)

Key Words: short hairpin RNA (shRNA), Multidrug resistance, Sodium/Iodide Symporter, Tc-99m sestamibi, Doxorubicin

서 론

P-glycoprotein (Pgp)은 mdr1 유전자에 부호화된 수송체로 광범위한 영역에서 발현되는 약 170 kDa의 단백질이다. Pgp는 항암 약물치료에서 세포내로 유입된 약물을 세포 밖으로 배출시키는 세포막수송체로 작용하며,[1-3] 화학요법제

• **Received**: 2007. 3. 8. • **Accepted**: 2007. 5. 10.
• Address for reprints: Jaetae Lee, M.D., Ph.D., Department of Nuclear Medicine, Kyungpook National University Hospital, Samduk 2-Ga 50, Daegu 700-422, Korea
Tel: 82-53-420-5586, Fax: 82-53-422-0864
E-mail: jaetae@knu.ac.kr
※본 연구는 과학재단 원자력 중·장기 계획 사업(M20502000002-06L0200 00210)과 2007년 두뇌한국21사업의 지원으로 수행되었음.

의 장기간 투여 시 mdr1 유전자의 과발현은 항암제 투여 효과를 감소시키는 것으로 알려져 있다.[4,5]

Pgp는 3개의 세포막, 세포질 및 핵산결합 도메인으로 구성되어 있는 단일이합체로서 사람 ATP binding cassette B형 수송체(ABCB1)에 속하며 다양한 특이적 기질을 세포 밖으로 배출하는 역할을 한다.[3,6] 이러한 기질은 일반적으로 지용성 양이온 화합물로써 에너지 의존성이 높으며 약물 배출 펌프 작용에 의해 세포 밖으로 배출되며, 기질의 종류 중 항암치료제는 taxanes (paclitaxel, docetaxel), anthracycline계 항생물질, epipodophyllotoxins (etoposide, teniposide) 등이 있다. Pgp modulator는 칼슘통로 차단제인 verapamil, 면역억제제 cyclosporin A로 알려져 있고 Pgp에 대한 경쟁적 억제자로 작용하는 물질로서 약제의 세포내 축적을 증가시킨다.[6] 암 환자의 장기적인 항암치료제 투여는 종양의 Pgp 발현이 증가되고 화학요법의 치료효과를 감소시키므로, 다약제내성의 극복은 항암치료의 성공과 직접적으로 연관되어 있다.

Fire 등[7]이 Green Fluorescence protein (GFP)를 표적으로 한 double stranded RNA (dsRNA)가 mRNA의 발현을 감소시킴을 증명한 바 있고, small interfering RNA (siRNA)에 의한 유전자 치료는 표적유전자의 발현 억제를 유도함으로써 유전자의 기능을 밝히는데 널리 이용되고 있다.[8] 이와 같이 인간의 mdr1 유전자를 표적으로 한 siRNA의 처리로 mdr1의 mRNA와 Pgp의 발현을 억제할 수 있고, 그 결과로 doxorubicin등의 항암제의 세포 저류증가에 기인한 암세포의 항암제 감수성이 증가함을 증명한 연구결과가 보고된 바 있다.[4,5,9]

갑상선 내에는 혈중 농도 보다 20-40배 더 높은 옥소가 존재하며,[10] 갑상선 내로 옥소를 이동시키는 단백질인 sodium iodide symporter (NIS)는 갑상선세포의 기저측막(basolateral membrane)의 끝에 존재하는 70-90 kDa의 수송체로 2개의 Na^+와 1개의 I^- 를 동시에 세포내로 운반하며 다른 조직보다 갑상선내에서 월등히 많이 발현된다.[10-12] NIS는 방사성옥소 뿐만 아니라, Tc-99m[13]도 유사한 기전으로 이동시키게 되므로 유전자 발현을 평가하는 리포터유전자로 이용되고 있고,[14,15] 한편으로는 치료용 방사성핵종인 I-131이나 Re-188, Re-186을 이용한 방사선치료를 시행할 수 있게 되므로 NIS가 발현되지 않거나 발현이 낮은 다양한 세포에서 NIS 유전자 발현을 유도하고 치료하는 연구들이 진행되고 있다.[16-18]

본 연구는 항암 약물치료 효과를 감소시키는 mdr1 유전자를 short hairpin RNA (shRNA)를 이용하여 발현을 억제시키고, 그 효과를 Pgp 기질물질로 이용되는 Tc-99m sestamibi 섭취 검사로서 확인하고자 하였으며, 또한 다약제내성 극복효과를 세포내 doxorubicin 섭취 증가와 이에 따르는 세포독성의 증가로 확인하고자 하였다. 또한 mdr1 유전자가 발현되는 세포주에서 NIS유전자를 동시에 발현시켰을 때, 치료용 방사성핵종인 I-131의 세포내 유입을 증가시키는지를 확인함으로서 shRNA를 이용한 약물치료와 함께 I-131 방사성치료를 병행하여 치료 효과를 증가시킬 수 있을 가능성에 대하여 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포배양

인체 대장암 세포인 HCT15 세포주는 20% 혈청, 0.7% 항생제 (GibcoBRL Co., USA)가 포함된 RPMI 1640 (GibcoBRL Co., USA) 배지에 배양하였고, 인체 태아 신장(Human Embryonic Kidney cell; HEK293, ATCC No.: CRL-1573) 세포주는 10% 혈청이 들어 있는 MEM (GibcoBRL Co., USA) 배지에 5% CO_2 농도로 37℃에서 배양하여 실험에 사용하였다.

2. shMDR의 제작과 cloning

사람 mdr1 유전자 (NCBI, Gene Bank: NM_000927)의 mRNA를 표적으로 한 Wu 등[9]과 동일한 염기서열의 short hairpin RNA (shRNA)는 [shMDR: 5-GGAAAAGAAA CCAACTGTCdTdT (sense), dTdTCCTTTTCTTTGGT TGACAG-5 (antisense)] mdr1 DNA의 502-520 bp 위치에 존재 하는 19 mer의 oligonucleotide이다. pRNAT H1-1 vector (GenScript Co., USA)의 *Xho* I, *Hind* III 위치를 이용하여 H1 promoter에 의해 shMDR이 발현되는 adenovirus 제작을 위한 기본구조를 만들었다.

3. Adenovirus 제작

pRNAT H1-1 vector의 *Xho* I, *Hind* III 위치에 shMDR (Ad- shMDR)을 이입 하였고 사람 NIS 유전자(Ad-NIS)는 cytomegalovirus promoter를 사용하여 발현을 유도 하였다 (삼성의료원 이경한 교수 제공).[15] 복제능력이 없는 human recombinant adenovirus serotype 5 구조를 이용한 pAdEasy-1 vector와 재조합을 한 뒤 HEK293 세포에 이입 후 생산된 adenovirus를 2.2 M과 4 M CsCl를 이용하여 초원심분리기로 정제하였다. Adeno-X™Rapid titer Kit (Clontech Lab., USA)을 사용하여 virus titer를 측정하고 multiplicity of infection (MOI)로 환산하여 각 실험에 사용하였다.

4. 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

shMDR이 이입된 pRNAT H1-1 vector를 HEK293 1×10^6 세포에 lipofectamin plus 시약 (Invitrogen Co., USA)으로 이입시킨 48시간 뒤 TRIzol (Invitrogen Co., USA)을 이용해 RNA를 분리하였다. RT-PCR은 Superscript First-Strand Synthesis System (Fermentas Co., USA)을 이용했는데 RNA 5 μg을 최종 20 μl (200 ng 의 random hexamers, 1× reverse transcription buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP mixture, 10 mM DTT, RNaseOUT recombinant ribonuclease inhibitor, 50 unit Superscript reverse transcriptase와 diethylpyrocarbonate-treated water)가 되게 넣었다. 42°C에서 60분 동안 역전사반응을 실시해서 complementary DNA (cDNA)를 얻었다. cDNA 2 μl을 주형으로 하는 [1.5 mM $MgCl_2$, 2.5 unit의 Taq 중합효소, 20 pM mdr1 primer (5'-ATATCAGCAGCCCACATCAT-3'; 5'-GAAGCACT GGGATGTCCGGT-3')] 혼합액를 만들었고 GAPDH primer (5'-GCCAAAAGGGTCATCATCTC-3;' 5'-GTAG AGGCAGGGATGATGTTC-3')는 대조군으로 사용하였다. 증폭조건은 94°C 에서 3분 동안 변성을 유도하고 94°C 1분, 58°C 1분, 72°C 1분 30초를 33회 시행하였다. PCR 생성물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 Ethidium Bromide (EtBr) 염색으로 PCR 생성물을 확인하였다.[9]

5. Western Blot Analysis

Pgp의 발현을 확인하기 위해 HEK293 1×10^6 세포에 shMDR 유전자를 lipofectamin plus 시약 (Invitrogen Co., USA)으로 이입하였고 NIS 발현은 HCT15 세포에 20 MOI Ad-NIS로 감염시켰다. 각각 이입 후 48시간에 세포를 PBS로 세척하고 단백질 추출 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 100 μM phenylmethylsulphonyl fluoride, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml luepeptin, 1 mM DTT] 완충액으로 단백질을 추출하여 100 μg을 8% SDS-PAGE에 싣고 nitrocellulose 막에 옮겼다. TBST [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20] 완충액에 5% skim milk를 넣고 실온에서 1시간동안 blocking 한 후 monoclonal anti-Pgp antibody C219 (170 kD, Calbiochem Co., USA), monoclonal anti-NIS FP5A (90 kD, Lab Vision Co., USA), monoclonal anti-β actin antibody (Sigma-Aldrich, USA), monoclonal anti-α Tubulin antibody (Sigma-Aldrich, USA)를 처리해서 immunoblotting을 하였다. Peroxidase가 붙어 있는 anti-mouse를 2차 antibody로 사용하였고 ECL시약(ECL, Amersham Pharmacia Biotech, USA)을 nitrocellulose 막에 도포한 뒤 X-ray 필름에 감광시켰다.

6. Tc-99m sestamibi 섭취율 측정

HCT15 세포를 6 well plate에 1×10^6 세포를 분주하여 Ad-shMDR 300 MOI, Ad-shMDR 300 MOI와 Ad-NIS 10 MOI를 감염시키고 48시간동안 배양한 후, trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 회수하였다. 370 kBq Tc-99m sestamibi를 PBS 100 μl에 희석하여 30분 동안 37°C에서 배양하고 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 2% SDS를 넣어 세포를 용해 시켜 감마선계측기(Packard, Il, USA)로 측정하였고 Tc-99m sestamibi 섭취율은 총단백질로 보정한 cpm/mg protein으로 환산하여 평가하였다.[19]

7. I-125 섭취율 측정

HCT15 세포를 24 well plate에 2×10^5 세포를 분주하고 Ad-NIS 10 MOI, Ad-shMDR 100 MOI와 Ad-NIS 10 MOI, Ad-shMDR 100 MOI를 감염시켜 48시간동안 배양한 후 bHBSS (GibcoBRL Co., USA; $NaHCO_3$ 0.35 g, HEPES 2.383 g, BSA 5g)로 2회 세척하였다. 감염된 세포에 3.7 kBq [I-125] NaI를 bHBSS 500 μl로 희석 처리한 뒤 37°C에 30분간 배양 하고 차가운 bHBSS로 3회 세척하였다. 2% SDS를 넣어 세포를 용해 시켜 감마선계측기 (Packard, USA)로 측정하였다. NIS유전자의 기능을 측정하고자 방사성옥소 섭취율 측정시 50 μM $KClO_4$를 첨가하여 ClO_4^-에 의해 옥소의 섭취가 저해되는지를 평가하였다. I-125 섭취율은 cpm/mg protein으로 환산하여 평가하였다.

8. Doxorubicin 세포 독성 측정

HCT15 세포를 96 well plate에 2×10^4 세포를 분주 한 후, adenovirus를 감염시킨 24시간 뒤 doxorubicin (Sigma Aldrich, USA)을 0.01, 0.1, 1, 60, 250, 500, 1000 μM/L 처리하였다. 48시간동안 배양한 후 Cell Count Kit-8 (CCK-8; Dojindo, Japan) 시약을 10 ul 씩 분주해서 4시간 동안 37°C에서 배양한 후 흡광도를 측정하였다.[20]

9. I-131 세포 독성 측정; 세포집락 형성능

HCT15 세포를 T75 Flask에 5×10^6개 분주하고 adenovirus로 감염시킨 48시간 후 bHBSS (GibcoBRL Co., USA; $NaHCO_3$ 0.35 g, HEPES 2.383 g, BSA 5 g)로 세척하였다. bHBSS로 4.6, 9.3, 18.5 MBq I-131을 희석하고 각각의 플라스크에 희석액을 넣어 7시간동안 배양하였다. 차가운 bHBSS로 3회 세척한 후에 trypsine-EDTA를 처리해서 세

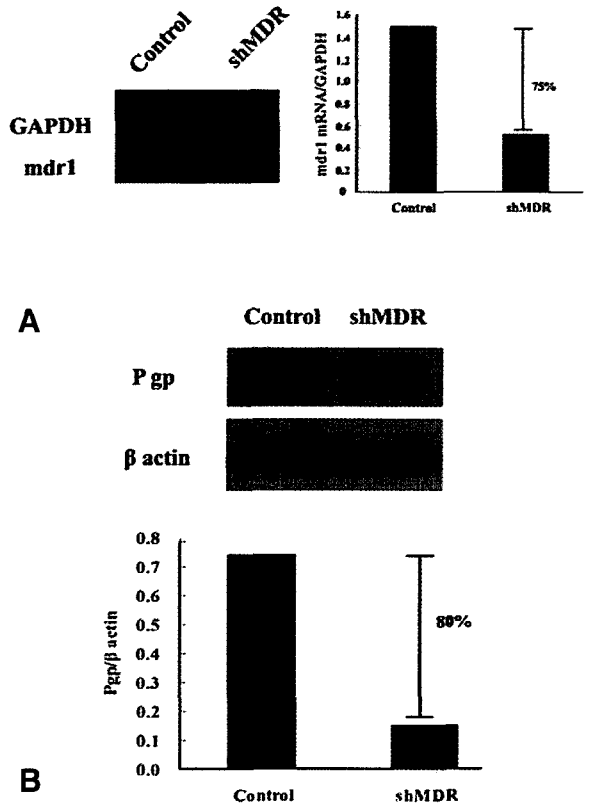

Fig. 1. Effect of shRNA on mdr1 mRNA and Pgp expression in HEK 293. A) Forty-eight hours after transfection of lipofectamin plus reagent and shMDR in HEK293 cells, the synthesized mdr1 cDNA was amplified by PCR using the mdr1 and GAPDH primer (internal control). PCR fragments were visualized by ethidium bromide staining. B) Transfected HEK293 cell by lipofectamin and shMDR was prepared for cell lysates after 48 h. Equal amounts of 100 ug proteins from cell lysates were separated by 8% SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membrane. This membrane was detected with monoclonal anti-Pgp antibody C219 and monoclonal anti-α Tubulin antibody. Detection of Pgp was performed by exposed X-film. Results are the representative of two similar experiments.

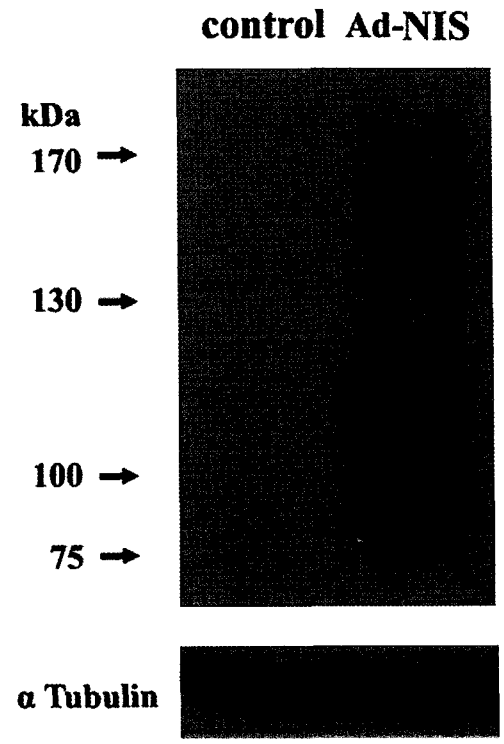

Fig. 2. Induction of NIS expression in infected HCT15 cells by Ad-NIS. HCT15 cells transfected with 20 MOI of Ad-NIS were prepared for cell lysates after 48 h. Loaded NIS protein was detected with monoclonal anti-NIS antibody FP5A. NIS was performed by exposed X-film and represented of two similar experiments.

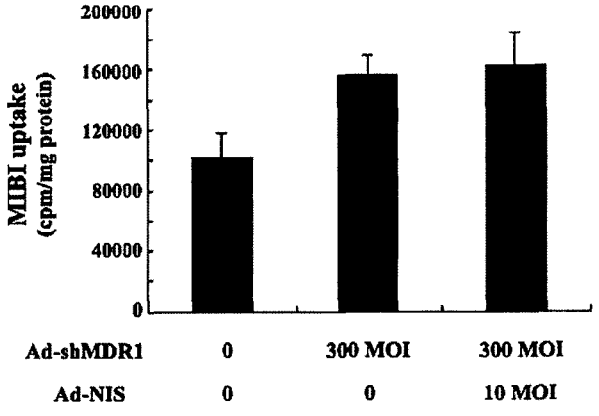

Fig. 3. Tc-99m sestamibi uptake in infected HCT15 cells containing Ad-shMDR with or without Ad-NIS. HCT15 cells were infected at the 300 MOI of Ad-shMDR with or without Ad-NIS for 48 h and incubated with 0.1 ml of PBS and 370 kBq of Tc-99m sestamibi for 30 min. The Result are expressed in mean numbers of cpm per protein concentration and SD of three measurements and are the representative of at least three similar experiments.

포를 회수하고 6 well plate에 well당 1×10^3개의 세포를 넣고 37℃에서 7일 동안 배양하였다. 세포 집락이 형성되면 PBS로 세척하고 crystal violet 시약 (0.5 g crystal violet 250 ml, 40% formaldehyde 25 ml, ethanol 50 ml, water 175 ml)을 500 μl 씩 분주하여 염색한 후 세포수가 30개 이상인 집락을 측정하였다. 평균과 표준 편차를 구하고 세포의 생존율을 백분율로 환산하였다.[17]

결 과

1. shMDR의 mdr1 유전자발현 억제 효과

HEK293 세포에 shMDR을 lipofectamin으로 이입한 48시간 뒤에 회수한 세포를 RT-PCR 한 결과, 대조군에 비하여 mdr1발현이 mRNA 영역에서 75% 감소되어짐을 확인하였다(Fig. 1A). 또한 western blot 검사에서도 Pgp 발현이 대

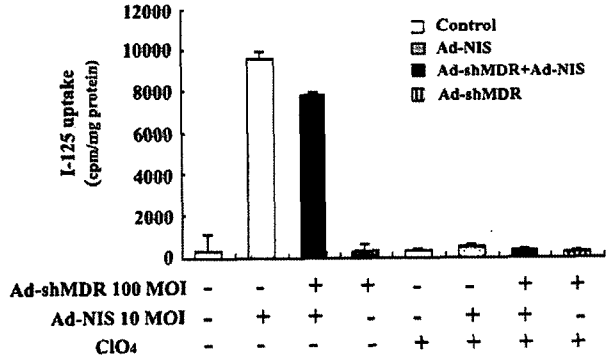

Fig. 4. I-125 uptake in infected HCT15 cells with 10 MOI of Ad-NIS either with or without 100 MOI of Ad-shMDR. In infected HCT15 cells, iodide uptake was then initiated by adding 0.5 ml of bHBSS containing 3.7 kBq of I-125 per well and blocked in the presence of KClO4, a known inhibitor of NIS function. Result are expressed as the means of cpm per protein concentration and SD of three measurements, and were represents two separate experiments.

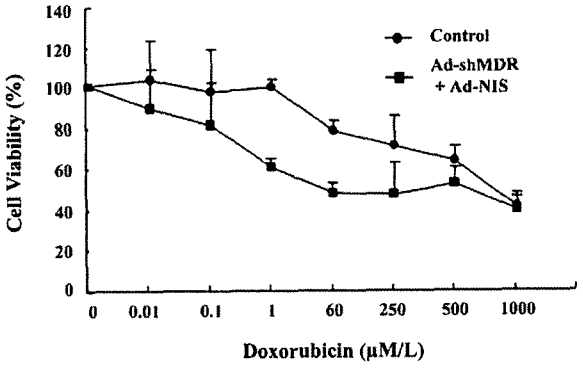

Fig. 5. Effect of shRNA on drug sensitivity to doxorubicin in HCT15 cells. Infected HCT15 cells with 300 MOI Ad-shMDR and 10 MOI Ad-NIS were incubated at 37℃ for 48 h in the presence of a series of concentrations doxorubicin. Data are the means and SD of three measurements and are represents two separate experiments.

조군보다 80% 감소됨을 확인하였다(Fig. 1B). Ad-NIS를 감염시킨 대장암 세포에서는 NIS 유전자의 발현이 대조군에 비하여 증가하였음을 확인하였다(Fig. 2).

2. shMDR 이입이 다약제 내성세포의 Tc-99m sestamibi 섭취에 미치는 효과

HCT15 세포에 Ad-shMDR 300 MOI, Ad-shMDR 300 MOI와 Ad-NIS 10 MOI를 감염시키고 48시간 후에 370 kBq/0.1 mL Tc-99m sestamibi를 30분 동안 37℃에서 배양한 결과를 비교하면, Tc-99m sestamibi 섭취정도는 Ad-shMDR 300 MOI, Ad-shMDR 300 MOI와 Ad-NIS 10 MOI를 감염시켰을 때 대조군보다 섭취율이 약 1.5배 증가되었다(Fig. 3).

3. NIS 유전자 이입에 의한 방사성옥소 섭취율 변화

HCT15 세포에 Ad-NIS 10 MOI, Ad-NIS 10 MOI와 Ad-shMDR 100 MOI, Ad-shMDR 100 MOI를 감염시키고 48시간 후에 3.7 kBq/500 μl을 30분 처리하여 I-125 섭취율을 측정한 결과, Ad-NIS 10 MOI 처리했을 때 I-125 섭취율이 대조군보다 약 25배 높았다. Ad-NIS 10 MOI와 Ad-shMDR 100 MOI 처리한 세포에서는 Ad-NIS 10 MOI 처리했을 때와 유사한 증가치를 보였다. NIS 유전자가 이입된 HCT15 세포를 ClO_4^-를 처리하였을 경우에는 Ad-NIS 10 MOI, Ad-NIS 10 MOI와 Ad-shMDR 100 MOI를 처리한 경우의 방사성옥소 섭취율은 NIS를 이입하지 않은 대조군과 유사한 결과를 나타내 방사성옥소의 섭취가 저해되어 NIS 유전자 특이적 반응임을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

4. Ad-shMDR로 감염시킨 세포에서 doxorubicin의 세포독성

HCT15 세포에 Ad-shMDR로 감염시킨 24시간 뒤 doxorubicin을 0.01, 0.1, 1, 60, 250, 500, 1000 μM/L농도로 처리한 결과, 대조군보다 Ad-shMDR 300 MOI와 Ad-NIS 10 MOI을 동시에 감염시킨 경우가 doxorubicin에 대한 감수성이 증가함을 확인 할 수 있었다. 특히 1, 60 μM/L의 농도로 처리 한 경우에는 암세포의 항암제 감수성이 대조군보다 30% 이상 증가하였다(Fig. 5).

5. Ad-NIS 이입 세포에서 I-131 처치에 대한 세포 생존율

Ad-NIS로 감염시킨 뒤 48시간이 경과한 후 I-131 4.6, 9.3, 18.5 MBq를 7시간 처리 했을 때 세포 생존율이 I-131의 양이 증가할수록 반비례적으로 감소함을 확인 할 수 있었다. Ad-NIS 20 MOI로 감염 시킨 경우 18.5 MBq를 처리했을 때 54%를 보이는 반면 대조군은 79%의 생존율을 나타내 가장 큰 차이가 나타났다(Fig. 6).

고 찰

siRNA는 세포내 유전자의 전사 후 발현억제 유도를 위한 유전자 수준의 치료방법이며, 최근 다약제 내성(MDR)을 극복하기 위하여 암세포를 이용한 세포실험과 종양이식 동물의 체내시험에서 mdr1 유전자를 표적으로 한 siRNA를 처리함으로서 mdr1 유전자의 발현을 성공적으로 억제한 사례들이 보고되고 있다.[4,6,9] Stierle 등[4]은 다약제 내성을 나타내는

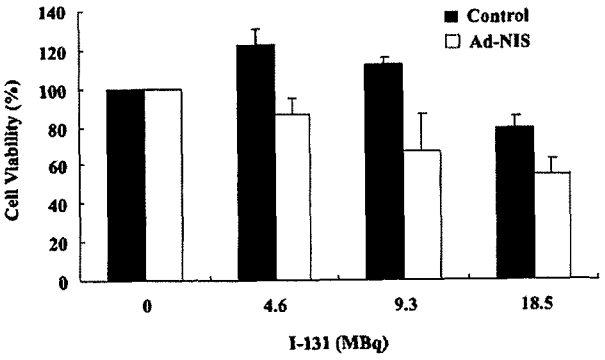

Fig. 6. Selective decreases in cellular viability by I-131 in infected HCT15 cells with 20 MOI of Ad-NIS. Infected HCT15 cells by 20 MOI of Ad-NIS for 48 h exposed to 0, 4.6, 9.3, 18.5 MBq of I-131 in bHBSS or bHBSS alone for 7 h. The cellular viability assessed with clonogenic assay was compared to treatment of I-131 with bHBSS or bHBSS alone. The result was acquired from three measurements of two separate experiments, and data are means and SD.

유방암 MCF7세포에 대한 siRNA 실험에서 비특이적 효과를 방지하기 위한 최소 20 nM 농도로 처리하였을 때, Pgp 발현이 18% 정도까지 감소되었다고 보고하였다. Matsui 등[6]은 생쥐의 간에 mdr1a/1b 유전자에 대한 hydrodynamics based delivery siRNA를 정맥에 주사한 결과 48시간 후 Pgp 단백질 발현이 감소되었음을 보고 하였고, Wu 등[9]은 mdr1의 siRNA주입이 mdr1의 내인성 유전자뿐만 아니라 mdr1 유전자를 이입시킨 유방암세포 모두에서 mdr1의 발현을 효과적으로 감소시켰음을 보고하였다. 이러한 선도적인 연구들은 siRNA의 투여가 다약재 내성을 완전 극복하거나 기존의 세포막에 영향을 미침으로서 세포막에 발현된 Pgp에 길항하여 세포질내의 약물 농도를 증가시키는 방법에 부가한다면 다약재 내성을 극복할 수 있는 길이 열릴 것이란 가정을 가능하게 한다. 본 연구에서도 이들이 발표한 siRNA 염기서열과 동일한 shRNA을 제작하여 내인성 mdr1 유전자가 발현된 HEK293 세포에 이입한 48시간 후 mdr1의 mRNA와 Pgp 발현이 감소됨을 RT-PCR과 western blot으로 증명할 수 있었다.

유전자 전달방법은 크게 바이러스형 매개체(viral vector)와 비 바이러스형 매개체(non-viral vector) 2가지 방법으로 나눌 수 있다. 비 바이러스형 매개체 방법은 liposome, naked DNA 와 electroporation방법이 있는데 세포에 이입 시 면역부작용 유발이나 이차적 발암유발 등의 부작용을 피할 수 있다. 그러나 동물모델에서는 유전자의 이입 효율이 낮다.[21] 바이러스형 매개체로는 adeno, retro 그리고 lenti virus 등이 있고 이러한 바이러스형 매개체는 세포뿐만 아니라 동물모델에서도 유전자 전달이 가능하다.[22] 이 연구에서는 HEK293 세포에 양전위를 띄는 liposome으로 shMDR DNA를 세포에 이입하여 shMDR의 역할이 원활하게 시행됨을 RT-PCR과 western blot으로 확인하였다. 다음 실험에서는 adenovirus (Ad-shMDR, Ad-NIS)를 이용하여 세포수준에서 shMDR과 NIS의 기능을 확인함으로써 동물 모델에 적용이 용이하게 하였다.

Pgp는 mdr1에 의해 부호화 되어지는 세포막의 수송 단백질[2]로서 장기간 동안 약물치료를 하는 암 환자들의 세포에서 과발현 되고 항암제의 내성과 암 진단의 방해요인으로 밝혀져 있다. mdr1의 과발현은 다양한 Pgp 기질물질인 항암제에 대한 세포내 저항을 증가시킬 뿐만 아니라,[1,6,23] 지용성 방사성의약품으로서 Pgp 기질물질들과 화학적 성상이 유사하여 암조직의 영상 진단에 이용되는 방사성의약품인 Tc-99m sestamibi,[24-26] Tc-99m tetrofosmin[27]와 Tc-99m glucarate[28]의 세포내 저류를 감소시킴으로서 감마카메라 영상에서 종양의 섭취가 낮아지게 하는 요인으로도 알려져 있다. 즉, Tc-99m sestamibi 는 지용성 양이온 방사성의약품으로 심관류영상과 암진단용 방사성의약품으로 사용되고 있으나, 한편으로는 Pgp에 의해 운반되어 지는 기질로써 높은 지방친화도, 저분자물질로 쉽게 세포질로 들어가 사립체 내에 축적되지만 Pgp에 의해 빠르게 세포 밖으로 배출된다.[29] siRNA를 이용하여 mdr1 유전자 발현을 억제시킬 경우에는 항암제의 세포내 축적이 증가되어 daunorubicin, paclitaxel 약제 감수성을 증가시킬 수 있었고 Pgp의 기질물질인 doxorubicin과 vinblastin를 처리하여 mdr1 과발현이 유도된 세포에서 약제 감수성을 증가시켰지만 Pgp의 기질이 아닌 hydroxyurea는 감수성이 증가되지 않아 siRNA가 mdr1 유전자에 특이하게 작용함을 증명한 연구도 있었다.[4,9] 저자들의 본 연구에서는 adenoviral vector system (Ad-shMDR)을 이용하여 인체 대장암세포에 감염을 유도하였고, Fig 5에서 표시하였듯이 Ad-shMDR을 감염시킨 세포에 doxorubicin을 처리한 경우, 세포생존율이 대조군에 비하여 유의하게 감소되었음을 확인할 수 있었다. 또한 mdr1유전자에 대한 shRNA (Ad-shMDR)를 처리한 후, Tc-99m sestamibi 섭취량이 약 1.5배 증가됨을 확인할 수 있었다. 이들 결과는 저자들이 제작한 mdr1에 대한 shMDR이 유전자 수준에 작용하여 Pgp의 발현을 억제시킴으로서 항암제인 doxorubicin의 암세포에 대한 독성을 증가시키고 Tc-99m sestamibi의 세포내 섭취 증가를 나타낸다는 것을 증명하였고, mdr1이 과발현된 암조직에 Ad-shMDR를 감염시킴으로써 내성을 보이던 암조직에 사용하지 못하던 약제들을 사용함으로서 항암화학치료요법의 효과를 증가시킬 것으로 추측할 수 있다.

NIS 수송체는 방사성옥소의 세포내 섭취에 관여되며,[11] 갑상선 분화암 조직의 NIS 유전자나 단백의 발현 여부와 발

현 정도는 수술 후의 I-131 동위원소 치료의 성공에도 영향을 미친다. 특히 NIS의 발현이 없거나 미약한 암세포에서는 NIS 유전자를 이입함으로서 치료용 방사성핵종인 I-131이나 Re-188, Re-186을 이용한 방사선치료를 가능하게 한다.[13,16-18] Dwyer 등[30]은 난소암 세포에 NIS 유전자 발현을 유도한 adenovirus를 감염시켰을 때 대조군보다 CMV promoter를 사용한 경우 12배, 난소암에서 과발현되는 mucin1 (MUC1)의 promoter를 사용한 경우는 5.5배 옥소 섭취가 증가됨을 보고하였다. Boland 등[17]은 유방암 MCF7세포, 전립선암 DU145 세포, 폐선암 A549 세포, 유방암 T-47D 세포, 전립선암 PC-3 세포, 대장암 HT-29 세포에서 Ad-NIS를 감염시켰을 때 옥소 섭취가 35-225배 증가 하였고 감염시킨 세포를 I-131로 처리했을 경우 세포 집락 형성능이 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며, I-123을 마우스 복강에 주사하였을 경우 이식된 종양조직의 방사능 집적을 영상으로 확인한 결과를 발표한 바 있다. Miyagawa 등[14]은 사람 NIS, wild-type HSV1-tk, mutant HSV1-sr39tk 유전자를 adenovirus를 이용하여 쥐의 심장에 주사하고 이들에 대한 추적물질인 I-124, I-124 FIAU, F-18 FHBG를 각각의 쥐에 주사한 후 positron emission tomography (PET)로 영상을 얻어서 리포터 유전자로서의 성능을 비교한 결과, 사람 NIS 유전자가 발현되는 쥐에서 가장 빠르고 높은 강도의 영상 신호를 확인할 수 있었다고 보고하였다. 저자들의 연구에서도 감마카메라 영상이나 PET 영상뿐만 아니라 치료용 방사성핵종을 이용한 방사선 치료효과까지 기대할 수 있는 NIS 유전자를 발현시키는 adenovirus를 이용하였다. Ad- NIS 20 MOI를 처리한 경우에서 NIS 유전자의 발현이 대조군에 비해 월등히 증가했음을 확인하였고 I-125 섭취량으로 평가한 NIS의 기능도, 대조군에 비해 25배 정도 증가되었다. 또한 I-131을 처리한 경우 Ad-NIS에 감염된 세포가 대조군에 비해 세포생존율이 25% 감소됨으로서 NIS을 이용한 방사성치료효과를 기대할 수 있었다.

NIS 유전자는 방사성옥소를 이용한 영상과 치료효과를 높일 수 있는 유전자로써 shMDR과 함께 NIS 유전자 발현을 유도하여 화학치료요법과 방사성치료를 병행함으로써 치료 효과를 극대화 할 수 있을 것으로 보고 Ad-shMDR과 Ad-NIS를 공동 이입하였다. 한 세포에 두개 이상의 유전자를 이입하는 방법은 두 가지의 유전자를 융합하는 internal ribosomal entry site (IRES)로 결합시키거나,[31,32] 양측성 promoter로 두 유전자를 분리하는 법,[33] 같은 vector에서 두 유전자를 다른 부위에 위치시키는 방법,[34] 융합시킬 때 한가지 기능이 잘 발현되지 못하는 경우에는 같은 역가의 바이러스를 공동 이입시키는 방법 등이 있다.[35] Adenovirus는 최근 유전자 치료를 위한 도구로 많이 사용되고 있으나 *in vivo* 실험에서 혈관내 주입 시 간, 비장, 심장, 폐, 신장 등에 축적이 되고 대식세포의 탐식에 의한 면역반응이나 세포독성을 유발하는 등의 문제점을 갖고 있다.[36] 그래서 동물의 체내의 손상을 최소로 하며 조직이나 암 특이적 유전자 이입을 시도하기 위해 바이러스 유전자의 변형을 통해 RGD/integrin[37] 같은 결합을 유도하지만 아직 실험적 단계에 그치고 있다.[38] 목표장기 또는 선택적 병소로 유전자의 이입술은 아직 극복해야할 문제이며, 특정부위의 목적유전자의 발현을 선택적으로 하고자 조직 특이 프로모터(tissue specific promoter)를 이용하여 선택적 발현을 유도하고 있다.[11]

본 연구에서는 shMDR과 NIS 유전자를 바이러스에 융합하여 이입한 예비실험에서는 한가지의 기능이 상대적으로 억제되어 두 가지의 기능을 나타내지 못하였다. 그러나 동시에 공동 이입한 경우에는 두 가지의 기능이 충분하게 나타났으므로 본 연구를 성공적으로 수행할 수 있었다.

저자들의 이번 연구에서는 mdr1 유전자에 대한 shRNA와 NIS유전자를 동시에 이입시킨 체세포와 암세포에서 mdr1유전자의 억제와 NIS단백의 발현을 증가시키고자 하는 두가지의 목적을 모두 달성할 수 있었다. 항암 화학요법치료에서 가장 문제가 되는 암세포에 shMDR을 이입하거나 주사한 경우, NIS 유전자를 핵의학 영상의 reporter 유전자로 이용할 수 있을 뿐만 아니라 shMDR로서 항암제의 약제감수성을 증가 시키고, NIS 단백질을 이용한 I-131 등에 의한 방사선 치료를 병용함으로서 암조직에 대한 이중 치료를 시행하여 항암치료 효과를 극대화 할 수 있을 것으로 추측한다. 본 연구에서는 체내실험에서 shMDR과 NIS 유전자의 효과를 증명했지만, 향후 종양이식 동물 모델에서 항암 약물치료와 방사성옥소를 이용한 방사선 치료를 병행하여 이들의 치료효과 증진에 대한 상승 작용을 규명한다면 이것이 임상 적용에 있어서의 가능성에 한 발짝 다가서는 의의를 가질 수 있다고 본다.

요 약

목적: mdr1유전자를 표적으로 한 short hairpin RNA (shMDR)는 다약재내성을 나타내는 암세포에서 효과적으로 mdr1 유전자의 발현을 억제 할 수 있고 sodium iodide symporter (NIS)는 유전자 치료와 리포터로의 기능을 동시에 나타낼 수 있다. 이 연구에서는 사람 대장암세포 (HCT15)에 shMDR과 NIS를 동시에 이입하고 Tc-99m sestamibi와 I-125 섭취를 측정하였고 doxorubicin과 I-131 치료효과도 관찰하였다. **대상 및 방법**: 사람 태아 신장 세포

주(Human Embryonic Kidney cells: HEK293)에 liposome 시약으로 shMDR을 이입하고 RT-PCR과 western blot으로 분석하였다. shMDR와 NIS 유전자가 발현하는 adenovirus를 만들고 HCT15 세포에 이입 후 48시간에 shMDR에 의한 Pgp의 기능 억제를 확인하기위해 Tc-99m sestamibi 섭취와 doxorubicin 세포독성을 측정하였다. 또한 NIS유전자의 기능을 확인 하기위해 I-125 섭취와 I-131 세포독성도 확인하였다. **결과**: shMDR이 이입 된 HEK293 세포에서 mdr1의 mRNA와 Pgp의 발현이 각각 75%, 80% 감소하였다. NIS 유전자가 발현하는 adenovirus를 HCT15 세포에 이입하고 NIS 유전자 발현을 확인 한 결과 대조군에 비해 월등히 높게 발현하였다. Ad-shMDR 300 MOI, Ad-shMDR 300 MOI와 Ad-NIS 10 MOI를 처리한 경우 Tc-99m sestamibi의 섭취가 대조군보다 1.5배 정도 증가하였다. HCT15 세포에 Ad-NIS 10 MOI를 감염시킨 경우 I-125 섭취가 대조군에 비해 25배 이상 증가였다. 또한 Ad-shMDR와 Ad-NIS를 동시 감염 시켰을 경우 doxorubicin의 세포 독성이 증가하여 나타났고 Ad-NIS 20 MOI를 감염시켰을 때 I-131에 의한 세포독성이 대조군보다 증가하였다. **결론**: 세포에 shMDR의 이입으로 mdr1 유전자의 발현이 억제되고 Tc-99m sestamibi의 섭취와 doxorubicin의 세포독성이 증가하였으며 NIS 유전자의 이입으로 I-125의 섭취와 I-131의 세포독성이 증가하였다. 다약제내성세포에 shMDR와 NIS 유전자의 동시 이입은 doxorubicin과 방사성 옥소의 이중치료 효과를 높일 수 있을 것으로 본다.

감사의 글

NIS adenovirus를 제공한 삼성의료원 이경한 교수의 배려에 감사드립니다.

References

1. Eytan GD. Mechanism of multidrug resistance in relation to passive membrane permeation. ***Biomed Pharmacother*** 2005;59:90-7.
2. Galina R, Jocelyne P, Sharom FJ. P-Glycoprotein is localized in intermediate-density membrane microdomains distinct from classical lipid rafts and caveolar domains. ***FEBS Journal*** 2005;272:4924-37.
3. Mahadevan D, List AF. Targeting the multidrug resistance-1 transporter inAML: molecular regulation and therapeutic strategies. ***Blood*** 2004;104:1940-51.
4. Stierle V, Laigle A, Jolle B. Modulation of MDR1 gene expression in multidrug resistant MCF7 cells by low concentrations of small interfering RNAs. ***Biochemical Pharmacology*** 2005;70:1424-30.
5. Matsui Y, Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y. Sequence-specific suppression of mdr1a/1b expression in mice via RNA interference. ***Pharmaceutical Research*** 2005;22:2091-98.
6. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. ***Advanced Drug Delivery Reviews*** 2003;55:3-29.
7. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Craig CM. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in Caenorhabditis elegans. ***Nature*** 1998;391:806-11.
8. Hannon GJ. RNA interference. ***Nature*** 2002;418:244-51.
9. Wu H, Hait W, Yang JM. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-Glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. ***Cancer Res*** 2003;63:1515-19.
10. Filetti S, Bidart JM, Arturi F, Caillou B, Russo D, Schlumberger M. Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism. ***Eur J Endocrinol*** 1999;141:443-57.
11. Chung JK. Sodium Iodide Symporter: Its role in nuclear medicine. ***J Nucl Med*** 2002;43:1188-200.
12. Levy O, Vieja AD, Carrasco N. The Na+/I - Symporter (NIS): recent advances. ***J Bioenerg Biomembr*** 1998;30:195-206.
13. Lee YJ, Chung JK, Shin JH, Kang JH, Jeong JM, Lee DS et al. In vitro and in vivo properties of a human anaplastic thyroid carcinoma cell line transfected with the sodium iodide symporter gene. ***Thyroid*** 2004;14;889-95.
14. Miyagawa M, Anton M, Wagner B, Haubner R, Souvatzoglou M, Gansbacher B, et al. Non-invasive imaging of cardiac transgene expression with PET: comparison of the human sodium/iodide symporter gene and HSV1-tk as the reporter gene. ***Eur J Nucl Med Mol Imaging*** 2005;32:1108-14.
15. Lee KH, Kim HK, Paik JY, Matsui T, Choe YS, Choi Y, et al. Accuracy of myocardial sodium/iodide symporter gene expression imaging with radioiodide: evaluation with a dual-gene adenovirus vector. ***J Nucl Med*** 2005;46:652-7.
16. Spitzweg C, Dietz AB, O'Connor MK, Bergert ER, Tindall DJ, Young CYF, et al. In vivo sodium iodide symporter gene therapy of prostate cancer. ***Gene Therapy*** 2001;8:1524-31.
17. Boland A, Ricard M, Opolon P, Bidart JM, Patrice Y, Filetti S, et al. Adenovirus-mediated transfer of the thyroid sodium/iodide symporter gene into tumors for a targeted radiotherapy. ***Cancer Res*** 2000;60:3484-92.
18. Chung JK, Kang JH. Translational research using the sodium/iodide symporter in imaging and therapy. ***Eur J Nucl Med Mol Imaging*** 2004;31:799-802.
19. Kinuya S, Yokoyama K, Fukuoka M, Mori H, Shib K, Watanabe N, et al. Anti-angiogenic therapy and chemotherapy affect 99mTc sestamibi and 99mTc-HL91 accumulation differently in tumour xenografts. ***Nucl Med Commun*** 2005;26:1067-73.
20. Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin BL. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. ***Oncogene*** 2003;22:2805-11.
21. Kamiya H, Tsuchiya H, Yamazaki J, Harashima H. Intracellular trafficking and transgene expression of viral and non-viral gene vectors. ***Adv Drug Deliv Rev*** 2001;52:153-64.
22. Young LS, Searle PF, Onion D, Mautner V. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. ***J Pathol*** 2006;208:299-318.
23. Takara K, Obata Y, Yoshikawa E, Kitada N, Sakaeda T, Ohnishi N, et al. Molecular changes to HeLa cells on continuous exposure to cisplatin or paclitaxel. ***Cancer Chemother Pharmacol*** 2006;22.
24. Burak Z, Moretti JL, Ersoy O, San U, Kantar M, Tamgac F, et al. 99mTc-MIBI imaging as a predictor of therapy response in osteosarcoma compared with multidrug resistance - associated protein and P-glycoprotein expression. ***J Nucl Med*** 2003;44: 1394-401.
25. Jekerle V, Wang JH, Scollard DA, Reilly RM, Wiese M, Micheline

PM. 99mTc-Sestamibi, A sensitive probe for in vivo imaging of P-glycoprotein inhibition by modulators and mdr1 antisense oligodeoxynucleotides. ***Mol Imaging Biol*** 2006;13:60-6.

26. Lee J, Ahn BC. Detection of multidrug resistance using molecular nuclear technique. ***Korean J Nucl Med*** 2004;38:180-9.
27. Yoo JA, Chung SY, Seo MR, Kwak DS, Ahn BC, Lee KB, Lee J. Comparison of the uptakes of ^{99m}Tc-sestamibi and ^{99m}Tc-tetrofosmin in cancer cell lines expressiong multidrug resistance. ***Korean J Nucl Med*** 2003;37:178-89.
28. Liu Z, Stevenson GD, Barrett HH, Kastis GA, Bettan M, Furenlid LR, et al. 99mTc glucarate high-resolution imaging of drug sensitive and drug resistant human breast cancer xenografts in SCID mice. ***Nucl Med Commun*** 2004;25:711-20.
29. Morettil JL, Hauetl N, Caglar M, Rebillard O, Burak Z. To use MIBI or not to use MIBI? That is the question when assessing tumour cells. ***Eur J Nucl Med Mol Imaging*** 2005;32:836-42.
30. Dwyer RM, Bergert ER, O'Connor MK, Gendler SJ, Morris JC. Sodium iodide symporter-mediated radioiodide imaging and therapy of ovarian tumor xenografts in mice. ***Gene Therapy*** 2006;13:60-6.
31. Yaghoubi SS, Wu L, Liang Q, Toyokuni T, Barrio JR, Gambhir SS, et al. Direct correlation between positron emission tomographic images of two reporter genes delivered by two distinct adenoviral vectors. ***Gene Therapy*** 2001;8:1072-80.
32. Tjuvajev JG, Joshi A, Callegari J, Lindsley L, Joshi R, Blasberg RG. A general approach to the non-invasive imaging of transgenes using cis-linked herpes simplex virus thymidine kinase. ***Neoplasia*** 1999;1:315-20.
33. Yu Y, Annala AJ, Barrio JR, Toyokuni T, Satyamurthy N, Gambhir SS. Quantification of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals. ***Nat Med*** 2000;6:933-7.
34. Baron U, Freundlieb S, Gossen M, Bujard H. Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. ***Nucleic Acids Res*** 1995;23:3605-6.
35. Bramson J, Hitt M, Gallichan WS, Rosenthal KL, Gauldie J, Graham FL. Construction of a double recombinant adenovirus vector expressing a heterodimeric cytokine: in vitro and in vivo production of biologically active interleukin-12. ***Hum Gene Therapy*** 1996;7:333-42.
36. Wood M, Perrotte P, Onishi E, Harper ME, Dinney C, Pagliaro L, et al. Biodistribution of an adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to a mouse. ***Cancer Gene Ther*** 1999;6:367-372.
37. Hemminki A, Belousova N, Zinn KR, Liu B, Wang M, Chaudhuri TR, et al. An adenovirus with enhanced infectivity mediates molecular chemotherapy of ovarian cancer cells and allows imagingof gene expression. ***Mol Ther*** 2001;4:223-231.
38. Glasgow JN, Everts M, Curiel DT. Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy. ***Cancer Gene Ther*** 2006; 13:830-844.