

나트륨 옥소 공동수송체 유전자와 녹색 형광 유전자의 이중 리포터 유전자를 발현하는 간암세포주 확립

경북대학교 의과대학 분자외과학교실¹, 핵외과학교실³, 대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실², 원자력의학원⁴ 과학원정¹ · 구본철² · 권모선² · 이홍진³ · 이화영¹ · 유정수^{1,3} · 김태완² · 전권수⁴ · 천기정⁴ · 이상우³ · 안병철³ · 이재태³

Establishment of a Hepatocellular Carcinoma Cell Line Expressing Dual Reporter Genes: Sodium Iodide Symporter (NIS) and Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP)

Wonjung Kwak, M.S.¹, Bon Chul Koo, Ph.D.², Mo Sun Kwon, Ph.D.², Yong Jin Lee, Ph.D.³, Hwa Young Lee, B.S.¹, Jeongsoo Yoo, Ph.D.^{1,3}, Teoan Kim, Ph.D.², Kwon Soo Chun, Ph.D.⁴, Gi Jeong Cheon, M.D.⁴, Sang Woo Lee, M.D.³, Byeong-Cheol Ahn, M.D.³, and Jaetae Lee, M.D.³

¹Department of Molecular Medicine and ³Nuclear Medicine, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea; ²Department of Physiology, Catholic University of Daegu, School of Medicine, Daegu, Korea; ⁴Korea Institute of Radiological & Medical Sciences, Seoul, Korea

Purpose: Dual reporter gene imaging has several advantages for more sophisticated molecular imaging studies such as gene therapy monitoring. Herein, we have constructed hepatoma cell line expressing dual reporter genes of sodium iodide symporter (NIS) and enhanced green fluorescence protein (EGFP), and the functionalities of the genes were evaluated *in vivo* by nuclear and optical imaging. **Materials and Methods:** A pRetro-PN vector was constructed after separating NIS gene from pcDNA-NIS. RSV-EGFP-WPRE fragment separated from pLNRGW was cloned into pRetro-PN vector. The final vector expressing dual reporter genes was named pRetro-PNRGW. A human hepatoma (HepG2) cells were transfected by the retrovirus containing NIS and EGFP gene (HepG2-NE). Expression of NIS gene was confirmed by RT-PCR, radioiodine uptake and efflux studies. Expression of EGFP was confirmed by RT-PCR and fluorescence microscope. The HepG2 and HepG2-NE cells were implanted in shoulder and hindlimb of nude mice, then fluorescence image, gamma camera image and I-124 microPET image were undertaken. **Results:** The HepG2-NE cell was successfully constructed. RT-PCR showed NIS and EGFP mRNA expression. About 50% of cells showed fluorescence. The iodine uptake of NIS-expressed cells was about 9 times higher than control. In efflux study, $T_{1/2}$ of HepG2-NE cells was 9 min. HepG2-NE xenograft showed high signal-to-background fluorescent spots and higher iodine-uptake compared to those of HepG2 xenograft. **Conclusion:** A hepatoma cell line expressing NIS and EGFP dual reporter genes was successfully constructed and could be used as a potential either by therapeutic gene or imaging reporter gene. (Nucl Med Mol Imaging 2007;41(3):226-233)

Key Words: dual reporter gene, HepG2 cell, NIS, EGFP

서 론

간암(hepatocellular carcinoma)은 우리나라에서 호발하는 악성종양으로서 조기에 발견할 경우 수술로 제거할 수 있다. 그러나 진행된 간암에서는 수술, 동맥색전술, 에탄올 주입법, 고주파 치료, 경피적 동위원소 주입법 등을 사용하여도 완치하기가 어렵다. 간암에서도 다른 불량한 예후를 가지는 악성종양에서와 같이 면역요법, 유전자 치료법 등이 시도되고 있다.^{1,2)} 최근 미분화 갑상선암 세포나 다양한 난치성 악성종양

• Received: 2007. 3. 6. • Accepted: 2007. 5. 9.
• Address for reprints: Jaetae Lee, M.D., Department of Nuclear Medicine, Kyungpook National University School of Medicine, 101, Dongin-dong 2-ga, Jung-gu, Daegu 700-422, Korea
Tel: 82-53-420-5586, Fax: 82-53-422-0864
E-mail: jaetae@knu.ac.kr
※ 본연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RT104- 01-01)과 2007년도 두뇌한국21 사업의 지원으로 수행되었음.

의 치료를 위하여 나트륨 옥소 공동수송체(sodium iodide symporter, NIS) 유전자를 이입하고, 치료용 방사성핵종을 주사하는 내부 방사선 치료를 시행하는 방법이 시도된 바가 있다.³⁾ NIS는 두개의 나트륨 이온이 세포막을 통해 들어가면서 옥소 이온이 함께 들어가는 방법으로, 세포 내로 갑상선 호르몬 합성에 필요한 옥소가 섭취되는 통로이다. Carrasco 등^{4,5)}이 재조합한 rNIS (recombinant NIS)의 제작에 관한 연구 결과를 발표하였고, 많은 연구자들이 이에 관한 기초 및 임상적 응용 가능성에 관하여 관심을 가지고 있다. NIS 유전자를 이입하여 세포막에 NIS 단백질을 발현시키면, Tc-99m pertechnetate, I-131이나 I-123으로 영상화가 가능하고 치료용 방사성핵종인 I-131, Re-186, Re-188을 이용한 치료도 가능하므로 미분화 갑상선암이나 몇 종류의 다른 암에서도 치료유전자로 사용할 수 있었다.^{3,6,7)} 그러므로 지금까지 이용되고 있는 치료법에 반응하지 않는 간암에서도 NIS 유전자를 이입하고 방사성핵종 치료를 한다면 치료 효과가 높을 것이라 예측할 수 있다.

분자영상을 위하여 개발된 리포터 유전자 중에서 핵의학 분자 영상에는 NIS 외에도 변형 도파민 D2 수용체(mutant dopamine D2 receptor, D2R)와 HSV1-tk (Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase)가 가장 널리 사용되고 있다.⁸⁾ 최근에는 이들 유전자들을 복합적으로 발현하도록 한, 다중 리포터 시스템을 이용한 복합분자 영상에 대한 관심이 집중되고 있다.^{9,10)} 특히 핵의학적 리포터 유전자(HSV1-tk 나 NIS 등)와 광학분자영상에 이용되는 리포터 유전자인 luciferase와 green fluorescence protein (GFP)등을 동시에 발현시키는 이중 리포터 유전자 영상기법은 체내 세포수준의 실험실 연구와 동물실험에서 암의 진행과 호전, 치료 후의 경과 추적에 광범위하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 광학 영상 리포터 유전자를 관찰 유전자(monitoring gene)로 이용하여, NIS가 이입된 세포에서 I-131, Re-186, Re-188에 의한 방사성핵종 치료의 효과를 평가할 수 있을 것이라 생각된다.^{2-4,6)}

본 연구에서는 간암 세포에 retroviral vector를 이용하여 향후 치료 유전자로 이용될 수 있는 NIS 유전자와 광학영상을 위한 EGFP (enhanced GFP) 유전자를 동시에 이입한 이중 리포터 유전자를 가진 세포주를 확립하고자 하였다. 이중 리포터 유전자가 이입된 세포를 마우스에 유전자 이입 후 핵의학 영상과 광학 영상을 동시에 얻어서 이중 리포터 유전자의 생체 내 영상이 성공적으로 이루어질 수 있는가를 확인하였다.

재료 및 방법

1. pRetro-PNRGW 벡터

pSIREN-RetroQ Retroviral Vector (Clontech, USA)에 제한효소를 처리하여 U6 promoter와 puromycin 저항성 유전자를 제거한 후 pcDNA-hNIS로부터 hNIS유전자를 분리하여 PGK promoter에 의해 발현되는 Retro-PN을 구축하였다. 그리고 pLNRGW (LTR-NeoR-RSV-EGFP-WPRE)로부터 RSV promoter에 의해 EGFP 유전자가 발현되는 RSV-EGFP-WPRE 서열을 분리하여 pRetro-PN 벡터에 도입함으로써 NIS와 EGFP 유전자가 발현되는 pRetro-PNRGW (PGKp-NIS-RSVp-EGFP-WPRE) 벡터를 구축하였다.

2. 세포주

사람 간암 세포주 HepG2는 10% fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL Co., USA), 1% antibiotic-antimycotic (GibcoBRL Co., USA)이 첨가된 Minimum essential medium a (MEM-a, GibcoBRL Co, USA)에서 배양하였다. Retro virus의 packaging 세포주인 GP2-293 세포(Clontech, USA)는 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)에서 배양하였다. 각 세포주는 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

3. Retro virus 생산 및 감염

Virus를 수확하기 위해서 각각 10 µg의 pRetro-PNRGW와 pHCMV-G plasmid DNA를 1×10⁶의 GP2-293 세포에 calcium phosphate transfection kit (Invitrogen, USA)를 사용하여 제약회사에서 제시한 방법으로 일시적인 공동이입(co-transfection)을 하였다. 37°C, 5% CO₂ 조건에서 8시간 배양하고 PBS로 2회 수세한 후 새로운 배양액으로 교환하고, 48시간이 경과한 후 retrovirus를 수확하였다. 생산된 retrovirus는 5 µg/ml의 polybrene을 첨가하여 HepG2 세포에 감염시켰으며, GFP가 발현되는 세포 수가 우월한 colony를 선별하기 위해 각 colony를 24 well plate에 접종하였다. 선별된 colony는 계대배양하여 충분한 세포수를 확보한 후 다음 실험에 사용하였다. 선별된 HepG2 세포를 HepG2-NE 세포라고 명명하였다.

4. 역전사효소 중합효소연쇄반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

HepG2-NE 세포들로부터 NIS 유전자의 발현을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 먼저 확립된 세포주들로부터

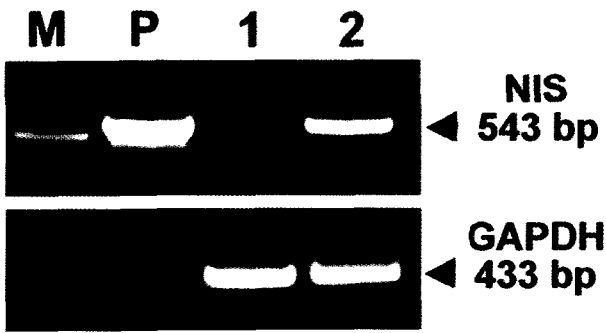


Fig. 1. Electrophoresis result of hNIS using RT-PCR in ethidium bromide stained gel. M: size marker, P; pRetro-PNRGW plasmid, 1; HepG2, 2; HepG2-NE.

터 Trizol (Invitrogen, USA) 방법을 이용하여 전체 RNA를 추출한 후 Access RT-PCR System (Promega, USA)을 사용하여 RT-PCR을 시행하였다. 48°C에서 45분간 역전사 반응을 수행하여 first strand cDNA를 합성한 다음 94°C에서 2분간 denaturation 반응 후 94°C 1분, 55°C 1분 그리고 72°C 1분의 PCR 반응을 35회 실시하였다. 역전사효소 증합효소 연쇄반응에 사용한 NIS 유전자의 프라이머는 upstream 프라이머 5'-CCTTCTACACGGCTGTGGG-3'과 downstream 프라이머 5'-TGGATGCTGTGCTGAGGGTG-3'이며, 양성 대조군으로 사용한 GAPDH (Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) 프라이머는 upstream 프라이머 5'-AAATC AAGTGGGGCGATGCT-3'과 downstream 프라이머 5'-AGCTTCCCGTTCAGCTCAGG-3'이다.

5. 방사성옥소 섭취율 측정

시간별 방사성옥소 섭취율을 측정하기 위하여 24 well plate에 한 well당 1×10^5 HepG2와 HepG2-NE 세포를 접종하였다. 24시간 배양한 후 3.7 kBq/0.5ml의 방사성옥소 (I-125)와 10 mM sodium iodide (NaI)가 첨가된 Hanks balanced salt solution (HBSS, Invitrogen, USA)을 각 well에 0.5 ml씩 넣었다. 5% CO₂, 37°C 배양기에서 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120분간 배양하였다. 각 시간마다 차가운 2 ml HBSS로 두 번 수세하고 2% SDS로 세포 용해 후 감마선 계측기(Packard, IL, USA)로 세포 내에 섭취된 방사능을 측정하였다. 각 섭취된 세포의 단백질 양을 측정하고자 BCA 단백질 정량 키트(Pierce Co., USA)를 사용하였다. NIS 유전자의 기능은 I-125 섭취율 측정시 50 mM KClO₄를 첨가하여 ClO₄⁻에 의해 옥소의 섭취가 저해되는지를 평가하였다. 방사성 옥소의 섭취율은 세포막 단백질의 양으로 보정한 pmol/mg protein으로 환산하여 평가하였다.

6. 세포에서 방사성옥소 유출량 측정

NIS 유전자가 이입된 HepG2-NE 세포에서 섭취된 방사성 옥소의 유출량을 측정하였다. 방사성 옥소의 섭취율 측정과 같이 7.4 kBq/ml의 I-125와 10 mM의 NaI가 들어있는 HBSS를 넣고 37°C에서 30분간 배양한 후 차가운 HBSS로 두 번 씻어낸다. 다시 HBSS를 넣고 0, 3, 6, 9, 12, 15, 21, 27분에 HBSS를 회수하여 각 시간에 회수된 HBSS에서의 유출된 방사성 옥소의 방사능을 감마선 계측기(Packard, IL, USA)로 측정하였다. 측정된 방사성 옥소는 투여량에 대한 백분율로 환산하여 평가하였다.

7. 동물 실험

누드 마우스(Balb/c nu/nu, 수컷, 5주령)를 사용하였고, 모든 동물은 경북대학교병원 의학연구소 동물 실험실에서 실험동물 사용 시의 윤리지침을 준수하며 정상적으로 사육하였다. HepG2 간암세포와 NIS와 GFP가 이입된 HepG2-NE세포를 3×10^7 과 6×10^7 세포로 제조 후 누드 마우스의 어깨와 대퇴부에 피하주사하고 종괴가 형성되도록 하였다. 소동물용 PET 영상에 이용한 동물은 대퇴부에만 6×10^7 세포를 주사하였다.

감마카메라와 소동물용 PET 영상으로 생체 내에서 이식된 세포의 NIS 단백질의 발현을 측정하고자 감마카메라 영상 획득을 위하여 I-123 5.6 MBq를 복강 내에 주사하였다. I-124 (12.95 MBq)는 꼬리 정맥을 통하여 주사하였다. 방사성 옥소 주사 2시간 후 각각 바늘구멍 주변기가 장착된 감마카메라(Basicam, Siemens, USA)와 소동물용 PET (Concorde MicroPET R4, Concorde Microsystems Inc., Knoxville, Tennessee)을 이용하여 전신 영상을 획득하였다. 또한 EGFP의 영상을 측정하기 위하여 세포이식 16시간 후에 형광카메라(Chemi Pro, Roperscientific, USA)를 이용하여 영상을 획득하였다. 감마카메라와 형광카메라 영상 획득은 펜토바비탈(2 mg/200µl 생리식염수)을 사용하였고, 소동물용 PET 영상은 isoflurane을 사용하여 마취 하에서 영상을 획득하였다.

결 과

1. NIS와 EGFP 유전자의 발현 분석

HepG2-NE 세포에서 전체 RNA를 분리한 후 NIS와 GAPDH primer로 RT-PCR을 실시한 결과는 Fig.1에 나타내었다. HepG2-NE 세포에서는 NIS 유전자가 발현되어 있음을 확인할 수 있었고, pRetro-PNRGW 유전자를 이입하지 않은 HepG2 세포는 NIS가 발현되지 않았다. 유전자 이입 후 만들어진 HepG2-NE세포를 형광현미경으로 확인한 결과

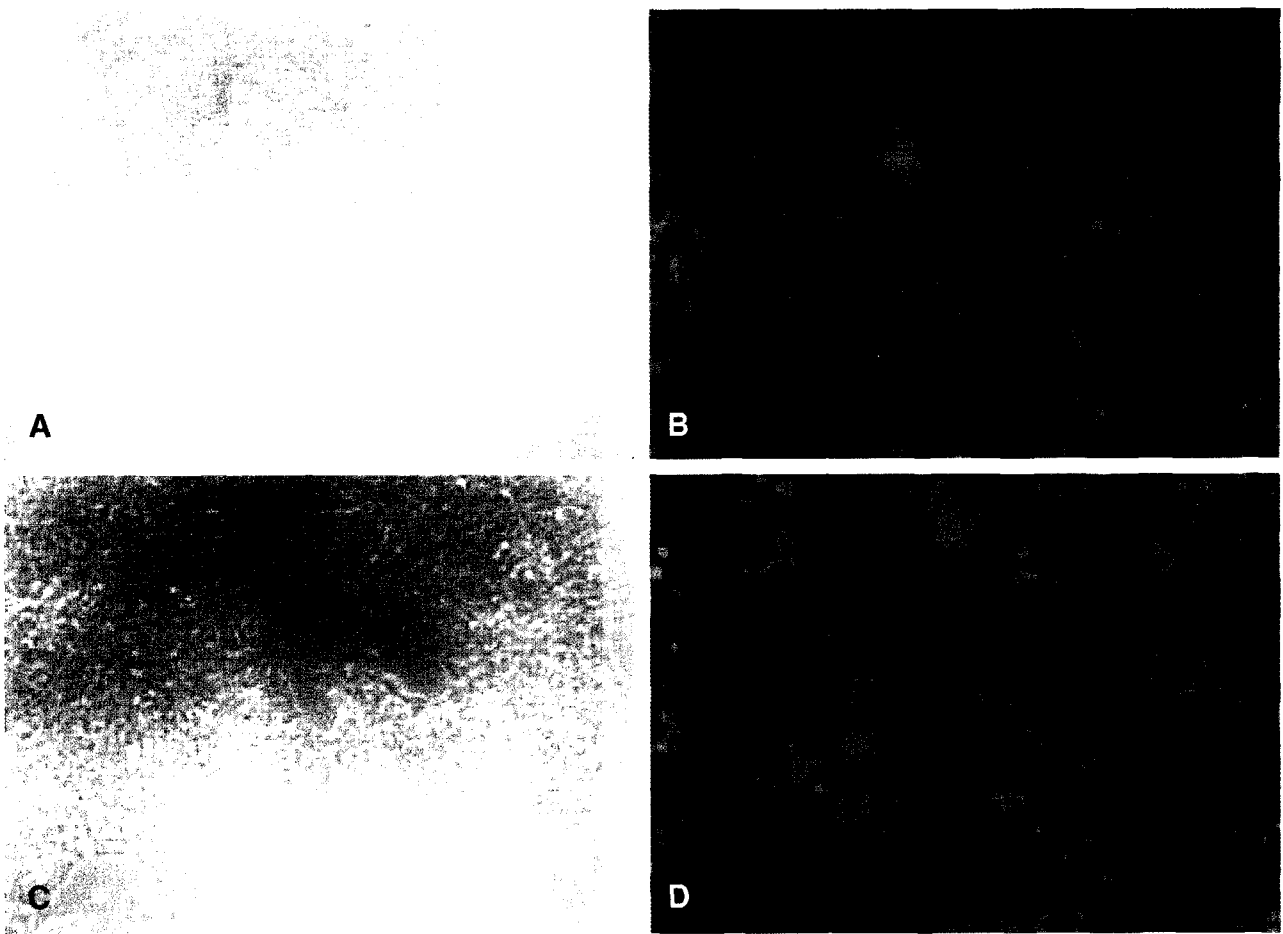


Fig. 2. EGFP gene expression in HepG2 cells transfected with Retro-PNRGW retroviruses. Field: (A,C) bright field, (B,D) fluorescence. Magnification: A,B; 50x, C,D; 100x

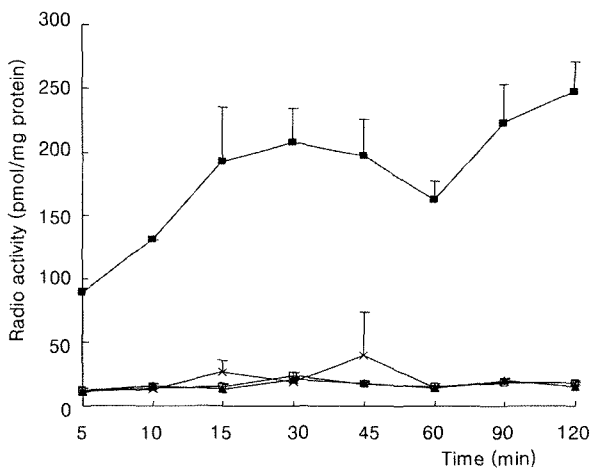


Fig. 3. Radioiodine uptake by HepG2 cells without perchlorate (□, n=3), HepG2-NE without perchlorate (■, n=3), HepG2 with 1 mmol/L perchlorate (▲, n=3), HepG2-NE with 1 mmol/L perchlorate (X, n=3).

50% 이상의 세포들이 형광을 띠고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

2. 방사성옥소 섭취율

HepG2-NE 세포의 방사성옥소 섭취율은 10분에 130 pmol/mg protein, 30분에는 207 pmol/mg protein 이었으며, 120분에서의 섭취율은 248 pmol/mg protein으로 가장 높았다. 30분의 섭취율을 비교하면 HepG2 세포에서의 섭취율은 23.4 pmol/mg protein으로서 HepG2-NE 세포의 섭취율이 HepG2 세포의 섭취율보다 약 9배 높았다. HepG2-NE 세포를 ClO_4^- 로 처리하였을 때, 30분의 방사성옥소 섭취율은 약 19 pmol/mg protein으로 감소되었다(Fig. 3).

3. 방사성옥소 유출률

30분간 방사성 옥소를 섭취시킨 HepG2-NE 세포에서의 방사성 옥소 유출은 3분에 22%의 옥소가 유출되었고, 세포 내에 저류되어 있는 옥소는 15분에는 36.7%, 27분 9.4%였다.

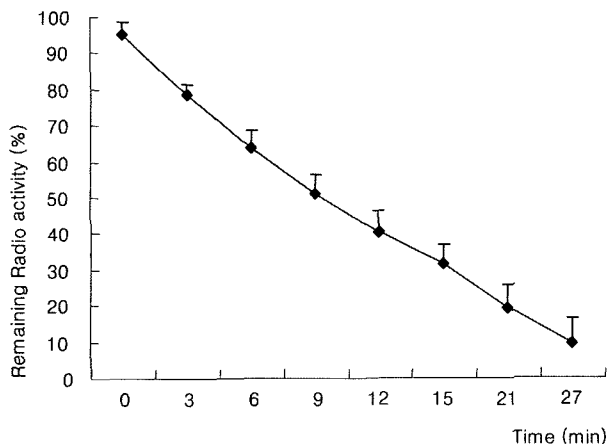


Fig. 4. Iodide efflux from HepG2-NE cells after 30 min incubation with Na^{125}I . Data are expressed as means (remaining % of I-125) of triplicate wells.

세포에서 옥소 유출 반감기 $T_{1/2}$ 는 9분이었다(Fig. 4).

4. 체내에서 NIS와 EGFP 유전자 발현의 증명

형광 카메라 영상에서 HepG2 세포는 형광의 신호가 전혀 보이지 않는데 비하여, HepG2-NE 세포는 뚜렷한 형광 신호를 나타내었다. 이식한 세포의 수가 적었던 어깨 종양이식 부위는 더 많은 수의 세포를 넣어준 대퇴부에 비하여 형광의 신호가 작았다(Fig. 5). 감마카메라와 소동물용 PET 영상에서도 NIS 유전자가 이입되었던 HepG2-NE 세포 주입부위가 HepG2 세포 주입부위에 비해 방사성 추적자의 섭취가

더욱 진하게 나타났다. 소동물용 PET 영상에서 관심영역의 총 방사능을 비교한 결과 HepG2-NE 세포 주입 부위는 10 KBq (274 nCi), HepG2 세포 주입부위는 1 KBq (27 nCi)로 10배의 차이를 보였다. 이것으로 NIS 유전자가 체내에서도 활성을 나타내고 있음을 확인하였다(Fig. 5).

고 찰

분자영상 기법은 체내 세포 수준에서 일어나는 현상을 세포의 근원적인 현상이나 생체를 조절하는 기전을 동물을 희생시키지 않고도 시간적 변화에 따라 연속적으로 영상화할 수 있다는 장점이 있다. 분자영상 기법의 도입으로 생체 내로의 유전자의 이입, 내인적 유전자의 발현, 체내 투여된 세포의 경로추적, 신호전달, 세포고사(apoptosis), 종양 조직의 혈관신생, 세포내 단백질과 단백질 간의 상호작용 등을 영상화할 수 있었고^{3,10-12)}, 감마카메라와 PET을 이용한 핵의학 적 분자영상기법은 가장 먼저 이용되었을 뿐만 아니라, 광범위하게 이용되어 온 방법이다. 발광 또는 형광물질을 이용한 광학적 분자영상기법은 종양학 연구 분야에서 종양의 발생 과정, 종양의 성장과 전이과정, 치료 후 세포수준에서의 치료 효과의 평가등을 비침습적으로 영상화할 수 있으므로, 체내 광학영상 기기의 개발과 함께 배양한 세포와 소동물에서의 발광 또는 형광 영상을 이용한 연구가 다양한 분야에서 이용된다^{10,13,14)} 최근에는 자기공명영상(MRI)을 이용한 분자영상 연구기법들도 활발하게 개발되고 있다. MRI가 높은

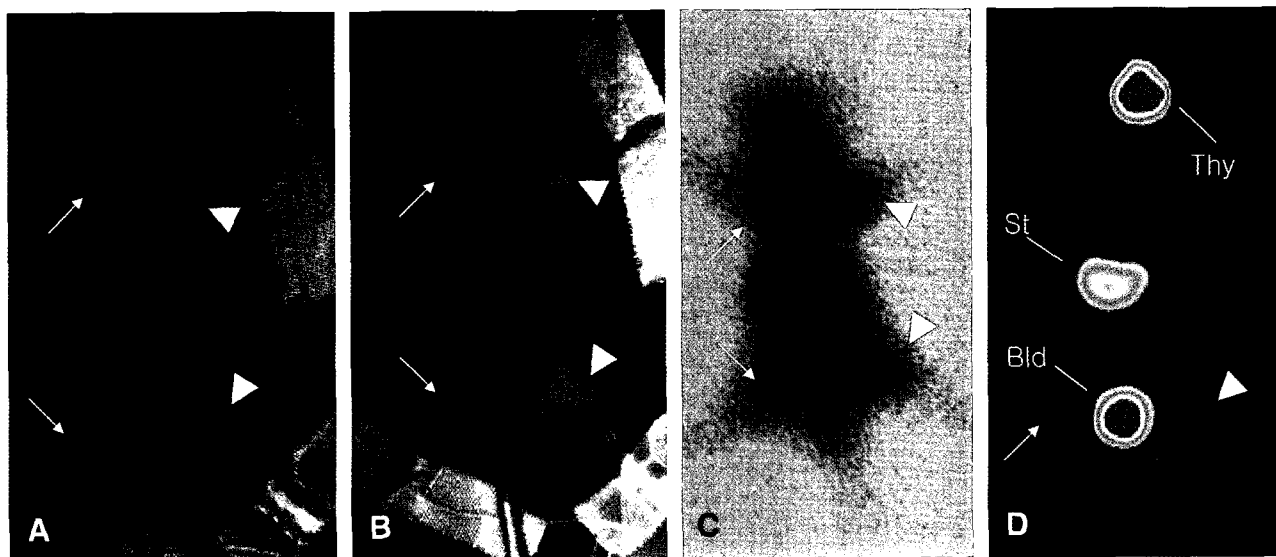


Fig. 5. Whole-body planar images of nude mouse transplanted tumor cells in both flanks. (A) white light image; Arrow indicates HepG2 and arrowhead does HepG2-NE. (B) fluorescent image; Fluorescent signals were shown at transplanted place by HepG2-NE. (C) gamma camera image of I-123, (D) microPET image of I-124; The radio signals of I-123 and I-124 were shown at HepG2-NE region. Thy:thyroid, St:stomach, Bld:bladder.

공간 분해능력을 가지고 있어 종양이 이식된 모델에 대해 비침습적인 연속 영상이 가능하기 때문이다.¹⁵⁾ 실제 분자영상 기법으로 이중 영상 리포터 유전자 시스템을 만들면 두 리포터 유전자에서 세포의 수와 영상신호가 비례한다는 사실이 보고된 바 있었다.¹⁶⁾ 생체 내로 주사되거나 접종된 유전자 이입 세포를 분자영상기법으로 쉽게 추적하기 위해서는 발현 특성이 잘 알려진 리포터 유전자의 이입이 필요하다. 핵의학적 영상에 사용되는 리포터 유전자로는 세포증식에 관여하는 thymidine kinase 효소의 기질물질을 추적자로 사용하는 HSV1-tk 유전자와 도파민수송체 유전자인 D2R 유전자, 그리고 저자들의 이번 연구에서 사용된 NIS 유전자 등이 있으며,^{9,10)} 광학영상을 위해서는 GFP 유전자와 luciferase 유전자 등이 사용되고 있다. NIS 유전자가 이입된 세포는 세포막에 NIS 단백질이 발현되며, NIS를 발현하는 암세포와 심근세포들은 세포와 체외나 소동물에 이용한 영상실험 연구에서 방사성 옥소의 섭취를 유도한다.^{3,13,14,17)} NIS 유전자가 이입된 암세포들이 방사성 옥소를 선택적으로 섭취하므로 현재 임상에서 갑상선암 치료에 사용되는 I-131 이외에도 화학적 성질이 유사한 Re-186, Re-188 등을 이용한 내부 방사선치료가 가능할 것이다. Haberkorn 등⁷⁾은 사람 NIS (hNIS) 유전자를 Morris hepatoma (MH3924A)에 retrovirus로 이입 후 옥소 섭취율을 측정하였을 경우 옥소 섭취정도가 235배나 증가하였다고 보고한 바 있다. 그러나 유출률은 10분에 80% 가량의 옥소가 빠르게 유출되었다. 또한 사람 간암 세포주인 SK-Hep1 세포에서의 NIS 유전자에 관한 연구에서는 방사성옥소의 섭취율이 모세포에 비해서 150배 정도 증가되었으나, 옥소 유출률은 27분에 60%로 morris hepatoma나 HepG2 세포보다 느린 유출률을 나타내었다.¹⁵⁾ 세포 내 섭취된 옥소의 빠른 유출은 임상적 이용을 위해서는 해결되어야 할 과제이다. 이러한 hNIS 유전자가 이입된 세포에서의 옥소 유출은 갑소 인자인 TPO (thyroid peroxidase) 또는 Tg (thyroglobulin) 유전자를 같이 이입하여 방사성옥소가 세포내에 섭취된 후 방사선 치료효과가 나타날 수 있도록, 충분한 시간 동안 세포 내에 머무르게 하려는 시도를 하고 있다.^{2,3)}

각각의 분자영상기법들은 독창적인 장점들이 있으나, 어떤 분야에서는 이용되기 어려운 본질적인 약점들도 가지고 있다. GFP와 luciferase를 이용한 광학 영상기법은 냉각한 CCD 카메라를 장착한 비교적 간편한 장치를 이용하므로 실험실에서 세포 또는 작은 동물 연구에서 손쉽게 이용할 수 있으나, 광선의 체내 조직 투과성이 좋지 못하므로 사람이나 큰 동물의 영상에는 이용되기 어렵다. PET이나 MRI를 이용한

핵의학적 및 자기공명 영상기법은 좀 더 좋은 공간 분해능을 가지고 있어 더 깨끗한 영상획득이 가능하다는 장점이 있으나, 가격이 비싸고 특정한 기기를 필요로 한다는 단점이 있다.^{10,16)} 최근에는 대부분의 PET 영상기기에 전산화단층촬영 기기(CT, computed tomography)가 동시에 장착된 PET-CT가 널리 보급되고 있으므로 생화학적, 유전자 수준의 변화를 볼 수 있는 기능적인 영상에 해부학적 영상이 첨가됨으로써 좀 더 확실한 영상을 획득할 수 있어 질병의 정확한 진단이 가능하다. 또한, 소동물용 PET은 좋은 공간 분해능으로 인하여 소동물의 체내영상화에 널리 이용되고 있으나,^{14,17-19)} 아직도 실험실 수준에서 쉽게 이용되는 데는 어려움이 있다. 결국 한가지 특정 방법으로 기초에서 임상 연구까지 모든 과정에 적용하기는 어려운 것이다. 그러므로 한가지 기법의 단점을 다른 기법으로 극복하거나 한번에 두가지 또는 여러 가지의 기능을 동시에 수행할 수 있는 복합분자영상기법의 개발이 필요하며, 최근의 연구들은 이러한 점에 초점을 두고 있다.¹⁵⁻¹⁹⁾ 복합 영상 리포터의 사용은 세포 수준의 실험실 연구뿐만 아니라, 사람을 포함한 대동물의 직접적인 영상연구 수준까지 넓은 범위로 응용이 가능하다.¹⁵⁾

저자들은 핵의학 영상과 광학영상 각각이 가지는 단점을 보완하고 체외실험에서 유전자의 발현을 확인하고 이어서 소동물 영상이 가능하도록 NIS를 이용한 핵의학적인 영상과 GFP보다 형광방출이 30-40배 더 밝다고 알려진 EGFP를 이용한 광학영상이 동시에 가능한 이중 리포터 유전자를 동시에 이입하여 발현 여부를 평가할 수 있는 간암 세포에서 확립하였다. 즉, 복합 분자영상기법이 가능한 세포주를 개발하고 만들어진 세포의 기능을 평가하고자, 핵의학적 영상으로 평가가 가능한 NIS 유전자와 동시에 형광 영상이 가능한 EGFP 유전자를 이입한 HepG2-NE 간암세포를 생성하고, 세포 수준에서의 분자생물학적 검사법과 체외영상 기법을 통하여 이들이 정상적으로 작동하고 있음을 증명하였다. 저자들이 생성한 NIS와 EGFP를 동시에 이입한 세포에서는 대조군 세포에 비하여 I-125의 섭취율이 9배 정도 증가하였으나, 앞에서 언급한 다른 연구^{3,15)}에서의 섭취율 증가보다는 낮았다. I-124를 이용한 소동물용 PET 영상에서 주변 조직이나 대조 종양에 비하여 높은 섭취율을 보였고, perchlorate로 옥소 섭취가 차단되었으므로 NIS가 잘 발현됨을 알 수 있었다. 또한, 형광도 잘 발현되었으므로 향후 복합적인 분자영상기법의 개발에 직접적으로 이용될 수 있으며, 삼중분자영상과 목적으로 하는 어떤 유전자의 세포내 발현을 두가지 리포터 유전자의 발현으로 평가할 수 있을 것이다. 본 연구의 결과에서는 NIS 유전자를 이용한 핵의학적인 영상과 GFP 유전자를 이용한 형광 영상의 결과로 보아 단일 세포

내에서 두 종류의 리포터 유전자가 기능적으로 잘 작동될 수 있을 것으로 추측된다. NIS 유전자의 기능은 양전자를 방출하는 I-124를 사용하여 소동물용 PET 영상을 획득하여 종양조직에 방사성옥소의 축적이 증가되는 것으로 확인하였다. 그러나 본 연구에서는 I-131을 이용한 치료효과에 관한 실험을 시행하지는 못하였으나, 향후 베타선을 방출하는 I-131 또는 Re-186, Re-188을 투여한 치료 연구를 예정하고 있다.^{3,21-25)} 그러나 저자들의 NIS 유전자가 이입된 HepG2-NE 세포에서 I-125는 FRTL-5 갑상선세포나 NIS를 이입시킨 다른 종양세포의 실험에서 관찰된 바와 같이, 오래 저류되지 못하고 방출되므로 치료를 위해서는 치료용 방사성핵종의 세포내 저류시간과 저류량을 증가시키기 위한 방법이 동시에 고려되어야 할 것이다.

두 가지의 유전자를 융합하는 방법은 IRES로 결합시키거나,^{26,27)} 양측성 promoter로 두 유전자를 분리하는 법,²⁸⁾ 같은 vector에서 두 유전자를 다른 부위에 위치시키는 방법,²⁹⁾ 융합시킬 때 한 가지 기능이 잘 발현되지 못하는 경우에는 같은 역가의 바이러스 vector를 공동 이입시키는 방법 등이 있다.³⁰⁾ 저자들은 retrovirus를 이용하여 같은 vector에 두 유전자를 이입시켜 pRetro-PNRGW vector를 제작하는 방법을 선택하였다. Shin 등¹⁶⁾은 SK-HEP1-NL 간암세포에 hNISpIRES vector를 이용하여 NIS와 luciferase 유전자를 이입한 이중 리포터 유전자 발현 세포를 제작하고 체내 I-125 분포량과 감마카메라 및 광학영상으로 두가지 기능이 동시에 발현되었음을 증명한 바가 있었다. Lee 등¹²⁾은 흰쥐의 심근세포에 NIS와 EGFP 유전자를 adenovirus vector를 사용하여 융합시키고 심근에 이입하여, 심근내 발현 여부를 I-123 영상으로 확인하였다. 이들은 GFP의 발현을 형광영상으로 두 유전자의 발현이 유사하게 발현함을 확인하여 GFP로 NIS 유전자의 발현을 비교적 정확하게 평가할 수 있었다고 보고하였다. 최근에는 삼중 유전자 발현 복합분자영상에 대한 관심이 높아졌고, Gambhir 등¹²⁾은 형광, 방사성 핵종 그리고 생물발광의 삼중 리포터 유전자를 단일 발현시킨 단일 세포를 만들고, 형광은 세포실험, 생물 발광은 소동물의 영상, 방사성 핵종은 대동물에서 영상화에 성공한 연구결과를 발표한 바가 있다.

저자들의 연구 결과로 보아, NIS와 GFP 리포터 유전자가 동시에 발현되어 복합 분자영상기법이 가능한 간암 세포주는 체외 세포실험에 핵의학이나 광학적 방법으로 평가가 가능할 것이다. 또한 소동물 실험으로 GFP 유전자를 종양의 관찰을 위한 영상 유전자로 사용하고, NIS 유전자를 I-131을 이용한 치료에 사용하는 치료 유전자로 사용할 수 있을 것으로 추측된다.

요 약

목적: 광학과 핵의학 및 자기공명 분자영상 기술은 생체 내에서 리포터 유전자의 발현을 비침습적으로 평가할 수 있다. 한가지 이상의 유전자 발현을 영상화 할 수 있는 복합분자영상은 유전자의 발현과 유전자 치료 후 효능의 평가를 다양한 방법으로 반복하여 평가할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서는 핵의학 영상이 가능한 NIS와 광학 영상이 가능한 EGFP 두가지 유전자를 동시에 발현하는 HepG2-Retro-PNRGW (PGKp-NIS-RSVp-EGFP-WPRE) plasmid를 이용한 간암 세포주(HepG2-NE)를 구축하고, NIS와 EGFP 리포터 유전자의 기능 발현을 체내에서 광학영상과 핵의학 영상으로 확인하고자 하였다. **재료 및 방법:** pcDNA-NIS로부터 NIS 유전자를 분리하여 pRetro-PN vector를 만든 후, pLNRGW (LTR-NeoR-RSV-EGFP-WPRE)로부터 RSV-EGFP-WPRE 조각을 분리하여 최종적으로 NIS와 EGFP 유전자가 동시에 발현할 수 있는 pRetro-PNRGW vector를 구축하였다. 구축된 vector를 이용하여 Retro-PNRGW retrovirus를 생산하였으며, 이를 HepG2 세포에 감염시켜 HepG2-NE 세포주를 만들었다. 이 세포주의 NIS 유전자의 발현은 역전사효소 증합효소 연쇄반응으로 mRNA 발현을 확인하였고, EGFP 유전자의 발현은 형광현미경을 통하여 EGFP 단백질이 발현하는 녹색형광을 관찰함으로써 확인하였다. 이중 리포터 유전자 중 NIS 유전자의 기능은 세포에서 방사능 옥소의 섭취량과 유출량의 측정을 통해서 확인하였다. 이렇게 만들어진 세포를 누드마우스에 이식하여 형광 영상, I-123을 이용한 감마카메라 영상과 I-124를 이용한 소동물용 PET 영상을 획득하였다. **결과:** NIS와 EGFP의 이중 리포터 유전자를 가지고 있는 HepG2 세포주가 성공적으로 만들어졌다. 세포의 약 50% 정도가 형광 현미경 아래에서 관찰되었다. NIS 유전자의 발현은 역전사효소 증합효소 연쇄반응 실험을 통해서 확인하였고, NIS가 발현된 세포의 방사능옥소 섭취량은 대조군에 비하여 약 9배 정도 높게 나타났다. 방사능옥소 유출량 실험에서는 약 9분에 반 정도의 옥소가 유출되는 것이 확인되었다. 구축된 세포주를 이식한 후 획득한 형광 영상, 감마카메라와 소동물용 PET 영상에서는 반대쪽의 대조군 세포를 이식한 것에 비하여 뚜렷한 형광신호가 보였고, 더 높은 방사능옥소 섭취가 확인되었다. **결론:** NIS와 EGFP의 이중 리포터 유전자를 가지는 간암 세포주가 성공적으로 구축되었고, 소동물에서 두 유전자를 각각 치료용 리포터 유전자와 영상 리포터 유전자로의 사용이 가능할 것이라고 생각된다.

References

- Blum HE. Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. *World J Gastroenterol* 2005;11:7391-400.
- Hernandez-Alcoceba R, Sangro B, Prieto J. Gene therapy of liver cancer. *Ann Hepatol* 2007;6:5-14.
- Kang JH, Chung JK, Lee YJ, Shin JH, Jeong JM, Lee DS, et al. Establishment of a human hepatocellular carcinoma cell line highly expressing sodium iodide symporter for radionuclide gene therapy. *J Nucl Med* 2004;45:1571-76.
- Dai G., Levy O., and Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 1996;379:458-60.
- Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *J Nucl Med* 2002;43:1188-200.
- Lambert B, Bacher K, Defreyne L, Gemmel F, Vlierberghe HV, Jeong JM, et al. ¹⁸⁸RE-HDD/Lipiodol therapy for hepatocellular carcinoma: A phase I clinical trial. *J Nucl Med* 2005;46:60-66.
- Haberkorn U, Henze M, Altmann A, Jiang S, Morr I, Mahmut M, et al. Transfer of the human NaI symporter gene enhances iodide uptake in hepatoma cells. *J Nucl Med* 2001;42:317-25.
- Gambhir SS, Barrio JR, Herschman HR, Phelps ME. Assays for noninvasive imaging of reporter gene expression. *Nucl Med Biol* 1999;26:481-90.
- Hwang DW, Lee DS, Kang JH, Chang YS, Kim YH, Jeong JM, et al. Development of dual reporter system of mutant dopamine 2 receptor (D2R) and sodium iodide symporter (NIS) transgenes. *Korean J Nucl Med* 2004;38:294-9.
- Shu CJ, Guo S, Kim YJ, Shelly SM, Nijaga A, Ray P, et al. Visualization of a primary anti-tumor immune response by positron emission tomography. *Proc Nat Acad Sci USA* 2005;102:17412-7.
- Keen HG, Dekker BA., Disley L, Hastings D, Lyons S, Zweit J, et al. Imaging apoptosis *in vivo* using ¹²⁴I-annexin V and PET. *Nucl Med Biol* 2005;32:395-402.
- 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.
- Ray P, Wu AM, Gambhir SS. Optical bioluminescence and positron emission tomography imaging of a novel fusion reporter gene in tumor xenografts of living mice. *Cancer Res* 2003;63:1160-65.
- Ray P, De A, Min JJ, Tsien RY, Gambhir SS. Imaging tri-fusion multimodality reporter gene expression in living subjects. *Cancer Res* 2004;64:1323-30.
- Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, Amado LC, Martin BJ, Pittenger MF, et al. *In vivo* magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation* 2003;107:2290-3.
- Gambhir SS, Barrio JR, Herschman HR, Phelps ME. Imaging gene expression: principles and assays. *J Nucl Cardiol* 1999;6:219-33.
- Boland A., Ricard M., Opolon P., Bidart J.M., Yeh P., Filetti S., et al. Adenovirus-mediated transfer of the the thyroid sodium/iodide symporter gene into tumors for a targeted radiotherapy. *Cancer Res* 2000;60:3484-92.
- Groot-Wassink, T, Aboagye EO, Wang Y, Lemoine NR, Reader AJ, Vassaux G. Quantitative imaging of Na/I symporter transgene expression using positron emission tomography in the living animal. *Mol Therapy* 2004;9:436-42.
- Dingli D, Kemp BJ, O'Connor MK, Morris JC, Russell SJ, Lowe VJ. Combined I-124 positron emission tomography/computed tomography imaging of NIS gene expression in animal models of stably transfected and intravenously transfected tumor. *Mol Imaging Biol* 2006;8:16-23.
- Jacobs A, Dubrovin M, Hewett J, Sena-Esteves M, Tan CW, Tjuvajev JG, et al. Functional coexpression of HSV-1 thymidine kinase and green fluorescent protein: Implications for noninvasive imaging of transgene expression. *Neoplasia* 1999;1:154-61.
- Nakamoto Y., Saga T., Misaki T., Kobayashi H., Sato N, Ishimori T, et al. Establishment and characterization of a breast cancer cell line expressing Na⁺/I⁻ symporters for radioiodide concentrator gene therapy. *J Nucl Med* 2000;41:1898-904.
- Li C, Wang W, Wu Q, Ke S, Houston J, Sevcik-Muraca E, et al. Dual optical and nuclear imaging in human melanoma xenografts using a single targeted imaging probe. *Nucl Med Biol* 2006;33:349-58.
- Spitzweg C, Dietz AB, O'Connor MK, Bergert ER, Tindall DJ, Morris JC, et al. *In vivo* sodium iodide symporter gene therapy of prostate cancer. *Gene Therapy* 2001;8:1524-31.
- Carlin S, Akabani G, Zalusky MR. *In vitro* cytotoxicity of ²¹¹At-Astatide and ¹³¹I-iodide to glioma tumor cells expressing the sodium/iodide symporter. *J Nucl Med* 2003;44:1827-38.
- Chen L, Altmann A, Mier W, Eskerski H, Letta K, Haberkorn U. Radioiodine therapy of hepatoma using targeted transfer of the human sodium/iodide symporter gene. *J Nucl Med* 2006;47:854-62.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bramson J, Hitt M, Gallichan WS, Rosenthal KL, Gaudie 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.
- 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.