

Hydrodynamic-based Procedure를 이용한 간에서의 HSV1-tk 발현 확인을 위한 방사표지 5-(2-iodovinyl)-2'-deoxyuridine (IVDU)의 영상연구

한국원자력의학원 분자영상연구부¹, 핵의학과²

송인호¹ · 이태섭¹ · 강주현¹ · 이용진¹ · 김광일¹ · 안광일¹ · 정위섭¹ · 천기정^{1,2} · 최창윤^{1,2} · 임상무^{1,2}

Imaging of Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase Gene Expression with Radiolabeled 5-(2-iodovinyl)-2'-deoxyuridine (IVDU) in Liver by Hydrodynamic-based Procedure

Inho Song, MS.¹, Tae Sup Lee, Ph.D.¹, Joo Hyun Kang, Ph.D.¹, Yong Jin Lee, Ph.D.¹, Kwang Il Kim, Ph.D.¹, Gwang Il An, Ph.D.¹, Wee Sup Chung, BA.¹, Gi Jeong Cheon, M.D. Ph.D.^{1,2}, Chang Woon Choi, M.D. Ph.D.^{1,2}, and Sang Moo Lim, M.D. Ph.D.^{1,2}

¹Molecular Imaging Research Center and ²Department of Nuclear Medicine, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, Seoul, Korea

Purpose: Hydrodynamic-based procedure is a simple and effective gene delivery method to lead a high gene expression in liver tissue. Non-invasive imaging reporter gene system has been used widely with herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk) and its various substrates. In the present study, we investigated to image the expression of HSV1-tk gene with 5-(2-iodovinyl)-2'-deoxyuridine (IVDU) in mouse liver by the hydrodynamic-based procedure. **Materials and Methods:** HSV1-tk or enhanced green fluorescence protein (EGFP) encoded plasmid DNA was transferred into the mouse liver by hydrodynamic injection. At 24 h post-injection, RT-PCR, biodistribution, fluorescence imaging, nuclear imaging and digital wholebody autoradiography (DWBA) were performed to confirm transferred gene expression. **Results:** In RT-PCR assay using mRNA from the mouse liver, specific bands of HSV1-tk and EGFP gene were observed in HSV1-tk and EGFP expressing plasmid injected mouse, respectively. Higher uptake of radiolabeled IVDU was exhibited in liver of HSV1-tk gene transferred mouse by biodistribution study. In fluorescence imaging, the liver showed specific fluorescence signal in EGFP gene transferred mouse. Gamma-camera image and DWBA results showed that radiolabeled IVDU was accumulated in the liver of HSV1-tk gene transferred mouse. **Conclusion:** In this study, hydrodynamic-based procedure was effective in liver-specific gene delivery and it could be quantified with molecular imaging methods. Therefore, co-expression of HSV1-tk reporter gene and target gene by hydrodynamic-based procedure is expected to be a useful method for the evaluation of the target gene expression level with radiolabeled IVDU. (Nucl Med Mol Imaging 2009;43(5):468-477)

Key Words: Hydrodynamic-based procedure, HSV1-tk, IVDU, liver, molecular imaging

서 론

유전자 치료는 유전자 조작을 통해 유전적으로 결함이 있는 유전자를 교정하거나 새로운 기능을 가진 유전자를 전달하여 질병을 치료하는 분야로서,¹⁾ 인간을 대상으로 1990년대 초 중증복합 면역결핍증후증의 일종인 아데노신 탈아미노효소 결핍증(adenosine deaminase syndrome) 환자에게 처음 시행되었다. 이후 현재까지 다양한 질병에 대하여 유전자 치료를 도입하려는 노력이 계속되어 왔으며, 자살유전자(suicide gene), 종양억제유전자(tumor suppressor

• Received: 2009. 7. 31. • Revised: 2009. 9. 15.

• Accepted: 2009. 9. 21.

• Address for reprints: Joo Hyun Kang, Ph.D., Molecular Imaging Research Center, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, 215-4 Gongneung-dong, Nowon-gu, Seoul 139-706, Korea

Tel: 82-2-970-1339, Fax: 82-2-970-1342

E-mail: kang2325@kirams.re.kr

※ 이 논문은 2009년도 교육과학기술부의 재원으로 시행하는 한국 과학재단의 연구지원프로그램으로 지원을 받아 수행된 연구임 (M20702010003-09N0201-00300).

gene) 등 다양한 치료유전자를 발굴하여 이용하고 있다.^{2,3)} 유전자 치료에서 유전자가 전달된 조직 또는 장기의 위치를 확인하고, 또한 전달된 유전자의 발현에 따른 효과를 평가하는 것은 임상적 유용성을 평가하는데 매우 중요하므로, 이를 추적하고 관찰할 수 있는 시스템의 도입이 필요하다. 최근 영상 보고 유전자(imaging reporter gene)를 이용한 분자영상기법을 통해 전달된 유전자 발현의 비침습적인 추적·관찰이 가능하게 되어 핵의학 영상, 광학 영상 등을 통해 보고 유전자의 발현 정도, 발현 위치 등을 확인할 수 있게 되었다.⁴⁾

간은 신체 내에서 많은 대사기능을 담당하고 다양한 혈청 단백질을 생성하고 분비하고 있으며 이는 가족성 고지혈증(familial hypercholesterolemia), OTC 결핍증(ornithine transcarbamylase deficiency), 윌슨병(Wilson's disease), 혈우병(hemophilia) A, B, 등과 같은 다양한 유전적 질환과 간염, 간암 등의 질환과 관련되어 있어 유전자 치료 분야에서 유전자 전달을 위해 가장 많이 이용되는 장기 중 하나이다. 따라서 간으로 유전자를 전달하는 방법을 도입하는 것은 암 치료나 대사성 간 질환의 치료에 매우 유용하다.⁵⁻⁸⁾

현재 이용되고 있는 유전자 전달 방법은 바이러스 벡터와 비바이러스 벡터를 이용한 방법이 있으며, 각 벡터에 따라 장, 단점이 존재한다. 유전자 치료를 위해 적합한 벡터는 체내에서 오랫동안 존재하면서 독성 없이 유전자를 발현하여야 한다. 바이러스 벡터는 병리적 이상이 없이 바이러스의 특성을 이용하여 세포 내로 유전자를 전달하는 방법으로 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노부속바이러스, 렌티바이러스 등을 이용하고 있다.⁹⁻¹¹⁾ 바이러스 벡터는 혈우병 B 동물모델 등에서 장기간 치료효과를 보임으로 우수성이 입증되었다. 하지만 바이러스 벡터는 바이러스의 자연적인 감염에서 유래되는 병리적 이상을 피하기 위해 바이러스 유전자를 제거하거나 변형하지만 세포 내 대사에 영향을 주거나 예기치 않은 면역 반응을 일으킬 수 있다. 이에 반해 비바이러스 벡터는 리포솜, 전기천공법, 유전자 총, 고분자 중합체 또는 naked DNA를 이용하여 생체 내에서 비교적 안전하고 다양하게 이용할 수 있으며 제조 및 준비 과정이 용이하여 비용효과적이다. 그러나 바이러스 벡터에 비해 세포 내 발현 효율이 떨어진다는 것은 단점으로 꼽히고 있다.¹²⁻¹⁵⁾

최근 비바이러스 벡터인 naked DNA의 전달을 이용하여 다양한 유전자 치료에 적용하려는 시도가 늘고 있다. Naked DNA를 이용한 유전자 전달은 DNA의 조제가 용이하고 사용이 간편하며 면역원성이 낮다는 장점이 있고, 원하는 세포나 조직 그리고 장기에 naked DNA를 전달하는

다양한 물리적 방법이 연구되고 있다. 그러한 방법에는 미세한 바늘과 주사기를 이용한 방법, 초음파, 유전자 총(gene gun), 생체 전기천공법(electroporation) 그리고 유체역학적 압력을 이용한 방법 등이 있다.¹⁶⁻¹⁹⁾ 많은 부피의 주사량과 빠른 주사 속도를 이용하여 naked 플라스미드 DNA(pDNA)를 정맥을 통해 전달하는 hydrodynamic-based procedure는 이용이 간편하고 유전자 전달이 효과적인 방법으로 많이 이용되고 있다. 이 방법은 간과 다른 장기에서 전달된 유전자의 높은 발현을 나타낸다.²⁰⁾

Hydrodynamic-based procedure (또는 hydrodynamic injection)는 물질을 물리적인 힘을 통해 세포막을 통과하여 세포질 내로 도입하는 방법으로^{21,22)} 유사한 방법으로 microinjection, particle bombardment, 전기천공법 등이 있다. 그러나 장치를 이용한 다른 방법과는 달리 hydrodynamic injection은 복잡한 장치를 사용하지 않으며 처음 소개된 이래로 DNA, RNA, 단백질뿐만 아니라 막을 통과하지 않는 물질의 세포 내 전달 방법으로 많이 연구하고 있다. 또한 hydrodynamic-based procedure는 여러 분야에서 이용되고 있는데 유전자 치료를 위한 연구를 목적으로 cytokine, growth factor, 유전질환 관련 유전자 등을 전달하는데 이용하고 있으며,²³⁻²⁶⁾ 유전자의 기능을 분석하기 위해 실험동물에서 특정 mRNA를 대상으로 하는 small interference RNA(siRNA)를 전달하여 목적유전자 산물의 감소를 확인하고 생리적인 변화를 관찰하기도 하였다.²⁷⁾ 이입한 유전자의 크기의 제한 때문에 바이러스 벡터를 이용할 수 없거나 전달 효율이 낮아서 충분한 발현 효과를 볼 수 없는 경우에도 hydrodynamic injection을 이용하여 높은 발현을 유도하였다.²⁸⁾ 유전자 발현에 관여하는 DNA sequence 연구 분야에서는 promoter, enhancer, suppressor, insulator, intron 등의 활성을 실험동물에서 관찰하기 위해 특정 장기나 위치에 hydrodynamic injection을 통해 염기서열을 전달하기도 한다.²⁹⁾ 또한 비바이러스 벡터의 전달뿐만 아니라 바이러스의 유전체를 바이러스성 단백질의 관여 없이 전달함으로써 바이러스 관련 질환의 연구에도 응용하고 있다.³⁰⁾ 간에서의 높은 발현은 단백질 합성을 위한 장소로 적합하여 분비 단백질에 대한 유전자를 전달한 후, 혈액으로 분비되는 유전자 산물을 혈액에서 분리해 낼 수 있으며, 생산된 단백질은 박테리아 유래 재조합 단백질에 비해 접힘(folding)이나 당화(glycosylation)의 측면에서 장점이 있다.³¹⁾

Herpes virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk) 효소는 ganciclovir (GCV)를 삼중인산화 GCV (triphosphorylated GCV, GCV-TP)로 변형시킴으로써 유전자가 전달된 세포에서 특이적인 세포독성을 나타내어 유전자 치료 분야

에서 유용한 치료 유전자로 이용될 뿐만 아니라 비침습적 보고 유전자 관찰 시스템에서 보고 유전자로 이용되고 있다. HSV1-tk 효소의 보고 기질로 이용되는 다양한 뉴클레오시드 유사체들이 핵의학 영상을 위해 개발되고 있다. 5-(2-iodovinyl)-2'-deoxyuridine (IVDU)는 단순 헤르페스 바이러스 감염 치료에 효과적인 약물로 알려진 5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU)와 유사한 구조를 가진 uracil nucleoside 유도체로서,³²⁾ 세포 내로 이동하여 HSV1-tk 효소에 의해 인산화되어 세포 내에 축적됨으로써 HSV1-tk 효소를 발현하는 세포에 특이적인 유전자 발현 영상을 획득하는데 사용된다.³³⁾ 기 보고에 따르면,^{34,35)} IVDU는 간에서 섭취율이 낮아 간을 대상으로 하는 유전자 발현을 평가하는데 유용하게 사용될 수 있으며, HSV1-tk 효소에 의한 국소적인 섭취가 확인되어 보고 기질을 이용한 유전자 발현 영상화가 가능하다.

본 연구에서는 hydrodynamic-based procedure를 이용하여 마우스의 간으로 HSV1-tk 유전자와 녹색형광단백 유전자 (EGFP)가 이입된 naked pDNA를 각각 전달한 후, HSV1-tk 유전자 발현은 방사표지 IVDU를 이용한 핵의학 영상으로, EGFP 유전자 발현은 광학영상장비를 이용한 생체형광영상으로 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 기기 및 재료

실험에 이용한 벡터는 synthetic HSV1-tk 유전자를 가진 pMOD-tk (Invivogen, San Diego, CA)와 녹색형광유전자를 가진 pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA)을 구입하여 사용하였다. 각 벡터는 LB 액체배지 배양액으로부터 EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 마련하였다. 역전사효소 중합효소연쇄반응 (reverse transcriptase PCR, RT-PCR)은 One step RNA reagent (Bio Basic, Canada)와 Superscript III RT-PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 수행하였다.

$Na^{123}I$ 은 한국원자력의학원의 30 MeV 싸이클로트론으로, $Na^{124}I$ 은 한국원자력의학원의 50 MeV 싸이클로트론으로 생산한 것을 사용하였다. 고성능 액체크로마토그래피 (HPLC)는 미국 Waters사의 제품을 사용하였으며, 컬럼은 미국 Waters사의 μ -Bondapak C-18을 사용하였고, HPLC 후 분취를 위해 미국 Bio-rad사의 fraction collector (Model 2110)를 사용하였다. 흡광도 측정에는 Waters 486 absorbance detector를 사용하였고, 방사능 측정은 독일 Raytest사의 GABI RI detector를 이용하여 방사능을 계측

하였다.

방사능을 측정하기 위하여 우물 형태의 NaI crystal을 가진 미국 Wallac wizard사의 감마카운터를 사용하였으며, 생체형광영상은 미국 Xenogen사의 IVIS-200 모델을 사용하여 획득하였다. 핵의학 영상은 Trionix사의 XLT-20 기종을 사용하였다. 생체영상과 해부학적인 위치를 비교 평가하기 위하여 일본 Nakagawa Seisakusho사의 전신동결박절기 (wholebody autocyrotome)를 사용하였다. 실험동물은 20~22 g의 생후 6~8 주령의 암컷 BALB/c 마우스를 이용하여 20~26°C, 습도 40~60%, 12 시간 점·소등주기를 유지하며 사육한 후 실험에 사용하였다. 실험동물용 마취제는 Ketamine (ketalar hydrochloride, 50 mg/mL, 유한양행)과 Xylazine (Rompun hydrochloride, Bayer, German)을 사용하였다.

2. 방사표지 IVDU의 제조와 정제

이전에 보고된 IVDU의 제조방법을 이용하여 표지한 IVDU를 사용하였다.^{34,35)} 반응관에 5-(2-(Trimethylsilyl)vinyl)-2'-deoxyuridine (TMS-VDU)를 에탄올 5 mg/mL로 녹인 용액 50 μ L를 넣고, 1N HCl 수용액을 100 μ L 넣은 후에 $Na^{123}I$ 또는 $Na^{124}I$ 을 10~100 μ L의 용량으로 하여 370 MBq (10 mCi)를 넣고 산화제로 30% 과산화수소수 용액을 50 μ L 넣은 후 실온에서 15 분 간 반응하면서 3 분 간격으로 교반하여 반응을 유도하였다. 0.1 mL의 포화 $NaHSO_3$ 용액과 1 mL의 $NaHCO_3$ 용액으로 중화하여 반응을 종결하였다. 방사성 요오드가 표지된 5-(2-iodovinyl)-2'-deoxyuridine (IVDU)의 분리정제 및 표지수율의 평가는 고분해능 액체 크로마토그래피 (HPLC)법을 사용하였다. 컬럼은 μ -Bondapak C-18을 사용하였고, 전개용액은 acetonitrile(용매 A)과 증류수(용매 B)를 사용하였다. 전개액을 1 분에서 5 분은 A=10%, B=90%의 등속으로 전개하고, 5 분에서 10 분은 A=40%, B=60%, 10 분에서 25 분은 A=40%, B=60%, 25 분에서 30 분은 A=10%, B=90%의 구배로 전개하여 분리·정제하였다. 물질의 분석에는 254 nm에서 흡광도를 측정하고 방사선 측정 장치인 GABI RI detector를 이용하여 방사능을 계측하였다. HPLC를 이용하여 분리된 분획을 각각 1 mL씩 fraction collector로 분취하고 방사능이 나타나는 분획을 모아서 argon 기류 하에서 건조하고 생리식염수로 재건하여 다음 실험에 사용하였다.

3. 벡터 제조

pMOD-tk 벡터로부터 HSV1-tk 유전자를 제한효소 처리하여 분리한 후 녹색형광단백 (green fluorescence protein,

GFP) 유전자를 가진 pEGFP-N1 벡터에 이입 후 녹색형광 단백질 유전자를 제거하여 pHSV1-tk 벡터를 확립하였다. 방법은 HSV1-tk 유전자는 *Not I*과 *EcoRV* 제한효소를 이용하여 분리하였고, 분리한 HSV1-tk 유전자는 *Sma I* 제한효소를 처리한 pEGFP-N1 벡터에 T4 DNA 리가아제를 이용하여 이입하고 pEGFP/TK로 명명하였다. pEGFP/TK 벡터에서 녹색형광단백 유전자는 *Age I*과 *Not I* 제한효소 처리를 통해 제거하고, Klenow fragment 효소를 이용하여 말단을 평활화한 후, T4 DNA 접합효소로 원형 플라스미드 형태의 pHSV1-tk 벡터를 확립하였다. pEGFP-N1 벡터와 pHSV1-tk 벡터는 *E. coli* DH5a 균주에 형질전환을 통하여 이입하고 50 µg/mL의 Kanamycin이 함유된 LB 액체배지에서 배양한 후 EndoFree Plasmid Maxi Kit를 이용하여 제조사의 방법대로 플라스미드 DNA를 마련한 후 사용하기 전까지 -20°C에서 냉동보관하였다.

4. Hydrodynamic-based procedure를 이용한 생체 내 유전자 전달

Hydrodynamic injection을 위해 20~22 g의 BALB/c 암컷 마우스를 사용하였다. 각 개체 당 40 µg의 pDNA (pHSV1-tk 또는 pEGFP-N1)를 포함한 0.9% 생리식염수 2 mL을 27 G의 3 mL 주사기를 이용하여 꼬리정맥으로 약 5 초 동안 주사하였다. 마우스는 보정기를 이용하여 보정하고, 마취를 하지 않은 상태에서 시행하였다.

5. 역전사효소 중합효소연쇄반응을 이용한 유전자 발현 확인

Hydrodynamic-based procedure를 통한 유전자 발현을 확인하기 위하여 유전자를 전달한 마우스의 간 조직으로부터 역전사효소 중합효소연쇄반응 (RT-PCR)을 수행하였다. Hydrodynamic injection으로 pDNA를 전달한 후, 24 시간 뒤에 마우스를 희생하여 간을 적출하고 trizol reagent 방법을 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 추출한 전체 RNA는 Superscript III RT-PCR kit를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 50°C에서 50 분간 역전사 반응을 수행하여 first strand cDNA를 합성한 다음 94°C에서 5 분간 denaturation 반응 후 94°C 30 초, 55°C 30 초 그리고 72°C 60 초의 PCR 반응을 35회 수행하였다. RT-PCR에 사용한 β-actin 유전자의 프라이머는 5'-agg ctg tgc tgt ccc tgt atg c-3', 5'-acc caa gaa gga agg ctg gaa a-3', EGFP 유전자의 프라이머는 5'-ggc gac gta aac ggc cac aag t-3', 5'-cac gaa ctc cag cag gac cat g-3'이며, HSV1-tk 유전자의 프라이머는 5'-ctg acc ctg atc ttt gac ag-3', 5'-act gga ggt atc tca

cag tg-3'을 사용하였다. RT-PCR 수행 후 PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 2% TAE agarose gel에서 100 볼트 30분 동안 전기영동한 후 UV 하에서 밴드를 확인하였다.

6. 생체 분포

Hydrodynamic injection을 통해 유전자를 전달한 후 24 시간 뒤 370 KBq의 [¹²³I]IVDU를 마우스의 꼬리 정맥을 통해 주사하고 2 시간 후 마우스를 희생하여 생체분포를 수행하였다. 마우스를 희생한 뒤 혈액과 각 장기(간, 폐, 비장, 신장, 위, 소장, 대장, 갑상선, 근육, 뼈)를 적출하고 각각의 무게를 측정하고, 감마카운터를 이용하여 각 장기에 섭취된 방사능을 측정하고 투입된 방사능의 백분율(%injection dose, %ID)로 환산한 후 장기의 단위 무게 당 방사능(percentage of injection dose per gram of tissue, %ID/g)으로 환산하여 평가하였다.

7. 생체형광영상

형광영상을 위한 생체영상 촬영은 마우스를 희생하여 개복한 뒤 장기가 보이도록 한 상태에서 IVIS-200을 이용하여 영상을 획득하였다. Hydrodynamic injection 후 24 시간 뒤 마우스를 희생하여 개복한 뒤 복면에서 IVIS-200의 GFP excitation filter, GFP background excitation filter, GFP emission filter를 사용하여 각 1 초간 전신 영상을 획득하여 두 그룹간의 차이를 비교하였다. 전신 영상 획득 후 각 장기(비장, 심장, 폐, 간, 위, 신장, 소장, 대장)를 적출하여 나열한 상태로 전신 영상과 동일한 filter를 이용하여 각 1초간 영상을 획득하여 각 장기 별 관심영역을 설정하여 비교하였다. 영상 획득 후 영상 분석을 위해 Living Image® 2.50 (Xenogen, CA, USA)를 사용하였다.

8. 감마카메라영상

방사표지 IVDU 주사 30 분 전 2 mg/mL의 sodium perchlorate를 200 µL씩 경구투여와 복강 내 투여하여 생체 내에서 방사표지 IVDU로부터 유리된 ¹²³I이 갑상선과 위에 섭취되는 것을 억제하였다. 감마카메라 영상을 위해 7.4 MBq의 [¹²³I]IVDU를 마우스의 꼬리정맥을 통해 주사한 후 2 시간 뒤 감마카메라를 이용하여 20 분간 영상을 획득하였다.

9. 전신자가방사영상

전신조직절편은 이전에 보고된 방법에 따라 마련하였다.³⁶⁾ Hydrodynamic-based procedure를 통해 pEGFP-N1 과 pHSV1-tk를 각각 마우스에 전달한 후 24시간 뒤에 9.25

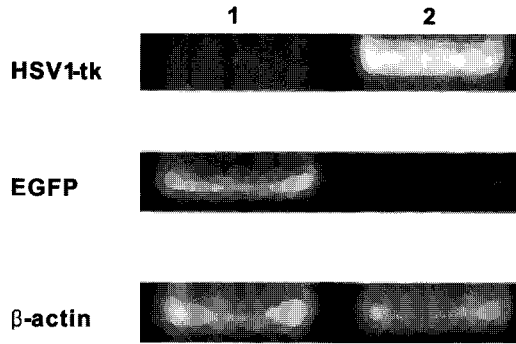


Figure 1. EGFP and HSV1-tk expression in liver of DNA transferred mice were confirmed by reverse transcriptase PCR. RT-PCR was accomplished from the livers of pHSV1-TK (lane 1) or pEGFP-N1 (lane 2) transferred mice. β-actin, as control, was 400 bp. EGFP was 613 bp, showed only in the liver of pEGFP-N1 transferred mice and HSV1-tk was 283 bp, showed in the liver of pHSV1-tk transferred mice.

MBq의 [¹²⁴I]IVDU를 마우스의 꼬리정맥을 통해 주사하고, 2 시간 뒤 희생하여 즉시 -80°에서 냉동하였다. 냉동한 마우스는 3% carboxymethyl cellulose로 포매한 후, 이를 아세톤과 드라이아이스를 이용하여 냉각된 용액에 담가 동결블록을 만들었다. 제작된 동결블록을 자동동결박절기를 이용하여 40 μm의 두께로 절삭 후 -20°C에서 건조하여 절편을 제작하였다. 절편을 획득하기 직전 디지털 카메라를 이용하여 절편에 대한 광학사진을 획득하여 후에 자가방사영상과 비교하였다. 각각의 얻어진 절편을 imaging plate에 24 시간 노출한 후 Fujix BAS 5000 system (Fuji Photo-Film, Tokyo, Japan)을 이용하여 자가방사영상을 얻고 Multi Gauge V3.0 프로그램을 이용하여 pseudocolor로 자가방사영상 정도를 나타내었다.

10. 통계처리

실험의 결과값은 평균값 ± 표준편차로 나타내었으며, 통계처리 방법은 unpaired student's t-test를 사용하여 *p* < 0.05로서 유의한 것으로 평가하였다

결 과

1. RT-PCR을 이용한 EGFP와 HSV1-tk의 발현 분석

Hydrodynamic-based procedure를 이용하여 pEGFP-N1 벡터와 pHSV1-tk 벡터를 각각 전달한 마우스에서 간을 적출하여 전체 RNA를 분리한 후 EGFP 프라이머와 HSV1-tk 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 각각 특이적인 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 1). β-actin의 PCR 산물은 400 bp로 모든 시료에서 동일하게 검출되었으며,

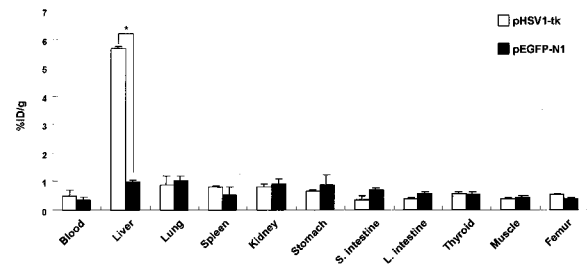


Figure 2. Biodistribution of (¹²³I)IVDU in pHSV1-tk and pEGFP-N1 transferred mice by hydrodynamic injection was performed at 2 hr post-injection of 370 KBq (10 μCi) of (¹²³I)IVDU. The liver in pHSV1-tk transferred group showed higher uptake than other organs in same group and all organs in pEGFP-N1 transferred group. *; *p*<0.05

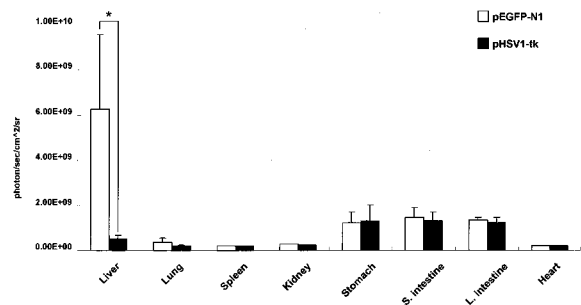


Figure 3. Fluorescence activities of the organs in pEGFP-N1 and pHSV1-tk transferred mice with hydrodynamic-based procedure were measured at 24 hr post-injection. Fluorescence activities were measured by Living image® 2.50. Fluorescence activities of the liver in pHSV1-tk transferred group were especially higher. A little higher activity in stomach, small intestine and large intestine were presumed as background activities. *; *p*<0.05.

EGFP의 PCR 산물은 613 bp, HSV1-tk의 PCR 산물은 283 bp의 밴드를 나타내었으며, 각 유전자를 포함한 pDNA를 전달한 실험군에서만 전달한 유전자의 특이적인 PCR 산물을 확인하여 전달한 naked pDNA가 간에서 발견되고 있음을 확인하였다.

2. 생체 분포

생체 분포를 위해 각 pDNA를 전달한 후 24 시간 뒤에 꼬리정맥을 통해 370 KBq의 [¹²³I]IVDU를 주사하고, 2 시간 후 마우스를 희생하여 혈액을 채취하고 각 장기를 적출하였다. 혈액과 각 장기 별로 조직 그램 당 주사량대비 섭취백분율(%ID/g)을 계산하였다(Fig. 2). pEGFP-N1 벡터를 전달한 마우스는 적출한 모든 장기에서 낮은 IVDU의 섭취를 보였으나(<1%ID/g), pHSV1-tk 벡터를 전달한 마우스는 장기 중 간에서 특이적으로 높은 IVDU의 섭취(5.65 ± 0.09%ID/g)를 보였으며, pEGFP-N1 벡터를 전달한 마우

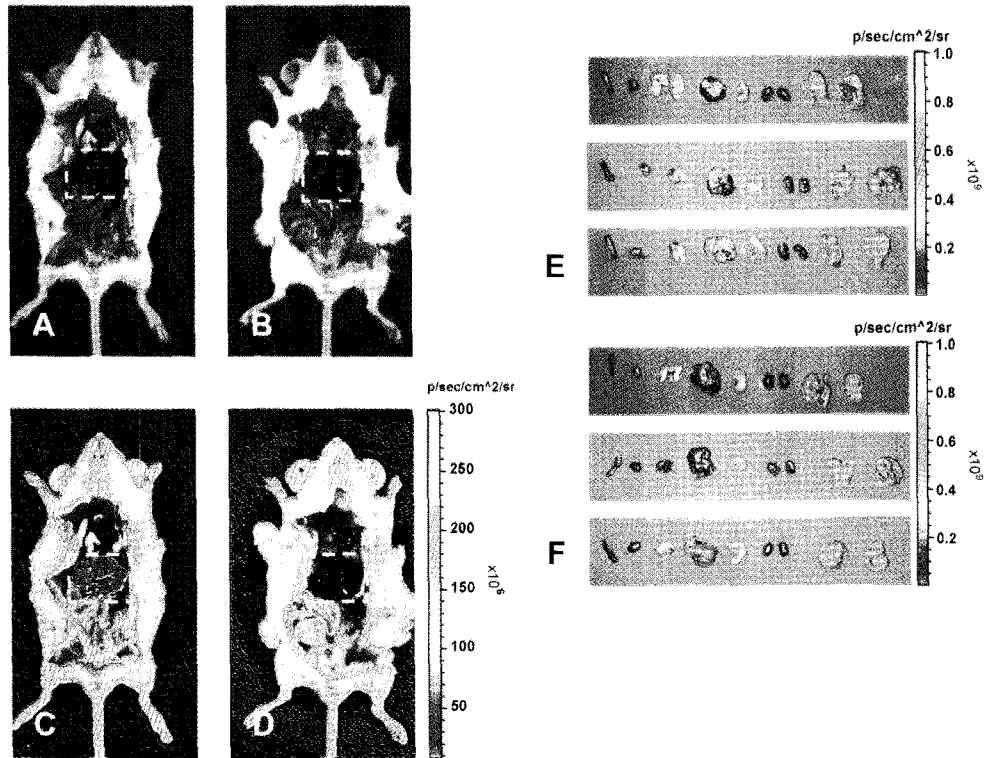


Figure 4. Fluorescence images of pEGFP-N1 and pHSV1-tk transferred mice with hydrodynamic-based procedure were acquired by IVIS-200. Photograph images were acquired before fluorescence imaging (A; pEGFP-N1 transferred mouse, B; pHSV1-tk transferred mouse). At 24 hr post-injection of each plasmid DNA, mice were sacrificed and fluorescence images were obtained in pEGFP-N1 (C) and pHSV1-tk (D) transferred mouse for 1 sec by IVIS-200. Dotted square indicated liver. After fluorescence imaging of mouse whole body, the organs were extracted (E; pEGFP-N1, F; pHSV1-tk). Fluorescence images of extracted organs were obtained for 1 sec by IVIS-200. Order: spleen, heart, lung, liver, stomach, kidney, small intestine, large intestine

스의 간($0.98 \pm 0.05\%ID/g$)과 유의한 차이를 나타내었고 ($p < 0.05$), 나머지 장기는 pEGFP-N1 벡터를 전달한 마우스의 장기와 큰 차이가 없었다.

3. 생체형광영상

형광영상은 각 벡터를 전달한 후 24 시간 뒤 마우스를 희생한 후 획득하였다. 희생한 후 즉시 회복하여 IVIS-200을 이용하여 전신 영상과 각 장기 별 영상을 1 초간 획득하였다. 전신 영상에서 pEGFP-N1 벡터를 전달한 마우스의 간에서는 형광 신호를 확인할 수 있었으며, pHSV1-tk 벡터를 전달한 마우스의 간에서는 형광신호가 나타나지 않았다(Fig. 4). 장기 별 영상에서도 전신 영상과 마찬가지로 pEGFP-N1 벡터를 전달한 마우스의 간에서 pHSV1-tk 벡터를 전달한 마우스의 간에 비해 유의하게 높은 형광 신호를 나타냈으며(Fig. 3, $6.29E+0.9 \pm 3.29E+09$ vs. $5.09E+0.8 \pm 1.70E+08$, $p < 0.05$), 간을 제외한 다른 장기에서도 형광 신호가 나타났으나, 두 실험군 간의 차이는 보이지 않았다

($p > 0.05$).

4. 감마카메라 영상

감마카메라 영상은 각 벡터를 전달 후 24 시간 뒤 꼬리정맥으로 7.4 MBq의 [^{123}I]IVDU를 주사한 후 2 시간 후 영상을 획득하였다(Fig. 5). pHSV1-tk 벡터를 전달한 마우스의 간에서 HSV1-tk에 의해 인산화된 [^{123}I]IVDU가 축적된 영상을 확인할 수 있었으나, pEGFP-N1 벡터를 전달한 마우스에서는 축적된 [^{123}I]IVDU에 의한 영상은 확인할 수 없었다. 신장을 통해 배출된 것으로 추정되는 [^{123}I]IVDU에 의해 두 그룹에서 모두 방광에서 집적된 영상을 볼 수 있었다.

5. 전신자가방사영상

pHSV1-tk 벡터와 pEGFP-N1 벡터를 전달한 마우스의 자가방사영상과 각 절편에 대한 광학사진을 비교하여 해부학적인 위치를 평가한 결과, [^{124}I]IVDU 주사 후 2 시간 뒤 자가방사영상에서 신장을 통한 배설로 인해 방광에서 나타

난 집적 외에 pHSV1-tk 벡터를 전달한 마우스의 간에서 국소적인 집적을 나타내었고, pEGFP-N1 벡터를 전달한 마우스의 장기에서는 특이적인 집적은 보이지 않았다(Fig. 6).

고찰

본 연구는 hydrodynamic-based procedure를 이용한 유전자 전달을 통해 간에서의 유전자 발현을 보고 유전자를 이용한 유전자 발현 영상 기법에 적용하여 확인하고 방사성동위원소로 표지한 uracil nucleoside 유도체인 IVDU를 보고 기질로 이용하여 HSV1-tk 효소 발현을 생체분포 및 영상을 통해 평가하고자 하였다.

Hydrodynamic-based procedure를 이용하여 전달된 유전자가 간특이적으로 발현하는 것을 역전사효소 증합효소 연쇄반응, 생체분포, 생체형광영상, 감마카메라 영상, 전신자가방사영상을 통해 확인할 수 있었다. 다만 생체형광영상에서 pHSV1-tk 벡터를 전달한 마우스의 장기에서도 형광신호가 나타났으나 각 장기 별 형광영상을 통해 pEGFP-N1 벡터를 전달한 마우스에서만 간에서 유의한 형광신호의 차이가 나타남을 확인할 수 있어 전달된 유전자와는 무관한 자가형광(autofluorescence)에 의한 비특이적인 신호로 추정되며, 피부나 털 등에서 나타난 형광신호도 자가형광으로 사료된다.

간으로 효과적이며 특이적으로 유전자를 전달하기 위해 다양한 방법이 제안되었고 시도되고 있다. 바이러스 벡터 중 아데노바이러스는 간에 대한 친화성을 보이기 때문에 정맥 주사를 통해 전달하게 되면 다른 장기에 비해 간에서 높은 발현을 보여 손쉽게 간으로 유전자를 전달할 수 있다.

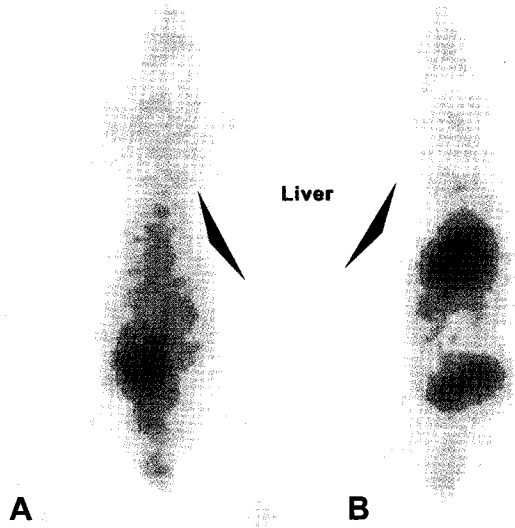


Figure 5. Gamma camera images of pEGFP-N1 and pHSV1-tk transferred mice by hydrodynamic injection were acquired at 2 hr post-injection of ^{123}I IVDU. After 24 hr of hydrodynamic-based procedure, images were obtained for 20 min in pEGFP-N1 (A) and pHSV1-tk (B) transferred mouse at 2 hr post-injection of 7.4 MBq (200 μCi) of ^{123}I IVDU. Radiolabeled IVDU was accumulated in the liver of pHSV1-tk transferred mouse.

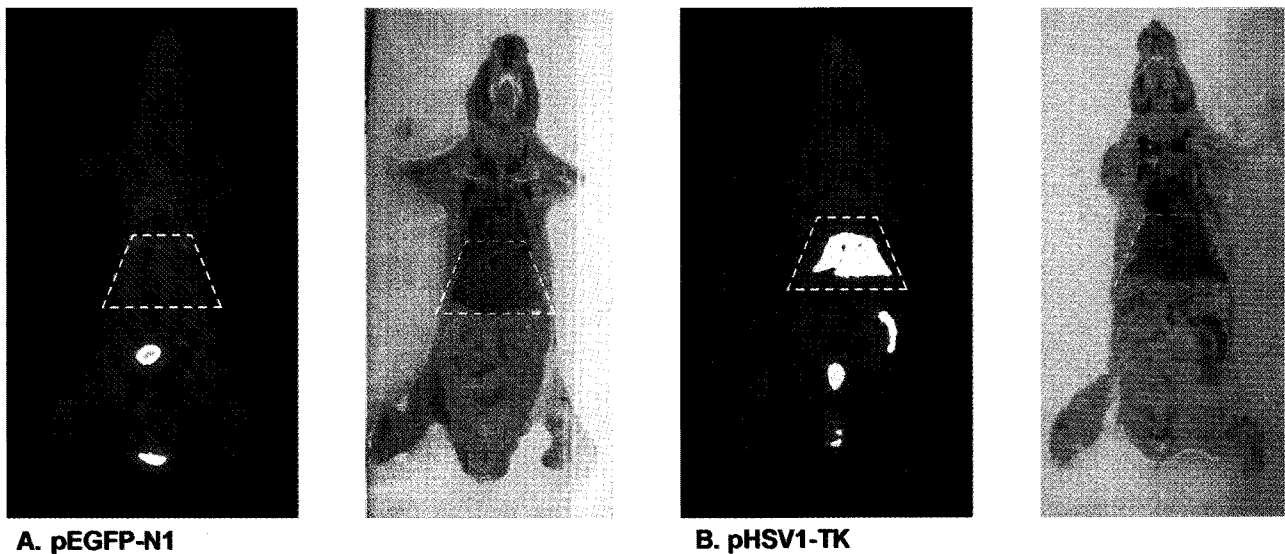


Figure 6. Digital wholebody autoradiography of pEGFP-N1 and pHSV1-tk transferred mice were performed 2 hr after injection of ^{124}I IVDU. At 2 hr post-injection of 7.4MBq (200 μCi) of ^{124}I IVDU, the mice were sacrificed and immediately deep frozen. The frozen mice were embedded in aqueous carboxymethyl cellulose gel. The sections of a given thickness (40 μm) were cut with cryomicrotome and were freeze-dried. The evaluation of the section was performed using Fuji BAS 5000 system. Specific activity was observed only in the liver of pHSV1-tk (B) transferred mouse but not in that of pEGFP-N1 transferred mouse (A). Dotted trapezoid indicated liver.

간은 신체 내에서 지질 대사를 담당하고 있으며 이러한 특성을 이용하여 지용성 약물 전달 방법을 차용하여 혈청 지방단백질(serum lipoprotein)을 이용한 유전자 전달이 시도되고 있다.³⁷⁾ 또한 간세포 표면에 많이 발현되어 있는 hepatic asialoglycoprotein receptor (ASGPR)를 표적으로 하는 항체, 단백질, 당 등을 비바이러스 벡터인 고분자중합체, 리포솜, 마이크로솜 등에 결합하여 유전자와 같이 전달하기도 한다.^{38,39)} 이러한 간특이적인 벡터의 전달은 준비과정이 복잡하고 생체 내 안정성의 문제를 가지고 있어 사용하기가 용이하지 않다.

유전자를 발현하고자 하는 장기에서 특이적으로 작동하는 프로모터를 이용하는 연구도 진행되고 있는데, 간에서 특이적으로 작동하는 프로모터로는 알부민, liver-type pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate kinase, human α 1-antitrypsin, liver-specific human apolipoprotein B100 등의 프로모터를 이용하여 간특이적인 발현도 보고되었다.^{40,41)} 그러나 간특이적인 프로모터 등은 간에서 특이적인 발현을 유도하지만 cytomegalovirus (CMV), long terminal repeat (LTR), simian virus-40 등 바이러스 유래 프로모터에 비해 전사효율이 낮은 단점이 있다.

Hydrodynamic-based procedure는 유전자 전달을 위한 간편한 방법으로, 특히 간에서의 높은 발현이 특징이다. 직접적인 간으로의 유전자 전달을 목적으로 하는 hydrodynamic injection 방법은 유전자 치료 분야에서 다양하게 이용된다. Hydrodynamic injection을 이용하여 DNA, RNA 뿐만 아니라 단백질, 고분자 화합물, 저분자 화합물까지 전달할 수 있고, 분자의 전하나 크기에 큰 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있으며, 현재 가장 널리 사용되는 분야는 DNA와 RNA의 전달이다. 따라서 간에서 결손된 유전자의 보충이나 이상 유전자의 억제를 이용한 유전자 치료 연구에 유용하게 이용될 수 있다. 그러나 아직까지 임상에 직접 적용하기에는 어려움이 있으며 현재 마우스, 랫 등의 소동물과 돼지 등에서 장기간 유전자의 발현을 유도하기 위한 연구들이 진행 중이다.⁴²⁾

보고 유전자를 이용한 분자영상기법은 전달된 벡터의 발현 위치를 확인하고 전달된 유전자의 발현이나 그에 따른 신호전달 기작의 영상화, 그리고 보고유전자와 연결되어 발현되는 다른 유전자를 추적관찰하고 정량적으로 평가할 수 있다. 따라서 적절한 보고유전자와 그에 따른 보고기질 또는 탐침자를 이용하면 도입한 유전자의 비침습적 영상을 확인할 수 있다. 특히, HSV1-tk와 nucleoside 유도체를 이용한 방법에서는 HSV1-tk 효소에 의해 선택적으로 보고기질이 전환되어 유전자가 이입된 세포에만 특이적으로 보고

기질이 축적됨으로 대상특이적인 영상을 획득할 수 있다.^{34,35)}

HSV1-tk의 보고기질로 이용되는 nucleoside 유도체는 크게 두 가지로 나뉘는데, 하나는 FMAU, FIAU, FIRU, IVDU, IVFAU, IVFRU 등 uracil nucleoside 유도체이며, 다른 하나는 FPCV, FHPG, FHBG 등 acycloguanosine 유도체이다. 많은 연구에 따르면, uracil nucleoside 유도체들은 acycloguanosine 유도체에 비해 HSV1-tk에 대한 친화력이 높으며, 신장을 통해 배출되기 때문에 간으로 배출되어 장과 다른 장기에 흡수되는 FHBG 등과 같은 acycloguanosine 유도체에 비해 간에서 보고유전자에 의한 영상을 획득하는데 보다 유리하다.⁴³⁾ 본 연구의 자가방사영상(Fig. 6)에서도 기존의 보고처럼 방사표지 IVDU의 주요 대사 배출경로가 신장이므로 대부분의 장기 및 조직에 있어서 HSV1-tk 유전자 발현 확인을 위한 핵의학 영상용 보고기질로 IVDU를 사용할 수 있는 것으로 확인되었다. uracil nucleoside 유도체들은 ¹⁸F의 방사성요오드로 표지하기 때문에 ¹²³I를 이용한 SPECT 영상, 그리고 ¹²⁴I를 이용한 PET 영상 또한 가능하다. 하지만 인간을 대상으로 한 실험에서는 FHBG의 장 배출이 크게 높지 않은 것으로 나타나 추후 좀 더 많은 연구가 필요하다.⁴⁴⁾

전통적으로 사람 또는 실험동물에게서 내부 유전자의 발현을 측정하는 것은 생검이나 동물을 희생한 후 얻어진 조직으로부터 mRNA의 양 또는 단백질의 양을 측정하는 등의 방법을 통해 가능하였다. 그러나 분자영상기법을 이용하면 목적 유전자와 보고 유전자의 동시발현, 또는 결합된 형태로 발현하였을 때 보고 유전자의 발현 정도를 통해 목적하는 유전자의 발현 정도를 가늠할 수 있게 되었다. 따라서 보고 유전자와 목적 유전자를 안정적으로 발현하고 제어할 수 있다면, 비침습적으로 목적 유전자의 발현 정도를 일정하고 반복적으로 측정할 수 있을 것이다. Gambhir 등⁴⁵⁾은 cytomegalovirus (CMV) 프로모터와 encephalomyocarditis virus (EMCV) internal ribosomal entry site (IRES)를 이용하여 renilla luciferase와 HSV1-sr39tk를 동시에 발현하는 벡터를 이입한 C6 세포를 사용한 시험관 내 실험에서 renilla luciferase와 HSV1-sr39tk의 발현의 상관관계가 매우 높음($r^2 > 0.99$)을 증명하였다.

방사성 핵종을 이용한 영상법은 매우 민감하므로 유전자 산물의 발현량의 소량을 탐지하는데 유용하다. PET과 SPECT, γ -camera 등과 같은 핵의학영상은 미량의 방사성 핵종에 대한 민감도가 높아 이러한 목적에 부합한다.

다양한 연구결과에서 uracil nucleoside 유도체가 HSV1-tk 유전자를 발현하는 세포 주에서 특이적으로 집적되는 것으로 보고하였으며, 이는 IVDU를 이용한 HSV1-tk 유전자

발현 평가와 영상화가 유용하게 이용될 수 있음을 나타낸다. HSV1-tk 이입 세포 주를 이용한 IVDU의 섭취량 내 섭취를 평가에서 유전자의 발현과 보고 기질인 IVDU의 섭취량 간의 상관관계가 직선을 나타내는 것으로 보고되었으며, 이는 유전자 발현량 평가에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.^{34,35)}

본 연구를 통해 hydrodynamic-based procedure를 이용한 유전자 전달은 간에서 특이적으로 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 생체 분포 결과, 이입한 HSV1-tk 유전자의 발현이 간에서만 나타나는 간 특이적인 유전자 전달 현상을 확인할 수 있었으며, 이는 유전자 발현 영상 기법과 생체분포 결과가 서로 일치함을 보여주었다. 따라서, 보고 유전자와 목적 유전자를 동시에 발현하는 안정적인 유전자 발현 시스템에 기반한 hydrodynamic-based procedure에 의한 유전자 전달은 목적 유전자의 발현을 영상화 할 수 있을 뿐만 아니라 목적 유전자 발현량의 평가에도 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

목적: Hydrodynamic-based procedure는 손쉽고 간편한 비바이러스성 유전자 전달 방법으로 특히 간 특이적으로 발현하는 특징을 가진다. 단순 헤르페스 바이러스 제 1 형 티미딘 키나제(herpes simplex virus type 1 thymidine kinase, HSV1-tk)와 다양한 기질을 이용한 비침습적 HSV1-tk 유전자 영상시스템이 널리 연구되어왔다. 본 연구에서는 HSV1-tk 유전자를 hydrodynamic-based procedure를 이용하여 전달한 후, HSV1-tk의 보고 기질로 알려진 5-(2-iodovinyl)-2'-deoxyuridine (IVDU)을 이용하여 간 특이적인 HSV1-tk 유전자 발현 영상을 획득하고자 하였다. **대상 및 방법:** HSV1-tk 유전자와 녹색형광유전자를 가진 각 플라스미드 벡터를 마우스에 hydrodynamic injection을 통해 전달하고, 24 시간 뒤 유전자의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR, 생체형광영상, 핵의학영상, 전신자가방사영상 그리고 생체분포를 시행하였다. **결과:** 각 플라스미드 벡터를 전달한 간으로부터 추출한 전체 RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과, 각각 HSV1-tk 유전자와 녹색형광단백 유전자의 특이적인 밴드를 관찰할 수 있었다. 생체 분포 결과, pHSV1-tk 벡터를 전달한 마우스의 간에서 특이적인 [¹²³I]IVDU의 섭취를 보였다. 생체형광영상에서는 pEGFP-N1 벡터를 전달한 마우스의 간에서는 유의한 형광신호를 나타내었다. 전신자가방사영상과 감마카메라 영상에서 pHSV1-tk 벡터를 전달한 마우스의 간에서 방사표지 IVDU

가 국소적으로 집적되는 것을 확인하였다. **결론:** 본 연구에서 hydrodynamic-based procedure는 간 특이적으로 플라스미드 DNA를 전달하는데 효과적이며 전달된 유전자의 발현을 분자영상학적인 방법으로 확인하였다. 따라서 Hydrodynamic injection을 통해 HSV1-tk 유전자와 목적 유전자의 공동발현은 방사표지 IVDU에 의해 목적 유전자의 발현을 정량평가하는데 유용할 것으로 기대된다.

References

1. Miller AD. Human gene therapy comes of age. *Nature* 1992;357:455-60.
2. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-78.
3. Freeman SM, Whartenby KA, Freeman JL, Abboud CN, Marrogi AJ. In situ use of suicide genes for cancer therapy. *Semin Oncol* 1996;23:31-45.
4. Kang JH. Introduction to basic molecular biologic techniques for molecular imaging researches. *Nucl Med Mol Imaging* 2004;38:115-20.
5. Guha C, Roy-Chowdhury N, Jauregui H, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte-based gene therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:51-7.
6. Ferry N. Gene therapy and liver diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 2003;27:288-90.
7. Ilan Y, Saito H, Thummala NR, Chowdhury NR. Adenovirus-mediated gene therapy of liver diseases. *Semin Liver Dis* 1999;19:49-59.
8. Kalpana GV. Retroviral vectors for liver-directed gene therapy. *Semin Liver Dis* 1999;19:27-37.
9. Follenzi A, Battaglia M, Lombardo A, Annoni A, Roncarolo MG, Naldini L. Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. *Blood* 2004;103:3700-9.
10. Wang L, Calcedo R, Nichols TC, Bellingr DA, Dillow A, Verma IM, et al. Sustained correction of disease in naive and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8-mediated, liver-directed gene therapy. *Blood* 2005;105:3079-86.
11. Nakai H, Montini E, Fuess S, Storm TA, Meuse L, Finegold M, et al. Helper-independent and AAV-ITR-independent chromosomal integration of double-stranded linear DNA vectors in mice. *Mol Ther* 2003;7:101-11.
12. Mikkelsen JG, Yant SR, Meuse L, Huang Z, Xu H, Kay MA. Helper-Independent *Sleeping Beauty* transposon-transposase vectors for efficient nonviral gene delivery and persistent gene expression in vivo. *Mol Ther* 2003;8:654-65.
13. Ehrhardt A, Xu H, Huang Z, Engler JA, Kay MA. A direct comparison of two nonviral gene therapy vectors for somatic integration: in vivo evaluation of the bacteriophage integrase phiC31 and the *Sleeping Beauty* transposase. *Mol Ther* 2005;11:695-706.
14. Herweijer H, Wolff JA. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* 2003;10:453-8.
15. Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects:

- nonviral vectors. *Gene Ther* 2002;9:1647-52.
16. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247:1465-8.
 17. Lawrie A, Briskin AF, Francis SE, Cumberland DC, Crossman DC, Newman CM. Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery. *Gene Ther* 2000;7:2023-7.
 18. Lin MT, Pulkkinen L, Uitto J, Yoon K. The gene gun: current applications in cutaneous gene therapy. *Int J Dermatol* 2000;39:161-70.
 19. Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat Biotechnol* 1998;16:867-70.
 20. Zhang G, Song YK, Liu D. Long-term expression of human alpha1-antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure. *Gene Ther* 2000;7:1344-9.
 21. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999;6:1258-66.
 22. Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1999;10:1735-7.
 23. Culver KW, Blaese RM. Gene therapy for cancer. *Trends Genet* 1994;10:174-8.
 24. Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ, Nutt SL. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol* 2004;172:2048-58.
 25. Dagnaes-Hansen F, Holst HU, Søndergaard M, Vorup-Jensen T, Flyvbjerg A, Jensen UB, et al. Physiological effects of human growth hormone produced after hydrodynamic gene transfer of a plasmid vector containing the human ubiquitin promoter. *J Mol Med* 2002;80:665-70.
 26. He CX, Shi D, Wu WJ, Ding YF, Feng DM, Lu B, et al. Insulin expression in livers of diabetic mice mediated by hydrodynamics-based administration. *World J Gastroenterol* 2004;10:567-72.
 27. Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 2002;32:107-8.
 28. Magin-Lachmann C, Kotzamanis G, D'Aiuto L, Cooke H, Huxley C, Wagner E. In vitro and in vivo delivery of intact BAC DNA-comparison of different methods. *J Gene Med* 2004;6:195-209.
 29. Aliño SF, Crespo A, Dasí F. Long-term therapeutic levels of human alpha-1 antitrypsin in plasma after hydrodynamic injection of nonviral DNA. *Gene Ther* 2003;10:1672-9.
 30. Cui FD, Asada H, Kishida T, Itokawa Y, Nakaya T, Ueda Y, et al. Intravascular naked DNA vaccine encoding glycoprotein B induces protective humoral and cellular immunity against herpes simplex virus type 1 infection in mice. *Gene Ther* 2003;10:2059-66.
 31. Al-Dosari MS, Knapp JE, Liu D. Hydrodynamic delivery. *Adv Genet* 2005;54:65-82.
 32. De Clercq E, Descamps J, Balzarini J, Fukui T, Allaudeen HS. Antiviral activity of the 3'-amino derivative of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Biochem J* 1983;211:439-45.
 33. Balzarini J, Morin KW, Knaus EE, Wiebe LI, De Clercq E. Novel (E)-5-(2-iodovinyl)-2'-deoxyuridine derivatives as potential cytostatic agents against herpes simplex virus thymidine kinase gene transfected tumors. *Gene Ther* 1995;2:317-22.
 34. Choi TH, Ahn SH, Kwon HC, Choi CW, Awh OD, Lim SM. In vivo comparison of IVDU and IVERU in HSV1-TK gene expressing tumor bearing rats. *Appl Radiat Isot* 2004;60:15-21.
 35. Lee TS, Choi TH, Ahn SH, Woo KS, Jung WS, Kwon HC, et al. In vitro uptakes of radiolabeled IVDU and IVERU in herpes simplex virus type-1 thymidine kinase(HSV1-tk) gene transduced morris hepatoma cell line. *Nucl Med Mol Imaging* 2004;38:62-73.
 36. Maas J, Binder R, Steinke W. Quantitative whole-body autoradiography: recommendations for the standardization of the method. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000;31:S15-21.
 37. de Smidt PC, van Berkel TJ. LDL-mediated drug targeting. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1990;7:99-120.
 38. Kim EM, Jeong HJ, Park IK, Cho CS, Kim CG, Bom HS. Hepatocyte-targeted nuclear imaging using ^{99m}Tc-galactosylated-chitosan: conjugation, targeting, and biodistribution. *J Nucl Med* 2005;46:141-5.
 39. Watanabe T, Umehara T, Yasui F, Nakagawa S, Yano J, Ohgi T, et al. Liver target delivery of small interfering RNA to the HCV gene by lactosylated cationic liposome. *J Hepatol* 2007;47:744-50.
 40. Walther W, Stein U. Cell type specific and inducible promoters for vectors in gene therapy as an approach for cell targeting. *J Mol Med* 1996;74:379-92.
 41. Park CW, Park YM, Lee GT, Lee Y, Woo S, Cha JY, et al. Targeting of therapeutic gene expression to the liver by using liver-type pyruvate kinase proximal promoter and the SV40 viral enhancer active in multiple cell types. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:131-7.
 42. Kamimura K, Suda T, Xu W, Zhang G, Liu D. Image-guided, lobe-specific hydrodynamic gene delivery to swine liver. *Mol Ther* 2009;17:491-9.
 43. Chae MJ, Lee TS, Kim JY, Woo GS, Jung WS, Chun KS, et al. Small animal PET imaging with [¹²⁴I]FIAU for herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene expression in a hepatoma model. *Nucl Med Mol Imaging* 2008;42:235-45.
 44. Yaghoubi SS, Gambhir SS. PET imaging of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk) or mutant HSV1-sr39tk reporter gene expression in mice and humans using [¹⁸F]FHBG. *Nat Protoc* 2006;1:3069-75.
 45. Wang Y, Iyer M, Annala AJ, Chappell S, Mauro V, Gambhir SS. Noninvasive monitoring of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals using improved bicistronic vectors. *J Nucl Med* 2005;46:667-74.