

조직 배양 모형에서 정상 구강 점막 상피에 대한 국소 유전자 요법

김태환¹ · 광명호¹ · 이춘호¹ · 박준우¹ · 박영욱² · 김성곤¹

¹한림대학교 의과대학 치과학교실, ²강릉원주대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

TOPICAL GENE DELIVERY TO NORMAL ORAL EPITHELIUM USING ADENOVIRUS IN ORGAN CULTURE MODEL

Tae-Hwan Kim¹, Myung-Ho Kwak¹, Choon-Ho Lee¹, Jun-Woo Park¹, Young-Wook Park², Seong-Gon Kim¹

¹School of Dentistry, College of Medicine, Hallym University

²Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kangnung-Wonju National University

Background: Though it is clear that many types of viruses can infect the oral mucosa, its condition for infection is unclear. The purpose of this study was to analyze the conditions for viral infection of normal oral mucosa and explore the possibility of topical gene therapy to oral mucosa using a viral vector.

Methods: Freshly taken fragments of the palate and the tongue of mice were used for organ culture. The specimens were exposed to green fluorescent protein (GFP)-adenoviral vector for 1 hour except for the control. Initial viral titer was 6.3×10^{11} pfu/ml and the virus was diluted to working concentrations. The dilution ratio was 1:1,000 (6.3×10^8 pfu/ml), 1:10,000 (6.3×10^7 pfu/ml), and 1:100,000 (6.3×10^6 pfu/ml). They were then cultured on a stainless steel wire mesh in an organ culture dish. The specimens were stereoscopically examined every 24 hours for 6 days, after which they were fixed and analyzed through immunohistochemical methods.

Results: There was no visible expression in the control, 6.3×10^6 pfu/ml, and 6.3×10^7 pfu/ml groups. Initial expression was observed at 24 hours after infection in both the palate and the tongue in 6.3×10^8 pfu/ml and the expression significantly increased until 3 days in the palate and 2 days in the tongue after infection ($P < 0.05$). In both groups, the expression was mostly observed at the resection margin. Immunohistochemical studies showed that the epithelial cells were positive to GFP.

Conclusion: The present study showed that topically applied adenovirus containing specific genetic information of GFP could successfully transduce GFP in normal oral epithelial cells at the resection margin in organ culture in terms of dose and exposure time.

Key words: Viral infection, GFP, Adenovirus

I. 서 론

구강 내에서 바이러스에 의한 감염증은 면역 기능이 떨어지는 환자에서 흔히 관찰된다. 예를 들면 헤르페스성 구순염의 경우 구강 내 점막 질환 중에서 두 번째로 흔한 질환이며 herpes simplex virus의 감염에 의하여 질환이 유발된

다¹⁾. 헤르페스성 궤양의 경우 구순 뿐 아니라 치은, 혀 및 경구개에서도 관찰된다²⁾. 인간 유두종 바이러스에 의한 감염도 구강 내에서 흔히 관찰되며 구강 내에서 발생하는 일부 양성 종양이나 악성 종양이 이 바이러스에 의한 감염증과 연관이 되어있다³⁻⁵⁾. 비록 많은 종류의 바이러스들이 구강 내 점막을 공격한다는 것은 임상적으로 명백하나 어떠한

조건에서 바이러스가 쉽게 감염되는지에 대하여는 아직 분명히 알려져 있지 않다. 이는 국소 도포법을 이용한 유전자 치료법의 개발에서도 중요한 문제가 될 수 있는데, 그 이유는 유전자 치료법 중에서 가장 효율이 높은 방법이 바이러스 벡터를 이용한 유전자 전달법이기 때문이다.

아데노바이러스 (adenovirus)는 DNA 바이러스로서 이는 비인두 부위 감염과 연관이 되어 있다⁶⁾. 비록 아데노바이러스에 의한 구강 점막의 감염은 거의 보고되어있지 않으나 이 바이러스는 유전자 치료법에서 가장 많이 사용되고 있는 벡터 중의 하나이다. 따라서 다양한 조건 하에 아데노바이러스 벡터에 표적 유전자를 실어서 구강 점막에 보내어 본다면 표적 유전자의 발현량을 조사함으로써 어떠한 조건에서 아데노바이러스가 구강 내 점막에 많이 침투하는 지를 알아볼 수 있다. Green fluorescent protein (GFP)의 유전자는 가장 흔히 사용되는 표적유전자의 일종으로 바이러스의 전파를 효과적으로 관찰할 수 있는 방법을 제공하고 있다⁷⁾.

본 연구의 목적은 다음과 같다. 첫째는 구강 내 조직의 종류에 따라서 아데노바이러스에 의한 유전자 전달 효율에 차이가 있는 지를 알아보려고 하였다. 둘째로 시간에 따른 유전자 발현의 변화를 관찰하고자 하였다. 이를 통하여 정상 구강 점막에 아데노바이러스 벡터를 이용한 유전자 치료법을 시행하고자 하는 경우 초기에 얼마만큼의 양을 투여하여야 하고, 투여된 유전자는 몇 시간이 지나서 발현이 시작되며, 얼마만큼 시간이 경과된 후에 최대 발현량에 도달하는 지를 조사하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 조직 배양 시편의 준비

본 실험의 프로토콜은 미국의 필라델피아 어린이병원의 동물실험 윤리위원회의 심사를 거쳐서 시행이 되었고, 실험에 이용된 백서는 국제 동물실험 윤리의 기준에 따라서 인도적인 방법으로 희생되었다. 백서를 희생시키고 얻어진 구개부 절편과 혀의 절편은 점차적으로 농도를 높인 포비돈액에 의하여 소독을 시행하였다. 조직 시편의 소독 후에 샘플을 적당한 크기로 절제한 다음에 nitrocellulose membrane (Millipore, Billeria, MA)에 샘플을 부착시켰다. 대조군은 같은 조건에서 조직배양을 한 시편으로 단지 바이러스에만 노출을 시키지 않았다. 부착된 시편을 GFP-adenoviral vector (Fig. 1)에 한 시간 노출시켰다. University of Pennsylvania에서 처음 받은 바이러스 농도는 6.3×10^{11} pfu/ml였고 이를 1:1,000, 1:10,000, 및 1:100,000으로 희석하여 사용하였다. 부착된 시편은 stainless steel wire mesh 위에 올려진 다음에 organ culture dishes

(Felcon, San Jose, CA)에서 배양되었고 배양액은 DMEM/F-12 with L-glutamine, 15 mM HEPES buffer와 pyridoxine hydrochloride (#11330-032, Gibco, Carlsbad, CA), antibiotics (#15240-062, Gibco) 및 ascorbic acid로 구성되었다. Fetal bovine serum (Atlanta biologicals, Lawrenceville, GA)의 농도는 10%였다. 시편은 총 6일간 관찰되었고 관찰은 매 24시간마다 시행하였다. 배양액은 매일 교환하여 주었고 시편의 사진은 fluorescent stereoscopic microscope (Leica MZ 16FA, Wetzlar, Germany)를 이용하여 촬영되었다. 실험은 같은 조건에서 3회 반복하여 시행하였고 GFP의 발현 정도는 영상 분석 프로그램인 SigmaScan Pro 5.0 (SPSS science, Chicago, IL)을 이용하여 분석하였다. GFP의 발현 정도는 발현이 전혀 없는 0에서 최대 발현되는 경우 255로 정하여 분석하였다. 전체 영역에서 녹색빛의 발현 정도를 평균을 내었으며 각각의 관측 시점에서 발현되는 정도와 대조군과의 차이를 paired sample t-test를 이용하여 분석하였고 유의수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

2. 면역조직화학법

면역 조직 화학법을 위하여 GFP에 대한 항체를 Molecular Probe (Eugene, OR, USA)로부터 구매하였고 희석 비율은 1:100으로 하였다. 면역 조직 화학법을 위한 시편의 두께는 4 μ m로 준비하였다. 면역 조직 화학법의 구체적인 방법은 이전에 출간된 논문을 참고로 하였다^{8,9)}. GFP의 검출을 위하여 슬라이드를 먼저 trypsin으로 처리하였다. 면역 조직 화학법은 Universal LSAB[®]+ Kits (Dako, Glostrup, Denmark)를 이용하여 시행하였고 염색법은 제조사의 설명서에 따라서 시행하였다. 면역 조직 화학법으로 처리한 시편의 역염색은 Mayer's hematoxylin으로 시행하였다.

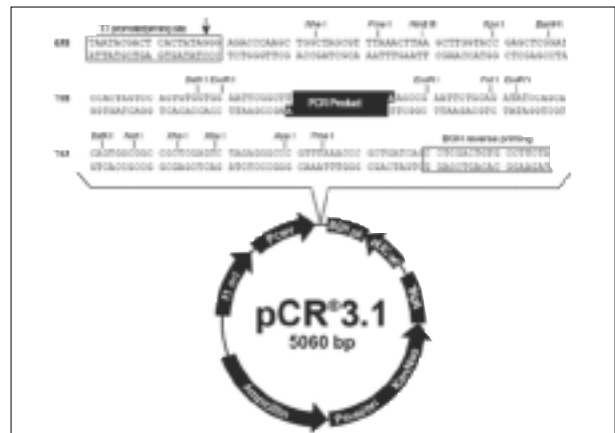


Fig. 1. Adenoviral vector. The circular plasmid had CMV promoter and GFP gene was inserted into the site indicated as PCR product (dark box).

III. 연구 결과

결과를 살펴보면 초기의 바이러스 농도가 구강 점막 감염에 중요하다는 것을 알 수 있었다. 대조군과 6.3×10^6 pfu/ml 및 6.3×10^7 pfu/ml로 처리한 시편에서는 바이러스 처리 후에 6일까지 육안으로 식별할 수 있는 GFP의 발현은 관찰되지 않았다. 6.3×10^8 pfu/ml로 처리한 군의 GFP 발현은 Fig. 1에 보여지는 바와 같다. GFP의 발현이 처음 관찰되는 시점은 구개부와 혀의 조직 모두에서 감염 후 24시간이 경과된 후에 관찰된다. 구개부 시편에서 발현 정도는 11.06 ± 0.11 (Fig. 2, 3A)였고 혀에서 발현되는 정도는 11.30 ± 0.95 이었다 (Fig. 2, 3B). 감염 후 2일이 경과된 상태에서 GFP의 발현은 두 시편 모두에서 다소 증가된 상태로 구개부 시편에서는 21.52 ± 0.81 (Fig. 2, 3C)이었고 혀에서는 18.03 ± 2.96 (Fig. 2, 3D)이었다. 양 집단에서 GFP의 발현 정도를 감염 후 1일과 비교하면 통

계적으로 유의한 수준으로 증가되었다 ($P < 0.05$). 감염 후 3일이 경과된 상태에서 구개부 시편에서 GFP의 발현은 25.32 ± 1.23 (Fig. 2, 3E)이었고 이를 2일째 GFP의 발현량과 비교하면 역시 통계적으로 유의할만한 수준으로 증가되었다 ($P < 0.05$). 혀의 조직에서 GFP의 발현은 3일째에 18.17 ± 3.16 로 약간 증가되었으나 2일째 발현량과 비교할 경우 그 차이가 통계적으로 유의하지는 않았다. 4일 이후의 GFP 발현량은 두 집단 모두에서 통계적으로 유의할만큼 증가하지는 않았다 (Fig. 2). 두 집단 모두에서 GFP가 발현되는 부위는 외과적 절제면에 국한되었다 (Fig. 3). 조직을 검자로 잡기 위하여 형성된 외상성 궤양 부위에도 GFP의 발현이 관찰되었다 (Fig. 3F). 치아 주위에 위치하고 있는 치은 상피 일부에서도 GFP의 발현이 관찰되었다 (Fig. 3G). GFP의 발현을 면역 조직 화학법으로 조사한 결과 GFP의 항체에 결합하여 양성 반응을 보이는 세포들은 모두 상피세포들이었다 (Fig. 4)

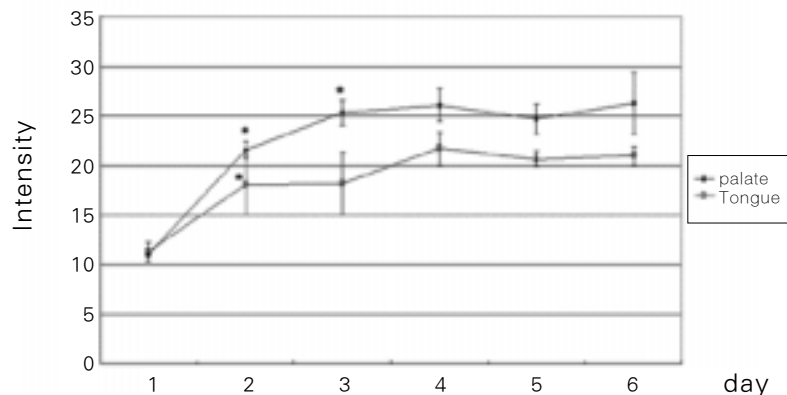


Fig. 2. The expression level of green fluorescent protein at each observation point. The working concentration was 6.3×10^8 pfu/ml of adenovirus and an asterisk (*) denotes that the expression level was significantly increased compared to immediately previous observation ($P < 0.05$).

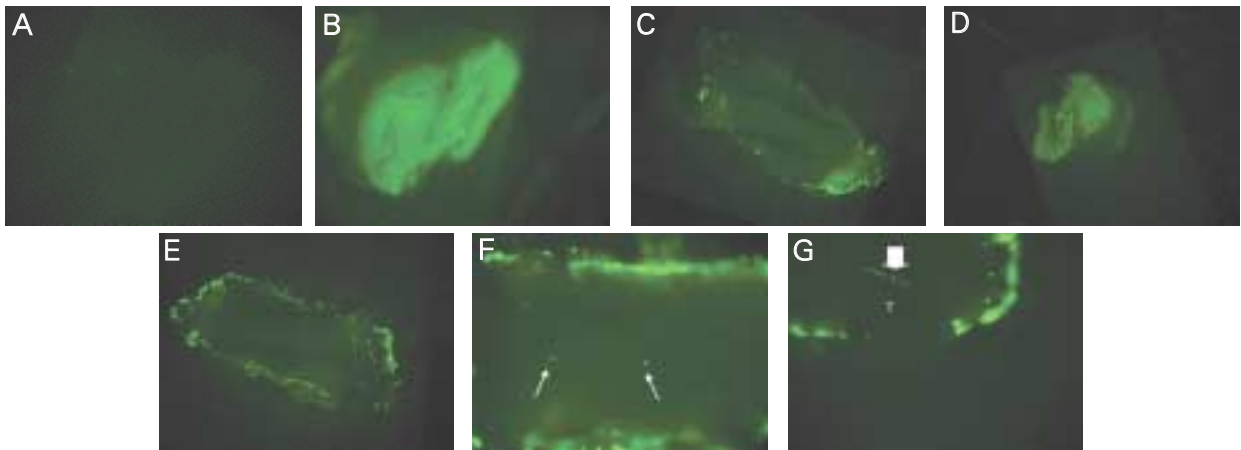


Fig. 3. Stereoscopic view. A. 1 day of the palate, B. 1 day of the tongue, C. 2 days of the palate, D. 2 days of the tongue, E. 3 days of the palate. F. 6 days of the palate. The arrows indicate GFP expression in the tissue forceps induced ulcer. G. 4 days of the palate. The gingiva around the teeth (T) expressed GFP (arrow).

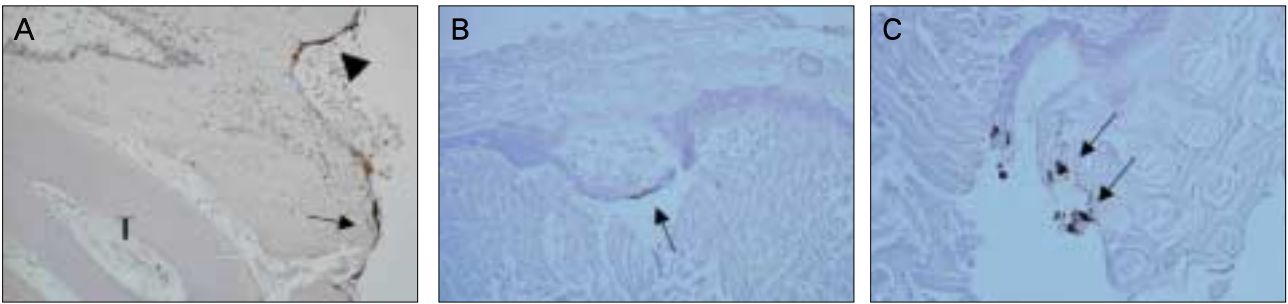


Fig. 4. Immunohistochemical view. All samples were prepared at 6 days after infection. A. The palate (original magnification $\times 100$). The gingiva (arrow) around the teeth (T) was GFP-positive. The resection margin was also GFP-positive (arrowhead). B. The tongue (original magnification $\times 40$). The ulcer area was shown to GFP-positive (arrow). C. The tongue (original magnification $\times 200$). The epithelial cells in the resection margin were GFP-positive (arrows).

IV. 총괄 및 고찰

본 연구에서 구강 점막을 통한 바이러스의 감염은 바이러스의 농도, 바이러스에 노출된 시간 및 조직의 상태에 의하여 영향을 받음을 알 수 있었다. 구강 점막 상피세포에 유전자를 전달할 목적으로 아데노바이러스를 사용한다면 최소한 6.3×10^8 pfu/ml 이상 농도의 아데노바이러스가 필요함을 알 수 있었다. 아데노바이러스를 이용한 유전자 치료법의 경우 유전자 전달이 처음 24시간이 경과된 후에 관찰이 되고 이는 72시간 후에 최대 발현량을 보인다고 보고되어 있다^{10,11}. 본 연구에서는 구개부 점막의 경우 72시간에 GFP의 발현이 최대한으로 증가되었지만 혀의 경우에는 96시간이 경과된 상태에서 최대 발현을 보였다 (Fig. 2).

Clayman 등은 정상 구강점막 상피세포에 국소적으로 1×10^{10} pfu/mL의 아데노 바이러스를 1분간 노출시키는 경우 유전자 전달에 실패하였다고 보고한 바 있다¹². 그러나 본 연구에서는 정상 구강 점막에 6.3×10^8 pfu/ml의 농도로 아데노바이러스를 이용한 유전자 전달에 성공하였다 (Fig. 2). Clayman 등의 연구¹²와 본 연구 사이에 방법 상 차이점은 바이러스에 구강 점막을 노출시킨 시간에 있었다. 본 연구에서는 6.3×10^8 pfu/ml의 농도로 1시간 동안 노출시켰다. 본 연구에서도 6.3×10^7 pfu/ml와 6.3×10^6 pfu/ml의 아데노 바이러스를 이용한 유전자 전달은 실패한 바 있다. 따라서 아데노 바이러스를 이용한 유전자 치료법에서 중요한 부분은 사용된 바이러스의 농도와 시편을 바이러스에 충분한 시간 동안 노출시켜야 한다는 것이다. 이러한 결론은 Eicher 등의 연구 결과와도 동일하다¹³.

본 연구의 결과를 살펴볼 때, 또 하나 특이한 점은 아데노 바이러스에 의하여 감염된 세포가 거의 대부분 외과적 절제연에서만 관찰된다는 점이다 (Fig. 3). 점상 감염은 외상성 궤양 부위에서만 관찰되었다. 게다가 치은연에서도 GFP의 발현이 관찰되었다 (Fig. 3F, G). 따라서 본 연구의 결과는 정상적인 구강 점막 상피 세포는 바이러스에 의한 유전자

전달이 쉽지 않다는 것을 의미한다. 본 연구의 결과를 토대로 검토하여 보면 정상 점막 상피 세포가 바이러스에 의한 유전자 전달이나 감염이 되기 위하여는 상피 세포 층 중에서 가장 바깥층이 아닌 바이러스에 취약한 특정 부위가 노출되어야 감염이 이루어질 것으로 추정된다. 아데노 바이러스는 세포 표면에 위치한 수용체에 결합되어야 세포 내로 들어갈 수 있으며 이때 요구되는 수용체는 integrins이라고 알려져 있다^{14,15}. 바이러스의 침투를 돕기 위한 세포의 수용체는 구강을 포함한 비인후부 및 기관지를 통틀어 불규칙하게 분포하고 있고 세포의 기저부나 측면에 집중적으로 분포하고 있다¹⁶. 아데노바이러스 자체는 증식하는 세포나 증식하지 않는 세포나 모두 감염시킬 수 있다¹⁷. 따라서 본 실험에서 보여준 것과 같은 절제연에서 높은 GFP의 발현은 세포의 증식 유무와는 관련이 없을 것으로 사료된다. 세포와 세포 간의 긴밀한 접촉은 바이러스의 침투를 억제하는 작용이 있다¹⁸. 만약 어떠한 이유에 의하여 이러한 세포 간의 접촉이 파괴된다면 이 물질이 세포 사이로 침투할 수 있게 된다¹⁹. 따라서 세포와 세포 사이의 결합이 이완되거나 상피층이 얇아지거나 세포가 활발하게 증식하는 상황이나 표면에 궤양이 형성된 경우에 바이러스의 침투가 훨씬 용이하게 일어날 것으로 사료된다. 만약 아데노바이러스를 이용하여 유전자 치료를 계획하는데 그 방법이 국소적인 도포라면 앞에서 언급한 조건들을 염두에 두어야 할 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는 아데노바이러스를 이용한 국소 도포형 유전자 치료법을 고려하거나 바이러스의 구강 점막 감염 조건을 고려할 때, 바이러스의 농도 및 바이러스에 노출된 시간 등이 중요한 조건으로 작용할 것이라는 것을 알게 되었다. 만약 구강 점막 상피의 보호층이 파괴된다면 아데노 바이러스는 감염 후 24시간 후 바이러스 단백질의 발현이 시작될 것이고 감염 후 3일까지 바이러스 단백질의 발현이 지속적

으로 증가될 것이다. 정상점막에는 감염이 잘되지 않고 궤양 같은 특정 조건의 구강 점막에만 잘 감염되는 성질을 이용하면 치료가 잘되지 않는 구강 내 궤양에 대한 치료법으로 국소 도포형 유전자 치료가 고려될 수 있을 것이라 사료된다.

※ Acknowledgement

아데노 바이러스 벡터를 제공하여 주신 University of Pennsylvania의 나현덕 교수님께 감사의 뜻을 포함합니다.

References

- Furlanetto DL, Crighton A, Topping GV : Differences in methodologies of measuring the prevalence of oral mucosal lesions in children and adolescents. *Int J Paediatr Dent* 16 : 31, 2006.
- da Silva LM, Guimaraes AL, Victória JM *et al* : Herpes simplex virus type I shedding in the oral cavity of seropositive patients. *Oral Dis* 11 : 13, 2005.
- Miller CS : Herpes simplex virus and human papilloma virus infections of oral cavity. *Semin Dermatol* 13 : 108, 1994.
- Al-Bakkal G, Ficarra G, McNeill K *et al* : Human papilloma virus type 16 E6 gene expression in oral exophytic epithelial lesions as detected by in situ rtPCR. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 87 : 197, 1999.
- Yeudall WA : Human papilloma viruses and oral neoplasia. *Oral Oncol Eur J Cancer* 87 : 197, 1992.
- Lai CM, Lai YK, Rakoczy PE : Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol* 21 : 895, 2002.
- Foster TP, Rybachuk GV, Kousoulas KG : Expression of the enhanced green fluorescent protein by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) as an in vitro or in vivo marker for virus entry and replication *J Virol Methods* 75 : 151, 1998.
- Kim SG, Yang BE, Oh SH *et al* : The differential expression pattern of BMP-4 between the dentigerous cyst and the odontogenic keratocyst. *J Oral Pathol Med* 34 : 178, 2005.
- Kim SG, Chae CH, Cho BO *et al* : Apoptosis of oral epithelial cells in oral lichen planus caused by upregulation of BMP-4. *J Oral Pathol Med* 35 : 37, 2006.
- Berking C, Takemoto R, Satyamoorthy K *et al* : Basic fibroblast growth factor and UVB transform melanocytes in human skin. *Am J Pathol* 158 : 943, 2001.
- Nesbit M, Schaidler H, Miller TH *et al* : Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. *J Immunol* 166 : 6483, 2001.
- Clayman GL, Trapnell BC, Mittereder N *et al* : Transduction of normal and malignant oral epithelium by an adenovirus vector: the effect of dose and treatment time on transduction efficiency and tissue penetration. *Cancer Gene Ther* 2 : 105, 1995.
- Eicher SA, Clayman GL, Liu TJ *et al* : Evaluation of topical gene therapy for head and neck squamous cell carcinoma in an organotypic model. *Clin Cancer Res* 2 : 1659, 1996.
- Chardonnet Y, Dales S : Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome. *Virology* 40 : 462, 1970.
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, *et al* : Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73 : 309, 1993.
- Walters RW, Grunst T, Bergelson JM *et al* : Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J Biol Chem* 274 : 10219, 1999.
- Lai CM, Lai YK, Rakoczy PE : Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol* 21 : 895, 2002.
- Coyne CB, Kelly MM, Boucher RC *et al* : Enhanced epithelial gene transfer by modulation of tight junctions with sodium caprate. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23 : 602, 2000.
- Wan H, Winton HL, Soeller C *et al* : Der p1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* 104 : 123, 1999.

저자 연락처

우편번호 431-070
경기도 안양시 동안구 평촌동 896
한림대학교 성심병원 구강악안면외과
김성곤

원고 접수일 2009년 03월 26일
게재 확정일 2009년 05월 19일

Reprint Requests

Seong-Gon Kim

Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Sacred Heart Hospital
Tel. +82-31-380-3870 Fax. +82-31-387-2475
E-mail : epker@chol.com

Paper received 26 March 2009
Paper accepted 19 May 2009