

## In Vitro에서 Retrovirus Vector System을 이용한 인간 성장 호르몬 유전자의 발현

김민기 · 구본철 · 권모선 · 김태완<sup>†</sup>

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

## Expression of Human Growth Hormone Gene using Retrovirus Vector System *In Vitro*

Min Ki Kim, Bon Chul Koo, Mo Sun Kwon and Teoan Kim<sup>†</sup>

Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 705-718, Korea

### ABSTRACT

Human growth hormone (hGH), one of the most important hormones in medicine, is secreted from anterior pituitary gland. Its broad physiological function includes body growth, cell regeneration, increasement of muscle volume, bone density, body fat reduction, and so on. Due to the wide range of therapeutic effects, the hGH produced from *E. coli* has been commercialized already. In this study, we asked whether it is possible to produce recombinant hGH efficiently from various cultured mammalian cells. To meet this purpose, we chose a retrovirus vector system for transfer and expression of the hGH gene in various mammalian cells. Analyses of RT-PCR, ELISA, and Western blot to determine expression of the hGH gene showed the highest production of the hGH was determined from chicken embryonic fibroblast (CEF) cells with the concentration of 8.58  $\mu$ g/ml. The biological activity of the hGH was similar to the commercially available counterpart. These results suggest that mass production of hGH is possible not only in the *E. coli* but also in the various mammalian cells.

(Key words : hGH, Mammalian cell, Retrovirus vector, Biological activity)

### 서 론

사람의 성장호르몬(human growth hormone, hGH)은 주로 뇌하수체 전엽에서 생성, 저장, 분비되고, insulin과 함께 대장균(*Escherichia coli*)에서 대량 생산되는 대표적인 단백질이다(Becker 등, 1986). hGH는 191개의 아미노산이 4개의  $\alpha$ -Helix 구조를 이루고 있으며, 당 잔기가 없는 분자량이 약 22 kDa인 단백질로서 두 개의 disulfide bond를 가지고 있다(Shin 등, 1998; de Vos 등, 1992). 운동이나 수면, 스트레스를 받거나 혈당이 떨어지면 시상하부에서 분비된 성장 호르몬 분비 호르몬(growth hormone releasing hormone, GHRH)의 자극에 의해 뇌하수체 전엽으로부터 hGH가 생산되고, 이는 간 조직에 작용하여 insulin-like growth factor-1 (IGF-1)이라는 호르몬을 분비하게 하며(Kleinberg 등, 2009), 신체의 성장과 간에서의 포도당 합성, 세포의 재생과 피부의 탄력 증가, 근육의 합성 증진, 골밀도 향상, 그리고 체지방 감소 등의 효과를 보인다(Uchida, 1997; Zachweja와 Yarasheski, 1999; KI-

einberg 등, 2009). 이와 같은 다양한 생리적 기능을 이용하여 hGH를 치료 목적으로 활용하는 빈도가 높아지고 있는데, 성장 호르몬 결핍에 따른 성장 지체, 터너증후군, 그리고 만성 신부전증 등과 같은 많은 증상에 hGH가 사용되고 있다(Allen과 Fost, 2004). 이상과 같이 다양한 치료 효과를 나타내는 hGH를 대량 생산하기 위하여 현재 주로 사용하는 방법은 대장균으로부터 재조합 hGH를 생산하는 방법이다. 그러나 이 방법의 가장 큰 단점은 inclusion body의 생성과 불필요한 N-말단 부위의 methionine으로 인한 높은 정제 비용이다. 이에 대한 대안으로 본 연구에서는 동물세포에서의 hGH의 생산 가능성을 검증하고자 하였다.

동물세포에 외래 유전자를 전이시키는 방법은 virus의 감염성을 이용하는 방법과 virus를 이용하지 않고 물리적(gene gun, electrophoration) 혹은 화학적(cationic lipid 또는 polymer)인 수단으로 외래 유전자를 전이시키는 방법이 있다. Virus를 이용하지 않는 방법은 크기가 큰 유전자를 숙주 세포에 전달이 가능한 장점이 있지만 virus를 이용하는 방법과 비교했을 때 상대적으로 유전자 전

\* 본 논문(특허)은 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ0080412011과 PJ007990042011)의 지원에 의해 이루어진 것임.

<sup>†</sup> Corresponding author : Phone: +82-53-650-4470, E-mail: takim@cu.ac.kr

이 효율성이 감소되는 단점을 가진다(Nishikawa와 Huang, 2001). 전자의 방법에 사용되는 virus에는 retrovirus, lentivirus, adenovirus 그리고 adeno-associated virus를 이용하는 방법 등이 있는데, adenovirus system의 경우 도입된 외래 유전자는 핵 속에서 episome 상태로 존재하기 때문에 단기간 동안 외래 유전자를 발현시킬 경우에 사용되며, retrovirus, lentivirus, 그리고 adeno-associated virus system은 도입된 외래 유전자가 숙주 세포의 유전체 내로 삽입되어 존재하기 때문에 외래 유전자를 안정적으로 장기간 발현시켜야 할 경우에 적합하다(Kay 등, 2001). 본 연구에서는 유전자 전이의 효율성, 실험의 편의성, 전이된 유전자의 안정성 등의 장점을 가지고 있는 retrovirus vector system을 이용하였다.

본 연구에서는 *in vitro*에서 hGH의 효율적 발현을 위하여 cytomegalovirus (CMV) promoter와 woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WP-RE) 서열(Zufferey 등, 1999)을 도입한 retrovirus vector system을 구축하였다. 또한, 이 vector system을 이용하여 다양한 표적세포에서 hGH의 발현과 생물학적 활성을 분자생물학적인 방법을 이용하여 비교함으로써 가장 효율적인 hGH 생산 세포주를 선별하고자 하였다.

## 실험 방법

### Retrovirus Vector의 구축

hGH cDNA가 도입된 retrovirus vector는 본 연구실에서 보유하고 있는 pGEM-11Zf-hGH와 pLNCXW를 재조합하여 구축하였다. pGEM-11Zf-hGH를 제한효소인 Sma I과 self ligation을 방지하기 위한 탈인산화효소인 Antarctic phosphatase 순으로 처리한 후, Not I linker를 삽입하였다. Not I linker가 삽입된 pGEM-11Zf-hGH에 Hind III와 Not I을 처리하여 hGH 유전자를 분리한 후, 동일한 제한효소를 처리한 pLNCXW와 재조합하여 pLNC-hGHW를 구축하였다(Fig. 1).

### Virus의 생산 및 표적세포로의 감염

Retrovirus의 생산은 pLNC-hGHW 20 µg을 전날 준비한 PI67 (Clontech, USA) 세포에 calcium phosphate 방법

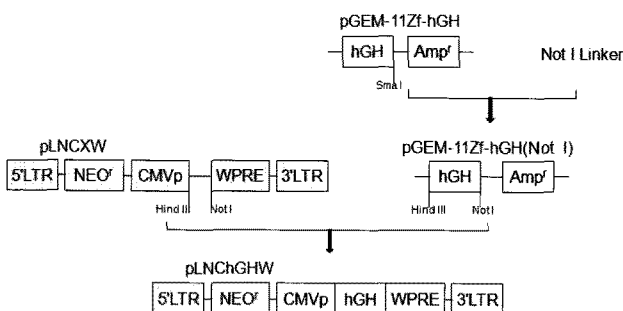


Fig. 1. Structure of human growth hormone (hGH) retrovirus vector. LTR, long terminal repeat; NEO<sup>r</sup>, neomycin resistance gene; CMVp, cytomegalovirus promoter; hGH, human growth hormone gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element.

으로 transfection한 후 배양액을 교체하였다. 48시간 후 세포로부터 생산된 virus가 함유된 배양액을 수확하여 virus packaging 세포인 GP2 293 (Clontech, USA)에 감염시킨 다음 G418 (600 µg/ml; usb, USA)이 첨가된 선별 용액으로 2주간 배양하였다. 선별된 GP2 293-LNC-hGHW 세포에 calcium phosphate 방법을 이용하여 virus 피막 유전자인 vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G) 유전자를 가진 pVSV-G (Clontech, USA)를 도입하였다. 48시간 배양 후 retrovirus가 포함된 배양액 1 ml을 5×10<sup>5</sup> cells/60 mm dish로 준비해 둔 여러 표적세포(BEF, bovine embryonic fibroblast cell; CEF, chicken embryonic fibroblast cell; HeLa, human cervical carcinoma cell; CHO, chinese hamster ovary cell; NIH3T3, mouse embryonic fibroblast cell; PFF, porcine fetal fibroblast cell)에 감염시켰다. 그 후 감염된 세포는 G418이 첨가된 선별 용액에 2주간 선별하여 hGH 유전자가 전이된 세포주를 확립하였다.

본 실험에 사용한 모든 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양하였으며, CHO 세포를 제외한 다른 세포들은 10% FBS (fetal bovine serum; Hyclone, USA)와 penicillin-streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml; Hyclone, USA)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Hyclone, USA) 배지에서 배양하였으며, CHO 세포는 penicillin-streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml)과 10% FBS가 첨가된 HamF-12 (Gibco, USA) 배지에서 배양하였다.

### 재조합 hGH 유전자의 발현 확인

각 세포주로부터의 재조합 hGH 유전자의 발현은 RT-PCR, Western blot, ELISA 실험을 통하여 확인하였다. 먼저 RT-PCR 과정은 다음과 같다. LNC-hGHW virus를 감염시킨 세포와 감염시키지 않은 BFF, CEF, CHO, HeLa, NIH3T3, PFF 세포로부터 Trizol을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리한 total RNA로부터 ImProm-II reverse transcription system (Promega, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 주형으로 하여 hGH와 대조구인 각 세포주의 GAPDH에 대하여 PCR을 하였다. PCR 반응은 PCR Master Mix (Promega, USA) 10 µl에 각각 10 pmol “+”, “-” strand primer, 그리고 합성한 cDNA 2 µl를 넣어 총 20 µl로 실행하였다. PCR 과정은 95°C에서 30초, 54°C에서 30초, 72°C에서 30초간 35 cycle을 실시하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 hGH의 발현 여부를 확인하였다. 본 실험에서 사용한 hGH에 해당하는 primer는 “+”인 5'-CAACCATTCCCTTATCCAGG-3'와 “-”인 5'-ATAGACGTGCTGTCAGAGG-3'이며, 각 세포주에 따른 GAPDH 유전자에 대한 primer를 대조구로 사용하였다.

hGH 단백질의 발현을 확인하기 위한 Western blot 실험은 세포 밖으로 분비된 hGH와 분비되지 않고 세포내에 존재하는 hGH를 대상으로 실행하였다. 전자의 경우는, 각 세포를 5×10<sup>5</sup> cells/100 mm dish로 준비하여 FBS가 없는 DMEM 배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 48시간 배양 후 배양액을 수거하여 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 sample을 준비하였다. 후자의 경우는, 전자의 배양액이 수거된 각 세포의 dish에 PRO-PREP<sup>TM</sup>

protein extraction solution (iNtRON, Korea) 500  $\mu$ l를 첨가하여 4°C 조건 하에서 16시간 동안 용해시켰다. 용해된 세포액을 13,000 rpm, 4°C, 30분간 원심분리하여 상층액을 Bradford 방법으로 정량하였다. 세포에서 분리한 세포 배양액 40  $\mu$ l와 단백질 20  $\mu$ g을 각각 취하여 다음 실험에 사용하였다. 12% SDS-polyacrylamide gel에서 80 V의 전압으로 전기 영동한 gel 내의 단백질은 Trans-Blot semi-dry transfer cell (Bio-Rad, USA)을 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 부착시켰다. Membrane은 MTBS-T buffer (5% skim milk, 0.1% Tween-20, 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6)을 사용하여 실온에서 1시간 동안 blocking하였으며, mouse anti-hGH primary antibody (Abcam, UK)와 대조구인  $\alpha$ -tubulin을 MTBS-T buffer를 사용하여 각각 1:2,000과 1:3,000 비율로 희석한 용액으로 4°C 조건에서 16시간 동안 반응시켰다. 그 후 TBS-T washing buffer로 membrane을 5분간 4회 세척하였고, HRP-conjugated Goat anti-mouse IgG (R&D systems, USA)을 MTBS-T buffer와 1:3,000 비율로 희석한 용액으로 1시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 membrane은 TBS-T로 15분씩 3회 세척 후, SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Trial Kit (Pierce, USA) 용액에 반응시켜 X-ray film에 1~5분간 노출시켜 현상하였다.

각 세포로부터 생산된 hGH의 정량적 분석은 ELISA 방법으로 수행하였다. hGH의 유전자가 전이된 세포주와 대조군 세포를 FBS가 없는 배양액에 각각 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 48시간 배양한 후, 1,000 rpm에 5분간 원심분리하여 배양액을 수확하였다. 수확한 배양액을 여러 단계로 희석한 다음 Quantikine Human GH Immunoassay kit (R&D systems, USA)을 사용하여 ELISA를 실시하였다. 희석한 standard와 sample을 각 well에 200  $\mu$ l씩 넣고 실온에서 2시간 방치한 후, wash buffer로 4회 세척하였다. 세척 후 각 well에 200  $\mu$ l anti-hGH HRP conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 well에 4회 wash buffer로 세척한 후, 200  $\mu$ l TMB substrate solution을 첨가하고 빛을 차단시켜 실온에서 25분간 반응시켰다. 반응시킨 후 50  $\mu$ l stop solution을 첨가하여 반응을 종결시키고, Model 680 micoplate reader (Bio-Rad, USA)를 사용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 재조합 hGH의 생물학적 활성 측정

생물학적 활성 측정에 앞서 Nb2-11 세포(ECACC, UK)를 Fisher's 배지(Welgene, Korea; 1% FBS, 10% Horse serum, 50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol, and antibiotics)에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 15 ml tube에 넣고 800 rpm, 10분간 원심분리하여 모은 후, Fisher's 배지(1% FBS, 10% horse serum, 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol, and antibiotics)에 옮겨서 배양하였다.

hGH 유전자가 전이된 세포주(CEF, CHO)에서 수확한 hGH가 함유된 배양액과 대장균에서 생산된 recombinant hGH (Abcam, UK)를 dilution buffer (PBS + 0.1% BSA)와 혼합하여 이배수로 희석한 후 96 well microplate의 각 well에 50  $\mu$ l씩 분주하였다. 배양된 Nb2-11 세포를 split하여 15 ml tube에 넣고 800 rpm, 5분간 원심분리한

후, 상층액을 제거하고 5 ml PBS를 넣어 세포를 세척하였다. 세척된 cell을 FBS를 첨가하지 않은 4 ml Fisher's 배지(10% horse serum, 50  $\mu$ M M 2-mercaptoethanol, and antibiotics)를 사용하여 split하여 2 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/100 mm dish로 준비한 다음, hGH를 분주해 놓은 각 well에 50  $\mu$ l씩 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 48시간 배양하였다. 각 well 당 MTT labeling reagent (Roche, USA)를 10  $\mu$ l씩 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후, solubilization solution을 100  $\mu$ l씩 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 16시간 동안 반응시킨 다음 Model 680 micoplate reader (Bio-Rad, USA)로 595nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

## 결 과

### Retrovirus Vector System을 이용한 재조합 hGH 유전자 발현 확인

RT-PCR을 이용한 hGH의 발현에 있어서 LNChGHW virus에 감염된 세포는 329 bp의 hGH 유전자에 해당하는 PCR 단편이 증폭되었으나, 감염되지 않은 세포는 PCR 단편이 증폭되지 않았다. 각각의 세포에서 정상적인 전사가 이루어지는 것을 확인하기 위한 대조군로서의 GAPDH 단편은 모든 세포에서 거의 동일하게 나타나는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

hGH 단백질의 발현 양상을 확인하기 위하여 각각의 세포 배양액과 세포에서 분리한 단백질을 이용하여 Western blot을 실시한 결과, virus 감염을 통하여 hGH 유전자가 전이된 세포에서는 hGH의 발현을 확인할 수 있었으며, virus에 감염되지 않은 세포에서는 hGH의 발현이 나타나지 않았다. 여러 세포주 중에서 CEF가 가장 강한 발현을 나타내었다(Fig. 3). 세포 배양액과 세포에서 분리한 단백질에서의 hGH 발현을 비교한 결과, 세포 배양액에서의 발현이 강한 것으로 확인되었다(Fig. 3). 이는 hGH가 세포 내에서 생산된 후 세포 밖으로 분비되었음을 의미한다.

### ELISA를 이용한 재조합 hGH의 정량

hGH의 정량을 위하여 각 세포의 배양액을 수확하고 ELISA를 실시한 결과, Western blot에서 비교적 높은 발현을 보인 CEF-LNChGHW 세포에서 8.58  $\mu$ g/ml로 가장

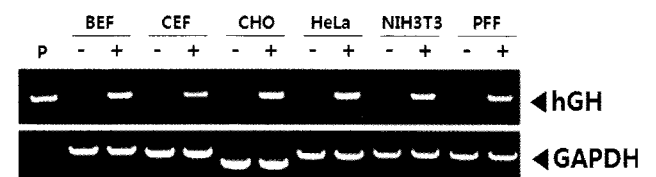
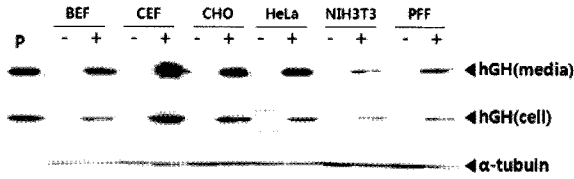
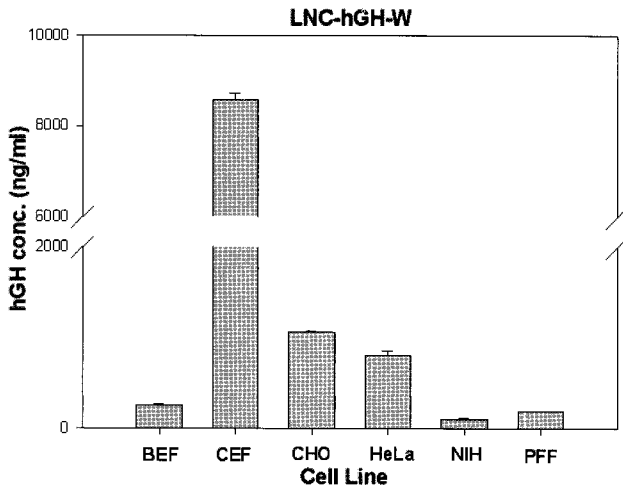


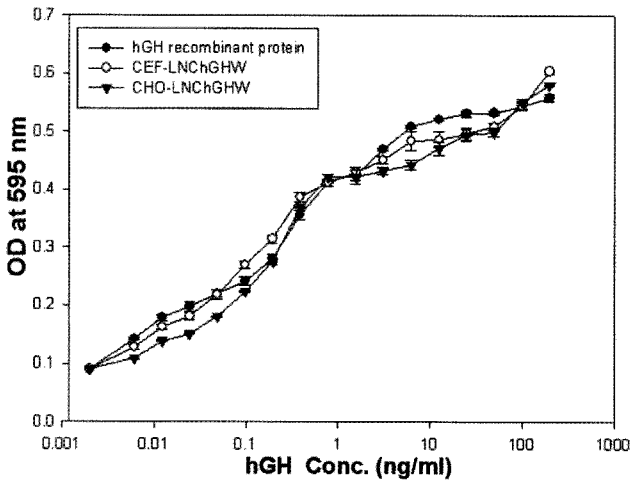
Fig. 2. RT-PCR analyses of hGH gene expression in various target cells. P, plasmid DNA (pLNChGHW); BEF cell, CEF cell, CHO cell, HeLa cell, NIH3T3 cell, PFF cell; -: uninfected cell; +: cells infected with LNChGHW virus. In RT-PCR analysis, two primer sets were used: One for the hGH gene and the other for the control GAPDH gene.



**Fig. 3.** Determination of the hGH gene expression in various target cells by Western blot analysis. -, cells uninfected; +, cells infected with LNChGHW virus. P, standard recombinant hGH (purchased from Abcam, UK). In Western blot analysis, two primary antibody sets were used: one for the hGH and the other for the  $\alpha$ -tubulin control.



**Fig. 4.** ELISA analyses of hGH in various target cells. All cells were infected with LNChGHW retrovirus vector.



**Fig. 5.** *In vitro* bioactivity of hGH in CEF, CHO cells and rhGH standard by measuring proliferation of Nb2-11 cells. Various concentration of hGHs were added to each well, and the incubation was done for 2 days. The data were obtained from experiments performed in triplicate and are presented as the mean  $\pm$  S.D.

높게 정량되었으며, NIH3T3 세포에서 110 ng/ml로 가장 낮게 발현하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 각각의 세포주에 대한 대조군으로 사용한 비감염성 세포에서는 hGH의 값

이 측정되지 않았다.

**Nb2-11 세포를 이용한 재조합 hGH의 생물학적 활성 측정**

hGH의 생물학적 활성은 CEF-LNChGHW와 CHO-LNChGHW 세포주로부터 수확한 배양액을 ELISA로 정량한 후, 각 세포주에서 발현된 hGH의 농도에 따른 Nb2-11 세포의 증식 정도로 측정하였다. CEF, CHO 세포주에서 수확한 hGH의 농도가 증가할수록 흡광도 값이 증가하였으며, 대장균에서 생산된 standard recombinant hGH (Abcam, UK)와 비교하였을 때 활성에 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 5).

**고 찰**

오늘날 생명공학 기술의 발달로 특정한 유전자를 다량한 세포나 형질전환 동물에게 도입하여 원하는 재조합 단백질 형태의 생리활성물질을 생산하는 연구가 활발하게 진행되고 있다(Yann 등, 1996; Wurm, 2004). 재조합 단백질 생산에 있어서 비교적 구조가 단순한 단백질들은 주로 대장균 등의 미생물을 이용하여 대량 생산이 가능하다(Becker 등, 1986; Shin 등, 1998). 이러한 대장균에서의 재조합 단백질 생산에 있어서 크게 두 가지의 문제점은, 생산된 재조합 단백질의 독성으로 인하여 대장균의 생리적 기능이 이루어지지 않거나, 당화에 따른 반감기, 접힘에 문제가 발생함으로써 생산된 재조합 단백질이 표적세포나 개체에 있어서 생물학적 활성을 나타낼 수 없게 된다는 것이다(Braun과 LaBaer, 2003; Palomares 등, 2004). 대장균 외에 진핵세포인 효모를 이용하여 단백질을 생산하는 경우에도 자체 분해 효소에 의해 외래 단백질이 분해되거나 정확한 당장기 부가 능력이 떨어지며, 저조한 생산 수율 등의 문제점이 대두되었다. 이를 개선하기 위해 동물 유래의 세포를 이용하여 인체 단백질을 생산하고자 하는 연구가 시도되었다. 동물세포는 생산된 재조합 단백질의 번역 후 정확한 입체 구조 형성 및 당장기의 결합이 인체 내에서 발현되는 단백질과 매우 유사한 반면, 배양 환경 조절이 어려우며, 배양기와 배양배지의 가격이 높은 단점을 가지고 있다. 현재, 시판되고 있는 재조합 의약품들의 약 60~70%가 동물세포 배양 방법을 사용하여 생산되고 있으며, 특히 고부가가치의 당단백질 대부분이 동물세포 배양 방법으로 생산되기 때문에, 고생산성의 재조합 세포주의 연구 개발은 매우 중요한 연구 분야이다. 동물세포 배양 기술은 1950년대의 virus 백신 생산에 이용되기 시작했으며, 1986년에 동물세포에서 생산한 인간 tPA (tissue plasminogen activator)가 최초로 재조합 의약품으로 승인을 받으면서부터 시장의 주목을 받기 시작했다. 배양에 사용되는 세포들로는 CHO 세포주가 가장 널리 사용되고 있으며(Urlaub과 Chasin, 1980; Lucas 등, 1996), 이 외에 BHK (Baby Hamster Kidney) (Grabenhurst 등, 1995; Geserick 등, 2000)와 HEK (Human Embryo Kidney) (Meissner 등, 2001), 그리고 치료용 항체의 생산을 위한 생쥐 유래의 NS0 (myeloma cell line) (Hills 등, 2001; Barnes 등, 2004) 등도 사용되고 있다.

본 연구에서도 기존의 대장균에서 생산되고 있는 인간 성장 호르몬을 다양한 동물세포에서 생산하고자 하였으며, 이를 위하여 hGH 유전자를 전이시키는 매개체로 고유의 감염성으로 인해 외래 유전자의 전이가 용이하고, 전이된 유전자는 숙주세포의 염색체 내로 삽입되어 세대가 거듭되어도 안정적인 발현이 지속적으로 이루어지는 retrovirus vector system을 구축하고자 하였다. 구축한 vector system을 이용하여 virus를 생산하는 데 있어서 숙주세포의 범위를 확대하기 위하여 vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G)를 피막으로 이용하는 pseudotyped retrovirus vector system을 사용하였다(Burns 등, 1993; Liu 등, 1996). 이 retrovirus vector system에서 생산된 virus로 여러 종류의 동물세포에 감염시켜 각 세포들에서 hGH 생산을 유도하였다. 그 결과, CEF에서 8.58 µg/ml 농도의 hGH가 생산되었으며, CHO와 HeLa 세포에서 비교적 높은 농도를 나타내었다.

hGH의 생물학적 활성을 측정하기 위한 방법은 크게 *in vivo*와 *in vitro* 방법으로 나누어진다. *In vivo* 방법에는 뇌하수체를 제거한 쥐나 난쟁이 생쥐에 hGH를 공급하여 체중의 증가를 분석하거나, 뇌하수체가 제거된 쥐에 hGH의 유무에 따른 경골판 분석을 실시한다(Greesbeck과 Palon, 1987; Bellini와 Bartolini, 1993; Greespan 등, 1949). 이 방법은 실험 개체의 스트레스나 대사 상태에 따라 결과에 미치는 영향이 크고 측정 감도가 불충분하다는 단점이 있다. *In vitro* 방법에는 radioreceptor 분석, receptor modulation 분석, 그리고 Nb2-11 세포나 Ba/F3-hGHR 재조합 세포를 이용하여 hGH의 공급 여부에 따른 세포 증식 정도를 측정하는 방법이 있는데(Lesniak 등, 1973; Rosenfeld와 Hiatt 등, 1980; Bozzola 등, 1998; Ishikawa 등, 2000), 전자보다 정밀한 분석이 가능하고 기술적으로 용이하다. 본 연구에서는 Nb2-11 세포를 이용하여 각 세포에서 발현된 재조합 hGH와 대장균에서 생산된 recombinant hGH (Abcam, UK)의 생물학적 활성을 비교하였는데, 각 hGH의 생물학적 활성이 거의 유사한 것으로 확인되었다(Fig. 5).

이상의 연구 결과는 기존의 대장균에서 생산하여 상업적으로 판매되고 있는 재조합 hGH뿐만 아니라 다양한 동물세포에서도 생물학적 활성을 가지는 hGH 생산이 가능함을 입증한 것이다. 본 연구에서 구축한 동물세포로의 유전자 전이 system은 차후 고가의 의료용 단백질 생산 연구에 있어서 중요한 기술적 매개체로 제공될 수 있을 것으로 생각된다.

### 인용문헌

1. Allen DB, Fost N (2004): hGH for short stature: ethical issues raised by expanded access. *J Pediatr* 144: 648-52.
2. Barnes LM, Bentley CM, Dickson AJ (2004): Molecular definition of predictive indicators of stable protein expression in recombinant NS0 myeloma cells. *Biotechnol Bioeng* 85:115-121.
3. Becker GW, Hsiung HM (1986): Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Es-*

- cherichia coli*. *FEBS* 204:145-150.
4. Bellini MH, Bartolini P (1993): *In vivo* bioassay for the pituitary determination of human growth hormone dwarf "little" mice. *Endocrinol* 132:2051-2055.
5. Bozzola M, Zecca M, Locatelli F, Radetti G, Pagani S, Autelli M, Tatò L, Chatelain P (1998): Evaluation of growth hormone bioactivity using the Nb2 cell bioassay in children with growth disorders. *J Endocrinol Invest* 21:765-70.
6. Braun P, LaBaer J (2003): High throughput protein production for functional proteomics. *Trends Biotechnol* 21:383-388.
7. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (1993): Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8033-8037.
8. de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA (1992): Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 257:306-312.
9. Geserick C, Bonarius HPJ, Kongerslev L, Hauser H, Mueller PP (2000): Enhanced productivity during controlled proliferation of BHK cells in continuously perfused bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 69:266-274.
10. Grabenhorst E, Hoffmann A, Nimtz M, Zettlmeissl G, Conradt HS (1995): Construction of stable BHK-21 cells coexpressing human secretory glycoproteins and human Gal(β1-)GlcNAc-R α2,6-sialyltransferase. *Eur J Biochem* 232:718-725.
11. Greesbeck MD, Palon AF (1987): Highly improved precision of the hypophysectomized female rat body weight gain bioassay for growth hormone by increased frequency of injection, avoidance of antibody formation, and other simple modifications. *Endocrinol* 120:2582-590.
12. Greespan FS, Li CH, Simpson ME, Evans HM (1949): Bioassay of hypophyseal growth hormone: the tibia test. *Endocrinol* 45:455-463.
13. Hills AE, Patel A, Boyd P, James DC (2001): Metabolic control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation in GS-NS0 cells. *Biotechnol Bioeng* 75:239-251.
14. Ishikawa M, Nimura A, Reiko H, Katsumata N, Arisaka O, Wada M, Honjo M, Tanaka T (2000): A novel specific bioassay for serum human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 11:4274-4279.
15. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L (2001): Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7:33-40.
16. Kleinberg LD, Wood LT, Furth AP, Lee V (2009): Growth hormone and insulin-like growth factor-i in the transition from normal mammary development to preneoplastic mammary lesions. *Endocr Rev* 1:

- 51-74.
17. Lesniak MA, Roth J, Gorden JR (1973): Human growth hormone radioreceptor assay using cultured human lymphocytes. *Nature* 241:20-2.
  18. Liu ML, Winther BL, Kay MA (1996): Pseudotransduction of hepatocytes by using concentrated pseudotyped vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G)-Moloney murine leukemia virus-derived retrovirus vectors: comparison of VSV-G and amphotropic vectors for hepatic gene transfer. *J Virol* 70:2497-2502.
  19. Lucas BK, Giere LM, Demarco RA, Shen A, Chisholm V, Crowley CW (1996): High level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. *Nucleic Acids Res* 24:1774-1779.
  20. Meissner P, Pick H, Kulangara A, Chatellard P, Friedrich K, Wurm FW (2001): Transient gene expression: recombinant protein production with suspension-adapted HEK293-EBNA cells. *Biotechnol Bioeng* 75:197-203.
  21. Nishikawa M, Huang L (2001): Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* 12:861-870.
  22. Palomares LA, Estrada MS, Ramirez OT (2004): Production of recombinant protein: Challenges and solutions. *Meth Mol Biol* 267:15-52.
  23. Rosenfeld RG, Hiatt RL (1980): Modulation of homologous receptor concentration: a sensitive radioassay for human growth hormone in acromegalic and newborn, and stimulated plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 50:62-69.
  24. Shin NK, Kim DY, Shin CS, Hong MS, Lee JW, Shin HC (1998): High-level production of human growth hormone in *Escherichia coli* by a simple recombinant process. *J Biotechnol* 62:143-151.
  25. Uchida H, Naito N, Asada N, Wada M, Ikeda M, Kobayashi H, Asanagi M, Mori K, Fujita Y, Konda K, Kusuhara N, Kamioka T, Nakashima K, Honjo M (1997): Secretion of authentic 20-kDa human growth hormone (20K hGH) in *Escherichia coli* and properties of the purified product. *J Biotechnol* 55:101-112.
  26. Urlaub G, Chasin LA (1980): Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4216-4220.
  27. Wurm FM (2004): Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22:1393-1398.
  28. Yann E (1996): Recombinant protein production in transgenic animals. *Curr Opin Biotechnol* 7:536-540.
  29. Zachweja JJ, Yarasheski KE (1999): Does growth hormone therapy in conjunction with resistance exercise increase muscle force production and muscle mass in men and women aged 60 years or older? *Phys Ther* 79:76-82.
  30. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999): Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892.
- (접수일자: 2011. 9. 2 / 채택일자: 2011. 9. 9)