

CT 조영을 위한 금 코팅 리포솜의 제조

위태인^{†,‡} · 전예원^{†,‡} · 조영재[§] · 조성근[†] · 하 정[†] · 이정원[§] · 조선행[†] · 한희동^{#,*} · 신병철^{†,‡,*}

[†]한국화학연구원 의약화학센터

[‡]과학기술연합대학원대학교 약품 및 의약화학

[§]성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 산부인과

[#]건국대학교 의과대학 면역학교실

(접수 2013. 6. 5; 게재확정 2013. 8. 15)

Preparation of Gold Coated Liposomes for CT Contrast Medium

Tae In Wee^{†,‡}, Ye Won Jeon^{†,‡}, Young Jae Cho[§], Sung Keun Cho[†], Jeung Ha[†], Jeong Won Lee[§],
Sun Hang Cho[†], Hee Dong Han^{#,*}, and Byung Cheol Shin^{†,‡,*}

[†]Research Center for Medicinal Chemistry, Division of Drug Discovery Research,

Korea Research Institute of Chemical Technology, 100, Jang-dong, Yuseong-gu, Daejeon, Korea. *E-mail: bcshin@kRICT.re.kr

[‡]Medical and Pharmaceutical Chemistry, Korea University of Science and Technology, 52, Eoeun-dong,

Yuseong-gu, Daejeon, Korea

[§]Department of Obstetrics & Gynecology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

[#]Department of Immunology, School of Medicine, Konkuk University, 268 Chungwondaero, Chungju 380-701, Korea

*E-mail: hanhd@kku.ac.kr

(Received June 5, 2013; Accepted August 15, 2013)

요 약. 암이나 혈관질환을 진단하기 위하여 영상의학기기들의 사용이 증가되고 있다. 영상의학기기 중 컴퓨터단층촬영(CT)은 가장 널리 이용되는 방법의 하나로서, CT를 하기 위해서는 조영제를 투여하여야 한다. 따라서, 본 연구에서는 리포솜의 표면에 금 입자를 코팅함으로써 조영제로 개발하고자 하였다. 금 입자를 코팅하기 위하여, 양이온성 리포솜을 제조하였고, 양이온성 리포솜의 표면에 음이온을 띄는 Au⁻가 정전기적으로 코팅이 되게 하였다. 금 코팅 리포솜(GCL)의 크기는 154.8±9.2 nm 이었고, 표면전하는 27±3.2 mV 이었다. 리포솜의 형태는 주사전자현미경과 투과전자현미경으로 확인하였다. 리포솜 표면의 금 코팅 효율은 18% 였으며, MTT 분석을 한 결과, 금 코팅 과정에 대한 세포독성은 없었다. 그리고, 제조된 금 입자 코팅 리포솜을 CT로 촬영했을 경우 우수한 조영 효과를 나타냈다. 따라서 본 연구에서 제조된 GCL은 CT 조영제로서 다양한 혈관질환에 적용이 가능할 것이다.

주제어: 금, 리포솜, 조영제, 컴퓨터단층촬영

ABSTRACT. The use of medical imaging has been increased for diagnosis of cancer or vessel disease. Among the medical imaging, computed tomography (CT) is one of the popular methods, however, which should need administration of contrast medium. Therefore, we developed gold coated liposomes (GCL) as a contrast medium. To coat gold on the liposomal surface, positive charged liposomes was prepared and then negative Au⁻ can coat on the liposomal surface by electronic interaction. The size of GCL was 154.8±9.2 nm and surface charge was 27±3.2 mV, respectively. The morphology of GCL was confirmed by electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The coating efficiency of gold was 18%. Chemical procedure for gold coating on liposomal surface was not toxic for cell cytotoxicity by MTT assay. Finally, we demonstrated attractive CT image for GCL. Taken together, the GCL would be useful for various vessel related disease as a contrast medium.

Key words: Gold, Liposomes, Contrast medium, CT

서 론

최근 암이나 혈관질환 등으로 인한 환자가 증가함에 따라 영상의학기기를 이용한 진단의 중요성이 강조되고 있다. 그 중, 컴퓨터 단층촬영(computed tomography, CT)은 가장

널리 이용되는 영상진단 방법의 하나로서 CT 촬영을 위해서는 조영제의 투여가 선행 되어져야 한다. 그러나 현재 사용되고 있는 CT 조영제인 요오드화 벤조산 유도체는 신장독성이 있고, 체내 순환시간이 매우 짧다는 단점이 있다.^{1,2} 이러한 단점을 극복하기 위하여 리포솜을 이

용한 조영제 개발이 방법이 활발히 연구되고 있다.³⁻⁵

리포솜은 지질 및 인지질 이중 막으로 이루어진 소포체로서 생체적합성, 생분해성이 있으며, 체내 체류시간을 향상시킬 수 있는 장점이 있다.^{6,7} 따라서 리포솜은 다양한 유효물질 및 약물의 전달체로 광범위하게 이용되고 있으며, 환부에 전달이 된 리포솜은 림프절에 오랫동안 체류하게 되어 기존의 CT 조영제의 단점을 극복할 수 있다. 또한 기존의 조영제보다 오랜 시간 림프절에 잔류함으로써 투여 후 장시간 확인이 가능하여 영상을 비교적 쉽게 얻을 수 있고, 임상에서 림프절을 확인하기 위해 사용하는 복잡한 방법을 단순화시킬 수 있는 장점이 있다.⁸

따라서 리포솜의 표면을 변형하여 다양한 작용기를 접합시킴으로써 표적부위로 약물을 효과적으로 전달하기 위한 연구가 진행 중이다. 리포솜의 표면에 작용기를 접합하여 활용하는 방법은 단백질,⁹ 항체,¹⁰ 리간드¹¹ 등을 활용한 표적화 전달 방법과 가돌리늄,¹² 금¹³ 등을 접합하여 조영제로 활용하기 위한 방법들이 연구중이다. 조영제로 활용이 가능한 금속이온 중, 금 입자는 빛의 산란과 흡수가 매우 좋고 안정성이 높으며 생체적합성이 뛰어나 암 진단과 치료에 많이 이용되고 있다.¹⁴⁻¹⁸

따라서, 본 연구에서는 양이온성 리포솜의 표면에 정전기적 결합력을 이용하여 음이온성 금 입자를 리포솜의 표면에 코팅을 하여 CT 조영제로 가능성을 확인하였으며, 본 연구 결과는 향후 다양한 질병의 진단에 효과적으로 활용이 가능할 것이라 기대된다.

실험방법

시약 및 기기

리포솜 제조에 사용된 지질인 L- α -phosphatidylcholine (soy-hydrogenated) (HSPC), cholesterol (CHOL), 그리고 N-[1-(2,3-dioleoyl)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride) DOTAP은 Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)에서 구입하여 사용하였고, gold chloride solution과 ascorbic acid는 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 투석막은 분획 분자량(molecular weight cut off, MWCO)이 12,000-14,000인 것을 (Viskase Co. Illinois, USA) 사용하였다. 리포솜의 제조는 회전응축증발기(Rotavapor R-200, Buchi, Switzerland)와 초음파 발생기(Ultrasonicator, 500, Fisher Scientific, USA)를 사용하였다. 리포솜의 크기 및 표면전하는 입도분석 및 제타전위측정기(ELS-Z, Particle analyzer, Otuska Electronics Co., Japan)를 이용하여 측정하였다. 그 밖에 리포솜 제조에 사용한 클로로포름과 메탄올 등은 일급 및 특급시약을 그대로 사용하였다.

리포솜의 제조

리포솜은 HSPC, CHOL 그리고 DOTAP을 이용하여 제조하였다. 대조군 리포솜은 HSPC와 CHOL을 이용해서 3:1 (w/w)의 비율로 제조하였고, 대조군 리포솜에 DOTAP의 양을 1, 2, 4(w/w)의 질량 비율로 변화시키며 실험군 리포솜을 제조하였다. 리포솜의 제조는 지질을 클로로포름과 메탄올(8:2)을 이용해 용해시킨 후, 회전응축증발기를 사용하여 40 °C에서 감압 증류하여 둥근 바닥 플라스크 내 벽에 얇은 지질 막을 형성시킨다. 형성된 지질 막을 250 mM 농도의 암모늄 설페이트 용액을 첨가하여 60 °C에서 제조하였다. 제조된 리포솜은 크기를 조절하기 위해 가압압출기로 각각 200 nm, 100 nm, 그리고 80 nm의 폴리 카보네이트 분리막(Whatman, USA)을 이용하여 4-5회 가압 압출하였다.

리포솜 표면에 금 입자 코팅

리포솜의 표면에 금 입자의 코팅은 리포솜 수용액에서 금 입자를 환원시켜 코팅하는 방법으로, 1 ml 리포솜 용액에 30 μ l gold chloride(HAuCl₄, 100 mM) 수용액과 40 μ l ascorbic acid 수용액(500 mM)을 혼합하면서 10분 동안 교반하였다(Fig. 1). 반응이 이루어지지 않은 gold chloride와 ascorbic acid는 투석막(MWCO 12,000-14,000 Da)을 이용하여 4 °C에서 48시간 투석하여 제거하였다. 리포솜 표면에 코팅된 금의 함량은 Inductively coupled plasma(ICP)와 Energy Dispersive X-ray Spectrometry(EDS)로 확인하였다. 한편 대조군 리포솜과 금 코팅 리포솜(GCL)의 형태를 확인하기 위하여 투과전자 현미경(transmission electron microscopy)과 주사전자 현미경(scanning electron microscopy)을 이용하였다.

금 입자 코팅 리포솜(GCL)의 세포독성

GCL의 세포독성은 MTT assay를 통하여 확인하였다. 암 세포주는 난소암 세포주인 SKOV3를 이용하였다. 3×10^3 cells/well로 96 well plate에서 37 °C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다. 대조군 리포솜과 GCL을 각 well에 첨

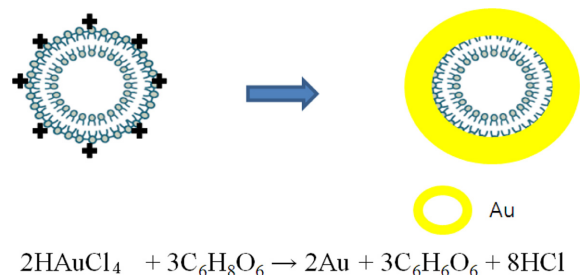


Figure 1. Schematic representation of gold coating on liposomal surface.

가 후 4시간 후에 microplate reader를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

GCL의 CT 촬영

GCL의 조영 효과를 확인하기 위하여 *in vitro* 상에서 12 well에 DOTAP1x, GCL HSPC, GCL DOTAP1x을 넣고 Micro-CT (Inveon; Siemens Medical Solutions, Kn oxville, TN)를 이용해서 촬영을 하였다. 촬영 시에 전압은 70 kVP 양극전류는 400 μ A, 노출시간은 600초로 하였다. 1.5 mm 알루미늄 필터레이션을 이용해 각 샘플을 360 scan 하였고 유효 화소수는 40.32 μ m이었다. CT 이미지는 Shepp-Logan filter filtered back projection algorithm을 사용하여 재구성하였다.

결과 및 고찰

리포솜의 물리적 특성

리포솜의 물리적인 특성을 Table 1에 나타내었다. 대조군 리포솜의 입자크기는 109.0 ± 7.2 nm 이었고 대조군 리포솜에 양이온성 지질인 DOTAP을 1, 2, 4 (w/w, %) 첨가함에 따라 입자의 크기는 약 110 nm로 DOTAP 첨가에 따른 입자의 크기 변화는 미비하였다. 또한 대조군 리포솜의 표면전하는 0.31 ± 3.5 mV로 중성을 나타내었지만 DOTAP의 양이 증가할수록 표면전하는 양이온으로 증가하였다.

리포솜의 표면에 금 입자를 코팅하기 위하여 gold chloride와 ascorbic acid의 양을 변화시키며 리포솜 입자의 크기와 표면전하를 확인하였다(Fig. 2). 리포솜의 크기는 gold chloride 농도가 100 mM 일 때까지는 160 nm로 증가하다가 100 mM 이상에서는 일정하였고(Fig. 2A), ascorbic acid의 농도가 50 mM 이상일 때 일정하게 나타났다(Fig. 2B). 이때, 금 입자가 코팅된 리포솜(GCL)의 표면전하는 gold chloride나 ascorbic acid의 첨가 농도에 영향을 받지 않고 일정하였다(Fig. 2C and D). 금 입자가 코팅된 리포솜 표면에서 gold chloride의 Au^+ 이온이 ascorbic acid에 의해 환원되어 코팅이 되면 금 입자의 표면은 전기적으로 중성을 나타내기 때문에 리포솜 표면의 전하는 일정하게 나타난다. 따라서 금 입자코팅의 최적조건은

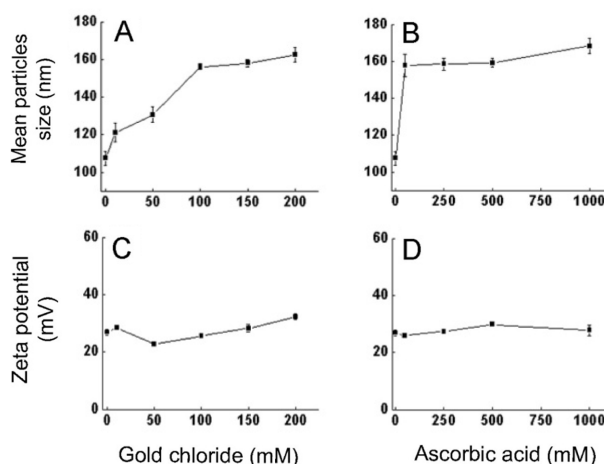


Figure 2. Mean particles size and zeta potential of GCL. (A) Mean particles size of GCL with different gold chloride concentration and (B) ascorbic acid concentration, (C) Zeta potential of GCL with different gold chloride concentration and (D) ascorbic acid concentration. Mean and S.D. are shown ($n=3$).

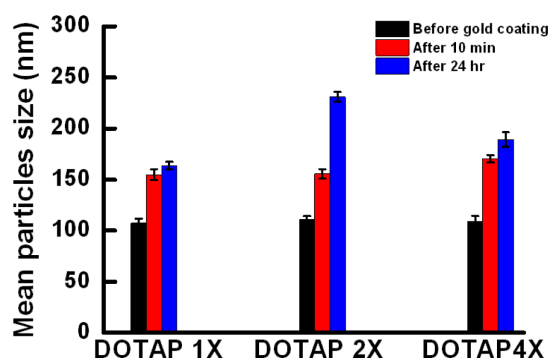


Figure 3. Mean particles size after gold coating on liposomal surface. Mean and S.D are shown ($n=3$).

100 mM gold chloride와 50 mM ascorbic acid로서 고정하고 이후 실험에 적용하였다. Gold chloride와 ascorbic acid의 양을 고정한 후, 최적의 코팅 시간을 확인하기 위하여 금 입자를 코팅 후에 GCL의 크기를 측정하였다(Fig. 3). 금 입자의 코팅은 양이온을 띠는 DOTAP 리포솜의 경우 10분 진행을 할 때 약 150 nm를 나타내었다. 그러나 24시간을 코팅하였을 경우, 입자의 크기가 DOTAP 2x는 60 nm 이상 증가되는 경향을 나타냈다. 이때 코팅시간이 증가하게

Table 1. Physical properties of liposomes

Liposomes	Composition (mass ratio)	Mean particle size (nm)	Zeta potential (mV)
Conventional liposome	HSPC:CHOL (3:1)	109.0 ± 7.2	0.31 ± 3.5
DOTAP 1x	HSPC:CHOL:DOTAP (3:1:1)	107.2 ± 8.3	27.47 ± 2.3
DOTAP 2x	HSPC:CHOL:DOTAP (3:1:2)	111.3 ± 5.2	33.17 ± 5.6
DOTAP 4x	HSPC:CHOL:DOTAP (3:1:4)	109.1 ± 9.3	42.74 ± 4.4

되면서 금 입자의 코팅이 증가되며 리포솜끼리 뭉치는 현상을 발견하였다. 대조군 리포솜의 경우에는 금 입자들끼리 뭉치게 되어 침전현상이 나타났다. 그러나 DOTAP1x 리포솜의 경우, 코팅시간에 영향을 받지 않고 입자의 크기가 일정하였다. DOTAP1x는 DOTAP2x 또는 DOTAP4x와 비교할 때 상대적으로 리포솜의 표면에 금 입자가 결합될 수 있는 양이온이 부족하므로 10분 동안 코팅을 진행하여도 리포솜의 표면에 금 입자의 결합이 완료된다. 또한 24시간 동안 코팅을 진행하여도 결합될 수 있는 양이온이 없기 때문에 금 입자가 결합되지 않아 입자의 크기가 증가하지 않았다. 그러나 DOTAP2x 또는 DOTAP4x는 DOTAP1x에 비하여 지속적으로 결합될 수 있는 양이온이 존재하기 때문에 24시간 코팅을 할 경우 리포솜의 크기가 증가하는 것으로 판단된다. 따라서 DOTAP1x 리포솜을 선택하여 금 입자의 코팅시간은 10분을 유지하며 이후 실험을 진행하였다.

금 입자의 코팅

금 입자가 리포솜의 표면에 코팅이 되면 리포솜 표면에서 금 입자의 산란도가 변화되기 때문에 빛에 대한 리포솜 수용액의 컬러가 변화된다(Fig. 4). Gold chloride 수용액은 노란색을 띄고 gold chloride + ascorbic acid 수용액은 보라색을 나타낸다. 그러나 GCL은 양이온성이 강해질수록 푸른색에서 보라색으로 변화되었다. 리포솜 수용액의 컬러가 변화된 것으로 보아, 금 입자가 리포솜의 표면에 코팅이 되었다는 것을 예측하였다(Fig. 4A). 한편, 강한 양이온을 나타내는 리포솜의 표면에 음이온을 나타내는 금 입자의 Au⁻ 이온이 정전기적 결합에 의하여 리포솜 표면에 붙은 후 ascorbic acid에 의해 Au⁻ 이온이 환원되어 리포솜 표면에 금 입자가 코팅이 된다. 이러한 상태를 UV-vis를 이용하여 580 nm에서 측정하였다(Fig. 4B).^{19,20} 이 결과로부터, 금 입자가 리포솜의 표면에 코팅이 된 것을 확인할 수 있었다. 대조군 리포솜 표면에 금 코팅을 한 경우, 넓은 범위에서 흡광도가 나타나는데 이는 리포솜 표면에 Au⁻ 이온의 결합이 미비하기 때문이며, 이때 리포솜은 뭉침현상이 발생하여 침전되는 것을 확인하였다. 따라서 중성이온에 대해서는 정전기적 결합력이 없기 때문에 금 입자가 리포솜의 표면에 결합되기가 어려우며, 혼합상태에서 gold chloride와 ascorbic acid 분자의 결합이 이루어진 것으로 판단된다. 결과적으로, 가장 안정적인 형태를 나타내는 DOTAP 1x (3:1:1) 리포솜을 이후 실험에서 사용하였다. 한편, GCL의 형태를 투과전자현미경(TEM)과 주사전자현미경(SEM)으로 확인한 결과, GCL은 구형을 나타내며 입자의 크기는 100 nm인 것을 확인하였다(Fig. 4C).

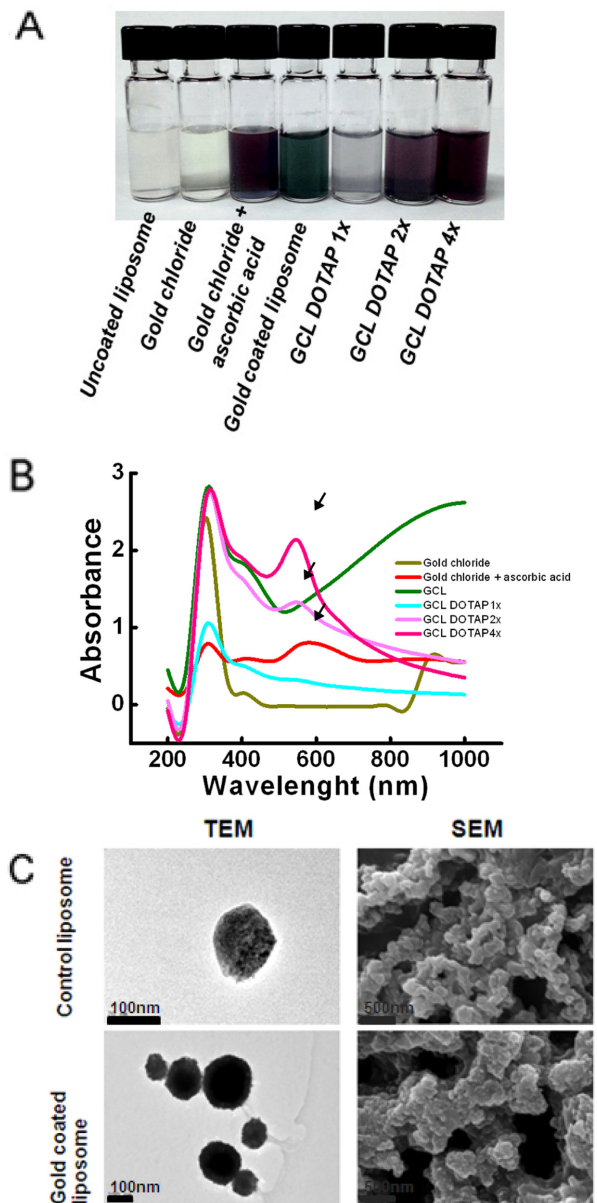


Figure 4. Gold coated liposomes. (A) Image of gold coated liposomes, (B) Absorbance of gold coated liposomes, (C) TEM and SEM images of liposomes either control liposomes or gold coated liposomes.

GCL 표면의 금 함량

GCL 표면의 금 입자 코팅은 에너지 분산형 엑스레이 측정기(EDS)와 유도결합 플라즈마(ICP)로 입자 표면의 Au 원소 분석과 Au 함량을 각각 측정하여 판단하였다(Fig. 5). EDS 결과로부터 GCL의 표면에 Au 이온이 존재하는 것을 확인하였고(Fig. 5A), ICP 결과로부터 GCL의 표면에 Au 이온이 25 ± 2.4 mg/L인 것을 확인하였다(Fig. 5B). 한편 Au 이온의 코팅 수율은 18% 였다.

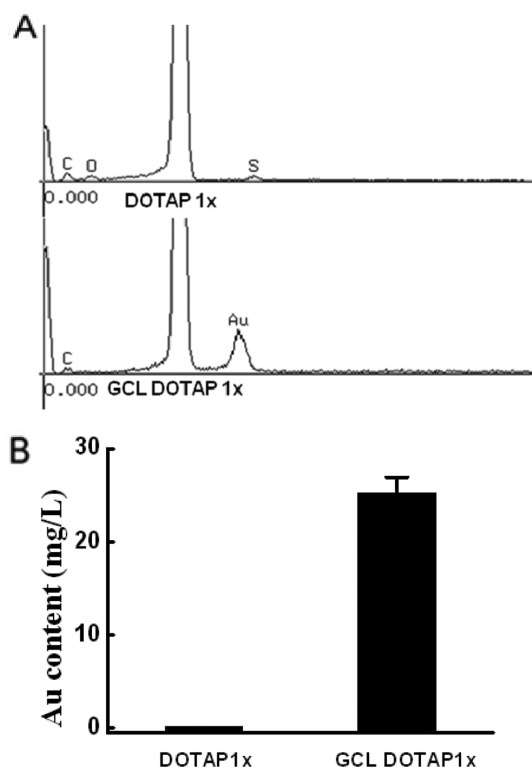


Figure 5. Au content on liposomal surface after gold coating. (A) Energy dispersive x-ray spectroscopy (EDS), (B) Inductively coupled plasma (ICP).

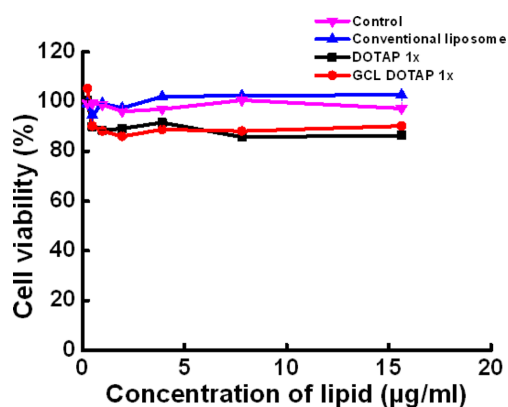


Figure 6. Cytotoxicity of liposomes by MTT assay after 4 hrs incubation at 37 °C. Mean and S. D. are shown (n=3).

GCL의 독성평가

금 입자 코팅 과정 중 첨가된 gold chloride와 ascorbic acid, 또는 양이온성 지질인 DOTAP에 대한 독성을 판단하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 모델 암세포주로는 난소암 모델인 SKOV3를 사용하였다. 본 연구에서 개발되어진 금 입자 코팅 리포솜은 난소암의 진단을 위한 것이기 때문에 GCL에 대한 세포 독성을 난소암 세포주를 활용하여 평가하였다. 금 입자를 코팅하기 전 양이온성 리

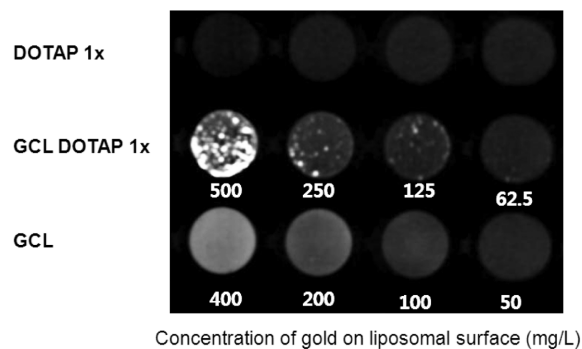


Figure 7. Computed tomography (CT) image of GCL.

포솜은 중성 리포솜(Conventional liposome)에 비하여 약 13.7–14.3%의 독성이 나타났다. 그러나 이것은 일반적인 양이온성 지질에 대한 독성이라고 판단된다. 그리고 DOTAP 리포솜에 금 입자를 코팅하였을 경우, GCL은 DOTAP 리포솜과 유사한 독성을 나타냈다. 따라서 금 입자 코팅과정 중의 GCL에서는 독성이 나타나지 않는다는 것을 확인하였다(Fig. 6).

GCL의 조영 효과

GCL의 조영 효과를 확인하기 위하여 CT촬영을 실시하였다(Fig. 7). CT촬영을 한 결과, GCL DOTAP 1x에서 우수한 조영 효과를 확인하였다. 본 결과로서 GCL은 CT 조영제로서 활용이 가능할 것이라 판단된다.

결론

약물 전달체로 이용되고 있는 리포솜으로 CT 조영이 가능하도록 하기 위해 리포솜 표면에 금 입자를 코팅하였다. 정전기적 결합력으로 음이온성 금 입자를 코팅하기 위해 양이온성 리포솜을 사용하였고 금 코팅에 대한 환원반응은 세포독성을 나타내지 않았으며 우수한 CT 조영 효과를 나타냈다. 따라서 GCL은 CT 조영제로서 활용이 가능할 것이라 판단되며, 향후 유사한 질병의 진단에 효과적으로 활용이 가능할 것이라 기대된다.

Acknowledgments. 이 연구는 교육과학기술부 도약과제(NRF-2009-0078434)의 연구비지원으로 연구되었음.

REFERENCES

- Hizoh, I.; Haller, C. *J. Clin. Lab. Res.* **2002**, *37*, 428–434.
- Haller, C.; Hizoh, I. *J. Clin. Lab. Res.* **2004**, *39*, 149–154.
- Jung, S. K.; Na, K. A.; Lee, S. A.; Chol, S. H.; Seong, H. S.; Shin, B. C. *Nano. Res. Lett.* **2012**, *7*, 462.

4. Kweon, S. J.; Lee, H. J.; Hung, W. J.; Suh, J. S.; Lim, J. S.; Lim, S. J. *Pharm Res.* **2010**, *27*, 1408–1415.
 5. Krause, W.; Schonborn, A.; Rupp, K. *J. Liposome Res.* **2011**, *21*(3), 229–236.
 6. Mühlen, A. Z.; Schwarz, C.; Mehnert, W. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *45*, 149.
 7. Allen, T. M. *Trends. Pharm. Sci.* **1994**, *15*, 215–220.
 8. Desjardins, R.; Krzystyniak, K.; Marie, H.; Banska, W.; Tancrede, P.; Fouriner, M. *Int. J. Immunopharm.* **1995**, *17*, 367–374.
 9. Jiang, T.; Zhang, Z.; Lv, H.; Zhou, J.; Li, C.; Hou, L.; Zhang, Q. *Biomaterials* **2012**, *33*, 9246–9258.
 10. Danila, D.; Partha, R.; Elrod, D. B.; Lackey, M.; Casscells, S. W.; Conyers, J. L. *Tex. Heart. Inst. J.* **2009**, *36*(5), 393–403.
 11. Forssen, E.; Willis, M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *29*, 249–271.
 12. Ghaghada, K.B.; Ravoori, M.; Sabapathy, D.; Bankson, J.; Kundra, V.; Annapragada, A. *Plos. One.* **2009**, *4*(10), e7628.
 13. Kim, D. K.; Park, S. J.; Lee, J. H.; Jeong, Y. Y.; Jon, S. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *24*(129), 7665.
 14. Paasonen, L.; Siplia, T.; Subrizi, A.; Laurinmaki, P.; Butcher, S. J.; Rappolt, M.; Yagmur A.; Urtti, A.; Yliperttula, M. *J. Cont. Rel.* **2010**, *147*, 136–143.
 15. Lee, M. Y.; Yang, J. A.; Jung H. S.; Baeck, S. G.; Choi, J. E.; Hur, W.; Koo, H. B.; Kim, K. M.; Yoon, S. K.; Hahn S. K. *ACS Nano.* **2012**, 9522–9531.
 16. Leung, S. J.; Romanowski, M. *ACS Nano.* **2012**, *6*(11), 9383–9391.
 17. Lee, H. J.; Lee, K. R.; Kim, I. K.; Park, T. G. *J. Biomaterials* **2008**, *29*, 4709–4718.
 18. Sarah J. L.; Timothy S. T.; Romanowski, M. *Nih. Publ. Acce.* **2010**, 7190.
 19. Pornpattananangkul, D.; Olson, S.; Aryal, S.; Sartor, M.; Huang, M.; Vecchio, K.; Zhang, L. *Nih. Publ. Acce.* **2010**, *4*(4), 1935–1942.
 20. Jin, Y.; Gao, X. *Nih. Publ. Acce.* **2009**, *131*(49), 17774–17776.
-