

가토 윤활막 세포에서 EBV-Based 플라스미드를 사용한 효율적인 유전자 발현

¹가톨릭대학교 의과대학 연구원 면역생물학연구소, ²한양대학교 의과대학 해부학교실

김진영¹ · 오상택¹ · 윤지희² · 이숙경¹

Highly Efficient Gene Expression in Rabbit Synoviocytes Using EBV-Based Plasmid

Jin Young Kim¹, Sang Taek Oh¹, Jeehee Youn² and Suk Kyeong Lee¹

¹Research Institute of Immunobiology, Catholic Research Institutes of Medical Science, Catholic University of Korea, ²Department of Anatomy and Cell Biology, Hanyang University School of Medicine

ABSTRACT

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disorder characterized by chronic synovial inflammation which leads to joint destruction. Gene therapy of RA targets the players of inflammation or articular destruction. However, viral vectors have safety problems and side effects, while non-viral vectors suffer from inefficient gene transfer and fast loss of gene expression. To overcome the limits of non-viral vectors, an EBV-based plasmid which is known to exert prolonged high level gene expression can be used. **Methods:** pEBVGFP, pEBVIL-10, and pEBVvIL-10 were constructed by cloning GFP, IL-10, and vIL-10 genes into an EBV-based plasmid, respectively. The pGFP was used as a control plasmid. Each constructs were lipofected into HIG-82 rabbit synoviocytes. The expression of GFP was monitored by FACS and confocal microscopy. IL-10 and vIL-10 expressions were measured by ELISA. **Results:** GFP expression 2 days after transfection was achieved in 33.2% of cells. GFP-expressing cells transfected with pGFP decreased rapidly from 4 days after transfection and disappeared completely by 11 days. Cells transfected with pEBVGFP began to decrease slowly from 4 days. But GFP expression was detected for over 35 days. In addition, HIG-82 cells transfected with pEBVIL-10 (44.6 ± 1.5 ng/ml) or pEBVvIL-10 (51.0 ± 5.7 ng/ml) secreted these cytokines at high levels. High level cytokine production by hygromycin selection was maintained at least for up to 26 days after transfection. **Conclusion:** These results suggest that the EBV-based plasmid has a potential to improve non-viral gene transfer system and may be applicable to treat RA without the drawbacks of viral vectors. (*Immune Network* 2004;4(3):190-197)

Key Words: Rheumatoid arthritis, EBV-based plasmid, IL-10, vIL-10, synoviocyte, rabbit

서 론

류마티스 관절염(rheumatoid arthritis, RA)은 단핵 세포의 침윤 (infiltration), 윤활막 세포의 이상 증식(hyperplasia), 신생 혈관 형성과 연골 조직 파괴를 동반하는 만성 염증성 자가 면역 질환이다(1,2). 이 가운데 염증성 사이토카인의 과도한 발현이 활막 내의 염증을 지속시키는 데 중심적인 역할을 한다는 사실은 이미 널리 알려져 있다(3). 따라서 soluble TNF- α receptor나 sIL-1R와 같은 수용체 길항제 혹은 사이토카인 결합 단백질 같은 재조합 단백질을 전달하여 염증을 억제함으로써 병의 진행과 관절의 파괴를 막는 치료제가 개발되어 많이 사용되고 있다(4,5). 하지만, 이러한 생물학적 제제들은 생체 내 반감기가 짧아 자주 투여해야 하며 가격이 비싸다는 문제

책임저자 : 이숙경, 가톨릭대학교 의과대학 연구원 면역생물학연구소
☎ 137-040, 서울시 서초구 반포동 505번지
Tel: 02-590-2396, Fax: 02-532-0575
E-mail: suklee@catholic.ac.kr

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터 연구 지원(과제번호: R11-2002-098-04006-0)으로 수행되었음.

점이 있다. 최근에는 이러한 단백질을 암호화한 유전자를 생체 내로 직접 전달하여 지속적인 치료 효과를 얻고자 하는 시도가 류마티스 관절염을 유발시킨 동물 모델에서 보고되고 있다(6,7). 특히 류마티스 관절염은 병소가 관절 부위에 집중되어 있어 유전자를 국소로 전달하기에 용이하므로 적은 부작용과 높은 치료 효과를 기대할 수 있다. 유전자 치료를 통하여 효과적으로 RA를 치료하기 위해서는 윤활막 세포에 많은 양의 유전자가 전달되고 전달된 유전자가 세포 내에서 높은 효율로 지속적으로 발현되어야 한다. 하지만, 현재까지 안전하면서도 발현 효율이 높은 유전자 전달 시스템은 개발되지 않았다.

류마티스 관절염의 유전자 치료에 적용된 벡터는 아데노 바이러스 벡터, 아데노 부속 바이러스 벡터(AAV), 레트로 바이러스 벡터, herpes simplex 바이러스 벡터가 있다. 이러한 바이러스성 벡터는 치료 유전자의 전달 효율은 높지만, 바이러스성 항원을 생산하여 염증 반응을 일으킬 수 있으며, 안전성에 대한 우려가 뒤따른다(8). 반면, 안전성이 높은 비바이러스성 벡터는 세포가 증식함에 따라 쉽게 소실되어 발현 효율이 낮다는 단점이 있다. 이러한 비바이러스성 벡터의 단점을 보완하기 위하여 Epstein-Barr virus (EBV)-based 플라스미드를 사용할 수 있다. EBV-based 플라스미드는 EBV nuclear antigen-1 (EBNA-1)과 복제 기점인 OriP를 가짐으로써 기존에 알려져 있는 플라스미드에 비하여 지속적이며 향상된 발현 효율을 기대할 수 있다(9,10). EBV는 숙주 세포 내에서 episomal DNA 형태로 존재하면서 잠재 감염상태를 유지하기 위해 EBV 핵 항원인 EBV nuclear antigen-1 (EBNA-1)과 복제 기점인 OriP를 필요로 한다. 이 두 요소를 포함하는 EBV-based 플라스미드는 전달된 세포의 핵 내에서 세포 증식에 맞추어 자가 복제를 하고 딸 세포로 나뉘어 들어감으로써 장기간 유지되는 특성을 가지게 된다(9). 이러한 특징 이외에도 EBNA-1은 nuclear localization 신호를 가짐으로써 핵으로의 이동이 촉진되고, OriP와 결합하여 전사 증폭제(transcriptional enhancer)로써 기능을 하게 된다(10). 이러한 EBV-based 플라스미드는 lympho-hematopoietic 세포주, hepatocellular carcinoma 세포주, cervical carcinoma 세포주 등의 여러 human 유래 세포주에서 그 효율성이 증명되었다(11,12). 또한 EBV가 human에 한정되어 감염되는 것과는 달리 EBV-based 플라스미드는 마우스(mouse)에서 유래된 세포 혹은 돼지(porcine)에서 유래된 세포에서도 높은 유전자 발현 효율을 보였다(12,13).

류마티스 관절염 활막 부위 내 염증성 사이토카인의 과도한 발현은 IL-10, soluble TNF-R IL-1Ra와 같은 염증을 억제하기 위한 인자의 발현도 향상시킨다. 그러나 그 발현량이 염증성 사이토카인과 비교할 때 상대적으로

매우 적어 염증 반응이 조절되지 못한다고 알려져 있다(1). 따라서 항염증성 사이토카인을 외부에서 병소 부위로 전달함으로써 염증을 조절하고자 하는 시도가 이루어지고 있다. 항염증성 사이토카인인 IL-10은 대식세포에 의한 염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α)의 생산을 억제하며, 직접적으로 T 세포를 억제하거나 혹은 IL-2의 생산을 억제함으로써 면역반응을 조절한다(14,15). 특히 RA 환자로부터 분리 후 배양된 synovial membrane에 IL-10을 처리하였을 때 TNF- α 와 IL-1 β 등의 염증성 사이토카인들의 발현이 감소된다는 보고가 있어 IL-10이 RA를 치료하기 위한 타겟 유전자로 적합하다(16). 한편 Epstein-Barr virus에 의해 암호화된 viral IL-10 (BCRF1 유전자의 산물)은 human IL-10과 84%의 동일한 아미노산 서열을 가질 뿐만 아니라 IL-10과 기능적으로도 매우 유사하고, MHC class II 발현을 down-regulation함으로써 IL-2 분비와 항원 특이 T 세포 증식을 감소시킨다(17). 특히 vIL-10 (BCRF1)은 IL-10처럼 염증을 조절하는 기능은 가지지만 Th2 활성을 향상시키지 않아 체액성 면역을 유발하지 않는 장점을 가진다(18). vIL-10이 과도한 염증성 사이토카인의 발현이 나타나는 류마티스 관절염에 좋은 치료 유전자로 사용될 것으로 기대된다. 본 연구에서는 마커유전자(GFP) 혹은 치료유전자(IL-10, vIL-10)가 발현되도록 제작된 EBV-based 플라스미드를 가토(rabbit)의 윤활막 세포주에 전달하여 발현 지속성 및 효율을 확인함으로써 RA를 유도시킨 가토 동물 모델에서의 EBV-based 플라스미드 적용 가능성을 가늠하고 류마티스 관절염의 유전자 치료를 위한 사용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

세포주 배양. Burkitt's lymphoma 세포주인 BJAB 세포주와 EBV 양성 세포주인 B95-8 및 SNU-719 세포주는 10% 우태아 혈청(Fetal Bovine Serum, Gibco, Grand Island, NY), penicillin-streptomycin (10,000 U/ml, Gibco)과 Fungizone (10,000 U/ml, Gibco)이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco)에서 배양하였으며, 트랜스펙션(transfection)을 하기 위한 가토의 윤활막 세포인 HIG-82 세포주(ATCC, CRL-1832)는 같은 조건의 Ham's F12 배지(Gibco)로 배양하였다.

IL-10에 대한 mRNA 추출 및 vIL-10에 대한 DNA 추출. BJAB, B95-8 그리고 SNU-719 세포주를 1 μ g/ml의 지질 다당질(lipopolysaccharide, Sigma, St. Louis, MO)로 자극하여 1×10^7 개의 세포를 모았다. IL-10의 cDNA를 역전사 반응 후 PCR로 증폭하여 클로닝하기 위해 모인 BJAB 세포에 RNazol B (Tel-Test, Friendswood, Texas)를 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 또한 vIL-10 유전자를 PCR로 증폭하기 위하여 모인 B95-8과 SNU-719 세포주

에 Phenol-CHCl₃을 처리하여 DNA를 추출하였다. **RT-PCR 및 PCR.** IL-10에 대한 cDNA를 합성하기 위하여 분리된 총 RNA를 주형으로 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 5 mM MgCl₂, dNTPs (각 1 mM씩), 250 nM oligo dT, 40U Ribonuclease Inhibitor (Takara, Shiga, Japan), 2.5U AMV Reverse Transcriptase XL (Takara)을 포함하도록 하여 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 99°C에서 5분 반응하였다. 합성된 cDNA와 B95-8 그리고 SNU-719 세포주로부터 분리한 DNA를 주형으로 PCR 과정을 수행하였다. PCR은 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), dNTPs (각 0.25 mM씩), 250 nM forward 및 reverse primer, 1.5U recombinant Taq DNA polymerase (Takara)를 포함하며 95°C에서 5분의 변성 과정을 거친 후에 94°C에서 30초, 60°C에서 10초, 72°C에서 30초로 총 40 cycle을 증폭한 후 72°C에서 10분 반응하였다. 본 실험에 사용된 IL-10과 (forward: 5'-cccaagctt atgcacagctcagcactgct, reverse: 5'-ccgctcgag tcagtttcg tatcttcattg), vIL-10 (forward: 5'-cccaagctt atggagcgaaggttagt ggt, reverse: 5'-ccgctcgag tcacctggcttaattgtca) 특이 primer에는 forward 5' 쪽에 Hind III 제한 효소 인식 서열과 reverse 5' 쪽에 Xho I 제한 효소 인식 서열을 각각 넣어 제작하였다. **EBV-based 플라스미드 제작.** 본 연구에서는 HIG-82 세포주에 트랜스펙션을 실시하기 위하여 5 종류의 플라스미드가 사용되었다. pEBVGFP는 이미 발표된 바와 같이 (12) pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA)를 Nhe I와 BamH I 제한 효소로 자른 후 pEGFP-C1 (Clontech, Palo Alto, CA)으로부터 동일한 효소로 잘라낸 GFP 유전자를 삽입하여 얻었으며, pGFP는 pEBVGFP를 Bbs I 제한효소로 잘라 EBNA-1, OriP를 제거한 것으로 EBV-based 플라스

미드와의 발현 지속성 등을 비교하기 위한 control로 사용되었다(12). pEBVIL-10과 pEBVvIL-10를 제작하기 위하여(Fig. 1) IL-10의 RT-PCR 산물과 vIL-10의 PCR 산물을 Hind III와 Xho I 제한 효소로 처리하여 절단하였다. pCEP4 (Invitrogen) 역시 동일한 제한 효소들로 절단하였다. 절단된 DNA는 0.8% 아가로스 겔에 전기영동하여 IL-10 (555 bp), vIL-10 (531 bp), pCEP4 (10.2 kb)의 단편을 확인 후 gel extraction kit (Viogene, Sunnyvale, CA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 1% 아가로스 겔에 내려 각각의 농도를 비교하였으며, 벡터 DNA: 삽입하고자 하는 DNA의 몰(mole) 비율이 1 : 5가 되도록 T4-DNA ligase (Takara)를 이용하여 접합하였다. 접합 후 DH5α 박테리아에 형질 전환하여 형성된 콜로니에서 pEBVIL-10과 pEBVvIL-10를 정제하였으며, 염기서열분석으로 확인하였다. **HIG-82 세포로의 유전자 전달 및 트랜스펙트된 세포 선별.** 트랜스펙션은 세포를 접종한 후 plate를 60~70% 정도 채울 때 수행하였다. Lipofectamine (Invitrogen)과 DNA를 Opti-MEM I (Invitrogen)에 섞은 후 실온에서 40분 동안 방치하여 Lipofectamine/DNA 복합체가 형성되도록 하고, 복합체가 형성되는 동안 HIG-82 세포가 접종된 plate를 우태아 혈청이 포함되지 않은 Ham's F12 배지로 3회 수세하였다. Lipofectamine/DNA 복합체를 세포에 가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5시간 동안 배양한 후 10% 우태아 혈청이 포함된 Ham's F12 배지로 교환하였다. pEBVIL-10, pEBVvIL-10, pEBVTK의 트랜스펙션 효율을 조사하고 하이그로마이신에 의한 선별 과정을 쉽게 모니터하기 위하여 green fluorescent protein (GFP)을 발현하도록 기존에 제작한 pEBVGFP (12)를 대상 플라

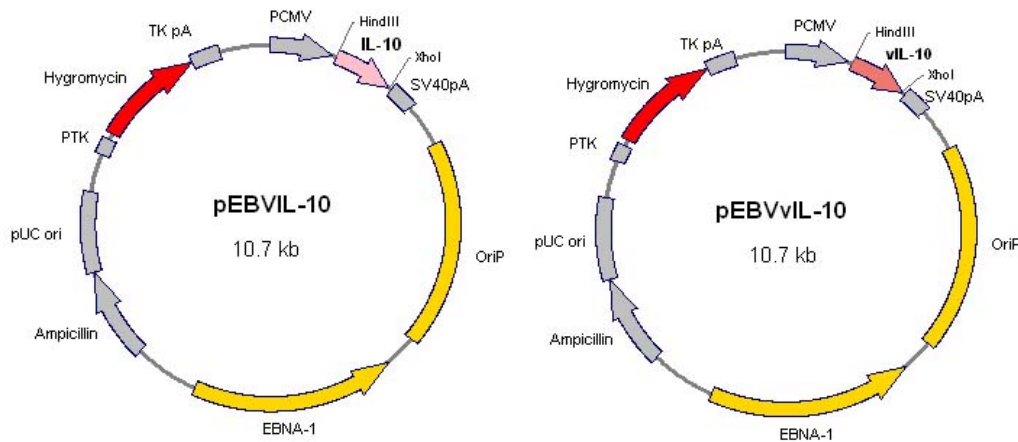


Figure 1. Schematic representation of pEBVIL-10 and pEBVvIL-10. All EBV-based plasmids contain nuclear antigen-1 (EBNA-1) and the origin of EBV replication (OriP). The resistance gene for hygromycin and ampicillin and a prokaryotic plasmid origin of replication are also present in all the plasmids.

스미드와 1 : 1 (w/w)로 섞어 사용하였다. 트랜스펙션 2일 후부터 하이그로마이신 B (hygromycin B, Sigma)를 처리하며 선별 과정을 형광현미경을 이용하여 관찰하였다.

유세포 분석(Flow Cytometry). HIG-82 세포주에 트랜스펙션하기 위한 최적 조건을 결정하기 위하여 유세포 분석을 실시하였다. pEBVGFP와 Lipofectamine (invitrogen)의 복합체가 트랜스펙트된 세포들은 trypsin-EDTA (Gibco)를 처리하여 수확하고, 10% 우태아 혈청이 포함된 배지를 넣어 섞어 준 후 5분 동안 1,500 rpm에서 원심 분리하였다. 수확된 세포들은 phosphate-buffered saline (PBS)으로 2회 세척하였으며, 상층액을 제거한 후 1 mg/ml의 propidium iodide (PI, Sigma)와 2% 우태아 혈청이 포함된 Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)에 섞어 주었다. 유세포 분석은 FACS Vantage SE (Becton Dickinson, Mountain View, CA)를 사용하여 수행하였다.

Confocal microscopy. 트랜스펙션된 세포는 confocal microscope (Bio-Rad MRC-1024, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 사용하여 488 nm 파장에서 촬영하였다.

Sandwich ELISA. pEBVIL-10과 pEBVvIL-10이 전달된 세포에서 IL-10과 vIL-10이 발현되는 기간 및 발현량을 측정하기 위하여 ELISA를 수행하였다. 세포를 24-well plate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 3×10^4 cells/well로 접종한 후 24시간 후 트랜스펙션하였으며, 3~4일마다 세포 배양 상층액을 모아 -70°C 에서 보관하였다. IL-10의 경우 monoclonal anti-human IL-10 antibody (clone 23738; R&D System, Minneapolis, MN), vIL-10의 경우 rat anti-human IL-10 and viral IL-10 monoclonal antibody (clone JES3-9D7; Pharmingen, San Diego, CA)로 96-well MaxiSorb surface plate (Nunc)에 well당 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 4°C 에서 12시간 반응시킨 후 차단 용액 (1% BSA/PBST)을 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 넣고 실온에서 2시간 두었다. IL-10 standard로는 recombinant human IL-10 (R&D System), vIL-10 standard로는 recombinant EBV viral IL-10 (R&D System)를 사용하였으며, standard와 측정하고자 하는 세포 배양 상층액을 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. Tween-20이 0.05% 포함된 PBS로 4번 세척한 후 biotinylated anti-human IL-10 antibody (R&D System)나 biotinylated rat anti-viral IL-10 monoclonal antibody (Pharmingen)을 well 당 500 ng/ml으로 분주 후 2시간 반응시켰다. 세척 용액으로 4번 세척 후 ExtraAvidin-Alkaline Phosphatase conjugate (Sigma)를 1 : 2,000으로 희석하여 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 넣고 실온에서 2시간 반응시킨 후, DEA 용액(Diethanolamine 97 ml, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0.2 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, 증류수 800 ml)에 p-nitrophenyl phosphate (Sigma)를 1 mg/ml 농도로 녹여 well 당 50 μl 씩 분주하였다. 흡광도는 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로 405 nm 파장에서 측정하였다.

결 과

Lipofectamine을 이용한 유전자 전달 효율. 최적의 트랜스펙션 조건을 확립하기 위하여 HIG-82 세포주를 12-well plate에 5×10^4 cells/well로 접종 후 pCEP4와 1 : 1 (w/w)로 섞은 pEBVGFP를 Lipofectamine을 이용하여 트랜스펙션하였다. DNA를 0.2~0.8 μg 으로 증가시키며 1 μl 혹은 2 μl 의 Lipofectamine을 사용하여 lipofection을 실시하였다. 트랜스펙션 24시간 후 confocal microscope를 사용하여 관찰한 결과 0.6 μg 의 DNA와 2 μl 의 Lipofectamine을 사용한 조건에서 가장 높은 발현 효율을 보였다. 유세포 분석은 세포를 6-well plate에 5×10^5 cells/well로 접종하여 well의 면적이 증가된 비율로 DNA와 Lipofectamine양을 증가시켜 트랜스펙션 후 실시하였으며, 12-well일 때 0.6 μg 의 DNA와 2 μl 의 Lipofectamine을 사용하였을 경우와 동일한 비율로 증가시켜 6-well에 트랜스펙션하였을 경우에서 33.2%의 세포가 GFP를 발현하는 것을 확인하여 최적의 트랜스펙션 조건을 확립하였다(Fig. 2). 이후의 모든 실험은 이와 동일한 조건에서 트랜스펙션 시켜 수행하였다.

EBV-based 플라스미드에 의한 지속적 GFP 발현. EBV-based 플라스미드에 의한 GFP의 발현이 오래 지속되는 것을 확인하기 위하여 pEBVGFP와 control 플라스미드인 pGFP를 HIG-82 세포주에 각각 트랜스펙션 하였다(Fig. 3). pEBVGFP와 pGFP는 동일 mole 수의 DNA를 사용하였고 기타 세포 수, lipofectamine 양 등 다른 트랜스펙션 조건도 모두 동일하게 하여 실험하였다. 트랜스펙션 24시간 후 pEBVGFP가 전달된 경우 pGFP가 전달된 경우보다 형광을 발현하는 세포가 2배 이상 많은 것을 confocal microscope를 사용하여 관찰하였다. pGFP가 전달된 세포에서는 트랜스펙션 후 서서히 형광이 감소하다 4일 후부터 빠르게 형광이 소실되었으며, 11일 이후에는 형광이 완전히 사라졌다. pEBVGFP가 전달된 세포에서도 4일 이후부터 형광이 서서히 줄어들기 시작하였으나, 35일이 지난 후에도 여전히 형광을 발현하였다. 따라서 가토(rabbit)의 율활막세포에서 EBV-based 플라스미드가 효율적이며 지속적으로 유전자를 발현한다는 것을 확인하였다.

하이그로마이신에 의한 transfectant 선별. pCEP4와 1 : 1 (w/w)로 혼합한 pEBVGFP와 pGFP를 각각 트랜스펙션한 세포들을 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 하이그로마이신을 처리하여 선별 과정을 confocal microscope로 관찰하였다. 하이그로마이신 농도를 증가시키며 실험을 실시한 결과 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 트랜스펙션 된 세포들까지 사멸이 유도되었으며, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 transfectant의 선별이 되지 않았다(data not shown). 따라서 5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도의 하이그로

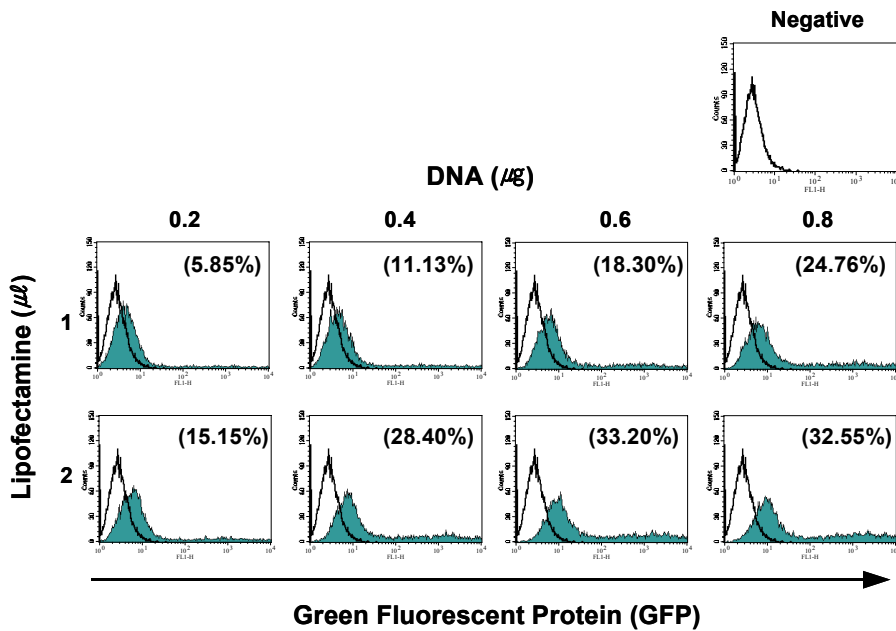


Figure 2. FACS analysis quantifying GFP expression in HIG-82 cells. Analysis of GFP expression was carried out 24 h after transfection by PI staining. Values within the parentheses indicate the percentage of GFP expressing cells.

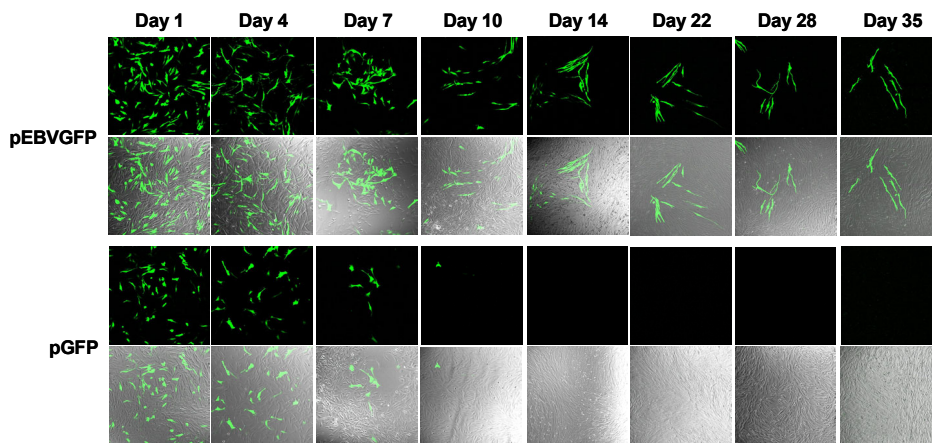


Figure 3. Prolonged gene expression in rabbit synoviocytes following lipofection with the EBV-based plasmid. HIG-82 cells were transfected with pEBVGFP or pGFP. At different time points, GFP expression was analyzed by confocal microscope (100×objective).

마이신으로 세포 선별을 실시하였다(Fig. 4). 하이그로마이신 처리 1일 후 관찰한 결과 pEBVGFP나 pGFP가 전달된 세포 모두 형광이 더 밝아지고 강해졌으며 2일 후부터 트랜스펙션되지 않은 세포들이 사멸되기 시작하였다. 선별 과정이 5일 정도 진행된 후 pEBVGFP가 전달된 세포에서는 GFP를 발현하는 세포가 점차 증가한 반면, pGFP를 트랜스펙션한 세포에서는 GFP를 발현하는 세포가 감소하기 시작하였다. pEBVGFP를 전달된 세포들을 관찰한 결과 10μg/ml의 하이그로마이신으로 선별하였을 경우 14일 경과 후 60% 정도의 세포가 GFP를 발현하였으며, 28일 후 90% 이상의 세포에서 GFP를 발현하였다. 반면, pGFP가 전달된 세포의 경우 28일 경과 후 세포의 대부분에서 GFP가 소실되었다. pEBVGFP가 전달된 세포를 5μg/ml의 농도의 하이그로마이신으로 선별하였을 경우에는 15일까지 GFP를 발현하는 세포가 증가하다

점차 감소하는 것을 관찰하였다.

EBV-based 플라스미드를 통한 IL-10과 vIL-10 유전자 전달 후 발현. HIG-82 세포주를 24-well plate에 3×10^4 cells/well로 접종하고 다음날 pEBVIL-10이나 pEBVvIL-10, 혹은 control 플라스미드인 pCEP4를 각각 트랜스펙션 하였다. 이때 형광을 나타내는 pEBVGFP를 이들 DNA와 1 : 1 (w/w)로 섞어서 co-transfection함으로써 유전자 발현 확인과 transfection efficiency 비교를 할 수 있게 하였다. 트랜스펙션 1일 후 형광현미경으로 관찰한 결과, 30% 이상의 세포가 형광을 발현하는 것을 확인하여 트랜스펙션 효율성을 확인하였다 (data not shown). 트랜스펙션 후 3~4일 간격으로 하이그로마이신(10μg/ml)이 포함되거나 포함되지 않은 배양액으로 교환하였으며, 모아진 세포 배양 상층액은 -70°C에 보관하였다. pEBVIL-10이 전달된 세포의 경우 하이그로마이신으로 선별하지 않았

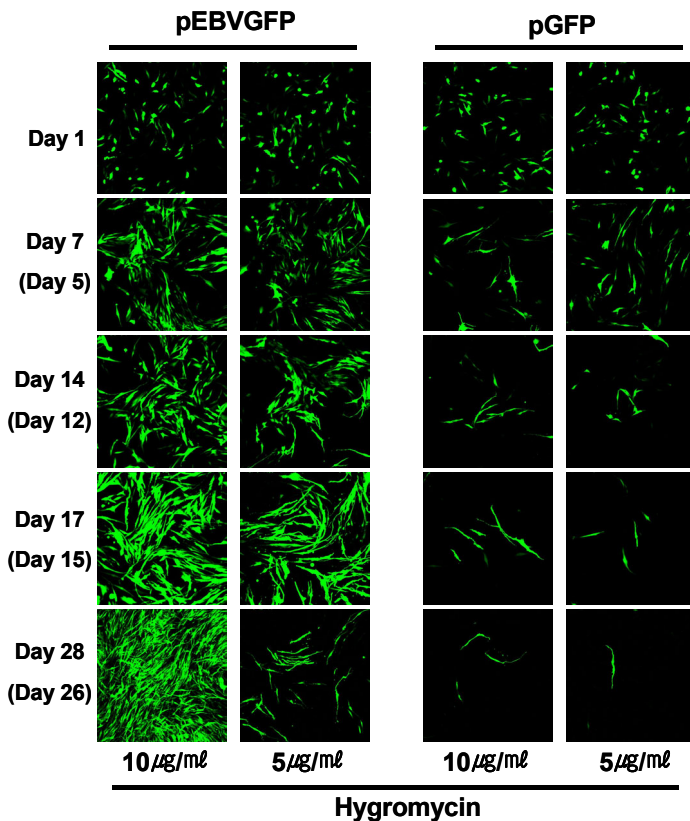


Figure 4. Selection of the transfected rabbit synovial cells by hygromycin treatment. HIG-82 cells were lipofected with pEBVGFP or pGFP. Two days after transfection, the cells were cultured in a media containing hygromycin. Days represent the duration after transfection and the days in the parentheses denote the duration of hygromycin treatment. The cells were observed using confocal microscope (100×objective).

을 때 트랜스펙션 1일 후 3.2 ± 1.2 ng/ml의 IL-10이 검출되었으며, 트랜스펙션 후 10일이 경과 되었을 때 44.6 ± 1.5 ng/ml로 가장 높은 양이 검출되었다. 트랜스펙션 2일 후부터 하이그로마이신으로 선별한 경우 선별 전 (트랜스펙션 1일 후) IL-10이 4.4 ± 0.4 ng/ml 검출되었으나 선별 1일 후(트랜스펙션 3일 후) 측정 결과 75.5 ± 2.6 ng/ml로 검출량이 현저하게 증가하였으며, 하이그로마이신으로 처리한 24일 후까지 지속적으로 검출량이 증가하여 494.4 ± 4.8 ng/ml의 IL-10이 검출되었다(Fig. 5A). pEBVvIL-10이 전달된 세포의 경우 하이그로마이신으로 선별하지 않았을 때 트랜스펙션 1일 경과 후 3.3 ± 1.1 ng/ml의 vIL-10이 검출되었으며, 6일 후에 51.0 ± 5.7 ng/ml로 검출량이 가장 높게 증가되었다. 하이그로마이신을 처리하였을 경우에는 선별하기 전 39.8 ± 9.4 ng/ml의 vIL-10이 검출되었고, 3일간 하이그로마이신을 처리한 후 330.7 ± 4.6 ng/ml로 검출량이 크게 증가하였다. vIL-10의 발현은 선별 24일 후(트랜스펙션 26일 후)까지 지속적으로 증가하여 1197.0 ± 23.8 ng/ml이 검출이 검출되었다(Fig. 5B). 반면, control 플라스미드인 pCEP4를 트랜스펙션하였을 경우 트랜스펙션 후 3일째 IL-10은 0.2 ± 0.2 ng/ml, vIL-10은 0.5 ± 0.1 ng/ml로 거의 검출되지 않았다(data not shown).

고 찰

본 연구에서는 가토의 윤활막 세포에 EBV-based 플라스미드(pEBVGFP)를 사용하여 유전자를 전달하였을 경우 일반적인 플라스미드인 pGFP와의 유전자 발현 패턴을 비교하였다. 흥미롭게도 트랜스펙션 1일 후 pEBVGFP를 전달하였을 경우의 GFP발현이 동일 몰 수의 pGFP를 전달하였을 경우와 비교할 때 2배 이상 높았으며, 이는 EBNA-1이 OriP에 결합함으로써 전사 증폭제로써 작용하여(10) 나타난 결과로 생각된다. 이처럼 EBV-based 플라스미드가 일반적인 플라스미드보다 높은 유전자 발현을 나타낸 예로는 human embryonic kidney 세포주인 293세포에 EBNA-1만을 발현하도록 만든 플라스미드를 트랜스펙션한 후 OriP를 전달하였을 경우 OriP가 전달되지 않은 경우와 비교하였을 때 훨씬 증가된 유전자 발현률을 보인다는 보고 등을 들 수 있다(19).

본 실험에서 사용한 세포주는 가토에서 유래된 윤활막 세포이다. 가토는 류마티스 관절염 연구를 위한 동물 모델로 사용되고 있는데, 이는 관절염이 유발된 가토에서 인체에서와 유사하게 관절 내 염증 및 연골 손상 등이 나타나며, 급성 상태는 대략 1주, 만성 단계는 몇 달까지 지속되는 특징을 가지기 때문이다(20,21). 현재까지 human에서 유래된 세포 외에 돼지 췌장(porcine pan-

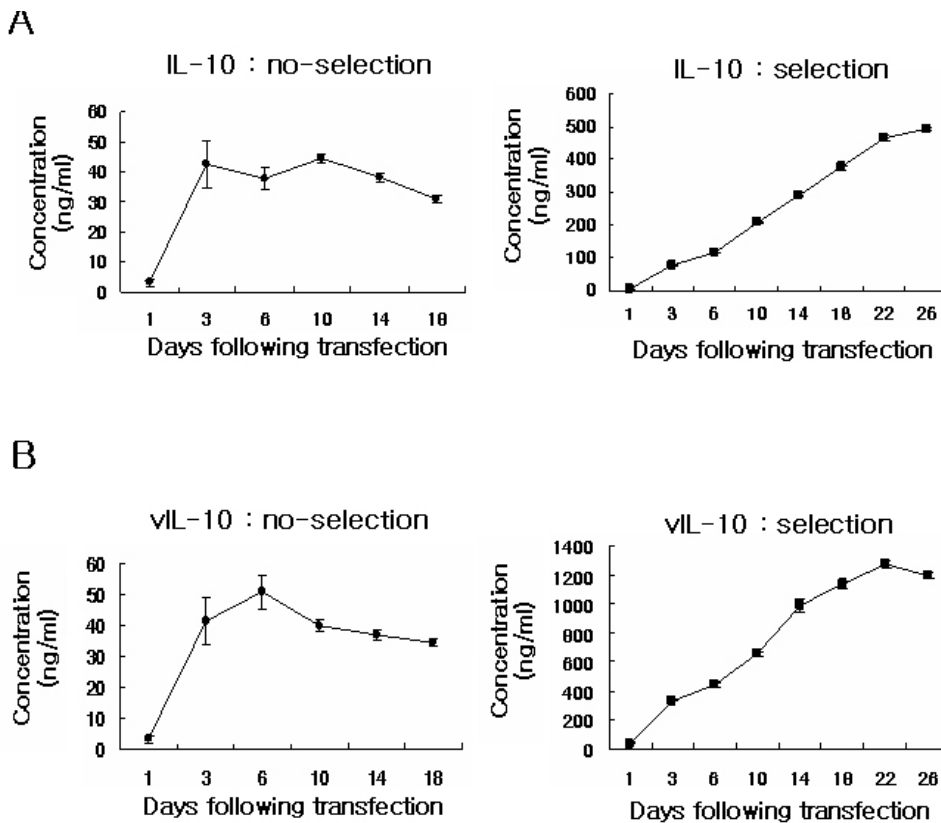


Figure 5. Prolonged IL-10 and vIL-10 expression using EBV-based plasmid. HIG-82 cells were plated in 24-well plates and lipofected with 1 : 1 (w/w) mixture of pEBVIL-10 and pEBVGFP, or pEBVvIL-10 and pEBVGFP. Transfected cells were cultured in the presence or absence of hygromycin (10µg/ml). The amount of IL-10 (A) or vIL-10 (B) secreted into the medium was measured by ELISA. Results are mean±SD from four (selection) or seven (no-selection) independent experiments conducted in triplicate.

creatic) 세포(12), 마우스 폐 (mouse lung) 내피 세포(13)에서 EBV-based 플라스미드에 의한 지속된 유전자 발현이 확인된 바 있으나, 아직 가토에서 유래된 세포에 EBV-based 플라스미드를 적용한 예는 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 가토의 윤활막 세포에 GFP 마커 유전자가 클로닝된 EBV-based 플라스미드를 전달함으로써 35일 이상 유전자 발현이 지속되는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 EBV-based 플라스미드를 류마티스 관절염 치료에 응용하고자 하는 연구에 가토 동물 모델이 유용하게 쓰일 수 있는 가능성을 제시한다.

본 실험에 사용된 EBV-based 플라스미드는 하이그로마이신 선별 유전자를 가진다. 이러한 선별 유전자는 *in vitro*에서 실험할 경우 EBV-based 플라스미드가 세포에서 쉽게 소실되지 않도록 해주며, 전달하고자 하는 유전자를 가지는 세포들만 선별하여 실험할 수 있도록 해준다. pEBVGFP가 전달된 가토의 윤활막 세포는 20µg/ml 이상의 하이그로마이신에서는 매우 높은 세포 사멸이 관찰되었으며, 그보다 낮은 농도인 10µg/ml의 하이그로마이신으로 26일 동안 처리하였을 경우 GFP를 발현하는 세포들만이 선별되었다. 따라서 트랜스펙션된 세포 선

별을 위해 위암 세포주(human gastric carcinoma cells)인 SNU-638에서 100µg/ml, 간암 세포주 (human hepatocarcinoma cells)인 HepG2의 경우 300µg/ml, 자궁 경부암 세포주 (human cervical carcinoma cells)인 HeLa의 경우 400 µg/ml의 하이그로마이신이 필요하다는 기존의 연구 결과들과(12,22) 비교하였을 경우 가토의 윤활막 세포인 HIG-82 세포가 하이그로마이신에 매우 민감하다는 것을 알 수 있다.

본 연구에서 사용된 IL-10과 vIL-10은 Th1 세포로부터 생산되는 염증성 사이토카인들의 생산을 억제하는 항염증성 사이토카인으로써 collagen-induced arthritis (CIA) 동물 모델에 전달하였을 때 염증을 억제시킬 수 있지만, 이들 유전자를 전달할 때 바이러스성 벡터를 사용함으로써 여러 문제점이 나타난다고 보고된 바 있다(17,23). 따라서 본 실험에서는 안전하게 사용할 수 있는 EBV-based 플라스미드를 사용하여 IL-10과 vIL-10 유전자를 전달하였을 경우의 발현 효율을 확인하였다. 트랜스펙션 3일 후 선별하지 않은 세포군에서 IL-10과 vIL-10은 모두 40 ng/ml 이상을 발현하는 것을 확인하였다. 동일한 세포에서 실험된 예는 찾을 수 없지만, 이러한 발현률

은 기존에 망막색소 상피세포(human retinal pigment epithelial cells)에서 IL-10을 발현하도록 한 플라스미드를 트랜스펙션한 후 3일이 경과되었을 경우의 발현량이 10.3 ± 0.1 ng/ml인 경우와(24) 내피 세포 세포주인 SVEC4-1에서 IL-10이 클로닝된 플라스미드를 전달 시 48시간 후에 IL-10 농도가 1209 ± 2 pg/ml 인 경우와(25) 비교할 때 EBV-based 플라스미드를 사용함으로써 발현율이 향상된 것이라고 생각할 수 있다. 특히 하이그로마이신으로 선별한 세포군에서는 동일한 기간에 IL-10은 75.5 ± 2.6 ng/ml, vIL-10은 330.7 ± 7.5 ng/ml이 발현되는 것을 확인함으로써 하이그로마이신 처리에 의한 transfectant의 선별 효율성을 확인할 수 있었다. 두 사이토카인 유전자 모두 동일한 CMV 프로모터에 의해 발현되도록 클로닝되었음에도 불구하고 동일한 조건에서 transfectant를 선별하였을 경우 vIL-10의 발현량이 IL-10보다 4배 가량 더 증가되었다. 이는 vIL-10 단백질이 IL-10 단백질보다 더 안정적이어서 세포 배양액 내에서 반감기가 길거나 IL-10이 일정 수준보다 과발현 되면 세포에 독성을 나타내는 등의 이유로 설명할 수 있을 것이나 정확한 이유를 밝혀려면 더 많은 연구가 필요할 것이다.

이상의 연구에서 가토의 윤활막 세포에서 EBV-based 플라스미드를 사용하여 지속적이며 효율적인 유전자 발현을 확인하였다. 본 연구는 EBV-based 플라스미드를 이용한 개선된 유전자 전달 시스템 개발 연구가 류마티스 관절염의 가토 동물 모델에서 수행될 수 있는 근거를 제시한다. 하지만 이를 위해서는 in vivo로 EBV-based 플라스미드를 보다 효율적으로 전달할 수 있는 방법 개발이 선행되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN: Rheumatoid Arthritis. *Cell* 85;307-310, 1996
- Robbins PD, Evans CH, Chernajovsky Y: Gene therapy for arthritis. *Gene Ther* 10;902-911, 2003
- Feldmann M, Brennan FM, Maini, RN: Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14;397-440, 1996
- Vervoordeldonk MJ, Tak PP: Gene therapy in rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15;771-788, 2001
- Afeltra A: Treatment of Rheumatoid arthritis: New Therapeutic Approaches with Biological Agents. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 1;45-65, 2001
- Boissier MC, Bessis N: Therapeutic gene transfer for rheumatoid arthritis. *Reumatismo* 56;51-61, 2004
- Bessis N, Doucet C, Cottard V, Douar AM, Firat H, Jorgensen C, Mezzina M, Boissier MC: Gene therapy for rheumatoid arthritis. *J Gene Med* 4;581-591, 2002
- Ghivizzani SC, Oligino TJ, Glorioso JC, Robbins PD, Evans CH: Direct gene delivery strategies for the treatment of rheumatoid arthritis. *Drug Discov Today* 6;259-267, 2001
- Middleton T, Sugden B: Retention of plasmid DNA in mammalian cells is enhanced by binding of the Epstein-Barr virus replication protein EBNA1. *J Virol* 68;4067-4071, 1994
- Mazda O: Improvement of Nonviral Gene Therapy by Epstein-Barr Virus (EBV)-based Plasmid Vectors. *Curr Gene Ther* 2;379-392, 2002
- Mucke S, Polack A, Pawlita M, Zehnpfennig D, Massoudi N, Bohlen H, Doerfler W, Bornkamm G, Diehl V, Wolf J: Suitability of Epstein-Barr virus-based episomal vectors for expression of cytokine genes in human lymphoma cells. *Gene Ther* 4;82-92, 1997
- Min KA, Oh ST, Yoon KH, Kim CK, Lee SK: Prolonged gene expression in primary porcine pancreatic cells using an Epstein-Barr virus-based episomal vector. *BBRC* 305;108-115, 2003
- Zhang J, Wilson A, Alber S, Ma Z, Tang ZL, Satoh E, Mazda O, Watkins S, Huang L, Pitt B, Li S: Prolonged gene expression in mouse lung endothelial cells following transfection with Epstein-Barr virus-based episomal plasmid. *Gene Ther* 10;822-826, 2003
- Taga K, Tosato G: IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 148;1143-1148, 1992
- Schulze-Koops H, Kalden JR: The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15;677-691, 2001
- Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M: Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 179;1517-1527, 1994
- Ma Y, Thornton S, Duwel LE, Boivin GP, Giannini EH, Leiden JM, Bluestone JA, Hirsch R: Inhibition of Collagen-Induced Arthritis in Mice by Viral IL-10 Gene Transfer. *J Immunol* 161;1516-1524, 1998
- Evans CH, Ghivizzani SC, Kang R, Muzzonigro T, Wasko MC, Herndon JH, Robbins PD: Gene therapy for rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 42;1-16, 1999
- Langle-Rouault F, Patzel V, Benavente A, Taillez M, Silvestre N, Bompard A, Sczakiel G, Jacobs E, Rittner K: Up to 100-Fold Increase of Apparent Gene Expression in the Presence of Epstein-Barr Virus oriP Sequences and EBNA1: Implications of the Nuclear Import of Plasmids. *J Virol* 72;6181-6185, 1998
- Otani K, Nita I, Macaulay W, Georgescu HI, Robbins PD, Evans CH: Suppression of antigen-induced arthritis in rabbits by ex vivo gene therapy. *J Immunol* 156;3558-3562, 1996
- Henderson B, Glynn LE: Metabolic alterations in the synovocytes in chronically inflamed knee joints in immune arthritis in the rabbits: comparison with rheumatoid arthritis. *Br J Exp Pathol.* 62;27-33, 1981
- 오상택, 민경아, 김종국, 이숙경: HSV-TK 유전자를 암호화하는 EBV 유래 플라스미드를 이용한 유전자 치료. *약제학 회지* 33;267-272, 2003
- Lubberts E, Joosten LA, Van Den Bersselaar L, Helsen MM, Bakker AC, Xing Z, Richards CD, Van Den Berg WB: Intra-articular IL-10 gene transfer regulates the expression of collagen-induced arthritis (CIA) in the knee and ipsilateral paw. *Clin Exp Immunol* 120;375-383, 2000
- Enzmann V, Hollborn M, Poschinger K, Wiedemann P, Kohlen L: Immunosuppression by IL-10-transfected human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Curr Eye Res* 23;98-105, 2001
- Sasaki M, Jordan P, Houghton J, Meng X, Itoh M, Joh T, Alexander JS: Transfection of IL-10 expression vectors into endothelial cultures attenuates alpha4beta7-dependent lymphocyte adhesion mediated by MAdCAM-1. *BMC Gastroenterol* 3;3-10, 2003