

변이 도파민 2 수용체와 나트륨 옥소 공동 수송체 이입유전자의 이중 리포터시스템 개발

서울대학교 뇌과학 협동과정,¹ 서울대학교 의과대학 핵의학교실²
황도원^{1,2} · 이동수^{1,2} · 강주현² · 장영수² · 김윤희^{1,2} · 정재민² · 정준기² · 이명철²

Development of Dual Reporter System of Mutant Dopamine 2 Receptor (D₂R) and Sodium Iodide Symporter (NIS) Transgenes

Do Won Hwang, B.S.^{1,2}, Dong Soo Lee, M.D., Ph.D.^{1,2}, Joo Hyun Kang, Ph.D.², Young Soo Chang, M.S.², Yun Hui Kim, B.S.^{1,2}, Jae Min Jeong, Ph.D.², June-Key Chung, M.D., Ph.D.², Myung Chul Lee, M.D., Ph.D.²

Program in Neuroscience,¹ Seoul National University and Department of Nuclear Medicine,² Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Both human NIS and mutant D₂R transgenes are proposed as reporting system in transplanted cell tracking. Using hepatoma cell lines, we constructed a dual reporter system containing human sodium-iodide symporter (hNIS) and dopamine 2 receptor (D₂R) and compared its characteristics. **Materials and Methods:** The recombinant plasmid (pIRES-hNIS/D₂R) was constructed with IRES (internal ribosome entry site) under control of the CMV promoter. pIRES-hNIS/D₂R was transfected to human hepatoma SK-Hep1 cell line with lipofectamine. HEP-ND (SK-Hep1-hNIS/D₂R) cells stably expressing hNIS and D₂R was established by selection with G418 for two weeks. RT-PCR was performed to investigate the expression of both hNIS and D₂R genes. The expressions of hNIS and D₂R were measured by ¹²⁵I uptake assays and receptor binding assays. Specific binding of D₂R to [³H]spiperone was verified by Scatchard plot with (+) butaclamol as a specific inhibitor. K_d and B_{max} values were estimated. The correlation between hNIS and D₂R expression was compared by using each clone. **Results:** Similar quantities of hNIS and D₂R genes were expressed on HEP-ND as RT-PCR assays. HEP-ND cells showed 30 to 40 fold higher radioiodine uptakes than those of parental SK-Hep1 cells. ¹²⁵I uptake in HEP-ND cells was completely inhibited by KClO₄, a NIS inhibitor. Specific binding to HEP-ND cells was saturable and the K_d and B_{max} values for HEP-ND cells were 2.92 nM, 745.25 fmol/mg protein and 2.91nM, 1323 fmole/mg protein in two clones, respectively. The radioiodine uptake by hNIS activity and D₂R binding was highly correlated. **Conclusion:** We developed a dual positron and gamma imaging reporter system of hNIS and D₂R in a stably transfected cell line. We expect that D₂R and hNIS genes can complement mutually as a nuclear reporting system or that D₂R can be used as reporter gene when hNIS gene were used as a treatment gene. (Korean J Nucl Med 38(4):294-299, 2004)

Key Words: dopamine 2 receptor, human sodium iodide symporter, SK-Hep1 cell line

서 론

살아있는 상태에서 생체 내로 이식한 세포를 추적하거나 세포 내 유전자 발현을 조사하는데 영상리포터 유전자를 발현시켜 영상으로 평가하는 영상법이 개발되고 있으며 접근 방식에 따라 여러 종류의 리포터 유전자가 이용되고 있다. 핵의학 영상은 광학

영상과 달리 생체 내 유전자 발현을 정량적으로 측정할 수 있고 단층촬영이 가능하므로 연구실에서 실험동물을 이용해서 얻은 영상방법을 사람에게도 적용할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 핵의학 분자 영상을 얻을 수 있는 리포터 유전자의 개발이 필요하며 현재 핵의학 분자 영상을 얻을 수 있는 리포터 유전자로 변형(mutant) 도파민 2 수용체(dopamine 2 receptor, D₂R), 나트륨 옥소 공동 수송체(sodium iodide symporter, hNIS)와 HSV1-tk (Herpes simplex virus 1-thymidine kinase)가 개발되어 있다.^{1,2)}

사람의 나트륨 옥소 공동 수송체는 방사성 옥소나 ^{99m}Tc과 같은 영상용 방사성 동위원소를 이용하여 종양 세포의 영상화에 쓰이기도 하고 방사성 옥소나 ¹⁸⁸Re 으로 방사선치료를 하는데 사용할 수 있어 리포터이자 동시에 치료용 유전자로 평가받고 있

• Received: 2004. 3. 15. • Accepted: 2004. 7. 10.

• Address for reprints: Dong Soo Lee, M.D., Ph.D. Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, 28 Yungun-dong, Chongno-ku, Seoul 110-744, Korea
Tel: 82-2-760-2501, Fax: 82-2-745-7690
E-mail: dsl@plaza.snu.ac.kr

다.^{3,4)} D₂R은 선조체의 도파민 신경세포에서 주로 발견되는 7개의 황막 단백질로 415개 아미노산으로 이루어진 단백질인데^{5,6)} 내인성 유전자이기 때문에 세포에 이입하여 이식하였을 때 면역 거부 반응을 일으키지 않는 점이 리포터 유전자로서 HSV1-tk와 비교하여 좋은 점이다.⁷⁾ 특히 이 연구에 사용한 D₂R은 변이된 (mutant) 형태로서 리간드가 수용체에 결합하여도 세포내로 신호가 전달되지 않아, 효과가 나타나지 않도록 고안된 것이다.⁸⁾ 이 실험에 사용한 이중 리포터 시스템은 위의 두 리포터 유전자가 하나의 프로모터의 조절을 받아 동시에 발현되도록 제작하였으며,⁹⁾ 둘 다 핵의학 분자 영상 리포터로 사용하거나 또는 각각 치료용과 리포터로 이용할 수 있다. 이 실험에서는 간암 세포주에 변형 D₂R과 hNIS를 이입하여 동시에 발현시켜서 두 유전자의 활성 사이에 상관관계와 리포터 유전자로 사용하여 핵의학 분자영상에 이용가능한 특성을 지녔는지 알아보았다.

대상 및 방법

1. 재조합 플라스미드 제조

D₂R 한 부분의 코돈 TCC (Ser)를 GCC (Ala)로 바꾸어 인위적으로 변이를 가진 유전자(스텐포드 대학의 Gambhir박사로부터 받음)⁸⁾와 사람으로부터 얻은 나트륨 옥소 공동 수송체 유전자를 같은 CMV 프로모터의 조절에 의하여 동시에 발현되도록 재조합 플라스미드를 만들었다. pIRES (Clontech, Co.)의 앞부분에 XhoI과 EcoRI로 hNIS를 삽입하고 뒷부분에 XbaI과 Not-1으로 변이 D₂R을 삽입하였다(Fig. 1).

2. 세포 배양 및 이중 리포터 유전자를 발현하는 세포주 확립

사람의 간암 세포주인 SK-Hep1을 10% 소태아혈청 (GibcoBRL Co., USA), 10 U/ml의 페니실린(Invitrogen Co., USA), 10 µg/ml 스트렙토마이신(Invitrogen Co., USA)이 첨가된 RPMI-1640 (Jeil Biotechservices Inc.) 배양액에서 배양하였다. Lipofectamine plus agent (Invitrogen Co.)를 사용하여 SK-Hep1세포에 순수 정제된 재조합 플라스미드를 도입하였다. 2주간 Geneticin (Invitrogen Co.)을 100 µg/ml부터 1000 µg/ml의 농도로 처리하여 pIRES-hNIS/D₂R 벡터가 도입된 SK-Hep1세포를 선별하고 이 세포주를 HEP-ND세포라고 하였다.

3. 역전사효소 중합효소연쇄반응(Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

배양한 세포주를 각각 Trizol 시약(Invitrogen Co.)을 처리하여

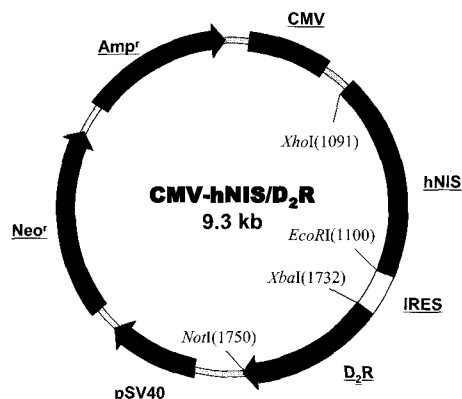


Fig. 1. This plasmid was constructed with D₂R and hNIS which were linked with IRES under control of the CMV promoter. The neomycin resistant gene was placed downstream of SV40 promoter separated from the CMV promoter in the same vector. (hNIS: human sodium iodide symporter, D₂R : dopamine 2 receptor)

총 RNA를 분리 하고 SuperscriptII RNase H-역전사효소(Gibco BRL Co.)를 사용하여 cDNA를 만들었다. 이 cDNA를 주형으로 hNIS와 D₂R 각각에 특이한 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)을 수행하였다. 1.5% agarose 겔에서 전기영동 한 후 브롬화에티뮴(EtBr)으로 염색하여 각각의 PCR 산물을 확인하였다. 양성 대조군으로는 GAPDH (Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase)을 사용하였다. PCR에 사용한 hNIS, D₂R 및 GAPDH 에 특이한 프라이머의 DNA 서열은 다음과 같다. hNIS: 앞부분(5'-gctaagtggcttctgggttg), 뒷부분(5'-gtaagcacaggccaggaaaa) D₂R: 앞부분(5'-actgtaatgccgtggg), 뒷부분(5'-gcaatgatacactcattct) GAPDH : 앞부분(5'-accagggtgctttaaactct), 뒷부분(5'-gagtccttccacgatacacaaa)

4. 방사성옥소 섭취율 측정

24 우물배양용기에 한 우물당 1×10⁵개의 세포를 접종하고 24 시간 배양 후 0.5% 소혈청 알부민과 0.2 µCi/ml의 방사성옥소 (¹²⁵I), 10 µM의 NaI가 들어 있는 HBSS (Hanks balanced salt solution)을 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다.¹⁰⁾ 냉각한 HBSS로 두 번 씻고 트립신으로 세포를 떼어 내어 감마카운터로 세포 내 남아있는 방사능을 측정하고 BCA 단백질 정량 키트 (Bio-RAD Co., USA)를 사용하여 단백질 양을 정량하고 방사성 옥소 섭취율을 산출하였다. 0.5% 소 혈청 알부민과 0.2 µCi/ml의 ¹²⁵I 와 10 µM 의 NaI가 들어 있는 HBSS에 50 µM KClO₄를 첨가하여 30분 동안 배양한 후 방사성옥소 섭취율을 다시 측정하여 hNIS의 작용이 KClO₄에 의해서 저해되는지 확인하였다.

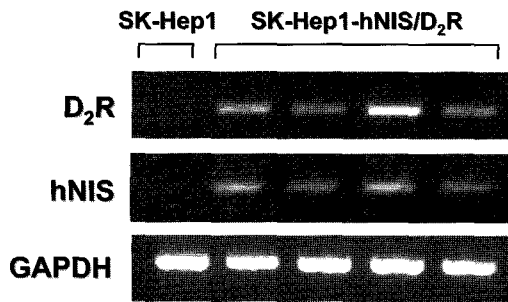


Fig. 2. Electrophoresis result presented by RT-PCR analysis of D₂R and hNIS in 4 different SK-Hep1 cell lines. Each well showed mRNA levels of both D₂R and hNIS, which were transfected to HEP-ND cell lines. In the result of RT-PCR, the similar expression levels of D₂R and hNIS were observed in all the HEP-ND cell lines, whereas neither gene was found in non-transfected SK-Hep1 cells.

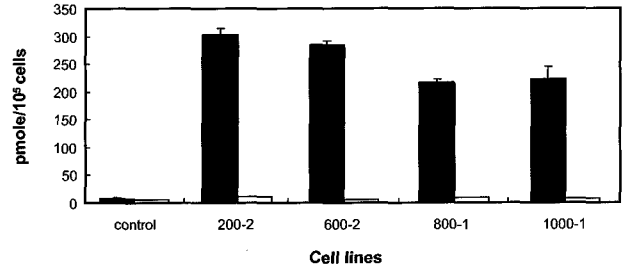


Fig. 3. Iodine uptake measured in a SK-Hep1 cell line expressing hNIS on radiiodine uptake assays. The SK-Hep1 cell line transfected with hNIS-D₂R (HEP-ND) showed 30- to 40-fold higher ¹²⁵I uptake than those of parental cells (black bar). ¹²⁵I uptake of HEP-ND cells was completely inhibited by KClO₄, a specific hNIS inhibitor (white bar).

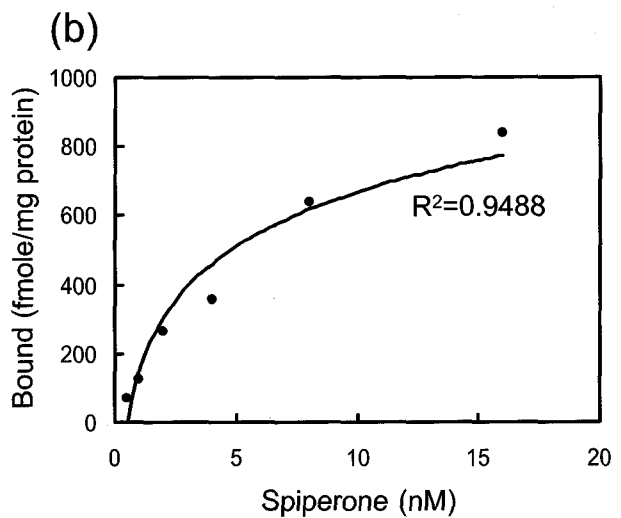
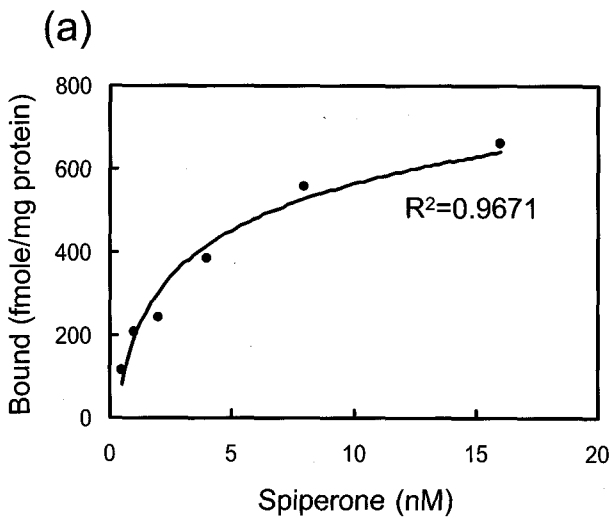


Fig. 4. Saturation curves of (³H) spiperone with HEP-ND cell lines (a: 600-1 cell line, b: 800-1 cell line). Cell homogenates were incubated with increasing concentrations of (³H) spiperone ranging from 0.5 to 16 nM in triplicates.

5. D₂R 활성측정

배양한 세포를 인산완충액으로 세척하고 스크래퍼를 사용하여 세포를 떼어 내 모은 세포를 -70°C 냉동고에 하루 동안 보관한 후 냉각한 물에서 서서히 녹였다. Fisher polytron homogenizer (10초간 3회)로 세포를 깨고 50 mM Tris, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂가 포함된 Tris 완충용액(pH 7.4)으로 최종 단백질 농도가 0.5 mg/ml가 되도록 하였다.^{6,8,15} D₂R의 리간드로 [³H]spiperone (비방사능 15.7 Ci/mmol) D₂R차단제인 (+) butaclamol (Sigma Co.)을 비특이 결합제로 사용하여 균질액과 최대결합부위 농도와 결합능을 측정하였다. 미리 100 μM (+)butaclamol을 전처리하거나 Tris 완충용액을 전처리한 후 [³H]spiperone의 농도를 0.5 nM부터 16 nM까지 각각 반응시켰다.

30분 동안 반응하게 한 후 각 시료를 25 mm GF/F 유리섬유여과지를 통과하여 감압 여과하고 Tris-NaCl (pH 7.4) 완충용액으로 3번 씻어 내었다. 유리섬유여과지를 10 ml의 설팅용액인 카테일 용액에 넣어 6시간이상 두었다. 베타계수기(Packard Bio Co.)를 이용하여 유리섬유여과지에 남아 있는 방사능을 측정하고 스캐차드 분석으로 최대결합부위농도와 해리상수를 측정하였다.^{6,11)}

결 과

1. D₂R과 hNIS 유전자의 mRNA 발현 분석

HEP-ND세포로부터 총 RNA를 분리 한 후 D₂R과 hNIS, GAPDH 프라이머로 RT-PCR을 수행한 결과 hNIS와 D₂R이 비

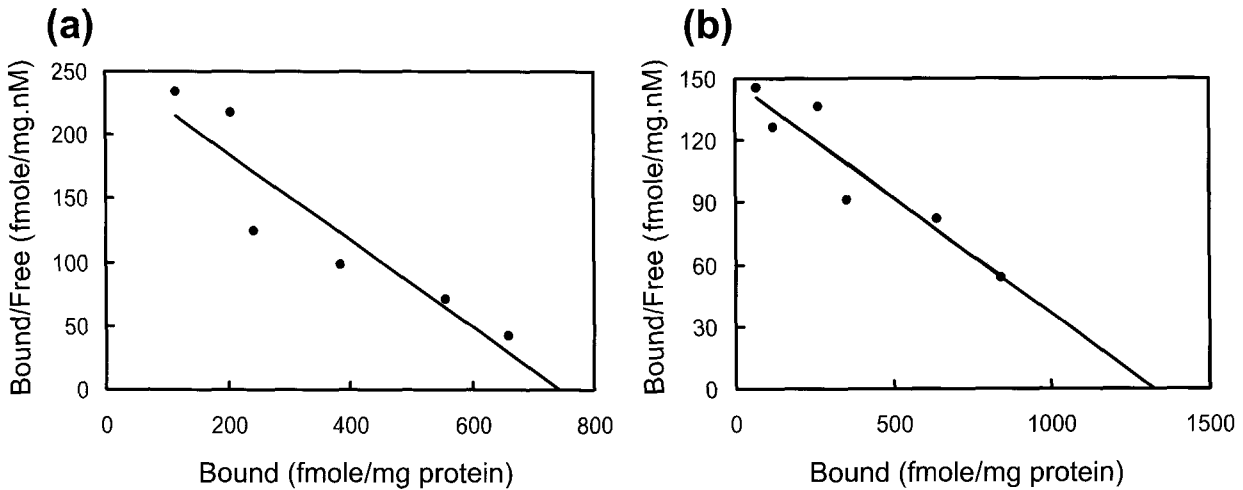


Fig 5. Scatchard plotting derived from the saturation curves of Fig. 4. The calculated K_d and B_{max} values of two different HEP-ND cell lines (a: 600-1 cell line, b: 800-1 cell line) were 2.92 nM, 745 fmole/mg protein and 2.91 nM, 1323 fmole/mg protein, respectively.

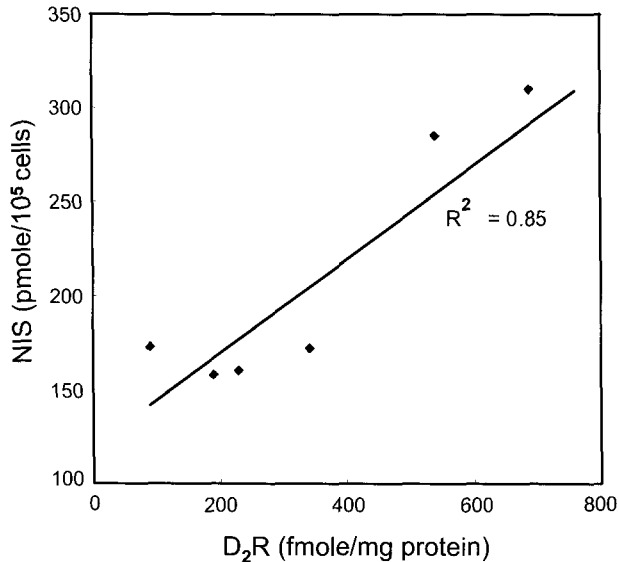


Fig 6. The correlation of hNIS and D_2R expression represented by radioiodine uptake assay and $[^3H]$ spiperone (16 nM) binding analysis in 6 cell lines. Both activities were correlated with each other with the correlation coefficient of 0.85.

슷하게 발현하였다. pIRES-hNIS/ D_2R 유전자를 이입하지 않은 세포에는 hNIS나 D_2R 이 발현하지 않았다. 각 밴드는 Genticin으로 선별한 HEP-ND 세포주 넷을 각각 나타낸다(Fig. 2).

2. 방사성옥소 섭취율 측정

HEP-ND세포의 방사성옥소 섭취율은 hNIS가 도입되지 않은 세포에 비해 약 30에서 40배로 증가하였다. HEP-ND세포의 방사성옥소의 섭취는 $KClO_4$ 에 의하여 완전히 저해되었다. 이

세포 중에 섭취율이 높은 4개의 세포주를 선택하여 유지하였다 (Fig. 3).

3. D_2R 의 활성측정

$[^3H]$ spiperone의 농도를 증가하였을 때 균질액이 D_2R 에 결합되는 활성을 측정한 결과 D_2R 에 대한 특이 결합능이 농도 증가에 따라 포화되었다(Fig.4). 두개의 세포주에 대해 얻은 $[^3H]$ spiperone결합의 해리상수(K_d)와 최대결합부위농도(B_{max})는 각각 2.92 nM, 745.25 fmol/mg protein과 2.91nM, 1323 fmole/mg protein이었다(Fig. 5).

4. hNIS와 D_2R 발현 활성의 상관관계

Genticin 내성으로 선별한 6개의 세포주에서 hNIS의 활성을 방사성옥소 섭취율로 하여 16 nM일 때 $[^3H]$ spiperone의 D_2R 결합능과 비교하였더니 상관관계가 높았다(Fig. 6, 상관계수 제공 =0.85).

고 찰

생체 내에서 세포를 추적하기 위하여 세포에 이입하였을 때 발현 특성이 잘 알려진 여러 리포터 유전자가 필요하다. 특히 예민도가 우수한 PET 영상 리포터 유전자는 이식 세포 추적을 하기 위해 알맞다.¹²⁾ 치료유전자를 세포에 이입하여 발현 여부를 추적하려면 두 유전자를 연결하여 이입하고 유지하여야 한다. 현재 다양한 방법으로 두 유전자를 연결하여 분자영상기법에 응용하려는 시도가 있다.¹³⁻¹⁵⁾

NIS 나 HSV1-*tk* 는 치료유전자로 사용할 수 있으며 이들을 치료유전자로 사용할 때에는 내인성 유전자인 D₂R을 리포터로 하여 이중 리포터 체계를 구축할 수 있다. Yaghoubi등¹⁴⁾은 D₂R과 HSV1-*tk* 각각을 운반하는 아데노바이러스를 세포에 도입하여 두 리포터 유전자의 상관관계를 비교하였다. 또한 테트라사이클린으로 유도된 이중방향의(bi-directional) 프로모터 조절을 받는 D₂R의 온/오프 시스템도 보고되었다.¹⁵⁾

영상 리포터 유전자로서 D₂R은 NIS 같이 세포내로 수송되는 추적자가 필요하지 않고 D₂R 수용체에 결합하는 리간드인 프로브가 필요한데 D₂R 수용체에 결합하는 프로브가 여럿 보고되어 있고 특이활성도 높은 장점이 있다.¹⁾ 그 중에도 도파민의 유사체인 FESP (¹⁸F-fluoroethyl-spiperone)나 ¹¹C-raclopride로 D₂R 수용체에 대하여 PET 영상을 얻을 수 있다.¹¹⁾ 이 연구에서 D₂R과 hNIS를 동시에 발현하게 만든 암세포는 [³H]spiperone 이 결합하고 방사성옥소가 섭취되는 것으로 보아 생체 내에서는 FESP와 ^{99m}Tc으로 영상을 얻어 항암제효과를 평가 분석하는 데에 쓸 수 있다. 특히 [³H]spiperone 결합능과 방사성옥소 섭취율이 비례하므로 FESP결합능으로 치료용 방사성옥소의 섭취율을 추정할 수 있다.

이번 실험에서 리포터 유전자로 사용한 D₂R은 외부에서 도입된 유전자의 발현이 표적세포의 생리적인 활성에 영향을 미치지 않게 하기 위해 인위적으로 변이를 시킨 것이다. D₂R을 영상 리포터 유전자로서만 사용하는 데 있어 필수적인 조작으로 이 조작 후에도 변이 D₂R은 [³H]spiperone을 포화가능하게(saturable) 결합하였다.^{6,15-17)}

Yu등¹⁷⁾은 IRES (internal ribosomal entry site)를 이용하여 동시에 이입한 두 리포터유전자를 비교하였더니 하위유전자 발현이 쇠약하여 진다고 하였다. 하위유전자 발현이 쇠약하여지는 여부를 확인하려면 mRNA를 정량하고 발현후 생성된 단백질 양을 면역블롯팅으로 정량하여 mRNA와 단백질양이 비례하고 단백질양과 방사성옥소 섭취율 활성 또는 D₂R에 대한 [³H]spiperone 결합능이 비례하는 것을 확인하여야 한다. 비례한다면 주 리포터 유전자 사이의 발현정도가 어떤 비례인지, 아래쪽에 위치한 유전자가 얼마나 감쇠 발현하는지 알 수 있을 것이다. 이 실험에서는 두 리포터 유전자를 발현하는 간암 세포주에서 mRNA가 비슷한 양 발현하고 있었고 최종산물인 공동수송체와 수용체 단백질은 발성이 상관있었다.

IRES로 연결된 두 리포터 유전자발현관계는 두 리포터 유전자 중 하나를 치료용 유전자로 바꾸었을 때 한 리포터 유전자의 발현 정도에 따라 치료용 유전자의 발현 정도를 간접적으로 확인할 수 있다. 이중 리포터 중 하나를 치료용 유전자로 쓸 때 다른

하나(D₂R)로 치료용 유전자의 발현 정도를 정량 추정할 수 있다. 이 이중 리포터 시스템 개발의 주요한 의의이다. D₂R 리포터가 생체내에서 어느 정도의 예민도와 대조도로서 영상 유전자로 적절할지 더 실험하여야 한다.

쥐 뇌의 선조체내에서 내인성 D₂R가 실질적으로 그것의 저해제인 (+)butaclamol에 의해서 저해가 되는지를 자가영상기록법으로 실험하여 저해제를 미리 처리하였을 때 선조체 부위가 차단됨을 확인하고 세포주에 대한 실험을 진행하였다.¹⁸⁾ D₂R리포터 유전자를 이입한 세포를 이식하고 D₂R에 대한 생체 영상을 얻는 실험을 계속하여야 한다. (+)butaclamol 전처리 후 D₂R 리간드의 결합이 저해되는지 보아 특이도를 향상할 수 있을 것 같다.

세포를 대상으로 시험관에서 실험할 때, hNIS의 발현여부 및 정도는 방사성옥소 섭취율을 통해 분석가능하지만 D₂R발현 여부는 고전적인 수용체결합분석을 하였다. 체내 영상으로서 이식 세포에 대하여 수용체 밀도(B_{max})와 리간드의 수용체 친화도(K_d)를 정량할 방법도 앞으로 개발할 문제이다. 스캐차드 분석으로 구한 K_d와 B_{max}는 다른 종양세포에 이입 발현시킨 D₂R 보다 낮았다. 해리상수(K_d)는 다른 참고문헌¹⁹⁾과 비교하여 비슷하였지만 단백질무게 당 결합할 수 있는 최대 결합수(B_{max})는 약 4분의 1에 불과하였다. 우리는 이를 D₂R과 hNIS가 둘 다 막 횡단 단백질이기 때문에 발현할 때 서로 경쟁하지 않을까 추측한다. CMV 프로모터의 아래에 D₂R만을 결합하여 이입 후 B_{max}가 얼마가 나오는지 조사하려 한다.

hNIS를 리포터 유전자로 쓰면 ¹²⁴I, ^{99m}Tc 같은 방사성동위원소가 뇌혈류장벽을 통과하지 못하여 뇌 영상용 리포터 유전자로는 적절치 않다. D₂R은 이에 대한 리간드 들이 지방친화성이 높아 뇌혈류장벽을 쉽게 통과할 수 있기 때문에 뇌 영상을 위한 리포터 유전자로 이용할 수 있다.^{3,11,20,21)} 다만 도파민 신경세포에 있는 내인성 도파민 수용체 때문에 심부피질부 뇌는 적절히 영상화 하기 어렵다.

hNIS의 경우, 우리 몸의 갑상선이나 위에 많이 분포하고 있어 ^{99m}Tc이나 ¹⁸⁸Re같은 방사성동위원소를 투여 하였을 때 이 부분 근처에 영상화 하고자 하는 표적물질이 있으면 갑상선이나 위쪽으로 많은 양의 동위원소가 흡수되고 배후방사능과의 혼동을 초래한다. 이럴 때 FESP를 리간드로 쓰면 D₂R 영상을 쉽게 얻을 수 있다. D₂R과 hNIS가 각각 리포터 유전자로서 미비점을 보완하여 이입유전자의 발현여부를 영상화하는데 기여할 것이다.

요 약

목적: 현재 생체 내로 이식된 세포를 추적하는데 여러 가지 리

포터 유전자들이 이용되고 있다. 이 연구에서는 사람 나트륨 옥소 공동 수송체(hNIS)와 도파민 2 수용체(D₂R)를 이중 리포터 유전자로 사용하여 각각을 비교하였다. **대상 및 방법:** hNIS와 D₂R의 발현이 동시에 이루어지도록 하기 위해서 IRES (internal ribosome entry site)로 연결된 재조합 플라스미드(pIRES-hNIS/D₂R)를 제조하였다. pIRES-hNIS/D₂R를 사람의 간암세포주인 SK-Hep1에 lipofactamine을 이용하여 형질을 도입시킨 후, 항생제(G418)를 농도별로 처리하여 2주간 선별하였다(HEP-ND). hNIS와 D₂R 발현 유무와 발현 정도를 알아보기 위하여 각 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 각 형질 도입세포주에서, hNIS의 활성은 ¹²⁵I 섭취율을 이용하여 측정하고 D₂R의 활성은 [³H]spiperone을 리간드로 이용하여 수용체 결합 정도를 측정하였다. **결과:** 선별된 HEP-ND세포에서 hNIS와 D₂R의 발현을 RT-PCR로 확인하였을 때 IRES로 연결된 hNIS와 D₂R의 발현 정도는 서로 비슷하였다. HEP-ND세포의 ¹²⁵I 섭취율은 대조군인 SK-Hep1세포에 비해 30-40배 증가되었고, KClO₄에 의해 ¹²⁵I 섭취가 저해되었다. D₂R의 발현 정도를 측정할 수 있는 수용체 결합 분석법을 통해 G418 농도별로 나눈 두 종류의 세포주에서, [³H]spiperone을 이용한 해리상수 (K_d)와 최대결합 부위농도 (B_{max})는 각각 2.92 nM, 745.25 fmol/mg protein과 8.91 nM, 1323 fmole/mg protein이었다. hNIS와 D₂R 발현의 상관관계에서는 높은 상관관계를 나타내었다. **결론:** 이 연구에서 hNIS와 D₂R가 이입된 세포주에서 이중 유전자, 감마 영상 리포터 시스템을 개발하였으며, D₂R와 hNIS 유전자를 이중 핵 영상 시스템으로서 서로 상호보완적으로 이용할 수 있을 것으로 기대하고 있다.

References

- Gambhir SS, Barrio JR, Herschman HR, Phelps ME. Assays for noninvasive imaging of reporter gene expression. *Nucl Med Biol* 1999;26:481-90.
- Herschman HR, MacLaren DC, Iyer M, Namavari M, Bobinski K, Green LA, et al. Seeing is believing: non-invasive, quantitative and repetitive imaging of reporter gene expression in living animals, using positron emission tomography. *Neurosci Res* 2000;15:699-705.
- Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *J Nucl Med* 2002;43:1188-200.
- Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 1996;379:458-60.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998;78:189-225.
- Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, et al. Cloning and expression of a rat D2 receptor cDNA. *Nature* 1988;336:783-7.
- MacLaren DC, Gambhir SS, Satyamurthy N, Barrio JR, Sharfstein S, Toyokuni T, et al. Repetitive, non-invasive imaging of the dopamine D₂ receptor as a reporter gene in living animals. *Gene Therapy* 1999;6:785-91.
- Liang Q, Satyamurthy N, Barrio JR, Toyokuni T, Phelps MP. Noninvasive, quantitative imaging in living animals of a mutant dopamine D₂ receptor reporter gene in which ligand binding is uncoupled from signal transduction. *Gene Therapy* 2001;8:1490-98.
- Gurtu V, Yan G, Zhang G. IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229:295-8.
- Min JJ, Chung JK, Lee YJ, Shin JH, Yeo JS, Jeong JM, et al. In vitro and in vivo characteristics of a human colon cancer cell line, SNU-C5N, expressing sodium-iodide symporter. *Nucl Med Biol* 2002;29:537-45.
- Barrio JR, Satyamurthy N, Huang SC, Keen RE, Nissenson CH, Hoffman JM, et al. 3-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)spiperone: in vivo biochemical and kinetic characterization in rodents, nonhuman primates, and humans. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:830-9.
- Adonai N, Nguyen KN, Walsh J, Iyer M, Toyokuni T, Phelps ME, et al. Ex vivo cell labeling with ⁶⁴Cu-pyruvaldehyde-bis(N4-methyl-thiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3030-5.
- Shin JH, Chung JK, Kang JH, Lee YJ, Kim KI, Kim CW. Feasibility of sodium/iodide symporter gene as a new imaging reporter gene: comparison with HSV1-tk. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:425-32.
- Yaghoubi SS, Wu L, Liang Q, Toyokuni T, Barrio JR, Namavari M, et al. Direct correlation between positron emission tomographic images of two reporter genes delivered by two distinct adenoviral vectors. *Gene Therapy* 2001;8:1072-80.
- Sun X, Annala AJ, Yaghoubi SS, Barrio JR, Nguyen KN, Toyokuni T, et al. Quantitative imaging of gene induction in living animals. *Gene Therapy* 2001;8:1572-9.
- Woodward R, Coley C, Daniell S, Naylor LH, Strange PG. Investigation of the role of conserved serine residues in the long form of the rat D2 dopamine receptor using site-directed mutagenesis. *J Neurochem* 1996;66:394-402.
- Yu Y, Annala AJ, Barrio JR, Toyokuni T, Satyamurthy N, Namavari M, et al. Quantification of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals. *Nature Medicine* 2000;6:933-7.
- Palacios JM, Niehoff DS, Kuhar MJ. [³H]spiperone binding sites in brain: Autoradiographic localization of multiple receptors. *Brain Research* 1981;213:277-89.
- Vile JM, D'Souza UM, Strange PG. [³H]nemonapride and [³H]spiperone label equivalent numbers of D2 and D3 dopamine receptors in a range of tissues and under different conditions. *J Neurochem* 1995;64:940-3.
- Bahn MM, Huang SC, Hawkins RA, Satyamurthy N, Hoffman JM, Barrio JR, et al. Models for in vivo kinetic interactions of dopamine D2-neuroreceptors and 3-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)spiperone examined with positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:840-9.
- Satyamurthy N, Barrio JR, Bida GT, Huang SC, Mazziotta JC, Phelps ME. 3-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)spiperone, a potent dopamine antagonist: synthesis, structural analysis and in-vivo utilization in humans. *Int J Rad Appl Instrum* 1990;41:113-29.