

말초신경재생을 위한 hNGF- β recombinant Adenovirus의 제작 및 수증세포주에서 신경성장인자의 발현

고은봉¹ · 정현종² · 안강민¹ · 김윤태¹ · 박희정¹ · 성미애¹ · 김남열³ · 유상배³
명 훈¹ · 황순정¹ · 김명진¹ · 김성민⁴ · 장정원³ · 이종호¹

¹서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, ²건국대학교 의과대학 소아과학교실,
³연세대학교 의과대학 약리학교실, ⁴강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

CONSTRUCTION OF HNGF- β RECOMBINANT ADENOVIRUS & SCREENING OF ITS EXPRESSION AFTER TRANSFECTION INTO VARIOUS CELL LINES

En-Feng Gao¹, Hun-Jong Chung¹, Kang-Min Ahn¹, Yoon-Tae Kim¹, Hee-Jung Park¹, Mi-Ae Sung¹,
Nam-Yeol Kim³, Sang-Bae Yoo³, Hoon Myoung¹, Soon-Jung Hwang¹, Myung-Jin Kim¹,
Sung-Min Kim³, Jeong-Won Jang², Jong-Ho Lee¹

¹Dept. of Oral and Maxillofacial Sugery, Seoul National University,

²Dept. of Pediatrics, Chung-Ju Medical Hospital, Kon-Kuk University,

³Dept. of Pharmacology, Yonsei University School of Medicine,

⁴Dept. of Oral and Maxillofacial Sugery, Kang-Nung National University

Nerve growth factor(NGF) has a critical role in peripheral nerve regeneration. The aim of this study is to construct a well-functioning hNGF- β recombinat adenovirus for the ultimate development of improved method to promote peripheral nerve regeneration with adenovirus mediated hNGF- β gene transfection into Schwann cells.

First PCR associated cloning of GFP-tagged hNGF- β which was ligated into E1/E3 deleted adenoviral vector was performed and tranfected into *E. coli* to construct hNGF- β recombinant adenovirus. After production of recombinat adenovirus in a large scale, its transfection efficiency, expression, and function were evaluated using cell lines or primarily cultured cells of HEK293 cells, Schwann cells, fibroblast(NIH3T3) and myocyte(CRH cells).

GFP expression was observed in 90% of infected cells compared to uninfected cells. Total mRNA isolated from hNGF- β recombinat adenoviru infected cells showed strong RT-PCR band, however, *LacZ* recombinant adenovirus infected or uninfected cells did not. NGF quantification by ELISA showed a maximal release of 18.865 +/- 0.31ng/mL at 4th day. PC-12 cells exposed to media with hNGF- β recombinant adenovirus infected Schwann cell demonstrated higher levels of differentiation compared with controls.

We generated hNGF- β recombinant adenovirus and induced over expression of NGF successfully in non-neuronal and neuronal cells. Following these result, it is expected to develop an improved treatment strategy peripheral nerve regeneration using the hNGF- β gene transfected cells.

Key words : NGF, Schwann cell, Peripheral nerve regeneration, Adenoviral vector

I. 서 론

신경생리학과 미세문합술의 획기적인 발전에도 불구하고 수술에 의한 손상된 말초신경의 성공적인 재생은 여전히 큰 과제로 남아있다^{1,2)}. 수술에 의한 신경재생은 3%미만의 정상적인 감각과 25%미만의 정상적인 운동능력을 회복하는데 그쳤다. 조직공학의 발전은 말초신경손상환자의 기능적, 심미적인 회복에 있어서 이식에 사용되는 공여부의 기능적 제한성 및 여러 심각한 합병증을 해결하는데 큰 희망으로 다가오고 있다.

조직공학적 방법으로 손상된 신경을 재생함에 있어서 가장 중요한 네가지 인자는 담체, 지지세포, 성장인자, 세포의 기질 등으로 알려져 있다³⁾. 신경성장인자(nerve growth factor, NGF)는 여러 수용성 neurotrophin 또는 neurotrophic 인자들 중 말초신경재생을 촉진하는 매우 중요한 신경인자이다⁴⁾. Griffin과 Letourneay⁵⁾는 1980년에 NGF의 농도에 따른 neurite extension/retraction을 증명하였고, NGF의 중요한 유도인자인 4-Methylcatechol을 성인 Wistar rat의 좌골신경에 놓았을 때 말초신경축삭의 발생과 증식을 촉진하고 anti-NGF 투여시 소실됨을 관찰하였다^{5,6)}. 신경손상 시 근위단에서 신경 재생이 이루어지게 되는데, 이는 원위단에서 분비되는 향신경성 인자의 자극 효과에 의존한다⁷⁾. 이와 같이 신경 재생에는 원위신경단의 잠재적 향신경성 영향(potential neurotrophic influence)과 근위 신경세포의 재생능이 중요한 역할을 하는데 손상부위의 원단위에서의 NGF mRNA의 농도와 NGF의 합성은 급격히 증가하여 6시간 후에 첫 peak에 도달하게 되는데 이는 주로 손상부위 근단 및 원단에 있는 섬유모세포와 Schwann cell 등 세포들이 손상된 축삭과 혈액에서 분비된 인자에 반응한 것으로 알려져 있다⁸⁾. 두 번째 peak는 약 3일 이내에 이르는데 이는 IL-1이나 microphage의 집합에 의한 다른 인자들의 의한 손상 원단위의 반응에 의한 것이며 증가된 NGF-mRNA는 신경이 재생될 때까지 유지된다. 이와 같이 NGF는 신경원위단의 슈반세포 생존을 직접적으로 촉진하고 간접적으로 축삭재생을 촉진하여 인으로 축삭이 절단된 감각신경의 death를 방지하고 적절한 농도에서 슈반세포의 증식을 촉진한다⁹⁾.

말초신경재생을 촉진하고자 다양한 NGF전달방법이 고안되었는데, microencapsulation과 같은 방법에 의한 순수한 단백질의 전달은 단일 농도와 빠른 분해(반감기 30분)로 오랜 기간에 거친 신경재생에 효과적이지 못하였다^{10,11)}. 이러한 단점을 극복하기 위해 유전자치료법이 응용되고 있는데 생물학적 유전자 전달 방법은 크게 간접적인 *ex vivo* method 직접적인 *in vivo* method로 나뉘어 진다¹²⁾. 간접적 방법은 전달하려는 유전자를 생산할 수 있는 세포를 원하는 부위에 이식하는 방법이고 직접적 방법은 DNA를 직

접 투여하거나 어떤 운반체(vector)에 연결하여 원하는 부위에 전달하는 방법인데, 이 때 운반체로 virus를 이용하여 유전자를 virus 표면에 붙이거나 그 안에 넣어 전달 할 수 있다. Virus를 이용한 유전자치료에서 주로 사용되고 있는 retrovirus는 감염된 후 viral DNA가 분열하고 있는 세포의 염색체 안으로 끼어 들어간 다음 증폭하는 성장주기를 갖는다. 이런 특성상 retrovirus는 투입된 유전자를 장기간 지속적으로 발현시켜야 하는 선천성 유전병의 치료에 적당하나 유전자의 전달 부위가 분열중인 세포(dividing cell)를 가진 조직으로 한정된다. 이 때 투입된 유전자는 염색체에 무작위적으로 삽입되기 때문에 정확한 유전자의 발현을 조절할 수 없고 또한 retrovirus는 유전자치료에서 요구되는 높은 역가(high titer)로 virus를 생산하기 어렵다는 단점으로 post-mitotic neuron에는 적합하지 않은 것으로 알려져 있다¹³⁾. 이런 retrovirus vector의 한계를 극복하기 위한 대안으로 adenovirus를 이용한 유전자전달 방법이 많이 연구되고 있는데^{14,15)} adenovirus를 이용하여 외부유전자를 신경세포나 조직으로 전달하려는 시도가 처음으로 이루어진 이래^{16,17)} β -galactosidase를 발현하는 *LacZ*나 Green fluorescent protein (GFP) 유전자를 표지물질로 이용한 실험에서 재조합 adenovirus가 *in vivo*나 *in vitro*에서 여러 종류의 신경세포나 조직에 효과적으로 외부유전자를 전달할 수 있는 것으로 보고되었다¹⁸⁾. 더욱이 특징적인 것은 신경전구세포를 이와 같은 adenovirus를 이용하여 표지(tagging)한 후 성숙한 뇌로 이식했을 때 세포의 생존이나 분화에 영향을 미치지 않는 것이 밝혀졌다¹⁹⁾. 따라서 현재 다양한 외부유전자를 재조합 adenovirus를 이용하여 여러 신경조직과 세포에 전달하여 그 효과를 관찰하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁵⁾.

본 연구는 말초신경재생에 있어 중요한 역할을 하는 NGF를 효과적으로 공급할 수 있는 방법의 일환으로 hNGF- β recombinant adenovirus를 제작, 대량 생산하고 이의 기능을 검증하는데 목적을 두었다.

II. 재료 및 연구방법

1. hNGF- β recombinant adenovirus 제작

1). hNGF- β 유전자 Cloning

인간 fetal brain cDNA (Human fetal brain quick clone cDNA; Clontech, CA, USA)로부터 hNGF- β cDNA를 cloning 하였다. Primer는 5'-GAGGTG-CATAGCGTAA-TGTC-3' 과 5'-TTACAGGTTG AGG-TAGGGAG-3' 를 사용하였으며 cloning된 hNGF- β 유전자의 서열을 PCR 2.1-TOPO TA cloning vector (Invitrogen, USA)로 ligation 한 후 sty I 제한효소로 절

```

gaggtg catagcgtaa tgtccatggt gttctacct ctgatcacag cttttctgat cggcatacag gcggaaccac
actcagagag caatgtccct gcaggacaca ccatcccca agtccactgg actaaacttc agcattcctc tgactactgcc
cttcgagag cccgcagcgc cccggcagcg gcgatagctg cacgcgtggc ggggcagacc cgcaacatta ctgtggacce
caggctgttt aaaaagcggc gactccgttc acccgtgtg ctgttttagca ccagcctcc ccgtgaagct gcagacactc
aggatctgga cttcgaggtc ggtggtgctg ccccttcaa caggactcac aggagcaagc ggtcatcatc ccatccatc
ttccacaggg gcgaattctc ggtgtgtgac agtgcacgcg tggggttgg ggataagacc accgccacag acatcaaggg
caaggaggtg atggtgttgg gagaggtgaa cattaacaac agtgtattca aacagtactt ttttgagacc aagtccggg
acccaatcc cgttgacagc ggggtccggg gcattgactc aaagcactgg aactcatatt gtaccacgac tcacacctt
gtcaaggcgc tgaccatgga tggcaagcag gctgcctggc ggtttatccg gatagatacg gcctgtgtgt gtgtgctcag
caggaaggct gtgagaagag cctgacctgc cgacacgctc cctccccctg ccccttctac actctcctgg gccctccct
acctcaacct gtaa

```

Fig. 1. cDNA sequence of human nerve growth factor. Heat shock method was used to insert cloning vector to competent cell. Above data is the sequence analysed result.

단하여 정 방향으로 삽입된 hNGF-β 클론을 확인한 후에 염기 서열을 분석하였다(Fig. 1).

2) Allelic variation의 mutagenesis

염기 서열 분석결과에서 103번째 염기에서 T/C 염기의 allelic variation이 존재하였으며, T일 경우 35번째 아미노산인 Valine이, C일 경우 Alaline으로 치환되는 것을 발견하였다. 하지만, 이전의 Borsani G 등의 연구²⁰⁾에서 103번째 염기가 T인 경우의 Human NGF 단백질의 기능에 관한 보고에 따라서 본 연구에서 103번째 C염기를 T로 point mutation 유도하였다. C 염기를 T로 point mutation을 유도하기 위하여 mutation을 위한 primer를 제작하고 이를 PCR 반응을 통해 mutation을 유도 한 후 염기 서열 분석을 통하여 염기 치환 여부를 확인하였다.

3) Recombinant adenovirus construct의 제작

염기 서열 분석이 완료된 hNGF-β유전자와 pAdenoVator-CMV5-IRES-GFP (Qbiogene, USA)를 각각 Bgl II 제한효소로 절단하고 T4 ligase (Takara, Japan)를 이용하여 ligation을 실시한 후 DH5, competent cell에 transformation 하여 pAdenoVator-CMV5-IRES-GFP hNGF-β vector를 만들었으며(Fig. 2), 이를 Sty I 제한 효소를 처리함으로써 hNGF-β 유전자의 삽입 여부와 방향을 확인하였다. 그리고 Pme I 제한 효소를 처리하여 선형화된 pAdeno Vator-CMV5-IRES-GFP-hNGF vector와 Ad5ΔE1/ΔE3 vector를 co-transformation을 실시하였다(Fig. 3). BJ5183 competent cell과 선형화된 pAdenoVator-CMV5-IRES-GFP hNGF-β vector를 electroporation후에 37℃ 액체 배지에서 1시간 배양한 다음 LB/kan (50g/mL) 고체 배지에서 24시간 배양하였다.

그리고 colony를 선별하여 LB/kan (50g/mL) 액체 배지에서 16~18시간 배양한 다음 plasmid를 분리하였다. 이때 BJ5158 competent cell은 16~18시간 이상 배양 또는 보관할 경우에 많은 recombination을 생성하였다. 이렇게 얻어진 plasmid를 다시 DH5, competent cell에 transformation하여 plasmid를 분리한 후에 이를 각각 BstX1 제한 효소를 가지고 처리 하여 전기영동을 통해서 co-transformation 여부를 확인하였다(Fig. 4).

2. 인간 신장세포를 이용한 large scale virus amplification 및 hNGF-β recombinant adenovirus purification

E1/E3 유전자가 들어 있는 HEK293 cell을 5% FBS-DMEM이 들어 있는 100mm dish에서 50%가 되도록 subculture하고 2% FBS-DMEM(no antibiotic)에서 바이러스로 4시간동안 infection한 후 100m.o.i infection media를 제거하고 다시 culture media(5% FBS-DMEM with 1% antibiotic)를 넣었다. 약 20시간 후 infection 되어진 dish에 plaque가 많이 형성되고 배양액의 색이 노란색으로 변하게 되면 cell scraper를 이용하여 dish바닥의 세포를 긁어서 튜브에 모아 800rpm으로 5분간 원심분리하여 Pellet을 -80℃에 보관하였다. Sample preparation을 위하여 -80℃ 보관하던 infected HEK293 cell sample을 꺼내서 37℃에서 녹인 후 pellet volume의 2~3배의 1X PBS를 첨가하여 섞고 다시 얼리는 것을 3-5회 반복하여 293 cell의 세포외벽을 깨 virus를 buffer로 방출시켰다. 2,000rpm에서 5분간 원심분리를 하고 난 뒤 상층액을 새로운 에펜도르프튜브로 옮기고 pellet 2배 volume의 1X PBS를 첨가하여 vortex하였다. 다시 4℃ 8,000rpm에서

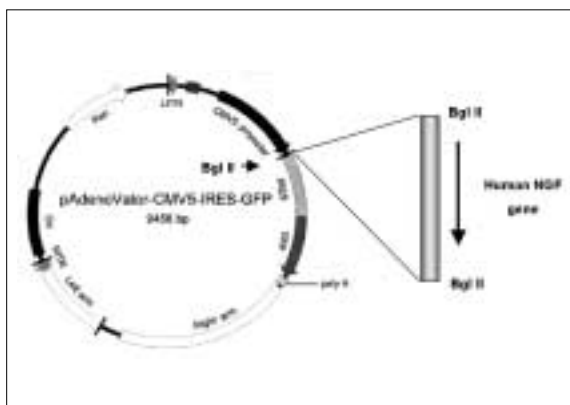


Fig. 2. Construction of pAdenoVator-CMV5-IRES-GFP carrying hNGF- β cDNA.

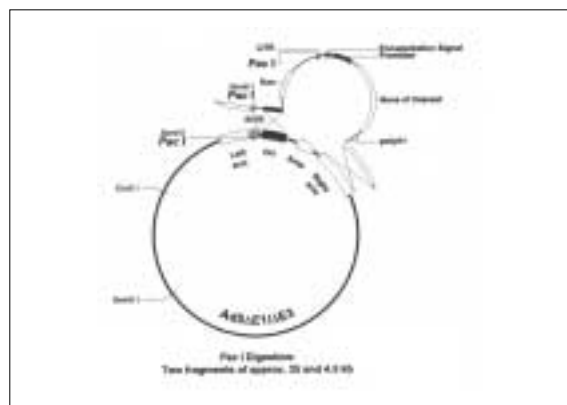


Fig. 3. Recombination between pAdenoVator-CMV5-IRES-GFP+hNGF- β and Ad5 Δ E1/ Δ E3 vector. Pme I linearized pAdenoVator-CMV5-IRES-GFP+hNGF gene and Ad5 Δ E1/ Δ E3 vector were co-transformed in BJ5183 competent cell that easy to recombination.

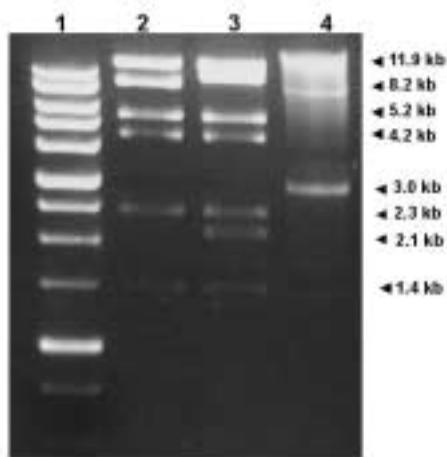


Fig. 4. Restriction analysis of recombinant Adenovirus vector (Screening of recombinants by plasmid size and restriction enzyme). After Colony selection and plasmid separation mapped the sequence with BstX I or Pac I for confirm the propriety of recombination. In lane 3, when restrict with BstX I there are 2.1kb band; and in lane 4, restrict with Pac I there are 3kb band confirming successful recombination.

Lane 1: 1kb DNA Marker

Lane 2: Ad5 Δ E1/ Δ E3 with BstX I digestion

Lane 3: Ad5 Δ E1/ Δ E3 + CMV5-IRES-GFP/hNGF with BstX I

Lane 4: Ad5 Δ E1/ Δ E3 + CMV5-IRES-GFP/hNGF with Pac I

15분간 원심분리를 하며 상층액을 이전 단계에서 얻은 상층액에 추가한 후 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

Cellular contaminants와 defective viral particles을 CsCl 1.4(53g+87ml of 10mM Tris-HCl pH 7.9)와 CsCl 1.2 (26.8g+92ml of 10mM Tris-HCl pH 7.9)용

액을 이용하여 100,000g(23,000 rpm)에서 90분간 4 $^{\circ}$ C에서 원심 분리하여 제거하고 1X PBS로 밤새 투석하여 순수한 샘플을 얻었다. 이렇게 얻어진 재조합 hNGF- β adenovirus의 역가를 plaque 분석법을 이용하여 계산하였다.

3. 재조합 hNGF-β의 발현 및 기능 확인

재조합 hNGF-β adenovirus가 E1 유전자 위치에 NGF-β 유전자를 함유하고 있으며 세포를 감염시켜 NGF-β의 발현 및 분비를 증가시키는지 확인하기 위해 신경지시세포인 Schwann cell과 비신경세포인 인간신장세포 HEK293, 근원세포(myoblast)인 CRH, 섬유모세포인 NIH3T3 세포들을 사용하였다.

신경성장인자의 발현은 hNGF-β 유전자와 같이 삽입된 형광물질인 GFP의 유전자의 발현과 immunocytochemistry 방법으로 NGF의 과발현을 확인하였다. RT-PCR 방법으로 hNGF-β mRNA의 발현을 확인하였고 ELISA 방법으로 정량화하였으며 PC-12cell의 neurite extension으로 NGE의 기능을 확인하였다.

1) GFP의 발현

네종류의 세포에서 세포수를 각각 산정하여 subculture하고 재조합 virus를 100m.o.i.로 infection하여 시간 경과에 따른 GFP의 발현을 형광현미경으로 관찰하였다.

2) Immunocytochemistry

Immunocytochemistry를 하기 위하여 hNGF-β adenovirus에 감염된 슈반세포와 정상 슈반세포를 0.1% PEI 또는 gelatin coating 된 슬라이드에서 세포를 배양한 후 PBS로 1회 세척하였다. 4% paraformaldehyde로 상온에서 30분 동안 고정시킨 후 PBS로 3회 세척하고 0.2% tritonX 100이 첨가된 4% normal goat serum으로 1시간 동안 blocking하였다. 다시 5분씩 3회 PBS로 세척한 후 1:300으로 희석시킨 anti-NGF Ab(Promega, USA) 5μg/ml씩 넣고 4℃에서 overnight 하였다. 5분씩 3회 PBS로 세척한 후 1:500으로 희석된 Anti-mouse IgG-FITC(Santa cruz, USA)를 넣고 1시간 상온에 두었다. 5분씩 6회 PBS로 세척한 후 mounting (glycerol in PBS, DABCO, USA)하여 형광현미경으로 관찰하였다.

3) hNGF-β mRNA의 발현

TRISOL LS Reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 각각의 세포에서 RNA를 추출하고 UV/Visible spectrophotometer (UltraSpec 3000, Pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 RNA농도를 결정하였다. RQ1 RNase-Free DNase kit(Promega, USA)를 이용하여 RNA 샘플로부터 DNA를 제거하고 hNGF-β cDNA를 클로닝하기 위하여 Primer (Forward: 5'-GAGGTGCATAGCGTAATGCT-3', Reverse: 5'-TTACAGGTTGAGGTAGGGAG-3')와 1μl의 first-strand cDNA 반응액을 사용해 PCR을 수행한 후 1% agarose gel에서 전기영동 하여 band의 density를 확인하였다.

4) ELISA

hNGF-β adenovirus에 감염된 여러 세포에서 분비되는 NGF의 발현 정도와 정상 세포에서 분비되는 발현 정도의 차이를 비교하고자 HEK293세포, Primary culture한 Schwann cell, Schwann cell cell line(ISC), NIH3T3세포를 사용하였는데 Primary culture한 Schwann cell은 기존에 개발한 연구방법으로 얻었다²¹⁾.

본 연구에서는 실험군으로써 hNGF-β adenovirus를 감염시킨 것과 감염시키지 않은 대조군으로 분류하였다. 각각의 대조군과 실험군은 1×10⁴cells/ml의 동일한 cell density로 seeding하였다. 실험군 세포는 virus 감염을 위해 DMEM(Gibco, U.S.A.)/10%FBS media를 제거하고 PBS로 3번 세척한 후 DMEM/2% FBS media에 70m.o.i로 virus를 감염시킨 뒤 4시간동안 배양하였다. 감염 후에는 다시 DMEM/10%FBS media로 배양하며 2일 간격으로 media 1ml을 채취한 후 배지를 교체하였다. 증식 속도가 빠른 ISC, CRH, 3T3 세포는 재조합 virus 감염 후 4일째와 12일째에 1:5로 subculture하여 동일한 방법으로 sampling 하였으며 세포의 노화로 인해 14일까지 실행하였다. 시간에 따른 NGF의 발현양상을 ELISA Kit(NGF Emax ImmunoAssay System kit Promega)로 정량화하였다. 통계처리는 ANOVA T-test로 통계적 유의성(P-value<0.05)을 측정하였다.

5) Neurite extemsion

분비된 NGF의 bioactivity를 확인하기 위하여 hNGF-β adenovirus에 감염된 Schwann cell의 plaque이 형성된 부분에서 추출한 media 1ml를 추출하여 PC12 cell의 배양액에 넣은 뒤 24시간 배양한 후 위상차 현미경 하에서 neurite extension을 관찰 하였다.

Ⅲ. 결 과

상기의 방법으로 recombinant hNGF-β adenovirus를 제작하고 정제하여 10¹¹pfu/ml단위의 역가를 얻었다.

재조합 virus를 말초신경지시세포인 Schwann cell과 비신경세포인 HEK293세포, CRH세포, NIH3T3 등 네가지 세포를 100m.o.i.로 infection하여 형광현미경으로 관찰하였을 때 네가지 세포 모두 대조군과 실험군의 세포형태에 변화가 없었으며 실험군에서는 18~24시간에 걸쳐 90%이상의 세포에서 GFP가 발현되었다(Fig. 5).

hNGF-β에 대한 immunocytochemistry에서 recombinant hNGF-β adenovirus에 감염된 하여 fluorescence microscopy로 관찰한 결과 감염된 Schwann cell에서 더욱 많은 형광이 발광되는 것이 확인되었다(Fig. 6).

NGF mRNA의 발현을 RT-PCR방법으로 확인한 결과

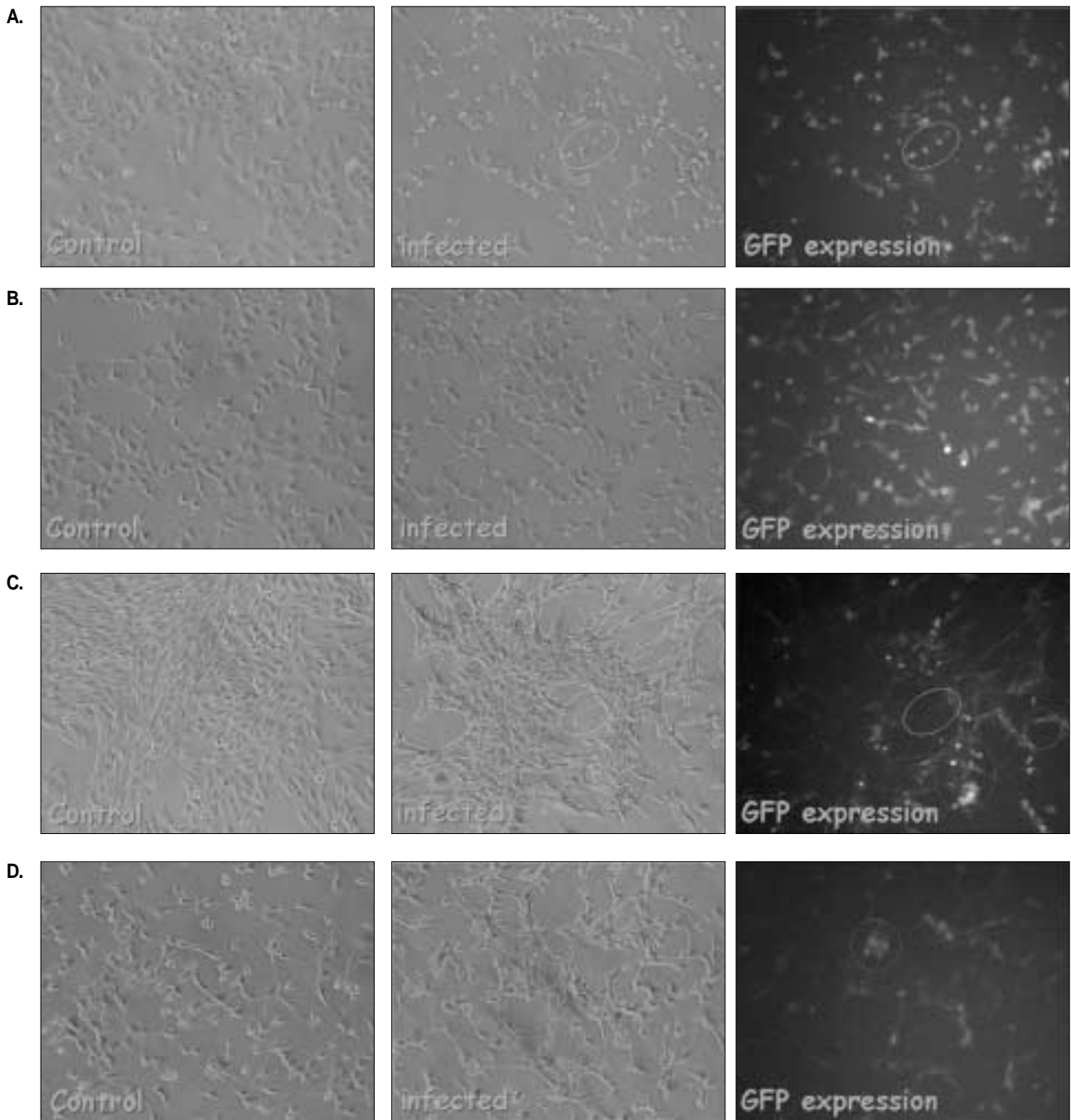
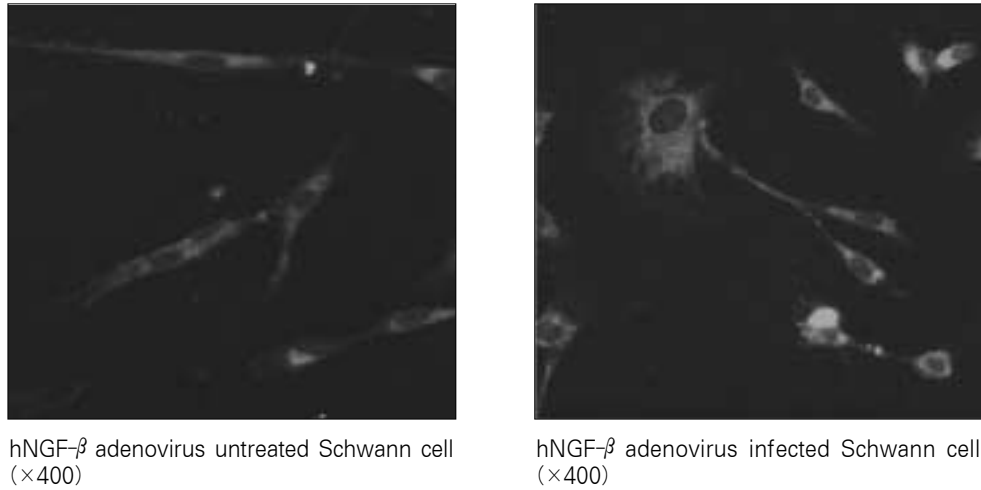


Fig. 5. GFP expression of infected cells(A: Schwann cell, B: HEK293 cell, C: CRH cells, D: NIH3T3 cell) with 100moi recombinant hNGF- β adenovirus.

HEK293세포, Schwann cell, CRH세포를 LacZ recombinant adenovirus에 감염시켰을 때는 NGF mRNA가 발현되지 않았으나 hNGF- β recombinant adenovirus에 감염된 군에서는 모두 발현되었다. CRH cell에서는 약하게, Schwann Cell에서는 가장 강한 발현을 나타냈다(Fig. 7). NIH3T3세포는 세포 자체 내에 NGF유전자를 포함하고 있

어 대조군과 LacZ recombinant adenovirus 감염군, 그리고 hNGF- β recombinant adenovirus 감염군 모두에서 발현이 확인되었다. 그러나 대조군과 LacZ recombinant adenovirus 감염군의 발현 양상이 비슷하게 낮은 반면 hNGF- β recombinant adenovirus 감염군에서는 과발현이 관찰되었다.



hNGF- β adenovirus untreated Schwann cell ($\times 400$)

hNGF- β adenovirus infected Schwann cell ($\times 400$)

Fig. 6. Immunocytochemistry result : NGF expression in Shwann cell after recombinant hNGF- β adenovirus infection.

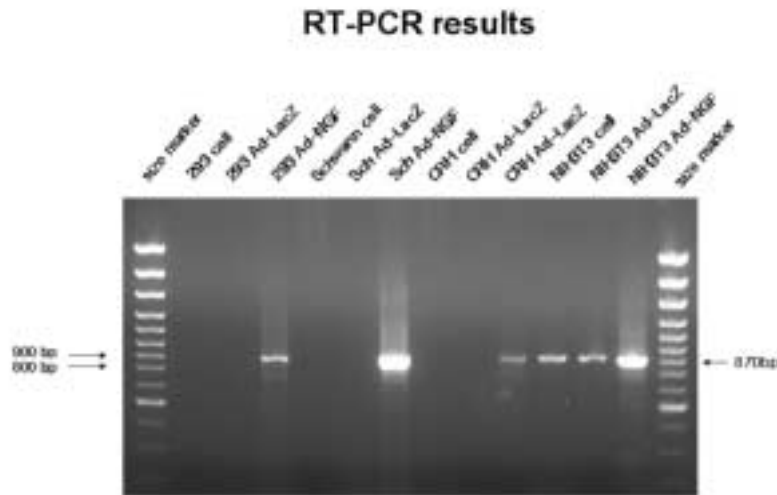


Fig. 7. RT-PCR result : NGF expression in various cell line after recombinant hNGF- β adenovirus infection 72 hours.

HEK293세포, SD 백서 1일령의 DRG에서 일차배양한 Schwann cell, Schwann cell line(ISC), CRH세포를 각각 대조군과 70m.o.i.로 감염한 군으로 나누어 시간경과에 따른 NGF의 발현을 ELISA로 정량화하였을 때 네가지 세포 모두에서 대조군에 비해 실험군에서 초기에 증가된 NGF의 발현이 관찰되었다(Fig. 8, Table 1, 2, 3). HEK293세포에서는 대조군에서의 과증식으로 인해 짧은 시간 동안(36~60시간)만 결과를 관찰하였다. 일차배양한 Schwann cell에서는 전체 실험기간 동안 대조군 자체에서도 8일 때 1257.5(± 125.4)pg/ml의 NGF가 발현하였고

실험군에서는 여러 세포 중 최고치인 18865.4(± 310.9)pg/ml를 바이러스 감염 후 4일에 나타내다가 14일까지 지속되었다. ISC의 실험군에서도 감염 후 4일째 가장 높은 수치인 677.9(± 129.4)pg/ml를 나타내고 14일까지 점차 감소하는 일차 배양한 Schwann cell과 비슷한 양상을 나타낸다. 발현된 NGF의 bioactivity를 검증하기 위하여 바이러스에 감염된 Schwann cell의 배양액을 PC-12 cell 배양액에 첨부하였을 때 Fig. 9와 같이 PC-12 cell의 neurite가 extension되는 양상을 관찰하였다.

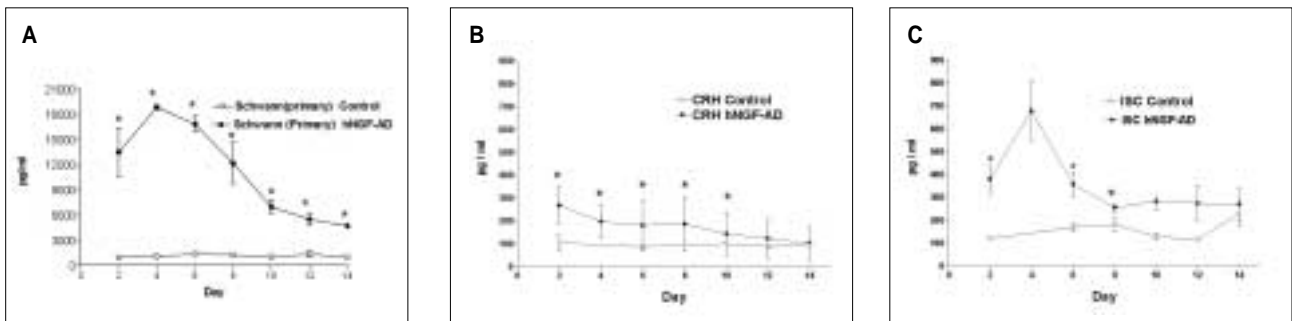


Fig. 8. ELISA results: Time dependent NGF expression in various cell line after hNGF- β recombinant adenovirus infection (*: P<0.05).

Table 1. ELISA results: Time Dependent NGF Expression in Primary Culture Schwann Cell after hNGF- β recombinant Adenovirus infection.

day	P.Schwann-Control(n=3)	P.Schwann-NGF(n=3)	P-value
2	967.163±129.103	13521.36±2892.639	0.123
4	1101.189±63.616	18865.37±310.94	<0.0001
6	1381.191±234.634	16850.33±953.089	<0.0001
8	1257.467±125.353	12192.95±2439.746	0.011
10	1033.895±153.762	7016.792±799.309	0.0018
12	1364.55±327.842	5498.096±704.409	0.0006
14	999.165±162.478	4741.403±170.556	<0.0001

Table 2. ELISA results: Time Dependent NGF Expression in CRH after hNGF- β recombinant Adenovirus Infection.

day	CRH-Control(n=5)	CRH-NGF(n=5)	P-value
2	102.941±33.203	267.416±80.311	0.0003
4		196.023±72.221	0.0009
6	86.087±10.137	179.625±110.809	0.0014
8	94.392±7.081	185.919±118.976	0.042
10	99.244±6.115	143.172±91.701	<0.0001
12	87.659±8.969	122.403±82.69	0.0748
14	92.954±6.371	100.682±75.286	0.41451

Table 3. ELISA results: Time Dependent NGF Expression in Schwann Cell Line after hNGF- β recombinant Adenovirus Infection.

day	ISC-Control(n=5)	ISC-NGF(n=5)	P-value
2	119.94±3.481	379.848±60.454	0.0148
4		677.872±129.427	
6	169.099±19.526	355.741±54.486	0.0152
8	180.109±26.971	253.787±17.693	0.0199
10	128.292±16.844	282.825±37.059	0.1981
12	114.983±5.364	273.528±79.895	0.1145
14	229.162±57.262	268.646±69.871	0.7595

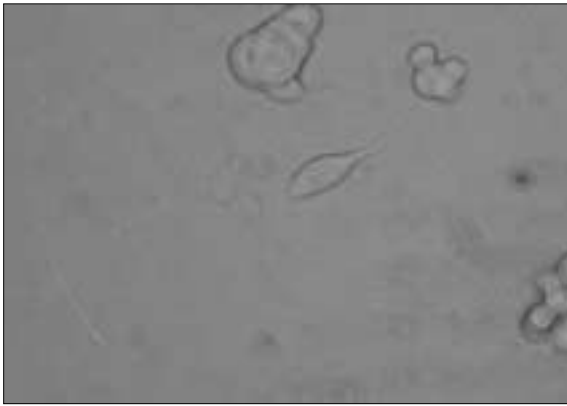


Fig. 9. Bioactivity assay of released NGF: neurite extension of PC-12 cells.

IV. 고 찰

Adenovirus는 CNS의 gene transfer vehicle로 여러 가지 명확한 장점을 갖고 있다²²⁾. Adenovirus는 쉽게 조작할 수 있고 높은 titer²³⁾(1012 viral particles per ml)로 배양할 수 있고 다른 vector와 비교하여 높은 transgene capacity를 지닌다. Adenoviral vector에 유입된 외부유전자는 상당한 안정성을 보이고 *in vivo*에서 adenovirus에 의한 gene transfer는 neuron과 glia 모두에서 효과적인 것이 검증되었다²⁴⁾. 그리고 Adenoviral vector의 serotype 2와 5는 *in vivo*에서 nontumorigenic하기에 상당히 안전하며 낮은 농도에서는 독성이 없는 것으로 알려져 있다^{25,26)}.

hNGF- β recombinant adenovirus shuttle vector와 E1, E3가 결합된 adenovirus genome을 갖고 있는 pJM17 plasmid를 HEK293 cell에 co-transfection하여 adenovirus genome sequence간에 homologous recombination이 일어난 hNGF- β recombinant adenovirus를 제작하였다. 재조합 adenovirus는 viral genome 내에 NGF sequence가 들어있는지 PCR을 이용해 확인하였고 hNGF- β recombinant adenovirus를 single plaque-으로 분리하여 wild-type adenovirus를 제거 하였다.

최종 분리한 재조합 hNGF- β adenovirus는 다량의 HEK293 cell에 감염시키고 대량 배양 정제하여 10^{11} viral particle/ titer의 높은 역가를 얻었는데 순수한 virus를 정제하는 과정은 virus를 추출하는 단계와 추출한 sample에서 CsCl를 제거하는 단계로 이루어져 있으며 단계마다 각별한 주의가 요구된다. 특별히 virus를 추출하는 단계에서의 gradient가 전체 puri과정의 결과를 결정하게 되는데 우리는 고정대에 고정된 polyallomer tube에 5ml의 CsCl 1.4(53g+87ml of 10mM Tris-HCl pH 7.9)을 천천히 넣고 1분 후에 CsCl 1.2(26.8g+92ml of 10mM Tris-HCl pH 7.9) 4ml을 CsCl 1.4 층 위에 얹는데 buffer가

섞이지 않게 아주 천천히 auto-pipetter과 1-2ml disposable pipet을 이용하여 벽면에 가까이 붙이고 buffer층에 근접하여 조심스럽게 얹어 gradient가 잘 생성 되었는지 확인 하였다. CsCl 1.2 buffer를 먼저 넣고 1.4 buffer를 tube 바닥부터 천천히 방출하여 1.4 buffer가 1.2 buffer를 밀어 올리게 하는 방법도 있다. 정제할 sample은 gradient 맨 위쪽에 층격이 가하지 않게 살살 얹어야 하며 volume과 balance는 100,000g(23,000 rpm in sw 28) 90분간 4°C로 정확하게 맞추어서 원심분리하고 brake or deceleration rate=0으로 조정하였다. 이러한 double cesium chloride법으로는 초기농도가 10^9 viral particle/titer이상인 virus는 정제할 수 없는데 우리가 얻은 10^{11} viral particle/ titer은 상당히 높은 역가로 사료되며 이는 손상된 말초신경 또는 중추신경계에 직접적인 주입제로 쓸 수 있다.

Recombinant adenovirus가 E1, E3 유전자 위치에 hNGF- β 유전자를 함유하고 있다는 것은 GFP의 발현과 immunocytochemistry 및 RT-PCR결과로 확인할 수 있다. GFP는 유전자 전달과정에서 hNGF- β 유전자와 같이 삽입되었는데 DNA서열에서 hNGF- β 유전자의 뒤에 놓여 있다. 이러한 특성상 GFP의 성공적인 발현은 hNGF- β 유전자의 성공적인 전달을 증명하였다. 제작된 hNGF- β recombinant adenovirus로 여러 세포들을 감염하여 발현되는 GFP는 90%의 높은 감염율을 제시하였다. RT-PCR 실험에서 HEK293세포, Schwann cell, CRH cell의 대조군에서는 hNGF- β 의 발현을 볼 수 없지만 hNGF- β recombinant adenovirus에 감염한 군에서는 모두 발현되었는데 CRH cell군에서는 약하게 Schwann Cell군에서는 가장 강한 발현을 나타내는데 이는 hNGF- β recombinant adenovirus의 성공적인 제작 및 NGF의 과발현 유도를 증명하였다. Schwann cell은 NGF gene을 함유하고 있으나 hNGF- β gene은 함유하지 않으므로 hNGF- β cDNA를 추출하여 전기영동으로 확인한 결과에서 Schwann cell 대조군과 같은 방법으로 제작한 Lac-Z recombinant adenovirus에 감염하였을 때는 band를 확인할 수 없다. 그러나 NIH3T3 cell는 자체 내에 hNGF- β 유전자를 함유하고 있기에 대조군과 같은 방법으로 제작한 Lac-Z recombinant adenovirus에 감염하였을 때 모두 band를 확인할 수 있고 hNGF- β recombinant adenovirus에 감염한 군에서는 더 증가되는 양상을 나타낸다.

Recombinant adenovirus에 의한 시간경과에 따른 NGF의 발현을 ELISA로 정량화하였을 때 세포의 안정 및 신경손상재생을 위한 NGF의 조기 과발현 유도는 70m.o.i.가 적절한 감염농도로 사료되었다.

본 실험에 사용된 adenovirus는 E2, E3, E4 promoter의 활성화에 필수적인 E1 유전자를 제거하고 hNGF- β 유전자를 삽입시켜 만들어진 재조합 adenovirus이기에 자기복

제 기능이 결여되어 있다. 이렇게 제작된 hNGF- β recombinant adenovirus는 E1A를 발현하는 human embryonic kidney 세포주인 293 세포 안에서 높은 감염가로 증폭하므로 HEK293세포는 세포자체의 특성으로 인한 과성장 및 증폭된 바이러스의 독성으로 인해 사멸하였지만 기타 세포들은 E1이 결여되어 감염 후 바이러스를 만들지 않으므로 장기적인 세포독성이 관찰되지 않고 NGF를 상당히 긴 기간동안 안정적으로 발현하였다. 그중 신경재생에 가장 중요한 일차배양 된 Schwann cell에서는 14일까지 일정하게 높은 농도(18865.4+/-310.9pg/ml)로 NGF를 발현되었는데 이는 기타 유전자전달방법에 의한 HEK293세포에서의 NGF의 발현향상결과인 9.05ng/ml²³⁾보다 훨씬 더 효과적인 결과이며 발현된 NGF의 bioactivity는 PC-12 cell의 neurite extension을 통하여 확인되었다.

이렇게 순수 정제된 recombinant adenovirus는 신경손상부위에 직접 주입²⁷⁾ 또는 Schwann cell에 감염 이식하여²⁸⁾ 말초신경조직의 조기재생에 큰 촉진작용을 할 수 있을 것으로 생각되었다.

V. 결 론

1. 말초신경손상 시 Schwann cell의 생존을 유도하고 성장과 분화를 촉진하며 특히 조기의 신경재생에 크게 관련되어 있는 hNGF- β 를 adenoviral vector에 cloning하여 10¹¹pfu/ml의 순수 hNGF- β recombinant adenovirus를 대량 제조하였다.
2. Schwann cell에 50~75m.o.i.로 감염시켰을 경우 90%이상의 transfection efficiency를 보였으며, mRNAtranscription에서의 NGF발현을 immunocytochemistry와 RT-PCR로 확인하였다.
3. In vitro NGF release를 SD rat DRG 일차 배양 Schwann cell과 Schwann cell line 그리고 근원세포에서 확인하였으며, 일차 배양 Schwann cell에서 바이러스 감염 4일째 18865.4+/-310.9pg/ml으로 최대 방출되었으며 그후 14일까지 유리가 관찰되었다. 또한 유지된 NGF는 neurite를 extension시키는 활성을 가지고 있었다.

이상에서 만들어진 재조합 hNGF- β recombinant adenovirus는 적당한 농도로 숙주세포에 감염시켰을 때 신경성장인자를 상당기간 높은 농도로 안정적으로 발현하여 말초신경손상에 응용하여 조기재생을 촉진할 것으로 기대되었다.

참고문헌

1. Lundborg G : A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical sig-

- nificance. J Hand Surg 25 : 391, 2000.
2. Seckel BR : Enhancement of peripheral nerve regeneration. Muscle Nerve 13 : 785, 1990.
3. May F, Weidner N, Hartung R : Tissue engineering of erectile nerves. Urologe A 43 : 1242, 2004.
4. Boyd JG, Gordon T : Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. Mol Neurobiol 27 : 277, 2003.
5. Griffin CG, Letourneau PC : Rapid retraction of neurites by sensory neurons in response to increased concentrations of nerve growth factor. J Cell Biol 86 : 156, 1980.
6. Kaechi K, Ikegami R, Nakamura N, Nakajima M, Furukawa Y, Furukawa S : 4-Methylcatechol, an inducer of nerve growth factor synthesis, enhances peripheral nerve regeneration across nerve gaps. J Pharmacol Exp Ther 272 : 1300, 1995.
7. Lee AC, Yu VM, Lowe JB 3rd, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, Sakiyama-Elbert SE : Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. Exp Neurol 184 : 295, 2003.
8. Rush RA, Mayo R, Zettler C : The regulation of nerve growth factor synthesis and delivery to peripheral neurons. Pharmacology & Therapeutics 65 : 93, 1995.
9. Anton ES, Weskamp G, Reichardt LF, Matthew WD : Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. Proc Natl Acad Sci USA Mar 29; 91 : 2795, 1994.
10. Thomas PK : The cellular response to nerve injury. III. The effect of repeated crush injuries. J Anat 106 : 463, 1970.
11. Liu HM, Lei HY, Kao KP : Correlation between NGF levels in wound chamber fluid and cytological localization of NGF and NGF receptor in axotomized rat sciatic nerve. Exp Neurol 132 : 24, 1999.
12. Verma IM, Weitzman MD : Gene Therapy: Twenty-First Century Medicine. Annu Rev Biochem 19, 2004.
13. Yi Y, Hahm SH, Lee KH : Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions Curr Gene Ther 5 : 25, 2005.
14. Haddada H, Cordier L : Perricaudet M. Gene therapy using adenovirus vectors. Curr Top Microbiol Immunol 199 : 297, 1995.
15. Smith GM, Romero MI : Adenoviral-mediated gene transfer to enhance neuronal survival, growth, and regeneration. J Neurosci Res 55 : 147, 1999.
16. Brody SL, Crystal RG : Adenovirus-mediated in vivo gene transfer. Ann N Y Acad Sci 716 : 90, 1994.
17. Le Gal La Salle G, Robert JJ, Berrard S, Ridoux V, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Mallet J : An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. Science 259 : 988, 1993.
18. Klein RL, Hamby ME, Gong Y, Hirko AC, Wang S, Hughes JA, King MA, Meyer EM : Dose and promoter effects of adeno-associated viral vector for green fluorescent protein expression in the rat brain. Exp Neurol 176 : 66, 2002.
19. Abe K, Setoguchi Y, Hayashi T, Itoyama Y : In vivo adenovirus-mediated gene transfer and the expression in ischemic and reperfused rat brain. Brain Res. 763 : 191, 1997.
20. Borsani G, Silani V : Human fetal brain beta-nerve growth factor cDNA: molecular cloning of 5' and 3' untranslated regions. Neurosci Lett 130 : 279, 1991.
21. Kim SM, Lee JH : Improved protocol for Schwann cell isolation and proliferation from rat dorsal root ganglia *in vitro*. J Kor Maxillofac Plast Reconstr Surg 25 : 265, 2003.

22. Smith GM, Romero MI : Adenoviral-mediated gene transfer to enhance neuronal survival, growth, and regeneration. *J Neur Res* 55 : 147, 1997.
23. Graham FL, Prevec L : Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol* 3 : 207, 1995.
24. Smith GM, Berry R, Yang Y, Tanelian D : Electrophysiological analysis of dorsal root ganglion neurons pre and pos-coexpression of green fluorescent protein and functional 5-HT₃ receptor. *J Neurophysiol* 77 : 3115, 1997.
25. Smith JG, Raper SE, Wheeldon EB, Hackney D, Judy K, Wilson JM, Eck SL : Intracranial administration of adenovirus expressing HSV-TK in combination with ganciclovir produces a dose-dependent, self-limiting inflammatory response. *Human Gene Ther* 8 : 943, 1997.
26. Jimenez JC, Tyson DR, Dhar S, Nguyen T, Hamai Y, Bradshaw RA, Evans GR : Human embryonic kidney cells (HEK-293 cells): characterization and dose-response relationship for modulated release of nerve growth factor for nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg* 113 : 605, 2004.
27. Koda M, Hashimoto M, Murakami M, Yoshinaga K, Ikeda O, Yamazaki M, Koshizuka S, Kamada T, Moriya H, Shirasawa H, Sakao S, Ino H : Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes rubrospinal axonal regeneration and functional recovery after complete transection of the adult rat spinal cord. *J Neurotrauma* 21 : 329, 2004.
28. Joung I, Kim HS, Hong JS, Kwon H, Kwon YK : Effective gene transfer into regenerating sciatic nerves by adenoviral vectors: potentials for gene therapy of peripheral nerve injury. *Mol Cells* 31 : 540, 2000.

저자 연락처

우편번호 110-768
서울시 종로구 연건동275-1
서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
이종호

원고 접수일 2005년 2월 20일
게재 확정일 2005년 5월 25일

Reprint Requests

Jong-Ho Lee
Dept. of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University
#275-1 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-768, South Korea
Tel: 82-2-2072-2630 Fax: 82-2-766-4948
E-mail: leejongh@plaza.snu.ac.kr

Paper received 20 February 2005
Paper accepted 25 May 2005