Polymer(Korea), Vol. 42, No. 5, pp. 849-856 (2018)
https://doi.org/10.7317/pk.2018.42.5.849

ISSN 0379-153X(Print)
ISSN 2234-8077(Online)

생체 적합성을 지니는 글리콜 키토산을 기반으로 하는 나노입자 제조를 통한 유전자 전달체 연구

이영화 · 최준식†

충남대학교 자연과학대학 생화학과

(2018년 4월 13일 접수, 2018년 5월 14일 수정, 2018년 5월 15일 채택)

Biocompatible Glycol Chitosan-based Nanoparticles for Gene Delivery System

Young Hwa Lee and Joon Sig Choi†

Department of Biochemistry, Chungnam National University, Gung-dong 220, Yuseong-gu, Daejeon 34134, Korea

(Received April 13, 2018; Revised May 14, 2018; Accepted May 15, 2018)

초록: 최근 많은 연구를 통해 유전자 전달체로써 생체 적합하며 생분해성이 뛰어난 키토산에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는 키토산의 유도체인 글리콜 키토산을 사용하여 메틸 아크릴레이트와 폴리에틸렌이민을 도입하여 유전자 전달체를 개발 및 연구하였다. 최종 합성물인 GMP 1300과 GMP 2000은 핵자기 공명 분광기를 이용해 합성 정도를 평가하였고, 플라스미드 DNA와의 결합력 확인을 위해 전기영동을 수행하였다. 그리고 나노입자 분석기를 이용하여 플라스미드 DNA와 결합시킨 GMP 1300과 GMP 2000의 입자 크기와 표면 전하를 측정하였다. *In vitro* 실험을 위하여, HeLa와 HEK 293 세포주를 이용하여 세포 독성 평가를 진행하였고, 세포 유입은 공초점 현미경을 통해 확인하였다. 또한 유전자 발현율을 평가하기 위해 녹색 형광 단백질을 발현하여 이미지로 확인하였고, 루시페라아제와 단백질 정량을 통해 유전자 발현 효율을 측정하였다. 그 결과, 본 연구에서 제조된 나노 입자들은 독성이 현저히 낮으며, 유전자와의 결합력이 강하고, 세포 내 유입에 용이하다는 것을 통해 생체적합한 유전자 전달체로써 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract: Since chitosan is biocompatible and biodegradable, it has been studied as a good material as a gene delivery carrier. In this study, we have developed and studied a gene delivery carrier by introducing methyl acrylate and polyethylenimine using glycol chitosan, a derivative of chitosan. GMP1300 and GMP2000 were identified by ^{1}H NMR and electrophoresis was performed to confirm the binding ability with pDNA. The particle size and surface charge of GMP1300 and GMP2000 with pDNA were measured using a zetasizer. Cytotoxicity was assessed using HeLa and HEK293 cell lines, and cellular uptake was confirmed by confocal microscopy. In addition, the gene expression rate in HeLa cell line was confirmed by confocal image through green fluorescent protein (GFP), and transfection efficiency was measured by protein quantification. As a result, the prepared nanoparticles were expected to be used as biocompatible gene delivery carriers because of their low toxicity and strong binding force with genes.

Keywords: gene delivery, cationic polymer, glycol chitosan, polyethylenimine, transfection.

서 론

최근 유전적인 질병뿐만 아니라 암을 비롯한 다양한 질병을 치료하기 위하여 유전자를 이용한 유전자 치료법이 연구되고 있다. 질병을 치료하기 위해서 사용되는 유전자 치료법에는 바이러스성 또는 비 바이러스성 전달체로 나눌 수 있다. 바이러스성 전달체는 유전자 전달 효율은 매우 높지만 면역 반응을 일으키며 부작용이 심하다는 단점을 가지고 있어 근래에는 비 바이러스성 전달체를 개발하여 많은 질병 치료를 위한 연구가 이루어지고 있다. 비 바이러스성 전달체는 연구자가 직접 물질을 선택하여 개발할 수 있으며, 바이러스성 전달체에 비해 면역 반응이 적다는 장점을 지니고 있지만 유전자 전달 효율이 바이러스성 전달체에 비해 낮다는 단점이 있다.[1-3] 이러한 문제를 보완하기 위하여 리포좀, 마이셀 뿐만 아니라 양이온성 고분자를 이용하여 많은 유전자 전달체가 개발되고 있다. 이 때, 많이 사용되는 양이온성 고분자는 폴리라이신(poly L-lysine), 폴리에틸렌이민(polyethylenimine, PEI), 키토산(chitosan), 그리고 폴리아미도아민(polyamidoamine) 등

†To whom correspondence should be addressed.
joonsig@cnu.ac.kr, ORCID 0000-0002-8463-841X
©2018 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

이 있다. 이와 같은 양이온성 고분자는 높은 농도로 사용하였을 때 독성이 나타날 수 있기 때문에 표면을 개질하여 독성을 줄이며 유전자 전달 효율을 높이기 위한 연구가 이루어지고 있다.[4-6]

특히, 양이온성 고분자 중 키토산은 갑각류로부터 추출한 천연고분자 물질인 키틴으로부터 제조되어 다양한 유도체로 사용되고 있다. 키토산과 그 유도체들은 생체적합성을 가지며 생분해성이 뛰어나 체내에서 독성이 없고 면역 반응을 일으키지 않는다는 장점이 있다. 또한 양전하를 가지기 때문에 여러 종류의 핵산과 효율적으로 복합체를 형성할 수 있어 질병을 치료하기 위한 전달체뿐만 아니라 다양한 분야에서 생체 재료로써 개발되고 있다.[7] 그러나 키토산 자체로는 물에 잘 녹지 않고 산을 포함한 수용액에만 용해되는데 반해 키토산의 유도체인 글리콜 키토산의 경우 수용성 키토산으로써 물에 용해가 잘 된다는 특징을 가지고 있다. 이러한 특징을 가지는 글리콜 키토산은 유전자 전달체를 비롯하여 약물 전달체로도 많이 연구되고 있으며 나노 입자, 마이셀, 그리고 하이드로젤의 형태로 응용되고 있다.[8,9]

또한 폴리에틸렌이민(polyethylenimine, PEI)은 다양한 분자량을 가지며 선형과 가지형으로 존재하며 구조에 많은 아민기를 포함하고 있다는 특징이 있다. 많은 아민기는 양이온성을 나타내게되고 음이온성을 띠는 유전자와 결합이 쉽다. 유전자 자체로는 음이온성을 띠는 세포막을 투과하기 어려우며 양이온성 고분자와 복합체를 형성하여 전달하였을 때 높은 전달력을 통해 단백질 효율이 높아지게 된다.[10-13] 그러나 높은 분자량을 가지는 PEI는 많은 수의 아민기로 인해 세포에 영향을 주어 독성을 나타낼 수 있기 때문에 적절한 분자량의 PEI를 사용하는 것이 매우 중요하다.

본 연구에서는 키토산의 유도체인 글리콜 키토산(GC)을 기반으로 하는 고분자를 제조하였다. 양이온성을 높이기 위하여 PEI를 도입하였으며 GC와 PEI 중간에 메틸 아크릴레이트(MA)를 연결하여 주었다. MA는 덴드리머를 제조할 때 많이 사용되는 물질로써 마이클 첨가(Michael addition) 과정을 통해 아민기와 반응하여 긴 사슬의 아민기를 도입할 수 있게 된다.[14] 이와 같이 GC에 MA를 연결한 후 도입된 PEI는 두 종류의 분자량(1300, 2000 Da)을 사용하여 고분자를 개발하였다. 제조된 고분자는 비 바이러스성 전달체로써 활용을 위하여 유전자와 결합력을 확인하였으며, 복합체를 형성하였을 때 가지는 크기와 전하를 확인하였다. 또한 동물 세포에 대한 농도별 독성 평가를 수행하였으며, 세포 내 유입을 공초점 현미경을 통해 확인하였다. 최종적으로 유전자 전달 효율을 확인하기 위하여 녹색 형광 단백질을 발현할 수 있는 유전자와 복합체를 형성하여 세포 내로 전달하였을 때 녹색 형광 단백질이 발현된 정도를 공초점 현미경 이미지를 통해 확인하였고, 루시페린과 만나 발광할 수 있는 단백질을 발현시킬 수 있는 유전자를 통해 유전자 전달 효율을 평가하였다. 이와 같은 특성 및 *in vitro*상 실험을 통하여 생체 적합한 유전자 전달체로써 가능성을 알아보고자 하였다.

실 험

시약 및 재료. 본 실험에서 사용된 글리콜 키토산(glycol chitosan, GC, ≥60%, crystalline, degree of deacetylation = 91.6%), 메틸 아크릴레이트(methyl acrylate, MA, 99%), 메탄올(anhydrous, 99.8%), 1300, 2000 Da(50 wt% in H_2O, branched PEI) 그리고 25 kDa 폴리에틸렌이민(water-free, branched PEI, polyethylenimine)은 Sigma-aldrich 사에서 구입하였다. 사용된 GC, MA 그리고 PEI의 구조는 Figure 1에 나타내었다. 세포 독성 평가를 위해 Daeil Lab service(한국)사에서 WST-1 assay kit를 구매하였다. Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), 그리고 100x antibiotic-antimycotic agent는 Gibco(미국)에서 구매하였다. 루시페라아제 정량은 Promega(Madison, WI, 미국)에서 구매하였으며, 단백질 정량을 위해 Micro BCA kit를 Pierce(Rockford, IL, 미국)에서 구매하였다.

폴리에틸렌이민을 가지는 글리콜 키토산 나노입자 제조. 본 실험에서 사용된 고분자는 이전에 게재된 논문과 동일한 방법으로 제조하였다.[15] 간략하게 요약하자면, 먼저 MA를 250 mL 둥근 바닥 플라스크에 옮기고 메탄올과 함께 실온에서 10분 동안 섞어준다. 그 다음, 물에 녹인 GC는 둥근 바닥 플라스크에 한 방울씩 떨어뜨리며 첨가해주며 교반시켜 준다. 교반시킨 후에, 플라스크 내부를 질소 기체로 충전시키

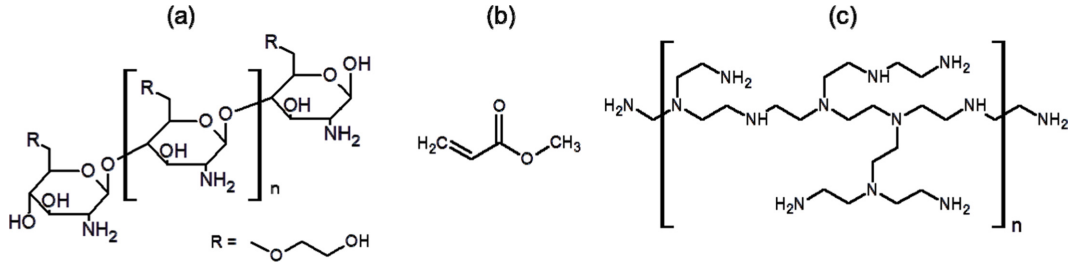

Figure 1. Structure of (a) glycol chitosan (GC); (b) methyl acrylate (MA); (c) polyethylenimine (PEI).

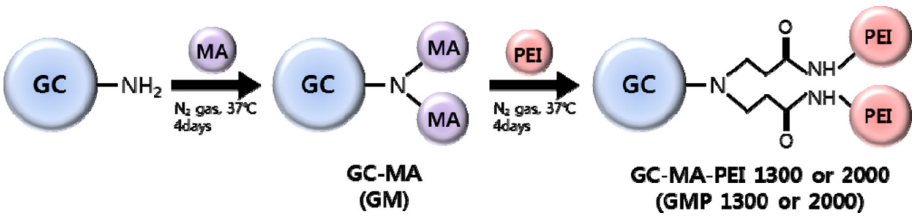

Figure 2. Synthesis scheme of glycol chitosan-methyl acrylate-polyethylenimine 1300 and 2000 (GMP 1300 and 2000).

고, 180 rpm으로 회전시키며 37 ℃에서 4일 동안 반응시켜 준다. 4일 후, 둥근 바닥 플라스크에 1300과 2000의 분자량을 가지는 PEI를 넣어주고, 다시 질소 기체로 충전시킨 뒤 회전시키며 반응한다. 반응 과정 중 사용한 용매는 메탄올과 물을 9:1의 부피비로 사용하였다. 최종적으로 둥근 바닥 플라스크 내부의 메탄올을 증발시키고, 남아있는 물질은 24시간 이상 투석(MWCO 3500)하여 순도를 높였다. 투석 후 동결건조하여 최종 합성물인 GMP 1300과 GMP 2000을 얻었다 (Figure 2).

최종 합성물은 600 MHz 핵자기 공명 분광기(Bruker, 독일)을 통해 분석하였다.

GMP 1300: ^{1}H NMR(D_2O, ppm), yield ≥90%, δ=1.1-1.2 ppm($NHCOCH_3$, acetyl group), 2.4-2.5 ppm(H2, deacetylated monomer), 2.6-2.8 ppm(H11, protons next to amines), 2.9-3.0 ppm(H9, H10), 3.5-3.7 ppm(multiplet, D-glucosamine unit, H2, H3, H4, H5, H6).

GMP 2000: ^{1}H NMR(D_2O, ppm), yield ≥90%, δ=1.2-1.3 ppm($NHCOCH_3$, acetyl group), 2.3-2.5 ppm(H2, deacetylated monomer), 2.7-2.7 ppm(H11, protons next to amines), 2.7-2.9 ppm(H9, H10), 3.1-3.4 ppm(multiplet, D-glucosamine unit, H2, H3, H4, H5, H6).

전기영동을 이용한 고분자와 플라스미드 DNA 복합체 형성 확인. 제조된 고분자와 플라스미드 DNA(pCN-Luc)의 중량비에 따른 복합체 형성 정도를 확인하기 위해 전기영동을 수행하였다. 복합체는 125 mM HEPES 버퍼(pH 7.4) 상에서 고분자와 pDNA는 1, 2, 4, 6, 8, 10:1의 중량비로 준비하였고, 대조군으로 글리콜 키토산과 pDNA를 5, 10:1의 중량비로 준비하여 30분 동안 실온에서 복합체를 형성시켰다. 0.7% 아가로스겔에 0.5 μg/μL의 ethidium bromide를 처리하여 20분 동안 100 V로 전기영동하였다.

나노 입자 분석기를 이용한 나노 입자의 크기 및 전하 측정. 플라스미드 DNA와 복합체를 형성한 나노 입자의 크기와 전하를 측정하기 위해 전기영동에 사용된 동일한 조건으로 복합체를 형성한 후 실온에서 Zetasizer Nano–Zs(Malvern, 영국)로 입자 크기와 전하를 측정하였다.

세포 배양. 세포는 human epithelial ovary carcinoma (HeLa), human embryonic kidney 293(HEK 293)을 10% FBS와 1% antibiotic을 포함하는 DMEM으로 배양하여 37 ℃, 5% CO_2, 95% 습도로 환경을 유지하며 실험에 사용하였다.

세포 독성 실험. 나노 입자의 농도에 따른 세포 독성 확인을 위하여 WST-1 assay 방법을 통해 독성 실험을 수행하였다. 세포는 HeLa와 HEK 293을 사용하였다. 96 well microassay plate에 1 well 당 1만개/well의 세포를 37 ℃, 5% CO_2, 95% 습도에서 배양한다. 24시간 후에, 합성된 고분자인 GMP 1300과 GMP 2000을 처리했고, 대조군으로 PEI 25 kDa, 1300 Da, 2000 Da 그리고 제조에 사용되지 않은 동일한 분자량의 GC를 사용하여 세포에 처리 후 다시 인큐베이터 안에서 배양하였다. 24시간 후에 10 μL의 EZ-Cytox 시약을 각 well에 넣어준다. 2시간 후에 ELISA(VersaMax, Molecular Devices, 미국)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 유입 확인을 위한 공초점 형광 현미경 실험. 세포 내 고분자 물질의 유입 정도를 확인하기 위하여 공초점 형광 현미경을 통해 확인하였다. HeLa 세포를 iBidi 8 well plate(μ-slide 8 well, iBidi, 독일)에 5000개/well로 37 ℃, 5% CO_2, 95% 습도에서 배양한다. 플라스미드 DNA의 형광을 나타나기 위해 Alexa Fluor 546 nucleic acid labeling kit(Thermo scientific, 미국) 플라스미드 DNA에 형광 표지를 연결하였다. 형광 표지된 플라스미드 DNA는 PEI 25 kDa(PEI 25 kDa: pDNA=2:1), 1300 Da, 2000 Da(PEI 1300, 2000 Da: pDNA=5:1), GC(GC:pDNA=10:1), GMP 1300 그리고 GMP 2000 (GMP 1300, 2000:pDNA=10:1)과 함께 각각 복합체를 형성시켜서 세포에 처리하여 24시간 동안 배양시켰다. 24시간 후, 세포의 핵 염색을 위해 10 μg/mL의 bisbanziamide trihydrochloride(Hoechst 33342)를 처리하여 인큐베이터에서 10분간 반응시킨다. DPBS로 세척 과정을 거친 후 공초점 현미경(LSM5 live configuration vario two VRGB, 독일)으로 관찰하였다.

녹색 형광 단백질 발현을 통한 형광 이미지 실험. 세포 내 유전자 전달 효율을 확인하기 위하여 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP)발현 실험을 통해 전달 효율을 평가하였다. GFP 발현을 위해 플라스미드 DNA인 pEGFP-N1을 사용하였으며 대조군을 비롯한 본 연구에서 제조된 고분자와 함께 복합체를 형성하여 사용하였다. 공초점 현미경 실험과 동일한 방법으로 복합체 형성 후 HeLa 세포에서 실험하였

다. HeLa 세포를 분주하고 24시간 뒤에 형성된 복합체를 세포에 처리하여 다시 배양시키고, 다음 날 세포 핵 염색을 위해 Hoechst 33342를 처리한 후 DPBS로 세척하여 공초점 현미경으로 녹색 형광을 관찰하여 비교하였다.

단백질 정량을 통한 유전자 전달 효율 실험. 루시페라아제 및 단백질 정량을 통해 유전자 전달 효율을 측정하기 위하여 HeLa와 HEK 293 세포를 사용하여 48 well plate에 3만개/well을 분주하고 24시간 동안 배양한다. 그 후, pCN-Luc과 고분자를 각각의 중량비로 복합체를 형성시킨 후에 세포에 처리해 주어 인큐베이터에서 배양했다. 24시간 후에 세포 배양액을 제거하고, reporter lysis buffer(Promega, 미국)를 처리하여 30분 동안 반응시켜 세포를 파쇄시킨다. 루시페라아제 활성은 루미노미터(LB9507, Berthold Technology, 독일)로 측정하였고, 총 단백질 농도는 Micro BCA Protein assay kit를 사용하여 2시간 반응 후에, ELISA로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계학적 분석. 실험의 통계학적 분석은 *student's t-test*를 시행하였다.

결과 및 토론

폴리에틸렌이민을 가지는 글리콜 키토산 고분자 확인. 본 연구에서는 GC를 기반으로 MA 도입을 통해 두 가지 종류의 분자량인 1300, 2000 Da PEI를 연결하여 새로운 고분자를 제조하였다. 제조된 고분자는 GC – MA – PEI 1300, 2000 Da(GMP 1300, 2000)으로써 명명하였다. 합성 후, PEI가 결합된 GC를 확인하기 위하여 600 MHz 핵자기 공명 분광기를 이용하여 분석하였다(Figure 3). 그 결과, GMP 1300과 GMP 2000은 2.5-2.9 ppm에서 가장 큰 피크를 갖는데, 이는 PEI에서 나타나는 아민 그룹의 수소 피크이며, 3.2-3.4 ppm에서는 GC 구조에서 링 부분에 해당하는 수소 피크가 나타남을 확인할 수 있었다. 결합된 MA와 PEI의 수소 개수를 계산하였을 때, GC 한 당량에 약 90% 이상으로 각각 결합된 것을 알 수 있었다. 이 결과는, 이전에 보고된 것과 비교하였을 때 GC와 PEI의 피크가 본 연구에서 제조된 고분자와 동일하게 나온 것을 통하여 GMP 1300과 GMP 2000 제조가 성공적으로 이루어진 것을 확인할 수 있었다.[16,17]

전기영동을 이용한 고분자와 플라스미드 DNA 복합체 형성 확인. GMP 1300과 GMP 2000이 플라스미드 DNA가 복합체를 형성하는지 확인하기 위하여 아가로스겔 전기영동을 이용하여 complex test를 수행하였다. 이 때, 고분자와 정전기적 상호작용으로 복합체를 형성하지 못한 자유 플라스미드 DNA는 아가로스겔을 쉽게 통과하여 아래쪽에 띠를 형성하게된다.[18] 전기영동을 위해 사용된 복합체는 나노 입자와 플라스미드 DNA를 1, 2, 4, 6, 8, 10:1의 중량비로 준비하였고, 대조군으로는 GC를 사용하여 5, 10:1의 중량비로 전기영동을 수행하였다. 그 결과, 대조군인 GC는 복합체를 형성하지 못하고 끌려 내려와 아래쪽에 띠를 형성하였지만, GMP 1300은 1,2:1의 비율에서는 약간 끌려 내려온 것으로 보였지만, 4:1부터 완벽하게 복합체를 형성한 것을 알 수 있었다. GMP 2000의 경우 제일 낮은 비율인 1:1부터 완벽하게 복합체를 형성한 것을 확인할 수 있었다(Figure 4). 이러한 결과는 본 연구에서 제조된 나노 입자가 유전자 전달체로써 유전자와

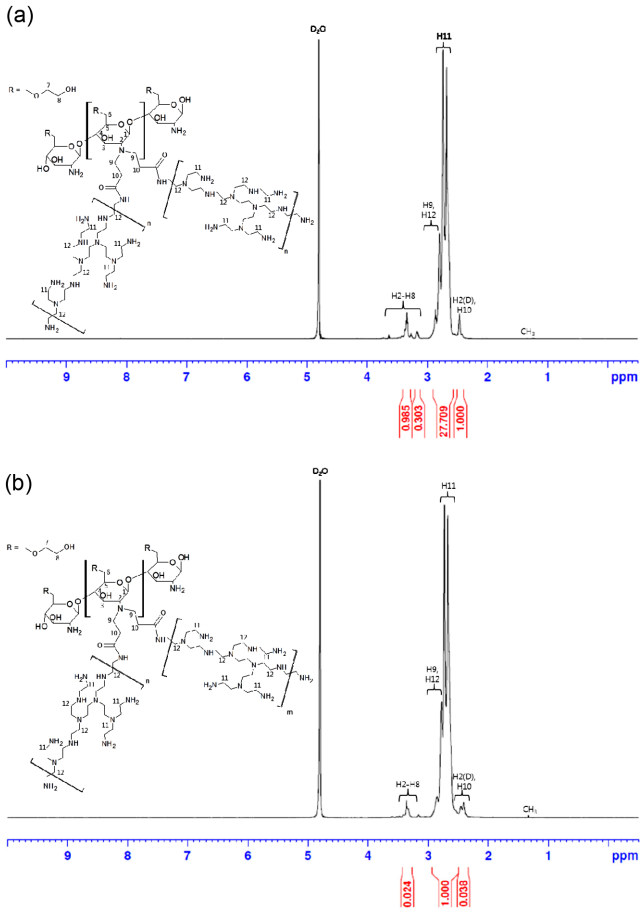

Figure 3. ^{1}H NMR spectra of (a) GMP 1300; (b) GMP 2000.

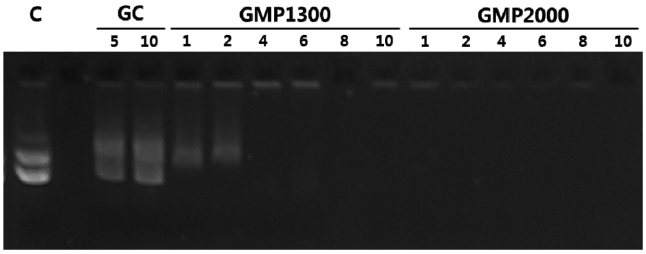

Figure 4. Agarose gel retardation assay of GMP 1300 and 2000 with plasmid DNA. Plasmid DNA only (C), weight ratio of glycol chitosan (GC):pDNA=5, 10:1 and GMP 1300 and 2000:pDNA= 1,2,4,6,8,10:1.

복합체 형성에 유리하다는 것을 확인할 수 있었다.

나노 입자 분석기를 이용한 나노 입자의 크기 및 전하 측정. 전기영동 실험을 통하여 나노 입자가 유전자와 복합체 형성이 잘 되었음을 확인하였다. 그러나 실제 세포 내 유입은 입자의 크기가 나노 크기를 가지며, 양전하를 띠는 나노 입자가 세포 유입에 유리하게 된다.[3] 본 연구에서 제조된 나노 입자가 세포 유입에 적합한 크기 및 전하를 가지는지 확인하기 위하여 나노 입자 분석기를 통하여 측정하였다.

제조된 GMP 1300과 GMP 2000을 플라스미드 DNA와 30분간 복합체를 형성시켜 크기와 전하를 측정한 결과, 모든 중량비에서 300 nm 이하의 나노 크기를 가지며(Figure 5(a), (b)), 제타 전위를 측정한 결과 모든 중량비에서 양전하를 띠며, GMP 2000의 경우 30 mV 이상으로 높은 양전하를 가지는 것을 확인하였다(Figure 5(c), (d)). 이러한 결과는, 1000 nm 이상의 크기를 갖는 플라스미드 DNA가 GMP 1300과 GMP 2000과 정전기적으로 결합하였을 때, 효과적으로 응축되며 세포 내로 유입하기에 적합한 특성을 가진다는 것을 확인하였다.

세포 독성 실험. GMP 1300과 GMP 2000의 농도에 따른 세포 독성 정도를 확인하기 위해 HeLa와 HEK 293 세포를 이용하여 WST-1 assay를 수행하였다. 대조군으로는 PEI 25 kDa, 1300 Da, 2000 Da 그리고 GC를 사용하였다. 모든 샘플은 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 μg/μL의 농도로 준비하여 세포에 각각 처리해주었다. 그 결과, 유전자 전달체로써 전달 효율은 뛰어나지만 세포 독성이 매우 강하다고 알려진 PEI 25 kDa은[19] 두 가지 세포주에서 낮은 농도만으로도 높은 세포 독성을 보이는 것을 확인하였다. 또한 PEI 1300, 2000 Da과 GC는 모든 농도에서 큰 독성을 보이지 않음을 확인할 수 있었다. 그리고 GMP 1300과 GMP 2000의 경우, 모든 농도에서 독성이 거의 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 양이온성 고분자로써 유전자 전달효율이 매우 높은 PEI 25 kDa과 본 연구에서 제조된 나노 입자를 비교하였을 때 현저히 낮은 독성을 갖는다는 것을 알 수 있었다(Figure 6). 이와 같은 독성의 차이가 나타나는 이유는 본 연구에서 사용한 PEI가 GC와 결합하면서 양이온 밀도가 낮아지며 세포 독성에 영향을 미치지 않으며, GC 골격으로 합성되어 생체 적합하며 높은 분자량의 PEI와 비교하였을 때 독성이 거의 없다는 것을 알 수 있었다. 따라서 낮은 분자량의 PEI와 연결된 GC는 세포 내에서 안전성을 띠는 비 바이러스성 유전자 전달체임을 확인할 수 있었다.

세포 유입 확인을 위한 공초점 형광 현미경 실험. 제조된 나노 입자가 세포 내로 전달되는 것을 확인하기 위하여 *in vitro* 상에서 플라스미드 DNA에 형광 물질을 결합하여 제조

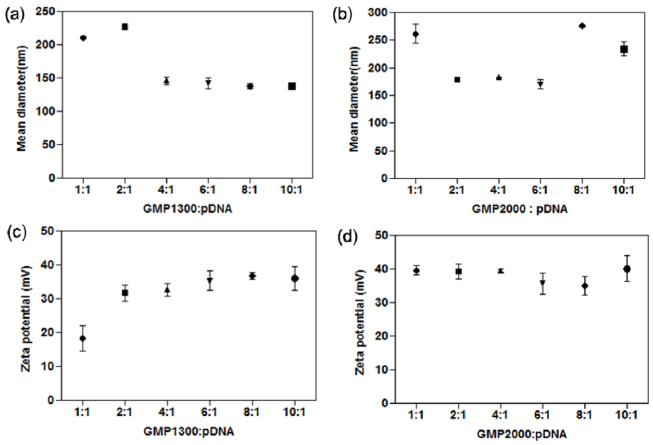

Figure 5. Characterization of polymers with plasmid DNA. Mean diameter of (a) GMP 1300; (b) GMP 2000 with pDNA complexes. Zeta potential values of (c) GMP 1300; (d) GMP 2000 with pDNA complexes measured by zetasizer. Data are expressed as mean ± standard deviation (n=3).

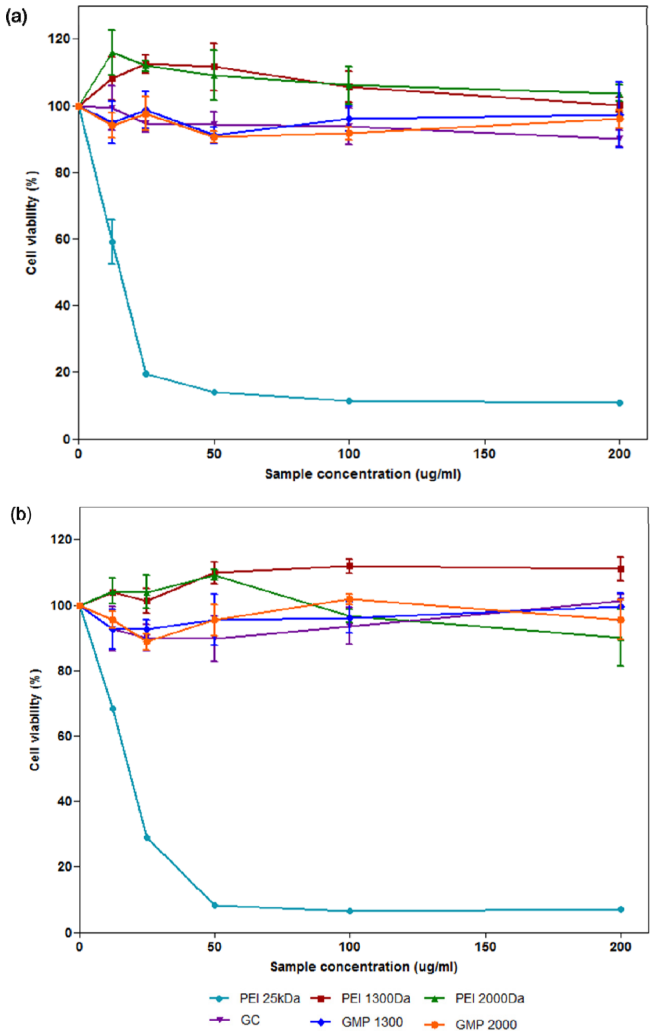

Figure 6. Cytotoxicity test of polymers in (a) HeLa; (b) HEK 293 cells at each concentration measured by WST-1-based toxicity assay. Data are expressed as mean ± standard deviation (n=4).

된 고분자와 복합체를 형성시킨 후 세포에 처리하여 공초점 형광 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, PEI 25 kDa의 경우 많은 양의 복합체가 세포 안으로 유입된 것을 확인할 수 있었지만 PEI 내의 많은 양전하로 인한 세포 독성으로 세포의 모양이 응축된 것을 관찰할 수 있었다. PEI 1300과 2000 Da은 고분자량의 PEI와 비교하였을 때, 붉은색 형광이 일부 나타나 소량으로 세포 내 유입이 된 것을 볼 수 있었고, GC는 핵 염색 시 사용된 파란색 형광 외에는 다른 색 형광이 나타나지 않을 것을 통해 세포 내로 유입되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 제조된 GMP 1300과 GMP 2000은 PEI 1300, 2000 Da과 비교하였을 때 훨씬 더 많은 복합체가 유입되어 붉은색 형광이 세포질에 위치하는 것을 확인할 수 있었고 일부는 세포 내 핵까지 위치한 것을 확인할 수 있었다(Figure 7). 위 결과를 통하여 본 연구에서 제조된 고분자와 플라스미드 DNA와 복합체 형성 후 세포 내 전달 능력이 향상된 것을 통하여 세포 내 유전자 전달체로써 사용될 수 있음을 확인하였다.

녹색 형광 단백질 발현을 통한 형광 이미지 실험. 공초점 현미경을 이용하여 세포 유입 실험을 수행한 결과 GMP 1300과 GMP 2000이 플라스미드 DNA와 복합체를 형성하였을 때 세포 내로 유입이 잘 된다는 것을 확인할 수 있었다. 다음으로는 녹색 형광 단백질을 발현시키는 유전자와 복합체 형성을 통해 본 연구에서 제조된 나노 입자가 세포 내로 유전자 전달 뿐만 아니라 실제로 전달된 유전자가 단백질 발현까지 이어질 수 있는지를 확인하기 위하여 본 실험을 진행하였다. 대조군으로는 이전 실험과 동일하게 사용하여 비교하였다. 그 결과, 세포 유입 확인 실험과 유사한 결과를 얻을 수 있었다. PEI 25 kDa에서 녹색 형광 단백질이 가장 많이 발현된 것을 확인할 수 있었고 그 다음으로 GMP 2000과 GMP 1300이 형광 발현 효율이 제일 높은 것을 확인할 수 있었다. PEI 1300, 2000 Da은 공초점 현미경과 유사하게 일부 형광이 나타나는 것을 확인할 수 있었지만 GMP 1300과 2000에 비해 현저히 적은 형광을 보이는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 GMP 1300과 GMP 2000은 유전자를 전달하는 것뿐만 아니라 전달된 유전자가 핵으로 전달되어 단백질 발현까지 이루어진다는 것을 확인할 수 있었다(Figure 8).

단백질 정량을 통한 유전자 전달 효율 실험. GMP 1300과 GMP 2000의 세포 내 유전자 전달 효율을 확인하기 위해 루시페라아제와 micro BCA를 통하여 단백질 정량 실험을 수행하였다. 세포 독성 실험과 동일한 세포주를 사용하였으며, 대조군으로는 이전 실험들과 동일하게 다양한 분자량의 PEI와 GC를 사용하여 비교하였다. 사용한 플라스미드 DNA는 pCN-Luc으로 세포 내로 전달되어 단백질인 루시페라아제로 발현되고, 루시페린과 반응시켰을 때 발광하여 각 샘플마다 발광 정도를 비교할 수 있게 된다. 실험을 수행한 결과, 유전자 전달 효율이 매우 높다고 알려진 PEI 25 kDa은 모든 샘플 중에 가장 높은 발현 효율을 보였다. GMP 1300과 GMP 2000은 중량비가 증가할수록 유전자 전달 효율도 증가하는 경향을 보였으며 최대 중량비인 10:1에서 가장 높은 효율을 보이는 것을 확인하였다. 이는 나노 입자의 양이 증가할수록 결합된 PEI의 양이 많아져 양전하가 증가하게 되고 효율적으로 플라스미드 DNA와 결합하여 세포 내로 전달할 수 있다

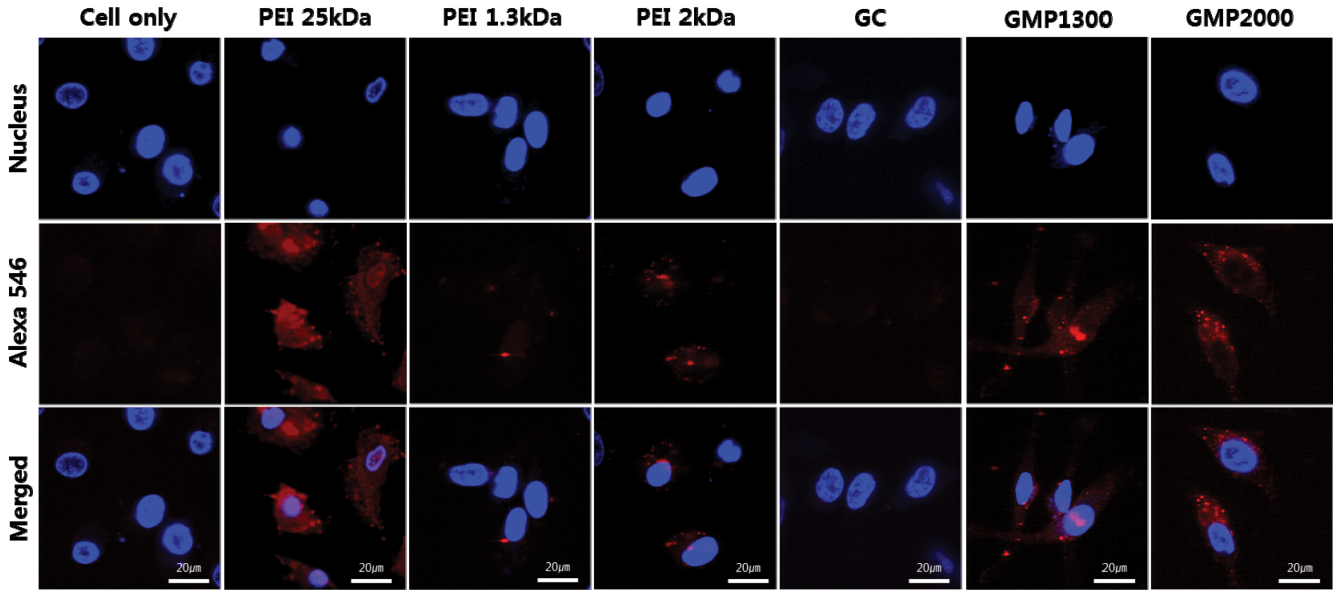

Figure 7. Cellular uptake in HeLa cells transfected with polymer/labeled-plasmid DNA complexes. The nucleus of the cells was stained with Hoechst 33342 (blue) and plasmid DNA was labeled with Alexa Fluor 546 reagent (red).

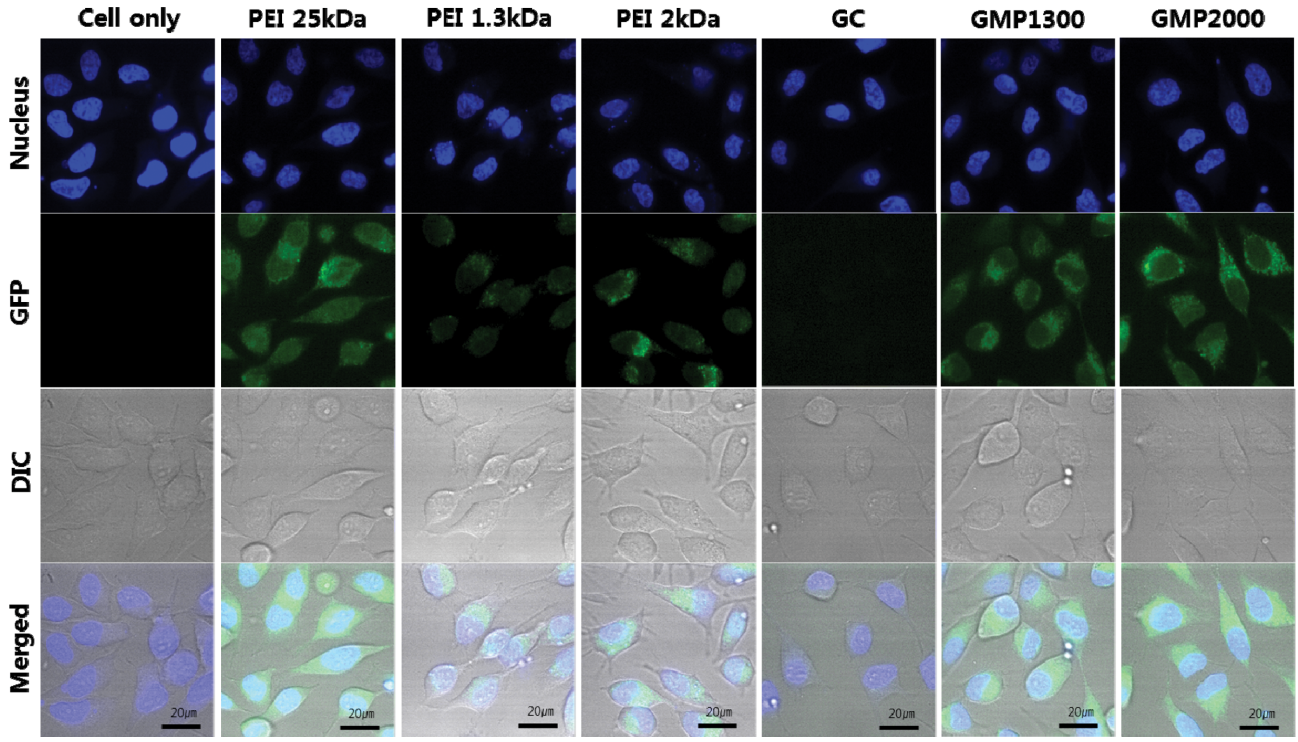

Figure 8. Expression of GFP in HeLa cells transfected with polymer/pEGFP-N1 compolexes under confocal microscopy. The nucleus of the cells was stained with Hoechst 33342 (blue).

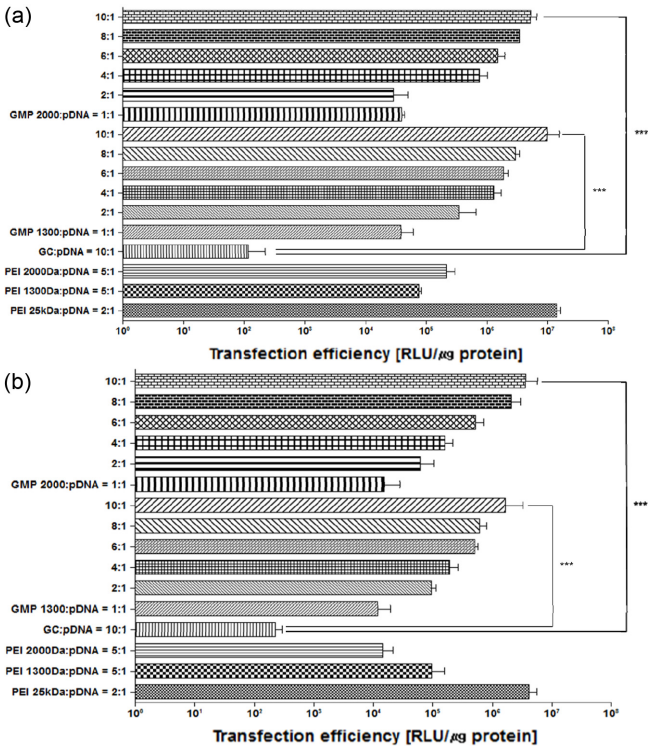

Figure 9. Transfection efficiency of polymers with plasmid DNA (pCN-Luc) in (a) HeLa; (b) HEK 293 cells at each weight ratio. Data are shown as mean ± standard deviation (n=3). ***p<0.001.

는 것을 알 수 있었다. 대조군으로 사용된 PEI 1300과 2000 Da은 그 자체로도 어느 정도 발현 효율을 보이긴 하지만 GMP 1300, GMP 2000과 비교하였을 때 유전자 전달 효율성이 낮다는 것을 알 수 있었다(Figure 9). 저분자량의 PEI의 경우 고분자량의 PEI와 비교하였을 때 구조 내 포함된 아민기의 개수가 적음을 알 수 있으며, GMP1300과 GMP2000은 GC에 저분자량의 PEI를 도입하여 아민 개수를 증가시켜 유전자 전달 효율 측정 실험에서 많은 아민기를 가진 고분자가 높은 효율이 나타나, 아민기와 전달효율이 비례하게 나타나는 것을 알 수 있었다. 이와 같이 유전자 전달 효율 실험을 통하여 본 연구에서 제조된 GMP 1300과 GMP 2000은 낮은 독성을 지니고 높은 유전자 전달 및 단백질 발현 효율을 지니는 유전자 전달체로써 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 생체 적합성을 지니며 독성이 없다고 알려진 키토산 유도체인 글리콜 키토산을 기반으로 유전자 전달체를 제조하였다. 글리콜 키토산은 물에 잘 녹지만 양전하를 띠는 부분이 낮아 유전자 전달 효율이 낮다. 그러나 본 연구에서는 두 가지 종류의 폴리에틸렌이민을 사용하여 글리콜 키토산에 연결하여 나노 입자를 제조하였다. 제조된 나노 입

자는 핵자기 공명 분광기를 통해 합성이 성공적으로 되었음을 확인할 수 있었고, 플라스미드 DNA와 복합체를 형성시켜 전기영동과 크기 및 전하를 측정한 결과 플라스미드 DNA와 결합력이 뛰어나며, 입자 크기 또한 나노 크기로 세포 내 유입에 유리할 것으로 판단되었다. 또한 HeLa와 HEK293 세포주를 이용해 농도별 독성과 전달 효율을 확인한 결과, 대조군인 폴리에틸렌이민 25 kDa과 비교하였을 때, 세포 내 독성이 현저히 낮음을 알 수 있었고, 유전자 전달 효율 또한 폴리에틸렌이민 25 kDa과 비슷한 수준으로써 전달효율이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 또한 세포 내에서도 세포질뿐만 아니라 핵까지도 세포 유입이 이루어진 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 연구에서 제조된 글리콜 키토산 기반의 나노입자는 면역 반응을 일으키지 않으며 전달 효율이 뛰어난 생체 적합한 새로운 유전자 전달체로써 사용될 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 글: This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2016R1D1A1A09917141).

참 고 문 헌

1. K. Kataoka and H. Harashima, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **52**, 151 (2001).
2. R. J. Cristiano, *Anticancer Res.*, **18**, 3241 (1998).
3. A. R. Azzoni, M. L. Wu, S. S. Freitas, G. A. Monteiro, and D. M. F. Prazeres, *Human Gene Therpy*, **18**, 1053 (2007).
4. J. M. Benns, J. S. Choi, R. I. Mahato, J. S. Park, and S. W. Kim, *Bioconjug. Chem.*, **11**, 637 (2000).
5. Y. B. Lim, S. M. Kim, H. Suh, and J. S. Park, *Bioconjug. Chem.*, **13**, 952 (2002).
6. Z. Y. Ye, N. Kumar, A. S. Narang, L. Thoma, D. D. Miller, and R. I. Mahato, *Molecular Therapy*, **7**, S216 (2003).
7. M. P. Patel, R. R. Patel, and J. K. Patel, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **13**, 536 (2010).
8. B. Moghadas, E. Dashtimoghadam, H. Mirzadeh, F. Seidi, and M. M. Hasani-Sadrabadi, *RSC Adv.,* **6**, 7701 (2016).
9. E. Khor and L. Y. Lim, *Biomaterials*, **24**, 2339 (2003).
10. J. A. Dai, S. Y. Zou, Y. Y. Pei, D. Cheng, H. Ai, and X. T. Shuai, *Biomaterials*, **32**, 1694 (2011).
11. X. A. Chen, L. J. Zhang, Z. J. He, W. W. Wang, B. Xu, Q. Zhong, X. T. Shuai, L. Q. Yang, and Y. B. Deng, *Int. J. Nanomed.*, **6**, 843 (2011).
12. S. Son and W. J. Kim, *Biomaterials*, **31**, 133 (2010).
13. Y. H. Lee, K. H. Yim, J. Heo, and J. S. Choi, *Polym. Korea*, **38**, 43 (2014).
14. M. Y. Jiang, K. M. Wang, J. F. Kennedy, J. Nie, Q. A. Yu, and G. P. Ma, *Int. J. Biol. Macromol.*, **47**, 696 (2010).
15. Y. H. Lee, H. I. Park, and J. S. Choi, *Carbohydr. Polym.*, **137**, 669 (2016).
16. J. M. Yu, X. Xie, M. R. Zheng, L. Yu, L. Zhang, J. G. Zhao, D. Z. Jiang, and X. X. Che, *Int. J. Nanomed.*, **7**, 5079 (2012).
17. M. S. Huh, S. Y. Lee, S. Park, S. Lee, H. Chung, S. Lee, Y. Choi, Y. K. Oh, J. H. Park, S. Y. Jeong, K. Choi, K. Kim, and I. C. Kwon, *J. Control. Release*, **144**, 134 (2010).
18. I. Honore, S. Grosse, N. Frison, F. Favatier, M. Monsigny, and I. Fajac, *J. Control. Release*, **107**, 537 (2005).
19. H. Hufnagel, P. Hakim, A. Lima, and F. Hollfelder, *Mol. Ther.*, **17**, 1411 (2009).