

PEG 스페이서를 통해 Homing 펩타이드를 고정화한 산화철 나노입자의 제조 및 생의학적 응용

이상민 · 심즐차이 · 신용석 · 구태형 · 이병현* · 허만우** · 강인규†
경북대학교 고분자공학과, *경북대학교 의과대학 생화학교실, **경일대학교 섬유패션학과
(2012년 1월 28일 접수, 2012년 3월 13일 수정, 2012년 3월 21일 채택)

Synthesis of Homing Peptide-Immobilized Magnetite Nanoparticles through PEG Spacer and Their Biomedical Applications

Sang Min Lee, Zhi-Cai Xing, Yong-Suk Shin, Tae-Hyung Gu, Byung-Heon Lee*,
Man-Woo Huh**, and Inn-Kyu Kang†

Department of Polymer Science & Engineering, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
**Department of Biochemistry, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 700-422, Korea*
***School of Textile and Fashion Technology, Kyungil University, Kyongsan 712-701, Korea*
(Received January 28, 2012; Revised March 13, 2012; Accepted March 21, 2012)

초록: 산화철(Fe_3O_4)은 세포에 의해 섭취된 후 대사반응에 의해 분비되므로 세포독성을 나타내지 않는다. 따라서 산화철 나노입자는 MRI 촬영을 하기에 앞서 조영제로서 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 통상의 공침법으로 산화철 나노입자를 합성하고 폴리에틸렌글리콜을 스페이서로 하여 혈관내피세포 및 방광암 세포막의 IL-4 리셉터에 특이적으로 반응하는 homing 펩타이드(AP)를 고정화하였다. AP를 고정화한 산화철 나노입자의 크기는 수용액 상에서 약 39 nm이었다. 섬유아세포 및 방광암세포를 이용하여 AP고정화 산화철 나노입자의 uptake를 조사한 결과 섬유아세포에는 선택적 uptake를 발견할 수 없었으나 방광암세포에는 선택적으로 uptake됨을 알 수 있었다. 따라서 AP 고정화 산화철 나노입자는 조기 암진단용 조영제로서 가능성을 지니고 있다고 할 수 있다.

Abstract: Iron oxides (Fe_3O_4) are metabolically secreted after endocytosed by cells, indicating no cytotoxicity. Therefore, they are widely used as a contrast agent before photographing of magnetic resonance imaging. In this study, iron oxide nanoparticles are synthesized by the co-precipitation method and subsequently immobilized with a homing peptide (AP), which specifically interacts with interleukin-4 receptor located on the membrane of endothelial and bladder cancer cells. The size of AP-immobilized iron oxide particle is about 39 nm. Intracellular uptake of the AP-immobilized iron oxide nanoparticles was investigated using bladder cancer cells and fibroblasts as the control. As the result, the nanoparticles are specifically uptaken by bladder cancer cells. However, the nanoparticles are not specifically uptaken by fibroblast. It could be said that the AP-immobilized iron oxide nanoparticles have a potential to be used as a contrast agent for early diagnosis of cancer.

Keywords: magnetite, homing peptide, IL-4 receptor, intracellular uptake, cancer cell.

서 론

인구의 고령화, 식생활의 서구화 및 환경문제로 뇌혈관질환, 암 환자의 발생은 지속적으로 증가하고 있다. 또한 생활환경의 변화에 따른 성인병 발병 연령이 점차 낮아져 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 병의 조기 발견을 위한 여러 진단 방법이 발전되고 있다.

그러나 기존의 진단 및 치료 기술의 낮은 효능 및 부작용 때문에 암을 극복하는 데에는 한계가 있어 왔다. 최근 나노기술의 발전과 더불어 새로운 물리적, 화학적, 광학적 특성을 가지는 나노 크기의 소재들을 바이오/의약 분야에 응용하는 연구가 활발히 진행되면서 나노의약품(nanomedicine) 개발의 중요성이 증대되고 있다.¹ 진단용 나노기술분야에서는 핵자기 공명영상(magnetic resonance image, MRI) 조영제의 연구가 가장 활발하다. MRI 조영제는 자장에 미치는 영향에 따라 상자성, 초상자성 제제로 구분되며, 각각 양성 조영제 및 음성 조영제라고도 불린다. 전자는 T1 감쇄효과가 우세하여 T1

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ikkang@knu.ac.kr

강조영상에서 밝은 신호로 보이며, 후자는 T2 감쇄효과가 우수하여 T2 영상에서 신호를 어둡게 만든다.² 임상에 사용되고 있는 상자성 물질로는 가돌리늄(Gd), 망간(Mn) 등의 전이 금속 이온이 대표적인데, 이들 이온들은 자체 독성이 강하기 때문에 착화합물 형태(Gd-DTPA, Gd-DTPA-BMA, Gd-DOTA, GD-DO3A 등)로 제조하여 안정한 형태로 변환시킨 후 몸속으로 투여한다. 상자성 물질을 적용하는 경우는 이미지를 밝게 하여 주변 조직보다 뚜렷이 부각시켜 관찰해야 하는 부위·식도, 위 및 대장 등에 주로 이용된다.^{3,4}

현재 주목받고 있는 또 다른 조영제는 초상자성 산화철(superparamagnetic iron oxide, SPIO)을 기본으로 하는 수용성 콜로이드이다.^{5,7} 초상자성 산화철을 기본으로 하는 콜로이드 나노입자 용액은 조영효과가 뛰어나 MRI 조영제로서 연구 가능성 및 효과의 잠재성이 크다.⁸ 이것은 텍스트란이나 전분 등의 고분자성 탄수화물로 코팅이 되어 있으며 산화철 용액의 나노 입자 크기는 코어(core) 부분의 크기와 코팅의 두께, 응집 양상에 따라 다양한 분포를 갖는다. 일반적으로 평균 직경을 200 nm 이하로 하여 상자성 물질에 비해 상대적으로 큰 자화율을 나타내도록 함으로써 강한 T2 효과를 이용한 조영제로 사용되고 있다. 최근에는 이러한 초상자성체의 입자크기를 50 nm 이하까지 제작할 수 있는 나노기술의 발전에 따라 기존의 초상자성 산화철 조영제에 비해 T2 효과를 유지하면서도 T1 효과가 증가한 미세 초상자성 산화철(ultrasmall superparamagnetic iron oxide, USPIO) 조영제에 대한 연구도 활발히 진행 중이다.⁹⁻¹² SPIO 제제로는 Feridex(AMI사)와 Resovist(Shering사)의 두 종류가 있으며 전자의 경우는 서서히 주입해야 하므로 시간에 따른 비조영과 조영증강 영상을 두 번에 걸쳐 따로 얻어야 하는 불편함이 있고 후자의 경우는 급속 주사 형태로 한 번에 주입이 가능한 장점이 있다. 따라서 나노입자를 생체 내로 주입할 경우 첫째, 혈액 속에서 응집되지 않고 잘 분산되어 일정한 시간 동안 순환할 수 있는 특성(long circulating property)이 요구된다. 그러나 나노입자는 표면적이 크기 때문에 다양한 혈장 단백질(opsonins, complement fragments, serum albumins, antibodies) 및 염 등이 표면에 달라붙는 바이오 파울링(biofouling) 현상 때문에 응집이 잘 일어난다. 따라서 간의 kupffer 세포나 비장의 대식세포(macrophage)와 같은 망상내피세포(reticuloendothelial system, RES)에 의하여 쉽게 제거될 수 있다. 이는 몸속에 투여된 후 수 분 내에 나노입자를 혈액에서 없애는 것과 같다. 따라서 EPR(enhanced permeability and retention) 효과를 기대할 수 없으므로 원하는 암 조직에도 도달할 수 없게 만든다. 둘째로, 산화철 나노입자의 경우 생체 내에서 충분히 안정하지 않으면 본래 구조가 바뀌어서 자기적인 특성이 변하거나 빠르게 생분해를 일으킬 수 있다. 그러므로 poly(ethylene glycol)(PEG), dextran, poly(vinyl pyrrolidone)(PVP) 등의 합성 및 천연고분자를 이용하

여 나노입자 표면을 코팅 처리하여 생체적합성 및 안정성을 증가시키는 기술이 개발되고 있다.¹³⁻¹⁷ PEG는 나노입자의 phagocytosis를 저해함으로써 망상내피세포에 의해서 제거되는 현상을 효과적으로 막을 수 있는 것으로 알려져 있는데 이를 '스텔스(stealth)' 효과라고 한다. 셋째, 나노입자의 크기를 100 nm 이하로 제조하는 것이 요구되어 지는데 만약 나노입자의 크기가 생체 내에서 이보다 클 경우 암 조직이 아닌, 주로 간이나 비장에 있는 대식세포들에 의해 제거되거나 미세혈관이 많이 분포하고 있는 폐 등에 도달하게 된다.

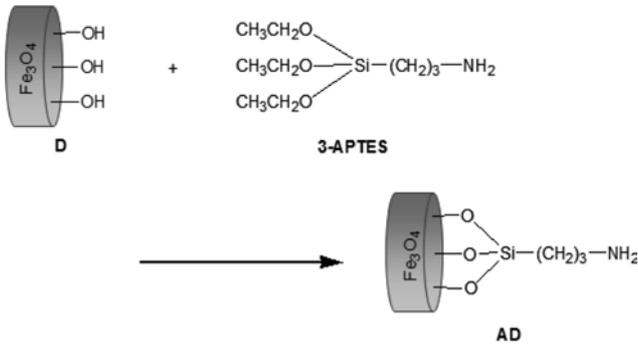
본 연구에서는 homing 펩타이드를 도입한 산화철계 나노입자를 합성하여 분자영상에의 응용 가능성을 검토하였다. 먼저 물에 대한 안전성 및 생체적합성을 높이기 위해 텍스트란과 철 이온에 의한 공침법을 이용하여 나노입자를 합성하였다. 3-Aminopropyltriethoxysilane을¹⁸ 이용하여 나노입자 표면에 1급 아미노기를 도입하였으며, 펩타이드의 활성을 이용하여 targeting 확률을 높이기 위해 spacer로 PEG를 도입하였다. 그 후 혈관 내피세포 및 방광암 세포막의 IL-4 리셉터에 특이적으로 반응하는 homing 펩타이드(AP 펩타이드)를 입자 표면에 도입하였다. 또한 형광물질인 fluorescein isothiocyanate(FITC)를 도입하여 *in vitro*에서 IL-4 리셉터가 많이 존재하는 방광암 세포와 특이적인 결합을 하는지를 조사하였다.

실 험

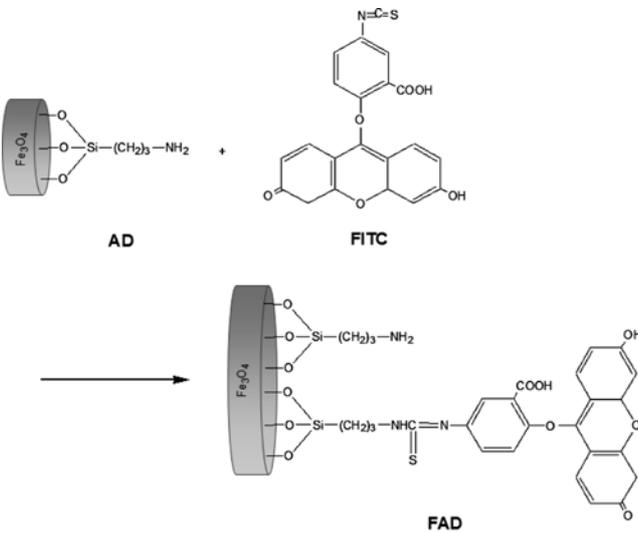
시약 및 재료. 텍스트란, ferric chloride($FeCl_3$), ferrous chloride($FeCl_2$)는 Sigma Chemical 사의 것을 사용하였고, carboxyl terminated-PEG(CT-PEG), 3-aminopropyltriethoxysilane(3-APTES), fluorescein isothiocyanate(FITC), 투석막은 Aldrich사의 것을 사용하였다. Homing 펩타이드인 AP(SRKRLDRNC) 펩타이드는 경북대학교 생화학 교실에서 제공받아 사용하였다.¹⁹ Penicillin G-streptomycin, trypsin-EDTA, fetal bovine serum(FBS), antibiotic-antimycotic와 세포 세척액으로 쓰인 phosphate buffered saline(PBS)는 GIBCO BRL사의 제품을 사용하였다. 멸균을 위한 필터 페이퍼는 Advantec MFC의 것을 사용하였다.

Dextran-coated Magnetite(D) 나노입자 합성.²⁰ $FeCl_3$ 0.5 g과 $FeCl_2$ 0.5 g을 탈기된 3차수 50 mL에 완전히 녹여 철수용액을 만들었다. 텍스트란 5 g을 탈기된 3차수 10 mL에 녹여 고분자 수용액을 만들고, 알칼리 수용액으로 암모니아수를 사용하였다. 철 수용액을 기계식 교반기를 이용하여 교반하면서 질소 주입 하에서 텍스트란 수용액을 천천히 한 방울씩 떨어뜨렸다. 그 후 암모니아수를 첨가하면 검은색의 수용액으로 변한다. 이 때 최종 pH는 11로 조절하였다. 합성된 나노입자는 투석막(M.W 12000)을 이용하여 24시간 투석함으로써 미반응된 $FeCl_3$, $FeCl_2$ 를 제거하였다.

나노입자 표면에 아민기의 도입(AD). 250 mL 삼구 플라스크



Scheme 1. Introduction of APTES to the surface of dextran iron oxide nanoparticles (D).

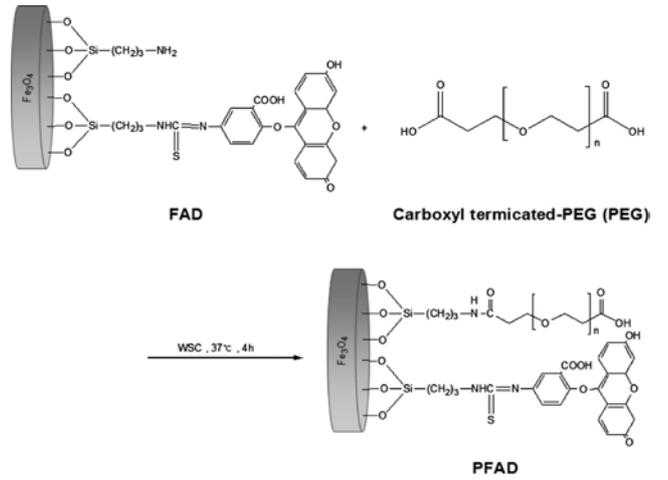


Scheme 2. Introduction of FITC to the surface of AD nanoparticles.

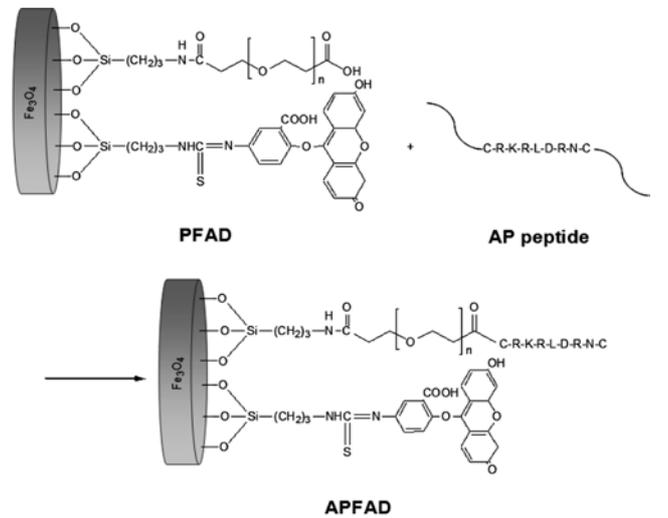
크에 텍스트란 코팅된 산화철 나노입자 수용액 50 mL를 넣고 3-APTES 10 mL를 첨가 후 30분 동안 질소 bubbling하고 기계식 교반기를 이용하여 95 °C에서 2시간 동안 반응시켰다 (Scheme 1). 반응물의 온도를 실온까지 내린 다음 투석막을 이용하여 24시간 투석하였다.

나노입자 표면에 FITC도입(FAD). 합성된 조영제의 형광 현미경 관찰을 위해 AD표면의 아미노기 일부에 FITC를 도입하였다(Scheme 2). 1 mL의 DMSO에 0.3 µg의 FITC를 녹였다. AD 분산액 20 mL에 FITC 용액을 넣고 상온에서 24 시간 동안 반응시켰다. 그 후 투석막을 통해서 24시간 동안 미반응물을 제거하였다.

나노입자 표면에 PEG 도입(PFAD). 나노입자 표면에 AP 펩타이드의 N-말단을 결합시키기 위하여 PEG의 양쪽 말단에 카르복실기를 갖고 있는 것을 사용하였다(Scheme 3). 양 말단이 카르복실기(-COOH)이므로 과량(0.1 g)의 PEG를 사용하여 카르복실기를 water soluble carbodiimide(WSC)로 활성화



Scheme 3. Introduction of PEG to the surface of FAD nanoparticles.



Scheme 4. Introduction of AP peptide to the surface of PFAD nanoparticles.

시켜준 후 입자표면의 아미노기와 37 °C에서 4시간 동안 반응시켰다. 그 후 투석막을 이용하여 24시간 동안 미반응물을 제거하였다.

나노입자 표면에 Homing 펩타이드 도입(APFAD) (Scheme 4). WSC로 PFAD의 카르복실기를 활성화시키고, 800 µg의 AP 펩타이드를 DMSO 5 mL에 녹인 후, PFAD 용액에 넣고 24시간 동안 교반하였다. PFAD 40 mg을 물 20 mL에 녹이고 50 mL 플라스크에 나노입자 수용액과 활성화된 AP 펩타이드 용액을 넣고 24시간 동안 4 °C에서 기계식 교반기를 이용하여 교반하였다. 투석막(MW 12000)을 사용하여 24시간 동안 미반응 물질을 제거시켰다.

나노입자의 크기 측정. 투과전자현미경(PHILIPS, CM 200)으로 건조상태에서의 나노입자의 크기를 측정하였으며

측정용 시료를 준비하기 위해 Formvar film으로 코팅된 400 mesh copper grids를 사용하였고, 나노입자가 희석된 수용액을 grids에 적하하는 방법을 이용하였다. 수용액 상에서의 나노입자 크기 및 분포를 조사하기 위해 제조된 나노입자를 증류수에 매우 낮은 농도의 용액으로 녹여 샘플링한 후 기공 크기가 0.7 μm 인 멤브레인 필터(membrane filter)를 사용하여 먼지를 여과한 후 dynamic light scattering(DLS, Mastersizer & Zetasizer, Malvern)로 측정하였다.

나노입자의 특성분석. 산화철 나노입자의 자기이력을 조사하기 위해 제조된 나노입자를 투명테이프에 고정시킨 후 밀봉하여 시편을 만들었다. 만들어진 시료를 마그네토미터(VSM)의 진동 축 홀더에 장착한 후 자속의 변화로 유도되는 기전력으로부터 자기 모멘트를 측정하였다. 또한 초상자성 나노입자가 잘 합성되었는지 확인하기 위해 X-ray diffractometer(XRD, Enraf Nonius, RA/FR-571, Holland)를 이용하여 결정의 특성을 조사하였다.

나노입자의 분광학적 관찰. 표면 개질된 산화철 나노입자의 적외선 흡수스펙트럼을 얻기 위해 나노입자 시료와 동량의 KBr을 이용하여 pellet을 제조한 후 적외선분광분석기(Jasco, FT-IR 300E)를 이용하여 주사 횟수 60회, 분해능 4cm^{-1} 의 조건으로 측정하였다. 또한 나노입자 표면에 aminosilane, AP 펩타이드 등이 잘 도입되었는지를 확인하기 위해 electron spectroscopy for chemical analysis(ESCA LAB VIG microtech. Mt 500/1 etc, East Grinstead, UK)를 사용하였다.

세포 배양. 방광암세포인 HT1376와 섬유아세포는 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 사용하였다. 배양액으로는 α -minimum essential medium 45 mL에 FBS 5 mL, penicillin 0.5 mL을 첨가하여 사용하였다. 일정농도의 세포를 배양하기 위해 세포의 수가 2×10^5 cells/mL 되도록 묽힌 후 직경 10 cm의 세포배양접시에 넣어서 배양하였다.

나노입자와 세포의 상호작용. 합성된 조영제 APFAD와 방광암세포 HT1376 세포와의 특이적 결합력을 조사하기 위해 실험용 배양액을 준비하였다. 실험용 배양액은 1 mg/mL의 농도의 APFAD를 첨가하여 제조하였다. 직경 10 cm의 dish에 HT1376 세포를 2×10^5 cells/mL 농도로 seeding한 후 실험용 배양액을 1 mL 첨가하고 37°C, 5% CO_2 incubator에서 30분 동안 방치하였다. 대조실험을 위하여 AP 펩타이드가 결합되지 않은 PFAD 수용액을 준비한 후 위 실험과 동일한 조건으로 대조군을 준비하였다. 37°C, 5% CO_2 incubator에 30분 동안 방치한 다음 형광현미경으로 점착 상태를 관찰하였다. 또한 방광암 세포와 비교하기 위해 섬유아세포를 이용하였고, 실험 방법은 세포주만 바꾸고 나머지 조건은 방광암 세포의 경우와 동일하게 하였다. 세포의 직접관찰을 위해 NIKON ECLIPSE TS100을 이용하였고, 형광현미경을 측정하기 위해 독일 CarZeiss사의 Axioplan 2 etc을 사용하였다. 이때 여기파장은 460-490 nm의 여기필터를 사용하였다.

결과 및 토론

자성나노입자의 특성. 산화철 나노입자의 자성을 알아보기 위해 vibrating sample magnetometer(VSM)을 측정하여 그 결과를 Figure 1에 나타내었다. 텍스트란이 코팅된 나노입자 D는 4.16 emu/g의 자화도를 나타내었고 homing 펩타이드를 도입한 나노입자 APFAD는 2.46 emu/g를 나타내었다. 초상자성이란 hysteresis loop에서 잔류자화가 없고, 초기 자화율이 1 이상인 것을 말한다. 따라서 본 연구의 경우 나노입자가 초상자성을 띠고 있음을 확인할 수 있었다.

산화철 나노입자의 결정성 및 초상자성체의 합성 여부를 확인하기 위하여 XRD를 측정하여 그 결과를 Figure 2에 나타내었다. (220), (311), (400), (422), (511), (440) 피크에서 각각 30.22, 35.5, 43.18, 53.82, 57.02, 62.82의 회절각이 나타나 magnetite 결정이 잘 형성된 사실을 알 수 있었다.²¹ 텍스트란이 코팅된 나노입자 D의 경우는 Fe_3O_4 와 동일한 패턴을

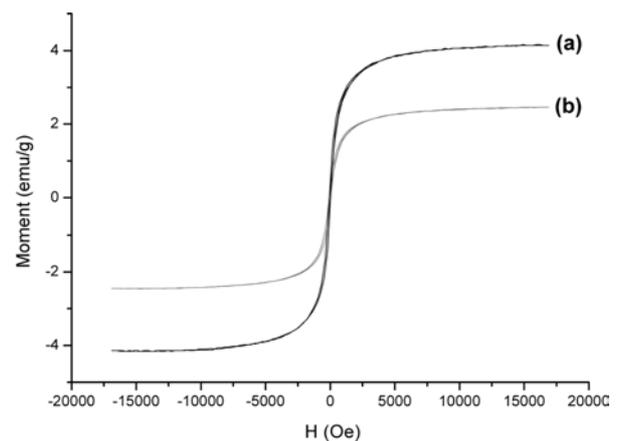


Figure 1. Magnetization curve of dextran-coated iron oxide nanoparticle (D) (a); homing peptide-immobilized iron oxide nanoparticle (APFAD) (b) obtained by vibrating sample magnetometer.

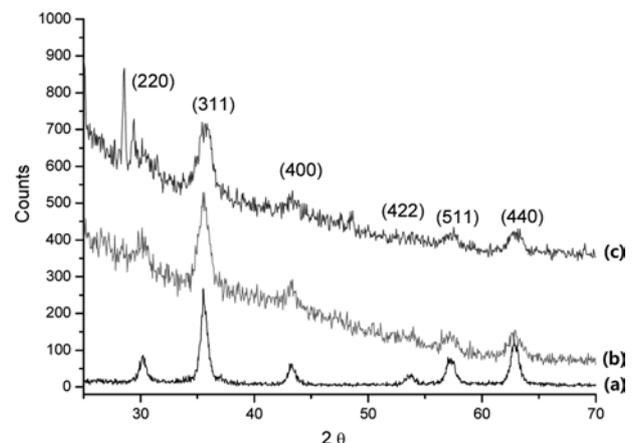


Figure 2. X-ray diffraction patterns of Fe_3O_4 (a); D (b); APFAD (c).

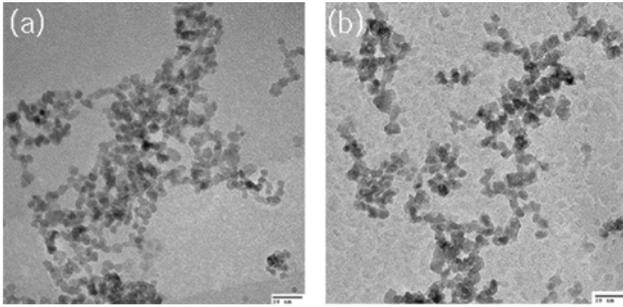


Figure 3. TEM images of D (a); APFAD (b).

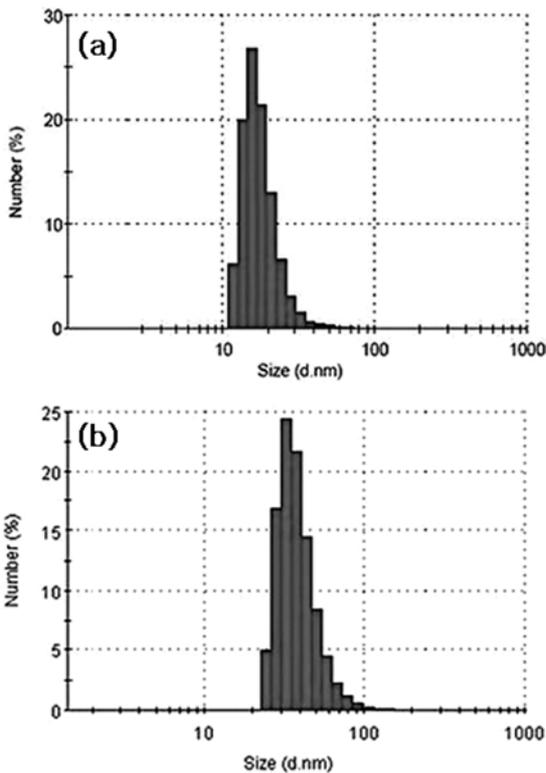


Figure 4. Particle size distributions of D (a); APFAD (b) measured by DLS.

나타내었다. 한편, AP 펩타이드를 결합한 나노입자 APFAD는 약 28의 회절각에서 피크가 나타나고 있는데 이것은 FITC 및 올리고펩타이드에 기인하는 것으로 판단된다.

산화철 나노입자의 크기 및 분포 조사를 위해 TEM과 DLS를 이용하였다. Figure 3에 나타내는 바와 같이 D의 입자크기는 5 nm, APFAD는 8 nm를 나타내었다. 이와 같이 표면개질을 함으로써 입자크기가 약간 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

TEM은 건조상태에서 입자들을 관찰하므로 입자들의 응집 현상으로 인해 정확한 입자 크기를 측정하는 것이 어렵다. 한편, 자성나노입자가 조영제로 사용되기 위해서는 수용액에 분

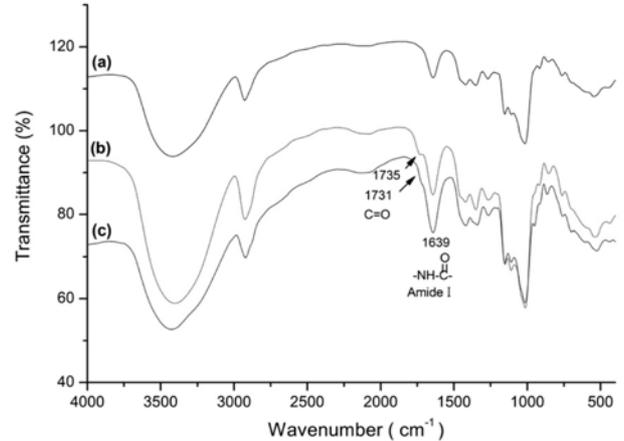


Figure 5. FTIR spectra of D (a); PFAD (b); APFAD (c).

산되어야 하므로 용액 상태에서 입자의 크기를 측정할 수 있는 DLS로 크기의 크기 및 분포를 측정하였다. DLS는 액체상에서 입자크기를 측정하는 것이기 때문에 물 분자가 입자를 둘러싸게 되어서 입자 크기가 건조상태에서 측정하는 TEM 크기보다 크게 나타난다.²² Figure 4에 나타내는 바와 같이 D(a)는 평균 18 nm의 크기를 나타내었고, APFAD(b)는 39 nm의 크기를 나타내었다.

나노입자 표면의 스펙트럼 분석. APTES가 텍스트란 코팅된 산화철나노입자와 반응하게 되면 가수분해에 의해 한 쪽이 실란을 형태로 바뀌며 다른 한쪽의 말단에는 1급 아미노기(-NH₂)를 갖게 된다. 따라서 아민의 신축진동에 기인하는 1562 cm⁻¹의 피크를 확인함으로써 APTES가 도입되었음을 알 수 있었다(Figure 5). 그 후, carboxyl terminated-PEG를 도입함으로써 1562 cm⁻¹의 피크가 사라지고 새로운 피크가 1735 cm⁻¹에서 나타남을 알 수 있었다. 이것은 입자표면의 아미노기와 PEG의 카르복시기 반응하여 아마이드(-CONH-) 결합으로 바뀌고 PEG의 한쪽 말단에 남아있는 -COOH의 C=O 신축진동에 기인하는 것이다. 한편, AP 펩타이드를 도입한 경우는 펩타이드(-CONH-) 결합의 증가에 의해 1639 cm⁻¹ 및 1530 cm⁻¹ 부근의 amide I, II 피크의 강도가 증가하였다.²³

표면원소분석에 의한 분석. 표면개질 과정을 확인하는 또 다른 방법으로 X-ray를 기반으로 하는 ESCA를 이용하였다. 나노자성체의 ESCA 스펙트럼을 측정하고 그로부터 표면의 원소함량을 계산하여 Table 1에 나타내었다. 산화철나노입자에 아미노실란(APTES)을 도입함으로써 질소와 규소 함량이 증가하였다. 또한 FITC와 PEG를 도입하였을 경우 황(S)이 검출되었고, AP 펩타이드를 도입한 경우 질소(N)와 황(S)의 함량이 증가하여 펩타이드가 잘 도입되었음을 알 수 있었다.

자성나노입자와 세포의 상호작용. 자성나노입자인 PFAD, APFAD를 배양액에 1 mg/mL로 녹여 12, 24, 72시간 배양한 후 광학 현미경으로 관찰하였다(Figure 6). 그 결과 배양시간

Table 1. Chemical Compositions of Surface-modified Magnetite Nanoparticles Calculated from ESCA Survey Scan Spectra

Substrates	Atomic percent (%)					
	C	Fe	N	O	Si	S
D	58.55	0.20	-	40.37	0.93	-
AD	56.70	0.18	1.28	36.64	5.20	-
PFAD	58.29	0.15	1.53	36.89	2.68	0.50
APFAD	60.40	0.16	1.72	35.01	2.13	0.58

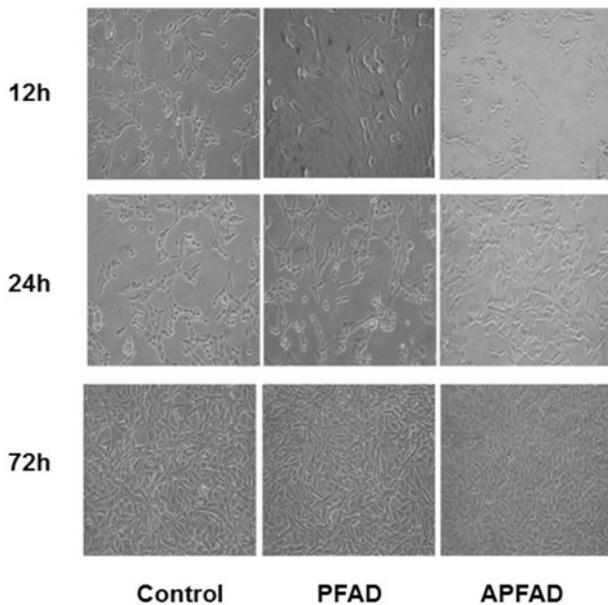


Figure 6. Optical images of fibroblasts cultured in the presence of magnetic nanoparticles. Original magnification : ×200.

이 길어짐에 따라 세포의 수는 점진적으로 증가하였고, 이들 결과로부터 배양액에 넣어준 자성나노입자는 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

Figure 7에는 나노입자 존재하에서 HT1376 세포를 배양한 형광사진을 나타내고 있다. Figure 7에서 알 수 있듯이 AP 펩타이드가 결합된 APFAD 존재하(Figure 7c)에서는 AP 펩타이드가 결합되지 않은 PFAD(Figure 7b)보다 강한 형광을 나타내었다. 이들 결과로부터 질병 특이 리간드로 사용된 AP 펩타이드가 방광암세포에 존재하는 interleukin-4 리셉터와 특이적으로 반응하여 APFAD가 PFAD보다 방광암세포에 더 많이 침투됨을 알 수 있었다.²⁴

Gan 등은 산화철 나노입자 표면에 간암표적 펩타이드(A54)를 결합시켜 악성간암세포와의 상호작용을 조사하고, 나노입자가 간암세포막에 선택적으로 침투된다고 보고하였다.²⁵ 본 연구에서는 자성나노입자의 방광암세포에 대한 uptake를 비교하기 위해 세포막에 IL-4 리셉터를 갖지 않는 섬유아세포에 대해 동일한 실험을 진행하였다. Figure 8에 나타내는 바

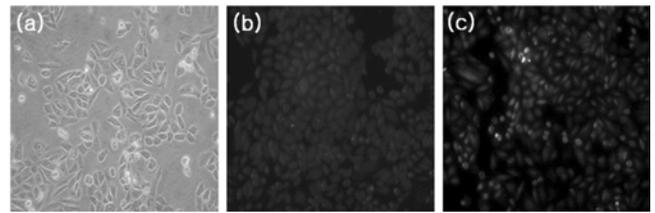


Figure 7. Optical images of HT1376 cell cultured in the absence of nanoparticles (a); fluorescence images of HT1376 cells cultured in the presence of PFAD (b); APFAD (c) for 30 min. Original magnification : ×200.

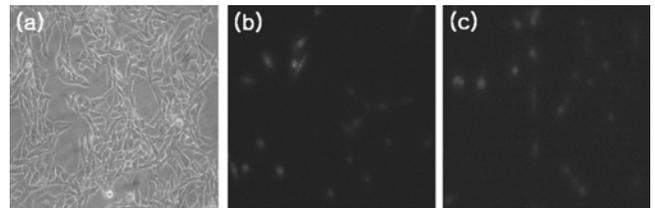


Figure 8. Optical images of fibroblasts cultured in the absence of nanoparticles (a); fluorescence images of fibroblasts cultured in the presence of PFAD (b); APFAD (c) for 30 min. Original magnification : ×200.

와 같이 자성나노입자 존재 하에 섬유아세포를 30분 배양하였을 경우 AP 펩타이드의 존재여부에 관계없이 형광을 나타내지 않았다. 이는 자성나노입자가 일반 세포인 섬유아세포에는 특이적으로 흡착하지 않음을 나타낸다.

즉, AP 펩타이드와 특이적으로 반응하는 IL-4 리셉터가 섬유아세포막에는 존재하지 않기 때문이다. Obiri 등은²⁶ 섬유아세포, 혈관내피세포, 암세포의 성장에 미치는 IL-4의 영향을 조사하였다. 그 결과 섬유아세포와 혈관내피세포는 IL-4에 의한 영향을 받지 않았으나 암세포의 성장은 IL-4에 의해 억제되었다. Shimamura 등은²⁷ IL-4 리셉터를 발현시키는 암세포는 IL-4 세포독에 매우 민감하지만 섬유아세포는 민감하지 않다고 보고하였다.

Lee 등은 phage display법으로 CRLTLTVRKC 펩타이드를 얻어 mouse 실험을 수행하였다. 그 결과 homing 펩타이드는 stabilin-2를 통해 동맥경화조직에 선택적으로 집착하여 약물 전달 또는 분자영상보조제로 활용가능성이 있다고 보고하였다.²⁸

결론

오늘날 건강에 대한 관심이 높아지고 고령화로 인한 질환의 조기진단을 위해 X선, CT 및 MRI 검사가 빈번히 이루어지고 있다. 그 중에서도 MRI 검사는 정확한 진단이 가능하며 다른 검사법에 비해 다양한 부위에 적용할 수 있다는 장점이

있다. 본 연구에서는 MR-광학 복합분자영상에의 응용을 목표로 homing 펩타이드를 결합한 산화철 자성나노입자를 합성하고 방광암 세포와의 상호작용을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. FeCl₂, FeCl₃, dextran을 이용한 공침법으로 나노입자를 합성하였다.

2. 표면반응을 통해 형광물질인 FITC 및 암세포 표면의 IL-4 리셉터를 인식하는 AP 펩타이드 리간드를 도입하였다.

3. AP 나노입자의 평균 직경은 건조상태에서 8 nm 이었고, 수용액 상에서는 약 39 nm 이었다.

4. *In vitro* 상에서 AP 펩타이드를 고정화한 나노자성체는 독성을 나타내지 않았고 방광암세포에 특이적으로 uptake 되었다.

5. 본 연구에서 제조된 AP 나노입자는 *in vivo* 상에서의 방광암 또는 interleukin-4에 의해 유도되는 염증반응에 대한 진단용 조영제로 사용될 수 있는 가능성을 나타내었다.

감사의 글: 이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2011-0020264).

참 고 문 헌

- C. Choi, J. K. Kim, M. K. Jang, and J. W. Nah, *Polymer(Korea)*, **35**, 119 (2011).
- W. Susanne, S. Jorg, P. Herbert, H. Bernd, and T. Matthias, *Invest. Radiol.*, **37**, 167 (2002).
- S. Albrecht, Z. Claus, G. Cindy, J. Manuela, M. Franziska, J. Tobias, P. Herbert, and G. Tilman, *Free Radic. Biol. Med.*, **36**, 976 (2004).
- L. Calabi, G. Alfieri, L. Biondi, and L. Paleari, *J. Mag. Res.*, **156**, 222 (2002).
- U. Schwertmann and R. M. Cornell, *Iron Oxides in the Laboratory*, VCH, Weinheim, 1991.
- A. K. Fahlvik, J. Klavenessm, and D. D. Stark, *J. Magn. Reson. Imaging*, **3**, 187 (1993).
- K. Naoki, I. Shinya, T. Taichi, and M. Tomoaki, *Invest. Radiol.*, **37**, 202 (2002).
- D. Pouliquen and C. Chouly, "Magnetic Microcarriers for Medical Applications", in *Microcapsules and Liposomes*, R. Archady, Editor, Citus Books 2, p 343 (1999).
- M. Lewin, N. Carlesso, and C. H. Tung, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 410 (2000).
- R. Weissleder, D. D. Stark, and B. Engelstad, *Am. J. Roentgenol.*, **152**, 167 (1989).
- R. Weissleder, *Magn. Reson. Med.*, **22**, 209 (1991).
- R. L. Magin, G. Bacic, M. R. Niesman, J. C. Alameda, S. M. Wright, and H. M. Swartz, *Magn. Reson. Med.*, **20**, 1 (1991).
- C. C. Berry, S. Wells, S. Charles, and A. S. G. Curtis, *Biomaterials*, **24**, 4551 (2003).
- L. A. Harris, J. D. Goff, A. Y. Carmichael, J. S. Riffle, J. J. Harburn, T. G. St. Pierre, and M. Saunders, *Chem. Mater.*, **15**, 1367 (2003).
- C. W. Jung, *Magn. Reson. Imaging*, **13**, 675 (1995).
- C. Liu, H. Honda, A. Ohshima, M. Shinkai, and T. Kobayashi, *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 420 (2000).
- H. Honda, A. Kawabe, M. Shinkai, and T. Kobayashi, *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, 191 (1998).
- Z. Xu, Q. Liu, and J. A. Finch, *Appl. Surf. Sci.*, **120**, 269 (1997).
- K. Park, H. Y. Hong, H. J. Moon, B. H. Lee, I. S. Kim, I. C. Kwon, and K. Rhee, *J. Control. Release*, **128**, 217 (2008).
- Z. C. Xing, M. J. Park, S. J. Han, I. K. Kang, M. J. Choi, B. H. Lee, and Y. Chang, *Macromol. Res.*, **19**, 897 (2011).
- S. Santra, R. Tapeç, N. Theodoropoulou, J. Donson, A. Hebard, and W. H. Tan, *Langmuir*, **17**, 2900 (2001).
- Y. L. Wu, C. S. Lim, S. Fu, A. I. Y. Tok, H. M. Lau, F. Y. C. Boey, and X. T. Zeng, *Nanotechnology*, **18**, 1 (2007).
- I. K. Kang, B. K. Kwon, J. H. Lee, and H. B. Lee, *Biomaterials*, **14**, 787 (1993).
- A. C. Antony, *Blood*, **79**, 2807 (1992).
- Z. F. Gan, J. S. Jiang, Y. Yang, B. Du, M. Qian, and P. J. Zhang, *J. Biomed. Mater. Res.*, **84A**, 10 (2008).
- N. I. Obiri, G. G. Hillman, G. P. Haas, S. Sud, and R. K. Puri, *J. Clin. Invest.*, **91**, 88 (1993).
- T. Shimamura, R. E. Royal, and M. Kioi, *Cancer Res.*, **67**, 9903 (2007).
- G. Y. Lee, J. H. Kim, G. T. Oh, B. H. Lee, I. C. Kwon, and I. S. Kim, *J. Control. Release*, **155**, 211 (2001).