

토끼에서 D-luciferin의 관절강 주입에 의한 연골세포의 자연발광 영상

전남대학교 의과대학 핵의학교실¹, 이코 바이오², 조선대학교 자연과학대학 생물학과³
문성민¹ · 민정준¹ · 오석중² · 강한샘² · 김영호³ · 김성미¹ · 김광윤² · 범희승¹

Bioluminescence Imaging of Chondrocytes in Rabbits by Intraarticular Injection of D-Luciferin

Sungmin Moon, M.S.¹, Jung-Joon Min, M.D., Ph.D.¹, Suk Jung Oh, Ph.D.², Han Saem Kang, M.S.²,
Sung Mi Kim, M.S.¹, Young Ho Kim, Ph.D.³, Kwang Yoon Kim, Ph.D.², and Hee-Seung Bom M.D., Ph.D.¹

¹Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea; ²ECOBIO INC., Gwangju, Korea; ³Department of Biology, College of Natural Science, Chosun University, Gwangju, Korea

Purpose: Luciferase is one of the most commonly used reporter enzymes in the field of in vivo optical imaging. D-luciferin, the substrate for firefly luciferase has very high cost that allows this kind of experiment limited to small animals such as mice and rats. In this current study, we validated local injection of D-luciferin in the articular capsule for bioluminescence imaging in rabbits. **Materials and Methods:** Chondrocytes were cultured and infected by replication-defective adenoviral vector encoding firefly luciferase (Fluc). Chondrocytes expressing Fluc were injected or implanted in the left knee joint. The rabbits underwent optical imaging studies after local injection of D-luciferin at 1, 5, 7, 9 days after cellular administration. We sought whether optimal imaging signals was could be by a cooled CCD camera after local injection of D-luciferin. **Results:** Imaging signal was not observed from the left knee joint after intraperitoneal injection of D-luciferin (15 mg/kg), whereas it was observed after intraarticular injection. Photon intensity from the left knee joint of rabbits was compared between cell injected and implanted groups after intraarticular injection of D-luciferin. During the period of imaging studies, photon intensity of the cell implanted group was 5-10 times higher than that of the cell injected group. **Conclusion:** We successfully imaged chondrocytes expressing Fluc after intraarticular injection of D-luciferin. This technique may be further applied to develop new drugs for knee joint disease. (Nucl Med Mol Imaging 2007;41(1):54-58)

Key Words: adenovirus, chondrocyte, firefly luciferase, optical imaging

서 론

생명공학분야에서의 in vivo 연구는 벤치에서의 결과를 확인하는데 매우 중요한 역할을 하고 있으나, 실험동물의 사후조직으로부터 결과를 확인하여야 하기 때문에 실험동물에서 한 시점의 결과만 얻을 수 있다는 한계가 있다.¹⁾ 이는 신약개발을 목적으로 연구가 수행될 경우 실험 대상의 개별차가 데이터에 반영되어 오차를 증가시킬 수 있다.

광학리포터 유전자는 과거부터 ex vivo 또는 in vitro 실험에서 형광현미경이나 발광측정기 등을 이용하여 사용되어 왔는데, 최근에는 살아있는 동물에서 실시간 영상을 획득할 수 있는 광학영상장치의 개발에 힘입어 생체영상을 위한 리포터 유전자로 각광을 받고 있다. 이러한 실시간 영상장치의 개발에 의해 세포 수준에서 실행되어온 광학을 이용한 영상 방법이 살아있는 소동물에 적용되어 생명체 내에서 유용한 생물학적 정보를 실시간으로 영상화하는 단계로 발전하고 있다.^{2,3)} 생체 광학영상으로 관찰하고자 하는 실험 대상물은 빛을 발생하는 효소 또는 단백질을 발현하는 리포터 유전자로 표지되어야 한다. 광학영상에 흔히 이용되는 리포터 유전자는 firefly luciferase (Fluc), renilla luciferase (Rluc), gaussian luciferase (Gluc)와 같은 생물발광 유전자와 green fluorescence protein (GFP), red fluorescence protein (RFP)와 같은 형광단백 유전자가 있다. 이 중 생물발광 리

• Received: 2007. 1. 25. • Accepted: 2007. 2. 16.

• Address for reprints: Jung-Joon Min, M.D., Ph.D., Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University Hwasun Hospital, 160 Ilsim-ri, Hwasun 519-809, Korea
Tel: 82-61-379-7271, Fax: 82-61-379-7280
Email: jjmin@jnu.ac.kr

※ 이 연구는 산업자원부 지역산업공동기술개발사업의 지원을 받아 수행되었습니다.

포터 유전자는 luciferase를 세포 내에서 발현시켜 D-luciferin과 결합한 후 산소, ATP 등의 존재 하에 산화시킴으로써 빛을 생성하게 하며^{4,5)}, 생성되는 화학 에너지의 일부가 가시광선의 형태로 방출되기 때문에 살아있는 세포의 생리학적 조건에서만 반응이 일어나게 된다.⁶⁾ 이 생물발광영상의 장점은 리포터 효소가 기질과 반응하는 위치에서만 영상신호가 발생하므로 매우 높은 선택성을 갖는다는 점이다.

이러한 리포터 유전자 영상을 수행하기 위해서는 리포터와 반응하는 기질을 주입하여야 하는데 기질의 주입은 실험동물의 무게에 비례하여 주사되고 가격이 매우 비싸기 때문에 마우스, 랫트같은 소동물에서만 적용가능하다는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 토끼와 같은 중동물을 이용한 실시간 영상기법을 적용하기 위해 리포터 유전자를 발현하는 연골세포를 토끼의 슬관절 강에 이식하고 소량의 기질 화합물을 관절강에 직접 주입한 다음 세포 이식 영상을 얻을 수 있는지를 확인하고자 이 연구를 수행하였다.

대상 및 방법

1. 연골세포 추출 및 리포터 유전자를 부호화하는 아데노바이러스(Ad-CMV-Fluc) 감염

무균실에서 사육한 생후 2주, 체중 500 g과 생후 6주, 체중 2 kg의 뉴질랜드 화이트 (New Zealand White) 계 수컷 토끼를 사용하였다. Thiopental sodium을 투여하여 안락사시킨 후 양쪽 무릎 관절에서 연골을 채취한 후 연골 편을 collagenase로 처리하여 단일세포를 분리, 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배양액에서 연골세포를 성장시켰다. 배양된 연골세포에 cytomegalovirus 촉진자 (promoter)의 조절을 받아 Fluc 유전자를 운반하는 Ad-CMV-Fluc를 감염시켰다. (multiplicity of infection =100) 감염 4시간 후에 연골세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 씻어낸 다음 새로운 배양액으로 20시간 더 배양한 다음 주입 및 이식에 사용하였다.

2. 연골세포 주입 및 이식

체중 2 kg의 뉴질랜드 화이트계 수컷 토끼를 xylazine (5 mg/kg)과 ketamine (50 mg/kg)으로 마취시킨 후 오른쪽 무릎 주변의 털을 제거하고 betadine과 70% 알코올로 피부를 소독하였다. Fluc을 발현하는 연골세포 5×10^4 개를 생리식염수 0.1 ml에 섞어서 좌측 슬관절강 내에 주입하였고 정상 대조군으로 Fluc을 발현하지 않는 같은 수의 연골세포를 우측 슬관절강 내로 주입하였다.(n=3)

세포이식(n=3)은 무릎 안쪽 피부를 절개하고 근막과 관

절낭을 절개한 후 무릎 골을 짓혀 관절 면을 노출시켜 지름 2 mm의 피부샘플 채취용 기구로 원을 만든 후 소파기로 원 내의 연골을 모두 제거하여 연골세포 이식부위를 준비하였다. 같은 수의 배양된 연골 세포를 준비된 주사기에 취하여 관절강의 연골세포 이식부위에 주입하였다. 모든 동물모델에서 세포를 주입 또는 이식한 슬관절의 반대측 슬관절에는 정상대조군으로 같은 수의 Fluc을 발현하지 않는 연골세포를 주입 또는 이식하였다.

3. 실시간 영상장비를 이용한 영상획득

연골세포 주입 및 이식한 하루 뒤에 토끼를 마취시킨 후 D-luciferin (15 mg/kg)을 복강(n=3) 또는 관절강(n=6)에 주입한 다음 10분 후에 CCD 카메라가 장착된 광학 영상장비(In Vivo Imaging System, Xenogen, CA)를 이용하여 10분씩 3차례 영상을 획득하였으며 총 광량 수치를 측정하여 최고값을 평가치로 삼았다.

4. 통계처리

연골세포를 주입한 군과 이식한 군 사이의 총광량 수치간의 차이는 independent t-test를 통하여 비교하였고 p값은 0.05이하를 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

영상실험에 사용된 토끼는 총 10마리로 세포의 관절강 주입 후 D-luciferin의 복강(n=2) 또는 관절강(n=2) 주사한 실험, 세포의 관절강 주입(n=3) 또는 이식(n=3) 후 D-luciferin을 관절강 내에 주사한 실험으로 나뉘었다. D-luciferin을 관절강에 주사한 경우에는 항상 양측 관절강에 각각 주사하였다.

Ad-CMV-Fluc에 감염된 연골세포를 토끼의 왼쪽 슬관절에 주입한 후 D-luciferin를 복강 또는 관절강 내 주사한 후 영상을 획득하였다. 동일한 양의 D-luciferin을 복강 주사한 경우 왼쪽무릎에서는 영상신호가 관찰되지 않았으나, 관절강 내에 직접 주사한 경우에는 왼쪽무릎 부위에서 영상신호가 나타남을 확인할 수 있었다.(n=3) (Fig. 1)

다른 토끼를 이용하여 동일한 바이러스 벡터에 감염된 연골세포를 왼쪽무릎에 주입 또는 이식한 후 1일, 5일, 7일, 9일별로 세포로부터의 영상신호를 측정하였다. Fluc을 발현하는 연골세포를 주입 또는 이식한 왼쪽 슬관절부위에서 1일째부터 5일, 7일째까지 영상신호를 관찰할 수 있었고,(Fig. 2) 9일째에서는 관절강에 이식한 토끼의 무릎연골에서만 영상신호를 관찰할 수 있었다.(Fig. 2) 연골세포 주입 또는 이식 후 5일 이후에는 관절강 내로 주입한 토끼의 무릎에서 나

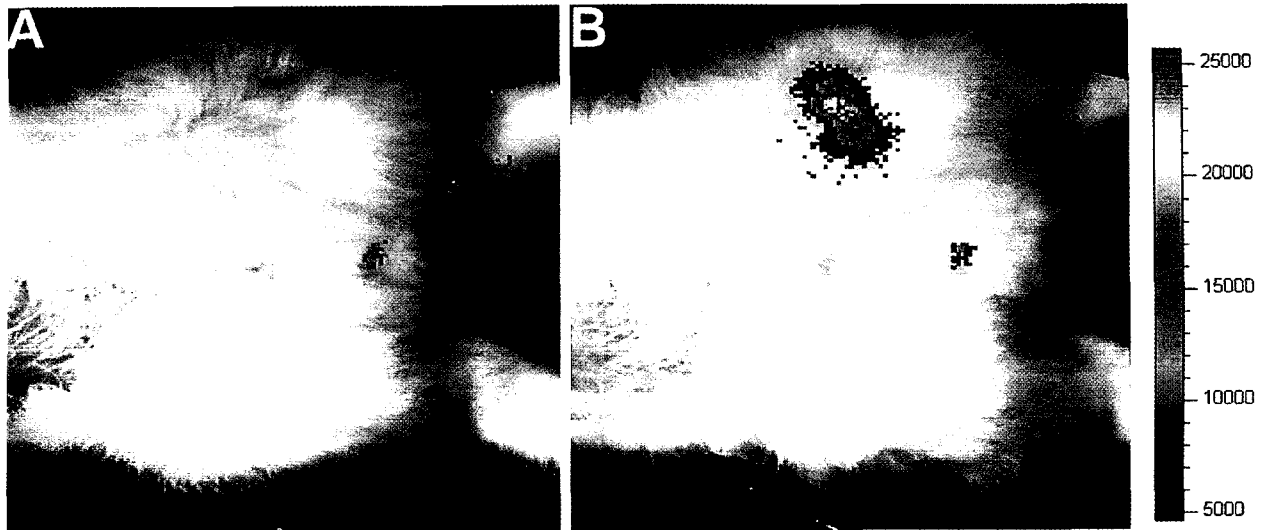


Fig. 1. Bioluminescence imaging of injected chondrocytes expressing firefly luciferase mediated by adenoviral vector in the left knee. D-luciferin (15 mg/kg) was injected intraperitoneally (A) or into the left knee joint cavity (B). The photon flux is expressed as total flux within the ROI (photons $s^{-1} cm^{-2} sr^{-1}$ (steradian)).

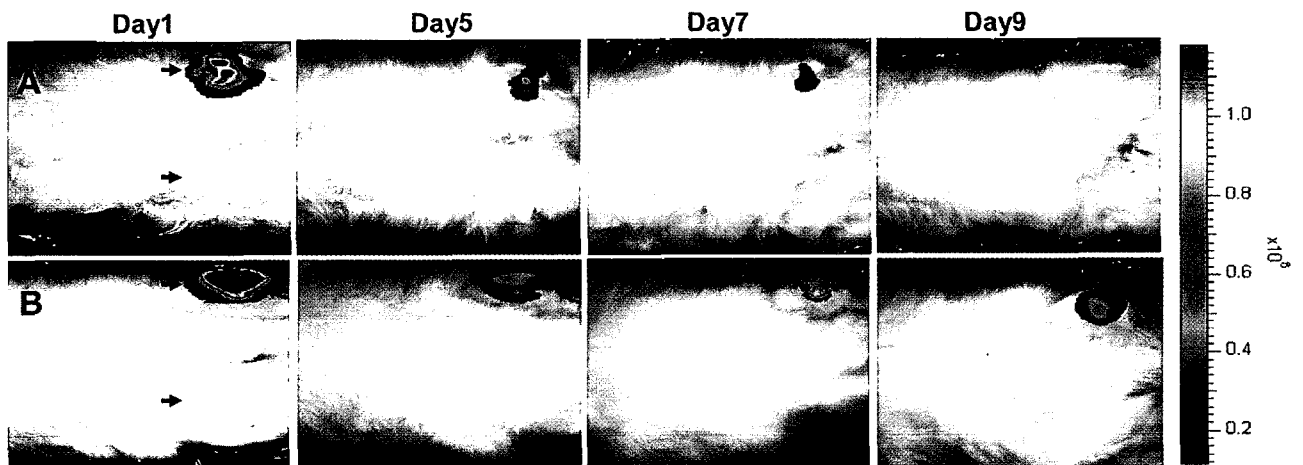


Fig. 2. Bioluminescence imaging of chondrocytes expressing firefly luciferase (left knee) or not (right knee). Cells are injected (A) or implanted (B) in both knee joints. Images were acquired after injection of D-luciferin in both knee joints (15 mg/kg). The photon flux is expressed as for Fig 1.

타나는 영상신호보다 관절강 내로 이식한 토끼의 무릎에서 약 3~10배 높게 영상신호가 나타났다.(5일, $4.49 \pm 1.35 \times 10^6$ vs. $1.02 \pm 0.41 \times 10^7$, $p < 0.05$; 7일, $9.84 \pm 1.35 \times 10^5$ vs. $8.60 \pm 4.30 \times 10^6$, $p < 0.01$; 9일, $2.29 \pm 0.35 \times 10^5$ vs. $2.86 \pm 1.72 \times 10^6$, $p < 0.01$)(Fig. 3) 모든 실험군에서 Fluc을 발현하지 않는 연골세포를 이식 또는 주입한 우측 슬관절에서는 어떠한 영상신호도 관찰되지 않았다.

고찰

광학영상에 자주 사용 되어지는 Fluc 리포터 유전자를 아

데노바이러스 벡터를 통하여 연골세포에 발현시켜 토끼의 슬관절 내에 이식한 뒤 소량의 기질을 국소주입하여 관절 강 내에 이식한 연골세포의 존재를 성공적으로 영상화하였다.

1. 리포터 유전자와 기질과의 반응

생물발광 효소-기질 시스템은 리포터로 사용하기에 유용한 몇 가지 특성들을 가지고 있다. Fluc이 생성하는 단백질을 여기시키기 위한 외부조사가 필요 없이, 기질인 D-luciferin, ATP, 산소, 마그네슘의 존재 하에 스스로 생물발광을 하며, 효소-기질의 반응이 매우 안정적이어서 in vivo 에서 복강으로 luciferin을 주입해 체내의 특정 장기에서의 영상을 얻는

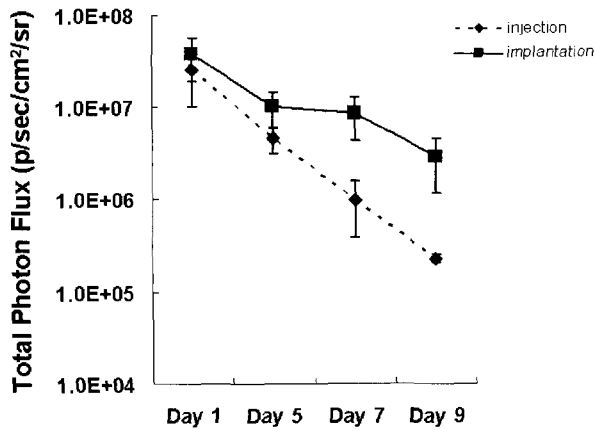


Fig. 3. Quantitative analysis of photon intensity at the left knee joint plotted as a function of time. Regions of interest (ROI) were manually selected over the knee joint region, and were kept constant for each animal. The photon flux is expressed as for Fig 1.

데도 사용할 수 있다. 기질인 D-luciferin이 존재할 경우 효소의 대사가 빨라서 (T1/2 = 3 h) 세포 내에 효소가 축적되지 않으므로 반복 실시간 영상이 가능하다.⁷⁻¹⁰⁾ 이러한 특성으로 인해 Fluc 리포터 유전자는 비침습적인 생체영상을 목적으로 활발히 사용되고 있다. 또 다른 리포터 유전자로서 바다의 갑각류 생물인 *Renilla reniformis*는 Fluc과 유사한 효소를 발현하는데 이를 Rluc 라고 한다. 이 효소는 coelenterazine이라는 물질을 산화시킨 후 생성되는 엔탈피 차에 의해 빛이 생성된다. 이 반응은 Fluc 반응과는 달리 산소, 마그네슘, ATP가 없어도 빛을 만들 수가 있으므로 ATP가 없는 세포 외부에서의 반응을 관찰하는데 사용될 수 있다. 반응 역학은 Fluc보다 반응속도가 빨라서 효소-기질 반응시작 후 수초 내에 최고 정점에 도달하므로 in vivo 에서 반복하여 영상을 얻는 것이 어느 정도 가능하나 반응 속도가 빨라서 동물실험 시 기질 coelenterazine을 복강 내로 주사해서 충분한 영상을 얻을 수가 없고 혈관 내로 주사하여야 한다.^{11,12)} 이들 생체 광영상에 사용되는 리포터 기질인 D-luciferin나 coelenterazine은 가격이 비싸서 소동물에서만 사용되어 왔다.

2. 실시간 영상을 통한 연골세포 확인

골 관절염은 관절을 보호하고 있는 연골의 손상 또는 퇴행성 변화로 인해 관절을 이루는 뼈와 인대 등에 손상이 일어나고 염증과 통증이 생기는 질환이다. 이 질환이 지속되면 통증과 관절의 기형이 유발되는데, 특히 무릎의 퇴행성관절염은 만성적으로 신체의 장애를 유발하는 가장 큰 원인이 된다. 그래서 현재 이러한 골관절염 치료제 개발에 상당한 시

간을 투자하고 있다. 이러한 치료제를 개발하기 위해서 필요한 것 중에 하나가 개발된 치료제를 연골세포가 이식된 실험동물에 투여한 다음 연골세포 생존연장 효과를 확인하는 것이다. 이러한 세포의 생존능을 실시간으로 관찰하기 위한 방법의 예로 GFP 형광 단백질을 운반하는 adenoassociate virus 벡터를 연골세포에 감염시킨 후 형광현미경을 이용하여 GFP 발현 유무를 평가한 보고가 있다.¹³⁾ 본 실험실에서는 실시간 생체영상을 위하여 Fluc 리포터 유전자를 바이러스에 침투시켜 연골세포에 감염시킨 후 토끼의 관절강에 주입하여 실시간 영상을 얻었다. 또한 D-luciferin을 복강주사가 아닌 연골세포가 이식된 관절강 내에 직접 주사함으로써 소량의 기질을 사용하여 토끼와 같은 중동물에서 영상을 획득할 수 있었다. Bloquel 등¹⁴⁾은 마우스의 관절강에 luciferin을 주사하여 성공적으로 영상화함으로써 이러한 국소주입을 통하여 예민도가 높은 영상을 얻을 수 있으며 기질의 소모를 줄일 수 있는 효과적인 방법임을 보고한 바 있다.

아데노바이러스 벡터는 숙주세포를 감염하여 전달 유전자를 숙주 DNA에 삽입시키지는 않은 채 핵 내의 염색체 옆에서 유전자 부체 전사(episomal transcription)를 한다. 따라서, 숙주세포가 2개의 딸세포로 분열할 때 어느 한쪽으로만 유전될 가능성이 높아 이러한 방법의 의해 전달된 유전자는 발현기간이 한시적이다. 본 연구에서 사용한 아데노바이러스 벡터는 시간이 지나면 리포터 유전자의 발현이 희석되고 자연 영상신호도 희석될 수 있는 한계를 가지고 있다. 본 연구에서는 세포 이식 후 최장 9일까지만 영상신호를 관찰할 수 있어서 그 동안 이식된 연골세포의 생존능이 소실된 것으로 여겨지는데, 연골세포의 분열, 증식능이 일반세포에 비해 낮아서 영상신호의 희석 효과는 그리 크지 않을 것으로 판단된다. 향후 렌티바이러스나 리트로바이러스를 이용하면 희석 효과를 방지할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 향후 이 연구에서 확립한 모델을 이용하여 연골세포의 생존을 연장시킬 수 있는 약물의 성능 평가 등의 연구를 시행할 계획이다.

요 약

목적: Firefly luciferase (이하 Fluc)는 분자영상 분야에 가장 널리 쓰이는 리포터 유전자 중 하나이다. 발광반응의 기질로 사용되는 D-luciferin 은 가격이 비싸고 실험동물의 무게에 비례해서 기질을 주입 하므로 마우스나 랫트와 같은 소동물을 대상으로 전임상 연구가 이루어지고 있다. 본 실험실에서는 중동물인 토끼의 관절강에 D-luciferin을 국소 주입하여 발광영상을 획득하였다. **대상 및 방법:** 연골세포를 일주일 동안 배양한 후 Fluc 아데노바이러스에 감염시켰다.

감염된 연골세포를 토끼의 관절강에 주입 또는 이식하였다. 착상된 무릎의 관절강부위에 D-luciferin을 국소 주입한 후 본 실험실서 보유하고 있는 CCD 카메라가 장착된 실시간 영상장비를 이용하여 날짜 별로 분자영상을 획득하였다. **결과:** 착상되어진 토끼의 관절강 부위에 기질을 국소주입하여 영상을 성공적으로 획득하였다. 연골세포 주입 및 이식 후 1 일째부터 토끼의 관절강에서 빛이 방출되었으며 토끼의 관절강에 주입하는 것보다 이식하는 방법이 강한 빛을 방출함을 알 수 있었다. 또한 7일째까지 토끼의 관절강에 연골세포를 이식한 것이 주입한 것보다 총 광량이 5배에서 10배까지 강하게 나타남을 확인하였고 9일째에는 약 10배정도 강하게 나타났다. **결론:** 중동물인 토끼를 이용하여 Fluc을 발현하는 연골세포를 주입 또는 이식한 관절강에 D-luciferin을 국소 주입하여 영상을 성공적으로 획득하였으며, 이러한 결과를 통해 중동물에 소량의 D-luciferin 국소주입하여도 발광 영상을 얻는데 충분함을 알 수 있었다.

Reference

1. Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* 2003;17:545-80.
2. Leclerc G, Gal D, Takeshita S, Nikol S, Weir L, Isner JM. Percutaneous arterial gene transfer in a rabbit model. Efficiency in normal and balloon-dilated atherosclerotic arteries. *J Clin Invest* 1992;90:936-44.
3. Wu JC, Sundaresan G, Iyer M, Gambhir SS. Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Mol Ther* 2001;4:297-306.
4. Antoinette Wetterwald, Gabri van der Pluijm, Ivo Que, Bianca Sijmons, Jeroen Buijs, Marcel Karperien, et al. Optical Imaging of Cancer Metastasis to Bone Marrow : A Mouse Model of Minimal Residual Disease. *Am J Pathol* 2002;160:1143-53.
5. Greer LF 3rd, Szalay AA. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* 2002;17:43-74.
6. Jinha M Park, Gambhir SS. Multimodality Radionuclide, Fluorescence, and Bioluminescence Small-Animal Imaging. *PROCEEDING OF THE IEEE* 2005;93:771-83.
7. Brittberg M, Lindahl A, Homminga G, Nilsson A, Isaksson O, Peterson L. Rela. A critical analysis of cartilage repair. *Acta Orthop Scand* 1997;68:186-91.
8. Breyer B, Jiang W, Cheng H. Adenoviral vector-mediated gene transfer for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 2001;1:149-62.
9. Contag CH, Spilman SD, Contag PR, Oshiro M, Eames B, Dennerly P, et al. Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochem Photobiol* 1997;66:523-31.
10. Contag CH, Bachmann MH. Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. *Annu Rev Biomed Eng* 2002;4:235-60.
11. Bhaumik S, Gambhir SS. Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:377-82.
12. Bhaumik S, Lewis XZ, Gambhir SS. Optical imaging of Renilla luciferase, synthetic Renilla luciferase, and firefly luciferase reporter gene expression in living mice. *J Biomed Opt.* 2004;9:578-86..
13. Li LH, Weng XS, Qiu GX, Wu ZH, Lin J, Jin J, et al. In vitro gene transfection into rabbit articular chondrocytes mediated by recombinant adeno-associated virus vector. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006;86:1489-92.
14. Bloquel C, Trollet C, Pradines E, Seguin J, Scherman D, Bureau MF. Optical imaging of luminescence for in vivo quantification of gene electrotransfer in mouse muscle and knee. *BMC Biotechnol* 2006;6:16.