



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사학위논문

약물 유발 심장 독성의 *in vitro*
평가법 개발

2014년 2월

서울대학교 대학원
약학과 약품분석학전공
김 선 희

약물 유발 심장 독성의 *in vitro* 평가법 개발

지도교수 송준명

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2013년 12월

서울대학교 대학원
약학과 약품분석학전공
김 선 희

김선희의 약학석사학위논문을 인준함

2013년 12월

위 원 장	<u>박 정 일</u>	(인)
부 위 원 장	<u>권 성 원</u>	(인)
위 원	<u>송 준 명</u>	(인)

국 문 초 록

Adherent cellular imaging을 바탕으로 region의 intensity를 측정하는 방법은 약물에 의한 심장 독성 평가에 이용되어 왔다. 부착되지 않은 상태의 isolated single cell을 요구하는 single cell cytometry와 달리, 이는 adherent cell의 isolation과 detachment를 위한 enzyme 처리를 필요로 하지 않으며 세포의 morphological information도 유지할 수 있다. 이를 확인하기 위해 green fluorescent protein (GFP)을 과다발현 시킨 human embryonic kidney (HEK)-293 세포의 isolated single cell과 adherent cell에서의 regional average intensity와 전체 세포 중 발현된 세포의 percentage를 비교하였다. 각 세포의 bright field image에서 defocused image를 얻고, 각 세포의 region을 잡아 형광 image에서의 region overlap 과정을 통해 측정하였다. 그 결과 세포의 isolation 과정 없이 adherent 상태의 세포를 통해서도 실험 결과가 유효하다는 결론을 얻고 human Ether-à-go-go-Related Gene (hERG)를 과다발현 시킨 HEK-293 세포를 이용하여 약물에 의한 심장 독성 평가를 수행하였다. 1980년대 안센社에서 출시된 cisapride는 위장 운동 촉진제로 시장에 등장하였으나 심각한 심장질환 유발의 부작용으로 인해 기업에서 스스로 철수시킨 약물이다. 본 실험에서는 cisapride와 함께 심장에 독성을 나타내지 않는 것으로 알려진 dexamethasone을 각각 농도별로 처리한 세포에서 potassium ion channel assay를 수행하여 그 결과를 비교하였다. cisapride의 경우 약물의 농도가 높아 질수록 세포의 potassium ion channel이 block 되었고, dexamethasone을 처리한 세포의 경우 약물의 농도에 따른 유의적인 변화를 보이지 않았다. 수많은 약물들이 부작용으로 인한 심장 독성의 유발로 인해 시장에서 퇴출되고 있다. 따라서 약물로 인한 심장 독성의 적절한 평가는 drug discovery에서 매우 중요한 문제이다. 본 연구의 결과를 바탕으로 *in vivo* 단계에서의 동물 모델 이전에 적용할 수 있는 *in vitro* 단계에서의 drug safety screening 평가로의 이용 가능성을 제시한다.

주요어: drug-induced cardiotoxicity, adherent cell cytometry, cisapride,
hERG, HEK-293, potassium ion channel assay

학번: 2012-21567

목 차

국문초록	i
목 차	iii
List of Figures	v
List of Tables	vi
List of Abbreviations	vii
I. 서 론	1
II. 실험	
1. 실험재료	3
1-1. 시약 및 용매	3
1-2. 실험 기구	4
1-3. 실험 기기	5
2. 실험방법	6
2-1. Cell culture	6
2-2. hERG PCR	7
2-3. Preparation of pAcGFP1-N1 vector and isolation of GFP free vector	9
2-4. DNA recombination and transformation	11
2-5. hERG overexpression by Lipofectamine transfection assay	12
2-6. Western analysis	13
2-7. Drug treatment	14
2-8. Potassium ion channel assay	15
2-9. Quantitative cellular imaging	18
III. 결과	20
1. Recombination of hERG genes	20
2. Upregulation of hERG potassium ion channels in HEK-293	21
3. Regional average fluorescence intensity-based adherent cellular imaging	22
4. Evaluation of the antagonistic effects of cisapride & dexamethasone on the cardiac hERG potassium ion channel	25

IV. 결론	27
V. 참고문헌	29
Abstract	30

List of Figures

Fig. 1. Gradient annealing temperature	7
Fig. 2. Enzyme cutting site	10
Fig. 3. Schematic diagram of DNA recombination	11
Fig. 4. Schematic illustration of potassium ion channel assay ...	17
Fig. 5. Process of getting cellular images for regional average intensity-based cellular image analysis	19
Fig. 6. Gel image of enzyme restriction	20
Fig. 7. Expression of hERG gene in wild type and hERG overexpressed HEK-293 cells by western analysis	21
Fig. 8. GFP expression of HEK-293 cells transfected with GFP plasmid DNA	24
Fig. 9. The effect of cisapride and dexamethasone on the permeability of potassium ion channels in hERG overexpressing HEK-293 cells.	26

List of Tables

Table 1. Composition of PCR mixture	8
Table 2. PCR thermal cycle conditions	8
Table 3. Preperation of FluxOR TM Loading Buffer	16
Table 4. Preperation of Assay Buffer	16
Table 5. Preperation of FluxOR TM Stimulus Buffer	16

List of Abbreviations

hERG : Human ether-à-go-go related gene
AOTF : Acousto-optic tunable filter
CCD : Charge-coupled device
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS : Fetal bovine serum
GFP : Green fluorescent protein
HEK293 : Human embryonic kidney cells
PCR : Polymerase chain reaction
RCF : Relative centrifugal force
RPM : Revolution per minute
PBS : Phosphate Buffered Saline

I. 서 론

같은 종(species)에서 발생한 세포일지라도 각각의 single cell은 같은 자극에 대해 다르게 반응할 수 있다. 따라서 single cell level에서의 세포 반응을 보기위한 전체 single cell의 통계값을 얻는 것이 필요하다[1]. Single cell imaging cytometry는 유방암이나 HIV 진단 등에서 *in vitro* 단계의 질병 진단에 적용되어 왔다[2-4]. 이러한 single cell imaging cytometry의 경우 adherent 상태의 세포를 표면에서 떼어내기 위해 accutase와 같은 enzyme 처리가 필요하다.

본 연구에서는 약물에 의해 유발되는 심장독성의 평가법으로 regional average fluorescence intensity-based adherent cellular imaging을 제안한다. 이는 부착 세포를 떼어내기 위한 enzyme 처리 과정을 필요로 하지 않으며 부착된 세포 그대로의 morphological information도 유지할 수 있다. 본 실험을 통해 single cell의 isolation 과정 없이 측정된 regional average fluorescence intensity-based adherent cellular imaging 값을 single cell imaging cytometry로 얻은 결과와 비교하여 그 통계적 결과가 동일한 결과를 제공한다는 것을 보여주고자 한다. 이러한 결과는 GFP(Green Fluorescent Protein)가 과다발현된 HEK-293 cell을 통해 확인하였다. 심장세포는 adherent cell의 형태를 띠는 세포 중의 하나로 본 실험에 적합하며, 약물에 대한 안전성의 평가에서 drug-induced cardiotoxicity는 매우 중요한 이슈이다. 많은 약물들이 부작용인 심장독성으로 인해 시장에서 퇴출되었다. Antiarrhythmics (quinidine, sotalol, amiodarone), psychotropics

(thioridazine, pimozone, haloperidol, ziprasidone, quetiapine, TCAs, SSRIs), opiate agonists (methadone), anti-infectives (moxifloxacin, clarithromycin), antihistamines (astemizole, terfenadine)은 심장 독성으로 인해 시장에서 퇴출된 대표적인 약물들이다. Drug-induced cardiotoxicity는 주로 Na^+ , Ca^{2+} , K^+ 이온 채널을 block 시킨다. 이 중 voltage gated potassium ion channels은 세포의 증식과 볼륨 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 더욱 관심을 얻고 있다[5, 6]. Human ether-à-go-go related gene (h-ERG)은 중요한 voltage gated potassium channels 중 하나이고, 채널의 탈분극에 관여한다. 약물은 hERG channel을 억제하는지와 QT prolongation(Torsades de Pointes)에 관여하는지에 대한 스크리닝을 필요로 하고, 이는 *in vivo* 에서의 심장독성 평가 방법을 결정짓기 위해서도 유용하다. Patch-clamp 기술이 voltage gated potassium, sodium, and calcium channels에서의 다양한 약물 영향을 연구하기에 적합하기는 하지만, 이는 현미경에서의 확인에 비해 조작이 어렵고 비용이 많이 든다[7, 8]. 약물에 의해 유발된 심장독성의 평가를 위한 cell-based assay 평가법 개발은 약물의 실패 가능성을 줄일 수 있다는 점에서 매우 중요하다. 본 연구에서는 약물에 의해 유발되는 심장독성의 *in vitro* 평가 단계에서의 regional average intensity-based cellular imaging 방법을 제시한다.

II. 실험

1. 실험재료

1-1. 시약 및 용매

- Bacto™ Agar (BD Biosciences, NJ, USA)
- Bacto™ Trptone (BD Biosciences, NJ, USA)
- Bacto™ Yesat Extract (BD Biosciences, NJ, USA)
- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, 11995, Gibco, NY, USA)
- D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco, NY, USA)
- EcoR I restrict enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- Not I restrict enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- Ethanol (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA)
- Ethylenediamine tetraacetic Acid, Disodium Salt (Shinyo pure chemicals co.,Japan)
- FBS (Fetal bovine serum, 16000-044, Gibco, NY, USA)
- Lipofectamine™ 200 reagent(11668-027, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Gel extraction kit (QIAquick gel extraction kit, Qiagen, Valencia, CA, USA)
- HEK293 cell (Korean Cell Line Bank, South Korea)

- Iso-propyl Alcohol (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA)
- Midi kit (QIAfilter™ plasmid Midi kit, Qiagen, Valencia, CA, USA)
- Opti-MEM®I (Reduced Serum Medium, Gibco, NY, USA)
- pAcGFP1-N1 (Clontech, Palo Alto, CA, USA)
- Pen Strep (Penicillin Strptomycin, Gibco, NY, USA)
- SeaKem®LE Agarose (Lonza® ,Rockland, ME, USA)
- Sodium chloride (Junsei, Japan)
- TBE Buffer 10X Molecular Biology Grade (Promega, Maidison, WI, USA)
- Trypan blue solution 0.4% (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA)

1-2. 실험 기구

- Adjust pipette (0.5~10μL, 20~200μL, 100~1000μL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Autoclave (JSAC-60, JSR, South Korea)
- Bacteria Incubator (NB-201, N-Biotek, South Korea)
- Cell culture flask (75T, SPL Life Sciences, South Korea)
- Cell Incubator (US AutoFlowt, NuAire, Plymouth, MN, USA)
- Centrifuger (5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Conical tube (15 mL, 50 mL, SPL Life Sciences, South Korea)
- DURAN 500mL Flask (Schott Glaswerke, Mainz, Germany)
- Horizontal Electrophoresis System (GH-100, GelHaus,)
- IR Concentrator(IR Micro-CENVAC NB-503CIR, N-Biotek,

South Korea)

- Microtube (1.5 mL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Midi Power Supply (MP-300N, Gentaur, Kampenhout, Belgium)
- Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, USA)
- PCR Program Temp Control System (PC-818, ASTEC, Shizuoka, Japan)
- Petri Dish (90x15mm, SPL Life Sciences, South Korea)
- Pipet-aid (Drummond, USA)
- Serological pipet (10mL, SPL Life Sciences, South Korea)
- Shakers (Rocker NB-104, N-Biotek, South Korea)
- Stirrer Water Bath (NB-302, N-Biotek, South Korea)

1-3. 실험 기기

- Haemocytometer Counting Chamber (Tiefe Depth profondeur 0.100mm, Marienfeld-Superior, Germany)
- MetaMorph (Version 7.6.2.0, Molecular Devices)
- Microscopy (CKX41, OLYMPUS, Melville, NY)
- pH Meter (HI2210, HANNA, South Korea)
- UV-Visible Spectrophotometer (Evolution 60S, Thermo Scientific, Madison, WI USA)
- VISIONlite Version 2.2(Thermo Scientific Thermo Scientific, Madison, WI USA)

2. 실험방법

2-1. Cell culture

Human ether-à-go-go related gene (hERG) channel에서 cisapride에 의한 심장 독성 영향을 연구하기 위하여 human embryonic kidney (HEK)-293 세포를 이용하였다. 세포는 Korean Cell Line Bank(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였고, 10% FBS(GIBCO)와 $60\mu\text{g ml}^{-1}$ penicillin, $100\mu\text{g ml}^{-1}$ streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다. 37°C , 5% CO_2 (US AutoFlowTM, NuAire, Plymouth, MN, USA) 조건을 유지하였다.

2-2. hERG PCR

hERG DNA의 증폭을 위해 PCR을 수행하였다. hERG-F (5'-CCGGAATTCCAGCGGCTGTACTCGGGCACA-3'), hERG-R (5'-CGCGCGGCCGCCAGAAGTGGTTCGGGAGAACTC-3')로 제작된 primer를 이용하여 Table 1의 조건으로 PCR하였다. 적합한 annealing step의 온도를 확인하기 위해 60~64°C로 gradient를 설정하여 PCR를 진행(Figure 1)한 뒤 가장 적합한 temperature(63°C)를 설정하여 이후의 실험을 Table 2와 같이 진행하였다. PCR 결과는 1.2% agarose gel을 이용하여 567bp의 hERG를 확인하였다.

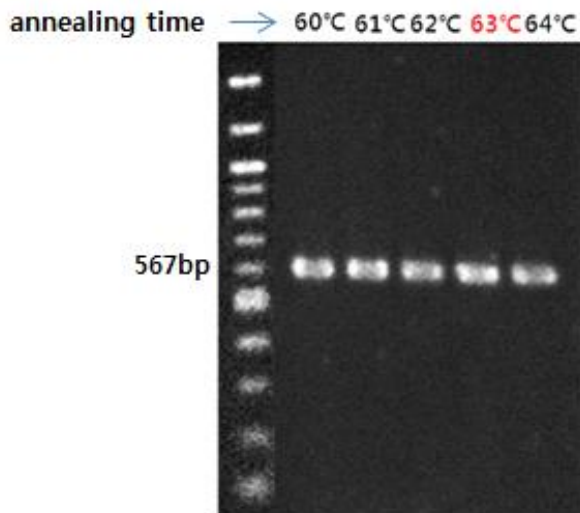


Figure 1. Gradient annealing temperature

Sample, Reagent	Concentration	Volume($\mu\ell$)
Template DNA(hERG gene)	20ng/ $\mu\ell$	1
Forward primer	10pmole	2.5
Reverse primer	10pmole	2.5
dNTP	10mM	0.5
DNA polymerase buffer	5X	5
DNA polymerase	5U/ $\mu\ell$	2.5
Autoclaved deionized water		11
Total volume		25

Table 1. Composition of PCR mixture

Step	Temperature	Time	Cycle
First denaturing step	94°C	5 min	1
Denaturing step	94°C	15 sec	30
Annealing step	63°C	15 sec	
Extension step	72°C	15 sec	
Last extension step	72°C	6 min	1

Table 2. PCR thermal cycle conditions

2-3. Preparation of pAcGFP1-N1 vector and isolation of GFP free vector

GFP를 포함하는 pAcGFP1(4700 bp)은 Evrogen (Moscow, Russia)에서 구입하였다. 이 plasmid DNA는 *Escherichia coli* DH5a cell(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용한 transformation에 의해 다량으로 확보하였고, kanamycin(30 μ g/ml)이 포함된 LB agar plate에서 colony를 선별하였다. kanamycin에 저항성을 갖는 colony를 LB배지에 inoculation하여 37 $^{\circ}$ C에서 overnight 증식시킨 뒤, 이는 plasmid Midi Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 isolation하였다. 확보된 DNA(100ng, pAcGFP1 plasmid)는 restriction enzyme(NotI-EcoRI, 100 units)을 처리하여 remaining vector 부분과 GFP를 포함하는 reporter gene(GFP gene) 부분으로 분리하였다. (Figure 2) 이 때 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응시켜 enzyme이 restriction 되도록 한 뒤, 67 $^{\circ}$ C에서 20min 처리하여 남은 enzyme을 제거하는 과정을 거쳤다. Reporter gene(GFP gene)과 remaining vector는 1.2% agarose gel에 전기영동하여 DNA가 포함된 gel band 부분을 extraction 한 뒤 이를 QIAquick gel extraction kit(Valencia, CA, USA)를 이용하여 DNA만을 추출하였다.

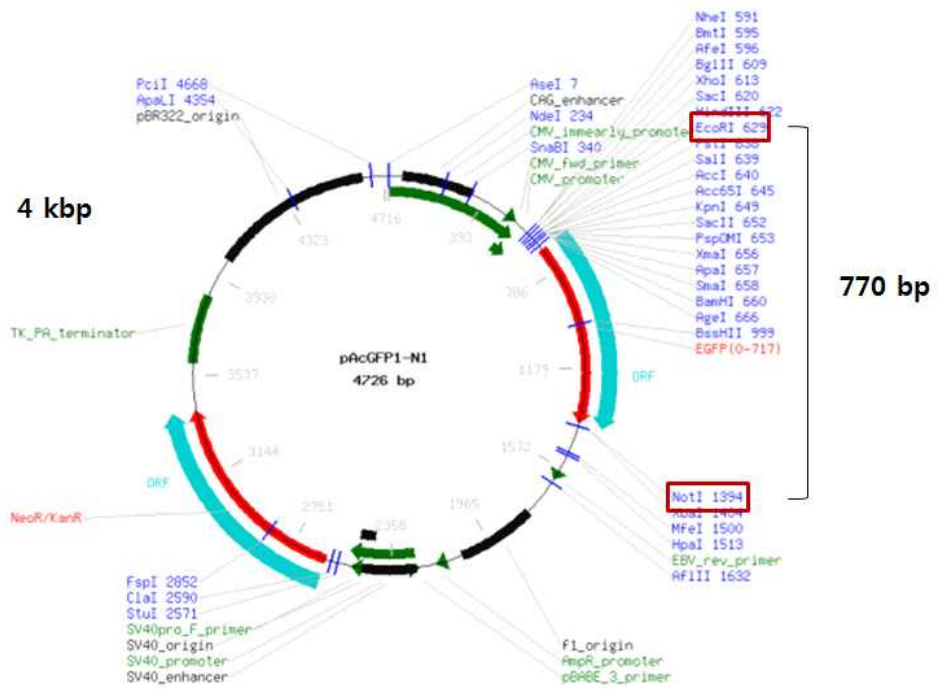


Figure 2. Enzyme cutting site

2-4. DNA recombination and transformation

PCR로 증폭시킨 hERG gene fragment를 remaining pAcGFP1-N1 vector(4000 bp)에 ligation하였다. 20ng hERG와 1 μ g remaining vector, 1 μ l T4 DNA ligase (1-3 Unit/ μ l, Promega, Madison, WI, USA)를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 16-24시간 반응시켰다. 얻어진 recombinant vector는 *E.coli* DH5 α 세포(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 transformation 하였고 kanamycin(30 μ g/ml)이 포함된 LB agar plate에서 colony를 선별하였다. Colony를 kanamycin이 포함된 LB배지에서 overnight 증식시킨 뒤 DNA midi kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 recombinant DNA를 새롭게 얻을 수 있었다. 이 recombinant DNA의 농도는 UV spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

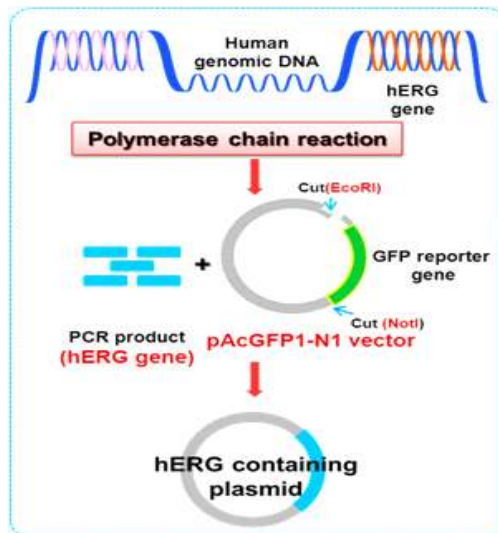


Figure 3. Schematic diagram of DNA recombination

2-5. hERG overexpression by LipofectamineTM transfection assay

Recombinant hERG plasmid를 HEK-293 세포에 transfection 시키기 위해 LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다. 0.8 μg 의 plasmid DNA(hERG)와 4 μl lipofectamineTM 2000을 각각 50 μl 의 serum free medium (OptiMEM[®], Invitrogen Carlsbad, CA, USA)에 넣고 상온에서 5분 반응시켰다. 각 tube를 mix한 뒤 다시 상온에서 20분 반응시켰다. 이 DNA-Lipofectamine 2000 mixture를 세포가 깔려있는 plate에 넣어주고 4시간 incubation 한 뒤, 배지를 제거한 후 complete medium으로 바꿔주고 48시간 배양했다.

2-6. Western analysis

Western analysis를 위해 wild type의 HEK-293 세포와 hERG가 과다 발현된 HEK-293 세포를 준비하였다. 배양된 세포는 1X PBS로 두 번 wash 해준 뒤, 각 well에 accutase 50 μ l씩 넣어주고 37 $^{\circ}$ C incubator에서 5분정도 처리해 주어 세포를 떼어냈다. 떼어낸 세포에 lysis buffer mixture를 넣어준 뒤 pipetting하여 상온에서 5분간 반응시켰다. 이 cell lysate는 14000rcf, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 centrifuge하고 상층액을 새 tube로 옮겼다. Lysate를 bradford assay를 사용하여 1:500으로 희석하여 농도를 측정한 뒤 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로 분리하였다. Gel 상에서 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane으로 transfer하였고, 이 membrane은 0.1% Tween-20과 2.5% BSA가 포함된 TBS(Tris-buffered saline)로 block시켰다. Primary antibody(anti-hERG)는 3시간 동안 상온에서 처리하였고, 결합하지 않은 antibody는 0.1% Tween-20이 포함된 TBS 용액으로 5분간 씻어주었다. 결합하지 않은 항체가 제거된 이 membrane은 상온에서 1시간동안 secondary antibody와 결합시켰다. 결합하지 않은 항체는 상온에서 TBST로 세 번 wash하여 제거하였다. Membrane 상의 물기를 제거하고 developer와 fixer solution을 처리해 준 뒤 LAS4000에서 membrane을 촬영하였다.

2-7. Drug treatment

hERG가 과다발현된 HEK-293 세포(5×10^5 cell/well)에 antibiotics가 포함되지 않은 DMEM 배지로 희석한 cisapride(CP)를 농도별로 넣어준 뒤 12시간 처리하였다. 약물은 hERG를 transfection 시킨 뒤 48시간이 지난 HEK-293 세포를 사용하였고, 세 번의 실험을 반복한 뒤 통계 처리하였다. Control 세포는 약물이 포함되지 않은 같은 양의 배지를 넣어 주었다.

2-8. Potassium ion channel assay

Potassium ion channel의 permeability를 보기 위해 FluxOR™ potassium ion channel assay kit(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다. 약물이 처리되었던 세포는 배지를 제거하고 1X PBS로 wash 해주었고, FluxOR™ loading buffer(Table 3)를 제조하여 1/16000로 희석(in HBSS)하였다. 이 loading buffer를 각 well에 500 μ l씩 넣어주고 빛을 차단한 뒤 상온에서 90분 반응시켰다. 반응 후 assay buffer(Table 4)를 각 well에 400 μ l씩 넣어주고 바로 loading buffer(Table 5)를 100 μ l씩 넣어준 뒤 90초 뒤에 well 내의 모든 buffer를 제거하였다. 남아있는 buffer는 1X PBS로 여러번 wash하여 제거한 뒤 현미경에서 그 결과를 확인하였다. Excitation/Emission 파장은 488nm/525nm에서 확인하였고 MetaMorph Version 7.1.3.0 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)을 이용하였다.

PowerLoad™ Concentration	10 μ l
FluxOR™ reagent, reconstituted in DMSO	1 μ l
Deionized water	880 μ l
FluxOR™ Assay Buffer	100 μ l
Probenecid, reconstituted in dH ₂ O	10 μ l
total volume	1mL

Table 3. Preparation of FluxOR™ Loading Buffer

Deionized water	4.45mL
FluxOR™ Assay Buffer	500 μ l
Probenecid, reconstituted in dH ₂ O	50 μ l
total volume	5mL

Table 4. Preparation of Assay Buffer

Deionized water	1.25mL
FluxOR™ Chloride-free Buffer	500 μ l
K ₂ SO ₄ Concentrate	500 μ l
Tl ₂ SO ₄ Concentrate	250 μ l
total volume	2.5mL

Table 5. Preparation of FluxOR™ Stimulus Buffer

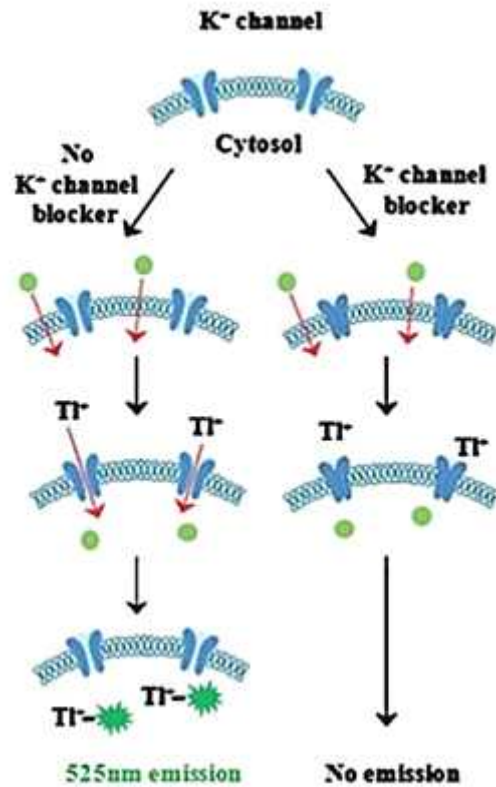


Figure 4. Schematic illustration of potassium ion channel assay

2-9. Quantitative cellular imaging

Potassium ion channel assay를 수행한 세포를 adherent cell과 single cell로 구분하여 정량적 측정을 수행하였다. 부착되어 있는 상태의 세포에 accutase를 처리(37°C)한 isolation single cell은 1.5ml tube에 모아서 centrifuge (230rcf, 3min)한 뒤 1x PBS로 두 번 wash 하여 남은 배지를 모두 제거한 후 ibidi plate에 넣어서 현미경 상에서의 형광감도를 측정하였다. 부착된 세포의 경우 위와 같은 accutase 처리 과정 없이 계대된 세포에서 배지만 제거한 뒤 1x PBS로 wash 후 바로 현미경에서 결과를 확인하였다. Excitation/Emission 파장은 488nm/525nm에서 확인하였고 MetaMorph Version 7.1.3.0 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)을 이용하였다.

Bright field에서 세포 사진을 촬영한 뒤 defocus 상태에서 threshold를 걸어주면 세포에 주황색의 영역이 표시된다. 이때 single cell의 경우 각 세포의 영역이 지정되고, adherent cell의 경우 isolation 상태가 아니기 때문에 때에 따라 세포 여러 개가 한꺼번에 영역으로 지정되기도 하였다. 프로그램 상에서 이들 주황색 영역을 region으로 설정하도록 해주면 Figure 5에서와 같이 각 영역에 번호가 매겨지며 각각의 region으로 나누어진다. 이미지 상의 모든 region을 저장한 뒤 형광이미지 상에서 불러오면 같은 위치에 그대로 region이 overlap된다. 각 region의 intensity는 프로그램 상에서 엑셀 파일로 변환되어 저장이 가능하였고, 이를 바탕으로 결과를 분석하였다.

Ⅲ. 결과

1. Recombination of hERG genes

hERG genes은 PCR로 증폭시켰고 0.8% agarose gel을 이용한 electrophoresis로 그 크기를 확인하였다. pAcGFP1-N1 vector (4.7kbp)를 EcoRI과 NotI으로 enzyme cutting 하여 얻은 GFP free vector에 PCR로 증폭시켜 얻은 hERG를 ligation 하여 hERG-containing plasmid를 확보하였다. 이 hERG-containing plasmid를 competent *E.coli* DH5a 세포에 transformation한 뒤 midi prep으로 DNA를 확보하여 이를 HEK-293 세포에 transfection하였다.

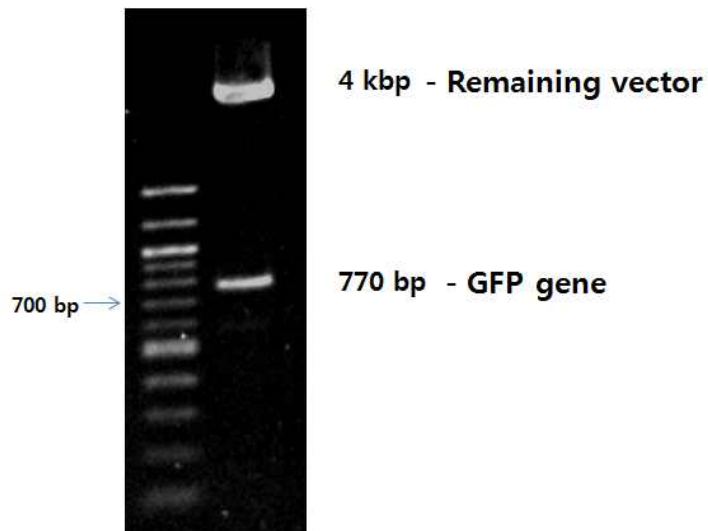


Figure 6. Gel image of enzyme restriction

2. Upregulation of hERG potassium ion channels in HEK-293

hERG recombinant plasmid는 LipofectamineTM 2000을 이용해 HEK-293 세포에 transfection 하였다. hERG가 과다발현 된 HEK-293 세포와 wild type의 HEK-293 세포에 각각 polyclonal anti-hERG 항체를 결합시켰고, 이는 western analysis를 통해 hERG 단백질의 발현을 확인하였다. hERG가 과다발현 된 세포에서 135-155 KDa에 해당하는 hERG를 확인한 것에 비해 wild type의 HEK-293에서는 hERG가 발현되지 않았음을 볼 수 있다.

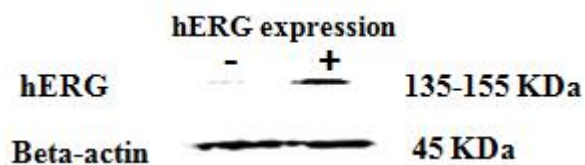


Figure 7. Expression of hERG gene in wild type and hERG overexpressed HEK-293 cells by western analysis

3. Regional average fluorescence intensity-based adherent cellular imaging

본 연구에서는 adherent cell 상태에서도 isolation single cell과 같은 결과를 얻을 수 있다는 것을 보이기 위해 adherent 및 single cell 상태의 HEK-293 세포를 이용한 GFP transfection assay를 비교하였다. GFP가 과다발현된 HEK-293 세포를 모델로 사용하였다. 현미경 상에서 세포의 bright field cellular image를 얻고 여기에 threshold value를 걸어주어 defocus image를 얻은 뒤 각 세포에 해당하는 region을 만들고 이 region을 형광 이미지 상에 입히면 각 region의 평균 intensity를 확인할 수 있다. 이 regional average fluorescence intensity는 프로그램 상에서 Excel 파일로 받을 수 있고 이를 통해 모든 region의 intensity를 확인할 수 있으며 결과에 필요한 데이터 분석이 가능하다.

Figure 8은 HEK-293 세포(single cell과 adherent cell)의 GFP 발현 정도를 보여주고 있다. Bright field image를 통해 HEK-293 세포의 다른 두 type을 확인할 수 있으며 fluorescent images를 통해 두 세포 type에 따른 average fluorescence intensity를 비교하였다. 결과를 정량적으로 확인하기 위해 regional average intensity와 expression percentage를 figure 5과 같은 과정을 통해 확인하였다. GFP가 과다발현된 HEK-293 세포의 isolated single cell에서의 average intensity는 1501을 나타내었고, adherent cell에서는 1476의 비슷한 값을 얻었다. 이러한 average intensity는 region으로 선택된 모든 세포의 fluorescence intensity의 평균값을 나타내는 것이고 두 세포 type에 따른 큰 차이는 나타나지 않았다. 이러한 유사성은 GFP 발현 정도를 통해서도 확인하였다. GFP가 발현된 percentage 역시 두 세포 type 모두 비슷한 값을 보였다(isolated single cell:49.1, adherent cell:51.7). GFP expression

percentage (EP)는 다음과 같이 계산하였다.

$$EP(\text{single cells})=S_F/S_B$$

$$EP(\text{adherent cells})=A_F/A_B$$

S_B 는 bright field defocus mode에서 single cell region의 전체 개수 이고, S_F 는 GFP가 발현된 HEK-293 single cell에서 가장 낮은 intensity 이상의 intensity를 보이는 region의 개수이다. 즉 전체 세포 개수 중 GFP 발현을 나타낸 세포의 개수를 계산한 방법이다.

위의 결과를 통해 regional average intensity-based cellular imaging assay에서 accutase enzyme을 사용한 single cell isolation 과정이 필요 하지 않다는 결론을 얻을 수 있었다. 이는 single cell 각각의 intensity가 아닌 세포 region의 평균 intensity만으로도 결과가 의미있음을 보여준다.

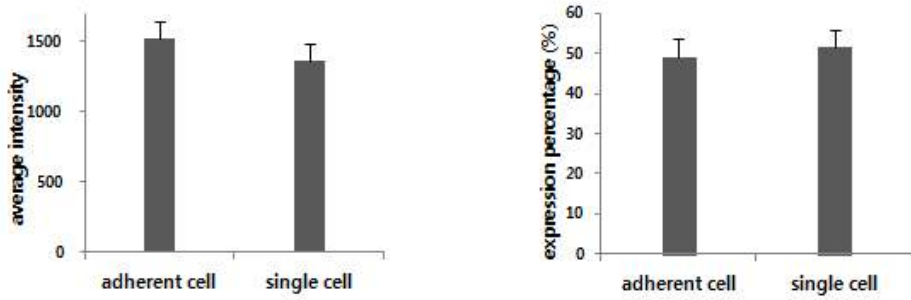
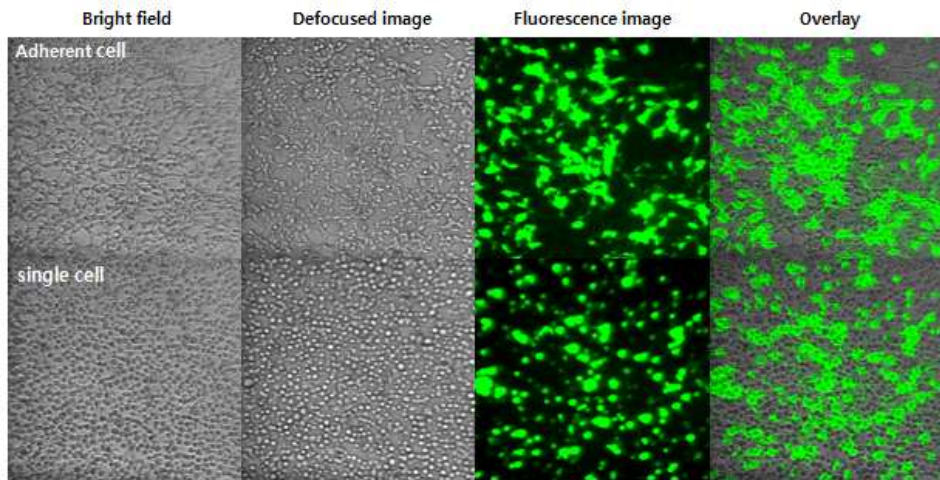


Figure 8. GFP expression of HEK-293 cells transfected with GFP plasmid DNA

4. Evaluation of the antagonistic effects of cisapride & dexamethasone on the cardiac hERG potassium ion channel

Cisapride는 1980년대 얀센社에서 위장운동 촉진제로 시장에 내놓았으나 심각한 심장질환 유발의 부작용으로 인해 기업에서 스스로 철수시킨 약물이다. 이는 세포 내 Na^+ , Ca^{2+} , K^+ 이온 농도를 변화시키고 potassium ion channel의 permeability에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한 cisapride는 hERG potassium ion channel을 억제한다. cisapride에 의한 심장독성 평가는 주로 patch clamp technique이 이용되어 왔다. 하지만 본 실험에서는 세포 수준에서의 regional average intensity-based adherent cellular imaging을 통한 심장 독성 평가법을 제안한다.

앞서 설명한 것처럼 cisapride의 심장독성을 확인하기 위해 hERG를 과다발현 시킨 HEK-293 세포에 cisapride를 농도별(25, 100, 200nM)로 처리하였다. 그리고 결과를 비교하기 위해 심장독성을 나타내지 않는 것으로 알려진 dexamethasone을 대조군으로 이용하였다. FluxOR™ potassium ion channel assay kit를 사용하여 hERG channel의 permeability 정도에 따른 형광의 intensity를 정량적 방법으로 측정하여 그래프로 표시하였다. 각 regional average intensity는 hERG channel을 통해 들어간 thallium ion의 농도를 반영한다. Cisapride의 농도가 증가할수록 regional average intensity가 감소하였으며 이는 cisapride에 의해 hERG channel이 block되었음을 나타낸다. Dexamethasone을 처리한 hERG-transfected HEK-293 세포의 경우에는 약물의 농도가 증가함에 상관없이 비슷한 regional average intensity를 보였다.

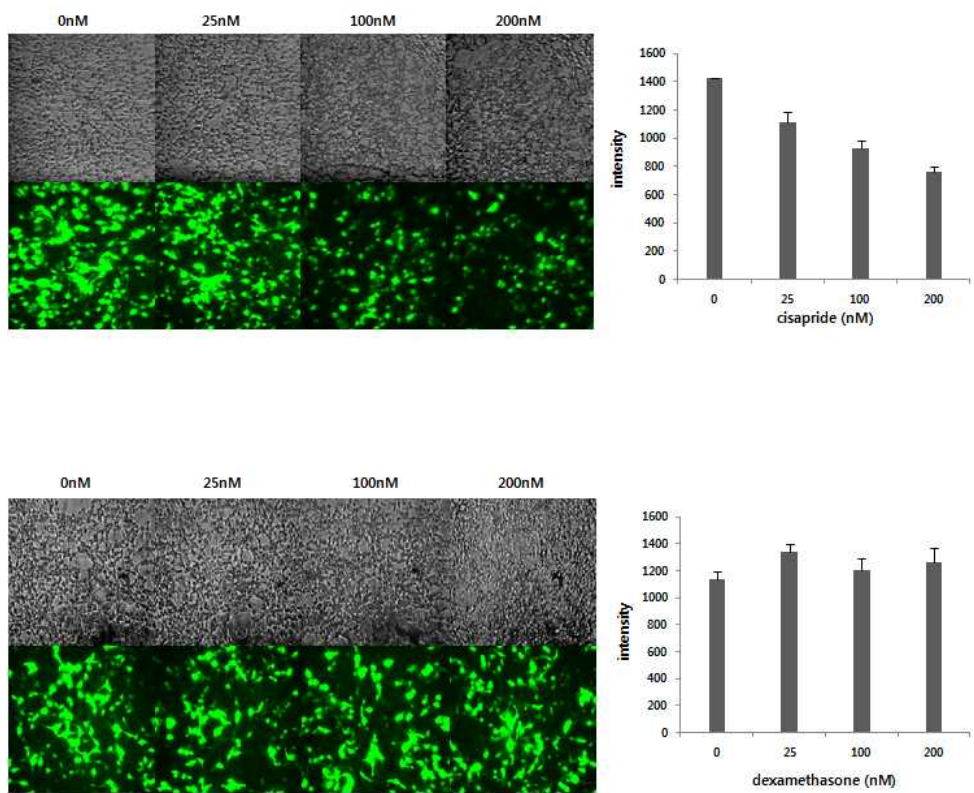


Figure 9. The effect of cisapride and dexamethasone on the permeability of potassium ion channels in hERG overexpressing HEK-293 cells.

IV. 결론

많은 제약회사들은 신약 개발 과정에 있어서 이온채널과 관련이 없는 어떤 약물이 이온 채널에 영향을 주어 독성을 일으킬 가능성을 확인하는데, 그 중 potassium ion channel을 본 실험에서 다루었다. Potassium ion channel은 세포막에 존재하는 이온 채널의 일종으로 세포에 존재하는 potassium ion을 선택적으로 통과시킴으로써 세포의 기능을 유지하고 있다. 따라서 이온 채널은 약물 target으로써의 역할 뿐 아니라 약물에 대한 독성 지표로의 응용 가치가 있다.

약물에 의한 심장독성은 여러 ion channel을 block함으로써 나타난다. 그 중 hERG에 의해 발현된 hERG channel이 약물에 의해 억제되면 심실의 활동전위 간격이 늘어나게 되고, 이는 심장 심전도의 QT파를 늘어나게 하는데 이것을 ‘QT prolongation’이라 한다. 이러한 현상이 지속되면 심장의 활동 전위에 EAD, 즉 ‘early after depolarization’이라 불리는 증상이 발생하게 되고 리듬있게 박동하던 심장 박동을 흐트러뜨리는 결과를 낳게 되어 심한 경우 심부정맥을 유발해 급성돌연사를 일으킬 수 있다. 이렇게 QT interval이 늘어지는 질환을 ‘LQT(Long QT) syndrome’이라고 한다[9]. Cisapride는 hERG channel의 길항작용을 연구하기 위한 모델 약물로 고려되었다. 임상 단계에서의 실패율을 감소시키기 위해 새로운 화학약품은 *in vitro* 단계에서의 독성 검사를 거쳐야 한다. 따라서 본 실험에서는 신약 개발의 초기 단계에 적용할 수 있는 간단한 방법으로 regional average intensity-based *in vitro* model assay를 제안하였다.

본 연구에서는 adherent 상태의 세포에 대한 regional average intensity-based cellular assay가 isolated single cell에서의 결과와 비교하여 크게 다르지 않다는 점을 보여주고 있다. 세포 이미지에서 선택된 region의 average intensity는 그 영역에 해당하는 전체 형광값의 평균을 나타내기 때문에 이는 세포의 isolation에 관계없이 동일하게 생각될 수 있다. Figure 8은 GFP가 과다발현된 HEK-293 세포에서의 이러한 개념을 증명한다. GFP가 발현된 adherent 상태의 HEK-293 세포의 결과는 single cell에서의 결과와 비슷하였다. 이것은 regional average intensity-based adherent cellular imaging이 single cell imaging cytometry를 대신할 수 있음을 보여준다. 결과적으로 adherent cell을 분리하는 enzyme 처리 과정을 생략할 수 있다. 첫 번째 결과를 통해 regional average intensity-based adherent cellular imaging이 약물 유발에 의한 심장독성 평가에 적용 가능하다는 것을 확인하였다. 현재까지 약물에 대한 안전성 시험은 신약개발과정의 비교적 늦은 단계에서 수행되어 왔다. 일반적으로 약물의 안전성 평가는 그 약물 compound의 nomination 단계까지 지연되는 편이었다. 하지만 약물의 안전성 평가는 기대되는 compound의 선택 과정에서부터 수행하는 것이 더욱 유리하다. 약물에 의한 심장독성의 평가를 위한 cell-based assay는 *in vivo* 단계에서의 경제적, 시간적 손실을 줄일 수 있는 실용적인 솔루션이 될 수 있을 것이다. 이를 통해 심각한 심장독성을 유발할 수 있는 약물 후보들은 *in vitro* 단계에서 배제될 것이다.

V. 참고문헌

- [1] A. Puliafito, L. Hufnagel, P. Neveu, S. Streichan, A. Sigal, D.K. Fyngenson, B.I. Shraiman, Proceedings of the National Academy of Sciences, 109 (2012) 739-744.
- [2] Y.K. Tak, P.K. Naoghare, B.J. Kim, M.J. Kim, E.S. Lee, J.M. Song, Nano Today, (2012).
- [3] Y.K. Tak, J.M. Song, Analytical chemistry, 85 (2013) 4273-4278.
- [4] M.J. Kim, S.C. Lee, S. Pal, E. Han, J.M. Song, Lab on a chip, 11 (2011) 104-114.
- [5] S. Grinstein, J.K. Foskett, Annual review of physiology, 52 (1990) 399-414.
- [6] H. Wulff, P.A. Calabresi, R. Allie, S. Yun, M. Pennington, C. Beeton, K.G. Chandy, Journal of Clinical Investigation, 111 (2003) 1703-1713.
- [7] G.A. Smith, H.-W. Tsui, E.W. Newell, X. Jiang, X.-P. Zhu, F.W. Tsui, L.C. Schlichter, Journal of Biological Chemistry, 277 (2002) 18528-18534.
- [8] D. Rampe, M.-L. Roy, A. Dennis, A.M. Brown, FEBS letters, 417 (1997) 28-32.
- [9] P. Hoffmann, B. Warner, Journal of pharmacological and toxicological methods, 53 (2006) 87-105.

Abstract

Regional Average Intensity-based Adherent Cellular Imaging: Application to Evaluation of Drug-induced Cardiotoxicity

Sunhee Kim

Department of Pharmacy, Pharmaceutical Analysis

The Graduate School

Seoul National University

A regional average intensity-based adherent cellular imaging assay has been applied to the evaluation of drug-induced cardiotoxicity. Unlike single cell imaging cytometry, which requires isolated single cells, regional average intensity-based cellular imaging does not require enzymatic treatment for the detachment and isolation of adherent cells. In addition, cellular morphological information is preserved. This concept was verified by the comparison of regional average fluorescence intensities and green fluorescent protein (GFP) expression percentages between isolated single and adherent human embryonic kidney (HEK)-293 cells with overexpressed GFPs. This approach successfully assessed the effect of cisapride and dexamethasone on the cardiotoxicity present in human ether-à-go-go

related gene (hERG)-overexpressed HEK-293 cells. The proper evaluation of drug-induced cardiotoxicity is an important issue in the drug discovery process because many pharmaceuticals have been withdrawn from the market due to drug-induced cardiotoxicity. The obtained results demonstrated the unique potential of regional average intensity-based cellular imaging as an *invitro* drug safety screening that can be well adapted at the *in vitro* stage before the *in vivo* animal model.

Keywords : Regional average intensity, adherent cellular imaging, drug-induced cardiotoxicity, hERG expression, single cell imaging, *in vitro* assay

Student Number : 2012-21567