

Polyethyleneimine-응축 BMP-2 발현 유전자를 이용한 골형성 효과

정희선¹, 김경화^{1,2}, 박윤정³, 김태일¹, 이용무¹, 구 영¹,
류인철¹, 이동수⁴, 이승진⁵, 정종평¹, 안수부¹, 설양조^{1*}

1. 서울대학교 치의학전문대학원 치주과학교실, 2. 서울대학교 BK21 치의학생명과학사업단
3. 서울대학교 치과대학 두개안면재건과학교실, 4. 서울대학교 의과대학 핵의학과
5. 이화여자대학교 약학대학 물리약학교실

I. 서론

골형성 유도단백질은 이소성 골형성을 일으킬 수 있다고 알려진 이후¹⁾ 골결손부 치료를 위한 연구에 이용되고 있다. 특히 BMP-2와 BMP-7은 골조직의 치유과정에 중요한 역할을 하므로 이 단백질의 적용에 중점을 두고 많은 연구가 진행되고 있다²⁻⁵⁾. 치주조직과 관련되어서도 BMP는 치주인대와 백악질의 분화와 재생에 관여하며⁴⁻⁷⁾, 치아와 임플란트, 상악동 이식술시 치조골 재생을 촉진하는 것으로 연구되고 있다⁸⁻¹³⁾. 그러나 직접적으로 BMP를 적용할 경우 단백질의 작용을 조절하기 힘들며, 조직액에 흡수되고 효소들에 의하여 분해되기 때문에 필요한 만큼의 골 형성 반응을 기대할 수 없으므로, 유전자 치료법이 도입되고 있다^{6,14-19)}.

유전자 치료법을 이용하여 충분한 기간에 걸쳐 특정 부위에 유전자를 적용함으로써 골 재생력을 극대화할 수 있다^{14,15,20)}. 유전자 발현을 개시하기 위하여 DNA는 세포를 뚫고 들어가 핵에 도달해야 한다. 이때 벡터를 이용하여 DNA가 세포로 들어가 발현되는

과정을 증진시킬 수 있으므로, 유전자 치료의 성공은 특정 조직에서 치료용 유전자를 효과적으로 전달하고 발현시킬 수 있는 벡터의 개발에 상당부분 의존하게 된다²¹⁾. 바이러스는 현재까지 가장 효과적인 벡터로서 치주조직의 재생에도 많이 이용되고 있으나^{22,23)}, 작업이 까다롭고 면역 반응을 일으키거나 전신적 질환과 관련될 가능성이 있으므로, 안전하고 제조가 용이한 비바이러스성 벡터를 이용한 방법이 시도되고 있다^{15,21,24,25)}.

Naked plasmid DNA, cationic lipid 그리고 cationic polymer들이 비바이러스성 시스템에 이용되고 있다. Plasmid DNA는 안정적이고 경제적인 DNA 전달 기구이다²⁴⁻²⁶⁾. 1996년 Fang 등이²⁷⁾ BMP-4를 발현하는 plasmid를 골 결손부에 직접 이식하여 치유세포들을 체내에서 유전적으로 조작할 수 있음을 보인 이후 동물을 이용한 여러 연구에서 plasmid를 이용하여 골형성이 증가됨을 보고하고 있다^{28,29)}. 그러나 plasmid DNA는 핵이나 세포액 혹은 순환 중 쉽게 분해될 수 있고, 세포막을 순조롭게 통과하지 못한다는 한계를 갖는다²⁴⁻²⁶⁾.

* 교신저자 : 설양조, 서울시 종로구 연건동 28, 서울대학교 치의학전문대학원 치주과학교실, 110-749 (전자우편: yjseol@snu.ac.kr)

* 본 연구는 과학기술부 특정연구개발사업(M10528010004-06N2801-00410) 지원으로 수행되었음.

비바이러스성 전달방법으로서 양이온성 지질이나 양이온성 중합체를 첨가하여 세포 내로 전달하는 방법도 이용되고 있다^{25,27,30}. 이들 양이온 분자들의 경우 DNA와 정전기적으로 결합하여 응축됨으로써 DNA의 세포 내 이동을 촉진시키고 핵산분해효소에 의해 분해되는 것을 방지한다^{30,31}.

양이온성 중합체들 중 polyethyleneimine(PEI)은 Boussif에 의하여 효과적인 형질감염시약으로 보고된 이후³² 여러 연구자들에 의해 활용되고 있다³³⁻³⁸. PEI는 DNA 응축효과가 뛰어날 뿐 아니라 높은 내재성 엔도솜 활성을 나타내므로 lysosome 효소의 파괴작용으로부터 DNA를 보호한다³⁰⁻³². 뇌, 신장 등 여러 신체조직에서 PEI를 이용한 유전자 전달이 연구되고 있으며, BMP 발현을 위한 연구들도 시도되고 있다^{34,35}.

비바이러스성 전달법을 이용할 경우 바이러스와 관련된 부작용이 매우 감소되지만, 아직까지 DNA를 전달하고 유전자 발현이 되도록 작용하는 데 있어서 바이러스 벡터보다 그 효과가 많이 떨어지므로^{24,25,30}, 생체 내에서의 효율적인 유전자 전달을 위하여 생체 내 분포, 세포 내 침투, 세포 내 전달경로 등의 과정에 존재하는 장애 요인들을 극복할 수 있어야 한다.

이 연구의 목적은 분자량 22kDa의 PEI를 이용하여 BMP-2 유전자를 발현하는 PEI/DNA 복합체를 만든 후, 이 복합체의 골 유도력을 in vitro와 in vivo에서 관찰함으로써 PEI가 효과적인 유전자 전달 벡터로서 기능할 수 있는가를 알아보는 것이다.

II. 실험재료 및 방법

1. DNA 제조

BMP-2 발현 cDNA(ATCC, Manassas, VA, USA)를 구입한 뒤 EcoRI로 분리해 냈다. 분리된 BMP-2 유전자를 plasmid vector인 pcDNA3.1 (Invitrogen, Calsbad, CA, USA)의 EcoRI site에 삽입시켰다. 재조합된 DNA로 *E. coli* DH5 α 를 형질전환시켜 재조

합 DNA를 증폭시켰다.

Plasmid extraction kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 배양된 *E. coli*에서 plasmid를 분리한 후 전기영동과 UV spectrophotometer (Beckman, Fullerton, Germany)를 이용하여 정성분석 및 정량하였다. 재조합된 유전자의 염기서열을 분석하고 제한효소분석을 시행하였다. 방향과 염기서열이 정확한 plasmid vector를 선택하여 다시 배양하여 다량의 plasmid를 획득하였다. 이렇게 제조한 DNA를 BMP-2/pcDNA3.1이라 하고 사용시까지 -20°C에서 보관하였다.

2. PEI /DNA 복합체 제작

BMP-2/pcDNA3.1 1 μ g을 100 μ l NaCl(150mM)과 혼합한 다음 이 혼합물을 분자량 22kDa의 PEI (ExGen 500[®], Fermentas, Opelstrasse, EU) 3.3 μ l와 혼합한 뒤 실온에 10분간 방치하여 DNA와 PEI의 복합체(PEI/BMP-2/pcDNA3.1)를 제작하였다.

3. PEI/DNA 복합체를 콜라겐에 도입

10 \times 10mm²의 정사각형의 콜라겐 스펀지(Zimmer Dental, Carlsbad, CA, USA)에 PEI/BMP-2/pcDNA3.1 복합체를 흡수시킨 후 4°C에서 18시간 방치하였다. -70°C에서 동결시킨 후 동결건조하였다. 대조군으로 BMP-2/pcDNA3.1만 넣은 콜라겐 스펀지도 함께 제작하여 동결건조시켰다.

4. 콜라겐 스펀지로부터 DNA 분리

제조한 PEI/BMP-2/pcDNA3.1/collagen을 1% 페니실린-스트렙토마이신 용액이 포함된 PBS 1ml에 넣은 후 37°C에서 진탕배양하였다. 배양 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일, 19일에 각각 100 μ l씩 채취하였다. 채취하고 남은 샘플에는 다시 100 μ l의 PBS를 첨가하였다. 채취한 용액에서 용출된 DNA의 농도를 Nanodrop spectrophotometer(NanoDrop, Wilmington,

DE, USA)에서 정량 하였다.

5. 유전자 전이 유용성 검사

쥐의 골수 기질 세포인 W20-17 세포를 사용하였다. 세포를 10% FBS(Invitrogen, Grand Island, NY, USA)와 페니실린 5000units/ml, 스트렙토마이신 50 μ g/ml이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Invitrogen, Grand Island, NY, USA)에서 배양하였으며, 5% CO₂, 37°C에서 성장 유지시켰다.

W20-17세포를 6well plate에 well당 1 \times 10⁵ 밀도로 접종한 후 24시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 제조된 PEI/BMP-2/pcDNA3.1/collagen을 넣고 배양하였다. 같은 조건에서 BMP-2/pcDNA3.1만 넣은 콜라젠 스펀지 또는 아무런 처치를 하지 않은 콜라젠스펀지를 넣고 배양하였다. 3일 후 배양액을 모은 다음 Immunoassay kit(R & D systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 각각의 군에서 분비된 BMP-2의 양을 측정하였다. 3일 동안 배양된 세포에서 염기성인산화효소 활성을 측정하였다. 각각의 군에서 21일 동안 배양된 세포를 10% NBF로 고정한 후 Alizarin Red S로 염색을 시행하여 석회화 정도를 관찰하였다.

6. DNA 복합체의 세포내 진입

pEGFP-N1 plasmid vector(Clontech, Mountain View, CA, USA) 1 μ g을 100 μ l NaCl(150mM)과 혼합하고 이를 PEI 3.3 μ l와 혼합하여 실온에서 10분간 방치하여 DNA와 PEI의 복합체를 제조하였다. 각각의 콜라젠 위에 준비한 PEI/pEGFP-N1 복합체를 넣은 다음 4°C에서 18시간 동안 유지하였다. 이렇게 제작된 PEI/pEGFP-N1/collagen을 동결건조시켰다. 대조군으로 pEGFP-N1 plasmid vector를 콜라젠 스펀지에 넣은 후 동결 건조시켰다.

W20-17세포를 4-well chamber slide에 접종한 후 하루 동안 5% CO₂ 배양기에서 배양한 뒤, 제조

된 PEI/DNA/collagen, DNA/collagen, PEI/DNA를 각각 넣고 3일간 배양하였다. 3일 후 10% NBF에서 고정하여 Confocal Laser scanning microscope (CLSM, Carl Zeiss, Göttingen, Germany)에서 green fluorescent protein (GFP) 발현을 관찰하였다.

7. In vivo 골형성 효과 실험

생체 내 골형성 효과를 보기 위하여 평균체중이 26g인 nude mouse에 DNA/collagen 복합체를 이식하였다. 제조한 BMP-2/pcDNA3.1 50 μ g을 200 μ l glucose 용액과 혼합한 다음 이 혼합물을 9 μ l PEI와 혼합하여 형성된 PEI/BMP-2/pcDNA3.1 복합체를 실온에서 10분간 보관 후 2장의 10 \times 10mm² 정사각형의 콜라젠 스펀지에 넣은 후 동결건조시켜 사용하였다.

Ketamine(유한양행, 서울, 대한민국), 5mg으로 실험동물의 전신마취를 유도하였다. 쥐의 대퇴부를 수직으로 10mm 정도 절개한 후 근육 내에 각각의 콜라젠 스펀지를 이식하였다. PEI/BMP-2/pcDNA3.1/collagen과 BMP-2/pcDNA3.1/collagen을 각각 두 마리씩의 마우스에 이식하였고, 음성대조군으로 아무런 처치를 하지 않은 콜라젠을 두 마리의 마우스에 이식하였다. 이식 후 5-0 흡수성 봉합사와 5-0 수술용 실크로 근육과 피부를 각각 봉합하였다. 술 후 3일간 항생제를 근육 주사하였고, 4주 후 희생시켜 조직표본을 제작하였다.

8. 조직학적 관찰

4주 후 모든 동물을 희생한 후 콜라젠을 이식한 부위 근육을 10 \times 7 \times 3mm³ 정도의 크기로 절제한 다음 10% 중성 포르말린 용액으로 고정하였다. 10% EDTA로 탈회하고 에탄올로 탈수한 다음 파라핀으로 포매하고 5 μ m 두께의 절편을 제작하였다. Masson-Trichrome 염색법으로 염색한 다음 광학현미경 하에서 20배와 100배의 배율로 관찰하였다.

9. 통계적 분석

통계적 분석을 위하여 SPSS 12를 이용하였다. 실험에서 얻어진 수치는 one-way ANOVA를 이용하였으며 사후 검정에 Duncan 법을 시행하여 분석하였다.

III. 결과

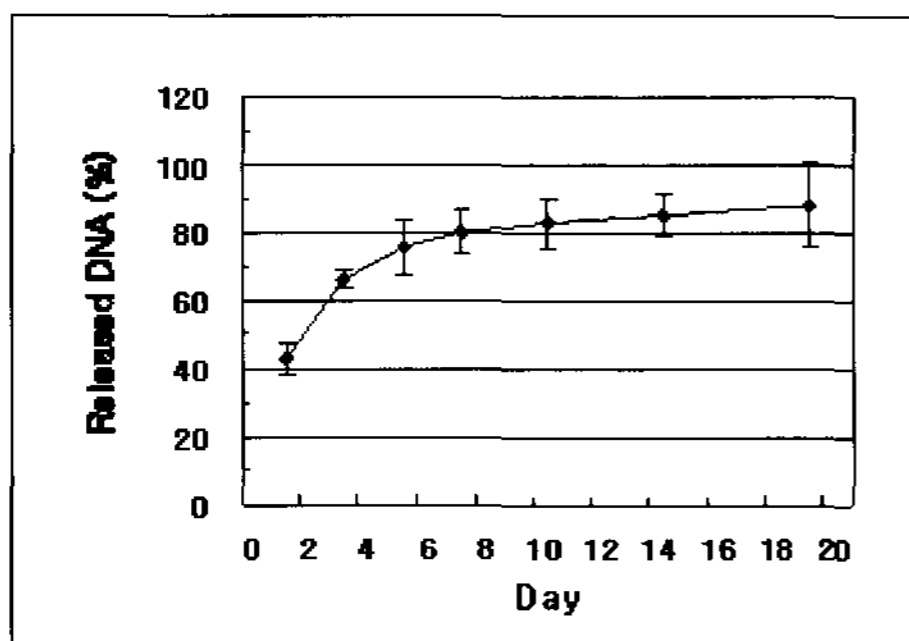


Figure 1. Cumulative release of PEI/DNA from collagen sponge. The amount of released DNA from collagen scaffold was measured using Nanodrop spectrophotometer. DNA was released from the collagen about 43% in 1 day, about 66% in 3 days, and about 88% in 19 days. Experiments were done in triplicate.

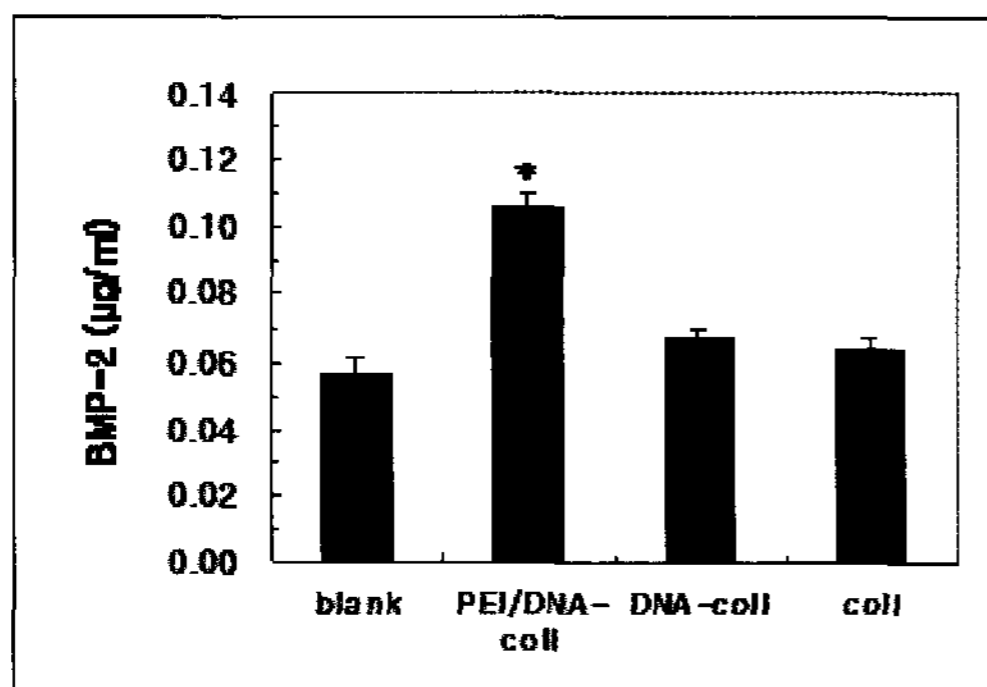


Figure 2. The amount of secreted BMP-2 in the conditioned media of W20-17 cells transfected by PEI/BMP-2/pcDNA3.1 which was released from collagen sponge in 3 days. (blank: No treatment, PEI/DNA-coll: PEI/BMP-2/pcDNA3.1/collagen, DNA-coll: BMP-2/pcDNA3.1/collagen, coll: blank collagen sponge)
* Significant differences were observed when compared to other groups (* $p < 0.05$).

1. 콜라겐 스폰지로부터 DNA 분리

각각의 날짜에 채취된 용액에서 용출된 DNA의 농도를 Nanodrop spectrophotometer에서 정량한 결과 시간이 경과함에 따라 PEI/BMP-2/pcDNA3.1을 적용한 콜라겐 스폰지에서 PBS용액으로 DNA가 점차적으로 용출되었다. 용출된 BMP-2/pcDNA3.1의 누적량을 최초 스폰지에 넣은 양에 대한 백분율로 나타내었다. 1일 후 약 43%, 3일 후 약 66%, 10일 후 약 83%, 그리고 19일 후에는 약 88%에 달하는 DNA가 분리되었으며 이후 더 이상의 증가는 없었다. 콜라겐으로부터 분리된 BMP-2/pcDNA3.1은 19일까지 증가하여 88% 가까운 양이 검출되었다 (Figure 1).

2. 유전자 전이 유효성 실험

1) BMP-2 발현

DNA가 부착된 콜라겐에서 용출된 유전자들에 의해 전이된 세포들이 3일간 분비한 BMP-2의 양을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 정량한 결과 PEI/BMP-2/pcDNA3.1/collagen으로 처리한 군에서 가

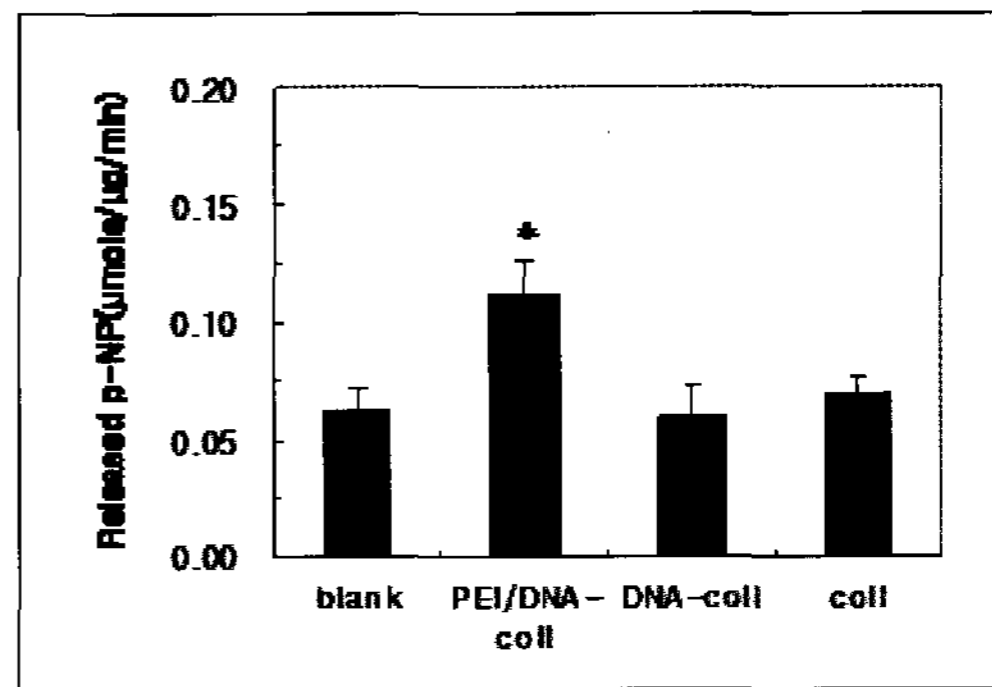


Figure 3. Alkaline phosphatase activities of W20-17 cells transfected by PEI/BMP-2/pcDNA3.1, which was released from collagen sponge. (blank: No treatment, PEI/DNA-coll: PEI/BMP-2/pcDNA3.1/collagen, DNA-coll: BMP-2/pcDNA3.1/collagen, coll: blank collagen sponge)
* Significant differences were observed when compared to other groups (* $p < 0.05$).

장 높게 나타났으며, BMP-2/pcDNA3.1/collagen 으로 처리한 세포군 및 아무런 처리를 하지 않은 세포군과 유의성 있는 차이를 보여주었다. BMP-2/pcDNA3.1/collagen으로 처리한 세포들이 분비한 BMP-2양은 콜라젠 스펀지만 넣은 군과 유의성 있는 차이를 나타내지 못했다(Figure 2).

2) 염기성 인산화 효소 활성

3일간 DNA가 부착된 스펀지에서 용출된 유전자들에 의해 전이된 세포들의 염기성 인산화 효소 활성을 평가한 결과 PEI/BMP-2/pcDNA3.1/collagen으로 처리한 군에서 활성이 가장 높게 나타났으며, BMP-2/pcDNA3.1/collagen으로 처리한 군 및 아무런 처리를 하지 않은 군과 유의성 있는 차이를 보여주었다(Figure 3).

3) 석회화 검사

PEI/BMP-2/pcDNA3.1/collagen과 BMP-2/pcDNA3.1/

collagen 첨가 후 21일 동안 배양된 세포를 Alizarin Red-S 염색을 시행하여 석회화 정도를 관찰한 결과 PEI/BMP-2/pcDNA3.1 군에서만 석회화 결절을 관찰할 수 있었다(Figure 4).

3. DNA의 세포내 진입

PEI/pEGFP-N1 복합체를 넣은 콜라젠 스펀지를 W20-17 세포에 넣고 3일간 배양한 후 CLSM에서 GFP 발현을 관찰하였다. 아무런 처리를 하지 않은 표본에서와 달리 PEI/pEGFP-N1 복합체를 넣은 콜라젠 스펀지로 처리한 경우 콜라젠과 슬라이드에 부착된 세포 모두에서 GFP 발현을 볼 수 있었으며, PEI/pEGFP-N1 복합체를 콜라젠 스펀지에 넣지 않고 직접 세포에 처리한 경우에도 유사한 정도로 GFP가 발현되었다. 반면에 pEGFP-N1/collagen으로 처리한 표본에서는 GFP 발현이 관찰되지 않았다(Figure 5).

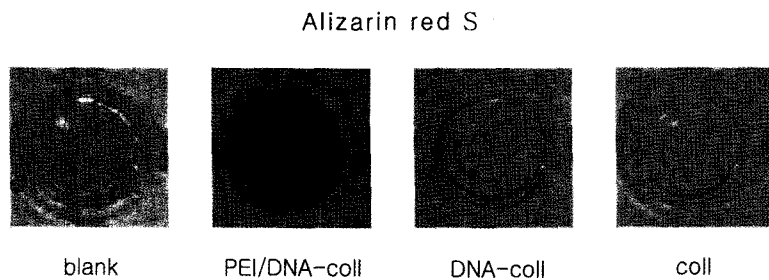


Figure 4. Alizarin red S staining for mineralization on BMSCs treated with nothing (blank), PEI/BMP-2/pcDNA3.1/collagen (PEI/DNA-coll), BMP-2/pcDNA3.1/collagen (DNA-coll) and collagen. Mineralization was observed only in BMSCs transfected by PEI/BMP-2/pcDNA3.1/collagen.

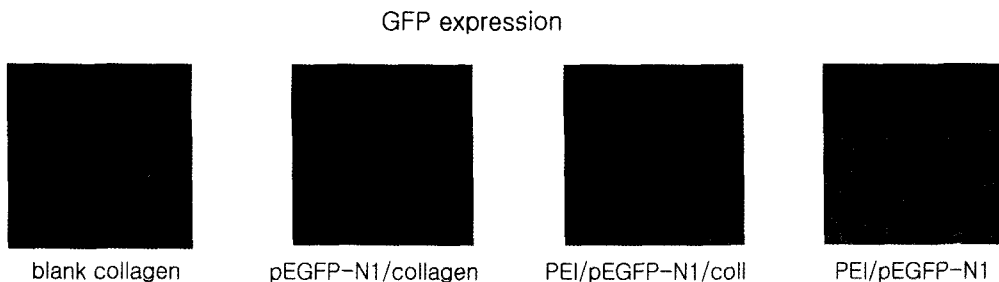
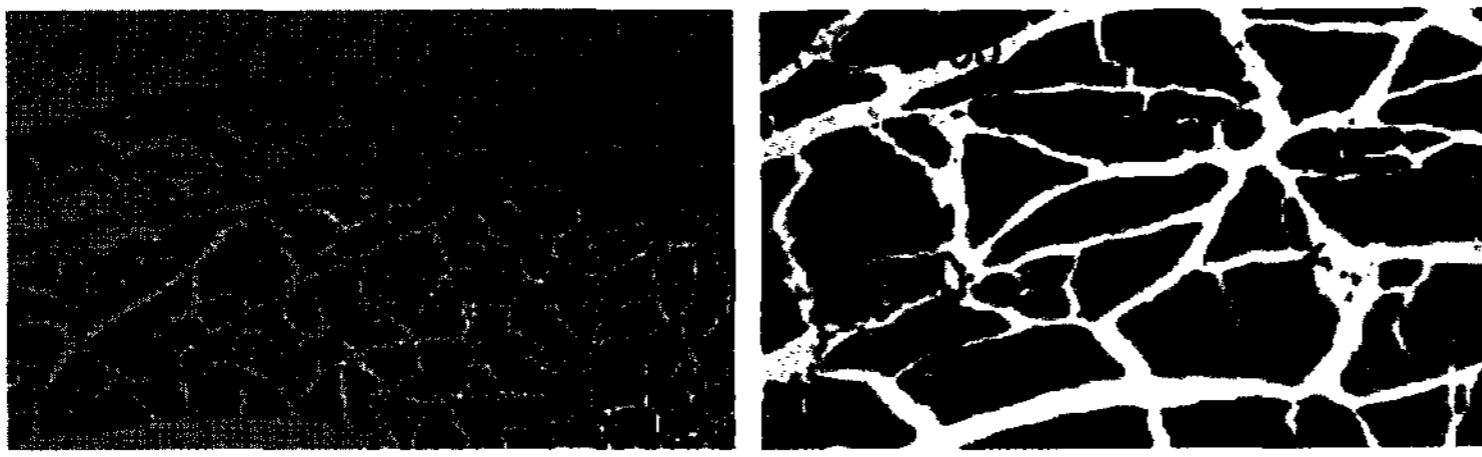
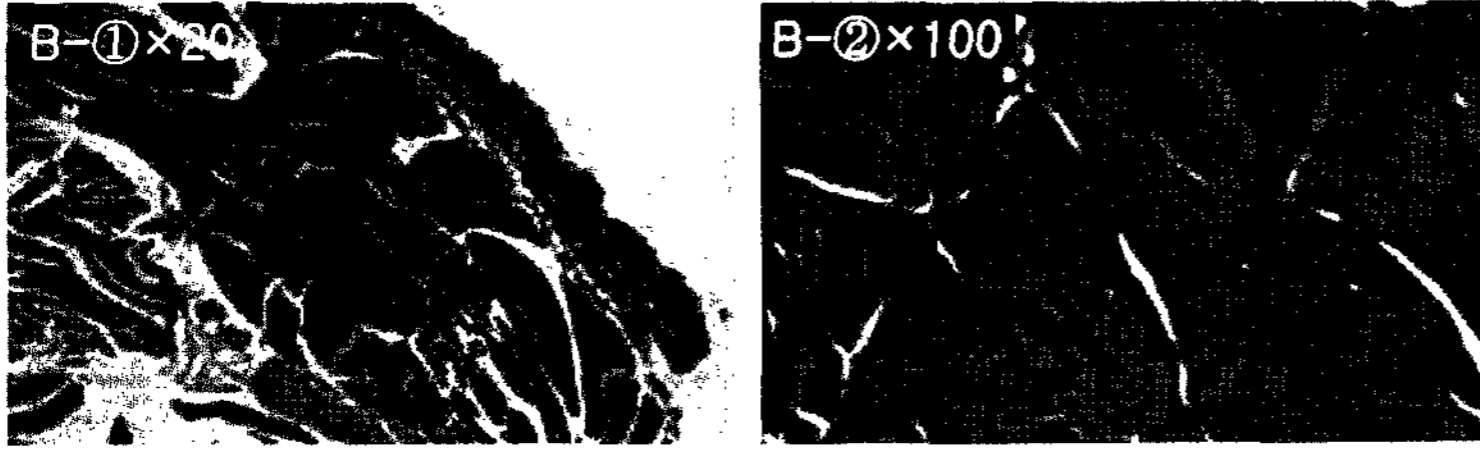


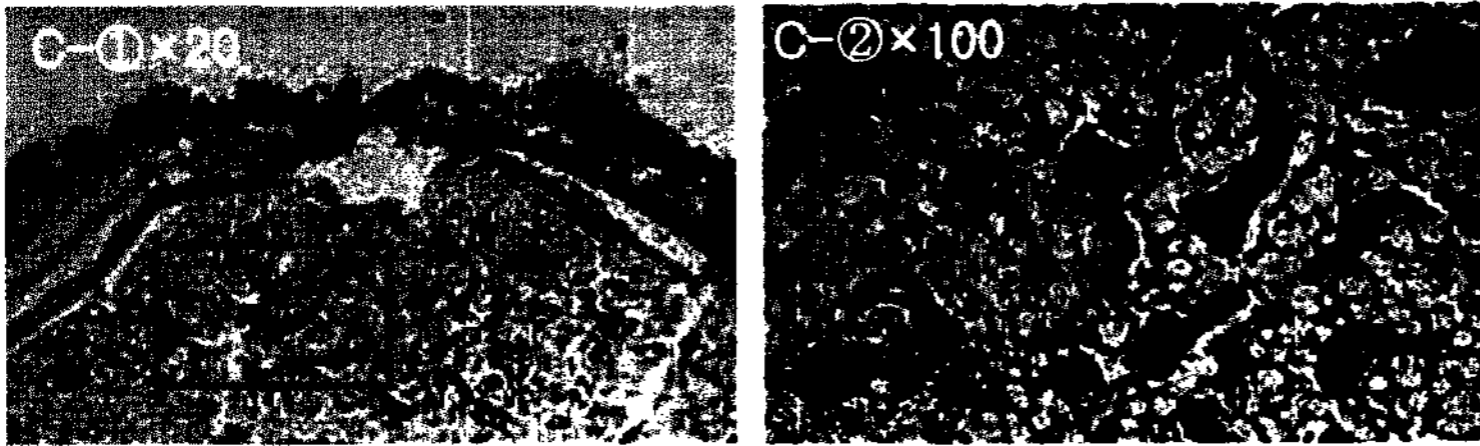
Figure 5. Cellular uptake of DNA into BMSCs. Original magnification, $\times 40$. GFP was expressed in cells transfected with PEI/pEGFP-N1/collagen or PEI/pEGFP-N1.



A. Tissue specimens grafted with collagen sponge after 4 weeks of implantation.



B. Tissue specimens grafted with BMP-2/pcDNA3.1/collagen after 4 weeks of implantation.



C. Tissue specimens grafted with PEI/BMP-2/pcDNA3.1/collagen after 4 weeks of implantation.

Figure 6. Histological sections of intramuscularly implanted vector-loaded sponges after 4 weeks of surgery. A. Blank collagen, B. BMP-2/pcDNA3.1/collagen, C. PEI/BMP-2/pcDNA3.1/collagen. Original magnification $\times 20$ (left), Higher magnification $\times 100$ (right). New bone formation was shown only in PEI/DNA grafted animal C. The newly formed bone tissue was consisted of islands of trabecular-like bone surrounded by fat cells and blood vessels. Remnants of resorbing collagen carrier were observed in tissues grafted with blank collagen A. or DNA/collagen B. at 4 weeks of healing. Masson-Trichrome staining.

4. 조직학적 관찰

누드 마우스의 대퇴부 근육조직 내에 PEI/BMP-2/pcDNA3.1/collagen과 BMP-2/pcDNA3.1/collagen, 그리고 DNA를 넣지 않은 콜라젠 스펀지를 각각 두 마리씩의 마우스에 이식하였다. 4주 후 희생하여 조직 표본을 제작한 뒤 Masson-Trichrome 염색 방법으로 염색하였다. PEI/BMP-2/pcDNA3.1/collagen을 이식한 동물의 조직에서는 신생골 형성을 관찰할 수 있었으나, BMP-2/pcDNA3.1/collagen을 이식한 표본에서는 콜라젠 스펀지만을 넣은 동물에서와 마찬가지로 골 형성의 증거를 찾을 수 없었다(Figure 6).

IV. 고안

양이온성 중합체 벡터인 PEI는 효과적으로 DNA를 응축하여 세포 내로 들어가기 쉽게 하며, 양성자

스펀지 효과(proton sponge effect)에 의하여 DNA 복합체가 라이소솜 효소에 파괴되지 않고 세포질 내로 방출되게끔 한다^{24,25,30,31}.

이 연구에서는 분자량 22 kDa의 linear형 PEI를 사용하여 BMP-2를 발현하는 DNA를 쥐의 골수기질 세포에 형질감염시켰다. 우선 PEI/DNA 복합체를 만든 뒤 이 용액을 콜라젠 스펀지에 흡수시켜 세포와 함께 배양하였다. 배양 시 콜라젠으로부터 분리되어 나온 유전자가 세포를 형질전환시킬 경우 전이된 세포는 BMP-2를 발현하고 염기성 인산화 효소 활성을 보이며 석회화를 유도하게 된다. 이 실험에서 PEI로 처리한 DNA와 함께 배양한 세포액에서 검출된 BMP-2 양은 대조군에 비하여 유의성 있게 높았으나, 비응축 DNA만으로 처리한 경우에 검출된 BMP의 양은 아무런 처리를 하지 않은 콜라젠만을 넣은 군과 차이가 없었으며, 염기성 인산화 효소 활성 역시 같은 양상을 보였다. 이와 같은 결과에서 전

달백터를 이용하지 않고 naked DNA만으로 처리할 경우 *in vitro*에서 형질전환이 일어나지 않음을 알 수 있었다.

DNA가 효과적으로 세포 내로 들어갔는지를 알아보기 위한 방법으로 pEGFP-N1과 복합체를 만들어 GFP 발현을 관찰하였다. PEI-condensing을 시행하지 않은 DNA 군에서는 GFP가 발현되지 않았으나, PEI/DNA 복합체와 배양한 세포에서는 GFP가 발현되어 전달백터를 사용하지 않은 경우 *in vitro*에서는 유전자가 세포 내로 거의 진입하지 못함을 알 수 있었다.

생체 내 실험에서는 쥐의 대퇴부 근육에 DNA를 넣은 콜라젠 스펀지를 이식하여 4주 후 신생골 형성 여부를 보았다. 생체 내 실험 역시 실험실 세포실험에서와 마찬가지로 비응축 DNA를 넣은 군에서는 골 형성 증거를 찾을 수 없었으며 PEI/DNA 복합체를 넣은 동물에서만 신생골이 형성되었다.

많은 연구에서 비응축 DNA의 *in vitro* 유전자 전달 효과가 매우 낮다는 것은 증명되었지만^{24,26)}, 생체 내에서는 약간의 효과를 나타낼 수 있으리라 예측하였다. 그러나 본 실험에서는 골형성이 전혀 일어나지 않았다. 비응축 DNA를 사용할 경우 고농도의 DNA가 필요하므로²⁸⁾ DNA 용량을 증가시킬 경우 상이한 결과가 나타날 수도 있었을 것이다. 향후의 연구에서는 용량에 따른 신생골 형성 유무 및 형성된 골의 양을 분석하여 볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

이번 실험에서는 근육조직 내에 이식했으므로 골 조직에 이식할 경우에는 다른 결과가 나타날 수도 있을 것이다. 실제 생체 내 골 결손부에 이식할 경우에는 실험동물의 종류와 이식부위의 크기 등에 따라 최적의 양을 적용해야 하므로, 이를 위한 연구가 뒤따라야 할 것이다.

이 실험에서는 유전자 전달기구로서 콜라젠 스펀지를 사용하였다. 콜라젠 제제는 생체내외에서 세포가 성장하기 좋은 기반이 됨으로써 약물이나 세포의 전달에 사용되어 오고 있으며, 최근에는 DNA 전달 시에도 운반체로 사용되고 있다³⁹⁻⁴¹⁾. Plasmid는 쉽

게 콜라젠의 구조 속으로 들어가 콜라젠이 흡수되는 동안 저절로 분비된다. 이런 특성으로 인하여 DNA 분해효소의 직접적인 공격을 피할 수도 있다^{16,40)}. 우선 PEI/DNA 복합체를 만든 뒤 이 용액을 콜라젠 스펀지에 넣어 콜라젠으로부터 복합체가 서서히 분리되어 나오는가를 조사하였다. 정량 결과 처음 24시간 43% 정도가 용출되었으며, 3일간 66% 분리되었고 이후 19일 동안 점진적으로 증가하면서 88%에 가까운 양이 측정되었다. 이것은 *in vitro*에서 전달된 DNA가 2주 정도는 나오지만 대부분이 3일 이내에 분리됨을 나타낸다. 생체 내에서는 콜라젠이 빠르게 분해되므로 유전자 역시 초기에 집중적으로 작용하게 될 것이다. 콜라젠은 조직 내에서 단기간에 분해되며 물리적으로 단단한 기질을 제공하지는 못하므로 장기간의 유전자 전달이 필요하다면 다른 전달체를 개발해야 한다.

이 연구에서 BMP 유전자를 발현하는 BMP-2/pcDNA3.1를 양이온 중합체 벡터인 PEI를 이용하여 쥐의 골수기질 세포를 형질전환시킬 수 있었다. 이렇게 유전적으로 변형된 세포의 BMP 생산력과 석회화 유도력을 확인하였고, PEI/DNA/collagen을 쥐의 근육에 이식하여 이소성 골형성을 유도할 수 있었다. 전달백터를 사용하지 않고 DNA만을 세포에 적용한 경우에는 원하는 유전자의 발현을 의미하는 결과를 관찰할 수 없었으며, 생체 내에서도 골 형성을 유도하지 못하였다. 이 실험의 결과 유전자 전달 벡터로서 PEI의 효과를 확인할 수는 있었지만, 효과나 독성에 있어서 다른 벡터와의 비교연구가 필요하다.

이 연구와 기존의 많은 연구결과들을 볼 때 국소적인 유전자 치료법의 미래는 유망하지만, 인체에 적용하기까지는 밝혀내야 할 부분이 많다. 생체 내에서 생산되는 단백질의 양과 생산기간도 규명되어야 할 내용이다. 또 세포나 조직 내에 전달에 이용한 운반체에 관해서도 다양한 시도가 필요하며, 특히 이 시스템을 치주조직에 효과적으로 적용시킬 수 있는 방법이 개발되어야 한다.

V. 결론 및 요약

양이온성 중합체 벡터인 polyethyleneimine이 효과적인 유전자 전달 벡터로서 기능할 수 있는가를 보기 위하여 BMP 유전자를 발현하는 PEI/DNA 복합체로 세포를 유전적으로 변형시킨 다음 변형된 세포의 BMP 생산력과 석회화 유도력을 확인하였고, 이 복합체를 생체 내에 이식하여 신생골 형성을 관찰함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *in vitro*에서 용출된 유전자에 의해 전이된 세포들에서 분비된 BMP-2의 양과 염기성 인산화효소 활성이 PEI/BMP-2/pcDNA3.1 복합체를 넣은 스펀지에서 PEI를 도입하지 않은 군에 비해 유의성 있게 높았으며, PEI-응축을 시행한 DNA로 처리한 콜라젠을 첨가한 세포군에서만 석회화가 관찰되었다.
2. 쥐의 대퇴부 근육에 제조한 PEI/BMP-2/pcDNA3.1/collagen을 이식한 결과 이소성 골 형성이 나타났으나, 비응축 DNA로 처리한 콜라젠을 이식한 동물에서는 콜라젠 스펀지만을 이식한 경우와 마찬가지로 골 형성이 일어나지 않았다.

이상에서 PEI를 이용한 유전자요법이 골조직 재생을 위한 치료법으로서 잠재력을 갖고 있는 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.
2. Wang EA, Rosen V, D' Alessandro JS et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:2220-2224.
3. Lee YM, Nam SH, Seol YJ et al. Enhanced bone augmentation by controlled release of recombinant human bone morphogenetic protein-2 from bioabsorbable membranes. *J Periodontol* 2003;74:865-872.
4. Wozney JM. The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. *J Periodontol* 1995;66:506-510.
5. Wang EA. Bone morphogenetic proteins (BMPs): Therapeutic potential in healing bony defects. *Trends Biotechnol* 1993;11:379-383.
6. Ripamonti U, Reddi A H. Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8:154-163.
7. Ripamonti U, Heliotis M, Rueger DC, Sampath TK. Induction of cementogenesis by recombinant human osteogenic protein-1 (hop-1/bmp-7) in the baboon (*Papio ursinus*). *Arch Oral Biol* 1996;41:121-126.
8. Higuchi T, Kinoshita A, Takahashi K, Oda S, Ishikawa I. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling. *J Periodontol* 1999;70:1026-1031.
9. Cochran DL, Jones AA, Lilly LC, Fiorellini JP, Howell H. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. *J Periodontol* 2000;71:1241-1257.
10. Cochran DL, Nummikoski PV, Jones AA et al. Radiographic analysis of regenerated bone around endosseous implants in the canine using recombinant human bone morphogenetic protein. *Int J Oral Maxillofac*

- Implants 1997;12:739-748.
11. Barboza EP, Duarte ME, Geolas L et al. Ridge augmentation following implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the dog. *J Periodontol* 2000; 71:488-496.
 12. Howell TH, Fiorellini J, Jones A et al. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1997; 17:124-39.
 13. Terheyden H, Jepsen S, Moller B, Tucker MM, Rueger DC. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs. *Clin Oral Implants Res* 1999;10:510-521.
 14. Murphy WL, Mooney DJ. Controlled delivery of inductive proteins, plasmid DNA and cells from tissue engineering matrices. *J Periodontal Res* 1999;34:413-419.
 15. Seeherman H, Wozney J, Rebecca L. Bone morphogenetic protein delivery systems. *Spine* 2002;27S:S16-S23.
 16. Winn SR, Chen JC, Gong X et al. Non-viral-mediated gene therapy approaches for bone repair. *Orthod Craniofacial Res* 2005; 8:183-190.
 17. Alden TD, Varady P, Kallmes DF, Jane JA Jr, Helm GA. Bone morphogenetic protein gene therapy. *Spine* 2002;15:S87-93.
 18. Gardlik R, Palfy R, Hodossy Julius et al. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit* 2005;11:RA110-121.
 19. Nishikawa M, Huang L. Nonviral Vectors in the New Millennium : Delivery Barriers in Gene Transfer. *Hum Gene Ther* 2001;12: 861-870.
 20. Herweijer H, Wolff JA. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* 2003;10:453-458.
 21. Fang J, Zhu YY, Smiley E et al. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:5753-5758.
 22. Bonadio J, Smiley E, Patil P, Goldstein S. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med* 1999;5: 753-759.
 23. Goldstein SA, Bonadio J. Potential role for direct gene transfer in the enhancement of fracture healing. *Clin Orthop* 1998;355S: S154-162.
 24. Pack DW, Hoffman AS, Pun S, Stayton PS. Designing and development of polymers for gene delivery. *Nature Reviews Drug Disc* 2005;4:581-593.
 25. Park TG, Jeong JH, Kim SW. Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv Drug Del Rev* 2006;58:467-486.
 26. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:7297-7301.
 27. Scherer F, Schillinger U, Putz U, Stemberger A, Plank C. Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* 2002;4:634-643.
 28. Huang YC, Simmons C, Kaigler D, Rice KG, Mooney DJ. Bone regeneration in a rat cranial defect with delivery of PEI-condensed plasmid DNA encoding for bone

- morphogenic protein-4 (BMP-4). *Gene Ther* 2005;12:418-426.
29. Huang YC, Riddle K, Rice KG, Mooney DJ. Long-Term in vivo gene expression via delivery of PEI-DNA condensates from porous polymer scaffolds. *Hum Gene Ther* 2005;16:609-617.
 30. Wightman L, Kircheis R, Rossler V et al. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* 2001;3:362-372.
 31. Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsasser HP, Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethyleneimine: Effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* 1999;16:1273-1279.
 32. Kunath K, Harpe AV, Fischer D et al. Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J Cont Rel* 2003;89:113-125.
 33. Lieberman JR, Daluiski A, Stevenson S et al. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein 2 producing bone marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg (Am)* 1999;81:905-917.
 34. Jin QM, Anusaksathien O, Webb SA, Rutherford RB, Giannobile WV. Gene therapy of bone morphogenetic protein for periodontal tissue engineering. *J Periodontol* 2003;74:202-13.
 35. Dunn CA, Jin Q, Taba M Jr et al. BMP gene delivery for alveolar bone engineering at dental implant defects. *Mol Ther* 2005;11:294-9.
 36. Krebsbach PH, Gu K, Franceschi RT, Rutherford RB. Gene therapy-directed osteogenesis: BMP-7-transduced human fibroblasts form bone in vivo. *Hum Gene Ther* 2000;11:1201-1210.
 37. Rundle CH, Miyakoshi N, Kasukawa Y et al. In vivo bone formation in fracture repair induced by direct retroviral-based gene therapy with bone morphogenetic protein-4. *Bone* 2003;32:591-601.
 38. Cohen-Sacks H, Elazar V, Gao J, Golomb A. Delivery and expression of pDNA embedded in collagen matrices. *J Cont Release* 2004;5;95:309-320.
 39. Friess W. Collagen-biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 1998;45:113-136.
 40. Katz JM, Roth CM, Dunn MG. Factors that influence transgene expression and cell viability on DNA-PEI-seeded collagen films. *Tissue Engineering* 2005;11:1398-1406.
 41. Southwood LL, Frisbie DD, Kawcak CE, McIlwraith CW. Delivery of growth factors using gene therapy to enhance bone healing. *Vet Surg* 2004;33:565-578

Osteogenic effects of polyethyleneimine–condensed BMP–2 genes *in vitro* and *in vivo*

Heesun Cheong¹, Kyoung–Hwa Kim^{1,2}, Yoon–Jeong Park³, Tae–Il Kim¹,
Yong–Moo Lee¹, Young Ku¹, In–Chul Rhyu¹, Dong–Soo Lee⁴, Seung–Jin Lee⁵,
Chong–Pyoung Chung¹, Soo–Boo Han¹, Yang–Jo Seol¹

1. Department of Periodontology School of Dentistry Seoul National University
2. BK21 Craniomaxillofacial Life Science School of Dentistry Seoul National University
3. Craniomaxillofacial Reconstructive Science School of Dentistry Seoul National University
4. Department of Nuclear Medicine, College of Medicine Seoul National University
5. College of Pharmacy Ewha Womans University

Naked DNA and standard vectors have been previously used for gene delivery. Among these, PEI can efficiently condense DNA and has high intrinsic endosomal activities. The aim of this study is to investigate whether the cationic polycation PEI could increase the transfection efficiency of BMP expressing DNA using a vector–loaded collagen sponge model.

BMP–2/pcDNA3.1 plasmid was constructed by subcloning human BMP–2 cDNA into the pcDNA3.1 plasmid vector. PEI/DNA complexes were prepared by mixing PEI and BMP–2/pcDNA3.1 and the constructed complexes were loaded into the collagen sponges. *In vitro* studies, BMSCs were transfected with the PEI/BMP–2/pcDNA3.1 complexes from collagen sponge. The level of secreted BMP–2 and alkaline phosphatase activities of transfected BMSCs were significantly higher in PEI/BMP–2/pcDNA3.1 group than in BMP–2/pcDNA3.1 group ($p < 0.05$). Transfected BMSCs were cultured and mineralization was observed only in cells treated with PEI/BMP–2/pcDNA3.1 complexes. *In vivo* studies, PEI/BMP–2/pcDNA3.1/collagen, BMP–2/pcDNA3.1/collagen and blank collagen were grafted in skeletal muscle of nude mice. Ectopic bone formation was shown in PEI/BMP–2/pcDNA3.1/collagen grafted mouse 4 weeks postimplantation, while not in BMP–2/pcDNA3.1 grafted tissue.

This study suggests that PEI–condensed DNA encoding for BMP–2 is capable of inducing bone formation in ectopic site and might increase the transfection rate of BMP–2/pcDNA3.1. As a non–viral vector, PEI offers the potential in gene therapy for bone engineering.