creative commons
COMMONS DEED

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

dCollection

농학석사 학위논문

RANK siRNA 전달을 위한 골조직 및 파골세포 전구체 표적화 보리 베타글루칸-알렌드로네이트 코팅 나노복합체

Bone and osteoclast precursor dual targeting Barley β-glucan-alendronate coated nanocomplexes for RANK siRNA delivery

2022년 2월

서울대학교 대학원

농림생물자원학부

바이오소재공학전공

정 소 희

RANK siRNA 전달을 위한 골조직 및 파골세포 전구체 표적화 보리 베타글루칸-알렌드로네이트 코팅 나노복합체

지도 교수 김 태 일

이 논문을 농학석사 학위논문으로 제출함
2021년 11월

서울대학교 대학원
농림생물자원학부
바이오소재공학전공
정 소 희

정소희의 농학석사 학위논문을 인준함
2021년 12월

위 원 장 곽 선 영 (인)

부위원장 김 태 일 (인)

위 원 이 기 훈 (인)

초 록

골다공증은 골의 밀도와 강도가 감소하는 골 질환으로, 연령이 증가할수록 유병률과 사망률이 높아져 경각심을 불러일으키고 있다. 골다공증은 뼈를 만드는 조골세포와 재흡수 하는 파골세포간 균형이 깨지며 파골세포의 활성이 증가하게 되면 촉진된다. 현재 골다공증 치료제로 비스포스포네이트 계열 약물이나 RANK siRNA 등 유전자 치료가 연구되고 있지만 각자 낮은 생체이용률과 부작용, 낮은 전달 효율로 인해 한계에 부딪히고 있다.

본 연구에서는 천연고분자인 보리 베타글루칸에 비스포스포네이트 계열인 알렌드로네이트를 접합시켜 유전자 전달체를 개발하고, RANK siRNA를 담지 하여 복합적인 효과로 파골세포의 과다 발현과 분화를 억제하고자 하였다. 이 연구를 통해서 보리 베타글루칸-알렌드로네이트 고분자는 일반적인 비스포스포네이트보다 높은 골 표적화 능력과 파골세포 전구체인 RAW264.7 세포에 대한 특이적 친화도가 있다는 것을 확인하여 높은 표적화 효율을 나타낼 것을 알 수 있었다. 또한, 베타글루칸-알렌드로네이트는 물리적 분산과 베타글루칸의 작용으로 인해 일반적인 알렌드로네이트보다 높은 파골세포 사멸 능력을 가지며, RANK siRNA 를 담지하여 전달 할 경우 일반적인 파골세포보다 분화 능력과 골재흡수능이 억제되었다.

결론적으로, 이 연구를 통해 새로운 유전자 전달체를 개발하였고 높은 표적화능과 파골세포 분화 억제 효율을 보여 파골세포 억제제로서의 새로운 가능성을 제시하였다.

주요어 : 골다공증, 유전자 전달체, 알렌드로네이트, 보리 베타글루칸, 폴리에틸렌이민

학 번 : 2020-21853

목 차

초 록 i
목 차 ii
List of Tables vi
List of Figures vii

제 1 장 서 론 1

제 2 장 문헌 연구 5
2.1 골다공증의 원인과 골조직의 리모델링 5
2.1.1 골조직의 생리학적 특성 5
2.1.2 골조직의 리모델링 과정 6
2.1.3 골다공증의 원인 7
2.2 골다공증 치료 방법 9
2.2.1 siRNA를 이용한 골다공증 치료 9
2.2.2 비스포스포네이트를 이용한 골다공증 치료 11
2.2.3 베타글루칸을 이용한 골다공증 치료 13
2.3 고분자를 이용한 유전자 전달 시스템 17
2.3.1 고분자를 이용한 유전자 전달체의 특징과 메커니즘 17
2.3.2 폴리에틸렌이민을 이용한 유전자 전달 시스템 18
2.3.3 베타글루칸을 이용한 유전자 및 약물 전달 시스템 19
제 3 장 재료 및 방법 21
3.1 재료 21

3.2 실험 방법 22
3.2.1 βGAD (Barley β-Glucan-Alendronate) 의 합성 22
3.2.2 βGAD의 특성 분석 23
3.2.2.1 ^{1}H NMR을 이용한 구조분석 23
3.2.2.2 FT-IR을 이용한 구조분석 23
3.2.2.3 GPC를 이용한 분자량 측정 23
3.2.3 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스 및 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노 합체의 특성 분석 24
3.2.3.1 폴리플렉스 및 나노복합체의 제조 24
3.2.3.2 아가로스 겔 전기영동을 이용한 복합체 형성 24
3.2.3.3 DLS를 이용한 평균 입자 크기 및 표면 전하..... 25
3.2.3.4 DLS를 이용한 혈청단백질 안정성 확인 25
3.2.3.5 TEM을 이용한 입자 형태 확인 25
3.2.4 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체의 세포 실험 26
3.2.4.1 세포 배양 26
3.2.4.2 MTT assay를 이용한 세포 대사 활성 26
3.2.4.3 Transfection을 이용한 유전자 전달 효율 27
3.2.5 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체의 표적화 실험 29
3.2.5.1 Hydroxyapatite를 이용한 골 친화성 확인 29
3.2.5.2 유세포 분석법을 이용한 나노복합체의 RAW264.7 세포 친화도 확인..... 29
3.2.6 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체의 생물학적 평가 31
3.2.6.1 파골세포 세포주 확립..... 31
3.2.6.2 TRAP assay를 이용한 파골세포 활성 확인 31
3.2.6.3 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)와 실시간 중합효소 연쇄반응 (Real Time-PCR, qPCR)을 이용

한 다양한 mRNA 정량..... 31
3.2.6.4 MTT assay를 이용한 세포 대사 활성..... 32
3.2.6.5 TRAP assay를 이용한 βGAD의 파골세포 사멸 유발 확인..... 33
3.2.6.6 qPCR을 이용한 βGAD 와 AD의 파골세포 사멸 유발 확인..... 33
3.2.6.7 TRAP assay를 이용한 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체의 파골세포 활성 억제 확인..... 34
3.2.6.8 qPCR을 이용한 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체의 파골세포 활성 억제 확인..... 34
3.2.6.9 통계 검정..... 35
제 4 장 결과 및 고찰..... 37
4.1 βGAD의 합성 및 특성 분석..... 37
4.1.1 βGAD의 합성..... 37
4.1.2 ^{1}H NMR을 이용한 구조분석..... 37
4.1.3 FT-IR을 이용한 βG, OXβG, AD, βGAD의 구조 분석 38
4.1.4 GPC를 이용한 βG와 βGAD의 구조분석..... 42
4.2 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스 및 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체의 특성 분석..... 44
4.2.1 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스 형성 확인..... 44
4.2.2 PEI_{25k}/siRNA의 평균 입자 크기 및 표면 전하 측정.... 44
4.2.3 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체 형성 확인..... 48
4.2.4 βGAD/PEI_{25k}/siRNA의 평균 입자 크기 및 표면 전하 측정..... 48
4.2.5 폴리플렉스,나노복합체의 혈청단백질 안정성 평가..... 52

4.2.6 폴리플렉스와 나노복합체의 입자 형태 확인 53
4.3 βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA 나노복합체의 세포 실험 56
4.3.1 MTT assay를 이용한 세포 대사 활성 확인 56
4.3.2 Transfection을 이용한 세포 내 유전자 전달 효율 56
4.4 βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA 나노복합체의 표적화 실험 62
4.4.1 βGAD의 골 친화도 측정 62
4.4.2 유세포 분석법을 이용한 나노복합체의 RAW264.7 세포 친화도 능력 확인 62
4.5 βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA 나노복합체의 생물학적 평가 68
4.5.1 RANKL을 이용한 파골세포 분화 및 TRAP assay 68
4.5.2 MTT assay를 이용한 RAW264.7 세포에서의 독성 평가 68
4.5.3 TRAP을 이용한 βGAD의 파골세포 사멸 능력 확인 72
4.5.4 qPCR을 이용한 βGAD의 파골세포 사멸 유발 능력 72
4.5.5 TRAP을 이용한 폴리플렉스와 나노복합체의 파골세포 활성 억제 확인 76
4.5.6 qPCR을 이용한 나노복합체의 파골세포 활성 억제 확인 76

제 5 장 결론 81

참고문헌 83

Abstract 96

List of Tables

Table 1 qPCR primer sequence for RAW264.7 cell 36

Table 2 Molecular weight (Da) of β-Glucan, βGAD10X, βGAD20X βGAD30X measured by GPC (Pullulan standard) 43

Table 3 Binding affinity of β-Glucan and βGAD to hydroxyapatite 65

Table 4 Cellular uptake (%) according to β-Glucan pretreatment concentrations relative to non-treated PEI_{25k}/siRNA and β GAD/PEI_{25k}/pDNA in RAW264.7 cell 66

Table 5 Cellular uptake (%) according to β-Glucan pretreatment concentrations relative to non-treated PEI_{25k}/siRNA and β GAD/PEI_{25k}/pDNA in HeLa cell..... 67

List of Figures

Figure 1 Schematic diagram showing (A) Formation of nanocomplex (B) Mechanism of complex in osteoclast and bone (C) Potential effect of nanocomplex 4

Figure 2 Synthesis scheme of (A) Oxidized β-Glucan (OXβG), (B) β-Glucan-Alendronate (βGAD) 39

Figure 3 ^{1}H NMR spectra of (A) Alendronate, (B) Barley β-Glucan, (C) βGAD10X, (D) βGAD20X, (E) βGAD30X 40

Figure 4 FT-IR spectra of Alendronate, β-Glucan, OXβG, βGAD10X βGAD20X, βGAD30X 41

Figure 5 GPC chromatogram of β-glucan, βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X 43

Figure 6 (A) Scheme of polyplex formation of PEI_{25k} and siRNA (B) Agarose gel electrophoresis of PEI_{25k}/siRNA 46

Figure 7 (A) Average size and (B) Zeta-potential values of PEI_{25k}/siRNA 47

Figure 8 (A) Scheme of nanocomplex formation of βGAD/PEI_{25k}/siRNA (B) Agarose gel electrophoresis of βGAD/PEI_{25k}/siRNA (PEI_{25k}/siRNA = 1:1 w/w) 50

Figure 9 (A) Average size and (B) Zeta-potential values of βGAD/PEI_{25k}/siRNA (PEI_{25k}/siRNA =1 w/w) 51

Figure 10 Size stability analysis in (A) dH_2O (B) 10% serum for 4h. (βGAD/PEI_{25k}/siRNA = 30: 1: 1 w/w) 54

Figure 11 EF-TEM images of (A, B) PEI_{25k}/siRNA

(C, D) βGAD10X/PEI_{25k}/siRNA

(E. F) βGAD20X/PEI_{25k}/siRNA

(G, H) βGAD30X/PEI_{25k}/siRNA (βGAD/PEI_{25k}/siRNA = 30: 1: 1 w/w) 55

Figure 12 MTT assay result of (A) PEI_{25k} and βGAD (B) βGAD/PEI_{25k}/siRNA in RAW264.7 cell 59

Figure 13 Transfection results of PEI_{25k} and βGAD10X, βGAD20X and βGAD30X in (A) RAW264.7 and (B) HeLa cells without serum at various weight ratios (βGAD/ PEI_{25k}/pDNA = 10, 20, 30, 50 : 1: 1 w/w) 60

Figure 14 Transfection results of PEI_{25k} and βGAD10X, βGAD20X and βGAD30X in (A) RAW264.7 and (B) HeLa cells in 10% serum at various weight ratios (βGAD/ PEI_{25k}/pDNA = 10, 20, 30, 50 : 1: 1 w/w) 61

Figure 15 In vitro hydroxyapatite binding assay. (A) Methodology to evaluate affinity of βGAD to hydroxyapatite (B) ^{1}H NMR spectra showing reduction of alendronate 65

Figure 16 FACS result of PEI_{25k}/pDNA and βGAD/PEI_{25k}/pDNA in RAW264.7 cell at various β-glucan concentrations (0.5, 1, 2 μg/mL). 66

Figure 17 FACS result of PEI_{25k}/pDNA and βGAD/PEI_{25k}/pDNA in HeLa cell at various β-glucan concentrations (0.5, 1, 2 μg/mL). 67

Figure 18 Osteoclast differentiation of RAW264.7 cell (A) Timeline for RANKL induced osteoclast differentiation (B) TRAP assay of osteoclast differentiation for 7 days..... 70

Figure 19 MTT assay for 7 days in RAW264.7 cell (A) Timeline (B) PEI_{25k}/siRNA (C) βGAD (D) βGAD/PEI_{25k}/siRNA at various weight ratios and concentrations..... 71

Figure 20 Effect of βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X in RANKL-induced osteoclast differentiation (A) Experiment timeline (B) TRAP assay results of reduced osteoclast activity by βGAD on RANKL-induced osteoclast differentiation.. 74

Figure 21 Apoptosis effect of AD, βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X in RANKL-induced osteoclast. Relative mRNA expression of FAS. Relative activity was normalized to value of non-treated RANKL-induced osteoclast..... 75

Figure 22 Effect of PEI_{25k}/siRNA and βGAD/PEI_{25k}/siRNA in RANKL-induced osteoclast differentiation (A) Experiment timeline (B) TRAP assay results of reduced osteoclast activity by PEI_{25k}/siRNA (C) TRAP assay results of reduced osteoclast activity by βGAD/PEI_{25k}/siRNA .. 79

Figure 23 Effect of PEI_{25k}/siRNA and βGAD/PEI_{25k}/siRNA in RANKL-induced osteoclast differentiation (A) RANK (B) NFATc1 (C) Cathepsin-K. Relative activity was normalized to value of non-treated RANKL-induced osteoclast..... 80

제 1 장 서 론

유전자 전달 시스템은 외부에서 유전 물질을 전달하여 과발현되는 유전자를 억제하거나 새로운 유전자를 투입하는 방법으로, 특정 질병의 유전자 단위에서의 치료가 가능하게 한다. 유전자 치료를 위해 사용되는 전달체는 바이러스성과 비바이러스성 전달체로 나눌 수 있는데, 바이러스성 전달체는 세포막과 결합하여 매우 높은 효율을 가지지만, 면역반응의 위험성과 독성 등의 문제가 존재하기 때문에 안정성이 높은 비바이러스성 전달체가 많이 연구되고 있다. 비바이러스성 전달체는 상대적으로 낮은 전달 효율을 가지지만 높은 생체적합성과 개질을 통해 원하는 특성을 부여할 수 있다는 점에서 큰 장점을 가지고 있다 [1]. 일반적으로 양이온성 고분자나 덴드리머, 리포솜등이 사용된다. 이 중에 양이온성 고분자는 음전하를 나타내는 유전자와 정전기적 상호작용을 통해서 유전자를 응축시킬 수 있으며, 세포막의 음전하와 상호작용을 통해 세포 내로 침투하여 유전자를 전달하는 기작을 가지고 있다 [2].

골다공증은 뼈의 강도와 밀도가 감소하게 되는 가장 흔한 유형의 골질환이다. 우리나라 50 세 이상의 인구에서 골다공증 유병률은 매년 증가하고 있으며, 여성의 경우 34.9%, 남자 7.8%로 연령이 증가할수록 발생률이 높고 폐경기 이후의 여성에게 많이 나타난다 [3]. 골다공증이 가장 많이 발생하는 요추와 대퇴골 부위에서 70 대 여성은 49.3%, 80 대에서는 60.4%가 골절을 겪는다 [4]. 특히나 대퇴골 골절의 경우 환자들은 1 년 후 20-30%의 사망률을 보이고 있다. 높은 사망률과 증가하는 유병률로 인해 골다공증 치료를 위한 연구가 많이 진행되어 왔고, 그중 비스포스포네이트가 주된 치료제로 사용되고 있다. 비스포스포네이트 약제는 골 흡수 억제제로서 체내에 흡수된 후 뼈의 하이드록시아파타이트와 결합해 파골세포의 활성과 생성을 억제하는

역할을 한다. 그러나 장기간 복용하였을 경우, 턱뼈 괴사와 대퇴골 골절, 식도암, 비정형 골절등의 부작용이 존재한다 [5]. 그래서 골다공증 치료는 다양한 치료제를 번갈아 가며 사용하고, 비스포스포네이트의 복용 기한이 엄격하게 관리되고 있다.

비스포스포네이트는 단순히 골다공증 치료효과뿐만 아니라 골표적화 효율이 높아 이 점을 활용한 유전자, 약물 전달체들이 개발되고 있다 [6]. 비스포스포네이트는 뼈를 구성하는 하이드록시아파타이트와 칼슘 킬레이션을 통해 표적화가 가능하고, 이때 일반적인 뼈보다 골 흡수 부위나 골 종양 조직에 더욱 높은 표적화능을 가지고 있다. 이는 칼슘의 밀도가 높거나 전환율이 높은 뼈에 먼저 축적되는 성질을 가지고 있기 때문이다. 따라서, 골종양이나 전이성 골암등에 대한 유전자 치료를 진행할 때 뼈 표적화 물질과 접합시켜 전달하는 방식으로 치료 효과를 더욱 높일 수 있다 [7-8].

보리 베타글루칸은 유전자 전달체로 사용될 수 있는 β-D-글루코오스가 주사슬을 이루며 β-1,3 구조와 β-1,4 구조가 대략 30%, 70%의 비율로 연결되어 있다 [9]. 보리 베타글루칸은 독성이 없고 생체적합성이 우수한 물질로서 대식세포에서 면역 작용을 통한 항암 효과가 있다고 알려져 있다. 또한 베타글루칸은 1,3 연결 구조로 인하여 파골세포의 수용체에 인식될 수 있으며 이를 통한 골다공증 치료 연구들이 진행되고 있다 [10-11].

따라서 본 연구에서는 골조직 표적화능과 파골세포 사멸 효과가 높은 비스포스포네이트 계열 약물과 파골세포 전구체에 작용할 수 있는 보리 베타글루칸 고분자를 이용하여 유전자 전달체를 만들고, 이를 골다공증 치료 효과가 있는 siRNA와 함께 전달할 수 있도록 하는 베타글루칸-비스포스포네이트/PEI_{25k}/RANK siRNA 나노복합체를 개발하였다 (Figure 1A). 비스포스포네이트는 치료 효과가 높은 3세대

약물인 알렌드로네이트 (AD)를 사용하였다. AD는 고분자 주사슬인 보리 베타글루칸 (βG)에 접합시켜 사용하였다. 유전자 전달체는 양이온성 고분자 중 폴리에틸렌이민 (PEI)를 사용하였다. 제조한 나노복합체의 물리화학적 특성을 분석하였고, 세포 실험을 통해서 파골세포 사멸 및 분화 억제 효율을 확인하였다 (Figure 1B). 최종적으로 개발한 나노복합체로 파골세포의 분화를 억제하며 이를 통해 향후 천연고분자와 유전자-약물 동시전달시스템의 도입으로 발전된 골다공증 치료제의 개발이 기대된다 (Figure 1C).

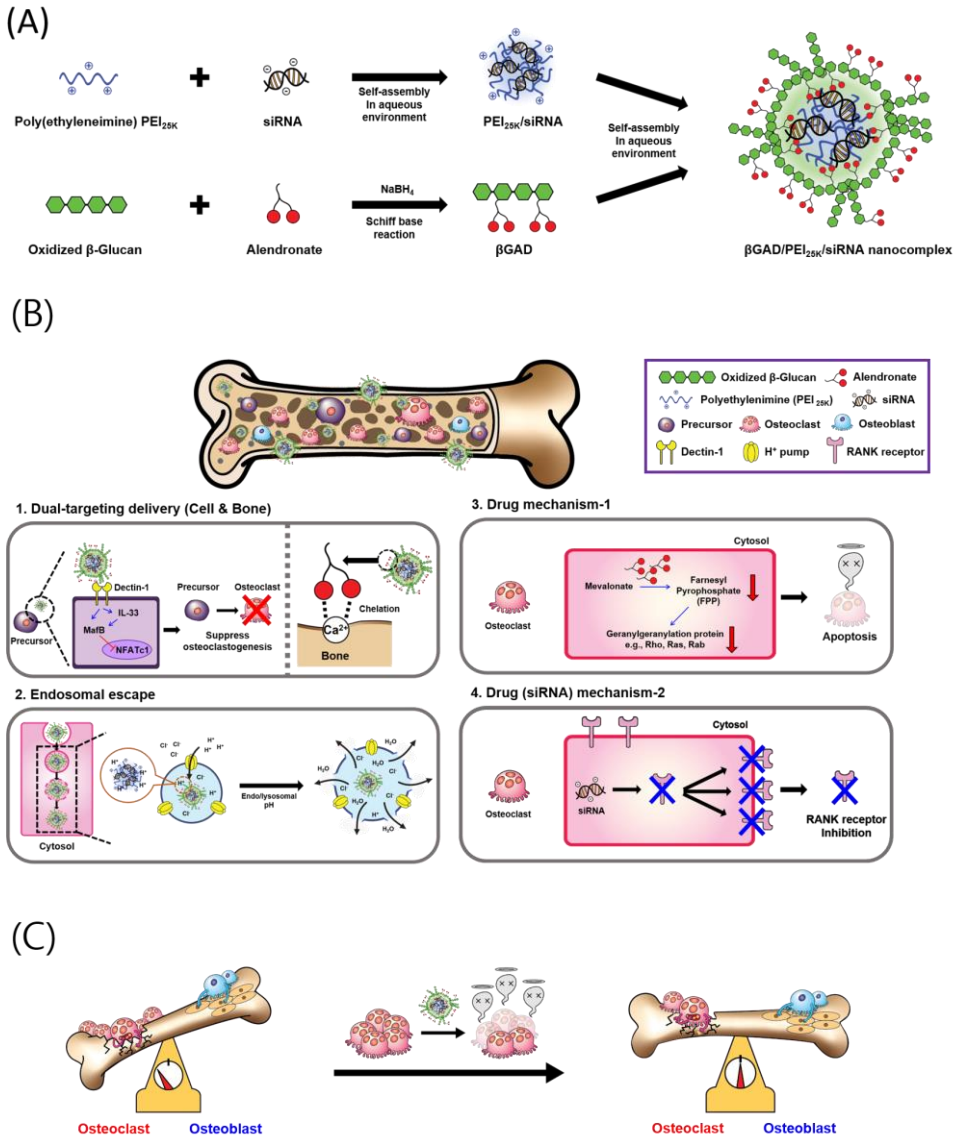


Figure 1. Schematic diagram showing (A)Formation of nanocomplex (B) Mechanism of complex in osteoclast and bone (C)Potential effect of nanocomplex.

제 2 장 문헌 연구

2.1 골다공증의 원인과 골조직의 리모델링

2.1.1 골조직의 생리학적 특성

골조직은 유기물과 무기물이 복합적으로 존재하고 무기질화된 콜라겐이 그 기본이 된다. 복합물인 골조직은 콜라겐과 지질을 포함하는 유기물이 약 25%, 하이드록시아파타이트를 비롯한 칼슘, 인, 마그네슘, 나트륨등의 무기물이 약 65%, 그리고 10%의 물로 구성된다. 이러한 유기물과 무기물의 복합구조가 뼈의 고유 성질인 기계적 강도, 탄성 등을 갖게 한다 [12-13].

골조직에는 4가지 세포가 있는데, 조골세포 (osteoblast), 골표면세포 (bone lining cell), 골세포 (osteocyte), 파골세포 (osteoclast)가 존재한다. 조골세포는 중간엽줄기세포에서 유래된 골전구세포 (osteoprogenitor cell)로부터 분화한다. 조골세포는 골기질 단백질을 합성하고 분비하며 응집시키면서 석회화를 진행하게 되고, 골세포로의 분화를 촉진시킨다 [14]. 골표면세포는 납작한 모양의 조골세포로서 골의 표면을 덮는다. 골표면세포는 RANKL을 생성하여 파골세포 활성에 영향을 준다고도 알려져 있다 [15]. 골세포는 골조직의 95%를 차지하는 세포로서 골조직 내에서 무기질 항상성을 조절할 수 있다. 골기질과 조직액 사이의 간극연접으로 인해 미네랄 물질과 대사물질의 교환이 가능하고, 이를 통해 골조직의 항상성을 유지하며 조골세포와 파골세포의 활성에도 영향을 미칠 수 있다 [16]. 마지막으로 파골세포는 단핵세포들이 융합되면서 분화되어 다핵세포구조를 가지고 있다. 뼈를 재흡수하는 기능을 통해 손상되거나 오래된 골조직을 교체하게 되고, 과다 발현될 경우 골다공증을 일으킬 수 있다고 알려져 있다 [17]. 조골세포, 골표면세포, 골세포, 파골세포 등 여러 세포들이 모여 서로 간의 상호작용을 통해 활성을

유지하고 골조직을 유지한다.

2.1.2 골조직의 리모델링 과정

골조직은 성장이 멈춰있는 조직이 아니기 때문에 일생 동안 오래되거나 손상된 조직들을 교체하고 새로운 조직을 생성시킨다. 이 과정을 골조직의 리모델링 과정이라고 한다. 성인의 뼈는 매년 10%씩 골조직이 교체되고, 매년 3-4 만 골리모델링유닛 (bone remodeling unit, BRU)이 시작된다고 알려져 있다 [18]. 리모델링은 손상되고 노후화된 골조직을 교체하는 것뿐만 아니라, 뼈의 기계적 물성을 지속적으로 유지하기 위해 꼭 필요하다. 리모델링은 파골세포를 과다발현하는 RANK-RANKL 상호작용의 활성화 단계, 파골세포의 재흡수 단계, 조골세포의 응집과 발현 단계, 조골세포의 세포 형성 단계로 나누어진다 [19].

활성화 단계에서 골표면세포가 골세포로부터 받는 신호에 의하여 리모델링을 시작한다. 기계적 골절, 골세포의 사멸등으로 인한 신호, 인슐린 유사 성장인자 (Insulin like growth factor, IGF-I), 종양괴사인자 (Tumor necrosis factor, TNF-α), 부갑상샘호로몬 (Parathyroid hormone (PTH), 인터류킨 6 (Interleukin 6, IL-6) 등 여러 호르몬의 분비에 의해 골표면세포가 활성화된다. 활성화된 골표면세포는 조골세포로, RANKL (Nuclear factor κB ligand)를 발현하게 되고 파골세포 전구체에 있는 RANK (Nuclear factor κB) 수용체와의 상호작용을 통해 전구체의 성장과 분화를 촉진하여 다핵세포인 파골세포를 생성한다 [20].

파골세포의 재흡수는 파골세포가 분화하고 성장하면서 골표면에 부착되어 시작된다. 성장한 파골세포는 골기질에 있는 무기물과 유기물을 분해한다. 첫째로는, 산성화 조건 하에서 무기물을 분해시킨다. 수소 이온이 파골세포가 부착된 공간으로 유입되어 산성 환경을 만들게 되면,

하이드록시아파타이트 등의 무기물이 분해된다. 이후 콜라겐 기질을 분해하는 효소들 (Collagenase, Proteinase, Cathepsin K enzyme)이 유입되어 골의 유기물을 분해시킨다. 골의 재흡수 단계가 끝나면 파골세포는 사멸된다 [21-22].

조골세포의 응집과 발현, 그리고 조골세포의 형성으로 인해 새로운 골 기질이 만들어지고 유기물과 무기물의 복합화를 통해서 새로운 뼈 구조를 만들게 된다. 뼈를 재흡수하고 뼈를 만드는 파골세포와 조골세포의 기능과 RANK-RANKL 신호를 통해서 골조직이 항상성을 유지하며 리모델링이 진행된다 [23-25].

2.1.3 골다공증의 원인

골다공증은 조골세포보다 파골세포의 활성이 높아지고 과다 발현되어 그 균형을 잃었을 때 일어난다. 골다공증의 원인으로는 노화, 에스트로겐 결핍, 염증 반응, 약물 부작용 등이 존재한다 [26].

노화로 인한 골다공증의 경우, 골밀도가 감소하고 손상된 골의 재생 능력이 떨어지게 된다. 골밀도는 30-40 대부터 감소하기 시작하고 남은 일생 동안 계속해서 소모된다. 이로 인해 골의 강도가 감소하게 되면서 골의 재흡수가 촉진되고 골다공증의 원인이 된다. 또한 산화 스트레스도 골다공증의 큰 원인이 된다. 노화된 골세포에서는 활성산소종의 일종인 초과산화물 음이온을 생성하여 파골세포에 의한 골의 재흡수를 일으킨다 [27].

폐경에 의한 에스트로겐 결핍은 골다공증의 또 다른 대표적 원인이다. 에스트로겐의 결핍은 에스트로겐 수용체-알파 (ERα)의 작용을 감소시켜 골세포에 수용체가 부족해진다. 이로써 골이 기계적 시그널을 충분히 받지 못하고 반응을 할 수 없게 되어 기계적 역할을 수행하지 못하게 한다. 또한, 에스트로겐 수용체의 감소는 골세포 재생을 돕는 β1 인테그린의

조절을 원활하지 못하게 해 새로운 골조직 형성을 막는다. 에스트로겐 결핍은 면역 조절에도 영향을 주어 파골세포의 활성을 증가시키며 T helper-17 (Th 17)세포의 활성을 증가시켜 염증성 인자인 TNF-α, IL-17 그리고 RANKL 등의 분비를 통해 파골세포의 성장을 촉진시켜 골다공증 발병에 큰 영향을 주고 있다 [28].

골다공증을 일으키는 약물에는 크게 호로몬제와 비호로몬제인 심혈관질환 약 등이 존재한다. 스테로이드 호로몬제인 글루코코르티코이드는 골다공증을 가장 흔하게 일으키는 약물이다 [29]. 글루코코르티코이드는 조골세포의 생성과 활성을 억제하고 RANKL 분비를 증가시켜 파골세포를 성장시키며 성숙한 파골세포의 사멸을 막아 골의 재흡수가 일어나게 한다. 이렇듯 골다공증에는 노화와 폐경 등 자연적인 현상과 약물 사용 등의 원인들이 존재한다 [30].

2.2 골다공증 치료 방법

2.2.1 siRNA을 이용한 골다공증 치료

siRNA (small interfering RNA)는 특정 유전자의 발현을 억제하여 원하는 효과를 나타내는 핵산이다. 세포질에서 siRNA 는 RISC complex 와 함께 상보적인 서열을 가지고 있는 mRNA 를 억제하여 단백질 형성 및 활성을 막을 수 있다. 일반적인 DNA 와 다르게 핵 외부에서 활성을 띠어 효과가 높으며 특정 서열과의 결합으로 인해 표적화 능력이 매우 높다는 장점을 가지고 있다 [31]. 하지만 siRNA 는 단독으로 사용될 경우 분해 효소의 작용과 낮은 세포 내 이입으로 그 효율이 낮아 유전자 전달체를 함께 사용하여 전달한다. 골다공증 치료에서 siRNA 는 조골세포의 활성을 낮추는 인자를 억제하거나 파골세포의 활성을 증가시키는 인자를 억제하는 방식으로 사용되고 있다 [32].

RANK-RANKL 상호 작용은 파골세포의 분화에 직접적인 영향을 미친다. 파골세포 전구체에 존재하는 RANK는 수용체로서 조골세포에서 분비되는 RANKL 과 결합하여 세포 내 MAPK, NF-κB 와 NFATc1 경로를 활성화시켜 파골세포의 성장과 골의 재흡수를 촉진시킨다. RANK siRNA 를 사용한다면 파골세포 전구체에서 RANK 수용체의 발현을 막고 파골세포의 성장과 분화를 억제할 수 있다. Y. Wang 은 RANK siRNA 를 파골세포와 파골세포로 분화할 수 있는 대식세포인 RAW264.7 세포에 단독으로 전달하여 파골세포와 그 전구체 활성 감소를 확인하였다 [33]. 2019 년 Bliecen 등은 siRNA 의 낮은 전달 효율을 극복하고자 RANK siRNA/PEI 복합체를 poly(lactic acid-co-glycolic acid) 고분자로 캡슐화하여 전달하였다. 파골세포와 전구체에 RANK siRNA 가 빠르게 축적되어 활성과 성장을 저해시키고

파골세포의 사멸을 일으키는 것을 확인할 수 있었다 [34]. Kim 등은 중극성 생물 활성 유리 나노구에 RANK siRNA 을 담지하여 전달하였다. 중극성 생물 활성 유리 나노구는 칼슘이 포함되어 있어 골에 대한 표적화 능력을 증진시켰고 골조직에 쉽게 축적되어 골재생을 도울 수 있었다. RANK siRNA 의 전달을 통해 RANK 를 표현하는 세포가 70% 감소하였고, 전달체는 골재생을 도와 골다공증을 효율적으로 치료하는 모델을 제시하였다 [35].

RANK siRNA을 비롯하여 다양한 종류의 siRNA 가 골다공증 치료에 사용되고 있다. G. Zhang 등은 골 재흡수를 조절하는 인자인 Plekhol1을 억제하는 siRNA를 사용하였다. 지질 기반의 전달체 표면에 골 표적화를 위해서 $(AspSerSer)_6$을 붙였다. 해당 전달체는 높은 표적화능을 통해 siRNA 를 전달하였고 이를 통해 골원성 세포의 분화와 Plekho1 인자 억제효과를 확인하였다 [36]. Y. Zhang의 연구팀은 파골세포 활성을 증가시키고 조골세포 성장을 감소시키는 semaphorin4D (sema4D)을 억제할 수 있는 siRNA 를 N-(2-Hydroxypropyl) methacrylamide-Asp_8 고분자를 전달체로 이용하여 전달하였다. *In vivo* 실험 결과 sema4D mRNA가 효율적으로 억제되었고 골표면에 조골세포의 수가 증가하고 골밀도, 골면적비율 또한 증가하였다 [37]. Wang 등은 골재생능력과 골밀도를 감소시키는 Wwp1 (WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1) 효소를 억제할 수 있는 siRNA를 양이온성 고분자와 함께 복합화 하여 전달하였다. 그 결과, 조직 손상이 일어난 부위에서 골재생효과가 빠르게 나타났고 뼈의 강도와 밀도가 함께 증가하는 것을 확인하였다 [38].

2.2.2 비스포스포네이트를 이용한 골다공증 치료

비스포스포네이트는 골다공증의 대표적인 치료제로 높은 치료 효과가 있으며 현재 부작용을 줄이기 위해 많은 연구가 진행되고 있다. 비스포스포네이트는 P-C-P 코어 구조에 있는 탄소의 R1 와 R2 관능기의 종류에 따라서 그 효과와 기작이 달라진다. 특히나 사슬기에 질소를 포함하는지에 따라서 파골세포 내부에서 작용하는 메커니즘이 달라진다. 질소를 포함하지 않는 경우, ATP 와 복합체를 형성하고 미토콘드리아로 이동하여 ATP 활성을 억제하는 방식으로 세포 사멸을 일으킨다 [39]. 질소를 포함하는 경우, 세포의 대사 경로인 메발론산 경로 (mevalonate pathway)에서 파르넨실 피로인산 합성효소 (Fararnesyl pyrophosphate synthase, FPPS)의 생성을 막아 파르넨실 피로인산이 만들어지지 못하게 하여 세포의 사멸을 유발한다. 질소를 포함한 비스포스포네이트의 경우 골의 미네랄인 하이드록시아파타이트 표면에 존재하는 수산기와 수소 결합이 가능하여, 질소가 없는 비스포스포네이트보다 더 강하게 결합할 수 있다고 알려져 있다 [40]. 그로 인해 질소가 포함된 종이 *in vitro* 와 *in vivo* 에서 보다 높은 효율을 가지고 있다고 알려져 있다 [41]. 질소가 포함된 비스포스포네이트에는 알렌드로네이트, 졸레드로네이트, 파미드로네이트, 이반드로네이트가 있다.

비스포스포네이트는 공통 구조인 P-C-P 코어 구조로 인해 뼈의 칼슘과 킬레이트화가 가능하여 뼈표적화능을 가지고 있다. 더욱이 정상 골조직보다는 파골세포로의 표적화능이 더 강해서 골다공증, 골종양 부위로 쉽게 축적이 될 수 있으며 뼈 표면에 접착하여 파골세포의 사멸을 일으키는 역할을 수행한다. 그런 이유로 비스포스포네이트는 단순한 골다공증 치료제뿐만 아니라 표적화 효과를 이용하여 파골세포나 골종양을 표적화하는 리간드로도 활용되고 있다 [42-43].

Chen 등은 골종양 표적화를 통해 siRNA 전달을 원활하게 하기 위해 비스포스포네이트의 한 종류인 알렌드로네이트를 사용하였다. 알렌드로네이트로 코팅한 리포솜은 하이드록시아파타이트에 대한 높은 친화도를 보였고, 다른 장기보다 뼈에 대해서 높은 표적화 효율을 나타내었다. 또한 기존의 유전자 전달체인 Lipofectamine 2000 보다 높은 세포 내 이입 효율로 인한 mRNA down regulation 을 보여, 뼈조직을 표적화 하는 나노파티클의 가능성을 보였다 [44]. Miller 등도 골종양 약물 전달을 위해서 알렌드로네이트를 고분자 공중합체에 합성하였고 내부에 약물을 담지하여 전달하였다. 이를 통해 골종양 치료뿐만 아니라 골전이 인자들도 감소시켜 골전이 전립선암이나 유방암에도 효과를 보이는 것을 확인하였다 [45]. Lee 등은 비스포스포네이트가 골종양뿐만 아니라 파골세포 억제효과를 보이는 것을 확인하였다. 알렌드로네이트를 금나노입자 표면에 합성하였고 골표면으로의 접착력과 파골세포 성장 억제효과를 확인하였다. 또한 알렌드로네이트를 코팅 시 높은 골밀도를 형성하는 것을 확인하였다. 이러한 연구를 통해서 비스포스포네이트는 높은 골친화성을 가지고 있으며 해당 부위에서 파골세포 사멸을 일으키는 것을 확인하였다 [46].

하지만 비스포스포네이트의 부작용과 해결 방안은 현재 연구 중에 있다. 비스포스포네이트는 장기간 경구 투여 시 턱뼈 괴사를 비롯하여 대퇴골 골절을 일으킬 수 있다 [47]. 또한 비스포스포네이트는 생체이용률이 1~3%로 매우 낮고 반감기도 30분-2시간에 불과하다 [48-49]. 이러한 문제를 해결하고자 비스포스포네이트는 고분자 복합화를 통해 생체이용률을 높이고 그로 인한 치료효과 또한 증진시키고 있다. Han등은 키토산 기반의 리포솜에 알렌드로네이트를 담지하여 경구 투여로 전달하였다. 일반적인 알렌드로네이트보다 생체 내에서 오랜 기간 머물렀으며 안정성 또한 높아져 알렌드로네이트의

방출량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 [50]. Migianu-Griffoni등은 아마이드 결합을 이용하여 다당류인 카복실메틸덱스트란과 알렌드로네이트를 접합시켰다. 이를 통해 알렌드로네이트의 낮은 생체이용률과 골종양의 표적화 효율을 증가시켰다 [51].

2.2.3 베타글루칸을 이용한 골다공증 치료

베타글루칸은 자연적으로 존재하는 다당류로서, D-포도당들이 베타글루코시드 결합으로 형성된다 [52]. 식물, 세균, 세포벽에 존재하며 다양한 물리화학적 구조와 기능을 가지고 있다. β-(1,3), β-(1,4), β-(1,6) 결합으로 대부분 연결된 베타글루칸 고분자는 항암 작용과 면역 작용 등 영향을 미치고 β-(1,3) 구조로 인해 골다공증 치료 효과를 보여주었다. 파골세포와 그 전구체에는 베타글루칸을 인식할 수 있는 여러 수용체들이 발현되는 것으로 보고되었고, 이러한 수용체에 대한 베타글루칸의 상호작용과 파골세포 내부의 신호 전달을 통해서 골다공증을 야기하는 파골세포의 분화와 성장을 억제할 수 있다 [53].

파골세포에서 베타글루칸이 인식할 수 있는 수용체들 중에는 대표적으로 Dectin-1 이라고 하는 C 형 렉틴 수용체, Mac-1 이라고 하는 보체수용체 3 (CR3)와 톨유사수용체 2 (Toll-like receptor 2, TLR2)가 존재한다. Dectin-1 은 단핵구와 대식세포, 호중구에 많이 발현되는 수용체로서 파골세포의 전구체에도 발현된다고 알려져 있다. 베타글루칸의 β-(1,3) 구조로 Dectin-1 이 활성화되면 Syk, c-fos, NF-κB 경로를 억제하여 NFATc1 경로를 막는다. NFATc1 경로는 파골세포 형성과 분화에 있어서 중요한 경로임으로 전구체에서 베타글루칸은 세포의 분화와 성장을 억제하는 역할을 수행한다 [54-55]. Mac-1 보체수용체는 비공유결합으로 이루어진 인테그린 αM (CD11b)와 인테그린-β2 (CD18)로 이루어져 있고, CD11b 가

베타글루칸과 결합 및 인식 하여 Syk 연쇄반응을 일으킨다. Syk 연쇄반응을 통해 NFATc1 의 활성이 감소하였고, 파골세포 전구체의 분화를 억제하는 효과를 가지고 있다 [56-57]. 마지막으로 톨유사수용체 2 (TLR2) 는 세포 표면에서 다양한 리간드를 직접 인식할 수 있는 표면 단백질로, 골수분화일차반응유전자 88 (Myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88)과 관련된 신호 전달을 활성화 시킨다. 일반 세포에서 베타글루칸은 TLR2 를 통해 인식될 경우 MyD88 신호전달과 MAPK, NF-κB 경로를 활성화시키며 항암 치료에 새로운 기능을 제시하였다. 파골세포 전구체에서는 NF-κB 경로를 통해 NFATc1 를 억제시키며 파골세포의 분화를 억제하는 효과를 보였다 [58-59]. 세 가지 수용체 모두 다양한 근원에서 온 베타글루칸을 사용하였고, 파골세포 전구체로 마우스 백혈성 단핵구 대식세포계통세포 (Mouse leukemic monocyte-macrophage cells, RAW264.7)을 사용하여 파골세포로 분화시키면서 실험을 진행하였다.

베타글루칸의 구조와 종류에 따라 수용체 상호작용을 통해 파골세포의 분화를 억제하는 효율을 보일 수 있다. 알칼리제니스 페칼리스 (*Alcaligenes faecalis*) 미생물에서 유래한 베타글루칸인 커들란 (curdlan)은 β-(1→3)로 연결되어있는 다당류이다. Zhu 등은 Dectin-1 수용체를 발현하는 RAW264.7 세포주를 통해 파골세포로 분화하는 과정에서 curdlan 을 처리하였다. 이때 Syk 신호의 억제효과를 볼 수 있었고 MafB 전사 인자와 인터류킨 33 (IL-33) 의 활성 저해를 통해서 NFATc1 경로가 억제되었음을 확인하였다 [60]. 또한 Aizawa 는 저분자량의 curdlan 을 이용해 TLR 수용체에 신호 전달을 저해하는 것을 확인하였다. 조골세포와 골수세포를 공생 배양 시킨 후 curdlan 처리 시 파골세포 생성이 TLR 신호 전달을 통해서 억제되었음을 확인하였다. Curdlan 처리 시 파골세포로의 분화를

촉진시키는 RANKL 의 생성이 감소하였고 파골세포 전구체에서도 성장을 억제하였다 [61]. 출아형효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)에서는 빵효모 (Baker's yeast)와 지모산 (zymosan)의 베타글루칸이 생성된다. 효모에서부터 생성된 두 베타글루칸은 β-(1→3)로 연결된 구조를 가지고 있다. Hara 등은 Baker's yeast 에서 나온 베타글루칸은 파골세포 전구체에서 Dectin-1 수용체를 통해서 파골세포 성장에 관련된 Syk, c-fos, NF-κB, Blimp1 신호를 억제하게 되어 NFATc1 활성을 막는 것을 확인하였다. 이를 통해 RANKL 로 인한 분화와 성장이 이루어지지 않고 RAW264.7 세포에서 베타글루칸을 처리할 경우 세포 사멸과 TRAP, NFATc1 등 분화 관련 인자들의 감소를 확인하였다 [62]. Takami 등은 Zymosan 파티클 또한 파골세포 분화를 억제함을 확인하였다. Zymosan 처리시 파골세포 전구체 역할을 하는 RAW264.7 세포에서 TLR 신호에 대한 자극과 파골세포 활성 억제를 확인하였다. 성숙한 파골세포에서도 TLR 수용체들이 존재하였고 다양한 리간드를 통해서 TLR 신호전달이 억제됨을 확인하였다 [63]. 이로써 베타글루칸을 이용한 파골세포 전구체와 성숙한 파골세포에 대한 치료효과를 기대할 수 있을 것이다.

β-(1→3) 구조를 가진 베타글루칸 이외에도 β-(1→4)와 β-(1→6) 를 함께 가지고 있는 베타글루칸의 파골세포 성장 억제 효과를 알아보았다. 보리에서 유래한 보리 베타글루칸 (Barley β-Glucan)은 β-(1→4)-Glucose 로 이루어진 고분자 사슬에 β-(1→3)-Glucan 이 약 30% 곁사슬로 존재한다. 담자균 (*Schizophyrum commune*)에서 나오는 베타글루칸인 시조필란 (Schizophyllan)은 β-(1→3)-Glucan을 주사슬로 3개의 포도당에 1개의 곁사슬로 β-(1→6)-Glucose가 존재하는 구조로 이루어져 있다. Ariyoshi 등에 의하면 β-(1→3)로만 이루어져있는 베타글루칸보다 다른 구조가 섞여있는

베타글루칸, 즉 시조필란과 보리베타글루칸 등은 낮은 파골세포 형성 억제 능력을 보였다. 이는 구조의 순도와 삼차원 공간에서의 겉사슬로 인한 물리적 결합이 강하지 않고, $\beta-(1\rightarrow3)$ 구조의 양이 다른 베타글루칸보다 낮기 때문이라고 설명하였다 [33]. 이처럼 베타글루칸은 $\beta-(1\rightarrow3)$ 구조와 파골세포 전구체에 존재하는 다양한 수용체와의 상호작용과 신호 전달 억제를 통해서 파골세포 분화를 억제시키고 사멸 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

2.3 고분자를 이용한 유전자 전달 시스템

2.3.1 고분자를 이용한 유전자 전달체의 특징과 메커니즘

유전자 치료를 위해서는 유전자의 안정성과 전달 효율을 위해 전달체가 필수적이다. 바이러스성 전달체는 유전자 전달 효율이 높지만 면역 반응의 위험성, DNA 용량의 한계, 유전자 재조합으로 인한 독성 문제들이 존재한다. 비바이러스성 전달체는 유전자 전달 효율이 다소 낮지만 안정성이 높아 다량의 유전 물질을 전달할 수 있고 합성이 용이하다는 점이 있다 [64]. 또한 다양한 전달체의 개발을 통해서 표적화 능력을 도입하는 등 새로운 기능들을 부여할 수 있다는 장점이 있다. 고분자 전달체는 생분해성, 생체 적합성, 개질의 용이성 등의 장점으로 인해서 비바이러스성 전달체 중에서도 많은 연구가 진행되고 있다 [65-66]. 유전자 전달체로 양이온성 고분자를 사용하면 정전기적 작용으로 인해 음전하를 띠고 있는 유전 물질과 상호작용이 가능하다. 이를 통해 유전자를 응축시키며 내부에 담지 시켜 안정성을 부여하게 되고, 세포 내 이입으로 인해서 흡수된다. 세포 내부에서 엔도좀으로부터 유전 물질을 방출시켜 세포 내 소화를 막고 유전 물질의 발현 효율을 증가시킬 수 있다. 현재까지 다양한 양이온성 고분자가 유전자 전달체로 연구가 되고 있으며, 구조와 분자량, 표면 전하 등 물리화학적 특성에 의해 효율이 달라지기도 한다. 대표적으로 합성고분자에서는 폴리 (L-리신) (Poly(L-lysine)), 폴리에틸렌이민 (Polyethylenimine), 폴리(아미도아민) 덴드리머 (Poly(amidoamine) dendrimer) 등이 있고, 천연고분자에서는 키토산 (chitosan), 덱스트란 (dextran), 구아닌화한 생분해성 중합체 (Guanidinylated bioreducible polymer) 등이 연구되고 있다 [67-68].

2.3.2 폴리에틸렌이민을 이용한 유전자 전달 시스템

폴리에틸렌이민 (Polyethylenimine, PEI)는 양이온성 고분자로 높은 전하 밀도와 높은 세포투과성을 가지고 있다. 1 차, 2 차, 3 차 아민기로 이루어져 있어 음이온성 유전 물질을 효과적으로 담지할 수 있고, 음전하를 띠는 세포막과의 상호작용을 통해서 효율적인 세포 내 이입이 가능하다. 또한, 양이온의 밀도가 높아 엔도좀에서 양이온 스펀지 효과 (proton sponge effect)를 통한 유전자 전달체의 탈출이 용이하다 [69-70]. 하지만 폴리에틸렌이민은 분자량에 따라서 효율과 독성의 차이가 생기게 되고, 양전하 밀도가 높은 고분자량의 폴리에틸렌이민은 세포 독성이 높다는 단점이 있다. 고분자량의 폴레에틸렌이민은 유전자 전달 효율이 높아지지만 세포 독성이 존재하고, 저분자량의 폴리에틸렌이민은 유전자 전달 효율이 낮지만 세포 독성을 보이지 않는다. 양이온의 밀도가 높아지게 되면 음전하를 띠는 혈장 단백질과 응집 현상으로 인해 체내 안정성이 감소하기 때문이다. 또한, 세포막과 과한 상호작용을 통해서 달라붙게 되고, 세포 스트레스를 유도하여 세포 사멸 (apoptosis)와 괴사 (necrosis)를 일으킬 수 있다 [71].

폴레이텔린이민25K (PEI_{25K})은 유전자 전달체에 있어서 'Golden Standard'로 알려져 있지만 그 독성으로 인해 다른 고분자들을 도입하면서 안정성을 높이는 방법들이 제시되었다. Son등은 Poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) 나노파티클 내부에 DNA를 담지하고 표면에 PEI_{25k} 를 접합시켜 유전자 전달 효율을 높이는 전달체를 개발하였다. PEI_{25k}의 긴 사슬 길이와 양이온 밀도로 인해서 DNA 안정성을 유지할 수 있었고, 높은 유전자 전달 효율을 보였다. 또한 HEK293세포에서 기존의 PEI_{25k} 보다 PLGA-PEI_{25k} 구조체는 독성을 보이지 않아 PEI_{25k} 자체의 독성을 줄일 수 있었다 [72]. Hu 등은

PEI_{25k}에 마노스 (mannose)를 접합시켜 수지상세포를 표적화하는 새로운 유전자 전달체를 개발하였다. 마노스의 수지상세포 표적화를 통해 기존의 PEI_{25k}보다 높은 유전자 전달 효율과 세포 내 이입 효율을 확인하였고, 복합화로 인해 PEI_{25k}의 독성이 감소하였다 [73]. 이로서, PEI_{25k}에 고분자를 복합화 함으로서 기존의 양이온 밀도와 세포막과의 작용을 낮추고 높은 유전자 전달 효율은 유지하며 새로운 모델에서의 안정성을 부여할 수 있다.

2.3.3 베타글루칸을 이용한 유전자 및 약물 전달 시스템

베타글루칸은 생체적합성과 생분해성, 면역 반응 조절과 약물, 유전자와의 상호작용으로 인하여 유전자 및 약물 전달체로 개발되고 있다. 베타글루칸은 사슬 구조에 의해 수용성을 가지며 약물과 유전물질과 함께 정전기적, 소수성 상호작용을 통해서 나노파티클을 만들며 내부에 물질을 담지할 수 있다 [74]. 또한 다양한 작용기들과의 결합으로 인해 물질의 전달 효율을 높일 수 있는 효과도 기대해볼 수 있다.

베타글루칸을 유전자 전달체로 사용하기 위해서 Han 등은 커들란에 라이신 (Lysine)과 클릭 화학 (Click-Chemistry)을 통해서 아민기를 도입하였다. 양이온성인 아민기의 도입으로 siRNA 와 정전기적 상호작용으로 나노파티클을 구성할 수 있었고, 이후 높은 유전자 전달 효율과 세포 내 이입 효율, 낮은 독성을 보여 베타글루칸이 유전자 전달체로서 주사슬로 사용될 수 있음을 확인하였다 [75]. Lee 등은 효모군에서 얻은 베타글루칸에 Doxorubicin 을 담지하여 키토산과 알지네이트와 함께 전달하였다. 베타글루칸을 이용한 전달체로 인해 면역 작용이 활성화 되었고, 약물 전달 효율과 함께 시너지 효과로 높은 항암 효과를 보이는 것을 확인하였다 [76]. Tukulula 등은 항결핵제인

리팜피신의 전달 효율을 증가시키기 위해서 β-(1→3) 글루칸과 PLGA를 개질화하여 나노파티클을 제조하였다. β-(1→3) 글루칸 나노파티클 사용 시 약물이 표적화능을 통해 원하는 부위로 빠르게 축적되었고, 그로 인해 약물의 효율 또한 증가하는 것을 확인하였다 [77].

보리에서 유래한 베타글루칸은 β-(1,3), β-(1,4) linkage 를 가지고 있어 β-(1,3)의 세포 상호작용과 β-(1,4)의 개질을 통해 효율적인 전달체를 개발할 수 있다. Lee 등은 보리 유래의 베타글루칸에 폴리에틸렌이민을 개질하여 새로운 전달체를 개발하였고, 베타글루칸의 대식세포 표적화 기능을 보였다. 암세포인 HeLa 보다 대식세포인 RAW264.7 세포에서 유전자 전달 효율이 증가하였고, 높은 세포 내 이입 효과를 확인하였다 [78]. 이를 통해 베타글루칸이 대식세포의 수용체와 상호작용하며 세포 표적화 기능으로 베타글루칸이 활용될 수 있음을 확인하였다. Zhang 등은 보리와 귀리에서 얻은 β-(1→3)-(1→4) 글루칸에 에틸렌다이이민으로 개질하여 아민기를 도입하였다 [79]. 이후 실험에서 개질된 베타글루칸이 siRNA 를 내부 코어 구조로 담지하여 전달함을 확인하였고, 대식세포로의 표적화 기능 또한 확인하였다 [80]. 해당 고분자를 siRNA therapy 에 활용하였는데, 항암 효과를 위해서 MIF siRNA 을 전달하였을 때 암세포에 대한 성장과 면역, 전이가 감소하였음을 확인할 수 있었다 [81]. 유전자 전달체와 비슷한 메커니즘으로 베타글루칸은 약물 전달체로도 활용될 수 있다.

제 3 장 재료 및 방법

3.1 재료

β-Glucan (Barley; Low Viscosity, ~95% purity) 는 Megazyme 에서 구입하였다. Sodium periodate, sodium borohydride 는 Junsei (Japan)에서 구입하였다. Alendronate sodium trihydrate 는 TCI (Japan)에서 구입하였다. Branched polyethylenimine (bPEI) (중량평균분자량 25000 Da), agarose, ethidium bromide, hydroxyapatite, sodium nitrate, sodium azide 는 Sigma-Aldrich (U.S.A)에서 구입하였고, Recombinant Murine sRANK Ligand 는 PeproTech (Korea) 에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), 0.25% trypsin-EDTA, Fetal Bovine Serum (FBS), penicillin/streptomycin, YOYO-1 Iodide 는 Invitrogen (U.S.A)에서 각각 구입하였다. Lucifersase assay system, reporter lysis buffer는 Promega (U.S.A)에서 구입하였고, α-Minimum Essential Medium (α-MEM)은 GE Healthcare Life Sciences (U.S.A)에서 구입하였다. BCA™ protein assay kit 는 PIERCETM (U.S.A) 에서 구입하였다. 중수소 (D_2O) 는 Cambridge Isotope laboratories (U.S.A)에서 구입한 것을 사용하였고, Dimethyl sulfoxide (DMSO), Tris base는 Merck (Germany)에서 구입하였다. TRACP & ALP double-stain kit, PrimeScript™ RT Reagent Kit, TG Green Premix Ex TaqTMII는 TaKaRa (Japan)에서 구입하였다. Nucleospin RNA extranction kit 와 Nucleospin DNA extraction kit 는 Macherey Nagel (Germany)에서 구입하였다. RANK siRNA (5'-GCGCAGACUUCACUCCAUAUU-3')와 Table 1의 primer들은 Bioneer (Korea) 에서 구입하였다.

3.2 실험 방법

3.2.1 βGAD (Barley β-glucan-Alendronate) 의 합성

βGAD의 합성을 위해 먼저 보리 베타글루칸을 산화시켰다. 베타글루칸을 2 mg/mL의 농도로 물에 녹이고 80°C 오일베드에서 3시간 녹여 수용액을 제조하였다. 이후 산화반응을 위해서 글루코오스 유닛의 2배 몰비의 과요오드산나트륨 ($NaIO_4$)를 7 mg/mL 수용액으로 녹여 추가로 넣어 반응시켰다. 반응은 18°C 조건에서 빛을 차단한 상태로 24시간 동안 진행되었다. 이후 셀룰로오스 투석막 (MWCO 6000-8000)을 이용하여 3일간 투석을 진행하였다. 0.45 μm 필터로 거른 후 동결건조를 하여 산화-베타글루칸 (OXβG)를 얻을 수 있다.

βGAD를 합성하기 위해서는 산화-베타글루칸 (OXβG)을 동결건조 시키지 않고 투석된 상태에서 사용한다. 수용액 상태의 OXβG에 질소나트륨 ($NaNO_3$)를 넣어 0.1 M $NaNO_3$에 녹아있는 OXβG로 분산시킨다. 알렌드로네이트 (AD)는 7 mg/mL에 농도로 0.1M 질소나트륨에 녹인다. 이후 베타글루칸의 글루코오스 유닛의 몰 수 대비 10, 20, 30배의 AD를 OXβG 용액에 넣고 반응시킨다. 반응은 18°C 조건에서 빛을 차단한 상태로 24시간 동안 진행되었다. 반응 후 형성된 Schiff-base와 알데히드기를 안정한 아민 결합으로 환원시키기 위해 수소화붕소나트륨 ($NaBH_4$)를 AD 의 2배 몰비율로 첨가하고 같은 조건에서 24시간동안 반응시켰다. 용액의 정제를 위해서 셀룰로오스 투석막 (MWCO 6000-8000)을 이용하여 3차 증류수에서 48시간 투석시킨 후, 0.1 M 질소나트륨과 5 mM의 아지드화나트륨 (NaN_3)에서 베타글루칸의 분산을 통한 잔여물을 24시간동안 투석하였고, 다시 3차 증류수에서 24시간 투석하였다. 동결건조를 통해서 최종적으로 세 가지 다른 비율의 βGAD를 얻었다.

3.2.2 βGAD 의 특성 분석

3.2.2.1 ^{1}H NMR을 이용한 구조분석

βGAD의 구조는 양성자 핵자기공명분광기 (^{1}H NMR)를 이용해 확인하였다. 용매는 D_2O 를 사용하였으며, 각 시료는 10 mg/mL의 농도로 550 μL씩 준비하였다. 600MHz AVANCE 600 (Brucker, Germany)을 이용하여 구조를 분석하였다.

3.2.2.2 FT-IR을 이용한 구조분석

βGAD의 구조를 추가적으로 분석하기 위해 푸리에변환-적외선 분광 분석기 (Fourier Transform Infrared Spectrometry, FTIR)를 이용하여 분석하였다. 기기는 ATR (Attenuated Total Reflectance) FTIR (Nicolet 6700, Thermo Scientific, USA) 를 이용하였다. 4000-650 cm^{-1}의 파장대에서 8cm^{-1}의 파장 간격으로 32번씩 반복하여 측정하였다.

3.2.2.2 GPC를 이용한 분자량 측정

Gel Permeation Chromatography (GPC, Thermo Dionex HPLC Ultimate3000 RI System, Thermo, U.S.A)를 이용하여 분자량을 측정하였다. 시료는 서울대학교 농생명과학공동기기원 (NICEM)의 크로마토그래피실에 의뢰하였다. 시료는 10 mg/mL 농도로 준비하였고 용매는 0.1 M sodium azide을 사용하였다. Pulluan 을 standard 로 사용하였고, Ultrahydrogel (Waters, U.S.A) 칼럼을 이용하여 유속 1 mL/min으로 측정하였다.

3.2.3 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스 및 βGAD/PEI_{25k} /siRNA 나노복합체의 특성 분석

3.2.3.1 폴리플렉스 및 나노복합체의 제조

PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스는 siRNA 의 무게비에 따라 PEI_{25k} 을 계산하였다. 증류수에 PEI_{25k} 를 먼저 넣어준 후 siRNA 를 넣어 섞어주었고 30 분간 안정화 시켰다.

나노복합체의 경우 폴리플렉스를 앞선 방법과 같이 만든 후, 증류수에 녹여 놓은 βGAD 를 siRNA 무게비에 맞춰서 넣었다. 이후 30 분간 안정화 시켰다.

3.2.3.2 아가로스 겔 전기영동을 이용한 복합체 형성

siRNA 와 복합체 형성 능력을 확인하기 위해 아가로스 겔 전기영동을 진행하였다. Ethidium bromide 을 사용하였고, 0.7% 아가로스 겔은 Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer 상에서 제조하였다. PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스는 Hepes buffer saline (pH 7.4) 상에서 PEI_{25k}/siRNA = 0.1, 0.25, 0.5, 1 : 1 w/w 로 제조하였다.

βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체의 경우에는 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스는 w/w 1 로 고정하여 준비하였다. βGAD/PEI_{25k}/siRNA = 0, 1, 2, 5, 10: 1 : 1 w/w 로 제조하였다.

전기영동은 Mupid-2plus® (OPTIMA, Japan) 전기영동장치를 이용하여 80V 에서 12 분간 진행하였다. 전기영동이 완료된 후 siRNA 밴드의 확인은 Gel Doc™ XRS+ gel documentation system (BIO-RAD, U.S.A)를 이용하여 이루어졌다.

3.2.3.3 DLS를 이용한 평균 입자 크기 및 표면 전하

폴리플렉스와 나노복합체의 평균 입자 크기와 표면 전하를 동적광산란계 (Dynamic Light Scattering, DLS)를 이용하여 측정하였다. 기계는 Zeta-sizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK)를 이용하였다. PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스는 siRNA 10 μL 를 이용하여 PEI_{25k}/siRNA = 0.1, 0.25, 0.5, 1:1 w/w 로 제조하였다. βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체는 βGAD/PEI_{25k}/siRNA = 0, 1, 5, 10, 20, 30 : 1 : 1 w/w 로 제조하였다. 용액은 증류수 상에서 만들었고, 각 시료는 측정 전 1 mL 로 희석하여 측정하였다.

3.2.3.4 DLS을 이용한 혈청단백질 안정성 확인

3.2.3.3 과 같은 방법으로 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스와 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체를 제조하였다. βGAD/PEI_{25k}/siRNA = 30 : 1 : 1 w/w 로 제조하였다. 제조한 폴리플렉스와 나노복합체를 20% 혈청 용액을 증류수에 넣어 최종 혈청 농도를 10%로 맞추었다. 0, 1, 2, 4 시간에 각각 평균 입자 크기를 측정하였다.

3.2.3.5 TEM 을 이용한 입자 형태 확인

에너지여과 투과전자현미경 (Energy-Filtering Transmission Electron Microscope, EF-TEM, LIBRA 120, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 폴리플렉스와 나노복합체의 입자 형태를 관찰하였다. 3.2.3.3 과 같은 방법으로 폴리플렉스와 나노복합체를 제조하였다. . βGAD/PEI_{25k}/siRNA = 30 : 1 : 1 w/w 로 제조하였다. 모든 용액은 증류수 상에서 만들었고, TEM 측정용 Carbon grid 에 1 분간 올린 뒤 uranyl acetate 로 염색하여 측정하였다.

3.2.4 βGAD/PEI$_{25k}$ /siRNA 나노복합체의 세포 실험

3.2.3.1 세포 배양

나노복합체의 세포실험을 하기 위해 인간 자궁경부암세포 (Human cervical adenocarcinoma cells, HeLa), 마우스 백혈성 단핵구 대식세포 계통세포 (Mouse leukemic monocyte−macrophage cells, RAW264.7)를 사용하였다. 세포 배양은 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin 이 포함된 배지에서 이루어졌다. HeLa 세포는 DMEM+GlutaMax^{TM}, RAW264.7 세포는 DMEM 을 각각 사용하였다. 배양의 전 과정에서 37°C, 이산화탄소 5%의 조건이 유지되었다.

3.2.4.2 MTT assay를 이용한 세포 대사 활성 확인

βGAD 와 βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA 의 세포 독성을 확인하기 위해 MTT assay 를 진행하였다. 대조군으로는 동일 농도의 PEI$_{25k}$를 사용하였고, RAW264.7 세포를 사용하였다. 먼저 세포를 96 well cell culture plate 에 1×10^4 cell/well 밀도로 100 μL 씩 분주하고 배양하였다. 24 시간 이후 βGAD 는 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL 의 농도로 serum 이 없는 조건에서 4 시간 동안 처리하였다. 이후 serum 이 들어있는 배지로 교체해주고 24 시간 동안 배양하였다. 나노복합체의 경우에 PEI$_{25k}$/siRNA 폴리플렉스를 siRNA (20 μM) 0.5 μL 기준으로 1 w/w 로 제조하였고, 이후 βGAD/siRNA = 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100: 1 w/w 로 나노복합체를 제조하였다. Serum 이 없는 조건에서 4 시간동안 처리하고 이후 serum 이 들어있는 배지로 교체해주고 24 시간 동안 배양하였다. 2 mg/mL 의 MTT 용액을 각 well 당 25 μL 씩 처리하고 추가로 2 시간 배양하였고, 배지를 모두 제거한 후 형성된 formazan 결정을 well 당 150 μL 의 DMSO 로 녹여주었다. 세포의 대사 활성은 570 nm 의 파장에서 microplate reader (Synergy H1,

BioTek, U.S.A)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 실험결과는 샘플을 처리하지 않은 세포에서의 흡광도에 대해 상대적인 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 (Cell viability, %)로 나타내었다.

3.2.4.3 Transfection 을 이용한 유전자 전달 효율

나노복합체의 유전자 전달 효율을 확인하기 위해 transfection assay 를 진행하였다. 대조군으로는 PEI_{25K}/pDNA = 1:1 w/w 를 사용하였고, RAW264.7 과 HeLa 세포를 사용하였다. 세포를 24 well cell culture plate 에 5×10^4 cell/well 의 밀도로 500 μL 씩 분주하여 24 시간 동안 배양하였다. 나노복합체를 만들기 위한 폴리플렉스에서는 β GAD/PEI_{25k}/pDNA = 10, 20, 30, 50 : 1 : 1 w/w 로 제조하였다. 제조한 샘플은 증류수에서 총 20 μL 로 희석하였다. 샘플 처리에 앞서 serum 이 없는 배지를 well 당 480 μL 씩 넣어주고, 샘플 20 μL 를 처리하였다. 4 시간 동안 배양하였고, serum 이 들어있는 배지로 교체해주었다. 48 시간 배양 후 배지를 제거하고 DPBS 로 2 회 세포를 세척하였다. Well 당 120 μL 씩 lysis buffer 를 넣어주고 30 분간 shaking incubator 로 plate 를 섞어주었다. 이후 냉동실에 2 시간동안 얼린 후 cell scraper 를 이용해 세포를 eppendorf tube 에 각각 담았다. 원심분리 (14000 RPM, 10 분, 4°C)하여 상등액을 취하였다. White 96 well plate 에 상등액 20 μL 씩 넣고 luciferase assay buffer 100 μL 를 분주하고 10 초간 발광도를 측정하였다. 발광도는 microplate reader (Synergy H1, BioTek, U.S.A)를 이용하여 측정하였다. 또한 세포 상등액의 단백질 양을 MicroBCA™ Protein Assay Kit (Thermo, U.S.A)를 이용하여 측정하였다. 96 well plate 에 3 차 증류수 130 μL, BCA 시약 150 μL, 상등액 20 μL 를 첨가하였다. 2 시간 동안 37°C 에서 안정화시킨 후 562 nm 파장에서 microplate reader 를 이용하여 흡광도를 측

정하였다. 실험 결과는 세포 내 단백질의 단위 mg 당 상대적 발광도 값 (RLU/mg protein)으로 표현하여 나타내었다.

Serum 이 존재하는 배지에서 Transfection 을 진행할 경우, 3.2.4.3 과 같은 방식으로 세포를 분주하고 폴리플렉스와 나노복합체를 만들었다. 샘플을 처리할 때 serum 이 있는 배지를 well 당 480 μL씩 넣어주고, 샘플 20 μL를 처리하였다. 4 시간 동안 배양하였고, serum 이 들어있는 배지로 교체해주었다. 48 시간 이후 3.2.4.3 과 같은 방식으로 cell lysis 를 한 이후 발광도와 단백질 양을 측정하여 세포 내 단백질 단위 mg 당 상대적 발광도 값 (RLU/mg protein)으로 표현하여 나타낸다.

3.2.5 βGAD/PEI$_{25k}$ /siRNA 나노복합체의 표적화 실험

3.2.5.1 Hydroxyapatite를 이용한 골 친화성 확인

골조직의 주성분인 하이드록시아파타이트 (Hydroxyapatite)를 이용하여 βGAD 의 골친화성을 확인하였다. 이 실험은 Jahnke 등의 연구를 참고하여 진행하였다 [82]. 하이드록시아파타이트 100 mg을 2 mL Tris buffer (0.1 M, pH 7.4)에 분산시키고 6 well plate 에 넣었다. 그리고 βGAD의 AD를 3 mg이 들어가도록 무게 비율을 계산한 이후 6 mL Tris buffer 에 녹였다. 그 중 3 mL 을 하이드록시아파타이트 용액에 넣어서 4 시간 동안 37°C, 120 RPM 으로 교반시켰다. 이후 원심분리기로 상등액을 취해 동결건조 시켰다. 남은 3 mL 의 βGAD는 2 mL Tris buffer 에 넣고 같은 조건에서 교반 후 동결건조 시켰다. 이후 ^{1}H NMR 을 이용하여 감소한 βGAD 의 양을 측정하였다. 이를 통해 하이드록시아파타이트와 결합한 βGAD의 양을 확인하였고, 골친화성을 예측하였다. 대조군으로는 AD 접합시키지 않은 β-glucan 를 이용하였다.

3.2.5.2 유세포 분석법을 이용한 나노복합체의 RAW264.7 세포 친화도 확인

유세포 분석법을 통해 βGAD/PEI$_{25k}$/pDNA 나노복합체의 파골세포 전구체인 RAW264.7 세포의 친화도를 평가하였다. RAW264.7 세포를 6 well cell culture plate 에 2.5 x 10^{5} cell/well 의 밀도로 2 mL 씩 분주하여 24 시간 동안 배양하였다. PEI$_{25K}$/pDNA 폴리플렉스를 만들기 전에 pDNA (pCN-Luci)를 YOYO-1 iodide 를 이용하여 50 개 염기쌍 당 1 개의 염료 분자가 들어가도록 처리하여 사용하였다. Well 당 βGAD/PEI$_{25k}$/pDNA = 30 : 1 : 1 w/w 로 제조하였다. 나노복합체 처리 전 serum이 없는 배지에 0.5 μg/mL, 1 μg/mL, 2 μg/mL 에 해당하는 농도의 베타글루칸을 800 μL 씩 30 분간 처리하였다. 이후, 배지를

완전히 제거하여 준 후 나노복합체 용액과 serum 이 없는 배지를 처리하였다. 나노복합체는 4 시간 동안 37°C 에서 처리하였다. 이후 세포를 DPBS 를 이용해서 2 회 세척하였고 trypsin 과 serum 이 있는 배지를 이용하여 세포를 떼어주었다. 떼어낸 세포를 원심분리(1500 RPM, 3 분, 4°C)를 통해 가라앉힌 후 DPBS 로 분산시켜 배지를 제거하고 다시 원심분리를 통해 상등액을 제거하였다. DPBS 300 μL 로 분산시키고 trypan blue (1 mg/mL) 30 μL 를 처리하였다. 이후 BD Accuri C6 flow cytometry (Becton Dickinson Biosciences, USA)를 통해 확인하였다. 결과는 BD Accuri C6 software 를 이용하여 세포 내 투과율을 분석하였다.

3.2.6 βGAD/ PEI_{25k} /siRNA 나노복합체의 생물학적 평가

3.2.6.1 파골세포 세포주 확립

RAW264.7 세포에 RANKL (Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand)을 처리하는 방식으로 파골세포로 만들었다 [83]. RAW264.7 세포를 6 well cell culture plate에 4×10^4 cell/well의 밀도로 분주하였다. 세포 배양은 2.5% FBS, 1% penicillin/streptomycin 이 들어간 α-MEM을 사용하였다. 24시간 이후부터 2일 간격으로 3번 RANKL 100 ng/mL을 1 mL의 α-MEM 배지에 넣어서 처리하였다. 이후 TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase) assay를 이용하여 파골세포의 형성을 확인하였다.

3.2.6.2 TRAP assay를 이용한 파골세포 활성 확인

TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase)는 파골세포에서 발현되는 특이적인 표지인자이다 [84]. TRAP assay는 TaKaRa의 TRACP & ALP double stain-kit를 이용하여 측정하였다. 광학 현미경 이미지로 확인하기 위해서 세포를 DPBS 로 세척한 후에 1 mL의 고정 용액을 처리하고 5분간 25°C에서 안정화시켰다. 고정 용액을 제거하고 증류수로 2번 세척한 이후 Tartrate-resistant enzyme을 포함한 sodium tartrate 용액을 1 mL 처리하였다. 45분간 37°C 조건에서 배양한 후 증류수로 세척하였다. 건조되는 것을 방지하기 위해 글리세롤을 첨가하고 마이크로필름카메라 (Olympus CKX41 Microscope, U.S.A) 를 이용하였고 CellSense 프로그램을 통해서 관찰하였다.

3.2.6.3 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)와 실시간 중합효소 연쇄반응 (Real Time PCR, qPCR)을 이용한 다양한 mRNA 정량

mRNA 정량이 필요한 실험들은 6 well cell culture plate 에서 진행되었다. DPBS 로 세포를 두 번 세척하고, cell scraper 를 이용하여 세포

를 떼어주었다. 그리고 RNA 는 Nucleospin® RNA extraction kit (Macherey-Nagel, Germany)를 이용하여 제조사의 프로토콜을 따라 추출하였다. 추출한 mRNA 의 전체량은 Take3 micro-volume plate (Synergy H1, BioTek, U.S.A)를 이용하여 측정하였다. mRNA 를 RT-PCR kit 인 PrimeScript RT reagent kit (TaKaRa, Japan)를 사용하여 cDNA 로 합성하였다. 이후 mRNA 의 정량 분석을 하기 위하여 만들어 놓은 cDNA 에 표적 프라이머와 SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa, Japan)를 넣었다. 프라이머는 Table 1 나와있는 sequence 를 사용하였다. 그리고 StepOne real-time PCR machine (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 측정하였다. 샘플은 95°C 에서 30 초 동안 denaturation 하고, PCR cycle 을 40 회 반복시켰다. Cycle 은 denaturation (95°C, 5 초), annealing (55°C, 30 초), polymerization (72°C, 30 초)를 한 세트로 하여 진행하였다. 결과는 하우스키핑 유전자인 GAPDH 로 정규화 하였고, $2^{-\triangle\triangle CT}$ 정량 방법을 이용하였다 [85].

3.2.6.4 MTT assay를 이용한 세포 대사 활성

βGAD, PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스, βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체를 7 일간 처리할 때의 세포 독성을 확인하기 위해 MTT assay 를 진행하였다. RAW264.7 세포를 α-MEM 을 사용하여 96 well cell culture plate 에 2×10^3 cell/well 의 밀도로 100 μL 씩 분주하여 24 시간동안 배양하였다. 샘플은 모두 2 일마다 처리하여 총 3 번 처리하였다. βGAD 의 경우 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL 의 농도로 처리하였고, PEI_{25k}/siRNA = 0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 : 1 w/w 로 처리하였다. βGAD/PEI_{25k}/siRNA = 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100: 1: 1 w/w 로 나노복합체를 제조하였다. 마지막 날에 2 mg/mL 의 MTT 용액을 well 당 25 μL 씩 처리하고 추가로 2 시간 배

양하였고, 배지를 모두 제거한 후 형성된 formazan 결정을 well 당 150 μL 의 DMSO 로 녹여주었다. 세포의 대사 활성은 570 nm 의 파장에서 microplate reader (Synergy H1, BioTek, U.S.A)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 실험결과는 샘플을 처리하지 않은 세포에서의 흡광도에 대해 상대적인 흡광도를 측정하여 세포 생존율 (Cell viability, %)로 나타내었다.

3.2.6.5 TRAP assay를 이용한 βGAD의 파골세포 사멸 유발 확인

βGAD의 파골세포 사멸 유발 능력을 확인하기 위해서 3.2.6.1의 파골세포 확립 과정 중에 RANKL 100 ng/mL과 βGAD 고분자를 2.5, 5, 10 μg/mL로 각각 처리하고 파골세포의 활성을 확인하였다. RAW264.7 세포를 6 well cell culture plate 에 4×10^4 cell/well의 밀도로 분주하였다. 24시간 이후부터 2일 간격으로 3번 RANKL 100 ng/mL와 βGAD 용액을 α-MEM 배지에 넣어서 처리하였다. βGAD의 최종 농도가 2.5, 5, 10 μg/mL이 되도록 제조하였다. 7일차에 3.2.6.2의 TRAP assay를 통해서 파골세포의 활성을 확인하여 βGAD의 파골세포 사멸 능력을 확인하였다.

3.2.6.6 qPCR을 이용한 βGAD와 AD의 파골세포 사멸 유발 확인

βGAD 로 인한 파골세포의 사멸 유발 능력을 확인하고자 사멸 표지인자인 FAS mRNA 의 양을 측정하였다. RAW264.7 세포를 6 well cell culture plate 에 4×10^4 cell/well 의 밀도로 분주하였다. 24 시간 이후부터 2 일 간격으로 3 번 RANKL 100 ng/mL 을 α-MEM 배지에 넣어서 처리하였다. 또한 βGAD 의 최종 농도가 2.5, 5, 10 μg/mL 이 되도록 제조하였고, AD 의 농도는 1, 5 μg/mL 이 되도록 α-MEM 배지에 넣어서 2 일 간격으로 3 번 RANKL 과 함께 처리하였다. 7 일차에

3.2.6.3 의 방법으로 GAPDH 와 FAS 의 mRNA 양을 측정하였다. 이때 아무것도 처리하지 않은 RAW264.7 의 mRNA 양으로 정규화 하였다. 이를 통해 βGAD 의 파골세포 사멸 유발 능력을 확인하고 일반적인 AD 와 사멸 유발 능력을 비교하였다.

3.2.6.7 TRAP assay를 이용한 βGAD/PEI_{25k} /siRNA 나노복합체의 파골세포 활성 억제 확인

βGAD/PEI_{25k}/siRNA 와 PEI_{25k}/siRNA 의 파골세포 활성 억제를 확인하기 위해서 3.2.6.1 의 파골세포 확립 과정 중에 RANKL 100 ng/mL 과 폴리플렉스 및 복합체를 처리하고 파골세포의 활성을 확인하였다. RAW264.7 세포를 6 well cell culture plate 에 4×10^4 cell/well 의 밀도로 분주하였다. 24 시간 이후부터 2 일 간격으로 2 번은 RANKL 100 ng/mL 을 α−MEM 배지를 처리하였고, 5 일째에 RANKL 100 ng/mL 과 폴리플렉스 및 나노복합체를 함께 넣어서 처리하였다. PEI_{25k}/siRNA 의 무게비는 1 로 고정시키고, siRNA 의 최종 농도가 5 nM, 10 nM, 20 nM 이 되도록 폴리플렉스를 제조하였다. 나노복합체의 경우, PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스에서 siRNA 농도가 10 nM 로 고정시키고 이후 βGAD/PEI_{25k}/siRNA = 3, 5, 10: 1: 1 w/w 이 되도록 제조하였다. 7 일차에 3.2.6.2 의 TRAP assay 를 통해서 파골세포의 활성을 확인하여 폴리플렉스와 나노복합체의 파골세포 활성 억제 능력을 확인하였다.

3.2.6.8 qPCR을 이용한 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체의 파골세포 활성 억제 확인

βGAD/PEI_{25k}/siRNA 와 PEI_{25k}/siRNA 복합체의 파골세포 활성 억제를 확인하기 위해서 RANK, NFATc1, Cathepsin K mRNA 양을 측정하였다. 3.2.6.1 의 파골세포 확립 과정과 3.2.6.7 의 복합체 처리 과정에

따라서 RANKL 100 ng/mL 은 2 일 간격으로 2 번 처리하였고, 5 일째에 siRNA 10 nM 을 기준으로 βGAD/PEI_{25k}/siRNA = 3: 1: 1 w/w 에서 제조하여 처리하였다. 7 일차에 3.2.6.3 의 방법으로 GAPDH, RANK, NFATc1, Cathepsin-K 의 mRNA 양을 측정하였다. 이때 아무것도 처리하지 않은 RAW264.7 의 mRNA 양으로 정규화 하였다. 이를 통해 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 복합체의 파골세포 활성 억제 능력을 확인하였다.

3.2.6.9 통계 검정

MTT, Transfection, PCR 실험들은 3배수로 진행하였고, 평균값과 표준편차로 나타내었다. One way ANOVA 의 Bonferroni test을 사용하여 분석을 진행하였고 다음과 같이 표시하였다($P<0.05$ *, $P<0.01$ **, $P<0.001$ ***).

Table 1. qPCR primer sequence for RAW264.7 cell

Gene	Primer Sequence (5'-3')	Reference
GAPDH	F-ACT TTG TCA AGC TCA TTT CC	[86]
	R-TGC AGC GAA CTT TAT TGA TG	
FAS	F- GGA GGC CCA TTT TGC TGT CAA CCA	[87]
	R-GTC CTT CTG GAC CAT GTC CTG	
RANK	F-AGA TGT GGT CTG CAG CTC TTC CAT	[88]
	R-ACA CAC TTC TTG CTG ACT GGA GGT	
NFATc1	F-TGC TCC TCC TCC TGC TGC TC	[89]
	R-CGT CCT CCA CCT CCA CGT CG	
Cathepsin-K	F-GCC AGG ATG AAA GTT GTA TG	[90]
	R-CAG GCG TTG TTC TTA TTC C	

제 4장 결과 및 고찰

4.1 βGAD 의 합성 및 특성 분석

4.1.1 βGAD의 합성

β-Glucan (βG)에 AD를 접합시키기 위해 먼저 βG을 산화 시켜 알데히드기를 도입하였다. βG에 과요오드나트륨을 첨가하여 βG의 단량체 중 β(1→4)로 연결되어 있는 글루코오스의 vicinal diol을 가지고 있는 2번과 3번 탄소를 끊어 알데히드기를 도입하였다. 이후 AD의 아민과 산화된 βG의 알데히드기가 schiff base formation으로 반응하여 이민 결합을 형성하였다. 불안정한 알데히드기와 이민 결합을 테트라히드로붕산나트륨을 이용하여 안정한 결합인 아민 결합으로 환원시켰다. 산화 베타글루칸 (OXβG)의 글루코오스 유닛당 AD 의 feed ratio 을 몰 비율 10, 20, 30배로 설정함으로서 합성을 진행하였다. 투석과 동결 건조를 통해 최종적으로 세가지의 베타글루칸-알렌드로네이트 (βGAD) 를 합성하였다 (Figure 2).

4.1.2 ^{1}H NMR을 이용한 구조분석

^{1}H NMR을 통해서 β-glucan, AD, βGAD 고분자의 구조를 분석하였고, 이를 통해 βGAD 의 합성을 확인하였다. βG 의 양성자는 4.6 ppm 과 3.4-4.1 ppm 에서 나타나고, 산화를 시켰을 때에 헤미아세탈 부분으로 인해 5.0-5.2 ppm 에서 추가적으로 나타난다. AD 의 피크는 2.0 과 3.0 ppm 에서 나오는 것을 확인 할 수 있다. βGAD 의 피크 중 3.2-4.7, 5.0-5.2 ppm 에서 나오는 피크들을 OXβG 의 양성자로 하고, 2.0 ppm 의 피크를 AD의 양성자로 하여 결합한 비율을 확인하였다. 반응에 넣어준 AD 의 양에 따라 βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X 라고 명

명하였고, 글루코오스 유닛 당 AD 의 접합 비율이 7.47%, 14.01%, 33.81%인 것을 확인하였다 (Figure 3). βGAD10X 에서 AD 의 무게 비율은 11.9%, βGAD20X 에서 AD 무게 비율은 21.4%, βGAD30X 에서 AD 무게 비율은 46.1%로 계산되었다.

4.1.3 FT-IR을 이용한 βG, OXβG, AD, βGAD의 구조분석

FT-IR 을 이용하여 β-glucan, OXβG, AD, βGAD 의 구조 분석을 진행하였다. β-glucan 스펙트럼에서는 히드록실기의 O-H 피크가 3000-3400 cm^{-1}에서 나타났고, C-H 피크는 2800-3000 cm^{-1}에서, 그리고 C-O 피크가 1085-1050 cm^{-1} 에서 나타났다. 또한 terminal group 의 헤미아세탈이 800-900 cm^{-1}에서 나타나고 1600 cm^{-1}에서 단백질의 아마이드 피크가 나타났다.

OXβG 는 베타글루칸의 O-H, C-H, C-O 피크들을 가지고 있지만, 산화를 통해 알데히드기의 C=O stretching 인 1730-1750 cm^{-1}에 새로운 peak 이 생겨났고, 헤미아세탈 피크가 더욱 증가하였다. AD 에서는 900-1300 cm^{-1} 의 O-P=O 피크가 있지만 베타글루칸의 피크와 겹치게 된다.

βGAD 는 AD 접합 비율이 증가할수록 amination 을 통해서 β-glucan 과 OXβG 에서 많이 나타났던 O-H 와 C-H, C-O, 헤미아세탈의 피크들이 점차 감소하는 것을 관찰 할 수 있다. 또한 1350-1250 cm^{-1}의 C-N 피크와 1650-1580 cm^{-1}와 700-800 cm^{-1}에서는 아민기의 N-H 피크가 점차 증가하며 생성되었다. 이를 통해서 아민 결합이 새롭게 도입되었고, AD 가 접합되었음을 간접적으로 알 수 있다 (Figure 4).

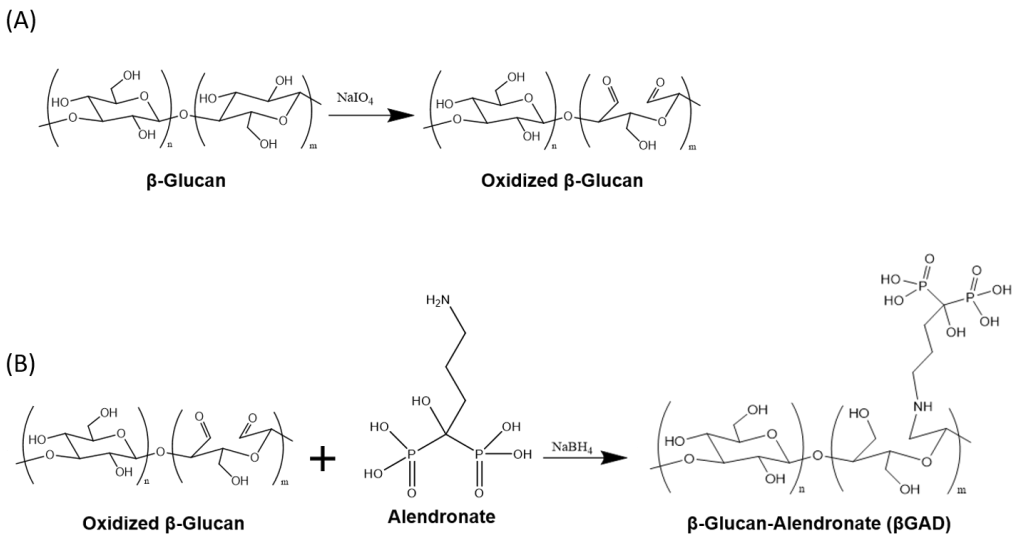


Figure 2. Synthesis scheme of (A) Oxidized β-Glucan (OXβG), (B) β-Glucan-Alendronate (βGAD).

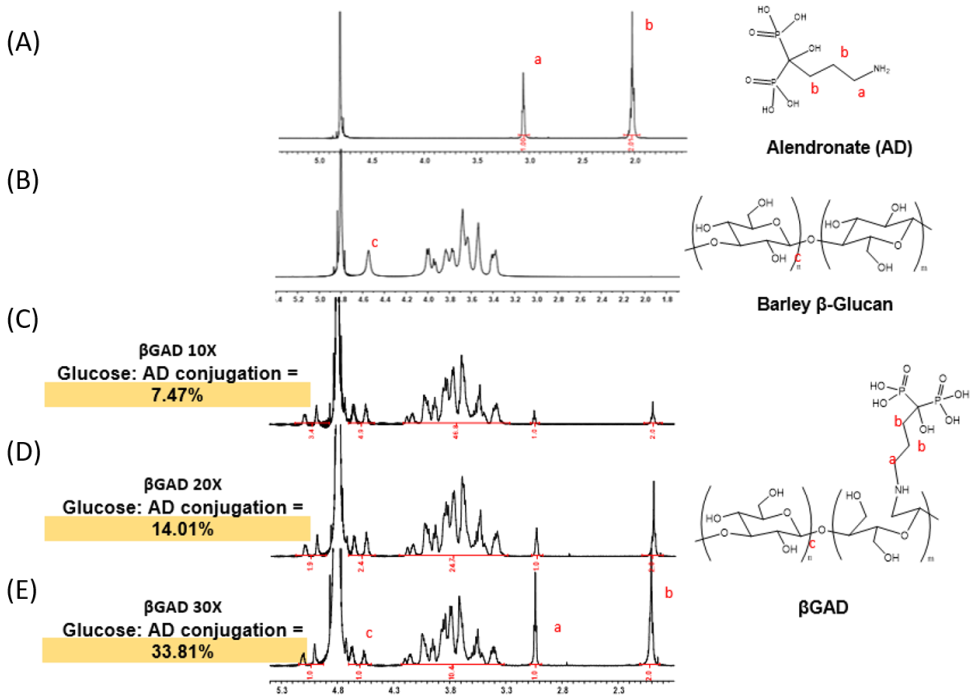


Figure 3. ^{1}H NMR spectra of (A) Alendronate, (B) Barley β-Glucan, (C) βGAD10X, (D) βGAD20X, (E) βGAD30X.

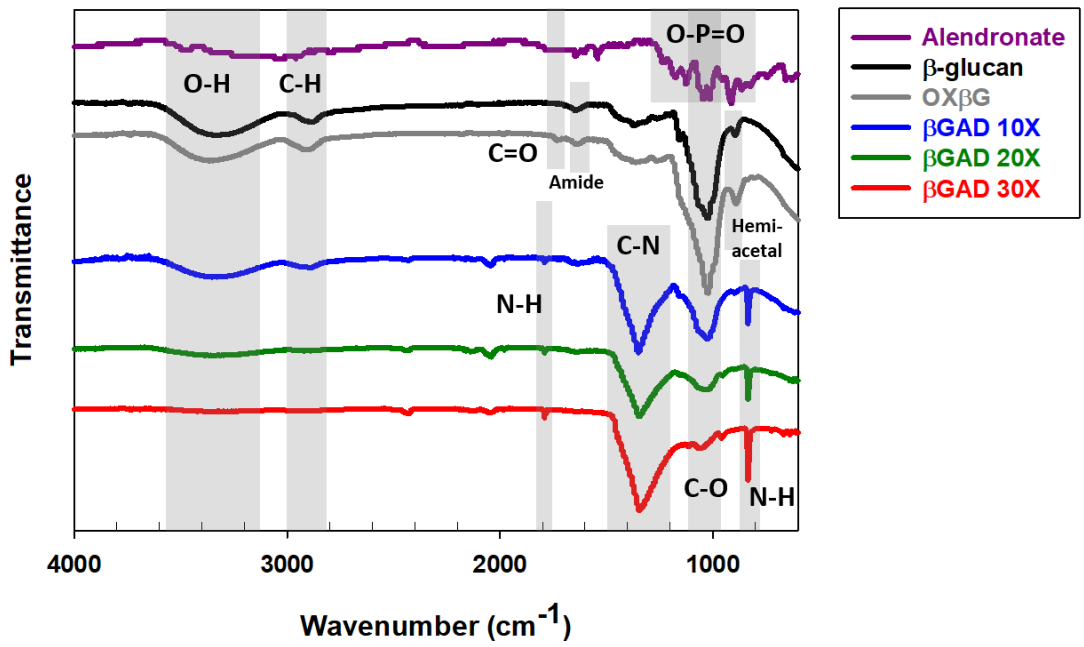


Figure 4. FT-IR spectra of Alendronate, β-glucan, OXβG, βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X.

4.1.4 GPC을 이용한 βG와 βGAD의 구조분석

GPC 를 이용하여 βGAD 의 정제를 확인하고 분자량을 측정하였다. Pullulan 을 표준 물질로 활용하였고, 용매는 0.1 M sodium azide 를 사용하였다. βGAD 의 크로마토그램과 분자량 및 PDI 값을 Figure 5 와 Table 2 에 나타내었다. GPC 는 상대적인 분자량을 측정할 수 있는 기기이고, 고분자의 분자량뿐만 아니라 칼럼과의 내부적 상호작용이나 친수성, 삼차원 구조 등 다양한 요소에 의해서 영향을 미칠 수 있기 때문에 정확한 분자량을 알기 힘들다 [91]. 하지만 각 βGAD 간 분자량의 비교와 순도 확인의 목적으로 GPC 측정을 진행하였다. β-glucan 고분자와 βGAD 고분자가 모두 하나의 피크로 나타나는 것을 통해 합성과 투석이 잘 이루어졌다는 것을 알 수 있었다.

β-glucan 은 중량평균 분자량이 288.7 kDa, PDI 값은 2.39 로 측정되었다. βGAD10X 는 중량평균분자량 54.3 kDa, PDI 값은 2.55 로 측정되었고, βGAD20X 는 중량평균분자량 58.5 kDa, PDI 값은 2.31 로 측정되었다. βGAD30X 는 중량평균분자량 52.3 kDa, PDI 값은 2.15 로 측정되었다. βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X 는 분자량에서 큰 차이를 보이지 않았으며, β-glucan 에서 산화되었기 때문에 분자량이 감소하였음을 알 수 있었다.

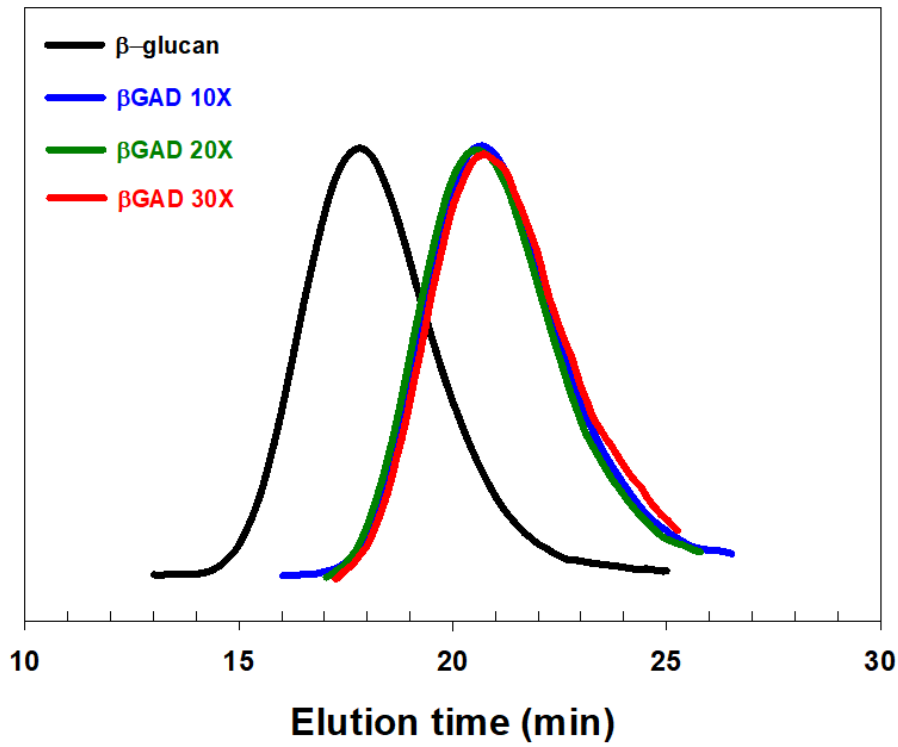


Figure 5. GPC chromatogram of β-glucan, βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X.

Table 2. Molecular weight (Da) of β-glucan, βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X measured by GPC (Pulluan standard)

	Mn (Da)	Mw (Da)	PDI	RT (min)
β-glucan	121.0×10^3	288.7×10^3	2.39	17.82
βGAD 10X	21.3×10^3	54.3×10^3	2.55	20.63
βGAD 20X	25.3×10^3	58.5×10^3	2.31	20.50
βGAD 30X	24.4×10^3	52.3×10^3	2.15	20.69

4.2 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스 및 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체의 특성 분석

4.2.1 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스 형성 확인

PEI_{25k} 와 siRNA 가 폴리플렉스를 형성하는지 확인하기 위해 아가로스 겔 전기영동을 진행하였다. siRNA 는 음전하를 띠기 때문에 양이온성 고분자인 PEI_{25k} 와 정전기적 상호작용을 통해서 안정적인 복합체를 만들 수 있다 (Figure 6A). 전기영동을 통해 낮은 무게비에서도 안정적으로 복합체를 형성하는지 분석하였다.

결과적으로 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스는 siRNA 무게 대비 0.1 이상에서 밴드를 나타내지 않아, 매우 낮은 무게비에서도 유리된 siRNA 없이 안정함을 확인하였다 (Figure 6B). 또한 이후 실험에서도 무게비 1 을 사용하므로 폴리플렉스 형성 및 유전자 전달에 문제가 없을 것이라고 예상할 수 있었다.

4.2.1 PEI_{25k}/siRNA의 평균 입자 크기 및 표면 전하 측정

유전자 전달체는 입자 크기와 표면 전하에 따라서 유전자 전달 효율에 큰 영향을 미친다. 전달체의 입자가 너무 작거나 큰 경우 제거되기 때문에 평균적으로 100−200 nm 의 크기를 가지는 입자가 세포 내 이입(endocytosis)을 통해 세포 투과가 일어난다고 알려져 있다 [92]. 또한 표면 전하의 경우 세포 표면에 존재하는 막 단백질과 정전기적 인력으로 인해 전달이 용이하기 때문에 일반적으로 양전하를 나타내는 것이 전달에 유리하다. 다만 양이온성이 강해지면 세포 독성이 나타나며 혈청 단백질과 상호작용 하여 유전자 전달 효율을 떨어뜨릴 수 있다. 최종적으로 100−200 nm 의 입자와 양전하가 높지만 독성을 나타내지 않을 무게비를 찾고자 하였다.

PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스 입자 크기와 표면 전하를 측정하기 위해 Zeta-sizer 를 사용하였다. PEI_{25k}/siRNA= 0.1, 0.25, 0.5, 1: 1 w/w 로 하여 각각 측정하였다. 낮은 무게비에서는 입자 크기의 변화가 80 nm 에서부터 200 nm 까지 크게 나타나는데, 음이온성인 siRNA 와 상호작용은 하였지만 완전한 입자의 형태는 갖추지 못했기 때문이다. 무게비 0.5 이상에서 복합체의 크기가 감소하고 있는 것을 관찰할 수 있었고, 무게비 1 에서 150 nm 의 크기를 가지는 것을 통해서 유전자 전달체로서 적합한 크기임을 알 수 있었다 (Figure 7A). 표면 전하를 측정한 결과, 0.1 의 낮은 무게비에서는 표면 전하가 음전하를 따는 것을 확인할 수 있었고, 무게비 0.25 부터는 양전하를 띠게 된다. 무게비 0.5 이상에서 saturation 을 통해 약 50 mV 로 유지되었다(Figure 7B). 무게비 1 에서 PEI_{25k}/siRNA 입자가 150 nm 의 크기와 50 mV 의 전하를 가지고 있는 것으로 매우 안정적인 입자가 만들었고, 유전자 전달체로서 좋은 효과를 기대할 수 있는 수치이므로, 이후 실험에 있어서 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스는 무게비 1 로 고정하였다.

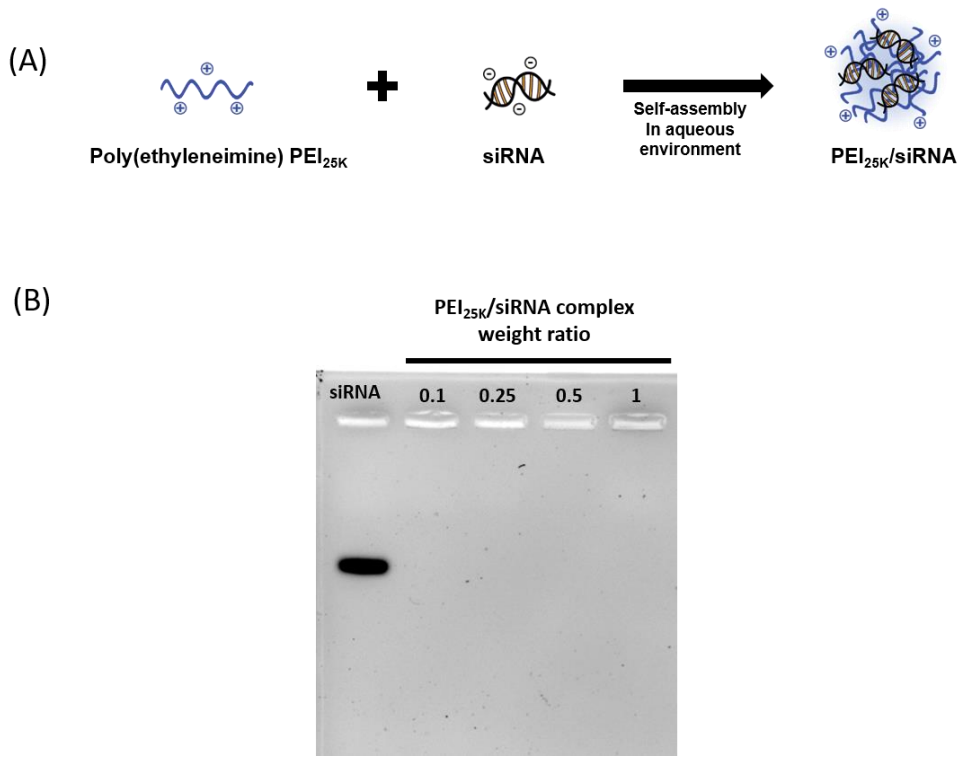


Figure 6. (A) Scheme of polyplex formation of PEI_{25k} and siRNA

(B) Agarose gel electrophoresis of PEI_{25k}/siRNA.

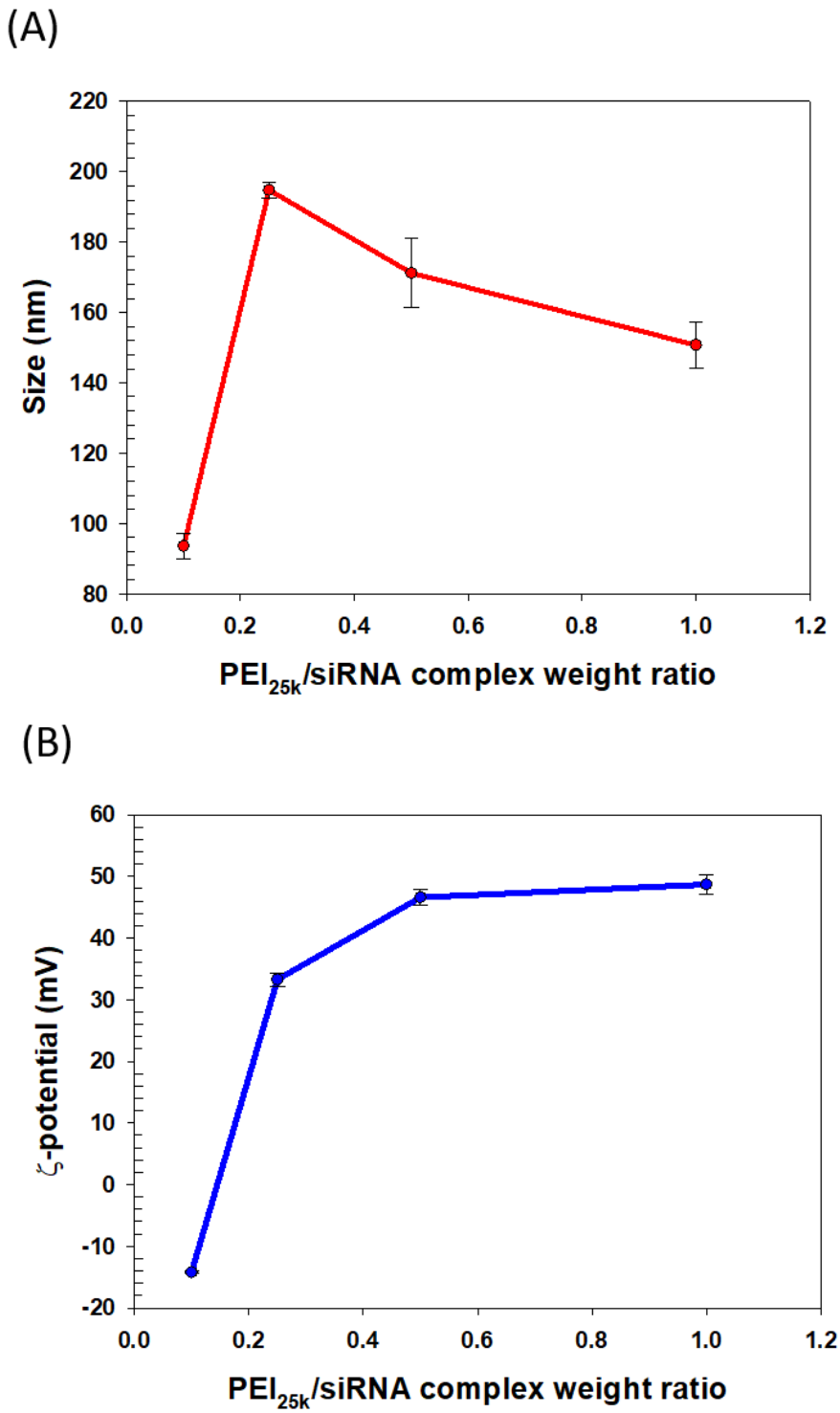


Figure 7. (A) Average size and (B) Zeta-potential values of PEI_{25k}/siRNA.

4.2.3 βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA 나노복합체 형성 확인

PEI$_{25k}$/siRNA 는 강한 양전하를 띠므로, βGAD 코팅 시 물리적 작용과 정전기적 상호작용을 통해서 안정적인 복합체를 형성할 수 있다(Figure 8A). βGAD 코팅 시에도 PEI$_{25k}$/siRNA 가 안정적인 입자를 형성하여 나노복합체가 만들어지는지 확인하기 위해 아가로스 겔 전기영동을 진행하였다. βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA = 0, 1, 2, 5, 10 : 1 : 1 w/w 로 제조하여 측정하였다.

Figure 8B 에서 βGAD 코팅을 시켜도 밴드가 나타내지 않았고 siRNA 가 유리된 부분 없이 복합체를 형성한다는 것을 알 수 있었다. PEI$_{25k}$/siRNA 가 무게비 1 로 폴리플렉스를 만들 때에 βGAD 로 코팅을 하지 않더라도 하나의 입자 형태가 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 0.7% 아가로스 겔은 1% 겔보다 큰 pore 크기를 가지고 있다는 것을 알 수 있고, 1% 겔에서는 180 nm−280 nm 의 pore 크기를 갖는다 [93]. 나노복합체가 pore size 보다 작아 사이즈에 의해 겔에서 내려오지 않는다는 것이 아니고 양전하를 갖기 때문이라는 것을 알 수 있었다.

4.2.4 βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA의 평균 입자 크기 및 표면 전하 측정

βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA 나노복합체의 평균적인 입자 크기와 표면 전하를 Zeta−sizer 를 이용하여 측정하였다. βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA = 0, 1, 5, 10, 20, 30 : 1 : 1 w/w 로 제조하여 측정하였다.

결과적으로 βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA 나노복합체는 PEI$_{25k}$/siRNA 보다 βGAD 의 무게비가 증가할수록 입자 크기와 표면 전하가 감소하는 것을 관찰할 수 있다. βGAD 의 무게비가 증가하여 많이 코팅 될수록 더욱 조밀한 입자가 만들어지게 되고 사이즈는 무게비 30 에서 약 130 nm 의 값을 보였다 (Figure 9A). 표면 전하를 측정한 결과, βGAD 을

코팅하였을 때 그 무게비가 증가함에 따라 표면 전하가 감소하여 무게비 30 에서 25 mV 의 값을 가지는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 9B). 이를 통하여 βGAD 는 양이온성인 PEI_{25k} 표면에서 작용한다는 것을 알 수 있었으며 βGAD 의 AD 의 인산염기로 인해 더욱 전하가 감소된 것이라 예상할 수 있었다. 입자 크기와 표면 전하는 βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X 에서 큰 차이를 보이지 않았으며 모두 전달체로서 적합한 값을 가졌고, 세포 내 이입을 통해 세포 투과가 잘 일어날 것이라고 예상할 수 있었다.

또한 βGAD 고분자가 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스를 코팅 시키고 포화가 되는 경우 표면 전하의 감소를 통해서 간접적으로 알 수 있었다. βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체의 표면 전하가 감소하는 것은 폴리플렉스 표면에 βGAD 고분자가 달라붙어 작용을 하기 때문이고, 만일 폴리플렉스 표면 면적의 한계로 인해서 βGAD가 작용하지 못한다면 표면 전하의 saturation 이 일어날 것이라 예상할 수 있다. Figure 9B에 따르면 βGAD20X와 βGAD30X는 무게비 30에서 saturation 이 진행되고 있음을 알 수 있었고, 이를 통해 βGAD10X는 무게비 30 이상에서 포화 상태에 가까워진다는 것을 예상할 수 있었다. 하지만 나노복합체에서 고분자들이 포화 상태로 존재해도 세포 활성에 주는 영향이 한정적이고, *in vivo* 상에서는 dilution 되어 농도가 매우 낮아지기 때문에 큰 영향이 없을 것이라고 예상하였다.

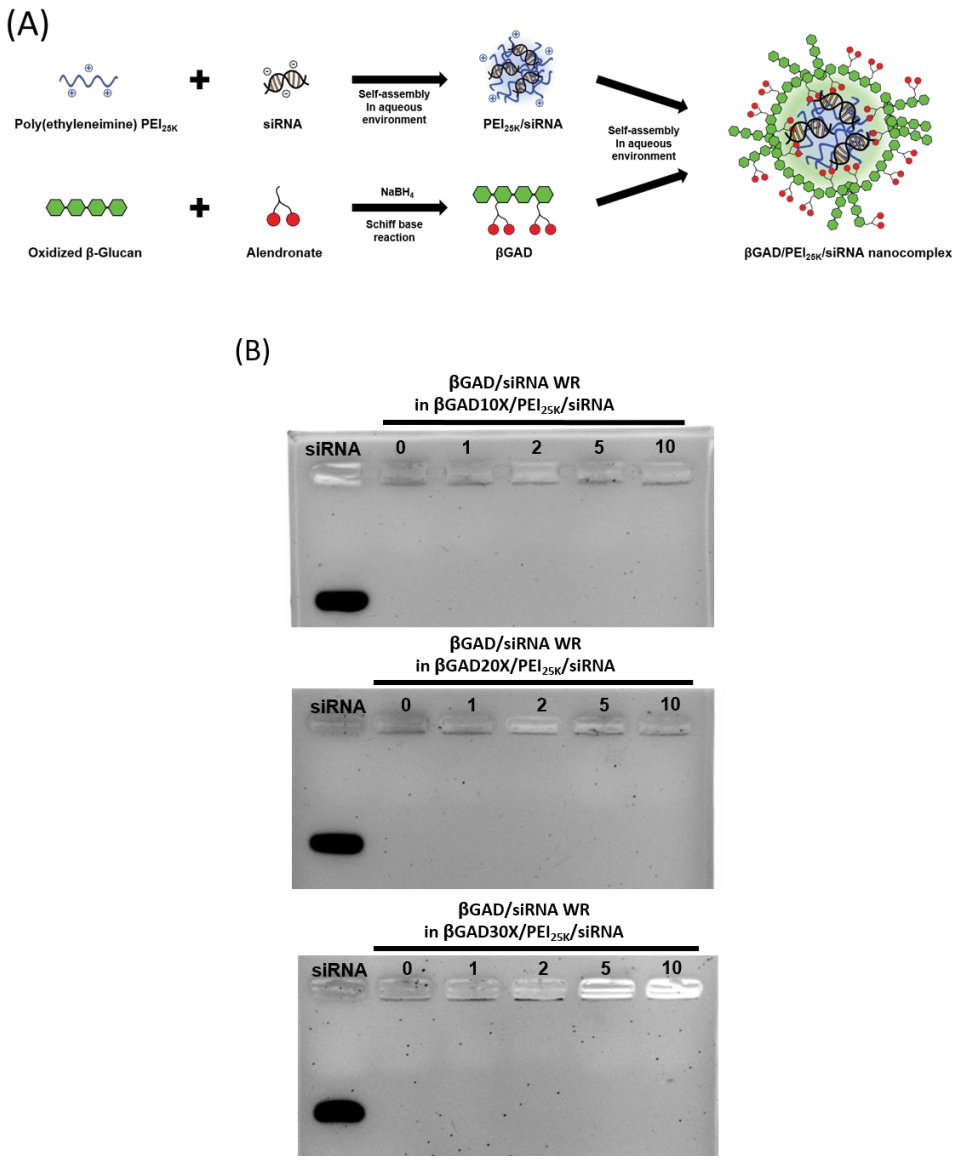


Figure 8. (A) Scheme of nanocomplex formation of βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA (B) Agarose gel electrophoresis of βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA (PEI$_{25k}$/siRNA = 1:1 w/w).

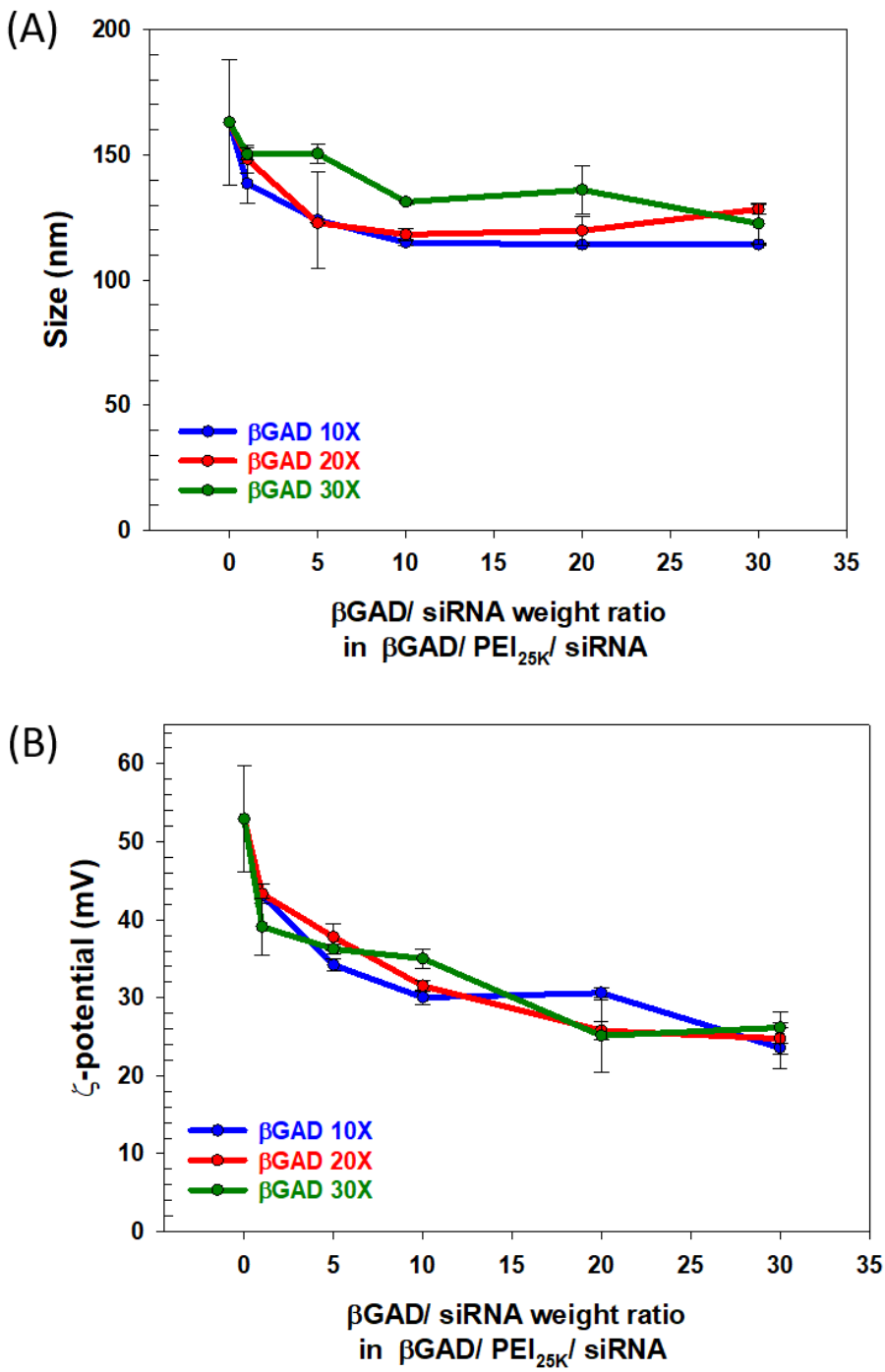


Figure 9. (A) Average size and (B) Zeta-potential values of βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA (PEI$_{25k}$/siRNA = 1:1 w/w).

4.2.5 폴리플렉스, 나노복합체의 혈청단백질 안정성 평가

βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체를 형성하여 유전자를 전달할 경우, 상대적으로 PEI_{25k}/siRNA 보다 낮은 전하로 인해 혈액 내에 존재하는 혈청 단백질로부터 유전자를 안정적으로 보호할 수 있다고 예상하였다. βGAD/PEI_{25k}/siRNA = 30: 1: 1 w/w 로 제조하였다. 복합체를 10% 혈청 단백질 수용액과 증류수에 넣어서 입자 크기를 측정, 비교하였다.

증류수에서 PEI_{25k}/siRNA 과 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 의 크기를 4 시간 동안 측정한 결과, PEI_{25k}/siRNA 는 231 nm 에서 200 nm 로 약 30 nm 감소하여 14%의 크기 감소율을 보였지만 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 의 경우 최대 12 nm 이내의 입자 크기 변화를 나타내어 1.5%에서 7.1%까지 크기가 감소하였다 (Figure 10A). 10% 혈청단백질에 PEI_{25k}/siRNA 과 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 를 넣어 크기를 측정했을 때, 0 시간에서도 증류수에서의 사이즈보다 큰 사이즈를 보였다 (Figure 10B). 이는 PEI_{25k}/siRNA 과 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 입자가 50 mV, 25 mV 의 양이온성을 띠고 있기 때문에 음이온성인 혈청단백질과의 상호작용으로 인한 것으로 보인다. 그렇지만 PEI_{25k}/siRNA 의 경우 4 시간 이후 386 nm 에서 543 nm 로 크기가 약 41% 증가하였다. βGAD/PEI_{25k}/siRNA 의 경우 입자 크기가 10 nm−40 nm 내외로 증가하여 2.8%−10%의 증가율을 나타내었다.

βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체는 혈청 단백질에 노출되었을 때 크기가 증가하지만 PEI_{25k}/siRNA 에 비해 혈청단백질의 공격을 덜 받는 안정한 입자임을 확인할 수 있었다. 혈액이나 혈청이 존재하는 상태에서 βGAD 로 코팅되어 있는 입자가 더 높은 안정성을 가지므로, 더 높은 유전자 전달 효과를 가질 것으로 예상할 수 있었다.

4.2.6 폴리플렉스, 나노복합체의 입자 형태 확인

TEM을 통해서 폴리플렉스와 나노복합체의 입자 형태를 관찰하였다. βGAD/PEI_{25k}/siRNA = 30: 1: 1 w/w로 제조하였다. 입자의 모양은 구형을 나타내었으며, 크기는 대부분 100 nm – 200 nm로 측정되었다 (Figure 11). DLS에서 얻은 130 nm−150 nm의 입자를 이루고 있다는 것으로 유사한 양상을 보이는 것으로 드러났고, DLS 보다 작게 나오는 것은 건조된 상태에서 관찰했기 때문이다.

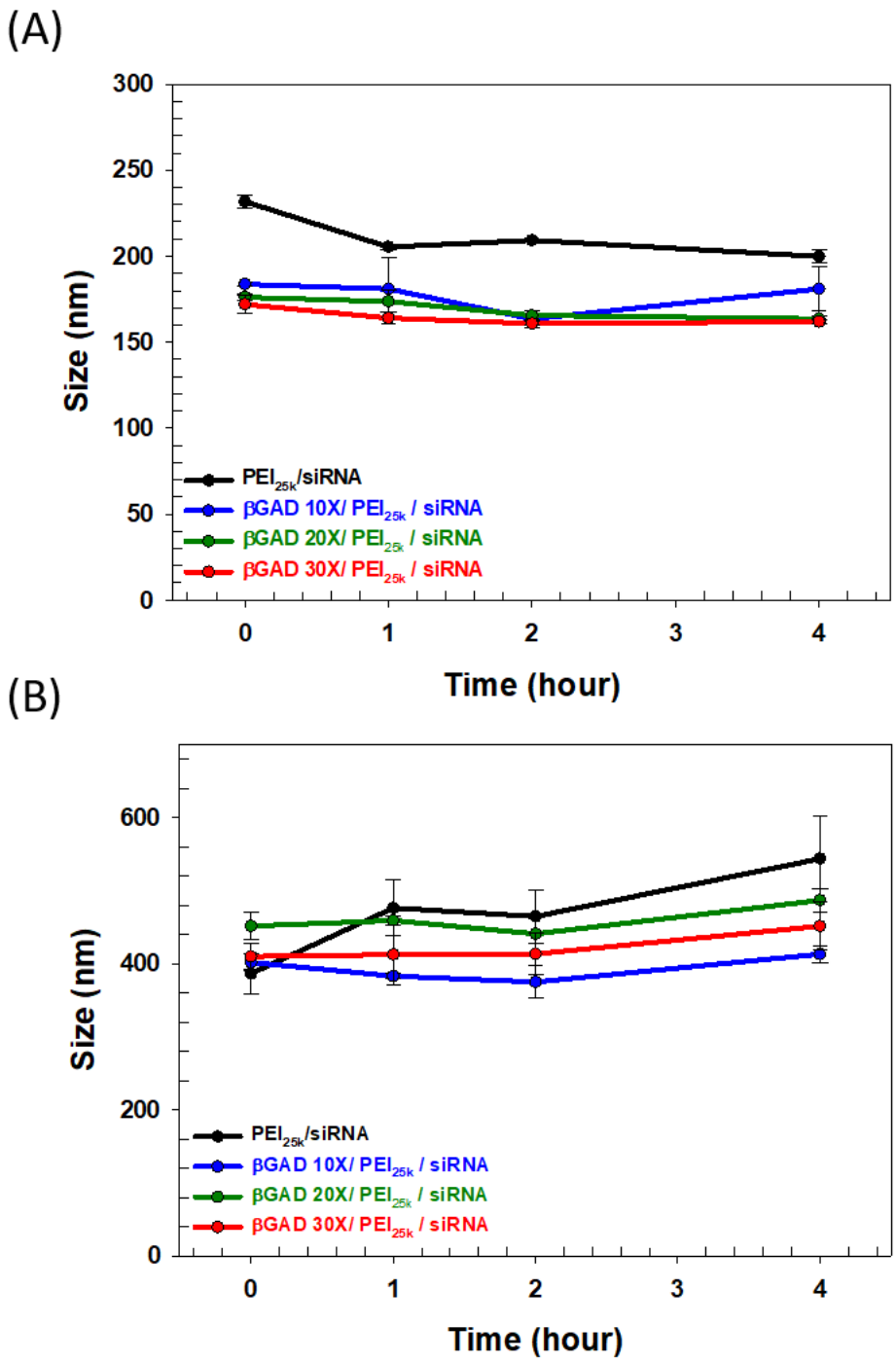


Figure 10. Size stability analysis in (A) dH_2O (B) 10% serum for 4h (βGAD/PEI_{25k}/siRNA = 30: 1: 1 w/w).

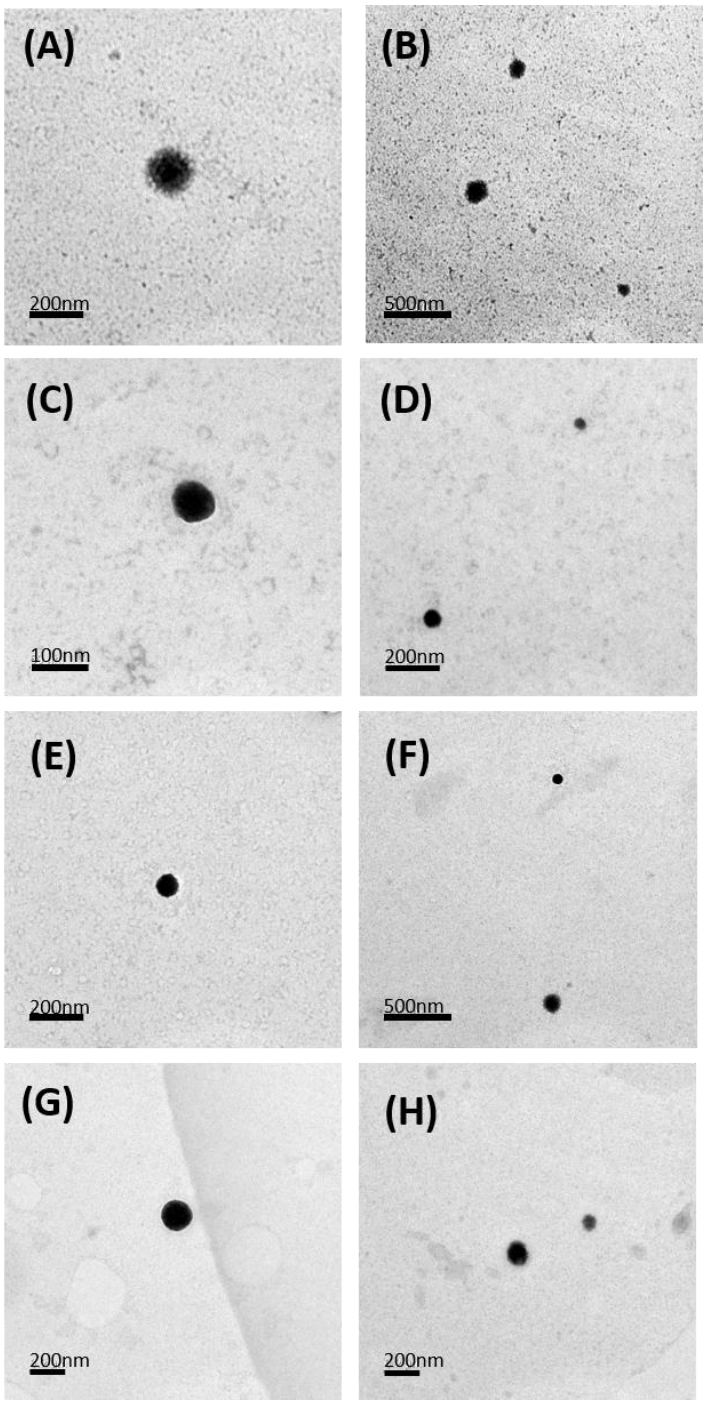


Figure 11. EF-TEM images of (A, B) PEI_{25k}/siRNA (C, D) β GAD10X/PEI_{25k}/siRNA (E. F) β GAD20X/PEI_{25k}/siRNA (G, H) β GAD30X/PEI_{25k}/siRNA (β GAD/PEI_{25k}/siRNA = 30: 1: 1 w/w).

4.3 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체의 세포 실험

4.3.1 MTT assay를 이용한 세포 대사 활성 확인

βGAD 고분자와 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 복합체의 세포 독성을 평가하기 위해 세포에 처리하고 MTT 시약을 이용해 세포 활성을 측정하였다. 세포 독성 평가는 대식세포인 RAW264.7 세포를 사용하였고, 대조군으로는 PEI_{25k}을 사용하였다. 무처리군인 세포의 활성을 100%로 하여 세포 활성도 (Cell viability, %)를 계산하였다. βGAD 고분자와 PEI_{25k} 는 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL의 농도로 준비하여 처리하였다. PEI_{25k} 는 농도가 증가함에 따라 급격하게 세포 활성도가 감소함을 확인할 수 있는데, 그에 비해 βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X 는 100 μg/mL의 높은 농도에서도 독성을 보이지 않았다 (Figure 12A). βGAD/PEI_{25k}/siRNA = 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100: 1: 1 w/w로 제조하였고, 높은 무게비에도 독성을 보이지 않았다 (Figure 12B).

4.3.2 Transfection 을 이용한 세포 내 유전자 전달 효율 확인

나노복합체가 유전자 전달체로 사용되기 위해서는 유전자 전달 및 발현이 실질적으로 일어나야 한다. 이를 확인하기 위해 유전자 전달 효율 평가를 진행하였다. siRNA 대신 pCN-Luci 유전자 (pDNA)를 사용하였고, 이 유전자에 의하여 luciferase 단백질이 발현된다.

βGAD/PEI_{25k}/pDNA 복합체를 처리한 후, luciferase 가 발현되면 luciferin 과 반응시켜 발광 정도를 확인하였다. 이 값을 세포의 단백질량으로 보정하여 같은 양의 세포 내의 유전자 발현 정도를 나타내었다. 암세포주인 HeLa 와 대식세포주인 RAW264.7 을 사용하였고, 혈청이 없는

조건에서 먼저 실험하였다. 대조군으로는 무처리군 (cell)와 PEI_{25k}를 사용하였다.

먼저 RAW264.7 세포에서는 양성 대조군인 PEI_{25k} 에 비해서 βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X 로 만든 나노복합체의 전달 효율이 전체적으로 유사하거나 더 높은 값으로 측정되어 전달 효율이 매우 높다는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 13A). βGAD10X, βGAD 20X, βGAD30X는 PEI_{25k}에 비해서 0.9−1.2 배, 0.8-1.4 배, 그리고 1.6-3.1 배의 효율을 보였다(Figure 13A). βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X는 다양한 무게비에서는 전달 효율에 큰 차이를 보이지 않았는데, 이것은 나노복합체의 입자 크기와 표면 전하의 차이가 크게 나타나지 않아 발현 효율이 비슷한 것임을 알 수 있다.

HeLa 세포에서도 양성 대조군인 PEI_{25k} 에 비해서 βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X로 만든 나노복합체의 전달 효율이 전체적으로 유사하게 더 높아 유전자 전달 효율이 높다는 것을 알 수 있었다 (Figure 13B). βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X 는 PEI_{25k} 에 비해서 0.8-5.0 배, 2.0-3.1 배, 1.4-3.4 배의 효율을 보였다 (Figure 12B). RAW264.7 세포와 유사한 이유로 βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X 의 다양한 무게비에 따른 차이가 크게 나타나지 않았다. 다만 βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X 모두 무게비 30 에서 가장 큰 유전자 전달 효율을 나타내어 추후 실험에 사용하였다.

결과적으로, βGAD/PEI_{25k}/pDNA 를 처리했을 때 대식세포와 암세포주에서 양성 대조군과 비슷하거나 높은 유전자 전달 효율을 확인하였고, βGAD 코팅이 유전자 전달에 있어서 그 효율을 감소시키지 않는다는 사실을 알 수 있었다.

유전자 전달 효율 평가를 혈청이 10% 존재하는 배지에 넣어 같은 조건에서 PEI_{25k}와 βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X의 유전자 전달

효율과 혈청 단백질 안정성을 확인하였다 (Figure 14). RAW264.7 세포와 HeLa 세포에서 βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X로 만든 나노복합체는 양성 대조군인 PEI_{25k}에 비해서 유사하거나 더 높은 안정성을 갖는 것을 관찰하였다. 혈청단백질이 있는 조건에서도 βGAD 나노복합체는 높은 유전자 전달 효율을 보였으며, Figure 9B에 따라서 βGAD 는 PEI_{25k}보다 혈청 단백질과 상호작용이 덜 일어났을 것임을 예상할 수 있었다. 하지만 혈청이 없는 조건보다 전체적으로 유전자 전달 효율이 감소하였는데, 이는 PEI_{25k} 와 βGAD 나노복합체가 양이온성 표면을 가지고 있기 때문이다.

결과적으로, 혈청 조건에서도 βGAD 나노복합체는 PEI_{25k} 대조군과 유사한 전달 효율을 가졌으며, 이후 *in vivo* 실험에서도 βGAD 나노복합체가 우수한 전달 효율을 가질 것이라고 예상할 수 있다.

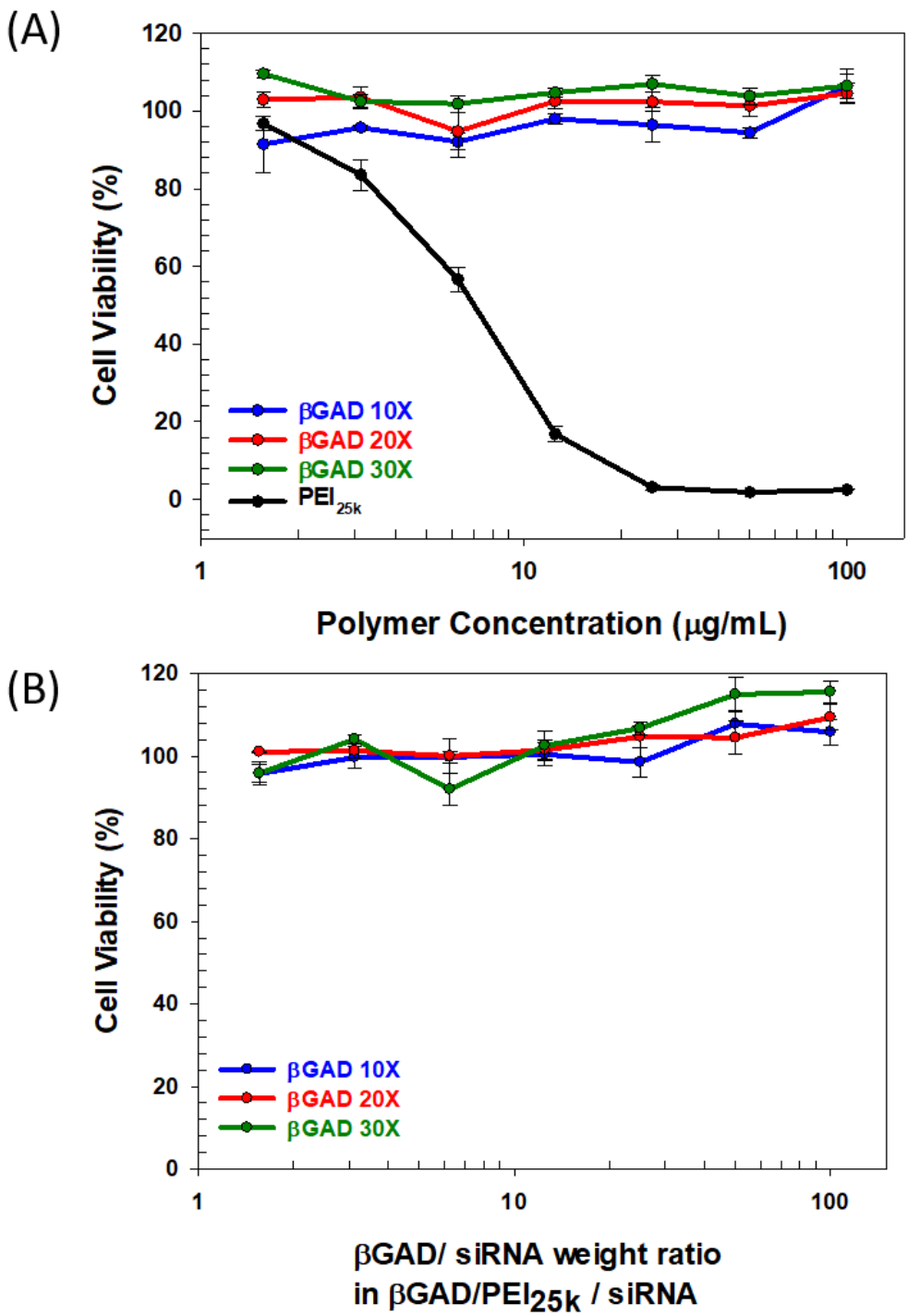


Figure 12. MTT assay result of (A) PEI_{25k} and βGAD (B) β GAD/PEI_{25k}/siRNA in RAW264.7 cell.

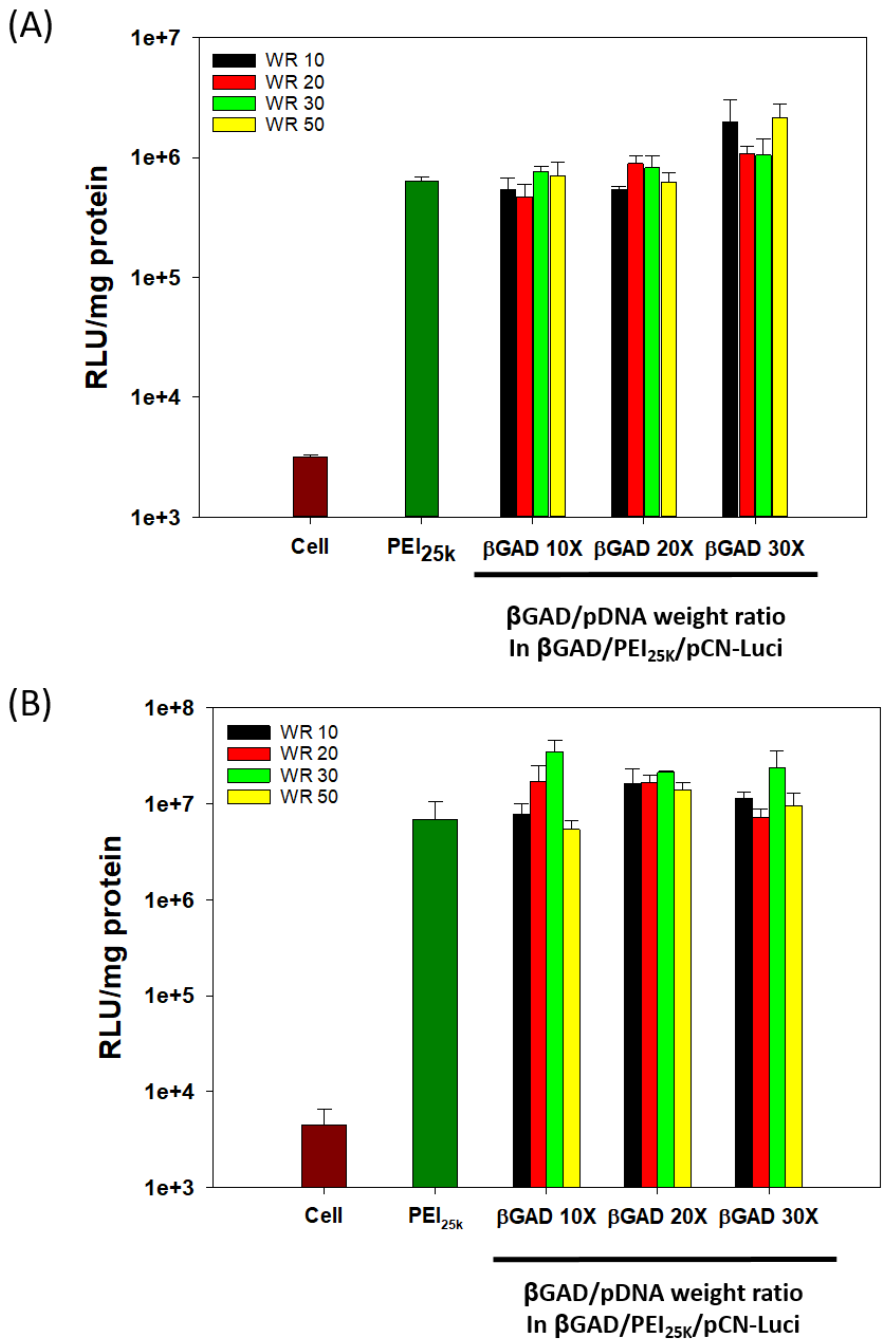


Figure 13. Transfection results of PEI_{25k} and βGAD10X, βGAD20X and βGAD30X in (A) RAW264.7 and (B) HeLa cells without serum at various weight ratios (βGAD/ PEI_{25k}/pDNA = 10, 20, 30, 50 : 1: 1 w/w).

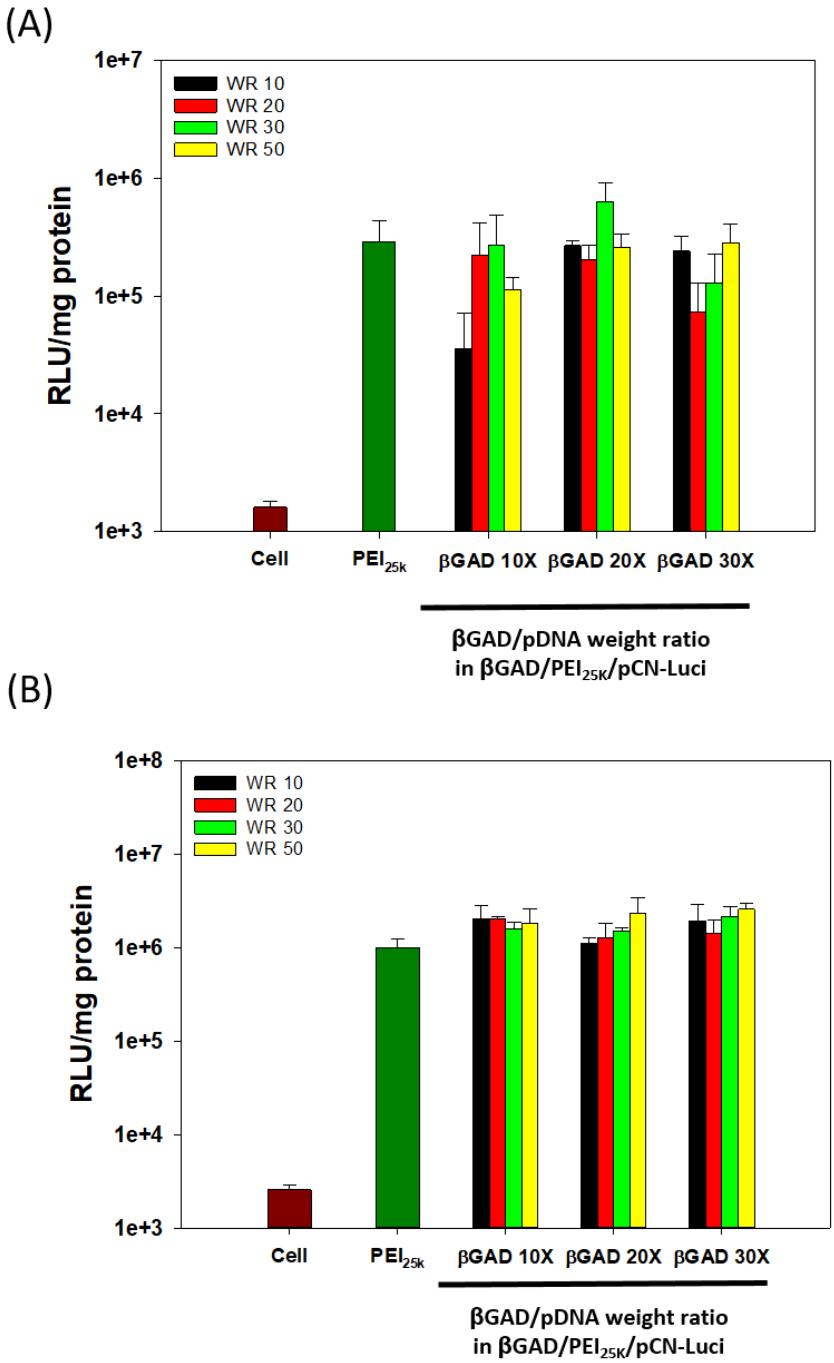


Figure 14. Transfection results of PEI_{25k} and βGAD10X, βGAD20X and βGAD30X in (A) RAW264.7 and (B) HeLa cells in 10% serum at various weight ratios (βGAD/ PEI_{25k}/pDNA = 10, 20, 30, 50 : 1: 1 w/w).

4.4 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체의 표적화 실험

4.4.1 βGAD 의 골 친화도 측정

βGAD 의 골표적화능은 하이드록시아파타이트에 대한 친화도를 Figure 15 의 방식으로 측정하여 확인하였다. AD 가 접합되어 있지 않은 β-glucan 은 하이드록시아파타이트에 대해 6.5%의 친화도를 보였고, βGAD10X 는 94.3%, βGAD20X 는 98.0%, βGAD30X 는 98.2%로 매우 높은 수준의 하이드록시아파타이트 친화도가 있음을 확인하였다 (Table 3). Henneman et al. 에 의하면 AD 는 하이드록시아파타이트와 친화성을 측정하였을 때 약 52% 의 친화도를 보여주었다 [94]. βGAD 고분자가 일반적인 AD 보다 높은 친화도를 갖는 것은 단분자인 AD 보다 사슬 형태의 고분자에 AD 가 접합되어 있는 것이 AD 간의 분산을 일으키고, 하이드록시아파타이트와의 물리적인 상호작용을 증진시킬 수 있기 때문이다. 결론적으로, βGAD 는 AD 접합을 통해서 β-glucan 보다 골 친화도가 증가하였고, 일반적인 AD 와 비하여도 높은 친화도가 있다는 것을 알 수 있었다.

4.4.2 유세포 분석법을 이용한 나노복합체의 RAW264.7 세포 친화도 능력 확인

βGAD 나노복합체의 RAW264.7 세포에 대한 친화도를 확인하고자 유세포 분석법을 이용하였다. pDNA 를 YOYO-1 형광 물질로 표지하고 βGAD/PEI_{25k}/pDNA 와 PEI_{25k}/pDNA 나노복합체를 만들었다. 나노복합체 처리 전에 세포에 베타글루칸을 0.5 μg/mL, 1 μg/mL, 2 μg/mL 의 농도로 30 분간 전처리 한 이후에 나노복합체를 4 시간동안 37°C 조건에서 처리하였다. 베타글루칸을 전처리 했을 때 세포 내 이입 효율이 유의미하게 감소한다면 βGAD 와 베타글루칸과의

competition 에 의한 것이라고 예상을 했고 그 차이를 통해 특정 세포에 대한 친화도를 확인할 수 있었다.

RAW264.7 세포에서 PEI_{25k}/pDNA 는 베타글루칸 전처리 농도에 따라 이입 효율의 차이를 보이지 않았다. 베타글루칸 처리시 베타글루칸을 처리하지 않은 샘플보다 세포 내 이입 효율이 최대 89.1%로 감소하였으나 베타글루칸 사슬 구조에 의한 물리적 결합에 의한 감소율이라고 예상하였다. βGAD/PEI_{25k}/pDNA 나노복합체들은 베타글루칸 처리시 베타글루칸을 처리하지 않은 샘플보다 유의미하게 감소된 세포 내 이입 효율을 보였고, 농도에 따른 감소율 또한 보여주었다 (Figure 16). βGAD10X 는 이입 효율이 92%, 81.8%, 67.4%로 급격하게 감소하였다. βGAD20X 는 103%, 98%, 83.1%로 감소하였고, βGAD30X는 89.9%에서 86.8%까지 감소하였다(Table 4). RAW264.7 세포에 대해 PEI_{25k} 는 세포 내 이입 효율의 차이를 보이지 않고 βGAD 에서는 효율이 감소하는 것은 RAW264.7 세포의 Dectin-1 수용체와 베타글루칸의 의한 특이적 상호작용 때문이라고 예상할 수 있다 [95]. 베타글루칸의 전처리시 βGAD/PEI_{25k}/pDNA 나노복합체는 경쟁을 통해서 특이적 상호작용과 이입이 억제되어 세포 투과율이 감소하지만 PEI_{25k}/pDNA 는 비특정 상호작용을 통해서 이입되기 때문에 베타글루칸 전처리에 따라 변화를 보이지 않았다.

HeLa 세포에서는 PEI_{25k}/pDNA 와 βGAD/PEI_{25k}/pDNA 모두 베타글루칸 전처리에 따라 세포 내 이입 효율에서 큰 변화를 보이지 않았다 (Figure 17). PEI_{25k}/pDNA 의 경우 세포 내 이입 효율이 88.3%까지 감소하였지만 유의미한 차이를 보이지 않아 물리적인 작용으로 인해 감소했을 것이라고 예상하였다. βGAD10X 는 최대 감소 효율이 96.5%, βGAD20X 는 95.8%, βGAD30X 는 98.4%로 나타났다 (Table 5). HeLa 세포에서는 베타글루칸 처리 여부와

관계없이 비특정 상호작용으로 세포 내 이입이 되기 때문에 전체적으로 영향을 주지 못하였고, 물리적인 작용을 통해서 세포 내 이입 효율이 5% 이내의 효율로 감소하였다는 것을 알 수 있었다.

결과적으로, RAW264.7 에서는 베타글루칸 전처리에 있어서 세포 내 이입 효율에 차이가 생기게 되고, 이로 인해 βGAD/PEI_{25k}/pDNA 는 RAW264.7 세포에 대한 친화도가 있다는 것을 알 수 있었다. HeLa 에서는 세포 내 이입 효율에 차이가 크지 않고, 물리적인 작용을 통해서 세포 내 이입 감소가 나타나는 것으로 예상되어 βGAD/PEI_{25k}/pDNA 의 친화도가 낮다는 것을 알 수 있었다.

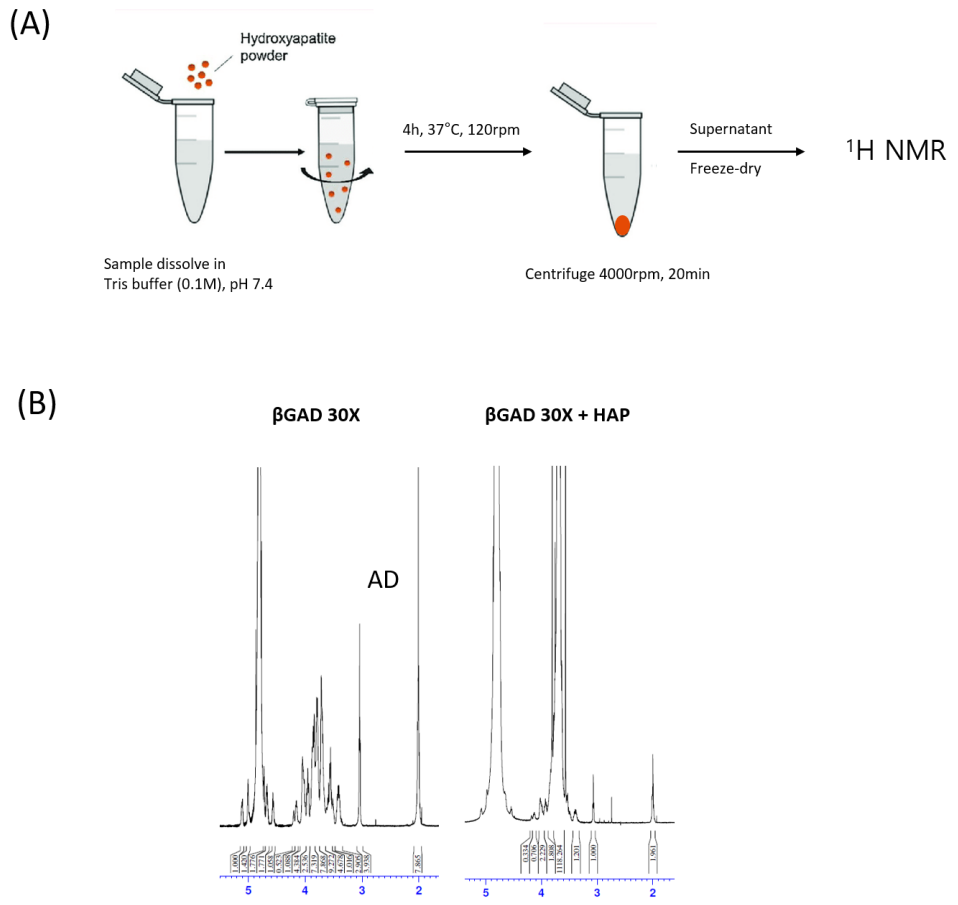


Figure 15. In vitro hydroxyapatite binding assay. (A) Methodology to evaluate affinity of βGAD to hydroxyapatite (B) ^{1}H NMR spectra showing reduction of alendronate.

Table 3. Binding affinity of β-Glucan and βGAD to hydroxyapatite

	Binding Affinity (%)
β-glucan	6.5
βGAD 10X	94.3
βGAD 20X	98.0
βGAD 30X	98.2

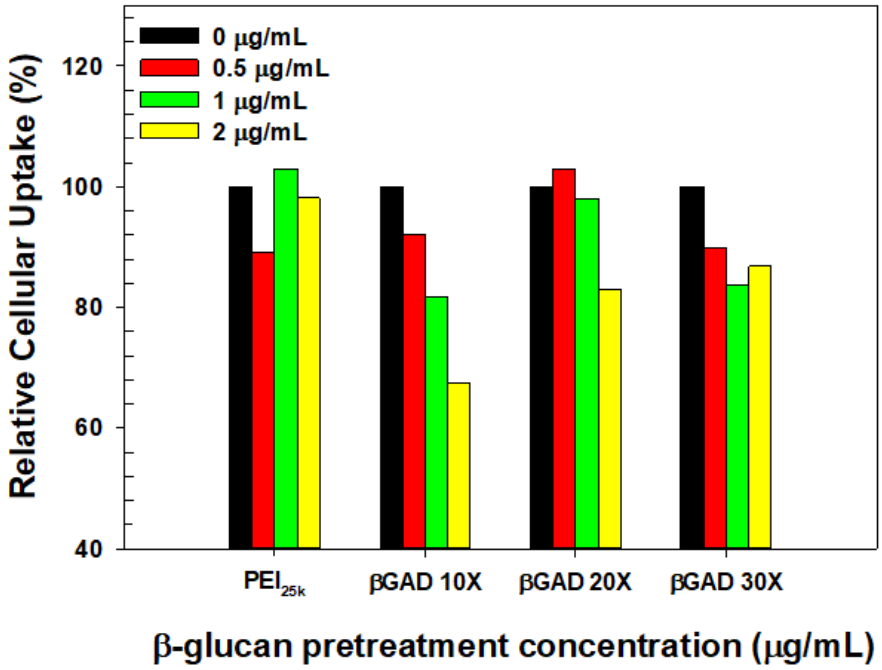


Figure 16. FACS result of PEI_{25k}/pDNA and βGAD/PEI_{25k}/pDNA in RAW264.7 cell at various β-glucan concentrations (0.5, 1, 2 μg/mL).

Table 4. Cellular uptake (%) according to β-glucan pretreatment concentrations relative to non-treated PEI_{25k}/pDNA and βGAD/PEI_{25k}/pDNA in RAW264.7 cell

β-glucan concentration	0 μg/mL	0.5 μg/mL	1 μg/mL	2 μg/mL
PEI_{25k}	100%	89.1%	103%	98.1%
βGAD10X	100%	92.0%	81.8%	67.4%
βGAD20X	100%	103%	98.0%	83.1%
βGAD30X	100%	89.9%	83.6%	86.8%

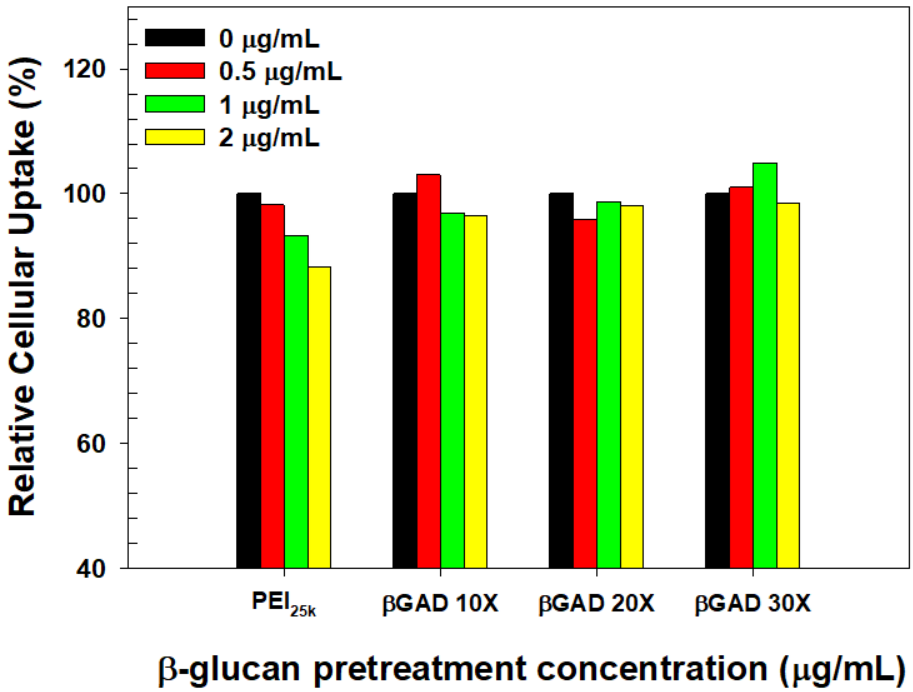


Figure 17. FACS result of PEI_{25k}/pDNA and βGAD/PEI_{25k}/pDNA in HeLa cell at various β-glucan concentrations (0.5, 1, 2 μg/mL).

Table 5. Cellular uptake (%) according to β-glucan pretreatment concentrations relative to non-treated PEI_{25k}/pDNA and βGAD/PEI_{25k}/pDNA in HeLa cell

β-glucan concentration	0 μg/mL	0.5 μg/mL	1 μg/mL	2 μg/mL
PEI_{25k}	100%	98.2%	93.3%	88.3%
βGAD10X	100%	103%	97.0%	96.5%
βGAD20X	100%	95.8%	98.7%	98.1%
βGAD30X	100%	101%	105%	98.4%

4.5 βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA 나노복합체의 생물학적 평가

4.5.1 RANKL을 이용한 파골세포 분화 및 TRAP assay

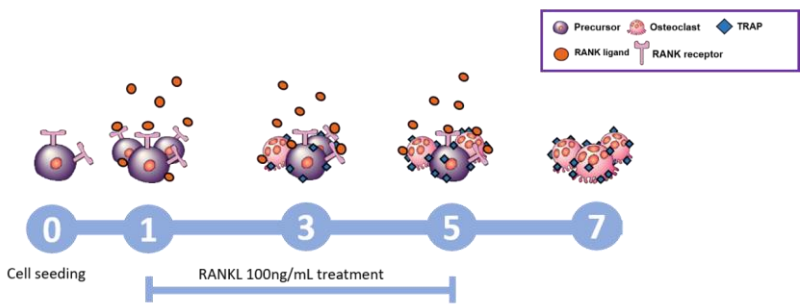
RAW264.7 세포에 RANKL 100 ng/mL을 2일 간격으로 3번 처리하여 7일간 TRAP으로 관찰하였다 (Figure 18A). TRAP은 파골세포에서 발현되는 특이적인 표지인자로서 RAW264.7 세포에서 파골세포로의 분화를 관찰할 수 있다. Figure 18B에서 점점 TRAP이 증가하는 것을 볼 수 있고, 3일차부터 발현되는 것을 확인할 수 있다. 또한 5일차부터 actin ring 이 생성되기 시작하며 7일차에 파골세포가 생성됨을 확인할 수 있다. 다른 논문들에서도 비슷한 수준으로 7일차에 분화가 진행됨을 확인하였다 [96].

4.5.2 MTT assay를 이용한 RAW264.7 세포에서의 독성 평가

RAW264.7 세포에 βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA 나노복합체, PEI$_{25k}$/siRNA 폴리플렉스, βGAD 샘플을 2일마다 3번 처리하고 7일차에 MTT를 통해서 세포 독성을 확인하였다 (Figure 19A). PEI$_{25k}$/siRNA = 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10: 1 w/w 에서 진행하였을 때 무게비 5 이상부터 독성이 나타났다 (Figure 19B). βGAD 고분자는 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL의 농도로 처리하였고 높은 농도에서도 세포 활성 감소가 나타나지 않음을 관찰할 수 있었다 (Figure 19C). PEI$_{25k}$/siRNA 는 무게비 1일때, 7일이 지나도 독성을 보이지 않아, βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA 나노복합체에서는 βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA = 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100: 1: 1 w/w 로 실험을 진행하였다. βGAD/PEI$_{25k}$/siRNA 나노복합체는 전체적으로 독성을 보이진 않았으나 무게비 100에서는 80%의 세포 활성이 나타났다 (Figure 19D). 이것은 총 3번의 샘플을 처리함에 있어서 많은 양의 βGAD가

처리되어 다소 세포 활성이 낮아졌으나 이후 실험에서는 높은 무게비를 사용하지 않아 문제되지 않을 것이라 예상하였다. 또한 RAW264.7 세포에서는 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체, PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스, βGAD를 7일간 처리시 큰 독성을 보이지 않아 이후 실험에서 발생하는 세포 사멸은 RAW264.7 세포가 아닌 파골세포에서의 영향임을 예상할 수 있었다.

(A)



(B)

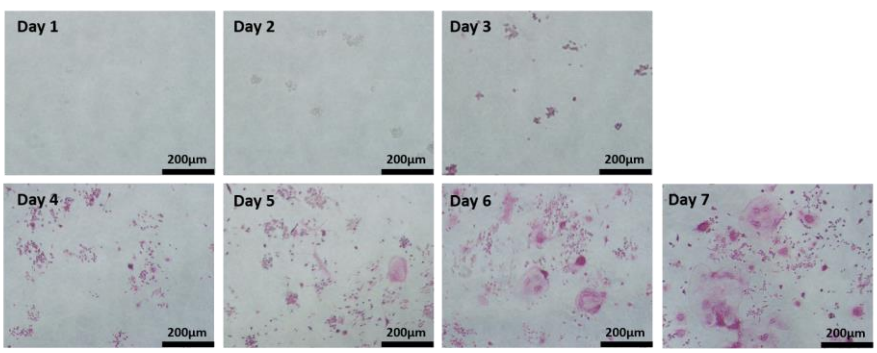


Figure 18. Osteoclast differentiation of RAW264.7 cell (A) Timeline for RANKL induced osteoclast differentiation (B) TRAP assay of osteoclast differentiation for 7 days.

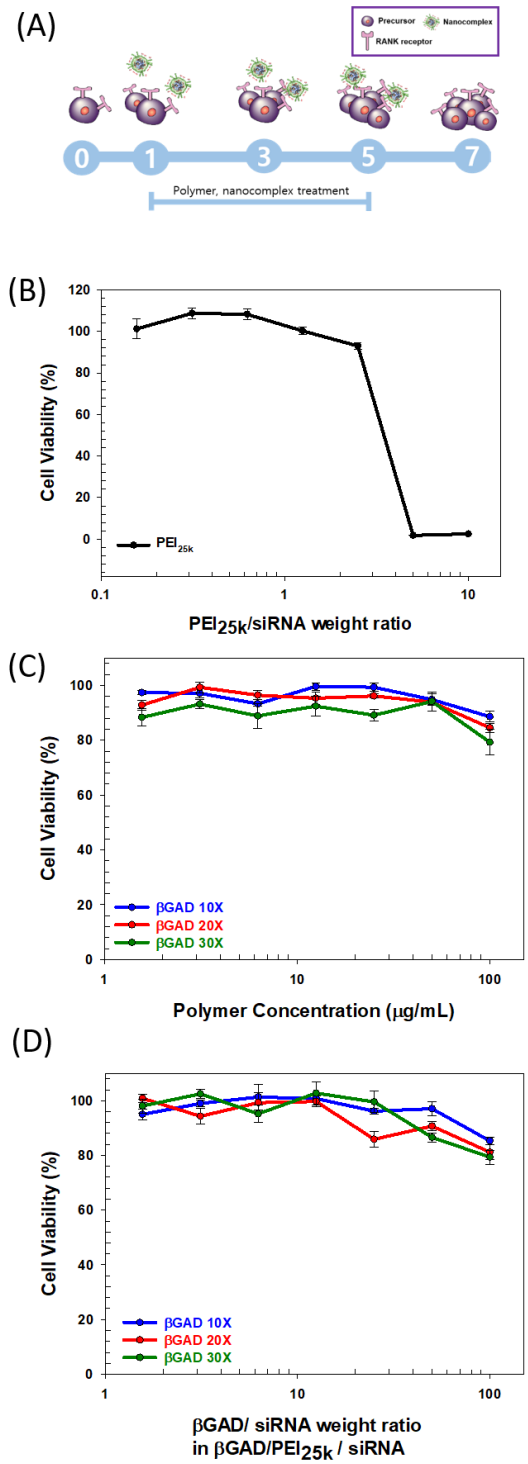


Figure 19. MTT assay for 7 days in RAW264.7 (A) Timeline (B) PEI_{25k}/siRNA (C) βGAD (D) βGAD/PEI_{25k}/siRNA at various weight ratios and concentrations.

4.5.3 TRAP을 이용한 βGAD의 파골세포 사멸 능력 확인

βGAD 의 파골세포 사멸 능력을 확인하기 위해 7 일간 파골세포를 분화시키는 과정 중에 βGAD 를 농도별로 RANKL 과 함께 처리하였다 (Figure 20A). TRAP 염색을 통해 현미경으로 파골세포를 관찰한 결과 βGAD 의 농도가 증가하고 βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X 로 함유된 AD 의 양이 증가함에 따라서 발현된 TRAP 의 양이 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 20B). 특히나 βGAD 30X 에서 효과가 더 크게 나타났고, 이는 함유된 AD 의 양이 더 많기 때문에 TRAP 발현량이 더욱 감소했을 것이라 예상할 수 있다.

4.5.4 qPCR을 이용한 βGAD의 파골세포 사멸 유발 능력

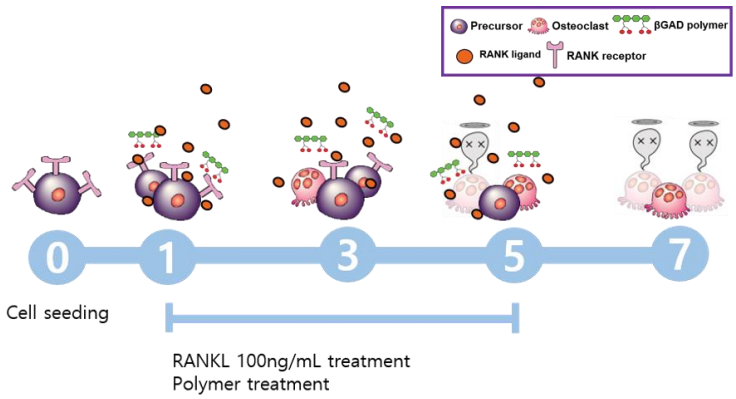
βGAD 로 인한 파골세포 사멸 유발 능력을 확인하고자 7 일간 파골세포를 분화시키는 과정 중에 βGAD 와 AD 를 처리하였다. βGAD30X 의 AD 무게비는 약 50%로, βGAD30X 의 10 μg/mL 의 비교군으로 AD 5 μg/mL 을 처리하였고, βGAD20X 의 AD 무게비는 약 25%로, βGAD20X 의 5 μg/mL 의 비교군으로 AD 1 μg/mL 을 처리하였다. 이후 apoptosis 마커인 FAS 를 qPCR 로 정량 하였다.

결과적으로, βGAD 처리시 아무것도 처리하지 않은 파골세포보다 농도와 AD 함유량에 따라 FAS mRNA 발현량이 증가하는 추세를 보였다 (Figure 21). βGAD10X 의 경우 농도가 증가함에 따라 FAS 발현량이 증가하였으나 일반적인 파골세포에 비해 0.5−2.1 배 증가하여 큰 차이를 보이지 않았는데, 이는 낮은 AD 함유량을 가지고 있기 때문이다. βGAD20X 와 βGAD30X 는 파골세포에 비해서 1.9−4.0 배, 1.3−4.3 배 더 높은 FAS mRNA level 을 보여주고 농도가 증가할수록 FAS 발현량 또한 유의미하게 증가하였다.

비교군으로 처리한 AD 는 같은 양의 AD 를 함유하고 있는 βGAD 보다는 낮은 발현량을 보인다. βGAD20X 의 5 μg/mL 은 AD 1 μg/mL 보다 3.8 배 높은 발현량을 보였고, βGAD30X 의 10 μg/mL 는 AD 5 μg/mL 보다 2.2 배 높은 발현량을 보였다. βGAD 가 더 높은 FAS 발현량을 갖게 되는 것을 통해 일반적인 AD 보다 βGAD 로 고분자화 시켰을 때 더욱 높은 사멸 효과를 보인다는 것을 예상할 수 있다. βGAD 의 사멸 효과가 높은 것은 β-glucan 과 파골세포간의 상호작용과 고분자 사슬에 있는 AD 가 파골세포에 닿는 물리적 표면이 더욱 넓기 때문이라고 예상할 수 있다 [35-37].

βGAD 고분자는 기존 연구보다 더 높은 파골세포 사멸 효과를 보였다. 히알루론산에 AD 를 접합한 고분자 전달체 (HA-AD)로 파골세포에 처리해 FAS 발현량을 측정한 연구에서 같은 함량의 AD와 비교했을 때 HA-AD가 1.5배 높은 FAS 발현량을 보였다 [97]. 하지만 βGAD 는 일반적인 AD에 비해서 2.2-3.8배 높은 발현량은 보여 기존 연구보다 더 높은 사멸효과를 가졌다는 것을 알 수 있었다. 또한 파골세포에 FAS 활성화 항체를 직접적으로 넣어주게 될 경우 세포 사멸이 약 5.7 배 증가한다는 연구를 통해 최대 4.3 배 FAS 발현량을 보이는 βGAD 고분자도 비슷한 세포 사멸 효과를 보여준다는 것을 알 수 있었다 [33].

(A)



(B)

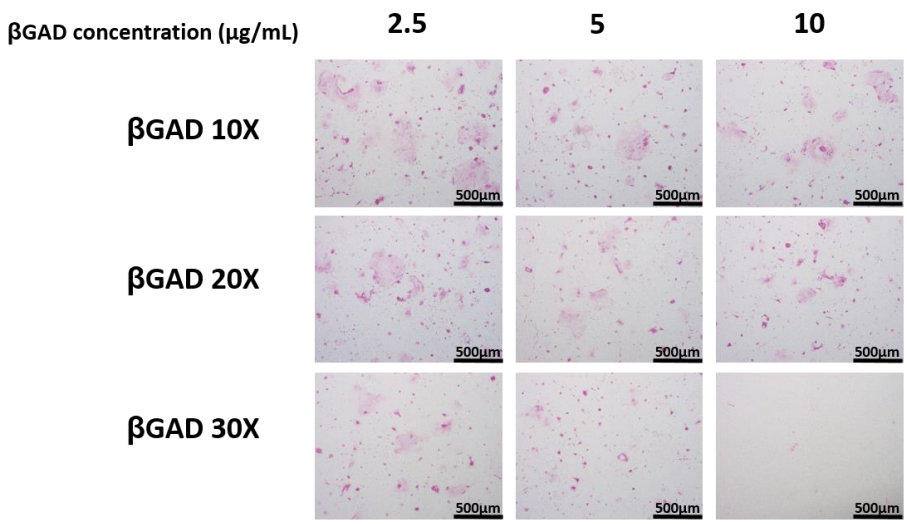


Figure 20. Effect of βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X in RANKL-induced osteoclast differentiation (A) Experiment timeline
(B) TRAP assay results of reduced osteoclast activity by βGAD on RANKL-induced osteoclast differentiation.

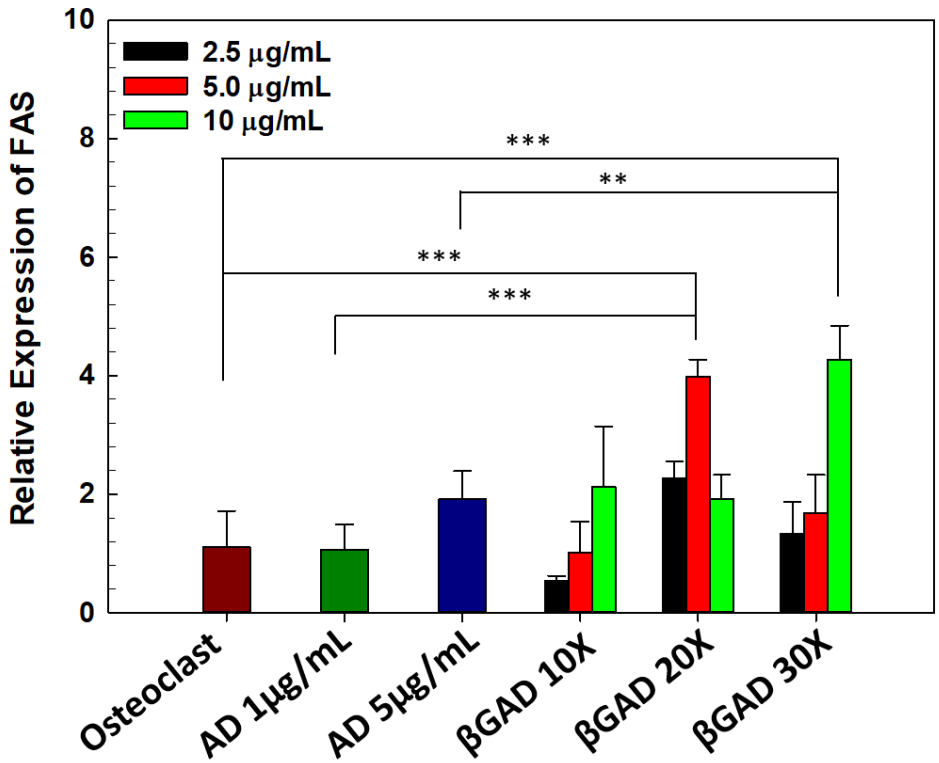


Figure 21. Apoptotic effect of AD, βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X in RANKL-induced osteoclast. Relative mRNA expression level of FAS. Relative activity was normalized to value of non-treated RANKL-induced osteoclast.

4.5.5 TRAP을 이용한 폴리플렉스와 나노복합체의 파골세포 활성 억제 확인

βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체와 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스로 파골세포 활성 억제 능력을 확인하기 위해 7 일간 파골세포를 분화시키는 과정 중에 나노복합체와 폴리플렉스를 처리하였다 (Figure 22A). TRAP 염색을 통해 파골세포 활성을 관찰한 결과, PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스에서 siRNA 농도가 증가함에 따라 분화가 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 22B). 특히 하나의 세포로 분화하지 못하고 뭉쳐있는 모습으로 기존의 파골세포와 다른 형상을 보였다. 이를 통하여 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스가 siRNA 전달을 통해 파골세포 분화를 억제한다는 사실을 확인할 수 있었다.

βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체를 siRNA 10 nM 에서 다양한 무게비로 처리했을 때, 무게비가 증가함에 따라서 발현되는 TRAP 의 양이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 22C). 특히나 AD 함유량이 낮은 βGAD10X 는 βGAD20X 와 βGAD30X 에 비해 TRAP 이 크게 나타났다. 또한 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스보다 βGAD 코팅 시 TRAP 의 양이 감소함을 확인할 수 있었다. 이로서 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체는 siRNA 전달 뿐만 아니라 βGAD 에 의해 TRAP 발현이 감소하였음을 예상할 수 있었다.

4.5.6 qPCR을 이용한 나노복합체의 파골세포 활성 억제 확인

βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체와 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스의 파골세포 활성 억제 능력을 확인하고자 파골세포로 분화시키는 과정 중에 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체, PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스를 RANKL 과 함께 5 일째에 처리하였다. 파골세포 대표인자인 RANK, NFATc1,

Cathepsin-K mRNA 을 정량하기 위한 나노복합체는 siRNA 10 nM 을 기준으로 βGAD /PEI_{25k}/siRNA = 3: 1: 1 w/w 로 제조하였다.

RANK, NFATc1, Cathepsin-K mRNA 모두 βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X 로 나노복합체를 만들면 일반적인 파골세포에 비해서 그 mRNA 발현량이 유의미하게 감소하여 파골세포의 활성을 효과적으로 억제하였다 (Figure 23). βGAD30X 으로 만들어진 나노복합체는 βGAD10X 과 βGAD20X 로 만들어진 복합체보다 모든 mRNA 에서 그 활성이 감소하였고, βGAD20X 또한 βGAD10X 보다 활성이 감소한 모습을 보였다. 이로부터, AD 함량이 증가할수록 파골세포 활성을 효과적으로 저해 한다는 것을 확인할 수 있었다. βGAD30X 로 만든 나노복합체의 경우 일반 파골세포보다 RANK 는 15.4%, NFATc1 은 24.2%, Cathepsin-K 는 43.2%의 mRNA 발현량을 나타내어 분화 억제 효율이 증가함을 확인하였다. PEI_{25k}/siRNA 나노복합체의 경우 파골세포 분화인자인 NFATc1 과 골재흡수 인자인 Cathepsin-K 에서 βGAD 나노복합체보다 강한 파골세포 활성 억제가 나타났고, 이는 PEI_{25k}/siRNA 의 양이온성으로 인해 상대적으로 높은 파골세포 내 이입이 발생했기 때문이다 [98].

그러나 βGAD 의 파골세포 사멸 효과, 파골세포 전구체인 RAW264.7 에 대한 특이적인 친화도, 혈청 단백질 안정성으로 인해 이후 비임상 실험에 들어간다면 PEI_{25k}/siRNA 나노복합체보다 더욱 안정적인 나노입자를 유지하면서 골조직과 파골세포 전구체에 대한 표적화능과 사멸효과를 보일 것이므로, 효율적인 파골세포 억제효과를 지닐 것이라 예상할 수 있다.

또한 βGAD /PEI_{25k}/siRNA 나노복합체는 기존의 RANK siRNA 전달 연구보다 효율적인 전달체로 작용할 수 있다. 현 실험에서는 RANK siRNA 를 10nM 기준으로 한번 처리하였다. HA-AD/SP2K/siRNA 전

달체를 활용하였을 경우, 20nM로 높은 siRNA 농도와 여러 번 처리했음에도 RANK의 발현 억제가 βGAD30X 나노복합체에서 더 높은 효율을 보였고, 비슷한 Cathepsin-K 억제 효율을 보였다 [97]. 이를 통해서 적은 siRNA 양으로도 βGAD /PEI_{25k}/siRNA 나노복합체가 효율적인 전달체임을 확인할 수 있었다. DharmaFECT4 (DF4) 라고 하는 양이온성 지질 전달체로 RANK siRNA 를 전달한 연구에서는 125 nM 의 RANK siRNA 로 현 연구보다 약 12.5배 높은 농도를 사용하였다. 그럼에도 불구하고 RANK의 파골세포 대비 발현량이 25%로 βGAD30X의 15.4%보다 억제 효율이 낮았다 [33]. 이를 통해 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체는 매우 효율적인 전달 능력을 통해서 높은 파골세포 분화 억제 효율을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.

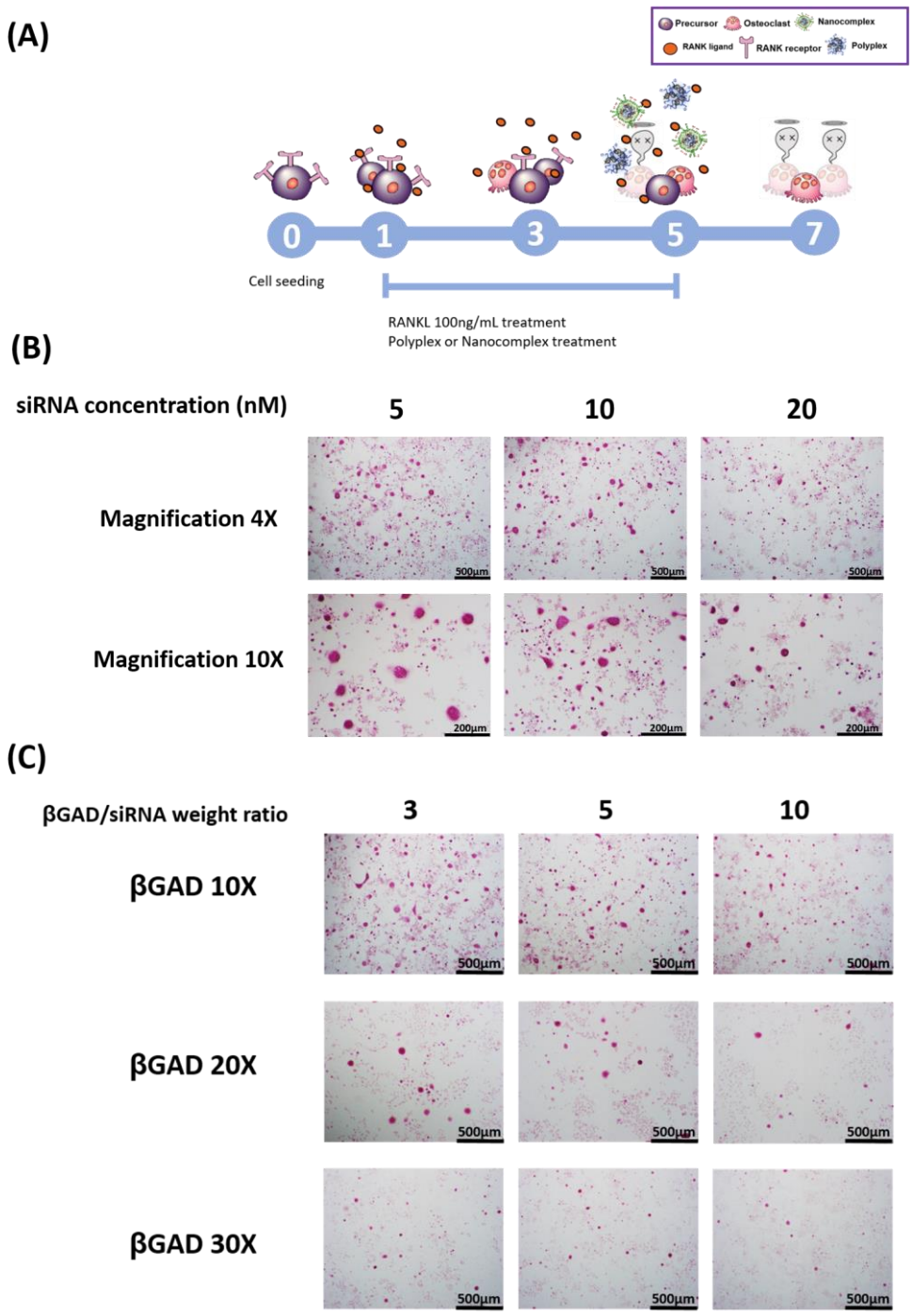


Figure 22. Effect of PEI_{25k}/siRNA and βGAD/PEI_{25k}/siRNA in RANKL-induced osteoclast (A) Experiment timeline (B) TRAP assay results of osteoclast activity by PEI_{25k}/siRNA (C) TRAP assay results of osteoclast activity by βGAD/PEI_{25k}/siRNA.

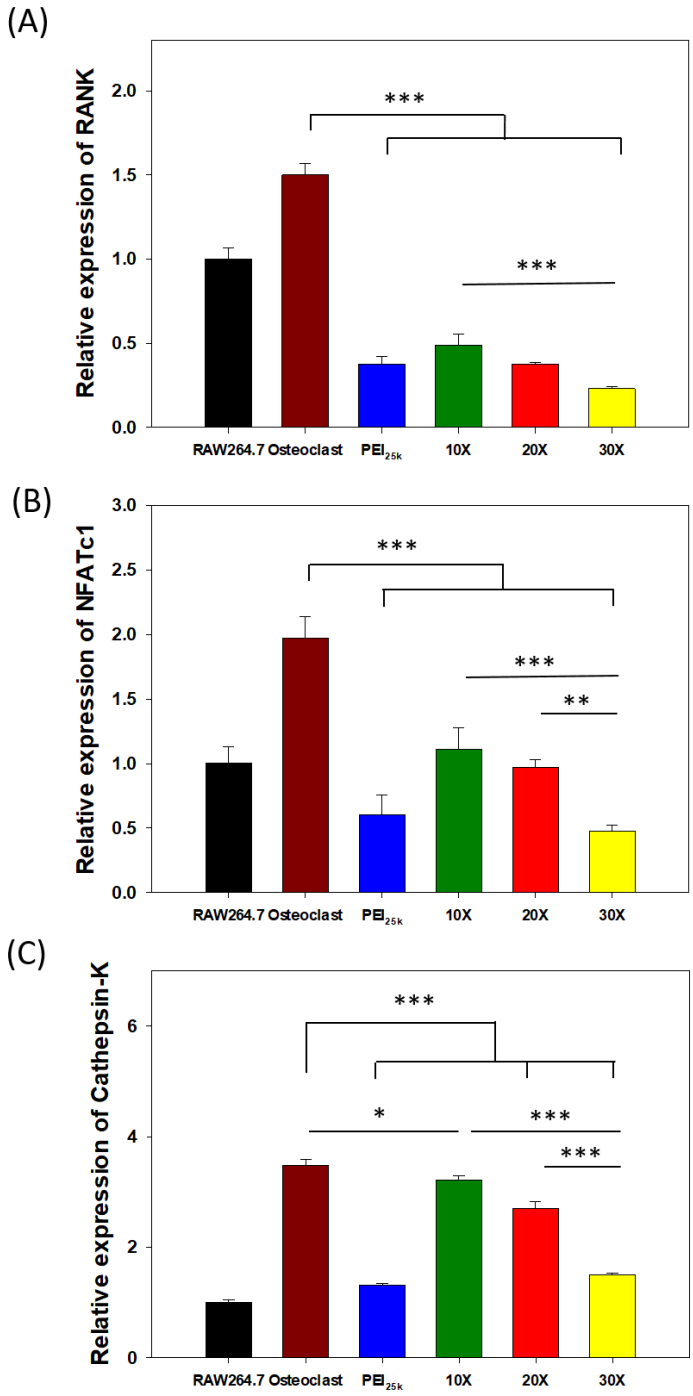


Figure 23. Effect of PEI_{25k}/siRNA and βGAD/PEI_{25k}/siRNA in RANKL-induced osteoclast. Relative mRNA expression levels of (A) RANK (B) NFATc1 (C) Cathepsin-K. Relative activity was normalized to value of non-treated RANKL-induced osteoclast.

제 5장 결론

본 연구에서는 새로운 유전자 전달체의 개발을 위해 골다공증 치료제로 사용되고 있는 알렌드로네이트와 파골세포 전구체에 표적화능이 있는 보리 베타글루칸을 합성하여 RANK siRNA를 전달해 새로운 골다공증 치료제에 대한 가능성을 제안하였다.

산화 시킨 보리 베타글루칸을 알렌드로네이트와 접합시켜 barley β-Glucan-Alendronate (βGAD)를 합성하였다. AD의 feed ratio에 따라서 βGAD10X, βGAD20X, βGAD30X로 명명하였다. βGAD의 구조는 글루코오스: AD 의 결합비가 7.47%, 14.01%, 33.81%로 나타났고 52-58 kDa의 분자량도 확인하였다.

아가로스 겔 전기영동과 TEM을 통해 PEI_{25k}/siRNA 폴리플렉스와 βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체는 구형의 형태로 내부에 siRNA을 담지하고 βGAD가 코팅되어 있는 구조인 것을 확인하였다. 입자 크기는 130-150 nm, 표면 전하는 25 mV로 안정적인 입자를 만들었다. 10% 혈청 단백질 조건에서 PEI_{25k}/siRNA의 크기는 41%까지 증가하였지만 βGAD/PEI_{25k}/siRNA의 크기 증가율이 10% 이내로, 상대적인 혈청 안정성을 나타내었다. 세포 독성을 확인하기 위해 MTT 실험을 진행했고, βGAD 고분자와 βGAD/PEI_{25k}/siRNA는 80% 이상의 세포 생존율을 보여 독성이 낮음을 확인하였다. 유전자 전달 효율 평가에서 대조군인 PEI_{25k}/pDNA보다 βGAD/PEI_{25k}/pDNA가 유사하거나 더 높은 전달 효율을 나타내었고, 혈청 조건에서도 대조군과 비슷한 효율을 보였다.

βGAD는 골 친화도 평가에서 90% 이상의 친화도를 보여 일반적인 AD와 베타글루칸보다 높은 골 친화도를 나타내었고, 유세포 분석을 통해 βGAD가 RAW264.7 세포에 대해 상대적 친화도를 가지고 있는

것을 확인하였다. 최종적으로 TRAP과 qPCR 를 통해서 βGAD가 파골세포에서 사멸을 유발하는 것을 확인하였다. 세포 사멸 인자인 FAS에 대한 qPCR 결과, βGAD는 비교군인 일반적인 AD보다 더 높은 발현량을 보여 AD를 복합화 했을 경우 더 효과적으로 파골세포 사멸을 일으킨다는 것을 확인하였다. βGAD/PEI_{25k}/siRNA 나노복합체의 파골세포 분화 억제 효율을 qPCR를 통해 확인하였다. 분화 억제 효율 확인을 위해 파골세포 수용체인 RANK, 분화인자인 NFATc1, 골재흡수인자인 Cathepsin-K 의 발현량을 확인하였다. βGAD/PEI_{25k}/siRNA는 일반적인 파골세포보다 모든 mRNA 발현 억제 능력이 높았고, AD 함량이 가장 높은 βGAD30X에서 βGAD10X와 βGAD20X에 비해 억제 효율이 더욱 높게 나타났다. 이를 통해서 βGAD/PEI_{25k}/siRNA는 siRNA 작용을 통해 파골세포 수용체인 RANK를 억제하여 분화에 중요한 RANK-RANKL 상호작용을 막았을 수 있고, 신호 전달을 통해 파골세포의 분화인자인 NFATc1 또한 억제할 수 있었다. 파골세포의 분화 억제 효율이 높아짐에 따라 골재흡수능을 확인하는 Cathepsin-K 도 발현량이 감소하였다. 또한 10nM로 낮은 siRNA 농도을 사용했음에도 불구하고 기존 연구들과 비교했을 때 비슷하거나 높은 억제 효율을 나타내어 나노복합체의 전달 효율이 매우 높다는 것을 확인하였다.

본 연구에서는 높은 골조직, 파골세포 전구체 친화도와 파골세포 분화 억제 능력을 갖춘 나노복합체를 개발하고 파골세포 분화 및 활성 억제 효율을 확인하였다. 높은 표적화 효율과 혈청 안정성, 그리고 파골세포 사멸 효과를 보이는 βGAD는 효과적인 유전자 전달체로 사용될 수 있고, 이를 기반으로 한 다양한 연구가 진행되어 골다공증 치료 연구에 기여할 것으로 기대된다.

참고 문헌

[1] P. Zhang, E. Wagner, History of Polymeric Gene Delivery Systems, Topics in Current Chemistry, 375, 26, 2017.

[2] S. Y. Wong, J. M. Pelet, D. Putnam, Polymer systems for gene delivery—Past, present, and future, Progress in Polymer Science, 32 (8–9), 799–837, 2007.

[3] E. Y. Jeon, S. Y. Kim, Influencing Factors on Osteopenia and Osteoporosis in Korean Aged 50 Years and Above, Korean Journal of Rehabilitation Nursing, 19 (2), 148–155, 2016.

[4] J. Lee, S. Lee, S. Jang et al., Age-Related Changes in the Prevalence of Osteoporosis according to Gender and Skeletal Site: The Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2008–2010, Endocrinology and Metabolism, 28 (3), 180–191, 2013.

[5] P. Salari, M. Abdollahi, Long term bisphosphonate use in osteoporotic patients; a step forward, two steps back, Journal of pharmacy and pharmaceutical science, 15(2), 305–317, 2015.

[6] D. A. Ossipov, Bisphoshonate–modified biomaterials for drug delivery and bone tissue engineering, Expert Opinion on Drug Delivery, 12 (9), 1443–1458, 2015.

[7] Q. Yang, D. Liu, M. Liu et al., Bone-Targeted Calcium Phosphate–Polymer Hybrid Nanoparticle Co-Deliver Zoledronate and Docetaxel to Treat Bone Metastsis of Prostate Cancer, Journal of Pharmaceutical Sciences, 110, 876–887, 2021.

[8] X. Zhou, E. J. Cornel, Z. Fan et al., Bone-Targeting Polymer Vesicles for Effective Therapy of Osteoporosis, Nano Letters, 21

(19), 7998-8007, 2021.

[9] I. Noss, I. M. Wouters, L. A. Smit et al., IgG to various beta-glucans in a human adult population, International archives of allergy and immunology, 157 (1), 98-108, 2012.

[10] G. C. Chan, W. K. Chan, D. M. Sze, The effects of β-glucan on human immune and cancer cells, Journal of Hematology & Oncology, 2, 25, 2009.

[11] X. Zhu, Y. Zhao, Y. Jiang et al., Dectin-1 signaling inhibits osteoclastogenesis via IL-33 induced inhibition of NFATc1, Oncotarget, 8 (32), 53366-53374, 2017.

[12] M. J. Olszta, X. Cheng, S. S. Jee et al., Bone structure and formation: A new perspective, Materials Science and Engineering R, 58 (3-5), 77-116, 2007.

[13] S. Weiner, H. D. Wagner, The material bone: Structure-Mechanical Function Relations, Annual Reviews, 28, 271-298, 1998.

[14] A. M. Mohamed, An Overview of Bone Cells and their Regulating Factors of Differentiation, The Malaysian Journal of Medical Sciences, 15 (1), 4-12, 2008.

[15] R. Florencio-Silva, G. R. Sasso, E. Sasso-Cerri et al., Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors that Influence Bone Cells, BioMed Research International, 2015, 421746, 2015.

[16] M. B. Schaffler, W. Y. Cheung, R. Majeska et al., Osteocytes: Master Orchestrators of Bone, Calcif Tissue International, 94, 5-24, 2014.

[17] N. S. Soysa, N. Alles, Osteoclast function and bone-resorbing activity: An overview, Biochemical and Biophysical Research

Communications, 476 (3), 115-120, 2016.

[18] C. F. Arias, M. A. Herrero, L. F. Echeverri et al., Bone remodeling: A tissue-level process emerging from cell-level molecular algorithms, Plos One, 13 (9), e0204171, 2018.

[19] N. Rucci, Molecular biology of bone remodeling, Clinical cases in mineral and bone metabolism, 5 (1), 49-56, 2008.

[20] M. Rauner, Basics of Bone Biology, Principles of Osteoimmunology, 1-30, 2016.

[21] L. I. Plotkin, A. Bruzzaniti, Molecular signaling in bone cells: Regulation of cell differentiation and survival, Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, 116, 237-281, 2019.

[22] S. A. Hienz, S. Paliwal, S. Ivanovski, Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis, Journal of Immunology Research, 2015, 615486, 2015.

[23] E. Hardy, C. Fernadez-Patron, Destroy to Rebuild: The Connection Between Bone Tissue Remodeling and Matrix Metalloproteinases, Frontiers in Physiology, 11, 47, 2020.

[24] B. Langdahl, S. Ferrari, D. W. Dempster, Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis, Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease, 8 (6), 225-235, 2016.

[25] J. C. Crockett, M. J. Rogers, F. P. Coxon et al., Bone remodeling at a glance, Journal of Cell Science, 124 (7), 991-998, 2011.

[26] G. R. Mundy, Osteoporosis and inflammation, Nutrition Reviews, 65 (3), 147-151, 2007.

[27] L. Santos, K. J. Elliott-Sale, C. Sale, Exercise and bone health

across the lifespan, Biogerontology, 18 (6), 931-946, 2017.

[28] R. Sapir-Koren, G. Livshits, Postmenopausal osteoporosis in rheumatoid arthritis: The estrogen deficiency-immune mechanisms link, Bone, 103, 102-115, 2017.

[29] G. Mazziotti, E. Canalis, A. Giustina, Drug-induced osteoporosis: Mechanisms and clinical implications, The American Journal of Medicine, 123 (10), 877-884, 2010.

[30] E. Canalis, G. Mazziotti, A. Giustina et al., Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy, Osteoporosis International, 18 (10), 1319-1328, 2007.

[31] D. W. Malcolm, Y. Wang, C. Overby et al., Delivery of RNAi-Based Therapeutics for Bone Regeneration, Current Osteoporosis Report, 18 (3), 312-324, 2020.

[32] Q. Leng, L. Chen, Y. Lv, RNA-based scaffolds for bone regeneration: application and mechanisms of mRNA, miRNA and siRNA, Theranostics, 10 (7), 3190-3205, 2020.

[33] Y. Wang, D. W Grainger, siRNA Knock-Down of RANK Signaling to Control Osteoclast-Mediated Bone Resorption, Pharmaceutical Research, 27 (7), 1273-1284, 2010.

[34] D. S. Bilecen, H. Uludag, V. Hasirci, Development of PEI-RANK siRNA Complex Loaded PLGA Nanocapsules for the Treatment of Osteoporosis, Tissue Engineering Part A, 25 (1-2), 34-43, 2019.

[35] T. H. Kim, R. K. Singh, M. S. Kang et al., Inhibition of osteoclastogenesis through siRNA delivery with tunable mesoporous bioactive nanocarriers, Acta Biomaterialia, 29, 352-364, 2016.

[36] G. Zhang, B. Guo, H. Wu et al., A delivery system targeting bone

formation surfaces to facilitate RNAi-based anabolic therapy, Nature Medicine, 18 (2), 307-314, 2012.

[37] Y. Zhang, L. Wei, R. J. Miron et al., Anabolic Bone formation via Site-Specific Bone Targeting Delivery System by Interfering with Semaphorin 4D Expression, Journal of Bone and Mineral Research, 30 (2), 236-296, 2015.

[38] Y. Wang, D. W. Malcolm, D. S. W. Benoit, Controlled and sustained delivery of siRNA/NPs from hydrogels expedites bone fracture healing, Biomaterials 139, 127-138, 2017.

[39] Y. Zhang, A. Leon, Y. Song et al., Activity of Nitrogen-Containing and Non-Nitrogen Containing Bisphosphonates on Tumor Cell Lines, Journal of Medicinal Chemistry, 49 (19), 5804-5814, 2006.

[40] L. E. Cole, T. Vargo-Gogola, R. K. Roeder, Targeted delivery to bone and mineral deposits using bisphosphonate ligands, Advanced Drug Delivery Reviews, 99 (Pt A), 12-27, 2016.

[41] M. T. Drake, B. L. Clarke, S. Khosla, Bisphosphonates: Mechanisms of Action and Role in Clinical Practice, Mayo Clinical Proceedings, 83 (9), 1032-1045, 2008.

[42] A. Kuznik, A. Pazdzierniok-Holewa, P. Jewula et al., Bisphosphonates-much more than only drugs for bone diseases, European Journal of Pharmacology, 866, 172773, 2020.

[43] J. J. Nielsen, S. A. Low, Bone-Targeting Systems to Systematically Delivery Therapeutics to Bone Fractures for Accelerated Healing, Current Osteoporosis Reports, 18 (5), 449-459, 2020.

[44] Q. Chen, C. Zheng, Y. Li et al., Bone Targeted Delivery of SDF-1 via Alendronate Functionalized Nanoparticles in Guiding Stem Cell Migration, ACS Applied Materials Interfaces, 10, 23700-23710, 2018.

[45] K. Miller, R. Erez, E, Segal et al., Targeting Bone Metastases with a Bispecific Anticancer and Antiangiogenic Polymer-Alendronate-Taxane Conjugate, Angewandte Chemie, 48 (16), 2949-2945, 2009.

[46] D. Lee, D. N. Heo, H. J. Kim et al., Inhibition of Osteoclast Differentiation and Bone Resorption by Bisphosphonate-conjugated Gold Nanoparticles, Scientific Reports, 6, 27336, 2016.

[47] D. Sharma, S. Ivanovski, M. Slevin et al., Bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw (BRONJ): diagnostic criteria and possible pathogenic mechanisms of an unexpected anti-angiogenic side effect, Vascular Cell, 5 (1), 1, 2013.

[48] B. Aderibigbe, I. Aderibigbe, P. Popoola, Design and Biological Evaluation of Delivery Systems Containing Bisphosphonates, Pharmaceutics, 9 (1), 2, 2017.

[49] A. P. Soares, R. F. Santo, S. R. Line et al., Bisphosphonates: Pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications, clinical applications in children, and effects on tooth development, Environment Toxicology and Pharmacology, 42, 212-217, 2016.

[50] H. K. Han, H. J. Shin, D. H. Ha, Improved oral bioavailability of alendronate via the mucoadhesive liposomal delivery system, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 46 (5), 500-507,

2012.

[51] E. Migianu-Griffoni, I. Chebbi, S. Kachbi et al., Synthesis and Biological Evaluation of New Bisphosonate-Dextran Conjugates Targeting Breast Primary Tumor, Bioconjugate Chemistry, 25 (2), 224-230, 2014.

[52] B. Han, K. Baruah, E. Cox et al., Structure-Functional Activity Relationships of β-Glucans From the Perspective of Immunomodulation: A Mini-Review, Frontiers in Immunology, 11, 658, 2020.

[53] W. Ariyoshi, S. Hara, A. Koga et al., Biological Effects of β-Glucans on Osteoclastogenesis, Molecules, 26 (7), 1982, 2021.

[54] J. F. Charles, L. Y. Hsu, E. C. Niemi et al., Inflammatory arthiritis increases mouse osteoclast precursor with myeloid suppressor function, Journal of Clinical Investigation, 122 (23), 4592-4605, 2012.

[55] T. Yamasaki, W. Ariyoshi, T. Okinaga et al., The Dectin 1 Agonist Curdlan Regulates Osteoclastogenesis by Inhibiting Factor of Activated T cells Cytoplasmic 1 (NFATc1) through Syk Kinase, Cell Biology, 289 (27), 19191-19203, 2014.

[56] D. Li, C. Bai, Q. Zhang et al., β-1,3-Glucan/CR3/SYK pathway-dependent LC3B-II accumulation enhanced the fungicidal activity in human neutrophils, Journal of Microbiology, 57, 263-270, 2019.

[57] H. Hayashi, K. Nakahama, T. Sato et al., The role of Mac-1 (CD11b/CD18) in osteoclast differentiation induced by receptor activator of nuclear factor-κB ligand, FEBS Letters, 528 (21-22),

3243-3248, 2008.

[58] J. Tang, H. Zhen, N. Wang et al., Curdlan oligosaccharides having higher immunostimulatory activity than curdlan in mice treated with cyclophosphamide, Carbohydrate Polymers, 207 (1), 131-142, 2019.

[59] J. Liu, J. Tang, X. Li et al., Curdlan (Alcaligenes faecalis) (1→3)-β-D-Glucan Oligosaccahrides Drive M1 Phenotype Polarizaiton in Murine Bone Marrow-Derived Macrophages via Activation of MAPKs and NF-κB Pathways, Molecules, 24 (23), 4251, 2019.

[60] X. Zhu, Y. Zhao, Y. Jiang et al., Dectin-1 signaling inhibits osteoclastogenesis via IL-33 induced inhibition of NFATc1, Oncotarget, 8 (32), 53366-53374, 2017.

[61] M. Aizawa, K. Watanabe, T. Tominari et al., Low Molecular-Weight Curdlan, (1→3)-β-Glucan Suppresses TLR2-Induced RANKL-Dependent Bone Resorption, Biological & Pharmaceutical bulletin, 41 (8), 1282-1285, 2018.

[62] S. Hara, Y. Nagai-Yoshioka, R. Yamasaki et al., Dectin-1-mediated suppression of RANKL-induced osteoclastogenesis by glucan from baker's yeast, Journal of Cellular Physiology, 236 (7), 5098-5107, 2021.

[63] M. Takami, N. Kim, J. Rho et al., Stimulation by Toll-like Receptors Inhibits Osteoclast Differentiation, The Journal of Immunology, 169 (3), 1516-1523, 2002.

[64] H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy et al., Non-viral vectors for gene-based therapy, Nature Reviews Genetics, 15, 541-555,

2014.

[65] Y. K. Sung, S. W. Kim, Recent advances in the development of gene delivery systems, Biomaterials Research, 23, 8, 2019.

[66] M. A. Mintzer, E. E. Simanek, Nonviral Vectors for Gene Delivery, Chemical Reviews, 109 (2), 259-302, 2009.

[67] R. Rai, S. Alwani, I. Badea, Polymeric Nanoparticles in Gene Therapy: New Avenues of Design and Optimization for Delivery Applications, Polymers, 11 (4), 745, 2019.

[68] S. M. Dizaj, S. Jafari, A. Y. Khosroushahi, A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors, Nanoscale Research Letters, 9 (1), 252, 2014.

[69] A. Zakeri, M. A. Kouhbanani, N. Beheshtkhoo et al., Polyethylenimine-based nanocarriers in co-delivery of drug and gene: a developing horizon, Nano Reviews & Experiments, 9 (1), 1388397, 2018.

[70] U. Lungwitz, M. Breunig, T. Blunk et al., Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 60 (2), 247-266, 2005.

[71] V. Kafil, Y. Omidi, Cytotoxic impacts of linear and branched polyethylenimine nanostructures in a431 cells, Bioimpacts, 1 (1), 23-30, 2011.

[72] S. Son, W. J. Kim, Biodegradable nanoparticles modified by branched polyethylenimine for plasmid DNA delivery, Biomaterials, 31 (1), 133-143, 2010.

[73] Y. Hu, B. H. Xu, J. J. Xu et al., Synthesis of Mannosylated Polyethylenimine and Its Potential Application as Cell-Targeting

Non-Viral Vector for Gene Therapy, Polymers, 6 (10), 2573-2587, 2014.

[74] K. Lee, D. Min, Y. Choi et al., Self-Assembling β-Glucan Nanomedicine for the Delivery of siRNA, Biomedicines, 8 (11), 497, 2020.

[75] J. Han, X. Wang, L. Liu et al., "Click" chemistry mediated construction of cationic curdlan nanocarriers for efficient gene delivery, Carbohydrate Polymers, 163 (1), 191-198, 2017.

[76] K. Lee, Y. Kwon, J. Hwang et al., Synthesis and Functionalization of β-Glucan Particles for the Effective Delivery of Doxorubicin Molecules, ACS Omega, 4 (1), 668-674, 2019.

[77] M. Tukulua, L. Gouveia, P. Paixao et al., Functionalization of PLGA Nanoparticles with (1→3)-β-glucan Enhances the Intracellular Pharmacokinetics of Rifampicin in Macrophages, Pharmaceutical Research, 35, 111, 2018.

[78] H. J. Lee, J. Park, G. J. Lee et al., Polyethylenimine-functionalized cationic barley-β-glucan derivatives for macrophage RAW264.7 cell-targeted gene delivery systems, Carbohydrate Polymers, 226, 115324, 2019.

[79] M. Zhang, J. A. Kim, Effect of molecular size and modification pattern on the internalization of water soluble β-(1→3)-(1→4)-glucan by primary murine macrophages, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 44 (6), 914-927, 2012.

[80] M. Zhang, Y. Gao, K. Caja et al., Non-Viral Nanoparticle Delivers Small Interfering RNA to Macrophages In Vitro and In Vivo, Plos One, 10, 118472-118488, 2015.

[81] M. Zhang, L. Yan, J. A. Kim, Modulating mammary tumor growth, metastasis and immunosuppression by siRNA-induced MIF reduction in tumor microenvironment, Cancer Gene Therapy, 22, 463-474, 2015.

[82] W. Jahnke, C. Henry, An in vitro Assay to Measure Targeted Drug Delivery to Bone Mineral, ChemMedChem, 5 (5), 770-776, 2010.

[83] X. Z. Zeng, L. He, S. Wang et al., Aconine inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264.7 cells by suppressing NF-κB and NFATc1 activation and DC-STAMP expression, Acta Pharmacologica Sinica, 37, 255-263, 2016.

[84] P. Ballanti, S. Minisola, M. T. Pacitti et al., Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry, Osteoporosis International, 7 (1), 39-43, 1997.

[85] X. Rao, X. Huang, Z. Zhou et al., An improvement of the 2^(delta delta CT) method for quantitative real time polymerase chain reaction data analysis, Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics, 3 (3), 71-85, 2013.

[86] H. J. Moon, S. E. Kim, Y. P Yun et al., Simvastatin inhibits osteoclast differentiation by scavenging reactive oxygen species. Experimental & Molecular Medicine, 43 (11), 605-612, 2011.

[87] X. Wu, M. A. McKenna, X. Feng et al., Osteoclast Apoptosis: The Role of Fas in vivo and in vitro, Endocrinology, 144 (12), 5545-5555, 2003.

[88] Y. Wang, D. W. Grainger, siRNA knock-down of rank signaling to control osteoclast-mediated bone resorption, Pharmaceutical Research, 27 (7), 1273-1284, 2010.

[89] K. L. Park, Rosiglitazone suppresses RANKL-induced NFATc1 autoamplification by disrupting physical interaction between NFATc1 and PPAR, FEBS Open Bio, 8 (10), 1584-1593, 2018.

[90] S. Ohmae, N. Noma, M. Toyomoto et al., Actin-binding protein coronin 1A controls osteoclastic bone resorption by regulating lysosomal secretion of cathepsin K, Scientific Reports, 7 (1), 1-12, 2017.

[91] O. Dragostin, L. Profire, Molecular weight of polymers used in biomedical applications, Characterization of Polymeric Biomaterials, 5, 101-121, 2017.

[92] W. Zauner, N. A. Farrow, A. M. Haines, In vitro uptake of polystyrene microspheres: Effect of particle size, cell line and cell density, Journal of Controlled Release, 71 (1), 39-51, 2001.

[93] M. Maaloum, N. Pernodet, B. Tinland, Agarose gel structure using atomic force microscopy: Gel concentration and ionic strength effects, Electrophoresis, 19 (10), 1606-1610, 1998.

[94] Z. J. Henneman, G. H. Nancollas, F. H. Ebetino et al., Bisphosphonate binding affinity as assessed by inhibition of carbonated apatite dissolution in vitro, Journal of Biomedical Materials Research, 85 (4), 993-1000, 2008.

[95] P. R. Taylor, G. D. Brown, D. M. Reid et al., The β-Glucan Receptor, Dectin-1, Is Predominantly Expressed on the Surface of

Cells of the Monocyte/Macrophage and Neutrophil Lineages, The Journal of Immunology, 169 (7), 3876-3882, 2002.

[96] L. Hu, T. Lind, A. Sundqvist et al., Retinoic Acid Increases Proliferation of Human Osteoclast Progenitors and Inhibits RANKL-Stimulated Osteoclast Differentiation by Suppressing RANK, Plos One, 5 (10), e13305, 2010.

[97] 박재홍, RANK siRNA의 파골세포 표적화 전달을 위한 폴리알렌드로네이트로 코팅한 자당-폴리에틸렌이민 고분자 복합체, Polyalendronate Coated Sucrose-Polyethylenimine Polyplex System for Osteoclast Targeted RANK siRNA Delivery, 서울 : 서울대학교 대학원, 서울 2020.

[98] C. Z. Wang, Y. Fu, S. Jian et al., Synthesis and characterization of cationic polymeric nanoparticles as simvastatin carriers for enhancing the osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells, Journal of Colloid and Interface Science, 432, 190-199, 2014.

Abstract

Bone and osteoclast precursor dual targeting Barley β-Glucan-Alendronate coated nanocomplexes for RANK siRNA delivery

Sohee Jeong

Department of Agricultural, Forestry and Bioresources

The Graduate School

Seoul National University

Osteoporosis is bone disease which bone density and strength decreases. Prevalence and mortality rate increases as age increases therefore alarming the world. Osteoporosis is stimulated as the balance between bone-forming osteoblast and bone-resorbing osteoclasts breaks and activity of osteoclast rises. Gene therapy such as RANK siRNA and bisphosphonate-based drugs are being studied for osteoporosis treatment, however they face limitations due to low bioavailability, side effects and low efficiency.

In this study, gene carrier was developed by conjugating natural polymer barley β-glucan and bisphosphonate based alendronate. RANK siRNA was loaded in the delivery vector to suppress osteoclast differentiation and activity by combinatorial effects. Through this study, it was confirmed that barley β-glucan-alendronate polymers exhibit higher bone targeting efficiency than general bisphosphonates, and have specific affinity for RAW264.7

cells which act as osteoclast precursors. Furthermore, barley β-glucan-alendronate shows high osteoclast apoptosis efficiency than general alendronate due to physical dispersion and activity of β-glucan. Barley β-glucan-alendronate loaded with RANK siRNA shows inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption than general osteoclasts.

In conclusion, new gene delivery vector was developed and showed high targeting efficiency and inhibitory efficiency which suggests new possibility as osteoclast inhibitor.

Keywords : Osteoporosis, Gene delivery vector, Alendronate, Barley-B-glucan, Polyethylenimine
Student Number : 2020-21853