

# 저주파 초음파를 이용한 미세기포 파괴를 통한 근육조직으로의 유전자 전달 증강에 대한 연구

삼성서울병원 심장혈관센터,<sup>1</sup> 성균관대학교 의과대학 내과학교실,<sup>2</sup> 한국표준과학연구원<sup>3</sup>

이상철<sup>1,2</sup> · 정성수<sup>3</sup> · 김선운<sup>1,2</sup> · 임성훈<sup>1,2</sup> · 조대경<sup>1,2</sup> · 권성욱<sup>1,2</sup>

이 일<sup>1,2</sup> · 김정민<sup>1</sup> · 이정선<sup>1</sup> · 성기익<sup>1</sup> · 박승우<sup>1,2</sup> · 전은석<sup>1,2</sup>

김덕경<sup>1,2</sup> · 이상훈<sup>1,2</sup> · 홍경표<sup>1,2</sup> · 박정의<sup>1,2</sup> · 서정돈<sup>1,2</sup>

## Enhancement of Gene Delivery into Mouse Skeletal Muscle with Microbubble Destruction by Low-Frequency Ultrasound

Sang-Chol Lee, MD<sup>1,2</sup>, Sung Soo Jung, PhD<sup>3</sup>, Seon Woon Kim, MD<sup>1,2</sup>, Sung Hoon Lim, MD<sup>1,2</sup>, Dae Kyung Cho, MD<sup>1,2</sup>, Sung Uk Kwon, MD<sup>1,2</sup>, Il Rhee, MD<sup>1,2</sup>, Jeong-Min Kim, BS<sup>1</sup>, Jung-Sun Lee, MS<sup>1</sup>, Kiick Sung, MD<sup>1</sup>, Seung Woo Park, MD<sup>1,2</sup>, Eun Seok Jeon, MD<sup>1,2</sup>, Duk Kyung Kim, MD<sup>1,2</sup>, Sang Hoon Lee, MD<sup>1,2</sup>, Kyung Pyo Hong, MD<sup>1,2</sup>, Jeong Euy Park, MD<sup>1,2</sup> and Jung Don Seo, MD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Cardiac and Vascular Center, Samsung Medical Center, <sup>2</sup>Sungkyunkwan University School of Medicine and

<sup>3</sup>Korea Research Institute of Standard and Science, Korea

### ABSTRACT

**Background and Objectives :** The aim of this study was to investigate the value of microbubble destruction using low-frequency ultrasound for enhancing gene delivery to skeletal muscles of laboratory animals. **Materials and Methods :** Lac-Z gene was injected into 21 mouse anterior tibialis muscles. Seven muscles received the gene only, and seven each received either 20-kHz ultrasound exposure or ultrasound-PESDA (perfluorocarbon-exposed sonicated albumin) destruction, respectively, following the injection; the extent of Lac-Z expression was then compared. Luciferase gene was injected into the muscles (N=80). The muscles were divided into two groups according to the mixture; in the first group saline was used as the mixture solute, with PESDA used in the second group. The groups were subdivided into two groups, one received 10 seconds of ultrasound at the injection site after injection, and the other that received no further intervention. Luciferase activities were measured and compared. **Results :** The proportions of Lac-Z stained cells were 0,  $5.7 \pm 1.2$  and  $7.7 \pm 1.7\%$ , respectively, showing a significant stepwise increase microbubble destruction ( $p < 0.05$ ). Luciferase activities were as follows: Luciferase only (Group 1, N=17),  $5727 \pm 2178$  RLU/mg; luciferase plus PESDA (Group 2, N=17),  $1170 \pm 470.7$  RLU/mg; luciferase plus ultrasound (Group 3, N=17),  $16480 \pm 5239$  RLU/mg; and luciferase plus PESDA destruction (Group 4, N=17),  $49910 \pm 16500$  RLU/mg. The activity in group 4 was significantly higher than in group 1 ( $p < 0.01$ ), showing an 8.7-fold increase in gene delivery due to microbubble destruction. **Conclusion :** Microbubble destruction using low-frequency ultrasound is an efficient method for increasing the efficacy of direct gene delivery to skeletal muscles. (Korean Circulation J 2006;36:32-38)

**KEY WORDS :** Gene therapy ; Microbubbles ; Ultrasound.

논문접수일 : 2005년 9월 21일

수정논문접수일 : 2005년 11월 15일

심사완료일 : 2005년 11월 28일

교신저자 : 이상철, 135-710 서울 강남구 일원동 50 삼성서울병원 심장혈관센터, 성균관대학교 의과대학 내과학교실

전화 : (02) 3410-3419 · 전송 : (02) 3410-3849 · E-mail : sclee@skku.edu

## 서 론

1990년 최초로 사람에 대한 유전자 요법의 임상연구가 시작된 이래<sup>1)</sup> 다수의 연구자들이 여러 방법을 통해 유전자 전달을 시도해 왔으며 현재 허혈성 혈관질환에서 유전자 요법이 가장 많이 시도되고 있는 경우는 하지의 혈관질환으로 국소적으로 혈관 폐색이나 협착이 발생한 부위에 혈관신생 유전자를 주입하여 신생혈관이 발생하도록 유도하는 요법이 동물실험을 통해 개발되어 현재 임상 시험 단계에 있다.<sup>2-4)</sup>

유전자 요법에서 가장 중요한 고안점의 하나는 적절한 양의 유전자를 목표 조직에 성공적으로 전달하는 방법이다. 이를 위하여 여러 가지 벡터를 이용하여 문제가 되는 조직에 직접 유전자를 주입하여 전달을 증강시키는 것이 시도되고 있으며<sup>5)6)</sup> 궁극적으로는 비관혈적인 방법인 정맥 주입을 통해 유전자를 체내 목표에 공급하고자 하는 노력도 진행 중이다. 그런데 유전자 요법에서 가장 일반적으로 사용되는 바이러스 벡터의 경우 벡터 자체로 인한 병태생리학적 효과를 유발할 수 있으며<sup>5)</sup> 또한 혈관신생 유전자와 같은 증식인자의 전신적인 요법에서는 새로운 악성 종양의 발생 우려도 있어 이에 대한 문제 제기도 지속되고 있다.<sup>7)</sup>

심초음파 검사 시 심실의 조영 또는 심근 내 혈류 분포의 확인에 사용되는 미세기포는 높은 에너지의 초음파에 의해 파괴되며 이때 강한 에너지가 발생하고, 발생한 에너지는 혈관 및 조직의 투과성을 증가시켜 유전자 및 기타 물질의 조직 내 전달률을 높일 수 있는 것으로 알려져 있다.<sup>8-10)</sup> 미세기포를 이용한 유전자 전달에서는 상기와 같은 바이러스 벡터에 의한 병리학적 변화가 없으며 신생물 발생의 위험도 없는 등 안전성에 있어서 우월한 것으로 생각된다. 기존의 연구에 따르면 특히 높은 에너지를 조직에 전달하기 위해 비교적 낮은 주파수의 초음파를 사용하는 것이 유전자의 전달 효과를 높일 수 있을 것으로 보이며, 극저주파가 더욱 효과적일 것이라는 보고도 있다.<sup>11)</sup>

본 연구에서는 실험동물의 하지 조직에 직접 유전자를 주입하면서 저주파의 초음파를 단기간 조사하여 미세기포를 파괴시키는 방법을 고안하여 허혈성 혈관질환의 치료에 사용될 수 있는 효과적인 유전자 요법을 시도하여 보았다.

## 재료 및 방법

### 실험대상

6주령의 Balb/C mouse 12마리를 사용하여  $\beta$ -galactosidase(Lac-Z) 유전자와 미세기포를 주입하고 초음파를 조사한 후 Lac-Z 유전자의 발현 정도를 확인하였다. 이어 같은 종류의 mouse 40마리를 사용하여 luciferase 유전자 발현 증강을 확인하였다. 동물실험은 미국 국립보건연구원(Guide for the care and use of laboratory animals, NIH publi-

cation No. 85-2, revised 1996) 및 삼성서울병원 임상의학연구소의 동물실험규칙에 따라 실시하였다.

### 미세기포(Perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose albumin, PESDA)의 제작

Porter 등<sup>12)</sup>의 방법에 따라 실험실에서 제작 가능한 PESDA를 제작하였다. 우선 5% human albumin 용액 4 mL와 5% dextrose 용액 12 mL를 혼합하고 3-way stopcock을 이용하여 주사기 내에 존재하는 용액과 Octafluorocarbon gas (Messar, Germany) 8 mL를 혼합하였다. 혼합시 용액과 gas가 골고루 잘 섞이도록 20회 이상의 agitation을 실시한 후 용액과 gas의 혼합액에 sonicator(Sonics & Materials, USA)의 horn을 담가 1분 30초간 sonication하였다.

### 체외 실험: 조사하는 초음파의 에너지에 따른 미세기포의 파괴 정도 분석

미세기포 용액을 Hemacytometer counting chamber를 이용하여 분석, 미세기포 농도를 mm<sup>3</sup> 당으로 계산한 후 미세기포 용액을 용기에 담고 sonicator horn을 담근 후 25%의 amplitude로 10초간 sonication하였다. 같은 방법으로 sonicator를 이용하여 50%와 75%의 amplitude로 10초간 sonication 하였고 처음과 같이 sonication을 실시한 미세기포 용액 내의 미세기포 농도를 측정하여 비교하였다.

### Lac-Z 유전자 근주 후 초음파 조사와 미세기포 파괴에 의한 mouse 하지 근육 조직내 Lac-Z 염색 증가 확인

14마리의 mice를 전신마취한 후 tibialis anterior muscle을 dissection하여 노출시키고 Lac-Z 유전자(10  $\mu$ g/50 mL saline)를 양쪽 근육에 근주하였다. 두 근육 중 한쪽에 상기의 sonicator를 이용하여 20 kHz의 초음파를 10초간 조사하였다. 이어 Lac-Z 유전자-미세기포 혼합액(10  $\mu$ g/50 mL)을 다른 7마리의 tibialis anterior 근육에 근주하였고 같은 방법으로 초음파를 조사하였다. Mice를 4일간 사육한 후 희생시켜 tibialis anterior 근육을 절제하고 section하여 Lac-Z 염색을 실시하였으며 현미경으로 염색도를 관찰하고 각 근육 조직에서 염색된 세포의 분율을 측정하여 비교하였다.

### Lac-Z 유전자 근주 후 초음파 조사와 미세기포 파괴에 의한 mouse 하지 근육 조직 손상 여부 확인

상기와 같은 방법으로 5마리의 mice tibialis anterior 근육에 유전자를 주입하고 다른 5마리에는 유전자 주입 후 주입한 근육에 10초간 초음파를 조사하였다. 다음으로 유전자-미세기포 혼합액을 다른 5마리의 근육에 주입하고 역시 같은 방법으로 10초간 초음파를 조사하였다. 각 근육 표본에 H & E 염색을 실시하고 section하여 조직을 준비한 후

광학현미경으로 관찰하고 조직의 손상 정도를 확인하였다.

#### Luciferase 유전자의 근육 후 미세기포 파괴에 의한 발현 변화 확인

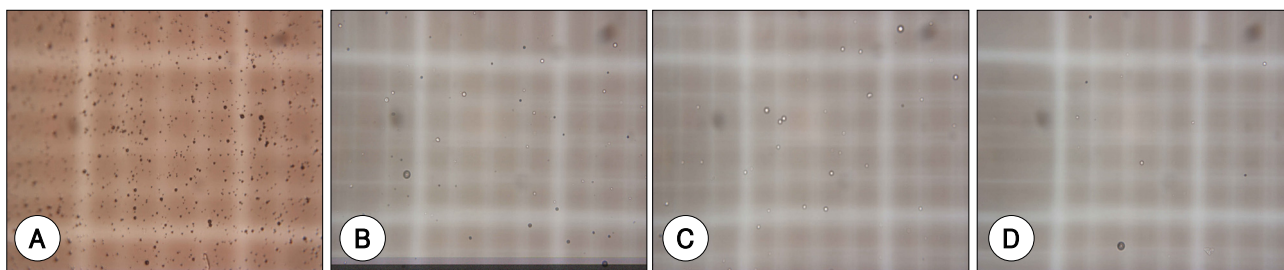
준비한 luciferase-saline 혼합액 또는 luciferase-미세기포 혼합액( $10 \mu\text{g}/50 \text{ mL}$ )을 40마리의 mice 양측 tibialis anterior muscle에 주입하고 다음과 같이 조작하였다. 실험동물은 4군으로 나누어 유전자만을 주입하는 군(1군), 유전자-미세기포 혼합액을 주입하는 군(2군), 유전자만을 주입하고 초음파를 조사하는 군(3군), 그리고 유전자와 미세기포 혼합액을 함께 주입하고 초음파를 조사하는 군(4군)으로 분류하였다. 각 mouse를 4일간 사육한 후 희생시키고 tibialis anterior 근육을 절제하였으며 절제한 근육에서 luciferase 유전자 발현을 확인하여 각 군에서의 luciferase 유전자 발현 정도를 비교 분석하였다.

#### Luciferase 유전자 발현 정도 분석 방법

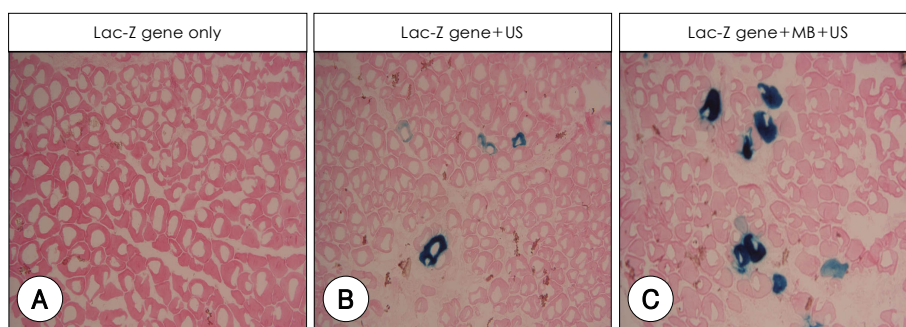
절제된 근육 조직의 질량을 측정하고 이 조직을 lysis buffer 1 mL를 이용하여 homogenize하고 이 조직 표본  $10 \mu\text{L}$ 와 luciferase assay buffer 50  $\mu\text{L}$ 를 섞어 luminometer(Turner Designs, USA)에 혼합물을 삽입하였다. 이 혼합물로부터 30초간 발생한 광량을 luminometer를 이용하여 측정하고 RLU 값을 구한 후 각 표본에서 측정된 RLU 값을 질량으로 나누어 RLU/mg 값을 구하였다.

#### 통계 방법

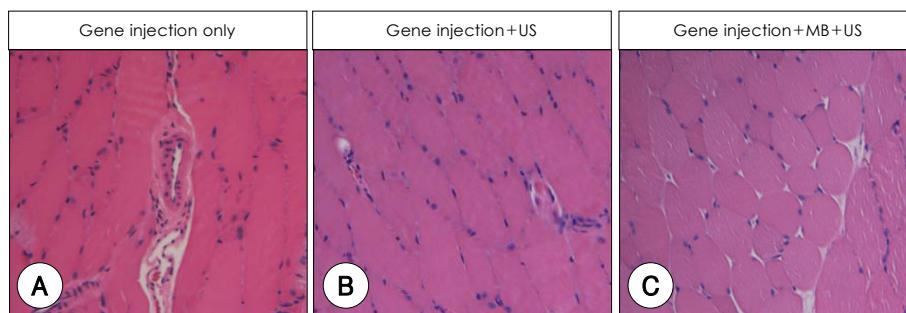
각 근육의 Lac-Z 유전자 염색 정도(%)와 luciferase 발현 정도(RLU/mg) 값의 평균과 표준편차를 구하였다. One-way ANOVA를 이용하여 각 군 간의 평균 및 표준편차를 비교 분석하고 각 군끼리의 값 차이를 Student's T-test



**Fig. 1.** Microscopic images ( $\times 200$ ) after in vitro sonication of microbubble solution. With 25% energy, the microbubble count per  $\text{mm}^3$  drops from  $1.9 \times 10^8/\text{mm}^3$  (A) to  $1.0 \times 10^7/\text{mm}^3$  (B), showing a decrease of more than 90% of microbubbles compared to baseline. Further increase in sonication energy results in increase in destruction rates, revealing 99% destruction with 50% (C,  $4.0 \times 10^6/\text{mm}^3$ ) and minor increase in rate with 75% (D,  $1.5 \times 10^6/\text{mm}^3$ ).



**Fig. 2.** Comparison between microscopic images of mice tibialis anterior muscles after Lac-Z staining ( $\times 400$ ). Lac-Z gene injection-only site, gene injection-ultrasound exposure site, and injection-microbubble destruction site after Lac-Z staining are compared. With ultrasound and microbubble destruction, visual demonstration of increase in Lac-Z gene expression is evident. US: ultrasound, MB: microbubble.



**Fig. 4.** Microscopic images of mouse anterior tibialis muscles after H & E staining ( $\times 200$ ). Lac-Z gene injection only, gene injection with ultrasound exposure, and gene injection with microbubble destruction. No visible tissue damage at microscopic level can be identified with 10 seconds of low-frequency ultrasound exposure or microbubble destruction. US: ultrasound, MB: microbubble.

를 이용하여 분석하였다.

## 결 과

### 체외 실험: 조사하는 초음파의 에너지에 따른 미세기포의 파괴 정도

25%, 50%, 그리고 75%의 amplitude를 설정하여 sonicator horn을 미세기포 용액에 담근 후 각 10초간 초음파를 조사한 결과 기저 상태에서 미세기포의 농도가  $1.9 \times 10^8/\text{mm}^3$ 로 확인된 것에 비교하여 25% amplitude에서는  $1.0 \times 10^7/\text{mm}^3$ , 50%에서는  $4.0 \times 10^6/\text{mm}^3$ , 그리고 75%에서는  $1.5 \times 10^6/\text{mm}^3$ 의 농도가 관찰되어 25%의 amplitude로 90% 이상의 미세기포가 파괴되는 것을 확인하였으며 (Fig. 1), 50%에서 99%의 파괴율이 관찰되었으나 75%까지 amplitude를 증량하였을 경우에는 50%의 경우에 비해서도 파괴율이 큰 차이를 보이지 않는 것을 관찰하였다. 이에 이후의 실험에서는 25%의 amplitude를 이용하여 미세기포 파괴를 유도하기로 하였다.

### Lac-Z 유전자 근주 후 초음파 조사와 미세기포 파괴에 의한 조직내 Lac-Z 염색

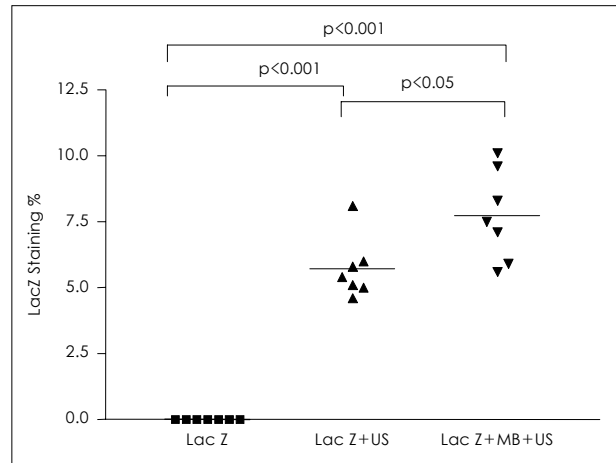
Lac-Z 유전자만을 근주한 부위와 초음파를 즉시 조사한 근육, 그리고 미세기포 파괴를 일으킨 근육 부위의 Lac-Z 염색 정도를 비교한 결과 유전자만을 근주한 부위에서 경미한 염색만이 관찰된 반면 초음파를 조사한 근육 부위에서는 염색도가 증가하였고 미세기포를 파괴시킨 부위에서는 염색된 면적이 더욱 증가한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 이어 현미경으로 관찰되는 영역의 근육세포 중 염색이 된 세포의 분율을 측정하여 비교한 바, 유전자만을 근주한 조직에서는 0%, 유전자를 주입한 후 초음파를 조사한 조직에서는  $5.7 \pm 1.2\%$ , 그리고 유전자-미세기포 혼합액 주입 후 초음파를 조사한 조직에서는  $7.7 \pm 1.7\%$ 로 초음파 조사에 의해 유의한 염색 증가가 일어났고 미세기포 파괴시에는 초음파만을 조사한 경우보다도 유의하게 증가된 분율을 보였다(각각  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 3).

### Lac-Z 유전자 근주 후 초음파 조사와 미세기포 파괴에 의한 조직 손상 여부 확인

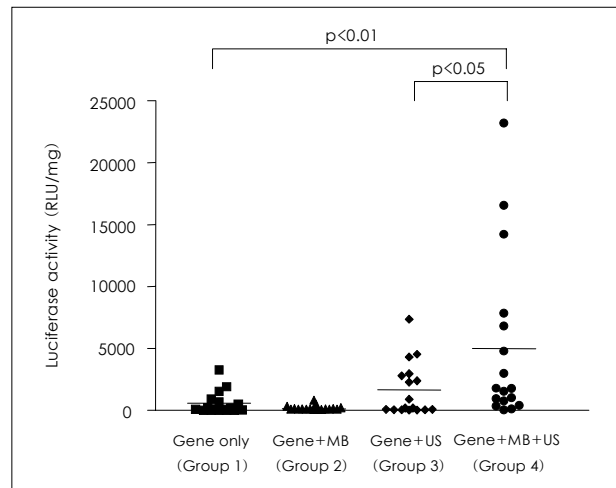
Lac-Z 유전자만을 근주한 근육과 유전자 근주 후 초음파만을 조사한 근육, 그리고 유전자 주입 후 미세기포 파괴를 일으킨 근육들을 section하여 H & E 염색한 조직 표본 15개를 관찰한 바, 근육세포의 유의한 파괴는 어떤 조직에서도 관찰되지 않았다(Fig. 4).

### Luciferase 유전자 근주 후 미세기포 파괴에 의한 발현 증강

Luciferase 유전자 발현 분석 중 유전자의 발현이 거의 일어나지 않은 조직의 결과를 제외하고 각 군에서 17개의 근육 조직에서의 발현 정도를 비교하였다(Fig. 5). 유전자



**Fig. 3.** Comparison of proportions of Lac-Z stained skeletal muscle cells. Specimens which received Lac-Z gene injection-only, gene injection and ultrasound exposure, and gene injection with microbubble destruction are compared. With ultrasound and microbubble destruction, a statistically significant increase in percentage of stained cells is demonstrated. US: ultrasound, MB: microbubble.



**Fig. 5.** Effect of low-frequency ultrasound and microbubble destruction on luciferase gene expression. Groups with gene injection only (group 1), gene-microbubble mixture injection only (group 2), gene injection with ultrasound exposure (group 3), and gene injection with microbubble destruction (group 4) are compared. Compared to group 1, no increase in gene expression can be seen in group 2. However, a 3-fold increase in gene expression in group 3, and a significant 9-fold increase in expression in group 4 are noted. US: ultrasound, MB: microbubble.

만을 주입한 군(1군)에서의 평균 유전자 발현 정도는  $5727 \pm 2178$  RLU/mg이었으며 유전자와 미세기포 혼합액을 주입한 군(2군)에서의 유전자 발현 정도는  $1170 \pm 470.7$  RLU/mg, 유전자를 주입하고 초음파를 주입 부위에 조사한 군(3군)에서의 유전자 발현 정도는  $16480 \pm 5239$  RLU/mg, 그리고 유전자와 미세기포 혼합액을 주입하고 초음파를 조사한 군(4군)에서의 유전자 발현 정도는  $49910 \pm 16500$  RLU/mg으로 확인되었으며 1군에 비해 4군에서 8.7배의 통계적으로 유의한( $p < 0.01$ ) 유전자 발현의 증가가 일어난 것으로 확인되었다. 또한, 3군에 비해서도 4군의 발현 증강은 3.0

배로 역시 통계적으로 유의한 것으로 확인되어( $p < 0.05$ ) 4 군에서의 높은 발현도는 초음파 조사만에 의해 일어난 것이 아니라 미세기포의 파괴에 의해 일어난 것으로 재확인할 수 있었다.

## 고 찰

본 실험은 극저주파의 초음파를 통하여 미세기포를 파괴함으로써 근육 조직으로의 유전자 전달이 증강될 수 있음을 보여준 최초의 보고이다. 미세기포와 초음파를 이용한 유전자 요법은 초음파로 인해 미세기포가 파괴될 때 발생하는 더욱 강한 에너지가 혈관 또는 조직의 미세한 손상을 일으키고 국소 투과성이 증가되어 세포 내로의 유전자 전달이 증폭되는 것을 원리로 한다. 유전자와 같은 고분자 물질들은 혈관에서 조직으로, 그리고 조직에서 세포 내로 쉽게 전달되지 못하여 이의 전달을 위해 다양한 벡터들이 사용되어 왔으며 물리적이거나 화학적인 여러 가지 다른 방법들도 적용되어 왔다.<sup>13)</sup> 그 한 가지 방법으로 초음파만을 이용하여 유전자 전달을 증강시키고자 하는 시도도 이루어졌으며, Kim 등<sup>14)</sup>과 Bao 등<sup>15)</sup>은 유전자 주입 부위에 국소적으로 초음파를 조사하여 세포막의 투과성을 증가시킬 수 있음을 보고하여 이를 “sonoporation”이라 명명한 바도 있다. 미세기포를 이용할 경우 이러한 유전자 전달의 증강 효과를 더욱 증폭할 수 있다. 체내에 유전자를 함유한 미세기포를 주입하거나 유전자와 미세기포를 동시에 주입한 후 초음파를 사용하여 미세기포를 파괴하면 국소적으로 강한 에너지파가 조직 또는 혈관 벽에 전달되고 이를 통해 조직의 투과성이 증대되어 다분자량 물질의 통로가 생성된다. 연구 결과에 따르면 초음파를 통해 약 1.6 mPa의 에너지가 전달될 때 실험동물의 혈관 벽 투과성이 효과적으로 증대되는 것으로 알려져 있다.<sup>16-18)</sup>

상기한 바와 같은 원리를 이용하여 체외에서와 실험동물에서 각각 여러 가지 실험이 진행되어 왔다. Price 등<sup>17)</sup>은 흰쥐의 근육에 적혈구와 고분자량의 polymer microsphere를 효과적으로 전달하였다고 보고하였고 Porter 등<sup>19)</sup>은 체외에서 실험동물의 신장에 초음파를 이용하여 유전자 부착 미세기포의 파괴를 일으켜 특정 부위에 유전자의 양이 늘어나는 것을 관찰하였다. Frenkel 등<sup>20)</sup>은 PESDA를 이용하여 체외에서 세포에 luciferase 유전자가 적절하게 전달됨을 보고한 바 있다. Taniyama 등<sup>21)</sup>도 흰쥐의 근육 세포에 luciferase 유전자와 perfluorocarbon 함유 초음파 조영제인 Optison을 함께 처리하고 1 MHz의 초음파를 조사하여 유전자 발현량이 증가하는 것을 보고하였다. 한편, Shohet 등<sup>22)</sup>은 adenovirus 전달체에 beta-galactosidase를 함유시켜 실험동물에 정주한 후 미세기포 파괴를 통해 심근에서 유전자 발현이 증가하는 것을 확인하였으며 Mukherjee 등<sup>23)</sup>은 유전자가 아닌 VEGF 단백질 자체를 미세기포와 함께 실험동

물에 정주하고 심장 부위에 초음파를 발사하여 혈관내피세포의 VEGF 섭취를 10배가량 증가시킬 수 있다고 보고한 바 있다. Lu 등<sup>24)</sup>은 실험동물의 하지 근육에 직접 EGFP plasmid와 Optison을 주입하고 초음파를 발사하여 유전자의 전달률을 부분적으로 증강시킨 결과를 보고하였다.

본 연구에서는 미세기포 파괴를 이용한 유전자 전달에서 중요한 고안점이 충분히 강한 에너지의 초음파를 적절한 깊이까지 전달하는 것이며, 이를 위해서는 일반적으로 영상 생성에 사용되는 주파수보다 낮은 극저주파의 초음파가 적절할 것으로 생각하여 유전자의 전달을 더 증강시키기 위하여 20 kHz의 극히 낮은 주파수의 초음파를 사용하였다. 기존의 연구 중 저주파의 초음파가 이 목적을 위하여 적절하다는 보고가 있으나<sup>11)25)</sup> 다른 연구자들에 의하면 이로 인해 실제로 유의한 조직 손상이 발생한다는 보고도 있어<sup>26)27)</sup> 본 실험에서는 초음파의 조사 시간을 최대한으로 짧게 하여(10 초) 조직 손상을 최소화하고자 하였다. 본 실험에서 미세기포 파괴를 통해 일어난 유전자 발현의 증강이 유의하면서도 편차가 매우 크게 나타난 원인은 기술적인 문제일 가능성이 높아 보이는데, 아마도 초음파 조사를 위해 사용된 탐촉자와 조직의 접촉 정도가 일정하지 못한 것이 가장 유력한 원인으로 사료된다. 또한 이렇게 큰 편차가 일어나도록 높은 발현도를 보인 군이 미세기포 파괴를 유도한 군 뿐이라는 점과 그럼에도 불구하고 미세기포 파괴를 통하여 10 배에 가까운 유전자 발현의 증강을 가져올 수 있었던 것으로 보아 이 방법은 비교적 손쉬운 유전자 전달의 증강 방법이라고 할 수 있겠다.

현재까지도 미세기포 파괴를 통한 유전자 등 고분자 물질의 조직 전달 증강에 가장 적합한 조건에 대해서는 여러 가지 이견이 존재하고 있으며,<sup>28)</sup> 본 실험에서 사용된 초음파의 조사시간 및 조사량 역시 재검토의 필요성이 있을 것으로 사료된다. 보다 긴 시간동안 다른 주파수의 초음파를 조사할 경우 조직 손상을 최소화하면서 유전자 전달 증강 효과를 더욱 높일 수 있을 가능성도 있으며 다른 종류의 미세기포, 예를 들어 지질을 이용하여 생성한 미세기포 등의 사용에 의해 다른 결과를 얻을 수도 있을 것으로 기대되기 때문이다. 나아가 비교적 침습적인 방법인 조직으로의 직접적인 유전자 주입보다 정주와 같이 비교적 비침습적인 방법을 이용하여 미세기포 파괴를 통해 유전자 전달을 증강시키고자 하는 노력도 지속되어야 할 것으로 보인다. 이를 위해서는 미세기포의 물리학적 특성이나 초음파와 미세기포 간의 상호작용에 관한 연구들도 더 진행되어야 할 것이다.

결론적으로, 유전자 요법은 심장-혈관질환을 비롯한 여러 가지 난치성 질환에 유용할 것으로 기대되고 있는 치료법으로 소량의 유전자를 주입하면서 그 효과를 증강시키면서도 치료의 대상이 되는 개체 또는 조직에 손상을 최소화시킬 수 있는 방법의 강구가 필요하다. 본 실험에서는 저주파의 초음파를 이용하여 미세기포의 파괴를 일으키고 그에

따라 효과적으로 유전자의 전달 및 발현의 증강을 가져올 수 있음을 보였다. 이는 유전자 요법의 가장 중요한 고안점인 국소적인 유전자 전달 증강을 해결하는데 일조할 수 있는 방법으로 생각되며 앞으로는 더욱 비침습적인 방법인 정주를 통해서도 유전자 전달의 증강을 가져올 수 있는 방법이 연구되어야 할 것이다.

## 요 약

### 배경 및 목적 :

유전자 요법은 난치성 허혈성 혈관질환의 치료에 효과적인 것으로 기대되고 있는 치료법이나, 전신적인 유전자 요법은 악성종양 등의 문제를 불러올 수 있고 기존의 바이러스 벡터 등은 환자에서 염증 등 이상반응을 일으킬 수 있어 더 나은 유전자 전달 방법이 강구되고 있다. 본 연구에서는 실험동물에서 저주파 초음파를 이용하여 미세기포 파괴를 유도하고 이를 통해 근육으로의 유전자 전달을 증강시키는 효과를 보고자 하였다.

### 방 법 :

21개의 생쥐 하지 근육에 Lac-Z 유전자 10  $\mu$ g을 주입하였다. 7개의 근육에는 유전자만을 주입하였고, 7개에는 유전자 주입 후 20 kHz의 저주파 초음파를 조사하였으며 나머지 7개에는 유전자와 미세기포(PESDA) 혼합액을 주입하고 초음파를 조사하였다. 이후 각 근육 조직에서 염색된 세포의 분율을 측정하여 비교하였다. 이어 40마리의 생쥐 양측 하지 근육에 luciferase 유전자 10  $\mu$ g을 다음과 같이 주입하였다. 실험동물을 4군으로 나누어 유전자만을 주입하는 군(1군), 유전자-미세기포 혼합액을 주입하는 군(2군), 유전자만을 주입하고 초음파를 조사하는 군(3군), 그리고 유전자와 미세기포 혼합액을 함께 주입하고 초음파를 조사하는 군(4군)으로 분류하여 주입과 조작을 실시하였다. 각 하지 근육에서 luciferase 유전자 발현을 확인하여 각 군에서의 유전자 발현 정도를 비교 분석하였다.

### 결 과 :

Lac-Z 유전자로 염색된 부분은 초음파를 조사한 근육에서만 관찰되었고 미세기포 파괴를 동반한 근육에서 증가되는 것이 관찰되었다. 염색된 세포의 분율은 각 군에서 0%,  $5.7 \pm 1.2\%$ , 그리고  $7.7 \pm 1.7\%$ 로 초음파 조사에 의해 유의한 염색 증가가 일어났고 미세기포 파괴시에는 초음파만을 조사한 경우보다도 유의하게 증가된 분율을 보였다. Luciferase 유전자 주입시 유전자 발현 정도는 1군에서 4군까지 각각  $5727 \pm 2178$  RLU/mg,  $1170 \pm 470.7$  RLU/mg,  $16480 \pm 5239$  RLU/mg,  $49910 \pm 16500$  RLU/mg으로 1군에 비해 4군에서 8.7배의 유의한( $p < 0.01$ ) 유전자 발현의 증가가 일어났다. 3군에 비해서도 4군의 발현 증가는 3.0배로 역시 유의하였다( $p < 0.05$ ). 1군과 2군 사이에 유의한 발현 정도 차이는 없었다.

### 결 론 :

저주파 초음파를 이용하여 미세기포를 파괴하는 방법은 근육으로의 국소적인 유전자 전달 증강에 효과적인 방법이다.

**중심 단어 :** 유전자 치료 ; 미세기포 ; 저주파 초음파.

본 연구는 대한순환기학회 2002년도 산학협동연구비 지원에 의해 이루어졌음.

## REFERENCES

- 1) Choi JH, Kim DK. *Therapeutic angiogenesis for cardiovascular diseases: the present and future*. Korean Circ J 2003;33:739-45.
- 2) Jang YS, Park HY. *Gene therapy for cardiovascular disease*. Korean Circ J 2000;30:772-9.
- 3) Kim HJ, Kim DK. *Angiogenic gene therapy in patients with ischemic cardiovascular diseases*. Korean Circ J 2003;33:7-14.
- 4) Rajagopalan S, Mohler ER 3rd, Lederman R, et al. *Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication*. Circulation 2003;108:1933-8.
- 5) Verma IM, Somia N. *Gene therapy: promises, problems and prospects*. Nature 1997;389:239-42.
- 6) Kay M, Liu D, Hoogerbrugge PM. *Gene therapy*. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:12744-6.
- 7) Sivakumar B, Harry L, Paleolog E. *Modulating angiogenesis: more vs less*. JAMA 2004;292:972-7.
- 8) Porter TR, Xie F. *Therapeutic ultrasound for gene delivery*. Echocardiography 2001;18:349-53.
- 9) Lindner JR. *Evolving applications for contrast ultrasound*. Am J Cardiol 2002;90 (Suppl):72J-80J.
- 10) Tachibana K. *Emerging technologies in therapeutic ultrasound: thermal ablation to gene delivery*. Hum Cell 2004;17:7-15.
- 11) Porter TR, Hiser WL, Kricsfeld D, et al. *Inhibition of carotid artery neointimal formation with intravenous microbubbles*. Ultrasound Med Biol 2001;27:259-65.
- 12) Porter TR, Xie F, Kricsfeld A, Kilzer K. *Noninvasive identification of acute myocardial ischemia and reperfusion with contrast ultrasound using intravenous perfluoropropane-exposed sonicated dextrose albumin*. J Am Coll Cardiol 1995;26:33-40.
- 13) Niidome T, Huang L. *Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors*. Gene Ther 2002;9:1647-52.
- 14) Kim HJ, Greenleaf JF, Kinnick RR, Bronk JT, Bolander ME. *Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells*. Hum Gene Ther 1996;7:1339-46.
- 15) Bao S, Thrall B, Miller D. *Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro*. Ultrasound Med Biol 1997;23:953-9.
- 16) Skyba DM, Price RJ, Linka AZ, Skalak TC, Kaul S. *Direct in vivo visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects on tissue*. Circulation 1998;98:290-3.
- 17) Price RJ, Skyba DM, Kaul S, Skalak TC. *Delivery of colloidal particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound*. Circulation 1998;98:1264-7.
- 18) Newman CM, Lawrie A, Briskin AF, Cumberland DC. *Ultrasound gene therapy: on the road from concept to reality*. Echocardiography 2001;18:339-47.
- 19) Porter T, Iversen PL, Li S, Xie F. *Interaction of diagnostic ultrasound with synthetic oligonucleotide-labeled perfluorocar-*

- bon-exposed sonicated dextrose albumin microbubbles. J Ultrasound Med* 1996;15:577-84.
- 20) Frenkel PA, Chen S, Thai T, Shohet RV, Grayburn PA. *DNA-loaded albumin microbubbles enhance ultrasound mediated transfection in vitro. Ultrasound Med Biol* 2002;28:817-22.
  - 21) Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka I, et al. *Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. Gene Ther* 2002;9:372-80.
  - 22) Shohet RV, Chen S, Zhou YT, et al. *Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium. Circulation* 2000;101:2554-6.
  - 23) Mukherjee D, Wong J, Griffin B, et al. *Ten-fold augmentation of endothelial uptake of vascular endothelial growth factor with ultrasound after systemic administration. J Am Coll Cardiol* 2000;35:1678-86.
  - 24) Lu QL, Liang HD, Partridge T, Blomley MJ. *Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. Gene Ther* 2003;10:396-405.
  - 25) Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. *Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. Pharm Res* 1996;13:411-20.
  - 26) Shupak A, Arieli R, Rosenhouse G, Resnick MB, Arieli Y, Adir Y. *The effect of low-frequency ultrasound on immersed pig lungs. Ultrasound Med Biol* 1999;25:1439-43.
  - 27) Karsch U, Henn W, Seyfert UT, Steudel WI, Reif J. *Effect of high power ultrasound on endothelial cells--an in vitro study of the endothelium--hemostasis interaction. Clin Hemorheol Microcirc* 2002;27:123-35.
  - 28) Tsutsui JM, Grayburn PA, Xie F, Porter TR. *Drug and gene delivery and enhancement of thrombolysis using ultrasound and microbubbles. Cardiol Clin* 2004;22:299-312.