약제학회지(2005), 제 35 권 제 1 호
*J. Kor. Pharm. Sci.*, Vol. 35, No. 1, 17-23 (2005)

# Plasmid DNA의 세포전이에 대한 PEI 분자량의 영향

이경만 · 김인숙 · 이용복 · 신상철 · 오인준†
*전남대학교 약학대학 약품개발연구소*
(2004년 12월 5일 접수 · 2004년 12월 28일 승인)

# Effect of Molecular Weight of Polyethylenimine on the Transfection of Plasmid DNA

**Kyung-Man Lee, In-Sook Kim, Yong-Bok Lee, Sang-Chul Shin and In-Joon Oh†**
*College of Pharmacy, Research Institute of Drug Development, Chonnam National University, Gwang-Ju 500-757, Korea*
(Received December 5, 2004 · Accepted December 28, 2004)

**ABSTRACT**–Polyethylenimine (PEI) has been used as cationic polymers for efficient gene transfer without the need for endosomolytic agents. Various kinds of PEIs with different molecular weight were tested in order to investigate the effects of the molecular weight of PEI on the transfection efficiency and cell cytotoxicity. The β-galactosidase expression (pCMV-β-gal) plasmid was used as a model DNA. Complex formation between PEI and pDNA was assessed by 1% agarose gel electrophoresis method. Particle size and zeta-potential of complexes were determined by electrophoretic light scattering spectrometer. *In vitro* transfection efficiency was assayed by measuring β-galactosidase activity. Cell cytotoxicity was determined by MTT assay. Particle sizes of the complexes became smaller on increasing molecular weights of PEI and N/P ratios. Surface potential of complexes was increased as the molecular weight of PEI increased. Transfection efficiency of pCMV-β-gal on the HEK 293 cells was greatest with PEI 25 K system but having the lowest cell viability. PEI with high molecular weight showed higher transfection efficiency and cell viability than PEI with low molecular weight.

**Key words**–Polyethylenimine, Plasmid DNA, Transfection, Gene delivery, Molecular weight

유전자 전달계는 크게 바이러스성 벡터를 이용하는 방법과 비(非)바이러스성 벡터를 이용하는 방법의 두 종류로 나눌 수 있다. 비바이러스성 벡터는 유전자를 조직에 축적되도록 조절하는 데에 바이러스성 벡터를 능가하는 장점이 있다. 이는 유전자 전달체를 조직에 축적하도록 결정하는 물리화학적 인자인 입자 크기, 전하, 특이적 리간드의 결합 등을 비바이러스성 벡터에서는 쉽게 조절할 수 있기 때문이다.[1] 비(非)바이러스성 전달계는 리포솜을 이용한 lipoplex와 양이온성 고분자를 이용한 polyplex 운반체로 분류할 수 있다.[2] 특히 양전하를 가진 고분자 중 polyethylenimine (PEI)은 효율적인 세포전이 전달체로서 광범위하게 연구되고 있는 물질 중의 하나이다. PEI는 선형 또는 가지형 구조를 이루고 있으며 높은 양이온성 전하 밀도를 갖고 있어 DNA와 같은 음전하를 소유한 분자와 결합하여 꾸러미를 만들 수 있다.[3] 또한 PEI는 *in vitro*나 *in vivo*에서 세포 내로 플라스미드 DNA (pDNA)를 전달하는데 poly-L-lysine과는 달리 엔도솜 파열 시약 또는 리소좀 파열 시약 없이도 사용될 수 있는 효율적인 유전자 전달체이다. PEI-DNA 복합체는 세포 내에 쉽게 엔도사이토시스되고 PEI의 높은 완충용량 때문에 리소좀의 효소에 의한 DNA 분해를 막을 수 있다. PEI의 매 3번째 원소가 질소이므로 pH가 7에서 5로 떨어지면 전체 수소화 수준은 20%에서 45%로 증가하여 PEI 고분자 구조가 스펀지처럼 된다. 이것은 엔도솜 내의 이온 농도가 증가하게 되고 물의 유입에 의해 고분자의 팽윤이 일어나게 되기 때문이다. 낮은 pH에서 엔도솜의 산화를 막아주고 많은 이온과 물이 유입되게 하여 리소좀이 부풀리게 되고 엔도솜이나 리소좀의 파열을 이끌어 PEI-DNA 복합체를 세포액 공간으로 전달하도록 한다. 또한 PEI는 산성 pH에서 적절하게 작용하는 리소좀의 누클레아제의 작용을 억제할 뿐 아니라 액포의 삼투농도를 바꾸기도 한다.[4] PEI-DNA 복합체는 리소좀 내에 축적되고 작은 국소적인 막의 파열로 인해 방출된다.[5] 그리고 아주 적은 양의 복합체만이 핵에 도달된다. 복합체의 세포 유입보다는 복합체의 리소좀 부위에서 핵으로의 이동이 세포 전이 과정에서 율속단계라고 알려져 있다. PEI-DNA 복합체는

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 062)530-2927, E-mail : ijoh@chonnam.ac.kr

*in vitro*에서는 광범위한 적용에서 높은 활성을 보여주고, *in vivo*에서는 국소적인 적용에서의 좋은 결과를 보여준다.[6] 또한 PEI-DNA 복합체는 DNA 분해효소에 의한 분해를 막아준다.[7,8]

전이유전자의 유효한 발현에 대한 PEI-DNA 복합체의 최소 조건은 세포 형태, *in vivo* 또는 *in vitro* 조건, 투여 방법 등 실험 상황에 따라 달라진다. *In vitro* 실험은 PEI-DNA 복합체의 세포전이를 위한 필요조건에 대해 더욱 세밀한 정보를 제공할 수 있다. PEI의 다양성, 분자량, 가지형 정도 등은 유전자 이송 효율에 영향을 미치는 인자들이다. Godbey 등[9]은 *in vitro* 조건에서 분자량이 증가함에 따라 세포 전이 효율이 증가하며, 이용된 PEI의 pH에 대해서는 영향이 없다는 결과를 발표한 반면, Abdallah 등[10]은 고분자량 PEI로 만든 polyplexes가 세포 전이 효율을 감소시킨다고 발표했다. Fischer 등[11]은 작은 PEI가 배양된 세포 내에서 transgene expression이 더 유력하다고 하였다. 위와 같은 상이한 실험결과를 검토하기 위하여 시판되고 있는 여러 종류의 PEI에 대하여 분자량의 차이가 PEI-DNA 복합체의 형성에 어떠한 영향을 주며 이에 따른 물리화학적 성질이 세포 전이 효율과 세포 독성에 미치는 효과를 알아보고자 하였다.

## 실험 방법

### 시약 및 재료

분자량이 0.8 K (branched), 25 K(branched) 및 750 K (branched)인 PEI는 Aldrich사 (Milwaukee, WI, USA)에서, 10 K(branched)와 70 K(branched)는 Polysciences사 (Warrington, PA, USA)에서 구입하여 사용하였다. TAE buffer, Ethidium bromide, EMEM 배지, Lipofectin™ 시약, reporter lysis buffer, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 시약 등을 사용하였다. pCMV-β-gal plasmid는 DH5α에서 확대되고 Qiagen high speed plasmid kit를 사용하여 분리하였다. 정제된 pDNA의 순도는 1% 아가로스 겔에서 전기영동으로 확인하였고, DNA의 농도는 260 nm의 흡광도를 측정하여 평가하였다.

### PEI-DNA 복합체 제조

준비된 PEI와 pDNA 용액을 N/P비 별로 혼합하였다. 1 μl의 PEI 용액은 10 nmol의 아민에 해당되고 1 μg의 pDNA는 3 nmol의 인산에 해당된다. 연이어 PBS로 희석된 PEI와 DNA를 잘 혼합하여 20분간 실온에 둔 후 형성된 PEI-DNA 복합체를 사용하였다.[12]

### 전기영동

pDNA와 PEI 복합체 형성 정도를 측정하기 위하여 1% 아가로스 겔 전기영동 실험을 하였다.[13] 아가로스 시약 0.3 g을 TAE buffer 30 ml에 넣어 2분간 가열 후 시료가 녹으면 DNA염색을 위해 10 mg/ml Ethidium bromide 용액 1.5 μl를 첨가하여 아가로스 겔을 제조하고, 여기에 PEI-DNA 복합체를 조심스럽게 넣어준 다음 전기영동장치의 전압을 100 V 걸어주고 1시간 정도 지난 후 이동된 밴드를 UV-발광기로 확인하였다. 1 kb의 DNA ladder (Bioneer, San Diego, CA, USA)를 크기 대조군으로 사용하였다.

### 복합체의 입도 분석 및 제타 전위 측정

복합체의 입자 크기를 측정하기 위하여 광산란 입도분석기(ELS-8000, Otsuka, Japan)를 사용하였다. 20 μg의 pDNA를 N/P 비에 따라 PEI와 혼합한 후 20분간 둔 다음 증류수로 희석하여 최종 부피를 2 ml로 하였다. 형성된 복합체의 입자 크기를 측정하였다.

복합체의 표면 전위를 측정하기 위하여 전기영동의 이동도를 이용한 제타전위 측정기(ELS-8000, Otsuka, Japan)를 사용하였다. 100 μg의 pDNA를 N/P 비에 따라 PEI와 혼합한 후 증류수로 희석하여 최종 부피를 10 ml로 하였다. 분산된 복합체의 표면 제타전위를 측정하였다.

### 세포 전이율 평가

5% $CO_2$에 37°C로 유지된 배양기에서 10% FBS와 항생제가 들어있는 EMEM 배양액에 인간 배아신세포 (HEK-293)를 유지시킨 후 12 well plate에 세포를 $2\times10^5$ cells/well로 깔고 24시간 배양하였다. 각 N/P 비로 계산된 복합체 용액을 각 well에 첨가한 후 8시간 동안 배양한 다음 다시 EMEM(+)로 배양액을 갈아주었다. 세포로부터 배양액을 제거하고 PBS로 2회 씻고 lysis 용액을 가해 세포를 용해하고 얻어진 세포 분해물을 17,000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하였다. 상층액에 기질용액인 o-nitrophenyl β-D-galactopyranoside를 첨가시켜 30분 동안 발색시킨 후 ELISA (ELX808, BIO-TEK, USA)로 420 nm에서 흡광도를 읽어 전이율을 측정하였다.

### MTT 측정법

HEK 293 세포를 12-well plate에 $2\times10^5$ cells/well 농도로 분주하고 24시간 배양하였다. 제조한 PEI-DNA 복합체를 앞에 기술한 세포전이 실험을 하고나서 배양액을 새로 교체한 다음 0.2% MTT 용액 50 μl를 각 well에 첨가하여 혼합하고 4시간 배양하였다. 보라색의 formazan 결정이 생

성되면 배양액을 모두 제거하고 DMSO 300 μl를 첨가해 결정을 용해시키고 얻어진 보라색 용액을 ELISA에서 540 nm로 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

### Cell Morphology

세포 $1 \times 10^5$개를 12-well plate에 분주한 다음 24시간 동안 37°C, 5% $CO_2$ 배양기에서 배양하였다. 역상현미경(IX51, Olympus, Japan)의 배율을 100X로 맞춘 다음 2시간 및 4시간 경과 후에 촬영하고 새로운 배양액으로 교체하였다. 24시간 후와 48시간에 다시 세포 상태를 촬영하였다.

## 결과 및 고찰

### 아가로스 겔 전기영동

pDNA와 PEI 복합체의 형성 정도를 측정하기 위하여 전기영동 실험을 하였다. 복합체가 형성되지 않은 pDNA는 겔 속으로 이동되고 복합체가 형성되면 이동되지 못하고 정체되게 되므로 PEI의 pDNA 응축 정도를 확인할 수 있다. PEI-DNA 복합체를 PEI 내의 전체 질소원자의 농도 (N)와 pDNA에서 인산기 (P)의 농도 비인 N/P 비에 따라 제조하여 N/P 비에 따른 전기영동 실험을 하였다. PEI 분자량 0.8 K에서는 복합체가 충분히 이루어지지 않아 N/P = 3 이상에서도 pDNA가 이동되었다 (Figure 1). 10 K, 25 K, 70 K 및 750 K에서는 N/P = 3 이상에서 복합체가 충분히 이루어져 복합체가 이동되지 않았다. 이로써 PEI의 분자량이 작으면 complex가 충분히 이루어지지 않고 분자량이 10 K 이상이면 complex가 충분히 이루어짐을 알 수 있었다. N/P = 1에서는 다섯 가지 시료 모두 복합체가 충분히 이루어지지 않아 pDNA가 이동되었다. 그러나 N/P 비가 3, 5, 7로 증가함에 따라 충분한 결합이 이루어져 pDNA가 이동되지 않았다. N/P 비가 커질수록, 즉 PEI의 양이 많아질수록 복합체가 더 잘 이루어짐을 알 수 있었다. 일반적으로 선형 PEI 고분자는 접촉의 수가 작아 효율적인 DNA 응축이 되지 않아 더 많은 PEI가 필요하게 된다. 최적의 전이 조건에서 pDNA는 완전히 polyplex에 혼합되어지고 대부분의 경우 과잉의 다가 양이온이 최대의 transgene 발현이 얻어지는데 필요하다.[14]

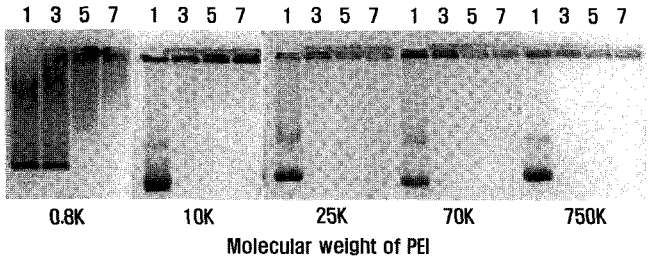


**Figure 1**–Agarose gel electrophoresis of various PEI-DNA complexes depending on the N/P ratio.

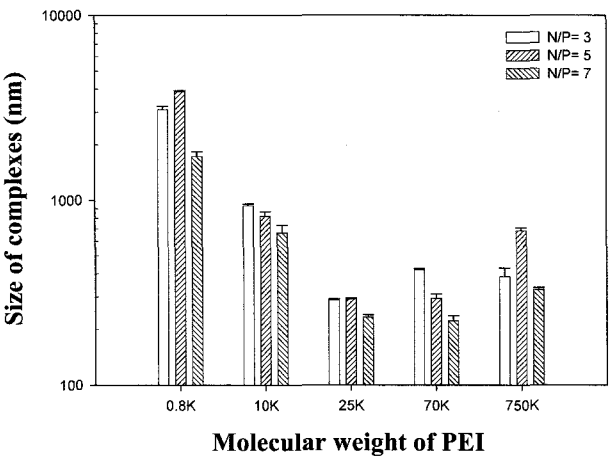


**Figure 2**–Effects of the molecular weight of PEI and N/P ratio on the particle size of PEI-DNA complexes.

### 입도 분석

복합체의 크기는 벡터의 기능에 영향을 줄 수 있는 인자 중 하나이다. 입자의 크기 측정을 동적 광산란계를 이용하여 측정하였다. PEI의 분자량이 커지면 입자 크기가 감소하여 PEI 25 K일 때 가장 작고 PEI의 분자량이 증가하면 다시 약간 증가함을 보였다 (Figure 2). Zhang 등[15]은 분자량이 25 K에서 100 K로 커지면 입자 크기가 증가하고, 선형 고분자가 가지형에 비해 큰 입자 크기를 보이고 있다고 보고하였다. PEI 0.8 K의 경우 N/P 비를 증가시켜도 1 μm 이상의 크기를 갖고 있었다. PEI 25 K와 70 K의 경우 N/P 비가 증가함에 따라 복합체의 크기가 거의 200 nm까지 감소하였다. PEI 0.8 K에서는 PEI-DNA 복합체가 느슨하게 결합되어 크기가 크고, 10 K이상에서는 복합체가 충분히 응축되어짐을 알 수 있다. 또한 N/P 비가 커질수록 크기가 작아지는데 이는 PEI의 양이 증가할수록 DNA를 더 잘 응축하기 때문이라고 생각된다. 입자의 유체 직경이 큰 것은 DNA의 약한 수축 이거나 polyplex의 응집 때문이라고 알려져 있다.[16] *In vitro* 평가에서 polyplex의 활성의 예측에 충분하지는 않지만 입자가 응집이 일어나지 않는 것이 유전자 전달계에서 필수적이다.[14] 세포 내 endocytosis 하기 위해서는 입자 크기가 충분히 작아야 할 필요가 있다. 그러나 submicrometer 범위에서는 큰 입자가 오히려 세포 전이 효율이 높다. 이는 큰 복합체는 쉽게 침강하여 세포에 부착되고 세포 내 유입이 촉

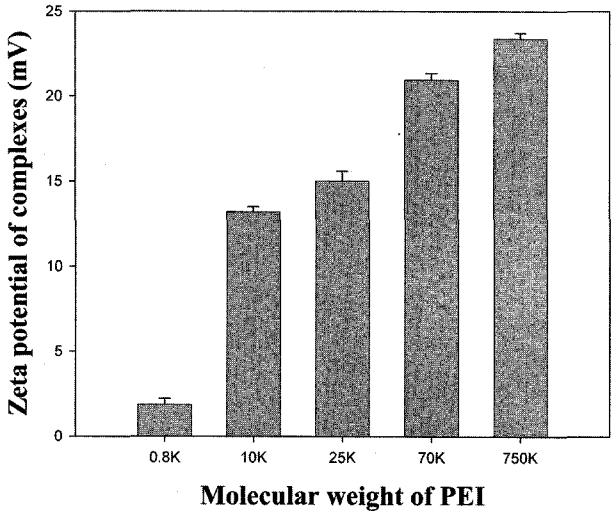


**Figure 3**–Change of zeta-potential of PEI-DNA complexes depending on the molecular weight of PEI (N/P ratio=5).

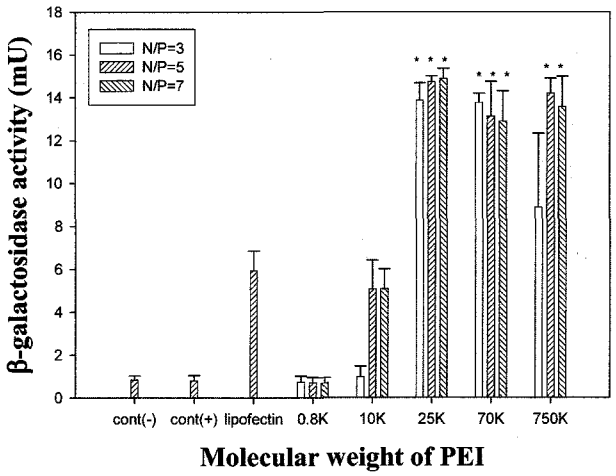


**Figure 4**–Comparison of various PEI-mediated transfectios of HEK 293 cells. All data were presented as mean standard deviation from at least three separate experiments. Cont (–) and cont (+) mean the blank solution and naked DNA, respectively. Lipofectin™ was used as standard assay.
*$p<0.01$ compared with Lipofectin™

진되기 때문이다.[15] 즉 Brown 운동을 극복할 정도로 입자 크기가 충분히 크면 세포 표면에 안치하여 전이가 일어나게 되지만 입자가 지나치게 커지면 세포 내에 효율적으로 endocytosis 되지 못한다. PEI 25 K와 70 K가 500 nm 이하의 크기를 갖고 있고 이로 보아 25 K와 70 K의 PEI를 사용해 만든 복합체가 세포 전이에 적당할 것이라고 예측할 수 있다.

### 복합체의 제타전위

PEI의 분자량 변화에 따라 복합체의 제타전위를 측정하였다. 분산 상태에 있는 PEI-DNA 복합체의 표면 제타전위 값은 분자량이 커짐에 따라 커짐을 알 수 있다 (Figure 3). 이로써 고분자량의 PEI로 만들어진 PEI-DNA 복합체일수록 표면 제타전위의 (+) 전하 값이 더 크므로 (–) 전하를 띠고 있는 세포벽을 더 잘 통과할 것임을 예측할 수 있다.

### β-Galactosidase 활성도

복합체의 *in vitro* 전이율을 평가하기 위해서 여러 종류의 PEI-DNA 복합체를 제조하였고, 이에 따른 HEK 293 세포에서의 β-galactosidase plasmid인 pCMV-β-gal의 일시적인 발현을 이용하여 세포 전이율을 평가하였다. 각 well에서 2조씩 3번의 별개의 실험을 하였다. 최적의 전이 비를 결정하기 위하여 여러 N/P 비에서 만들어진 polyplex를 가지고 24시간 배양된 세포에서의 전이를 보았다. β-Galactosidase 활성을 평가한 결과, 0.8 K를 제외한 polyplex가 유의성있는 전이율을 보이고 있었고 대조군으로 사용된 naked DNA는 아주 낮은 전이율을 보이고 있었다 (Figure 4). 전이 효율은 N/P 비에 따라 약간은 달라지고 있었다. pDNA는 크고 (–)로 하전되기 때문에 세포내로 유입이 제한을 받게 된다. 따라서 양이온성 전달체와 복합체를 형성함으로써 전달을 증가시킬 수 있다. PEI의 분자량이 커질수록 복합체가 세포 내로 잘 전달되고, 세포 내에서 발현이 잘 됨을 볼 수 있다. 특히 25 K에서 복합체가 가장 세포 전이 효율이 높음을 알 수 있다. PEI 25 K는 불규칙적인 가지형 분자로서 1차, 2차, 3차 아민의 비율이 대략 비슷하게 포함되어 있는 양이온성 고분자이다.[14] 이 물질은 *in vitro* 뿐 아니라 *in vivo* 조건에서도 뛰어난 효율을 나타내는 것으로 알려져 있다.[17] PEI의 분자량이 작은 0.8 K와 10 K의 경우 낮은 전이 효율을 보이고 있는데 이것은 입자의 크기가 1 μm보다 훨씬 커진 복합체가 형성되어 세포내의 유입이 어렵기 때문으로 추측된다. Fisher 등[11]의 결과와 다른 현상을 보인 이유는 Fisher 등이 사용한 PEI는 자체 합성한 branching 정도가 적은 PEI (11.9 K)를 사용하였고, 높은 N/P 비 (N/P = 66.66)의 차이 때문으로 사료된다. 대조군으로서 Lipofectin™을 사용하여 세포 전이율을 비교하였다. Lipofectin™은 양이온성 지질인 DOTMA와 colipid인 DOPE의 1:1 (w/w) 혼합물로서 시중에서 쉽게 구할 수 있는 대표적인 비바이러스성 세포 전이 시약이다. Lipofectin™은 제조회사에서 제시한 조건으로 pDNA와 복합체를 제조하여 세포 전이율을 측정하였다. 일반적으로 PEI는 상업적인 Lipofectin™ 또는 Lipofectamine과 비교할 때 여러 세포군에서 거의 비슷한 세포 전이 효율을 보이고 있다.[4] 이 결과에서는 PEI가 더 뛰어난 세포 전

이를 나타내고 있다. Godbey 등[9]은 큰 PEI 분자가 세포 내에 복합체의 도입을 더 잘하게 하거나 운반하는 pDNA를 더 잘 보호하는 효과 때문이라고 하였다. PEI 분자량이 커지면 입자의 크기 및 제타 전위 값이 세포 유입에 적절하기 때문이라고 추측할 수 있다.

### 세포 독성

양이온성 비바이러스성 벡터인 PEI polyplex의 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT 실험을 하였다. PEI 0.8 K, 10 K에서는 세포 생존율이 높고, 70 K, 750 K에서는 N/P = 3에서 가장 높고, N/P 비가 커짐에 따라 세포 생존율이 낮아졌다 (Figure 5). PEI 25 K에서는 실험한 N/P 비에 관계없이 생존율이 낮았다. PEI-DNA 복합체는 세포에 있어서 외부물질이므로 외부 DNA의 발현은 세포의 생존율을 낮출 수 있는데, 25 K의 PEI-DNA 복합체가 세포 내에서 발현이 가장 잘 되므로 세포의 생존율이 가장 낮았을 것

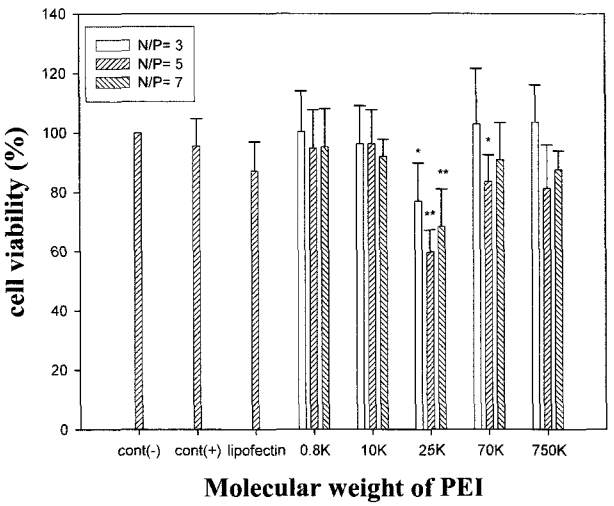


**Figure 5**–Cell viability of HEK 293 cells with various PEI-DNA complexes. Cytotoxicity was determined by the MTT assay. All data were presented as mean standard deviation from at least three separate experiments. *p<0.05 compared with cont (+), **p<0.01 compared with cont (+)

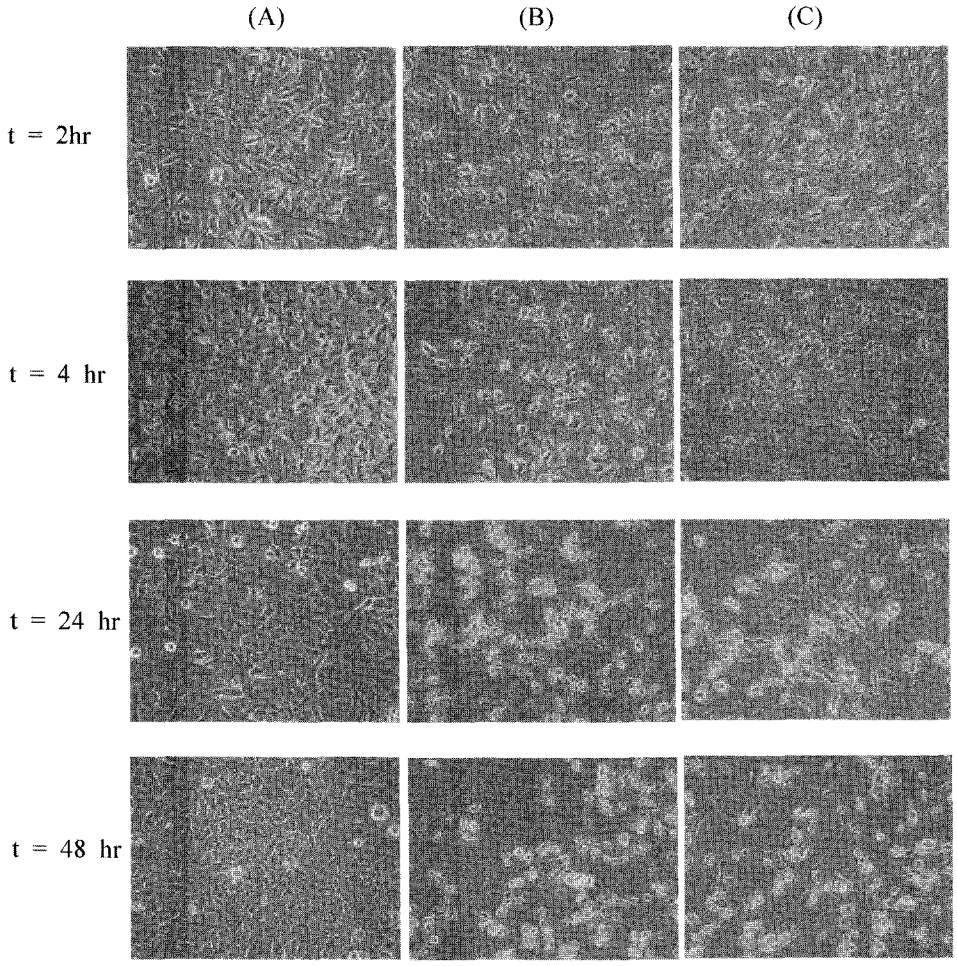


**Figure 6**–Phase contrast images of HEK 293 cells at various time points following exposure to PEI-DNA complexes (×100). (A) Control, (B) PEI 25 K/DNA (N/P=5) and (C) PEI 750 K/DNA (N/P=5).

이라 생각된다. 저분자량의 PEI-DNA 복합체는 세포 내로의 전달과 세포 내에서의 발현이 잘 안되어 세포의 생존에 영향을 크게 미치지 않았을 것이다. 반면에 고분자량의 PEI-DNA 복합체는 세포 내로의 전달과 발현이 잘 되어 세포의 생존에 영향을 크게 미쳤을 것이다. Gebhart 등[14]의 결과에서도 전이율이 높은 polyplex가 전이율이 낮은 것보다 세포 독성이 더 높게 나오는 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 여기에 따르면 세포 내에 높은 양의 DNA를 전달하는 과정에서 세포의 스트레스 반응에 의해 세포괴사가 일어난다. 즉, 높은 전이유전자 발현은 CMV 프로모터를 포함한 transfection construct에 의해 유도된 세포 독성 효과와 관련될 수도 있다고 하였다.[14] 또한 높은 농도의 PEI는 막의 기능에 손상을 주어 괴사에 의한 세포 사멸을 이끈다고 알려져 있다.[11] PEI의 N/P 비가 증가할수록 세포독성이 증가하는 것은 유리 PEI가 독성이 있기 때문이다. 과잉의 PEI은 제타 전위를 증가시켜 세포 표면과 상호작용을 증가시키고 세포 유입을 촉진한다. 이 때, PEI를 매개로한 전이는 어느 정도 상피세포에 스트레스를 줄 수 있다.[17] 따라서 성공적인 전이는 상피세포의 활성에 역기능을 보이게 된다. 허용된 세포 독성은 대조군에 비해 세포 단백질이 20% 감소 이하이어야 한다고 알려져 있다.[14] PEI 25 K를 제외하고는 이 기준을 넘어 안전하다고 할 수 있다. 분자량이 작은 선형 PEI는 세포 독성이 낮은 결과를 보였는데, 이는 세포 표면에 접착이 줄어들어 막의 파열 효과가 낮기 때문이라고 할 수 있다.[16]

**Cell Morphology**

PEI-DNA 복합체의 세포 독성을 살펴보기 위하여 위상차 현미경으로 세포의 형태를 관찰하였다. 아무 것도 처리하지 않은 대조군의 경우 시간이 지나도 세포의 형태는 크게 변화하지 않았다 (Figure 6(A)). PEI 25 K의 경우 4시간만 지나도 형태가 다소 변형이 일어나고 있었고 24시간이 지나면 완전 변형이 일어나 세포 간 응축이 일어났다 (Figure 6(B)). 높은 세포 독성은 막의 외부 면에서 PEI와의 높은 친화적 결합 때문이다. PEI는 세포 면에 부착하여 큰 집합체의 침전이 생기고 많은 괴사가 일어난다고 알려져 있다.[11] PEI 750 K의 경우는 24시간이 지난 후의 세포 형태는 크게 변화되지 않은 반면 48시간이 지나면 약간의 변형이 일어나는 것을 알 수 있었다 (Figure 6(C)). 따라서, 분자량이 25 K의 경우 세포 독성이 750 K 보다 더 높다는 것을 알 수 있었다.

## 결 론

위의 결과를 종합할 때 다음과 같이 요약할 수 있다.

1. PEI의 분자량에 따라 pDNA와의 결합이 달라지고 그에 따른 물리화학적 성질이 달라진다.
2. N/P 비가 증가할수록 PEI와 pDNA 간의 결합 정도는 증가하고 입자 크기는 감소한다.
3. 분자량이 작은 PEI의 경우보다 분자량이 큰 경우가 더 높은 DNA의 전이를 보이고 있다.
4. 세포 독성도 고려하여 적절한 분자량의 PEI를 선택해 사용해야 하며 분자량이 10 kDa에서 70 kDa 사이의 PEI가 적합하다고 할 수 있다.

## 감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업 (00-PJ1-PG3-21700-0006)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

## 문 헌

1) K. Morimoto, M. Nishikawa, S. Kawakami, T. Nakano, Y. Hattori, S. Fumoto, F. Yamashita and M. Hashida, Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethylenimine on hepatoma cells and mouse liver, *Mol. Therapy*, **7**, 254-261 (2003).
2) M.D. Brown, A.G. Schatzlein, I.F. Uchegbu, Gene delivery with synthetic (non viral) carriers, *Int. J. Pharm.*, **229**, 1-21 (2001).
3) R. Kircheis, L. Wightman and E. Wagner, Design and gene delivery activity of modified polyethylenimine, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **53**, 341-358 (2001).
4) J.S. Remy, B. Abdallah, M.A. Zanta, O. Boussif, J.P. Behr and B. Demeneix, Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **30**, 85-95 (1998).
5) T. Bieber, W. Meissner, S. Kostin, A. Niemann and H.P. Elsasser, Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes, *J. Contr. Release*, **82**, 441-454 (2002).
6) S. Ferrari, E. Moro, A. Pettenazzo, J.P. Behr, F. Zacchello and M. Scarpa, ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells *in vitro* and *in vivo*, *Gene Therapy*, **4**, 1100-1106 (1997).
7) C. Brus, H. Petersen, A. Aigner, F. Czubayko and T. Kissel, Efficiency of polyethylenimines and polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) block copolymers to protect oligonucleotides against enzymatic degradation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **57**, 427-430 (2004).
8) I. Moret, J.E. Peris, V.M. Guillem, M. Benet, F. Revert, F. Dasi, A. Crespo and S.F. Alino, Stability of PEI-DNA and DOTAP-DNA complexes: effect of alkaline pH, heparin and serum, *J. Contr. Release*, **76**, 169-181 (2001).
9) W.T. Godbey, K.K. Wu and A.G. Mikos, Size matters:

Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle, *J. Biomed. Mater. Res*, **45**, 268-275 (1999).

10) B. Abdallah, A. Hassan, C. Benoist, D. Goula, J.P. Behr, and B.A. Demeneix, A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine, *Hum. Gene Ther.*, **7**, 1947-1954 (1996).

11) D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H.P. Elsässer and T. Kissel, A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine, *Pharm. Res.*, **16**, 1273-1279 (1999).

12) P. Lampela, P. Soininen, A. Urtti, P.T. Männistö and A. Raasmaja, Synergism in gene delivery by small PEIs and three different nonvial vectors, *Int. J. Pharm.*, **270**, 175-184 (2004).

13) J.S. Kim, B.I. Kim, A. Maruyama, T. Akaike and S.W. Kim, A new non-viral DNA delivery vector: the terplex system, *J. Contr. Release*, **53**, 175-182 (1998).

14) C.L. Gebhart and A.V. Kabanov, Evaluation of polyplexes as gene transfer agents, *J. Contr. Release*, **73**, 401-416 (2001).

15) C. Zhang, P. Yadava and J. Hughes, Polyethylenimine strategies for plasmid delivery to brain-derived cells, *Methods*, **33**, 144-150 (2004).

16) K. Kunath, A.v. Harpe, D. Fischer, H. Petersen, U. Bickel, K. Voigt and T. Kissel, Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery, *J. Contr. Release*, **89**, 113-125 (2003).

17) W.T. Goodbey, K.K. Wu and A.G. Mikos, Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability, *Biomaterials*, **22**, 471-480 (2001).