

Gene Transfer in Normal and Ischemic Tibialis Anterior Muscle of Rat by *In Vivo* Electroporation

JI Sook Kim^{1,2}, Byung Kook Kwak^{1,†}, Hyung Jin Shim¹, Hong-Jin Kim³,
Kyung-Hee Choi⁴ and Jung-Woong Kim⁴

¹Department of Radiology, Chung-Ang University Hospital, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul 156-755, Korea.

²Department of Toxicology, Sungkunkwan University School of Pharmacy, Suwon 440-746, Korea.

³Department of Microbiology, Chung-Ang University College of Pharmacy, Seoul 156-756, Korea.

⁴Department of Biology, Chung-Ang University College of Natural Sciences, Seoul 156-756, Korea

The purpose of this preliminary study is to improve the efficiency of gene transfer of nonviral plasmid DNA by *in vivo* electroporation in ischemic hindlimb muscle, tibialis anterior. Hindlimb ischemic model was aseptically made by excision of left femoral artery. Each 50 µg of pEGFP-C1 and pGL3-control in 100 µl 0.9% NaCl was injected in tibialis anterior muscle. *In vivo* electroporation was applied on the same site with 10 mm-distance 2 needle array electrodes and ECM830. In 3 groups of normal rat with different electric field strength 0, 200 and 800 V/cm, the expression of pEGFP-C1 was comparatively evaluated. In 8 groups of normal rats, the expression of pGL3-control was evaluated in 0, 40, 50, 80, 100, 150, 200 and 300 V/cm of electric field strength. In 5 groups of ischemic models, the expression of pGL3-control was analyzed on 0, 4, 7, 10 and 14 days elapsed after making ischemic models. In 9 groups of ischemic rats, the expression of pGL3-control was analyzed in the electric field strength 0, 60, 70, 80, 100, 150, 200, 250 and 300 V/cm. GFP expressions in normal tibialis anterior were high in the extent and degree in order of electric field strength of 200, 800 and 0 V/cm. Luciferase value was highest in 50~100 V/cm electric field strength. In the case of ischemic models, luciferase expression was significantly increasing in the order elapsed time after making the model. The degree of luciferase expression was higher in cases of application of *in vivo* electroporation than in that of non-application and was highest in 100~150 V/cm. In conclusion, *in vivo* electroporation is effective in transfer and expression of plasmid DNA in normal and ischemic tibialis anterior of rat.

Key Words: *In vivo* electroporation, Gene transfer, Tibialis anterior, Green fluorescence protein, Luciferase, Rat

서 론

치료 목적의 유전자전달 방법의 하나인 비바이러스 맨플라스미드 DNA 유전자요법 (nonviral naked plasmid DNA gene therapy)의 제한점은 플라스미드 DNA를 생체 근육내에 주입하였을 경우 근육 세포내 도입과 발현이 1% 정도로 극히 적고, 발현 지속 시간도 짧다는 점이다 (Wolf et al., 1990). 플라스미드 DNA의 적은 발현을 극복하

기 위하여, 벡터를 바꾸거나, 양이온 지질 (cationic lipid) 이나 중합체 (polymer)를 사용하거나, 유전자총 (gene gun) 을 이용하거나, 초음파를 이용하거나, 생체내 전기천공 (*in vivo* electroporation)을 이용하는 것과 같은 많은 시도가 있었다 (Nishikawa and Huang, 2001; Zelenin et al., 1997; Lemieux et al., 2000; Schratzberger et al., 2002; Dona et al., 2003).

생체내 전기천공이란 플라스미드 DNA를 생체 조직에 주입한 후에 그 부위에 전기펄스를 작용시켜서 DNA가 세포내로 들어가는 것을 증강시키는 방법이다. 세포막은 지질이중층 (lipid bilayer)으로 되어 있으며 플라스미드 DNA와 같이 수용성 물질은 수용체나 식작용 없이 세포막을 통과할 수가 없다. 그러나 전기펄스는 지질이중층의 막전위를 극복하게 하여 이중층에 가역적인 파괴를

*논문 접수: 2007년 7월 18일

수정재접수: 2007년 9월 14일

†교신저자: 광병국, (우) 156-755 서울시 동작구 흑석동 224-1,

중앙대학교 의과대학 영상의학과학교실

Tel: +82-2-6299-2661, Fax: +82-2-6263-1557

e-mail: kwakbk@cau.ac.kr

유발한다. 결과로 세포막에 40~120 nm 정도의 구멍들이 생긴다. 대부분의 이 구멍들은 세포 내외로 물질 이동이 있는 후, 수 초안에 다시 닫히게 된다 (Chen et al., 2006, Kotulska et al., 2007).

지금까지 쥐를 이용한 다리 근육에 생체내 전기천공에 의하여 유전자 발현이 10~1000배 가량 증가한다는 보고가 있었다 (Aihara and Miyazaki, 1998; Mathiesen, 1999; Mir et al., 1999). 그러나 아직 다리의 만성 허혈질환이나 그 모델에 대하여 생체내 전기천공을 이용한 유전자전달에 관한 연구는 아주 드물다 (Nishikage et al., 2004).

본 연구는 다리의 만성 허혈질환에 대한 생체내 전기천공을 이용한 유전자요법의 효율을 높이고자 하는 기초 동물실험으로서, 쥐의 정상 및 허혈 뒷다리 앞정강근에서 생체내 전기천공의 도움으로 유전자전달의 효율성을 높이는 예비 실험 결과를 발표하고자 한다.

대상 및 방법

1. 실험동물

본 실험은 중앙대학교병원 동물실험 규율에 따라 이루어졌다. 실험동물로는 200~250 g Sprague-Dawley (SD) 쥐 수컷을 사용하였고, 구입한 후 중앙대학교병원 내 사육실에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 5마리씩 분리, 수용하였으며 실험기간 동안 물과 사료의 양은 제한 없이 공급하였다. 마취가 필요한 경우 케타라 (ketamine hydrochloride, 서울, 한국) 50 mg/kg와 럼폰 (xylazine hydrochloride, 바이엘코리아, 서울, 한국) 15 mg/kg를 복강내로 주입하여 마취하였다.

2. 재료 및 장치

정보제공유전자 (reporter gene)로서 green fluorescence protein (GFP)을 발현하는 플라스미드 DNA인 pEGFP-C1 (Clontech, CA, USA)과 luciferase를 발현하는 플라스미드 DNA로서 pGL3-control (Promega, WI, USA)을 구입하였다. *E. coli* JM109에 각 플라스미드 DNA를 형질전환시킨 후 플라스미드 분리 키트 (Quiagen plasmid isolation kit, Quiagen, CA, USA) 를 사용하여 분리 정제하였다. Luciferase 발현 분석을 위한 Luciferase assay system (Promega, WI, USA)를 구입하여 사용하였다. 모든 시약은 분석 등급이나 1등급을 사용하였다.

플라스미드 DNA와 단백질 정량에는 분광광도계 (Nanodrop ND-1000, Nanodrop, DE, USA)를 사용하였고,

유전자 주입에는 Becton Dickinson사의 28G 인슐린 주사기 (Ultra-Fine II, Becton Dickinson, CA, USA)를 사용하였으며, 생체내 전기천공에 사용한 기계는 square wave 펄스 전기천공기 (ECM 830, BTX, CA, USA)와 10 mm 사이 거리를 갖는 2개 바늘 배열전극 (two needle array electrode)을 사용하였고, GFP 발현 정도는 동일초점현미경 (confocal microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 확인하였으며, luciferase 정량에는 luminometer (Junior, Berthold technologies, Bad Wildbad, Germany)를 사용하였다.

3. 쥐의 뒷다리 허혈질환모델 만들기

뒷다리 허혈질환모델이 필요한 경우는 SD 쥐를 마취하고, 무균적 방법으로 왼쪽 살고랑인대에서 무릎뼈 직상 부까지 넓적다리 안쪽의 넓다리동정맥 고랑을 길게 절개하였다. 넓다리동맥을 따라가며 분지들인 아래배벽동맥, 깊은넓다리동맥, 원회돌이동맥, 얇은배벽동맥 등을 묶고 분리하였다. 아래쪽으로 오금동맥과 두령동맥을 묶은 다음 전체 넓다리동맥을 넓적다리에서 적출하여 허혈모델을 만들었다 (Hong et al., 2001).

4. 생체내 전기천공에 의한 정상 앞정강근에서 pEGFP-C1 유전자전달

9마리 정상 SD 쥐를 3마리씩 3개의 군으로 나누어 마취 후, 왼쪽 다리의 앞정강근 부위의 털을 면도기로 제거하였다. 준비된 pEGFP-C1를 각각 50 µg씩 준비된 0.9% NaCl 100 µl를 앞정강근의 중심에 28G 인슐린 주사기 (Becton Dickinson)로 주입하였다. 주입 후 1분 경과 후에 주입한 부위를 가운데로 하여 2개 바늘 배열전극을 위아래 방향으로 앞정강근에 삽입하여 전기펄스를 주었다. 전기펄스를 주지 않은 군 3마리, 낮은 전기장 세기로 200 V/cm, 펄스 작용시간 20 msec, 펄스 회수 8회, 펄스 간격 200 msec와 높은 전기장 세기 조건으로 800 V/cm, 펄스 작용시간 20 msec, 펄스 회수 8회, 펄스 간격 200 msec으로 하였다. 생체내 전기천공 유전자전달 1 주 후에 쥐를 희생시켰고 왼쪽 앞정강근을 적출하였다.

앞정강근 조직을 OCT compound (Miles, Elkhart, IN, USA)로 처리하여 10 µm 두께의 동결절편을 만들어, 3% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)로 고정시킨 후 동일 초점현미경 (Carl Zeiss)으로 GFP 발현을 확인하였다. GFP 발현의 범위와 정도를 등급으로 나누어 분석하였다. 발현 범위는 보이는 근섬유의 30% 미만을 1+, 30~59%를 2+,

60% 이상을 3+로 하였다. 발현 정도는 형광의 밝기를 상호 비교하여 약한 경우 1+, 강한 경우 2+로 하였다.

5. 생체내 전기천공에 의한 정상 앞정강근에서 pGL3-control 유전자전달

3마리씩 8그룹의 정상 SD 쥐를 왼쪽 앞정강근에 전기장세기를 0, 40, 50, 80, 100, 150, 200, 300 V/cm으로 하여 전기장의 세기에 따른 pGL3-control 유전자의 발현 정도를 알아보았다. 이때 pGL3-control 50 µg을 생리식염수 100 µl에 녹여 28G 인슐린 주사기 (Becton Dickinson)로 앞정강근에 주입하였다. 10 mm 간격의 2개 바늘 배열전극을 이용하였고, 전기펄스 작용시간은 20 msec, 펄스 회수 8회, 펄스 간격 200 msec로 다른 조건은 같게 하였다.

Luciferase 분석은 유전자 주입 1주 후에 쥐를 희생시켰고, 앞정강근을 적출하여 -80°C에 얼렸다. 얼린 조직을 액체 질소를 이용하여 막자사발에서 갈아서 녹여 용해 완충액을 넣고 15 분간 vortex, 액체 질소로 동결, 해동 과정을 3회 반복하였다. 이어서 4°C, 10,000 g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 얻었고, 이 과정을 두 번 반복하였다. 그리고 이 상등액을 단백질 정량 후, luciferase 분석 시약과 혼합하여 luminometer (Berthold technologies)로 relative light units (RLU) 값을 측정하였다.

6. 생체내 전기천공에 의한 뒷다리 허혈의 시간경과에 따른 앞정강근의 pGL3-control 유전자 발현의 변화

SD 쥐 20마리를 좌측 뒷다리에 허혈모델을 만들었다. 4마리씩을 한 군으로 하여 모델을 만든 날을 기준으로 0일 (당일), 4일, 7일, 10일, 14일 후, 우측 정상과 좌측 허혈 앞정강근에 각각 pGL3-control 50 µg을 생리식염수 100 µl에 녹여, 28G 인슐린 주사기 (Becton Dickinson)로 앞정강근에 주입하였다. 양쪽 앞정강근에 ECM830 (BTX) 장비로 10 mm 간격의 2개 바늘 배열전극을 이용하여 전기장 세기를 150 V/cm, 작용시간을 20 msec, 펄스 회수 8회, 펄스 간격을 200 msec로 하여 전기펄스를 주었다. 전기펄스 1주일 후 쥐를 희생시켜 좌우 앞정강근을 얻어 luciferase 분석을 하였다.

7. 생체내 전기천공에 의한 뒷다리 허혈모델에서 전기장의 세기에 따른 앞정강근의 pGL3-control 유전자 발현

SD 쥐 3마리씩 9군에서 좌측 뒷다리 허혈모델을 만든 뒤 2주 후에 pGL3-control 50 µg을 생리식염수 100 µl에 녹여 28G 인슐린 주사기 (Becton Dickinson)로 좌측 앞정

강근에 일정하게 주입하였다. ECM830 (BTX) 장비로 10 mm 간격의 2개 바늘 배열전극을 이용하여 각각 0, 60, 70, 80, 100, 150, 200, 250, 300 V/cm의 전기장의 세기를 작용시켰으며, 다른 조건은 펄스 작용시간 20 msec, 펄스 회수 8회, 펄스 간격 200 msec로 같게 하였다. 1주일 후 쥐를 희생시켜 좌측 앞정강근을 얻어 luciferase 분석을 하였다.

8. 통계

모든 자료를 평균치와 표준오차로 표시 하였다. 통계 분석은 Wilcoxon rank sum test로 하였으며, 신뢰 수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 쥐의 정상 앞정강근에서 생체내 전기천공에 의한 GFP 발현

쥐의 앞정강근 GFP 발현은 전기장 세기 200 V/cm, 800 V/cm, 전기펄스를 주지 않은 경우의 순서대로 GFP 발현 범위와 정도가 높았다. 전기장의 세기 200 V/cm에서 발현 범위는 3+, 발현 정도는 2+, 800 V/cm에서는 발현 범위 2+, 발현 정도 1+, 전기펄스를 주지 않은 경우에는 발현 범위 1+, 발현 정도 1+이었다 (Fig. 1). 800 V/cm의 전기장 세기에서 유전자 주입 후, 전기펄스를 주었을 때, 바늘이 삽입된 부위에 조직이 타는 근육 손상이 있었다.

2. 쥐의 정상 앞정강근에서 생체내 전기천공의 전기장 세기에 따른 luciferase 발현

쥐의 정상 앞정강근에서 전기장 세기에 따라 유전자 발현의 정도는 전기펄스를 주지 않은 경우 보다 훨씬 높게 나타났다. 전기펄스는 전기장 세기 50~100 V/cm에서 가장 발현이 높았다 (Fig. 2).

3. 쥐의 뒷다리 허혈모델에서 일자경과에 따른 유전자 발현

쥐 뒷다리 허혈모델에서 허혈 상태에 있는 좌측 앞정강근은 정상인 우측 앞정강근 보다 생체내 전기천공에 의한 유전자 발현이 통계적으로 의미 있게 적었다. 허혈 모델을 만든 직후일수록 유전자 발현이 적어서, 당일 (0일), 4일, 7일, 14일로 가면서 점증적으로 유전자 발현이 증가하였다 (Fig. 3). 급성 허혈모델에서 보다는 만성 허

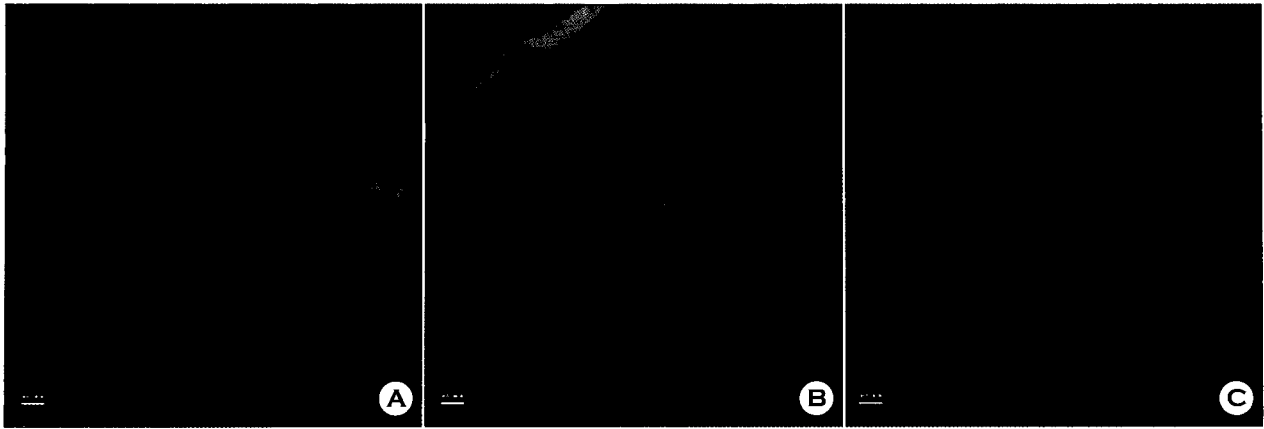


Fig. 1. Green fluorescence protein expression in normal tibialis anterior of rat after injection of pEGFP-C1 and electric pulsing of *in vivo* electroporation. pEGFP-C1 50 μ g-containing 0.9% NaCl 100 μ l was injected into normal anterior tibialis muscle of rat and *in vivo* electroporation was applied with 2 needle array electrode at 20 msec of duration, 8 in number, 200 msec of interval and different electric field strength 0 (A), 200 (B), 800 V/cm (C). The extents and intensities of GFP expressions are 1+, 1+ for 0 V/cm; 3+, 2+ for 200 V/cm; 2+, 1+ for 800 V/cm, respective (bar in A, B and C are 50 μ m).

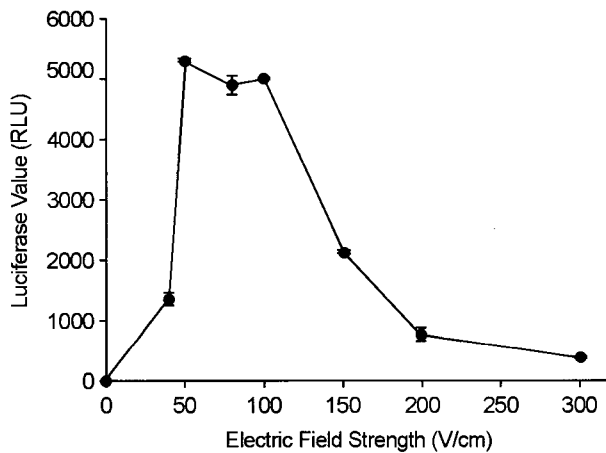


Fig. 2. Effect of electric field strength of *in vivo* electroporation on expression of pGL3-control at normal tibialis anterior of rat. The expressions of luciferase after injection of pGL3-control 50 μ g-containing 0.9% NaCl 100 μ l and application of *in vivo* electroporation with 2 needle array electrode at 20 msec of duration, 8 in number, 200 msec of interval are increased with the highest expression at the field strength 50~100 V/cm.

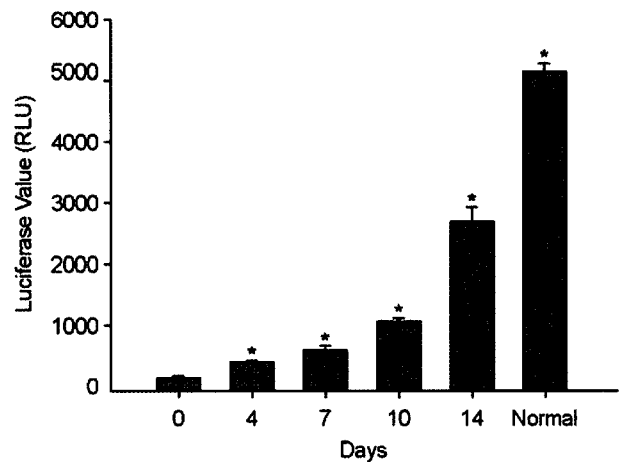


Fig. 3. Increasing tendency of expression of luciferase of pGL3-control by *in vivo* electroporation in ischemic tibialis anterior of rat after making model. The expressions of luciferase after injection of pGL3-control 50 μ g-containing 0.9% NaCl 100 μ l and application of *in vivo* electroporation with 2 needle array electrode at 150 V/cm of electric field strength, 20 msec of duration, 8 in number, 200 msec of interval show an increasing tendency until 14 days depending on the time elapsed after the ligation of femoral artery.

혈모델에서 생체내 전기천공에 의한 유전자전달 효과가 클 것으로 기대된다.

4. 쥐의 뒷다리 허혈모델에서 전기장의 세기에 따른 발현

쥐의 뒷다리 허혈모델에서 앞정강근에서 전기장 세기에 따라 유전자 발현의 정도는 전기펄스를 주지 않은 경우 보다 훨씬 높게 나타났다. 전기펄스는 전기장 세기 100~150 V/cm에서 가장 발현이 높았다 (Fig. 4).

고 찰

생체내 전기천공을 이용하면 살아있는 개체의 세포막에 구멍을 만들게 되고 이 구멍을 통하여 비바이러스 맨 플라스미드 DNA의 세포내 이입을 증강시켜 유전자요법의 효율성을 높일 수 있음이 알려져 있다 (Aihara and Miyazaki, 1998; Mathiesen, 1999; Mir et al., 1999). 그런데 이

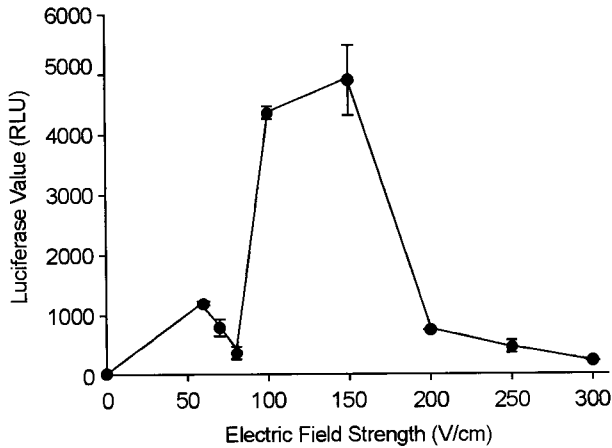


Fig. 4. Effect of electric field strength of *in vivo* electroporation on expression of pGL3-control at ischemic tibialis anterior of rat. The expressions of luciferase after injection of pGL3-control 50 μ g-containing 0.9% NaCl 100 μ l and application of *in vivo* electroporation with 2 needle array electrode at 20 msec of duration, 8 in number, 200 msec of interval are increased with the highest expression at the field strength 100~150 V/cm.

것은 여러 가지 조건에 따라 유전자 이입의 효율이 다르므로 각 장거나 조직 및 질병 상태에 따라 전기장의 조건을 최적화 하는 것이 필요하다. 전기펄스는 세포막의 지질이중층의 막전위를 극복하게 하여 세포막에 구멍들을 형성한다. 이 구멍을 통하여 세포 내외로 플라스미드 DNA의 이동이 있게 된다. 생체내 전기천공으로 플라스미드 DNA가 생체 세포내로 들어가는데 있어서 두 과정이 있다: (1) 세포막 투과 (permeabilization)와 (2) 전기이동 (electrophoresis)에 의한 DNA의 세포내로 이동이다 (Satkaukas et al., 2002).

생체내 전기천공에 의한 플라스미드 DNA의 전달에 있어서 전기펄스의 조건에 대해서는 아직 이견이 많다. 같은 장거나 조직에서 전극의 모양, 전기펄스파의 모양, 전기장의 세기, 전기펄스의 작용시간, 전기펄스의 횟수, 전기펄스 사이의 간격 등이 다르며, 장기와 조직이 달라지면 이러한 조건은 달라진다. 또한, 같은 장거나 조직이더라도 정상과 질병 상태에 따라 달라질 것으로 생각하고 있다 (Mir, 1999; Gehl, 1999).

Mir 등은 쥐의 앞정강근을 이용한 효율이 높은 전기조건을 연구하여 전기장의 세기 200 V/cm, 작용시간 20 msec, 전기펄스 8회, 전기펄스 간격 200 msec에서 luciferase의 발현이 높음을 확인하였다 (Mir, 1999). 본 연구에서도 쥐의 앞정강근에서 전기펄스 작용시간 20 msec, 전기펄스 8회, 전기펄스 간격 200 msec, 전기장의 세기가 200 V/cm에서 전기장의 작용이 없을 경우와 다른 조건은

같고 전기장의 세기가 800 V/cm인 경우 보다 GFP의 발현이 높게 나타났다 (Fig. 1). 전기장의 세기를 더욱 세분하여 보았을 때 luciferase 발현은 정상 앞정강근에서 다른 조건은 같을 경우 전기장의 세기 50~100 V/cm에서 발현이 높았다 (Fig. 2). 연구자 마다 조금씩 다른 결과를 보이는 것은 주입된 플라스미드 DNA의 차이에 따를 수도 있겠지만, 동물 개체 차이와 그 외의 여러 실험 조건의 차이로 보는 것이 더 옳을 것으로 생각된다.

다리 근육의 허혈질환에 대한 생체내 전기천공을 이용한 유전자요법에 대해서는 아직 많이 연구되지 않은 상태이다. Nishikage 등은 생체내 전기천공을 이용하여 토끼 허혈 넓적다리 근육에서 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다 (Nishikage et al., 2004). 본 연구에서는 생체내 전기천공에 의하여 유전자의 발현이 정상 근육보다 허혈 상태의 앞정강근이 적었다. 허혈모델을 만든 직후일수록 유전자 발현이 적었고, 당일 (0일), 4일, 7일, 14일로 가면서 점증적으로 유전자 발현이 증가하였다 (Fig. 3). 급성 허혈모델에서 보다는 만성 허혈모델에서 생체내 전기천공에 의한 유전자전달 효과가 클 것으로 기대된다. 또한, 본 연구에서는 허혈 상태와 정상 상태의 쥐의 앞정강근을 대상으로 생체내 전기천공을 본 연구에서는 쥐의 앞정강근의 정상 상태에서는 전기장의 세기 50~100 V/cm, 허혈 상태에서는 100~150 V/cm에서 유전자의 발현이 높았다 (Fig. 4). 각각 정상과 허혈 상태의 골격근에 적합한 생체 전기천공의 전기장의 세기에 차이가 있는 것으로 판단된다.

생체내 전기천공을 이용하지 않을 경우 허혈 상태의 다리 근육은 정상 근육보다 플라스미드 DNA 주입으로 근육내 유전자전달이 현저히 증가 된다고 알려져 있다. Takeshita 등은 플라스미드 DNA만을 근육 주사할 경우 정상보다 허혈 상태의 넓다리곧은근 (rectus femoris)에서 유전자의 발현이 증강된다고 보고하였다 (Takeshita et al., 1996). 생체내 전기천공을 이용하면 허혈 다리에서 플라스미드 DNA의 세포내 도입을 증가시켰다 (Nishikage et al., 2004). 본 연구에서도 허혈 다리에서 세포내 전기천공이 플라스미드 DNA의 세포내 유입을 증가시키는 것을 확인하였다. 그러나 본 연구에서 새롭게 얻은 결과는 세포내 전기천공이 다리 근육의 허혈 상태가 정상 근육보다는 유전자 발현이 더 낮았고, 허혈의 급성 상태를 받아 날 수록 2주까지 유전자 발현이 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig. 3).

본 연구의 제한점은 일부 실험에서 한 군에 여러 마리

의 쥐를 사용하지 못하여 평균치와 분포 정도를 정확히 밝히지 못하였다. 그러나 여러 조건들의 일관된 추이는 알 수 있었으며, 본 실험은 예비 실험으로 앞으로 많은 실험에 기초 자료를 제공하는 데 충분하리라 생각된다. 결론적으로, 생체내 전기천공이 쥐의 앞정강근에 플라스미드 DNA의 세포내 전달 및 발현에 효과적이며, 정상 및 허혈 상태의 골격근에 모두 효과가 있었다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

REFERENCES

- Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nat Biotechnol*. 1998. 16: 867-870.
- Chen C, Smye SW, Robinson MP, Evans JA. Membrane electroporation theories: a review. *Med Biol Eng Comput*. 2006. 44: 5-14.
- Dona M, Sandri M, Rossini K, Dell'Aica I, Podhorska-Okolow M, Carraro U. Functional *in vivo* gene transfer into the myofibers of adult skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003. 312: 1132-1138.
- Gehl J, Sorensen TH, Nielsen K, Raskmark P, Nielsen SL, Skovsgaard T, Mir LM. *In vivo* electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution. *Biochim Biophys Acta*. 1999. 1428: 233-240.
- Hong JH, Bahk YW, Suh JS, Kwak BK, Shim HJ, Kim JS. An experimental model of ischemia in rabbit hindlimb. *J Korean Med Sci*. 2001. 16: 630-635.
- Kotulska M, Kubica K, Koronkiewicz S, Kalinowski S. Modeling the induction of lipid membrane electroporation. *Bioelectrochemistry* 2007. 70: 64-70.
- Lemieux P, Gue' in N, Paradis G, Proulx R, Chistyakova L, Kabanov A, Alakhov V. A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther*. 2000. 7: 986-991.
- Mathiesen I. Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer *in vivo*. *Gene Ther*. 1999. 6: 508-514.
- Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999. 96: 4262-4267.
- Nishikage S, Koyama H, Miyata T, Ishii S, Hamada H, Shigematsu H. *In vivo* electroporation enhances plasmid-based gene therapy of basic fibroblast growth factor for the treatment of ischemic limb. *J Surg Res*. 2004. 120: 37-46.
- Nishikawa M, Huang L. Nonviral Vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther*. 2001. 12: 861-870.
- Schatzberger P, Krainin JG, Schratzberger G, Silver M, Ma H, Kearney M, Zuk RF, Brisken AF, Losordo DW, Isner JM. Transcutaneous ultrasound augments naked DNA transfection of skeletal muscle. *Mol Ther*. 2002. 6: 576-583.
- Satkauskas S, Bureau MF, Puc M, Mahfoudi A, Scherman D, Miklavcic D. Mechanisms of *in vivo* DNA electrotransfer: respective contributions of cell electroporation and DNA electrophoresis. *Mol Ther*. 2002. 5: 133-140.
- Takeshita S, Isshiki T, Sato T. Increased expression of direct gene transfer into skeletal muscles observed after acute ischemic injury in rats. *Lab Invest*. 1996. 74: 1061-1065.
- Wolf JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990. 270: 1465-1468.
- Zelenin AV, Kolesnikov VA, Tarasenko OA, Shafei RA, Zelenina IA, Mikhailov VV. Bacterial β -galactosidase and human dystrophin genes are expressed in mouse skeletal muscle fibers after ballistic transfection. *FEBS Lett*. 1997. 414: 319-322.