

양이온 리포솜을 이용한 유전자 전달 및 발현에서 첨가제의 효과

†최 태 부 · ¹박 인 철 · ¹홍 식 일 · ²C. Schmid
건국대학교 미생물공학과, ¹원자력병원 세포생물학실, ²UC Davis MCB
(접수 : 1998. 3. 21., 게재승인 : 1998. 5. 21.)

The Effects of Supplements on the Plasmid Delivery and Expression in the Transfection Using Cationic Liposomes

T. B. Choe†, I. C. Park¹, S. I. Hong¹, and C. Schmid²
Division of Chemical and Biological Engineering, Konkuk Univ. Mojin-dong 93-1 Seoul, 143-701
¹Laboratory of Cell Biology, Korea Cancer Research Institute, Seoul
²Section of Molecular and Cellular Biology, UC Davis, Davis, CA 95616
(Received : 1998. 3. 21., Accepted : 1998. 5. 21.)

Cellular transfections with cationic liposomes are widely employed for gene and oligonucleotide transfer *in vitro* or *in vivo* because of their safety and ease of use. However, they still suffer from the low transfection efficiency comparing with viral vectors. Substantial efforts have been focused on increasing transfection efficiency by supplementing the liposome/DNA complexes(lipoplex) with various components. In this work, we tried three kinds of supplements, Poly-L-lysine(PLL), transferrin and a mixture of anionic lipids(PS/PE/PC), to study their effects on gene transfer yield and gene expression efficiency. PLL, a polycationic polymer, enhanced gene transfer yield by 3 times but the gene expression efficiency was increased only by 1.5 times. This result implies that PLL can enhance the transfection efficiency mainly by increasing the rate of outer membrane transport of lipoplex into the cells. On the other hand, transferrin which can facilitate the gene transfer via ligand-receptor interaction gave not only increased gene transfer yield but also enhanced gene expression efficiency by 2.8 times. Transferrin seems to contribute to the escape of plasmid from endosomes through ligand-receptor recycle mechanism. When the cells were treated with a mixture of anionic lipids for 3 hours before the transfection, gene transfer yield was slightly decreased but the gene expression efficiency was enhanced by 1.9 times. This is presumably due to the accelerated liposome-plasmid dissociation by the anionic lipids, and the increased delivery of plasmid to the nucleus. According to these results, it is clear that the supplementation to ameliorate transfection efficiency with cationic liposomes should be contrived in the direction of increasing the intracellular delivery of plasmid.

Key Words : Transfection, cationic liposome, gene transfer, gene expression, supplements

서 론

세포 외부에서 필요한 유전자를 세포 내로 전달하여 발현시키는 방법은 유전자 치료법이나 ribozyme, antisense oligonucleotide와 같은 핵산을 이용한 치료법에서 반드시 실현되어야 할 중요한 기술이다. 체세포 내로 유전자를 전달시키는 방법은 바이러스를 이용하는 방법과 양이온 리포솜을 이용하는 방법, 그리고 유전자 총과 같은 담체를 이용하는 방법이 있다. 현재로서는 바이러스를 이용하는 방법이 가장 효율이 높고 다양한 종류가 개발되어 있어 의사들의 임상 실험에 가장 많이 이용되고 있다. 그러나 바이러스가 가지고 있는 문제점들도 아직 완전히

해결된 것은 아니고 또 ribozyme, antisense oligonucleotide와 같은 핵산의 전달에 있어서는 리포솜을 이용하는 방법이 선호되고 있다. 따라서 많은 종류의 양이온 리포솜이 개발되어 시판되고 있으나 아직은 낮은 transfection 효율 때문에 그 사용이 *in vitro* 실험에서 주로 사용되고 있다.

리포솜 이용법은 Felgner 등(1)이 DOTMA(dioleoyloxy propyl trimethyl ammonium chloride)라는 양이온 지질(cationic lipid or liposome)을 이용하여 플라즈마드 형태의 유전자를 세포 내에 전달하면서 시작되었다. 그 뒤 유전자 전달에 이용될 수 있는 많은 종류의 양이온 지질들이 고안되었는데 예를 들면 DC-cho(dimethylamine ethane carbamoyl cholesterol)(2-4), DMRIE(dimyristyloxy propyl dimethyl hydroxyethyl ammonium)(5,11) DOTAP(bis oleoyloxy trimethyl ammonium propane), DOGS(dioctadecyl glycine spermine)(5,12), DDAB(dimethyl dioctadecyl ammonium bromide)(6) 같은 것이 있다.

† Corresponding Author : Division of Chemical and Biological Engineering, Konkuk Univ. Mojin-dong 93-1 Seoul, 143-701
Tel : 02-450-3523, Fax : 02-3436-5594,
e-mail : tbchoe@kkucc.konkuk.ac.kr

리포솜을 이용한 유전자 전달 효율을 증가시키기 위해 양이온 지질의 개발과 함께 여러 가지 첨가제에 대한 연구가 활발히 전개되고 있는데 예를 들면, poly-L-lysine(PLL)과 같은 polycation polymer(7), folic acid나 transferrin과 같은 ligand(8,9) 그리고 virus에서 유래하는 endosome 파괴 peptide(10) 등을 첨가하는 방법과 최근에는 sendai virus와 같이 세포막 융합을 촉진하는 virus를 불 활성화시켜 첨가하기도 한다(13).

1997년 Felgner 등(14)은 양이온 리포솜을 이용한 유전자 전달법을 lipofection이라 부르기로 결정하였는데 일반적으로 lipofection은 3단계로 구분될 수 있다(15)(Figure 1 참조). 즉, 1단계는 양이온 리포솜-플라스미드의 복합체(lipoplex라 부름, 14)가 endocytosis 기능에 의해 세포 외막을 통과하여 endosome 내로 들어가는 단계이고, 2단계는 lipoplex 혹은 여기서 해리된 플라스미드가 endosome으로부터 탈출하는 단계, 그리고 3단계는 플라스미드가 핵까지 전달되어 발현이 시작되는 단계로 구분할 수 있다. 지금까지 많은 첨가제들을 이용한 lipofection 효율 증가에 대한 연구를 진행하여 왔으나 주로 유전자의 최종 산물인 단백질 효소의 역가를 측정하는 방법이 이용되어 왔기 때문에 이 경우 첨가물이 유전자 전달 과정에서 위의 세 단계중 어느 단계에 도움을 주었는가에 대해 알기 힘들었다. 따라서 본 연구에서는 lipofection에 대한 첨가제의 역할에 대하여 좀 더 구체적으로 알아보기 위하여 아래와 같은 두 변수를 이용하여 조사함으로써 유전자의 전달 효율을 증가시키는 방법을 찾고자 하였다.

$$\text{gene transfer yield, } Y = \frac{\text{intracellular plasmid delivered}}{\text{total plasmid loaded}}$$

$$\text{gene expression efficiency, } E = \frac{\text{total gene product expressed}}{\text{intracellular plasmid delivered}}$$

유전자 전달 효율을 나타내는 Y값은 첨가해 준 플라스미드에 대해서 세포 내로 전달된 플라스미드의 분율을 표시하는 것이고, 유전자 발현 효율을 나타내는 E값은 세포 내로 전달된 플라스미드 1 µg에 대한 gene product의 역가를 표시하는 것으로, Y값의 증가는 세포 외막으로부터 세포 내로 플라스미드 전달율이 증가하는 것을 의미하는 반면, E값의 증가는 세포 내로 들어온 플라스미드가 세포핵까지 전달되어 전사 및 진이를 거쳐 단백질로 만들어지는 효율을 나타낸다고 볼 수 있을 것이다.

본 연구에서 사용된 플라스미드는 luciferase 유전자를 repor-

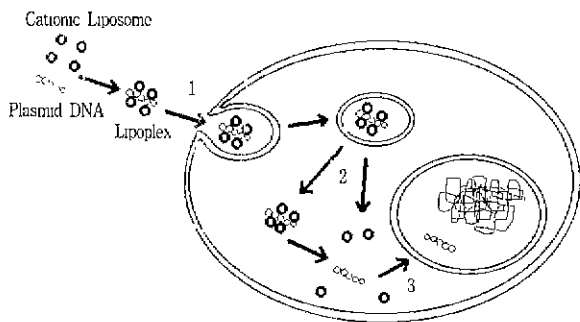


Figure 1. Schematic diagram for the gene delivery pathway with cationic liposomes.

1: endocytosis, 2: escape from endosome, 3: transfer to nucleus.

ter gene으로 가지고 있는 pGL3이며, 양이온 지질로는 DOTMA를 이용하여 HeLa cell에 lipofection 시켰을 때 몇 가지 첨가 물질이 위의 두 변수에 대해 어떠한 영향을 주는지에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

Chemicals

양이온 지질인 DOTMA는 Life Biotech.에서, 그리고 luciferase gene을 가진 플라스미드 pGL3와 luciferase의 역가 측정 kit는 Promega에서 구입하였다. 그 밖에 iron saturated transferrin, PLL(M.W. 20,700), phosphatidylcholine(PC), phosphatidylserne (PS), phosphatidylethanolamine (PE)등은 Sigma 제품이다.

P32 labeling plasmid의 제조 및 유전자 전달율 측정

본 실험에 사용한 플라스미드는 PEG 침전법으로 준비하였다(18). 세포 내로 전달된 유전자의 양을 정량하기 위하여 nick translation kit를 이용하여 플라스미드를 P³²로 pulse labeling 시켰다. Lipofection은 아래의 방법으로 수행하였으며 세포 내로 전달된 유전자 양은 scintillation counter를 이용하여 정량한 후 표준 곡선을 이용하여 계산하였다.

Lipofection 방법

Transfection 하기 전날 HeLa cell을 6 well plate에 계대배양하여 실험하는날 아침 40-60% 포화가 되도록 준비한다. 리포솜-플라스미드 복합체, 즉 lipoplex의 준비 방법은 다음과 같다. 먼저 5 µg의 DOTMA를 100 µl HBSS에 희석시킨 후 1 µg의 pGL3와 섞어서 15분간 실온에 방치한다. PLL을 첨가할 경우 주어진 양의 PLL을 먼저 1 µg의 pGL3와 섞은 후 지체없이 DOTMA 용액과 혼합한 후 15분간 방치한다. Transferrin을 첨가할 경우 DOTMA 용액에 transferrin을 먼저 첨가하고 15분간 실온에 방치하였다가 1 µg의 pGL3와 섞은 후 다시 실온에 15분간 방치한다. Transfection 방법은 다음과 같다. 세포 배양액을 걷어 내고 무혈청 배지로 일차 씻어 낸 후 다시 1mL의 무혈청 배지를 첨가하여 37 °C가 되게 한 후 준비한 lipoplex를 첨가하고 가볍게 흔들어 준 뒤 CO₂ incubator 속에 넣어 둔다. 4시간이 경과하면 배지를 모두 걷어 내고 무혈청 배지로 일차 씻어 준 뒤 세 혈청 배지 3mL를 첨가하여 다시 CO₂ incubator 속에 넣어 둔다. 약 40시간이 경과하면 plate를 꺼내어 luciferase 역가를 측정한다. 측정 방법은 먼저 배지를 걷어 내고 일차 씻어 준 후 lysis buffer 200 µL를 첨가한 뒤 실온에 30분간 방치한다. 세포 파쇄액을 회수한 뒤 가볍게 vortex하고 원심 분리하여 상등액 50 µL를 기질 용액 200µL와 혼합한 후 luciferase 역가를 lummometer를 이용하여 측정한다

음이온 지질 전 처리 방법

Lipofection하기 전에 전 처리에 사용한 음이온 지질은 PS/PE/PC를 1:2:1로 혼합하여 사용하였다. 먼저 무혈청 배지 1mL을 첨가하고 여기에 주어진 양의 음이온 지질 용액을 첨가한 뒤 CO₂ incubator 속에 넣어 둔다. 3시간이 경과하면 배지를 걷어 내고 무혈청 배지로 세포를 3회 씻어내 남아 있는 음이온 지질이 없도록 한 후 전술한 방법으로 lipofection을 수행한다.

결과 및 고찰

Lipofection의 첫단계는 lipoplex가 세포 밖에서 세포 내로 전달되는 과정이다. Figure 2는 P³²로 수식한 pGL3 1 µg과 DOTMA 5 µg을 혼합하여 lipoplex를 만들고 이를 이용하여 HeLa cell에 transfection 시켰을 때 시간에 따라 세포 내로 전달되는 플라스미드의 양을 측정 한 것이다. 첫 번째 첨가물로는 양이온 폴리머인 PLL을 이용하였다. PLL이 첨가되지 않은 경우에는 transfection 시작후 4시간이 경과했을 때 세포 내로 전달되는 플라스미드의 양은 처음 투여한 플라스미드의 16% 정도 였으나 PLL을 0.5 µg/mL의 농도로 첨가하면 48%까지 3배 가량 증가하는 것으로 나타났다. 세포 내로 전달된 플라스미드 양이 0.48 µg이고 플라스미드의 분자량이 약 1 × 10⁶ 이라면 well당 세포 수가 약 5 × 10⁵ 개이므로 세포 한 마리당 전달된 플라스미드 copy 수는 약 5.76 × 10⁵ 개가되므로 Zabner 등 (15)이 보고한 값인 2.95 × 10⁵ 개와 거의 같은 양의 플라스미드가 세포 내로 전달되었음을 알 수 있다. Figure 3A는 PLL 첨가 농도를 0 - 1 µg/mL로 변화시켰을 때 이에 따른 유전자 전달율, 즉 Y 값의 변화를 측정 한 것으로 PLL의 첨가 농도가 0.5 µg/mL에서 0.43으로 최대가 되었다가 다시 감소하는 형태를 보이고 있다. PLL의 첨가 농도가 0.5 µg/mL 이상이 되면 과잉의 양이온들이 역시 양이온을 많이 함유하고 있는 DOTMA와 플라스미드간의 결합을 방해하게 되므로 세포 내 유전자 전달율을 감소시키게 된다(7). PLL이 유전자 발현율에 미치는 영향을 조사하기 위해 P³²가 수식되지 않은 pGL3 1 µg을 같은 방법으로 lipofection 시킨 후 유전자 발현을 luciferase 역가로 측정 한 결과와 이를 다시 전달된 유전자양으로 나눈 값, 즉 E값을 Figure 3B에 나타내었다. 이 결과에 따르면 PLL을 첨가하지 않은 경우에 비해 0.5 µg/mL의 농도로 첨가할 경우 luciferase 역가는 1.44 × 10⁵ RLU(relative luciferase unit)에서 6.21 × 10⁵ RLU로 약 4.3배 가량 증가하였다. 그러나 세포 내로 전달된 유전자 1 µg에 대한 luciferase 역가로 환산한 E값의 경우에는 9.6 × 10⁵ RLU/µg plasmid에서 14.4 × 10⁵ RLU/µg plasmid으로 약 15배 가량 증가하는데 그쳐 PLL에 의한 luciferase의 역가 상승이 주로 세포 외막에서의 유전자 전달을 향상에 의해 일어난다는 것을 알 수 있다. Gao 등(7)에 의

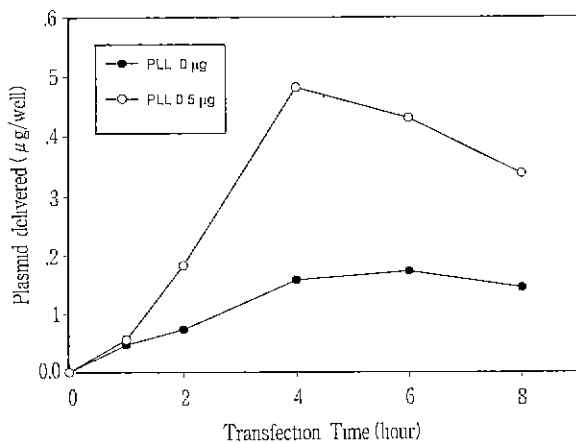
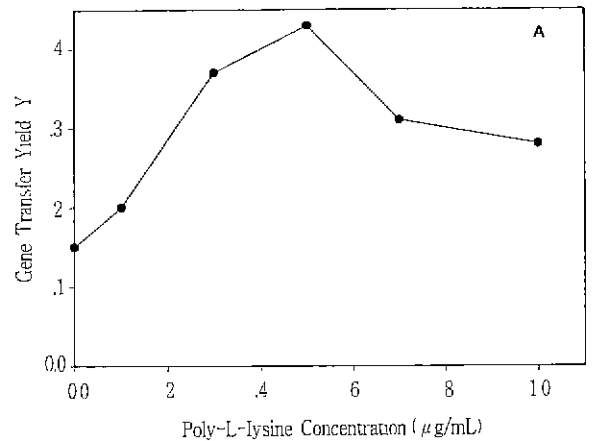
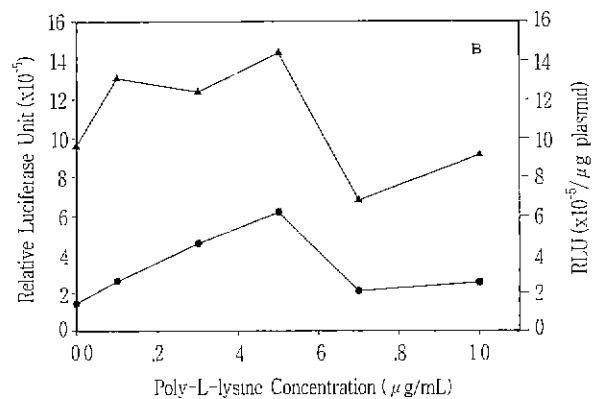


Figure 2. Time dependent change of plasmid delivered into HeLa cells with or without poly-L-lysine(PLL).



(a)



(b)

Figure 3 A; Effect of poly-L-lysine on the gene transfer yield. Y B; Effect of poly-L-lysine on the luciferase activity (RLU, relative luciferase unit, ●) and on the gene expression efficiency(RLU/µg plasmid, ▲).

하면 PLL이 유전자 전달을 향상시키는 기작은 cationic polymer인 PLL이 DNA와 결합하면 lipoplex의 구조가 compact하게 되어 1 µm 이상이던 lipoplex의 크기가 100nm까지 작아지게 되고 따라서 이들 복합체가 세포 내로 유입되는 속도와 양이 증가하게 된다는 것이다. 또 이들은 PLL이 endosome에서 플라스미드가 탈출하여 핵 내로 운반되는 것도 돕는다는 주장을 하고 있으나 E 값이 15배가량 증가한 본 실험의 결과로 보아서는 PLL의 이러한 효과는 기대보다 매우 미약한 것으로 보인다.

두 번째 첨가물로는 transferrin을 이용하였다. Transferrin은 세포 외막에 있는 receptor와 결합하여 clathrin-coated pit라는 곳을 통하여 endocytosis되므로 lipoplex의 세포 내 전달을 용이하게 할 수 있다(9) 본 실험에서는 첨가된 transferrin 농도가 15 µg/mL일 때 유전자 전달율 Y값은 0.22로부터 0.46으로 약 2.1배 가량 증가하였고(Figure 4A), 유전자 발현에 따른 luciferase역가는 transferrin을 첨가하지 않았을때 2.64 × 10⁵ RLU에서 20 µg/mL의 농도로 첨가하면 15.25 × 10⁵ RLU로 약 5.7배 가량 증가하였다(Figure 4B). 한편 전달된 플라스미드 양에 대한 luciferase 역가인 E값은 같은 transferrin 농도일때 12 × 10⁵ RLU/µg plasmid에서 34.65 × 10⁵ RLU/µg plasmid

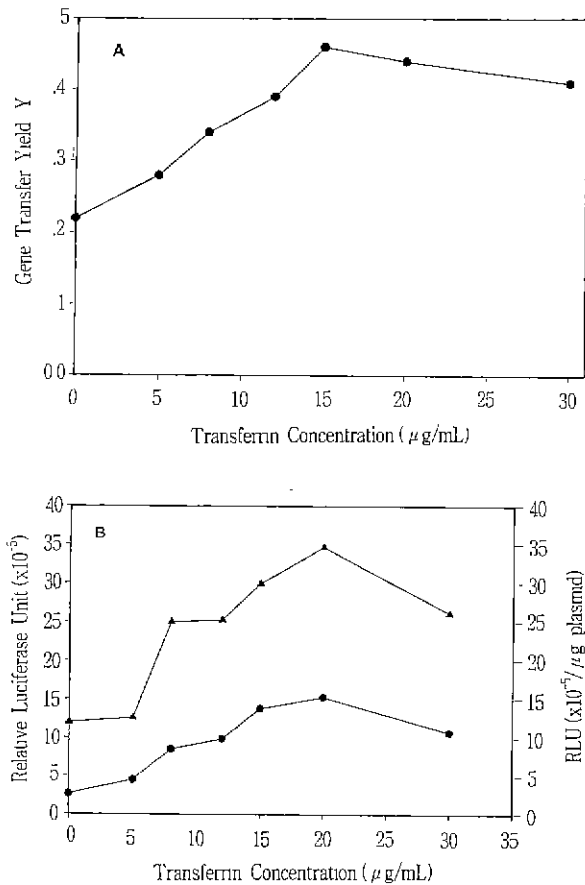


Figure 4. A; Effect of transferrin on the gene transfer yield, Y B; Effect of transferrin on the luciferase activity(RLU, relative luciferase unit, ●) and on the gene expression efficiency(RLU/µg plasmid, ▲).

로 약 2.8배 가량 증가하였음을 알 수 있다(Figure 4B). 이러한 결과는 transferrin이 세포 외막에서 receptor-facilitated 전달기작에 의한 유전자 전달을 향상 외에도 세포 내로 전달된 플라스미드가 endosome을 빠져나와 핵 내로 전달, 발현되는 과정에서도 상당 부분 기여하고 있음을 의미한다. 세포 내로 전달된 lipoplex는 endosome에서 lysosome과 융합하여 endolysosome이 되고 따라서 lysosome 유래의 분해 단백질에 의해 대부분 분해된다고 알려져 있으므로 분해가 일어나기 전에 endosome을 빠져나오는 일은 발현율을 향상시키는데 있어 매우 중요한 과정 중 하나이다. Cheng 등(16)에 의하면 transferrin-DOTMA를 이용한 유전자 전달 시스템에서 transferrin의 첨가는 DNA의 세포 내 전달을 2배 가량 증가시켰을 뿐 아니라 DNA가 endosome을 빠져나오는 과정에서도 어느 정도 기여했다고 주장하고 있다. 그 이유로서 transferrin은 세포 내로 전달된 후에도 receptor와 여전히 결합을 하고 있고 endosome에서 iron을 방출하면 endosome을 빠져나와 세포 표면으로 환원되는데 이 과정에서 일종의 bystander effect에 의해 lipoplex의 endosome 탈출을 도울 수 있다는 것이다. 이러한 주장이 받아들여지기 위해서는 더 확실한 실험 data가 필요하지만 본 실험 결과로 보아 transferrin의 첨가가 세포 내로 전달된 유전자가 endosome을 빠져나오거나 핵까지 전달되는 과정에서 긍정적인 영향을 주는 것

으로 보여진다.

플라스미드가 endosome을 빠져나오는 과정 못지 않게 플라스미드가 lipoplex로부터 해리되어 자유롭게 이동할 수 있어야 유전자 발현 효율이 증가될 수 있을 것이다. Zabner 등(15)에 의하면 lipoplex의 형태로 결합되어 있는 플라스미드와 자유롭게 해리된 플라스미드를 각각 *Xenopus laevis*의 난자 핵 내에 직접 주입시켜 본 결과, 양이온 지질과 결합하고 있는 플라스미드의 경우에는 유전자 발현 효율이 매우 낮는데 비해 해리된 플라스미드나 약간의 지질과 결합하고 있는 플라스미드의 경우에는 높은 발현율을 나타낼 수 있음을 실험을 통하여 보여 주었다. 이러한 관점에서 볼 때 우리는 양이온 지질과 결합하고 있는 플라스미드가 해리되어 핵 내로 이동하는 것을 돕기 위하여 음이온을 가진 지질을 이용하여 lipoplex로부터 플라스미드를 해리시킬 경우 유전자 발현율에 어떠한 영향을 주는가에 대하여 조사하였다. Szoka 등(17)은 플라스미드가 lipoplex로부터 해리되는 기작에 관한 연구를 하면서 음이온 지질 혼합물인 PS/PE/PC(1:2:1)가 매우 효과적으로 양이온 지질/DNA complex의 해리를 유도한다는 것을 보고하였다. 따라서 본 실험에서 사용한 세 번째 첨가물은 음이온 지질 PS/PE/PC(1:2:1)이다. 그러나 음이온 지질을 lipoplex 제조시 함께 첨가할 경우 양이온 지질과 플라스미드의 결합을 방해할 것이므로 음이온 지질은 따로 transfection을 수행하기 전에 전 처리하여 주는 방법을 사용하였다. 음이온 지질 혼합물의 농도를 0-40 µg/mL로 변화시켜 3시간 정도 전 처리 한 뒤 다시 lipofection을 수행하였을 때 유전자 전달율을 측정된 결과는 Figure 5A와 같다. 예상한 대로 음이온 지질을 전 처리 할 경우 세포 외막에서의 유전자 전달율 Y값은 0.31에서 0.23까지 완만하게 감소하는 경향을 보였다. 그러나 luciferase역가를 측정할 경우 3.87×10^5 RLU에서 30 µg/mL의 양이온 지질로 전처리 하면 7.35×10^5 RLU로 1.9배 증가하였고 이로부터 계산한 E값은 12.48×10^5 RLU/µg plasmid에서 30.62×10^5 RLU/µg plasmid로 2.4배 증가하였다(Figure 5B). 이러한 실험 결과는 미리 처리해 준 음이온 지질이 lipoplex의 양이온 지질과 결합하게 되므로 플라스미드의 해리를 촉진할 수 있고 따라서 자유로워진 플라스미드가 핵 내로 이동하거나 전사과정을 용이하게 한 결과라고 추측되어 진다.

본 실험에서 우리는 lipofection에서 사용되는 세 가지 형태의 첨가물, PLL, transferrin, anionic lipid에 대한 세포 외막 유전자 전달율과 세포 내 유전자 발현율에 대한 영향을 살펴보았다. PLL은 lipoplex를 compact한 형태로 만들어 주로 세포 외막에서의 유전자 전달율을 향상시키는 반면, transferrin은 ligand-receptor 결합에 의한 유전자 전달 촉진과 함께 lipoplex의 endosome 탈출을 돕는 것으로 보여진다. 또 음이온 지질을 미리 전 처리하면 세포 내 전달된 lipoplex로부터 플라스미드의 해리를 촉진시켜 결과적으로 유전자 발현율의 증가를 가져오는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 종합하면 앞으로 양이온 지질을 이용한 transfection에서 바이러스를 이용하는 방법 못지 않게 그 효율을 증가시키기 위해서는 세포 외막에서의 유전자 전달을 향상과 함께 세포 내로 전달된 lipoplex가 endosome을 빠져나온 후 해리되어 핵까지 성공적으로 도달할 수 있도록 양이온 지질을 설계하거나 첨가물들에 대한 연구를 수행해 나가야 할 것이다.

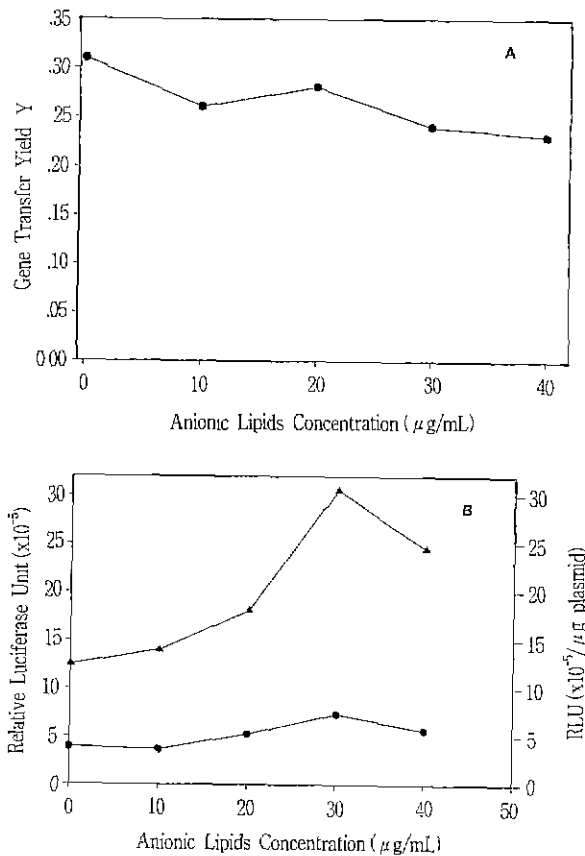


Figure 5. A; Effect of pretreatment of cells with anionic lipids (PS/PE/PC. 1:2:1) on the gene transfer yield, Y B; Effect of pretreatment of cells on the luciferase activity(RLU, relative luciferase unit, ●) and on the gene expression efficiency(RLU/µg plasmid, ▲).

요약

양이온 리포솜을 이용한 유전자 전달에서 전달 효율을 증가시키는 것으로 알려진 세 가지 첨가물, Poly-L-lysine(PLL), transferrin 그리고 PS/PE/PC로 된 양이온 지질 화합물들이 세포막에서의 유전자 전달율과 세포 내 유전자 발현율에 대하여 미치는 영향을 조사하였다. PLL은 세포막에서 유전자 전달율을 3배정도 증가시켰으나 전달된 단위 플라스미드당에 대한 유전자 발현율은 1.5배 가량 증가하는데 그쳤다. Transferrin을 첨가할 경우 유전자 전달율은 약 2.1배 정도 증가하는데 반해 유전자 발현율은 2.8까지 증가하였다. 양이온 지질 화합물을 처리한 경우에는 세포막에서의 유전자 전달율은 20% 정도 감소하는 경향을 보였으나 세포 내 유전자 발현율은 2.4배 증가하였다. 이러한 실험 결과로 보아 PLL은 주로 세포막에서의 유전자 전달율을 증가시키는 효과가 있는 반면 transferrin은 세포 내에서의 유전자 이동에도 긍정적인 기여를 하는 것으로 보인다. 또 양이온 지질들을 처리할 경우 세포막에서의 유전자 전달율을 다소 떨어뜨리는 효과가 있으나 세포 내로 전달된 lipoplex의 해리률도와 결과적으로 유전자 발현율을 증가시키는 것으로 해석된다. 이러한 결과들을 볼 때 앞으로 양이온 리포솜을 이용한 유전자

전달에서 그 효율을 높이기 위해서는 세포막에서의 유전자 전달율을 증가시키는 일과 전달된 유전자가 세포 내에서 핵까지 이동하여 발현을 도울 수 있는 첨가제에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 건국대학교 해외 파견 연구 지원에 의해 수행된 연구 결과의 일부이며 연구 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Felgner, P. and G. Ringold (1989), Cationic Liposome-mediated Transfection, *Nature*, **337**, 387-388.
2. Gao, X. and L. Huang (1991), A Novel Cationic Liposome Reagent for Efficient Transfection of Mammalian Cells, *Biochem. Biophys. Research Comm.*, **179**, 280-285.
3. Farhood, H., R. Bottega, R. Epand and L. Huang (1992), Effect of Cationic Cholesterol Derivatives on Gene Transfer and Protein Kinase C Activity, *Biochim Biophys Acta*, **1111**, 239-246.
4. Gao, X., D. Jaffurs P Robbins and L. Huang (1994), A Sustained. Cytoplasmic Transgene Expression System Delivered by Cationic Liposomes, *Biochem. Biophys. Research Comm.*, **200**, 1201-1206
5. Felgner, J., R. Kumar, C. Sridhar, C. Wheeler, Y. Tsai, R. Border, P. Ramsey, M. Martin and P. Felgner (1994), Enhanced Gene Delivery and Mechanism Studies with a Novel Series of Cationic Lipid Formulations, *J. Biol. Chem.*, **269**, 2550-2561.
6. Rose, J., L. Buonocore ad M. Whitt (1991), A New Cationic Liposome Reagent Mediating Nearly Quantitative Transfection of Animal Cells, *Biotechniques*, **10**, 520-525.
7. Gao, X. and L. Huang (1996), Potentiation of Cationic Liposome-mediated Gene Delivery by Polycations, *Biochemistry*, **35**, 1027-1036.
8. Wang, S., R Lee, G. Cauchon, D. Gorenstein and P. Löw (1995), Delivery of Antisense Oligodeoxynucleotides Against the Human Epidermal Growth Factor Receptor into Cultured KB Cells with Liposomes Conjugated to Folate via Polyethylene Glycol, *Proc Natl. Acad. Sci.*, **92**, 3318-3322.
9. Zanke, M., P. Steinlein, E. Wagner, M. Cotten and H. Beug (1990), Receptor-mediated Endocytosis of Transferrin-polycation Conjugates: An Efficient Way to Introduce DNA into Hemotopoietic Cell, *Proc Natl. Acad. Sci.*, **87**, 3655-3659.
10. Plank, C., B. Oberhauser K. Mechtler, C Koch and E. Wagner (1994), The Influence of Endosome-disruptive Peptides on Gene Transfer Using Synthetic Virus-like Gene Transfer Systems, *J. Biol. Chem.*, **269**, 12918-12924.
11. Wheeler C., L. Sukhu, G. Yang, Y. Tsai, C. Bustamente,

- P. Felgner, J. Norman, M. Manthorpe (1996), Converting an Alcohol to An Amine in a Cationic Lipid Dramatically Alters the Co-lipid Requirement, Cellular Transfection Activity and the Ultrastructure of DNA-cytofectin Complexes, *Biochim Biophys Acta*, **1280**, 1-11.
12. Mack, K., R. Walzem and J. Zeldis (1994), Cationic Lipid Enhances *in vitro* Receptor-mediated Transfection, *Am J. Med. Sci.*, **307**, 138-143.
 13. Mizuguchi, H., T. Nakagawa, M. Nakanishi, S. Imazu, S. Nakagawa and T. Mayumi (1996), Efficient Gene Transfer into Mammalian Cells Using Fusogenic Liposomes, *Biochem Biophys. Research Comm.*, **218**, 402-407.
 14. Felgner, P. L., Y. Barenholz, J. P. Behr, S. H. Cheng, P. Cullis, L. Huang, J. A. Jesse, L. Seymour, F. Szoka, A. R. Thery, E. Wagner, and G. Wu (1997), Nomenclature for Synthetic Gene Delivery Systems, *Human Gene Ther.*, **8**, 511-512.
 15. Zabner, J., Al. Fasbender, T. Moninger, K. Poellinger and M. Welsh (1995), Cellular and Molecular Barrier to Gene Transfer by a Cationic Lipid, *J. Biol. Chem.*, **270**, 18997-19007.
 16. Cheng, P. (1996), Receptor Ligand-facilitated Gene Transfer: Enhancement of Liposome-mediated Gene Transfer and Expression by Transferrin, *Human Gene Ther.*, **7**, 275-282.
 17. Xu, Y. and F. Szoka, Jr. (1996), Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complex Used in Cell Transfection, *Biochemistry*, **35**, 5616-5623.
 18. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis (1989), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Vol. I, pp 1.33-1.40.