

폴리디아세틸렌 리포솜 표면에 저분자량의 폴리에틸렌이민을 연결한 새로운 유전자 전달체 합성 및 특징 연구

이영화 · 임강혁 · 허정석*[†] · 최준식[†]

충남대학교 자연과학대학 생화학과, *충남대학교 자연과학대학 화학과
(2013년 7월 24일 접수, 2013년 9월 23일 수정, 2013년 9월 27일 채택)

Synthesis and Characterization of Polyethylenimine-conjugated Polydiacetylene Liposome as a Gene Delivery Carrier

Young Hwa Lee, Kang Hyuck Yim, Jungseok Heo*[†], and Joon Sig Choi[†]

Department of Biochemistry, Chungnam National University, Gung-dong 220, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

*Department of Chemistry, Chungnam National University, Gung-dong 220, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

(Received July 24, 2013; Revised September 23, 2013; Accepted September 27, 2013)

초록: 본 논문은 저분자량의 폴리에틸렌이민을 폴리디아세틸렌 리포솜 표면에 연결하여 유전자를 세포 내로 전달할 수 있는 새로운 양이온성 고분자 리포솜 유전자 전달체 개발에 대한 결과이다. 폴리디아세틸렌 리포솜 제조 후에 자외선을 조사하여 고분자성 리포솜을 제조한 후, 유전자의 전달 효율을 높이기 위해 폴리에틸렌이민을 리포솜 표면에 커플링제를 이용하여 공유결합시켜서 PCDA-PEI 리포솜을 합성하였다. 제조한 고분자 리포솜을 이용하여 동물세포 내에서의 유전자 전달 및 발현 효과와 그에 따른 독성을 확인하는 연구를 수행하였다. 사용한 폴리에틸렌이민은 가지형이고 분자량은 2 kD인 것을 사용하였다. DNA와의 복합체 형성을 알아보기 위하여 전기영동 방법과 피코그린 형광 염색 시약을 사용하였으며 효율적으로 복합체를 형성하는 것을 확인하였다. 전달체의 효율과 독성을 확인하기 위하여 HEK 293 및 HeLa 세포를 사용하여 확인하였다. 실험 결과 PCDA-PEI 리포솜은 세포 내에서 비율이 높아질수록 유전자 전달 효율이 증가하는 경향을 보였고, 세포에 대한 독성도 상대적으로 낮음을 확인하였다. 이러한 결과는 PCDA-PEI 리포솜이 효율적인 유전자 혹은 약물 전달체로 사용될 수 있음을 보여주었다.

Abstract: In this paper, we made a new polycationic polymeric liposome composed of low molecular weight polyethylenimine (PEI) and 10,12-pentacosadiynoic acid (PCDA). PCDA liposome was prepared by ultraviolet irradiation. PEI was further conjugated on the surface of the polymerized PCDA liposome using coupling reagents to make PCDA-PEI. The blue-to-red transition of PCDA liposome was observed during the coupling reaction. The size distribution of liposome and complexes with plasmid DNA was measured by dynamic light scattering (DLS). The complex formation was also identified by agarose gel electrophoresis and PicoGreen reagent assay. We confirmed the complex formation of the polymeric liposome with DNA and then performed transfection and cytotoxicity assay in HEK 293 and HeLa cells. As a result, PCDA-PEI showed significant gene transfection efficiency and low cytotoxicity. This study shows that PEI-conjugated PCDA liposome could be an efficient gene or drug delivery carrier.

Keywords: polydiacetylene, polyethylenimine, gene delivery, transfection.

서 론

일반적으로 질병 치료를 위해 사용되는 약물치료법은 여러 질환에 대해서 효과적이거나, 암을 비롯한 난치성 질환들은 보다 더 근본적인 치료 방법의 개발이 필요하다. 특히 질병을 유전자 차원에서 치료하기 위해 연구가 진행 중인 유전자 치료법은 약물치료법에 대한 새로운 치료법이라고 할 수 있다.

유전자 전달 및 발현을 위해 사용되는 전달체는 주로 바이러스성과 비바이러스성 전달체로 나누어진다.

바이러스성 전달체는 바이러스에서 유래하여 유전자 전달체로 많이 사용되어 왔다. 그 예로써 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 렌티 바이러스 등이 있다. 이러한 바이러스성 전달체들은 유전자 전달 및 발현 효과는 매우 우수하지만 면역 반응 유발 또는 유전자의 변형 등의 문제점이 있으며 전달할 유전자의 크기에 제한을 받는 문제점이 있다고 보고되었다.¹

한편, 비바이러스성 전달체는 물리적 혹은 화학적 방법으

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jungseokheo@cnu.ac.kr; joonsig@cnu.ac.kr

로 세포 내에 유전자를 전달하여 발현시키는 방법을 사용한다. 그 예로써 리포솜이나 천연 혹은 합성 고분자 전달체 등이 있으며, 발현할 유전자를 가지고 있는 DNA와 직접적으로 복합체를 형성하거나 인캡슐레이션화 하여 세포 내부로 유입이 잘 되도록 나노입자를 형성하여 전달하는 방법들이 활발히 연구되고 있다. 이러한 비바이러스성 전달체는 상대적으로 전달할 수 있는 유전자의 크기에 상대적으로 제약이 적고 부작용도 없지만 바이러스성 전달체에 비해 그 효율성이 낮다는 단점이 있다.²

비바이러스성 전달체를 이용한 방법 중 나노미터 수준의 복합체를 형성하는 방법은 주로 양이온성 폴리머와 양이온성 지질 등이 정전기적 상호인력으로 DNA와 복합체를 형성하여 세포 내로 유입되게 된다. 양이온성 폴리머들은 분자량이나 특성에 따라 여러 지질체나 폴리머에 변형되어 사용되어 지기도 한다.³

특히, 수용액상에서 폴리디아세틸렌 고분자를 형성하여 고분자 리포솜을 형성할 수 있는 10,12-pentacosadiynoic acid (PCDA) 분자는 일종의 지질체로 자기조립을 통하여 리포솜을 형성한다. 폴리디아세틸렌은 pH 변화나 온도변화, 용매의 성질, 자외선 등 외부의 자극에 따라 그 색이 변화하게 된다.^{4,6} 이러한 색 변화를 통하여 특정 리간드와의 결합 여부를 확인할 수 있고 따라서 바이오 센서 응용연구 분야에서 다양하게 연구되고 있다.

양이온성의 고분자 중에서 폴리에틸렌이민(polyethylenimine, PEI)은 선형과 가지형 모두 존재하며 다양한 형태의 아민기를 고루 포함하고 있어서 양이온적 성질을 띠고 있는 폴리머 중 하나이다. 폴리에틸렌이민의 표면 양전하는 유전자의 음전하와 쉽게 복합체를 형성하여 유전자가 세포벽을 통과하는데 효율적인 역할을 한다.⁷

세포벽을 통과하여 세포의 핵 내로 유입되는데 있어서는 백터의 DNA 결합 및 응축 능력이 중요시 된다. 세포 외부에서 DNA를 응축시킨 백터는 내포 작용을 통하여 세포 내부로 유입되게 되고 이 때 엔도솜 형태로 세포 내에서 pH가 낮아짐에 따라 리소솜으로 분해되기 전에 세포질에서 방출되며 그 후에 핵으로 전달되는 과정을 거치게 된다.^{3,6}

본 연구에서는 폴리디아세틸렌 분자인 PCDA와 독성이 낮은 저분자량의 가지형 PEI 고분자를 사용하여 합성 고분자 리포솜을 제조하였고, 이를 이용하여 플라즈미드 DNA와의 복합체의 형성 및 흡광도 변화 등의 특징을 확인하였고, 동물 세포에 대한 유전자 전달 효율과 그에 따른 독성평가를 수행하여 비바이러스성 백터로써의 효율성을 확인하였다.

실 험

시약 및 재료. 본 실험에서 사용된 10,12-pentacosadiynoic acid(PCDA)는 Fluka사의 10,12-pentacosadiynoic acid(Figure

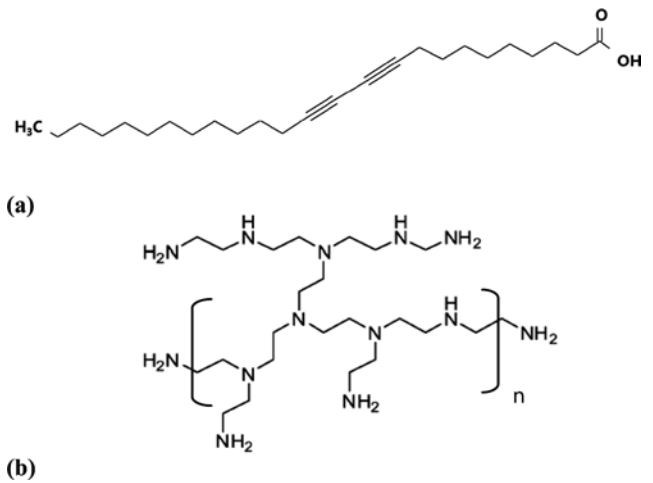


Figure 1. (a) Structure of 10,12-pentacosadiynoic acid (PCDA); (b) polyethylenimine (PEI).

1(a))를⁸ 구매하여 사용하였다. PCDA를 녹이는 용매는 Sigma-Aldrich사의 chloroform을 사용하였으며, 폴리에틸렌이민(PEI, MW 2 kD)은 Sigma-Aldrich사에서 구매하였다.

루시페라아제 정량과 BCA 단백질 정량을 위해서 Promega (Madison, WI)의 루시페라아제 정량 키트와 Pierce(Rockford, IL)의 마이크로 BCA 단백질 정량 키트를 각각 구입하여 사용하였다. PCDA 리포솜 표면에 저분자량의 가지형 폴리에틸렌이민(PEI, 2 kD)을 연결하였다. 합성을 위하여 *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC)와 *N*-hydroxysuccinimide(NHS)를 커플링제로 사용하였다.

사용한 water bath는 Lab Companion의 CW-05GL이고, bath type의 sonicator를 사용하였다. 제조된 리포솜의 여과를 위해서 0.8 μ m filter를 사용하였다.

Cell Lines. HeLa cell과 Human Embryonic Kidney 293 (HEK 293) cell을 10% fetal bovine serum(FBS, GIBCO)과 1% antibiotic(GIBCO)을 포함하는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, GIBCO)으로 배양하여 37°C, 5% CO₂, 95%의 습도로 환경을 유지하며 배양하였다.

PCDA 리포솜 제조. 유기용매인 클로로포름에 PCDA를 녹여 리포솜 형태로 만든 후 질소 기체를 이용하여 클로로포름을 완전히 제거해 준 후 3차 증류수를 넣어서 다시 녹여주기 위하여 water bath를 이용하여 80°C에서 15분 동안 처리하였다. 그 후 sonicator를 이용하여 리포솜을 형성한 후 불순물을 제거해 주기 위해 filter를 이용하여 여과시켜 준다. 리포솜의 안정화를 위하여 4°C에서 4시간 이상 보관하며, 본 실험에서는 UV 반응기(RMR-600, 254 nm)에서 조사하여 고분자화된 폴리머 리포솜으로 만들어 사용하였다.

PCDA 리포솜과 PEI의 결합. PCDA 표면에 있는 음전하는 유전자를 전달하기에 쉽지 않기 때문에 표면을 PEI(Figure 1(b))와 결합시켜 유전자 전달에 용이하게 만들어주었다.⁹

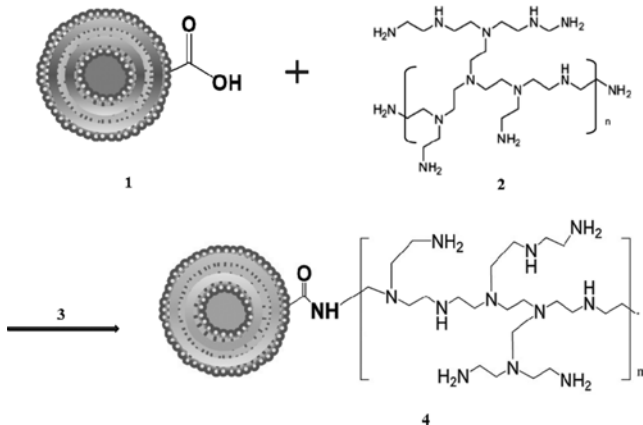


Figure 2. Synthetic scheme of the PCDA-PEI liposome (1: polymerized PCDA liposome, 2: PEI 2 kD, branched form, 3: *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodi-imide hydrochloride (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), 4: structure of PCDA-PEI liposome).

PCDA와 PEI는 1:5의 몰비율로 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. PEI의 아민기와 PCDA의 카르복실기가 결합하게 되고, EDC, NHS 커플링제를 사용하여 연결하였다(Figure 2). 반응 후 하루 동안 투석(MWCO 3500)을 진행한 후 동결건조하여 최종 생성물을 얻었다. 합성된 PEI를 계산하기 위하여 반응물질인 고분자화시킨 PCDA 리포솜 농도(0.37 mg/mL)와 PCDA-PEI 리포솜의 농도(1.19 mg/mL)를 구하였고, 따라서 결합하여 붙은 PEI의 농도는 0.82 mg/mL로 결합 수득률이 약 41% 정도로 합성되었음을 확인하였다. 이 때 결합을 확인하기 위하여 FTIR을 통해 PCDA와 PEI의 펩티드 결합을 확인하였고, 합성물의 특성 연구를 위해 600 MHz NMR 분광계(Bruker, AVANCE III 600)로 ¹H NMR 스펙트럼을 측정하였다.

PCDA-PEI (D₂O): δ (ppm) 2.0-2.9 (-NH-), 0.96 (-CH₃), 2.39-2.50 (-CH₂-CH₂), 8.03 (-CO-NH-), 5.11 (-NH₂), 1.28-1.31 (-CH₂-CH₂-), 2.50-2.52 (-NH-CH₂-CH₂-NH-)

PCDA-PEI 복합체 크기 및 표면 전하 측정. 제조된 폴리에틸렌결합 고분자 리포솜 및 플라스미드 DNA와의 복합체 등의 크기 및 표면전하를 확인하기 위하여 MALVERN Zetasizer Nano ZS를 이용하여 측정하였다.

PCDA-PEI 복합체와 플라스미드 DNA Complex Test. 제조된 PCDA-PEI 리포솜과 플라스미드 DNA의 결합력을 알아보기 위하여 전기영동과 PicoGreen 시약을 통해 확인하였다. 0.25 μg/μL 농도의 pCN-Luci DNA와 복합체를 weight ratio로 30분 동안 상온에서 complex시킨 후 Tri acetate EDTA buffer를 사용하여 ethidium bromide가 첨가된 0.7%의 agarose gel을 통해 결합력을 확인하였다. 전기영동 후 PicoGreen 시약을 사용하여 미리 complex시켜 둔 리포솜을 weight ratio 별로 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)와 섞어 PicoGreen 시약과 2분간 반응시켜 분광형광계(Quantech

digital filter fluorometer, Thermo scientific)를 이용하여 파장은 excitation 480 nm, emission 515 nm로 고정하여 형광을 측정하였다.

Transfection Efficiency Assay. PCDA-PEI 리포솜의 세포 내 유전자 전달 효율을 측정하기 위하여 HeLa cell과 HEK293 cell을 48 well plate에 3만개/well의 cell을 깔고 24시간 동안 배양 후 리포솜과 DNA를 complex시켜 cell에 처리해 주었다. 처리하고 24시간 동안 배양한 후, 용해시키고 루시페리아제 측정과 단백질 정량을 통해 세포 내 유전자 발현 효율을 측정하였다. 효소 활성 분석 시 LB 9507 광도계(Berthold, Germany)를 사용하였고, 단백질 정량은 각각 4시간 반응 후 ELISA(VERSAMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다.¹⁰

WST-1 Assay. 합성된 리포솜의 독성확인을 위하여 WST-1 assay 방법을 통해 다른 고분자 전달체와 비교하여 확인하였다. 유전자 전달효율에 사용된 cell과 마찬가지로 HeLa cell과 HEK293 cell을 사용하였다. 96 well에 1 well당 15000개의 cell을 넣고 24시간 동안 배양한 후, 합성된 고분자 리포솜과 대조군을 농도 별로 희석하여 세포에 처리하였다. 처리 후 24시간 동안 배양한 후에 WST-1 시약(Daeil Lab Service, Seoul, South Korea)을 10 μL씩 각 well에 넣고 2시간 후 ELISA로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

공초점 형광현미경 실험. HeLa 세포를 35 mm confocal dish(coverglass bottom dish, SPL)에 5000개/well의 세포를 37 °C에서 배양했다. PCDA-PEI 리포솜의 형광을 나타내기 위하여 Alexa Fluor® 488 5-SDP Ester(Alexa Fluor® 488 Sulfodichlorophenol Ester)를 사용하였다. 세포의 핵 염색을 위하여 bisBenzimide H 33342 trihydrochloride을 처리한 상온에서 5분간 반응시킨 뒤 DPBS로 세척 과정을 거친 후 공초점 현미경(LSM5 live configuration variotwo VRGB)으로 관찰하였다.

결과 및 토론

이번 연구를 통해 PCDA 표면에 2 kD의 PEI를 사용하여 제조한 새로운 고분자성 PCDA-PEI 리포솜이 동물 세포에 대한 유전자 전달에 매우 효과적임을 알 수 있었다.

PCDA는 254 nm의 파장에서 UV를 조사하게 되면 고분자화되어 PCDA 리포솜은 푸른색으로 색변화가 관찰된다. 이 때 폴리머화된 PCDA에 PEI를 연결시켜 주면 푸른색에서 빨간색으로 색 변화가 유발됨을 확인하였다. 여러 파장에서 흡광도를 측정하여 정확한 색변화를 수치적으로 측정하였다. 흡광도 측정 결과 푸른색을 띠는 폴리머화된 PCDA 리포솜은 640 nm에서 흡수 피크를 나타내며, PCDA 표면에 PEI를 붙인 리포솜은 540 nm 부근에서 최대 흡광도를 나타내는 것을 확인하였다(Figure 3).

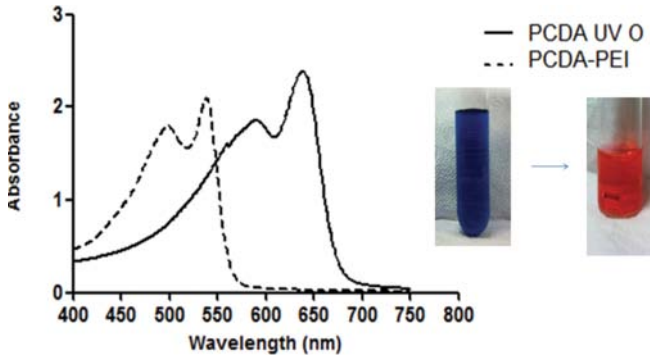


Figure 3. Absorbance results for the polymerization of the PCDA liposome.

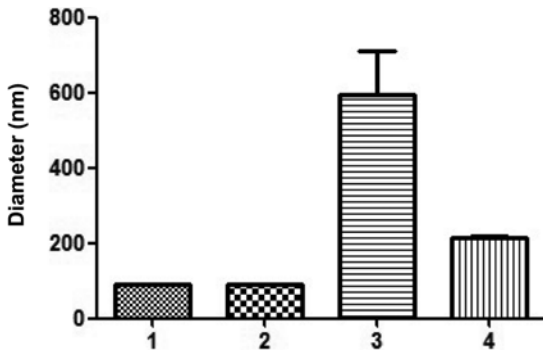


Figure 4. The size measurement of polymerized PCDA-PEI liposome and DNA complex is smaller than the polymerized PCDA-PEI liposome (1: nonpolymerized PCDA liposome, 2: polymerized PCDA liposome, 3: polymerized PCDA-PEI liposome, 4: polymerized PCDA-PEI liposome and DNA complex).

유전자 전달 벡터는 음이온성인 DNA와 결합하기 위하여 양전하를 띠며 리포솜은 유전자 전달을 위해 복합체 형성 후 세포 내로 들어가기에 적절한 크기를 지녀야 한다. 기존 PCDA 리포솜의 크기는 약 100 nm 미만으로써 폴리머화를 시키면 크기가 약간 줄어든다. 이후 투석시키는 과정에서 겔표면에 PEI를 결합시킨 PCDA-PEI는 물에서 투석 후에 크기가 증가하여 500-600 nm 정도 됨을 확인하였다. 이 때 DNA와 복합체를 형성하게 되면, 고분자 리포솜 벡터와 DNA 사이에 정전기적 인력으로 복합체의 크기가 약 200 nm가 됨을 확인하였다. 이는 DNA와 폴리머가 결합하면서 응축되는 현상으로 크기가 효과적으로 줄어들게 된다(Figure 4).

UV를 조사한 PCDA 리포솜과 PEI를 결합한 PCDA-PEI 리포솜의 표면 전하를 측정한 결과 PCDA만을 측정할 때 표면 전하는 -32.91 mV로 확인되었고, 표면에 PEI로 결합시킨 리포솜은 양의 값인 +19.08 mV로 측정되었다(Figure 5). 이를 통해 PCDA 리포솜은 표면이 음전하로 나타나지만 PEI를 결합하였을 때 표면이 양전하로 측정되어 만들어진 PCDA-PEI 리포솜이 양이온성 고분자로 합성된 것을 확인할 수 있었다.

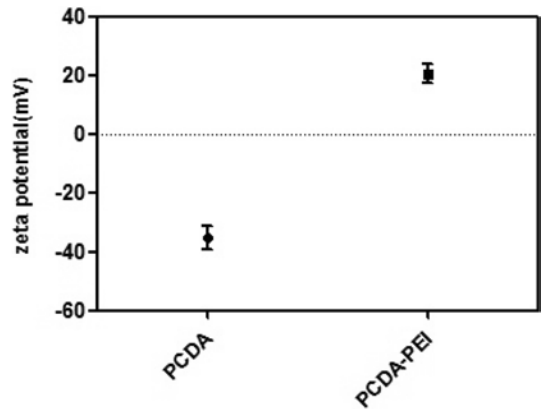


Figure 5. Zeta potential values of PCDA and PCDA-PEI liposomes.

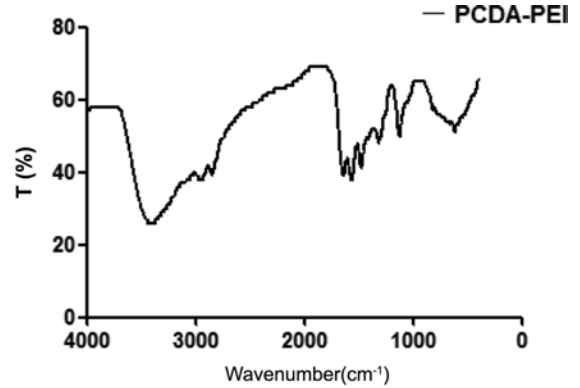


Figure 6. FTIR data of PCDA-PEI.

또한 PCDA와 PEI의 결합을 확인하기 위하여 FTIR을 통하여 amide bond를 확인하였다. 보통 amide bond의 wavenumber는 1500-1600 범위에서 확인할 수 있다. PCDA-PEI 리포솜은 2848, 2956(ν_{C-H}), 1475, 3411(ν_{N-H}), 1562, 1639 cm^{-1} (ν_{CO-NH})에서 특수한 피크가 나타났다(Figure 6). 이를 통해 PCDA 리포솜 표면에 PEI가 결합되어 amide bond를 형성했다는 것을 알 수 있었다.

양이온성 고분자인 PEI를 표면에 연결한 PCDA 리포솜과 플라스미드 DNA의 결합력을 확인하기 위하여 전기영동을 실시한 결과 여러 질량비 중 1:1에서부터 완벽히 결합하는 것을 확인할 수 있었고(Figure 7), 이를 좀 더 정확하게 확인하기 위하여 PicoGreen 시약을 사용하여 DNA와 PCDA-PEI 리포솜이 효과적으로 결합함을 확인할 수 있었다(Figure 8).

DNA와 PCDA-PEI 리포솜의 결합력을 확인한 후 벡터가 cell 안으로 DNA를 전달시키는 유전자 전달 효율을 확인하기 위하여 HeLa 및 HEK293 세포를 통하여 루시페라아제 발현 효율을 측정하고 비교하였다. 대조군으로 PEI 2 kD과 PEI 25 kD으로 유전자 발현 효율을 수행하였다. PCDA-PEI 리포솜과 DNA의 weight ratio 1:2부터 양성대조군인 PEI 25 kD 보다는 낮지만 리포솜 합성에 사용된 대조군인 PEI 2 kD보



Figure 7. Gel image of agarose gel retardation of plasmid DNA and polymer (C: control, only plasmid DNA, weight ratio of polymer: DNA; 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10:1).

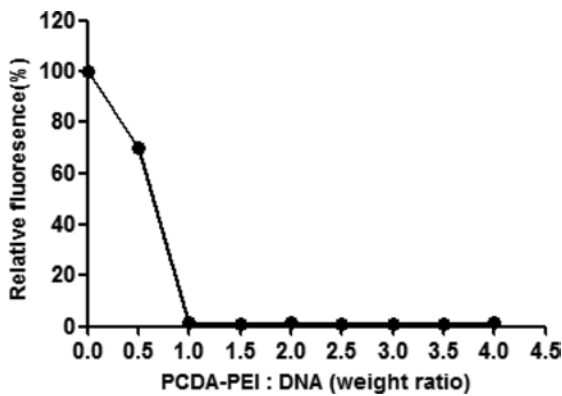


Figure 8. Complexation of polymer using PicoGreen reagent. The fluorescence was measured at each weight ratio (excitation 480 nm, emission 520 nm).

다 높은 효율을 보이는 것을 확인하였다(Figure 9). HeLa cell과 HEK293 cell line에서 유전자 전달 효율의 차이를 확인하였으며 이는 두 세포간의 특성 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 또한 리포좀의 양이 증가함에 따라 두 세포주에서 모두 유전자 전달 효율이 증가하는 경향성을 보임을 알 수 있었는데, 이는 합성한 리포좀의 양이 증가함에 따라 양이온 하전 밀도가 증가하고 이로 인해 DNA와 복합체를 형성하기가 수월하며 세포막과의 상호작용 증가로 더욱 용이하게 세포 내로 전달하여 비교적 높은 효율을 나타내는 것으로 생각된다.

비바이러스성 벡터가 DNA를 응축시켜 세포 내로 유입을 촉진하는 경향성을 갖는다는 점도 중요하지만 무엇보다도 전달체가 독성을 얼마나 나타내는지 확인하는 것은 중요한 요인이다. 이를 확인하기 위하여 WST-1 시약을 사용하여 독성을 측정할 결과 전달체 중 유전자 전달효율은 높지만 세포 독성이 강한 PEI 25 kD 보다는 합성된 PCDA-PEI가 낮은 독성을 가지고 있고 PEI 2 kD와 유사하게 매우 낮은 수준의 독성을 보이는 것을 확인하였다(Figure 10).

리포좀이 세포 내로 전달되는 것을 확인하기 위하여 *in vitro* 상에서 PCDA-PEI 리포좀에 형광 물질을 결합하여 HeLa 세

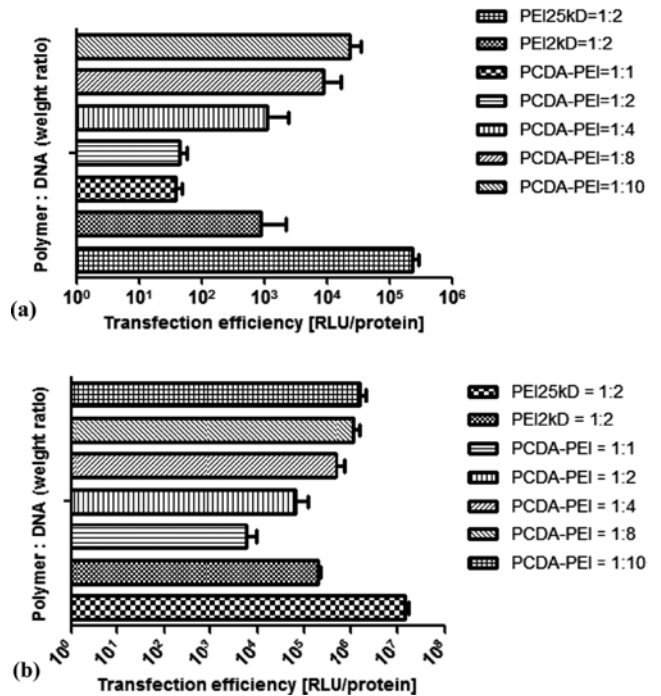


Figure 9. Transfection efficiency of polymer: (a) in HeLa cells; (b) in HEK293 cells at each weight ratio.

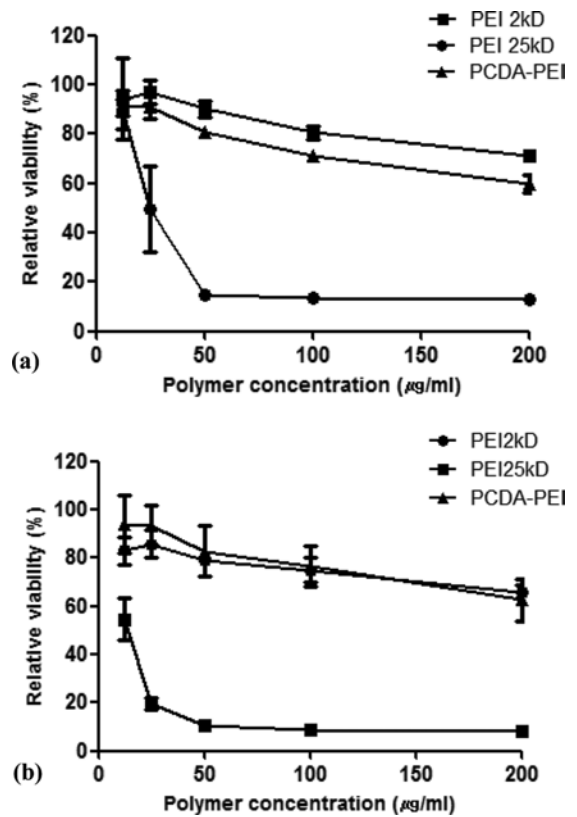


Figure 10. Cytotoxicity of PCDA-PEI liposome: (a) in HeLa cells; (b) in HEK293 cells by WST-1 assay at each concentration.

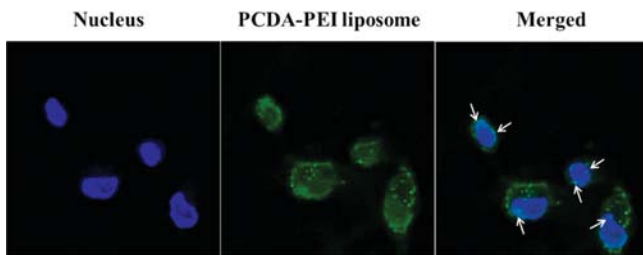


Figure 11. Confocal microscopic images of localized PCDA-PEI liposome in HeLa cells.

포에 처리하였다. Figure 11에서 보여지는 것과 같이 PCDA-PEI 리포솜이 세포 내로 들어가서 대부분 세포질에 분포하며 일부는 세포핵 부분에서도 검출되는 것을 확인하였다(화살표). 이를 통해 PCDA-PEI 리포솜이 유전자 및 약물 전달 응용에 사용될 수 있는 가능성이 높음을 확인하였다.

결 론

본 연구에서는 유전자 전달체로 사용되는 비바이러스성 벡터의 일종으로 새로이 고분자성 리포솜을 제작하였고, 이를 이용하여 유전자 전달 및 발현에 관한 실험을 수행하였다. 즉, PCDA를 폴리머화한 리포솜을 사용하였고 추가로 표면에 PEI로 결합시켰다. 유전자 전달체로서 가장 중요한 점은 외부 유전자의 전달 및 발현 효율뿐만 아니라 전달체가 가지고 있는 독성의 유무 또한 매우 중요하게 여겨지고 있다.

우선 합성한 리포솜과 커플링제를 통해 표면을 폴리에틸렌 이민으로 변형시킨 합성물의 특성을 흡광도와 FTIR, 입자크기 및 표면전하를 측정하고 결과 우리가 원하는 유전자 전달에 용이한 고분자성 리포솜을 제조하였으며, DNA와의 복합체 형성의 효율을 확인하였다. 확인 결과, 합성한 표면의 폴리에틸렌 이민이 양이온성을 띠기 때문에 음이온성인 DNA와 복합체 형성이 용이하였다. 또한 리포솜이 낮은 질량비에서도 DNA와 결합하는 것을 알 수 있었다.

또한 유전자 전달체로서 중요한 유전자 전달효율과 세포 내 독성을 확인하기 위하여 실험을 수행한 결과 대조군인 PEI 2 kD보다 PCDA-PEI 리포솜이 유전자 전달 효율이 뛰어났고, 또한 다른 대조군에 비해 독성이 낮다는 것을 확인하였다. 위의 실험을 바탕으로 HeLa cell line에서 공초점 현미경을 통해 형광 이미지를 확인한 결과 세포 내로 유입이 용이하다는 것도 확인하였다.

본 연구를 통하여 PCDA를 이용한 폴리머 리포솜 표면에 PEI를 도입함으로써, 유전자 전달체뿐만 아니라 항원성 단백질을 비롯한 다양한 바이오 의약 전달 시스템에도 적용이 가능한 나노전달체 벡터로서 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글: 본 연구는 산업통상부 산하 (재)충청지역사업평가원의 광역경제권 선도산업 육성사업에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. P. Hess, *Clin. Lab. Med.*, **16**, 197 (1996).
2. H. Elyahu, Y. Barenholz, and A. J. Domb, *Molecules*, **10**, 34 (2005).
3. M. Thomas and A. M. Klibanov, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 27 (2003).
4. E. K. Ji, D. J. Ahn, and J. M. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **24**, 667 (2003).
5. A. Perino, A. Klymchenko, A. Morere, E. Contal, A. Rameau, J. Guenet, Y. Mely, and A. Wagner, *Macromol. Chem. Phys.*, **212**, 111 (2011).
6. E. Morin, M. Nothisen, A. Wagner, and J. S. Remy, *Bioconjug. Chem.*, **22**, 1916 (2011).
7. R. R. Sawant, S. K. Sriraman, G. Navarro, S. Biswas, R. A. Dalvi, and V. P. Torchilin, *Biomaterials*, **33**, 3942 (2012).
8. Q. Cheng and R. C. Stevens, *Langmuir*, **14**, 1974 (1998).
9. D. H. Seo, B. C. Shin, and M. S. Kim, *Polymer(Korea)*, **29**, 277 (2005).
10. S. J. Bae, H. Choi, and J. S. Choi, *Polymer(Korea)*, **37**, 94 (2013).