

비바이러스 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 유전자 치료를 위한 Minicircle 플라스미드와 Conventional 플라스미드의 비교

인제대학교 의과대학 부산백병원 내분비대사내과/당뇨병 센터¹, 인제대학교 백인제기념 임상의학연구소 분자치료연구실², 메리놀병원 내분비대사내과³

권민정^{1,2} · 이순희^{1,2} · 정혜숙² · 윤창신² · 김미경^{2,3} · 박정현^{1,2}

Comparison of Minicircle with Conventional Plasmid for the Non-viral Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Gene Therapy

Minjeong Kwon^{1,2}, Soonhee Lee^{1,2}, Heysook Chung², Changshin Yoon², Mikyung Kim^{2,3}, Jeonghyun Park^{1,2}

Paik Diabetes Center, Division of Endocrinology & Metabolism, Pusan Paik Hospital, College of Medicine, Inje University¹; Molecular Therapy Lab, Paik Memorial Institute for Clinical Research, Inje University²; and Department of Internal Medicine, Maryknoll General Hospital³

Abstract

Background: Delayed wound healings in diabetic patients are related with the impairment of the expressions of various growth factors. Treatments using growth factors have been attempted on diabetic foot ulcer. VEGF (vascular endothelial growth factor) accelerates neo-angiogenesis on the early phase of the wound healing and exerts chemo-attractive effect for the other growth factors and cytokines. Non-viral gene transfer strategies are attractive tool for the gene therapy due to the safety and the versatility, but the low efficiency has been the serious problem.

Methods: We performed the VEGF gene therapy using reconstructed minicircle MINI-p β VEGF DNA with a polymeric carrier, polyethylenimine (PEI, 25 kDa) in HEK293, CHO, and NIH3T3 cell lines, and compared its efficiency with the conventional VEGF plasmid p β VEGF.

Results: The levels of expressed VEGF were higher in the groups using BPEI (branched PEI) as a gene carrier than naked plasmid transfer in all cell lines ($P < 0.05$). The minicircle MINI-p β VEGF DNA showed much higher VEGF expression than conventional plasmid p β VEGF ($P < 0.05$).

Conclusion: Minicircle DNA MINI-p β VEGF showed much higher transfection efficiency than conventional plasmid p β VEGF. It might be used in actual human clinical trial due to its higher efficiency and possible safety for the treatment of diabetic foot ulcer. (J Kor Diabetes Assoc 31:465~471, 2007)

Key Words: Gene therapy, Minicircle DNA, Vascular endothelial growth factor (VEGF)

서 론

당뇨병환자에 있어 당뇨병성 족부병변은 당뇨병에 의한 입원의 가장 많은 부분을 차지하고 있으며 하지 절단의 흔한 위험요인으로 알려져 있다. 당뇨병이 있는 사람이 일생 동안 당뇨병성 족부궤양에 노출될 위험은 당뇨병이 없는 사람에 비해 25%가 높으며 하지 절단을 하게 될 위험은 30배

나 높다^{1,2)}. 우리나라에서의 최근 통계를 보면 당뇨병환자의 1.2%에서 족부질환이 있으며 전체 족부질환의 47.9%였고 이중 족부절단은 전체 족부절단의 54.4%, 족부궤양은 전체 족부궤양의 52.5%였다³⁾. 당뇨병성 족부합병증이 발생하면 경제적인 문제뿐만 아니라 환자와 가족에게 피할 수 없는 사회, 정신적 스트레스를 가져다준다.

정상적인 상처의 치유는 세포 이동과 증식 세포의 간질

의 침착, 재생 등이 조화를 이루어 나타난다. 하지만 당뇨병 환자에서는 염증과 연관된 사이토카인, 성장인자들의 반응 장애를 기본으로 질병과 연관된 혈류 장애, 감염의 취약성 등이 복합적으로 관여하여 상처치유를 지연시킨다. 그 중 하나가 상처치유와 관련된 여러 성장 인자들의 발현 장애로 특히 VEGF (vascular endothelial growth factor) 발현의 장애는 상처 초기 단계에 혈관 생성이나 세포 이동과 증식에 관련된 물질들의 작용 장애로 이어진다⁴⁾. 이러한 성장인자들을 외부에서 공급함으로써 상처의 치유를 촉진시킨다는 여러 보고가 있으며⁵⁾, EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet derived growth factor)⁶⁾와 같은 성장인자들이 이미 상품화가 되어있으나 가격 대비 효과의 문제와 도포된 상처 부위에서의 반감기 및 상처투과능력 등의 문제들 때문에 광범위하게 사용되고 있지 못하다.

유전자 치료는 유전자 전달체로 바이러스를 사용하는 것과 그렇지 않은 것, 두 가지로 크게 나누어 볼 수 있다. 바이러스를 전달체로 이용한 경우는 뛰어난 전달 효율과 장기적이고 안정적인 유전자 발현 등의 장점이 있지만 아직까지 안전성의 문제가 완전히 해결되지 않아 실제 임상에 적용하기에는 제약이 따른다. 비바이러스 유전자 전달 방법은, 특히 합성 양이온성 고분자를 전달체로 사용하는 경우, 생물학적인 안전성도 높일 수 있을 뿐만 아니라 필요에 따라 얼마든지 전달체의 화학적인 조성과 구조를 변경할 수 있어 주목을 받아 왔다. Polyethylenimine (PEI)은 높은 양이온 전기를 띄어 인간기에 의해 음전하를 띄는 플라스미드 DNA와 강하게 결합하여 나노 입자를 형성함으로써 DNA의 분해를 막고 세포내 유입을 용이하게 한다. PEI는 세포질에서 물질교환 시에 완충 작용을 하여 플라스미드 DNA를 보호하고 세포 분열 주기와 상관없이 핵 내로의 운반을 촉진한다^{7,8)}. 하지만 이러한 비바이러스 전달체를 사용한 유전자 치료 방법의 경우 그 전달 효율과 발현의 시간적인 측면에서 바이러스를 사용하는 경우에 비해서는 아주 미흡하여 실제 임상에서 사용할 수 없는 정도라고 알려져 왔다. 이러한 비바이러스 방식의 유전자 전달이 가지는 저효율을 극복하기 위한 방법의 일환으로 1997년 최초로 기술된 super-coiled minicircle 플라스미드 DNA는 conventional 플라스미드 DNA와 비교해서 물리적인 크기가 작고 원핵세포에서 유래된 메틸화되지 않은 CpG motif를 제거하여 면역반응을 감소시킴으로 생체 내와 생체 외 모두에서 높은 유전자 전달효율을 보일 수 있음이 입증되어 왔다⁹⁻¹¹⁾.

저자들은 배양된 다양한 세포주들에서 인간의 VEGF를 비바이러스 유전자 전달 방식으로 발현시키는 유전자 치료를 시행함에 있어 새로운 minicircle 플라스미드 DNA가 conventional 플라스미드 DNA와 비교하였을 때 얼마나 더 유전자의 발현 효율을 증가시킬 수 있는지를 확인하고자 하였다.

방 법

1. 세포배양

HEK293, NIH3T3, CHO 세포주들은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)으로부터 구입하였다. 이산화탄소 5%, 37℃의 조건에서 CHO 세포는 10% 우태아혈청이 포함된 F12 Coon's modification 배지에 배양하였고 HEK293과 NIH3T3 세포는 10% 우태아혈청이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다.

2. 플라스미드 제조

VEGF165 cDNA는 pSG5-VEGF (MH Lee, University of Utah, Salt Lake City, UT로부터 기증받음)로부터 증폭하였다. 센스 시발체: 5'-CCGAATTCATGAACCTTCTGCTGTCTTGGG-3', 안티센스 시발체: 5'-AAAAGCCCCGGC GTCATTCATTCATCAC-3'. 증폭한 VEGF165 cDNA를 pCI (Promega, Madison, WI)에 제한효소 처리를 하여 EcoRI과 NotI 부위 사이에 삽입했다. pCI의 CMV promotor는 BglII과 EcoRI을 제한효소로 제거하고 닭의 β -actin 촉진제(promoter)로 대체하여 p β VEGF를 만들었다. 닭의 β -actin promotor를 포함하는 DNA 단편들과 VEGF165 cDNA, SV40 아데닐중합체로 구성된 p β VEGF 표현 부위를 Bgl II와 Cla I사이로 잘라 세균에서 나온 메틸화되지 않은 CpG motif들을 제거하고 플라스미드 pBAD-pieC31 (Dr. Mark A Kay, Department of Genetics, Standford University, CA로부터 기증)의 attB와 attP.사이에 둔단연결(blunt ended ligation)로 연결하여 pBAD-phiC31- β VEGF를 만들었다. 또한 저자들은 비교군을 위해 VEGF165 cDNA를 제거한 것 이외에는 p β VEGF와 구조가 동일한 p/null 플라스미드도 만들었다.

3. Mini-circle 플라스미드의 통합반응과 정제

Mini-circle 플라스미드의 통합반응과 정제는 이전에 기술된 대로 시행하였다¹¹⁾. 간단히 요약하면 E.coli DH5a (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 pBAD-phiC31- β VEGF 플라스미드를 넣어 형질변환 시켜 100 ug/mL ampicillin이 포함된 배지에 37℃로 항정상태에 도달할 때까지(O.D.600 = 1.5) 밤새 배양하였다. 이후 0.5% L-(+)-arabinose (Sigma)를 첨가하고 phiC31 integrase를 넣어 30℃에서 시간별로 배양하였고(Fig. 1A) 2시간동안 배양한 것을 사용하였다. EcoRV 제한효소를 사용하여 플라스미드를 직선화하고 cesium chloride에서 50,000 RPM으로 24시간동안 초원심분리를 하여 minicircle MINI-p β VEGF를 정제하였다(Fig. 1B). Ethidium bromide는 N-butanol로 추출하여 제거하였고 dialysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)로 투석하여 -20℃에 저장하였다.

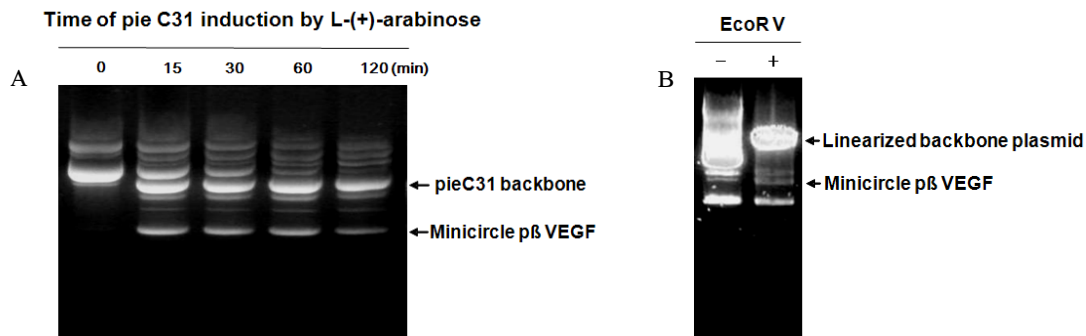


Fig. 1. Production of minicircle p β VEGF. A, L-(+)-arabinose (Sigma) was added on E.coli DH5a transformed with pBAD-pieC31- β VEGF plamid and the additional incubation for the integration of DNAs at 30°C by times; B, The minicircle p β VEGF was separated by linearized the remnant bacterial backbone using EcoRV restriction enzyme.

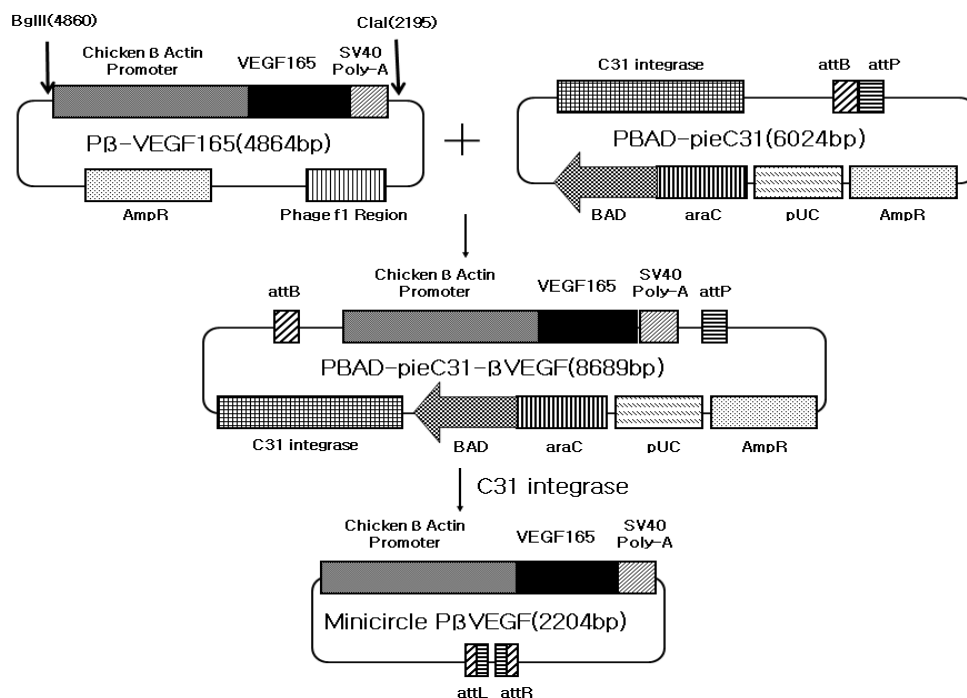


Fig. 2. Reconstruction of the minicircle p β VEGF. The expression cassette of p β VEGF comprised with chicken beta actin promoter, the VEGF165 cDNA and d SV40 poly adenylation signal sequence was excised with Bgl II and Cla I and ligated bluntly between attB and attP in plasmid pBAD-pieC31. The minicircle p β VEGF was produced by C31 integrase recombining the att structure.

4. 겔 지연 분석(Gel Retardation Assay)

2 μ g의 pCMV-luciferase 플라스미드 DNA를 BPEI (branched PEI: 25kDa, Sigma-Aldrich)와 섞어 1:10의 N:P 비율로 만들어 0.5 μ g/mL의 ethidium bromide을 포함한 0.6% 아가로스 겔에 100 V로 45분간 전기영동하였다.

5. 생체의 전달(In-vitro Transfection)

각각의 세포는 6-well plates에 세포 수 2×10^5 /well씩 24시간 이상 60~70%에 도달할 때까지 배양하였다. 유전자를 전달하기 전 혈청이 들어있지 않은 배지에 30분 동안 배

양한 후 플라스미드 DNA만을 첨가하거나 DNA/BPEI의 복합체를 첨가하여 이산화탄소 5%, 37°C 환경에서 4시간 동안 배양한 후 10% 우태아혈청이 포함된 신선한 DMEM로 교환하여 37°C에서 44시간 더 배양한다.

6. 발광효소 활성 분석(Luciferase Activity Assay)

발광효소의 활성도는 Luminoscence Kit (Promega)로 측정하였고 상대발광단위(RLU, relative light units)는 세포 추출물의 단백질 농도를 protein assay kit (Pierce)로 측정하여 보정하였다.

7. ELISA를 이용한 VEGF 단백질 정량 분석

VEGF165의 전달은 앞서 기술한 방식으로 시행하였고

배지에 분비된 VEGF를 Quantikine human VEGF ELISA kit (R&D Systems, MN)를 사용하여 측정하였다.

결 과

1. Mini-circle DNA 재조합(Fig. 2)

저자들은 닭의 β -actin promotor와 사람의 VEGF165 cDNA, SV40 아테닐중합체 신호를 포함하는 p β VEGF 플라스미드를 제작하였다. 이 플라스미드의 발현 부위를 제한효소로 분리하여 pBAD-phiC31의 attP와 attB 사이에 삽입하였다. 박테리오파지의 phiC31 integrase로 attP와 attB 부위를 붙여 pBAD-phiC31- β VEGF를 2개의 플라스미드로 나누어 minicircle MINI-p β VEGF와 BAD promotor와 phiC31 integrase를 포함하는 큰 플라스미드를 만들었다. MINI-p β VEGF의 발현부위는 닭의 β -actin promotor와 사람의 VEGF165 cDNA, SV40 아테닐중합체 신호로만 구성되었으며, 박테리아에서 유래된 암피실린 내성부위와 파이지 f1 부위 내의 메틸화되지 않은 CpG motif들이 제거됨으로써 원 p β VEGF(4.9Kb)에 비해 크기가 반 이하인(2.2Kb) 작은 플라스미드가 만들어졌다.

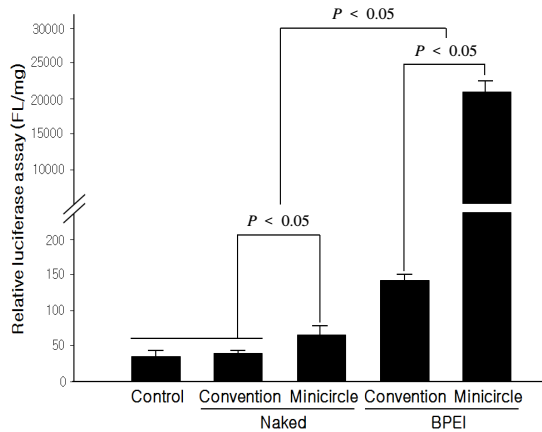


Fig. 3. Luciferase activity assay in HEK293 cell line. Luciferase activities were increased on cells transfected with DNA/BEPI polyplexes than naked plasmids ($P < 0.05$). And it was increased more one hundred times on minicircle p β VEGF than conventional p β VEGF on groups using BEPI (branched polyethylenimine), cationic gene carrier.

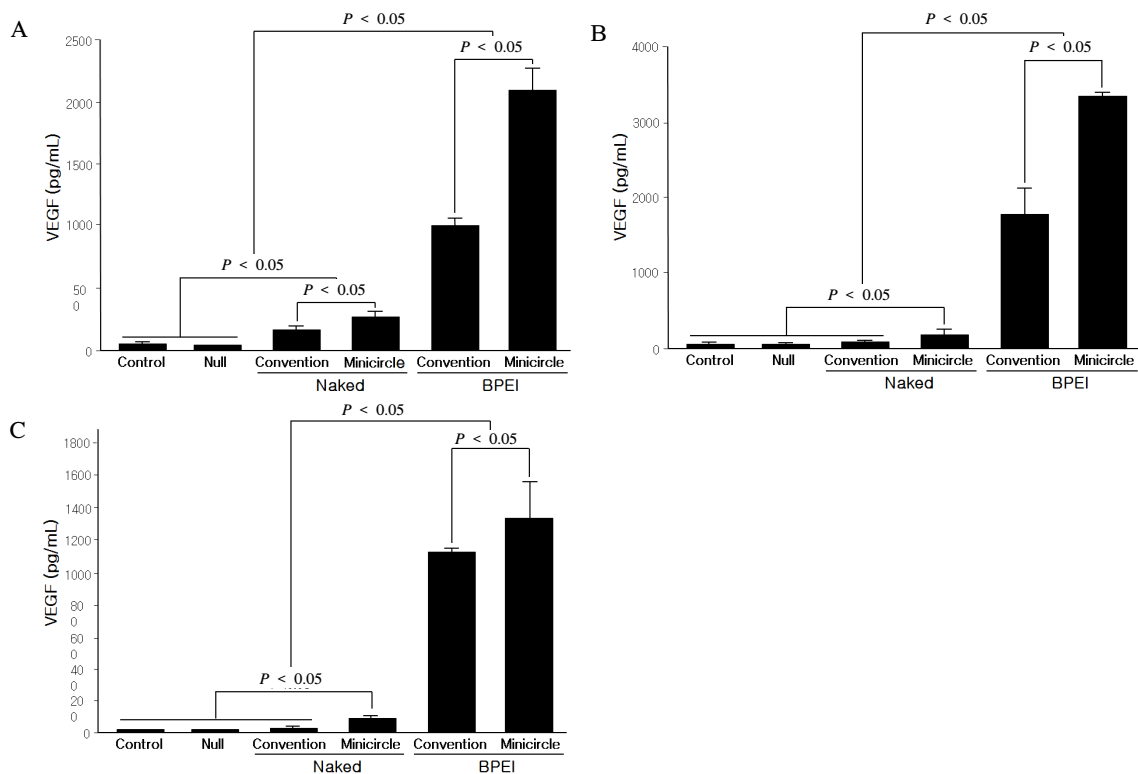


Fig. 4. VEGF protein level by ELISA in HEK293, NIH3T3, and CHO cell line. VEGF proteins were more expressed on groups of BEPI complexes than naked plasmids in all cell lines ($P < 0.05$). VEGF expressions were more increased about 2.5, 2 and 1.25 times on minicircle p β VEGF group than conventional p β VEGF using BEPI in HEK293(A), NIH3T3(B), and CHO(C) cell line.

2. Minicircle VEGF DNA/BPEI 복합체의 생체 외 전달

1) HEK293 세포주에서 발광효소 활성도(Fig. 3)

HEK293 세포주에 기본형의 p β VEGF 또는 minicircle MINI-p β VEGF를 투여하였다. 양전하 운반체인 BPEI를 유전자 전달체로 사용한 경우(N:P=1:10)와 사용하지 않은 경우로 나누어 확인하였다. BPEI를 사용한 경우 plasmid DNA만 사용한 경우보다 발광효소 활성도가 높게 측정되었다($P < 0.05$). BPEI 첨가 유무에 관계없이 minicircle MINI-p β VEGF를 투여한 경우 p β VEGF에서보다 높은 발광효소 활성도를 보였으며 BPEI를 전달체로 사용한 경우에는 100배 이상의 뛰어난 활성도를 나타내었다($P < 0.05$).

2) HEK293, NIH3T3, CHO 세포주에서 VEGF 정량 분석(Fig. 4)

HEK293 세포주에서 BPEI 사용 유무에 관계없이 minicircle MINI-p β VEGF를 투여한 경우 p β VEGF에서보다 높은 VEGF의 발현을 보였으며 BPEI를 전달체로 사용한 경우에는 minicircle MINI-p β VEGF군에서 약 2.5배 정도 높게 발현되었다($P < 0.05$, Fig. 4A). NIH3T3, CHO 세포주에서 DNA만을 투여한 경우 기본형의 p β VEGF를 사용한 군에서는 VEGF 발현이 대조군과 차이를 보이지 않았으나 minicircle MINI-p β VEGF를 사용한 군에서는 유의한 차이를 보였으며 ($P < 0.05$), BPEI를 사용한 경우 DNA만 사용한 경우보다 전체적으로 높은 발현율을 보였다. BPEI를 사용한 경우에는 minicircle MINI-p β VEGF를 투여한 경우 p β VEGF에서보다 각각 약 2배와 1.25배 정도의 증가된 VEGF 단백질 발현을 보였다(Fig. 4B, 4C).

고 찰

정상적으로 상처 회복 과정의 초기 저산소 상태에서 대식세포나 섬유아세포 및 포피세포 등에서 VEGF가 분비되어 NO 생성을 증가시키고 내피번식세포(endothelial progenitor cell)의 생산을 증가시켜 상처 치유에 유의한 작용을 한다¹²⁾. 피부에 상처가 생기면 크게 4가지 단계를 거쳐 상처 치유가 이루어진다. 1단계는 혈액응고 단계, 2단계는 염증 단계, 3단계는 세포 이동과 증식의 단계이고 4단계는 재형성의 단계이다. 첫 1, 2단계는 수 시간에서 수 일에 거쳐 나타나고 3, 4단계는 수 주에서 수 개월에 거쳐 이루어진다. 초기 단계에서 상처에 출혈이 생기면 혈소판이 응집되고 피브린 플러그가 형성되며 PDGF, TGF (transforming growth factor) β 1, VEGF 등과 여러 사이토카인이 합성되고 분비된다. 이후 3, 4단계에서 포피가 재생되고 섬유화와 혈관 형성이 촉진되면서 세포외 기질이 침착되고 흉터가 남게 된다⁴⁾.

당뇨병환자에서는 상처 치유의 각각의 단계에 장애를 보

이는데 성장인자 생성의 지연, 혈관생성 반응의 장애, 대식세포의 기능 장애 등이 초기 단계 반응 이상에 속한다. 또한 당뇨병환자는 당뇨병 자체에 의한 합병증들인 신경병증, 혈관 문제, 발 변형, 감염에의 취약성 등에 의해 족부 궤양이 만성화된다⁴⁾.

VEGF는 1970년대 후반에 혈관투과성에 관여하는 물질로 처음 분리되었다¹³⁾. VEGF는 5개의 아형이 존재하며 각각 206, 189, 165, 145, 121 아미노산으로 구성되어 있다¹⁴⁾. 이 중 165가 가장 흔한 형태이다. VEGF는 활성화된 대식세포, 각질세포, 섬유아세포, 중성구 등 많은 세포에서 분비되며 혈관 생성을 증가시키며 투과도를 높여 상처 치유에 필요한 여러 다른 성장인자와 사이토카인이 작용을 할 수 있게 도와준다¹⁵⁾. 당뇨병에서는 VEGF mRNA와 단백질 발현에 이상이 나타난다고 알려져 있으며, 당뇨병환자에서 VEGF의 이상과 관련된 많은 연구들은 현재에도 계속 이루어지고 있다¹⁶⁾.

유전자 치료의 핵심은 발현시키고자 하는 물질의 유전자를 표적 기관에 얼마나 효율적으로 전달하느냐에 있다. 이러한 전달체계는 그 대상 질병과 목적에 따라 다양하게 선택될 수 있다. 유전병과 관련된 유전자 이상을 치료하기 위해서는 지속적으로 발현을 유지하는 것이 중요한 반면 일시적인 질병이나 암에 관련된 유전자 치료에 있어서는 단기간의 유전자 발현만으로도 충분할 수 있다. 유전자 치료용 전달체는 크게 바이러스를 사용하는 것과 바이러스를 사용하지 않는 것으로 나누어 볼 수 있다. 전자는 뛰어난 유전자 전달효율을 보이지만 투여된 유전자가 인간 염색체 내 유전자의 구조를 영구적으로 변화시킨다든지 재조합능을 갖추어 스스로 복제를 하거나 인간의 면역 방어 체계를 활성화시키는 등의 생물학적 안전성의 문제들로 사람에게 실제 치료 목적으로 사용하기에는 아직까지는 한계를 보이는 것으로 알려져 있다. 이러한 문제는 바이러스를 전달체로 사용하지 않는 경우 빈도가 낮으며 특히 합성 양이온성 전달체를 사용하면 생물학적인 안전성은 월등하게 개선시킬 수 있을 것으로 기대되어 왔다. PEI (polyethylenimine)는 비바이러스 유전자 전달체(non-viral gene carrier)로서의 가능성이 1995년 처음 소개되었다¹⁷⁾. 하지만 PEI를 기본적으로 이용하여 화학적으로 구조를 변화시키고^{18,19)} 전사단계를 활성화시키려는^{20,21)} 많은 노력에도 불구하고 바이러스 전달체들에 비해 효율이 낮아 실제 임상적으로 사용하기는 어려웠다.

1997년 처음 소개된 이중나선의 minicircle 플라스미드 DNA는²²⁾ 크기가 작고 원핵세포에서 유래된 메틸화되지 않은 CpG motif들을 제거하여 면역반응을 크게 감소시키고 유전자 전달효율을 극대화시킨 플라스미드 DNA이며, 생체 내와 생체 외 모두에서 높은 유전자 전달 효율을 보임이 이미 입증되어 있다⁹⁻¹¹⁾. 저자들은 고전적 형태의 플라스미드인 p β VEGF (4.9 Kb)에 비해 크기가 반 이하인(2.2 Kb)

작은 플라스미드를 만들었으며, 본 실험에서도 입증된 minicircle 플라스미드 DNA의 뛰어난 유전자 전달효율은 크기가 작은 물리적 이점이 보다 주된 기전으로 작용하였을 것으로 생각 된다¹¹⁾.

본 연구는 *in vitro* 결과이기는 하지만 혈관의 신생을 통해 상처회복에 도움이 되는 것으로 이미 입증되어 있는 VEGF165의 유전자를 사용해서 minicircle 플라스미드 DNA로 제조하였을 때도 비바이러스 유전자 치료 시 고전적인 형태의 플라스미드와 비교하여 월등한 전달효율을 나타낼 수 있음을 입증하였다. 현재 실제적인 효과 및 안전성 문제들을 검증하기 위해 질병모델에 대한 *in vivo* 실험이 진행 중이며 향후 minicircle 플라스미드 DNA 방법을 사용한 비바이러스 유전자 치료는 당뇨병성 만성 족부궤양의 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대한다.

결 론

Minicircle DNA는 고식적인 플라스미드와 비교하여 안전하며 유전자 전달 효율이 뛰어나다. 본 실험에서도 양이온성 합성 유전자 전달체인 BPEI를 이용한 minicircle VEGF DNA는 이전에 사용하던 고식적인 플라스미드에 비해 VEGF 발현을 현저히 증가시켰다. VEGF는 상처 치유 초기단계에 작용하는 필수적인 성장인자로 minicircle DNA를 이용하면 상처 치유가 지연되어 있는 당뇨병환자의 치료에 유용할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경: 당뇨병환자에 있어서 피부 상처 회복에 필요한 여러 성장인자들의 부족이 치유를 지연시키고 당뇨병성 족부병변의 악화에 관여하여, 여러 성장인자들의 단백질들이나 유전자를 이용한 치료가 관심의 대상이 되고 있다. 특히 VEGF는 상처 회복의 초기에 신생혈관 형성을 촉진하여 상처 치유에 필요한 다른 인자들이 활성화될 수 있게 유도한다. 유전자 치료에 있어 비바이러스 전달체를 사용한 방법은 생물학적으로 안전하고 조작이 용이하여 관심의 대상이 되어 왔지만 유전자 전달 효율이 너무 낮아 실제 임상에는 사용되지 못하였다.

방법: 양이온성 합성 유전자 전달체인 BPEI (branched polyethylenimine)를 사용하여 VEGF165 DNA를 내포한 minicircle DNA를 HEK293, CHO, NIH3T3 세포종에 발현시켜 유전자 전달의 효율성을 확인하였다.

결과: Minicircle DNA는 고식적인 플라스미드에 비해 각각의 세포 주 모두에서 탁월한 효율을 보였으며 BPEI를 전달체로 사용하였을 때 더 뛰어난 발현 효율을 보였다.

결론: Minicircle DNA는 비바이러스 전달 방식에 의한 유전자 치료에서 VEGF165의 유전자 전달 효율을 증가시켜 실제 당뇨병성 만성 족부궤양의 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H: *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care* 27: 1047-53, 2004
2. Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J: *The global burden of diabetic foot disease. Lancet* 366:1719-24, 2005
3. 정춘희, 김대중, 김재용, 김혜영, 김화영, 민경완, 박석원, 박정현, 백세현, 손현식, 안철우, 오지영, 이선희, 이준영, 최경목, 최인정, 박이병: 우리나라 당뇨병성 족부 질환의 현황: 건강보험자료 분석결과. *당뇨병* 30:372-6, 2006
4. Falanga V: *Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Lancet* 366:1736-43, 2005
5. Bennett SP, Griffiths GD, Schor AM, Leese GP, Schor SL: *Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. Br J Surg* 90:133-46, 2003
6. Harding KG, Morris HL, Patel GK: *Science, medicine and the future: healing chronic wounds. BMJ* 324: 160-3, 2002
7. Pollard H, Remy JS, Loussouam G, Demolombe S, Behr JP, Escande D: *Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. J Biol Chem* 273:7507-11, 1998
8. Sonawane ND, Szoka FC, Verkman AS: *Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. J Biol Chem* 278:44826-31, 2003
9. Darquet AM, Rangara R, Kreiss P, Schwartz B, Naimi S, Delaere P, Crouzet J, Scherman D: *Minicircle: an improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer. Gene Ther* 6:209-18, 1999
10. Bigger BW, Tolmachov O, Collombet JM, Fragkos M, Palaszewski I, Coutelle C: *An ARAC-controlled bacterial CRE expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy. J Biol Chem* 276:23018-27, 2001
11. Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, Kay MA: *Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in*

- persistent and high-level transgene expression in vivo. Mol Ther* 8:495-500, 2003
12. Brem H, Tomic-Canic M: *Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. J Clin Invest* 117: 1219-22, 2007
 13. Iruela-Arispe ML, Dvorak HF: *Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. Thromb Haemost* 78:672-7, 1997
 14. Kirchner LM, Meerbaum SO, Gruber BS, Knoll AK, Bulgrin J, Taylor RAJ, Schmidt SP: *Effects of vascular endothelial growth factor on wound closure rates in the genetically diabetic mouse model. Wound Repair Regen* 11:127-31, 2003
 15. Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD: *Angiogenesis-a new target for future therapy. Vascul Pharmacol* 44:265-74, 2006
 16. Frank S, Hbuner G, Breier G, Longaker M, Greenhalgh DG, Werner S: *Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. J Biol Chem* 270:12607-13, 1995
 17. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP: *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proc Natl Acad Sci USA* 92:7297-301, 1995
 18. Thomas M, Klibanov AM: *Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA* 99:14640-5, 2002
 19. Furgeson DY, Chan WS, Yockman JW, Kim SW: *Modified linear polyethylenimine-cholesterol conjugates for DNA complexation. Bioconjug Chem* 14:840-7, 2003
 20. Nettelbeck DM, Jerome V, Muller R: *A strategy for enhancing the transcriptional activity of weak cell type-specific promoters. Gene Ther* 5:1656-64, 1998
 21. Natesan S, Molinari E, Rivera VM, Rickles RJ, Gilman M: *A general strategy to enhance the potency of chimeric transcriptional activators. Proc Natl Acad Sci USA* 96:13898-903, 1999
 22. Darquet AM, Cameron B, Wils P, Scherman D, Crouzet J: *A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. Gene Ther* 4:1341-9, 1997