

新型阳离子基因传递载体 PEI-PBLG 的细胞转染研究

Transfection with a Novel Cationic Gene Carrier : PEI-PBLG

尉继征 林 磊 熊 伟 祝庆余*

WEI Ji-Zheng , LIN Lei , XIONG Wei and ZHU Qing-Yu *

军事医学科学院微生物流行病研究所 ,病原微生物生物安全国家重点实验室 ,北京 100071

State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity , Institute of Microbiology and Epidemiology , Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100071 , China

摘 要 对新型阳离子聚合物 PEI(10kD)-PBLG 进行研究 ,重点考察其基因转染效率与细胞毒性 ,探讨其作为基因载体的可能性。通过粒径分析及扫描电镜 (SEM) 观察 PEI(10kD)-PBLG 与质粒 pEGFP 自组装形成的颗粒形态及粒径 ,预测其进入细胞的可能性。使用 MTT 比色法分析 PEI(10kD)-PBLG、PEI(25kD)-PBLG、PEI(10kD) 和 PEI(25kD) 的细胞毒性差异。选用表达增强型绿色荧光蛋白的质粒 pEGFP 作为报告基因模型 ,将其与 PEI(10kD)-PBLG 自组装后 ,分别转染真核细胞株 HeLa、COS-7、Vero-E6 和 ECV304 ,应用流式细胞术检测细胞转染效率 ,并比较了血清、缓冲液、细胞谱等多种因素对基因转染效率的影响。PEI(10kD)-PBLG 可包裹质粒形成粒径 100~120nm 的纳米复合物 ,适合介导质粒进入细胞。该纳米粒复合物对转染缓冲液的敏感度较低 ,并能够在 10% 血清存在的条件下 ,转染全部实验用细胞株 ,尤其对 HeLa 的转染效率最高 ,其次是 COS-7、Vero-E6 和 ECV304 ,其中 PEI-PBLG(10kD)pEGFP 复合物转染 HeLa 细胞的比率为 45.02% ,高于 PEI(10kD)pEGFP 的 29.16% ,PEI(10kD)-PBLG 的细胞毒性作用显著低于 PEI(25kD) 、PEI(10kD) 和 PEI(25kD)-PBLG。新型阳离子多聚物 PEI(10kD)-PBLG 在提高 PEI 介导的基因转染效率的同时降低了其细胞毒性 ,提高了生物相容性 ,有望成为基因转移的有效载体。

关键词 聚乙烯亚胺 ,聚谷氨酸 ,基因传递 ,转染效率 ,细胞毒性

中图分类号 R392 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)02-0229-06

Abstract This study mainly deals with cell transfection and cytotoxicity for PEI(10kD)-PBLG , a novel cationic copolymer , to observe its potential as a gene carrier. Size measurement and SEM were used to show the modality of the PEI-PBLG/pDNA complexes. Cytotoxicity of PEI(10kD)-PBLG was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay and compared with PEI(25kD)-PBLG , PEI(10kD) , and PEI(25kD). Furthermore , pEGFP that can express the enhanced green fluorescent protein was chosen as a reporter to observe the transfection efficiency directly. Then , PEI(10kD)-PBLG/pEGFP complexes were transfected into several cell lines , such as HeLa , COS-7 , Vero-E6 , and ECV-304 , and effects of the transfection conditions were evaluated. The efficiencies were measured by FACS. Size measurement of complex particles indicated that PEI-PBLG/pDNA tended to form smaller nanoparticles compared with PEI/pDNA. The representative size of the PEI(10kD)-PBLG/pDNA complex was approximately 100~200 nm. SEM images showed that the particles were condense and compact. This can be suitable for their entry into cells. Cytotoxicity studies suggested that PEI(10kD)-PBLG had considerably lower toxicity than the other three materials. In the transfection tests , PEI(10kD)-PBLG/pDNA complexes could be

Received : October 20 , 2006 ; Accepted : November 17 , 2006.

This work was supported by the grants from the Beijing Natural Science Foundation (No. 7042051) and the Science Project Foundation of State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry.

* Corresponding author. Tel : + 86-10-66948624 ; Fax : + 86-10-83816353 ; E-mail : Qingyzh@yahoo.com.cn

北京市自然科学基金 (No. 7042051) 和高分子物理与化学国家重点实验室项目基金资助。 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

transfected into all the cell lines that were tested. These provided the highest level of EGFP expression (45.02%) in HeLa cells, which was considerably higher than that of PEI (10kD)/pEGFP (29.16%). Being less affected by the serum during transfection, PEI-PBLG/pDNA complexes offered greater biocompatibility than PEI. PEI-PBLG copolymer reduces the cytotoxicity of PEI, improves the transfection efficiency, and offers greater biocompatibility than PEI. It shows considerable potential as an efficient nonviral carrier for gene delivery.

Key words polyethylenimine (PEI), poly(β -benzyl L-glutamate) (PBLG), gene delivery, transfection efficiency, cytotoxicity

基因传递载体是影响细胞转染和基因治疗效果的关键因素。阳离子聚合物聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 具有较高的基因转染效率^[1,2,3], 是近年来发展最快的非病毒载体材料之一。但 PEI 介导的转染效率与它的细胞毒性之间存在相关性。分子量大 (≥ 25 kD) 的 PEI 基因转染效率高, 同时细胞毒性也较大; 而小分子量 PEI 虽然细胞毒性小, 转染效率却较低。为解决这一矛盾, 本研究采用了将聚谷氨酸 (PBLG) 链段引入小分子量 PEI (10kD) 中合成的新型阳离子多聚物 PEI (10kD)-PBLG 进行研究, 考察其基因转染效率与细胞毒性, 探讨这种新型材料作为基因传递载体的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

阳离子聚合物: PEI 10kD (Mr 10000D) (Aesar Alfar 公司), PEI 25kD (Mr 25kD) (Sigma-Aldrich 公司) 以及 10kD、25kD 的 PEI-PBLG 为中国科学院长春应化所提供。噻唑兰 (MTT) 购自 Amresco 公司。

质粒 pEGFP-N1 (Clontech) 为本室保存, 在大肠杆菌 DH5 α 中扩增, QIAgene 质粒大量提取试剂盒提取纯化, BECKMAN DU-60 紫外可见分光光度计测定 A_{260} 定量, A_{260}/A_{280} 在 1.7 ~ 1.9 之间, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, -20 $^{\circ}$ C 保存。HeLa、Vero-E6、COS-7 细胞为本室保存, ECV304 为东北师范大学李玉新教授惠赠。以上细胞均用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养 (FBS 及 DMEM 购自 GibcoBRL)。

1.2 PEI (10kD)-PBLG 对质粒 DNA 的包裹

取 20 μ L 浓度为 0.03 μ g/ μ L 的质粒 DNA (pEGFP-N1) 按照不同质量比将相同体积的 PEI (10kD)-PBLG 溶液分别逐滴加入等量的 pDNA 中, 温和混匀, 室温静置 10min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PEI (10kD)-PBLG/pEGFP 自组装后 DNA 条带的阻滞情况。

1.3 PEI (10kD)-PBLG/pEGFP 自组装纳米粒的形态观察和粒度分析

用扫描电子显微镜观察上述复合物溶液中纳米粒的表面形态、大小, 粒度分析仪测定复合物的粒径

及其分布。粒度变异系数 (coefficient of variation, CV) = $(D_{90} - D_{10})/D_{50}$, 式中 D_{90} 、 D_{10} 和 D_{50} 分别代表在粒度分析曲线上, 含量累计占 10%、90% 和 50% 的纳米粒数量。

1.4 PEI (10kD)-PBLG 的细胞毒性测定

采用 MTT 比色法进行。将 HeLa 细胞以 5×10^3 细胞/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔加入 100 μ L 含 10% FBS 的 DMEM, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24h。取 100 μ L 溶解于 PBS 中的不同浓度 PEI (10kD)-PBLG 加入各细胞孔中, 每个浓度设 4 个复孔, 同时设立 PEI (25kD)、PEI (10kD) 和 PEI (25kD)-PBLG 的对照组。细胞在同样条件下培养 24h 后, 每孔加入 5mg/mL 的 MTT 溶液 10 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3.5h, 翻板法弃去孔内所有液体, 可见甲臞结晶形成于细胞内。加入二甲基亚砜 100 μ L, 振荡 10min 使甲臞结晶充分溶解, 在酶联免疫检测仪上测定各孔在 492nm 波长的吸光值。计算细胞存活率。细胞存活率 = (试验组吸光度 / 对照组吸光度) $\times 100\%$ 。

1.5 PEI (10kD)-PBLG 与 pDNA 不同比例对转基因效率影响的测定

转染前 24h 将 HeLa 细胞以 2×10^5 细胞/孔的密度种入 60mm 培养皿中, 待细胞 70% ~ 80% 融合时进行转染。将 8 μ g 质粒 pEGFP-N1 和对应量的 PEI (10kD)-PBLG 稀释于 100 μ L PBS (pH 7.4) 中, 室温孵育 5min。将复合物溶液逐滴加入 pDNA 中, 轻轻混匀, 室温孵育 10min, 使 PEI (10kD)-PBLG 与 pDNA 在比例下自组装形成纳米复合物。在复合物溶液中加入 3800 μ L 含 10% FBS 的 DMEM, 轻轻混匀, 室温放置 5min, 使复合物均匀分散于培养液中。将孵育好的转染液小心加至吸去旧培养液的细胞上。同时设立 PEI (10kD) 对照和裸质粒的阴性对照。37 $^{\circ}$ C 培养 24h 后, 在荧光显微镜下观察 EGFP 表达。消化细胞, 流式细胞仪检测 EGFP 阳性细胞比例。

1.6 转染复合物与细胞的作用时间对转染效率影响的测定

转染前 24h 将 HeLa 细胞以 2×10^4 细胞/孔的密度种入 24 孔板中, 待细胞 70% ~ 80% 融合时进行转

染。每孔 pEGFP-N1 转染量为 2 μ g, PEI(10kD)-PBLG/pDNA = 60。转染后分别于 3h、6h、9h 换为含 10% FBS 的 DMEM ,同时设不换液的对照组。37 $^{\circ}$ C 培养 24h 后检测 EGFP 阳性细胞比例。

1.7 血清对基因转染效率的影响

细胞准备及转染复合物的制备方法同 1.6 所述。在复合物溶液中分别加入 5%、10% FBS 及无血清 DMEM 800 μ L ,轻轻混匀 ,室温放置 5min 后小心加至细胞上。37 $^{\circ}$ C 培养 24h 后观察细胞生长状态 ,并检测 EGFP 阳性细胞比例。

1.8 转染复合物形成时不同溶媒对转基因效率的影响

质粒与载体分别稀释于无菌的 PBS 缓冲液、Hank 's 平衡盐溶液、HBS、5% 葡萄糖溶液、0.9% 生理盐水和去离子水中 ,在 10% 血清存在下同上方法进行细胞转染 ,37 $^{\circ}$ C 培养 24h 后检测 EGFP 阳性细胞比例。

1.9 复合物对不同类型细胞的转染

分别将 HeLa、Vero-E6、COS-7、SK-OV-3 和 ECV304 以 2 \times 10⁴ 细胞/孔种入 24 孔板中 ,37 $^{\circ}$ C 培养 24h。转染复合物的制备方法同上。在复合物溶液中加入 600 μ L 含 10% FBS 的 DMEM ,轻轻混匀 ,室温放置 5min。然后小心加至细胞上。37 $^{\circ}$ C 培养 24h 后检测 EGFP 阳性细胞比例。

2 结果

2.1 PEI(10kD)-PBLG 对 DNA 的包裹作用

随着[PEI-PBLG]/[pDNA]增大 ,载体包裹质粒 DNA ,使负电荷量迅速减少 ,部分复合物阻滞于电泳加样孔中 ,同时溴化乙锭插入 DNA 双链受到阻碍 ,条带的亮度逐渐减弱。至[PEI-PBLG]/[pDNA]= 10 时 ,PEI-PBLG 完全包裹 pDNA ,产生荧光淬灭现象 (Fig. 1)。

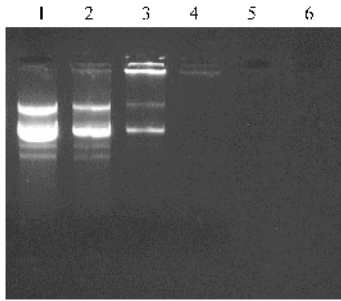
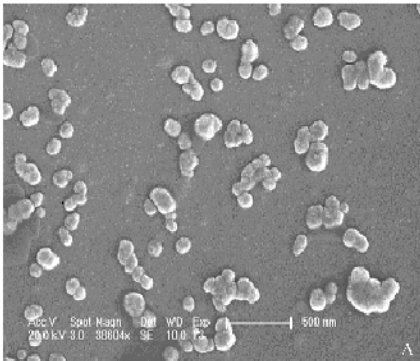


图 1 凝胶阻滞电泳检测 PEI(10kD)-PBLG 对 DNA 的包裹作用

Fig. 1 Gel retardation assay for PEI(10kD)-PBLG to test the entrapment of the complexes
1 : pDNA ; 6 : PEI-PBLG ; 2-5 : PEI-PBLG/pDNA complexes , [PEI-PBLG]/[pDNA] were 1 , 2 , 5 and 10 , respectively .

2.2 自组装纳米复合物的形态

在扫描电子显微镜下 ,可见阳离子型多聚物 PEI-PBLG 在临界胶束浓度下包裹并浓缩质粒 DNA ,自组装形成紧密的复合物颗粒 (Fig. 2A)。粒径分析结果显示 ,PEI-PBLG 与 pDNA 自组装形成的纳米粒子的粒径主要分布在 100 ~ 200nm ,变异系数 CV = 17.9 (Fig. 2B)。

2.3 PEI(10kD)-PBLG 对细胞的毒性

将不同分子量的 PEI 和 PEI-PBLG 分别加入细胞培养液中作用 24h 后 ,发现随着载体浓度的增高 ,细胞活力均呈下降趋势 ,低分子量载体 (10kD)的毒性均低于高分子量 (25kD) (Fig. 3)。在 PEI 实际含量 (以 [PEI] 表示) 相近的情况下比较 ,经 PEI 处理的细胞随 [PEI] 增高活力迅速下降 ,至 [PEI] = 0.13mg/ml 时 ,细胞几乎全部破碎死亡 (Fig. 4B) ,而经 PEI-PBLG 处理的细胞在 [PEI] = 0.18mg/ml 时活力明显高于 PEI (Fig. 4A)。试验数据经对数变换直线化后 ,采用 SAS 软件包 ,按照具有 4 次重复试验的数据进行直线回归分析 ,并进行回归直线的两两比较 ,结果为 PEI(10kD)与 PEI(25kD)之间、PEI(10kD)-PBLG 与 PEI(25kD)-PBLG 之间均为 P < 0.05 ,而 PEI 与

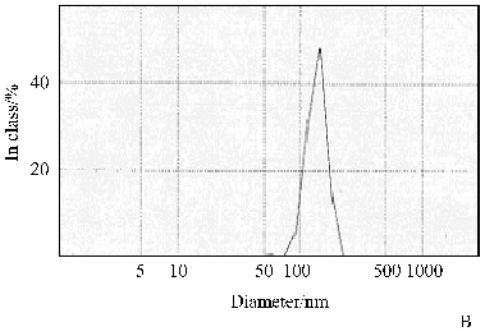


图 2 PEI(10kD)-PBLG/pDNA 复合物的扫描电镜照片 (A) 和粒径分布 (B)

Fig. 2 SEM image (A) and size distribution (B) of PEI(10kD)-PBLG/pDNA complexes

PEI-PBLG 之间均为 $P < 0.01$,由此证明 4 种材料对细胞的毒性作用均有明显差异 ,并且合成的 PEI-PBLG 与原 PEI 有显著差异。结合 Fig. 3 可以清楚的看出四种载体作用之后的细胞活力为 PEI(10kD)-PBLG > PEI(25kD)-PBLG > PEI(10kD) > PEI(25kD) ,即材料的细胞毒性作用为 PEI(10kD)-PBLG < PEI(25kD)-PBLG < PEI(10kD) < PEI(25kD)。

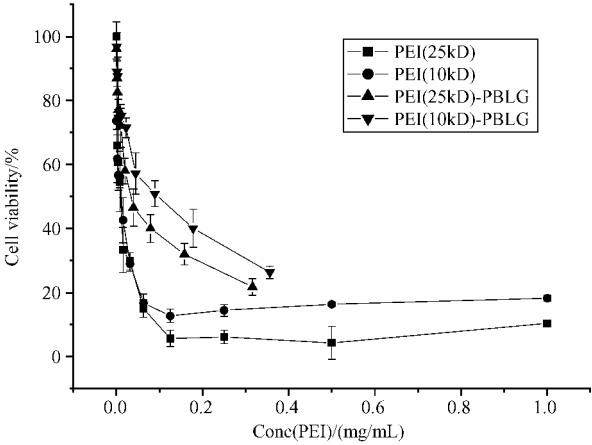


图 3 10kD 和 25kD 的 PEI 与 PEI-PBLG 作用于细胞 24h 后的细胞存活率(n = 4)

Fig. 3 The percentage of viable cells 24 hours after treated with PEI and PEI-PBLG of 10kD and 25kD at various PEI concentrations(n = 4)

2.4 不同转染条件对 PEI(10kD)-PBLG/pEGFP 转基因效率的影响

以 PEI 为骨架的基因传递载体 ,影响其效率的一个决定性因素就是 PEI 与 pDNA 的缩合比 ,通常用 N/P 表示($N/P = 7.53 \times b/c$,b 为 PEI 的质量 ,c 为 pDNA 的质量)。由 Fig. 5 可见 ,PEI(10kD)和 PEI(10kD)-PBLG/pDNA 的转染均呈剂量依赖性 ,而 PEI 介导的细胞转染在一个很窄的剂量范围内 , $N/P = 13$ ([PEI] [pDNA] = 1.7)时转染效率达到最大值 ,此时光镜下可见细胞膜周围有许多小泡聚集 ,继续增加 PEI 用量转染效率即急剧下降 ,并且导致细胞大量

破碎死亡(Fig. 2)。实验中达到与 PEI 相同的转染效率时 PEI-PBLG 所需的 N/P 约为 PEI 的 25 倍 ,此时细胞生长状态正常(Fig. A2) ,当 N/P 继续升高至 32([PEI] [pDNA] = 42.75)时 ,阳性细胞率达到了 45.02%(Fig. 5 ,Fig. 6 A ,) ,大大高于 PEI 的最高转染效率 29.16%(Fig. 5 ,Fig. 6 B)。

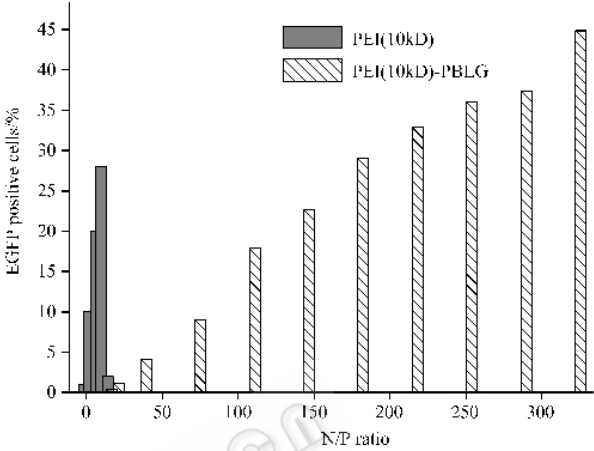
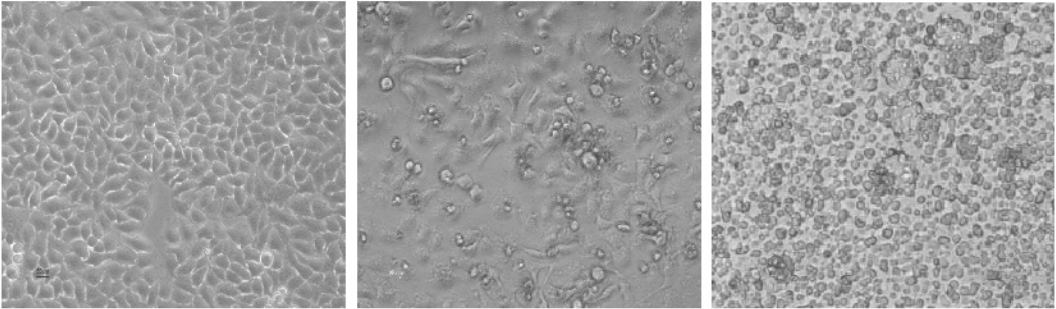


图 5 不同 N/P 下 PEI(10kD)-PBLG 和 PEI(10kD)介导 pEGFP 转染 HeLa 细胞后 pEGFP 表达阳性率随 N/P 比的变化

Fig. 5 Transfection efficiency of PEI(10kD)-PBLG and PEI(10kD) at various N/P ratios in HeLa cells

PEI-PBLG/pDNA 形成时对缓冲液的敏感性低于 PEI^[4] ,使用 PBS 可达到与 Hank 's 液几乎同样高的转染效率(Fig. 7)。转染复合物与细胞的作用时间对转染效率影响较大。转染 3h 的细胞表达 EGFP 较少 ,而 6h、9h 换液组及不换液组转染效率明显增高 ,但三组之间无明显差别 ,表明 6h 作用时间已足够使 PEI-PBLG 介导质粒进入细胞 ,不换液组在 48h 后仍未观察到有明显的细胞毒性。PBLG 接枝于 PEI 后 ,降低了对血清的敏感性 ,具有更好的生物相容性 ,在 10% 血清存在的情况下 ,转染效率及细胞活力均明显高于无血清转染组(Fig. 8)。PEI-PBLG 对不同细胞的转染效率不同 ,Hela 细胞最高 ,其次是 COS-7、Vero-E6、SK-OV-3 和 ECV304(Fig. 9)。



A: Normal HeLa cells B: PEI(10kD)-PBLG, [PEI]=0.18mg/mL C: PEI(10kD), [PEI]=0.13mg/mL

图 4 PEI(10kD)-PBLG 和 PEI(10kD)作用后 24h 的细胞状态

Fig. 4 Images of HeLa cells 24 hours after treated with 10kD PEI and PEI-PBLG

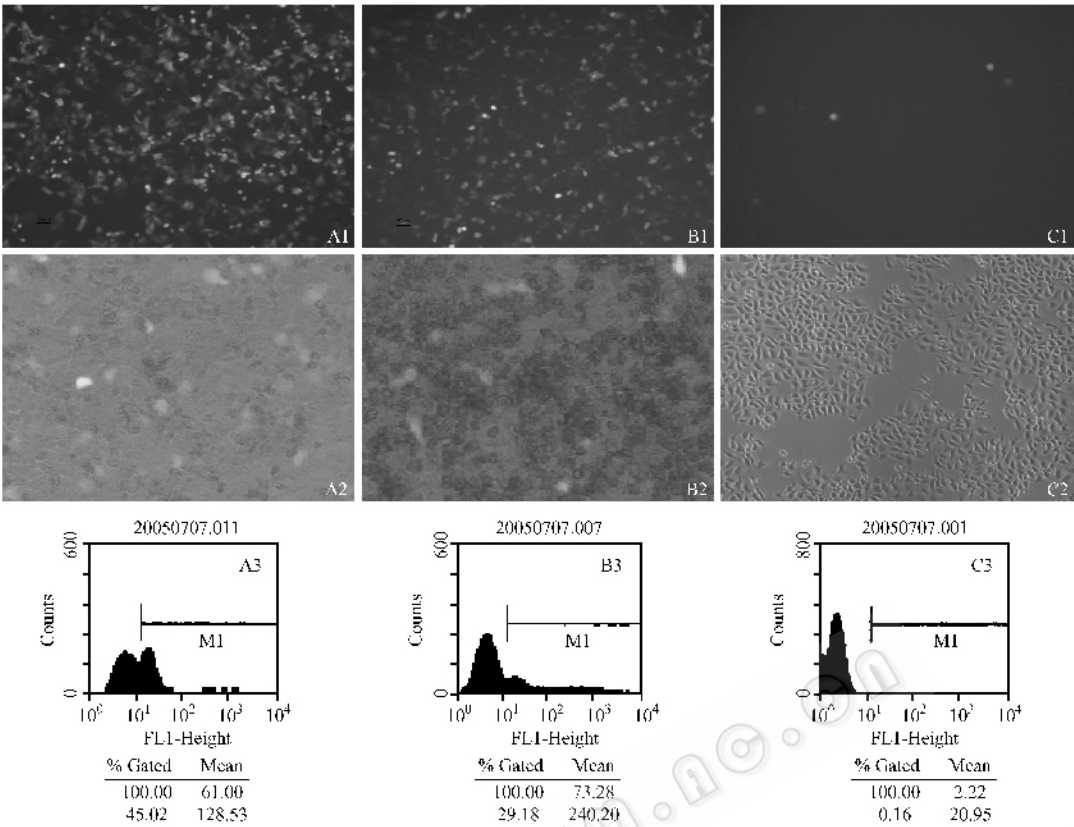


图 6 细胞转染后的荧光显微照片(Row 1)、明场下细胞形态(Row 2)及转染效率的流式细胞检测图(Row 3)
Fig. 6 Fluorescence images (Row 1), cell modalities (Row 2) and FACS graphs (Row 3) of HeLa cells transfected with :
Line A : PEI-PBLG/pEGFP (N/P = 320) , % Gated = 45.02 , cells grew well ; Line B : PEI/pEGFP (N/P = 13) , % Gated = 29.16 , lots of frag.

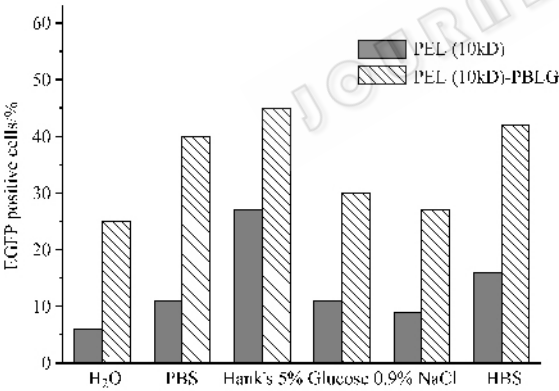


图 7 几种缓冲液对 PEI 和 PEI-PBLG 转染效率的影响
Fig. 7 Influence of buffers on transfection efficiency of PEI and PEI-PBLG during forming complexes

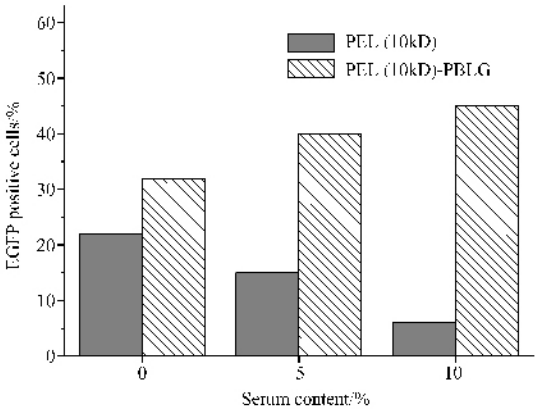


图 8 转染时血清含量对 PEI 和 PEI-PBLG 转染效率的影响
Fig. 8 Influence of serum content on transfection efficiency of PEI and PEI-PBLG

3 讨论

聚乙烯亚胺(Polyethylenimine ,PEI)是目前受到关注最多的非病毒载体。目前发现影响 PEI/DNA 复合物转染效率的主要因素有 :PEI 的分子量、支化程度、氨基与 DNA 磷酸基的比例(N/P)、PEI/DNA 复合物的粒径及表面电荷密度等^[5]。同时 PEI 介导的细胞转染效率同它的细胞毒性之间存在相关性。分子量、支化程度高的 PEI 转基因效率高,但毒性也

高^[6,7]。研究表明,大分子量 PEI 在细胞内聚集,产生高密度的阳离子电荷是引发 PEI 细胞毒性的主要原因,因此科学家们对 PEI 进行了多方面的修饰改性,以降低其毒性。许多研究者尝试将亲水性的聚乙二醇引入 PEI 分子中^[6,8,9],屏蔽 PEI 密度过高的正电荷,以降低 PEI 的细胞毒性,但是亲水性分子的引入会使其与 DNA 形成的复合物颗粒较大,不利于细胞摄取。引入疏水性的聚氨基酸链段形成嵌段共

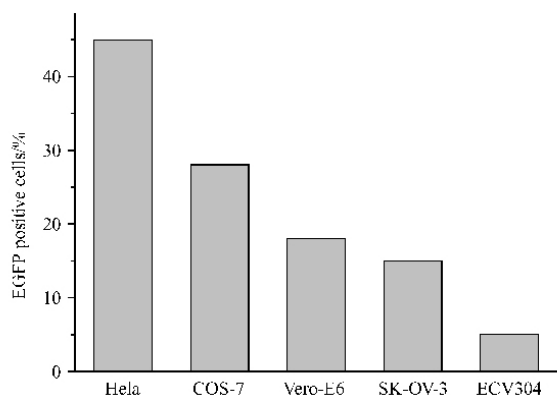


图9 PEI(10kD)-PBLG对几种不同细胞系的转染效率

Fig. 9 Transfection efficiencies of several cell lines mediated by PEI(10kD)-PBLG

聚物^[10]更有利于形成较小的复合物颗粒。

本研究应用将疏水性聚谷氨酸(PBLG)链段引入PEI中形成的两亲性嵌段共聚物PEI-PBLG作为基因载体,对比了分子量为25kD、10kD的PEI及以这两种PEI为骨架合成的两种PEI-PBLG的细胞毒性,其中PEI(10kD)-PBLG的毒性小于PEI(25kD)-PBLG,这与PEI分子量越高毒性越大的趋势相同,而PEI(25kD)-PBLG比PEI(10kD)毒性更小,证明PBLG的引入极大降低了PEI的细胞毒性。

通过基因转染研究发现,PEI-PBLG放大了PEI介导基因转染的复合物比例范围,提高了转染所需的[PEI]/pDNA,这可能是由于PBLG的引入降低了共聚物的电荷密度,使有效富集DNA所需的载体用量增大。可见PEI-PBLG减弱了PEI的细胞毒性,而转染效率却大大提高,这是由于载体材料的低毒性使转染过程中对细胞的损伤减小,细胞生长状态较少受到抑制或破坏,因而使载体得以更好地发挥基因传递的巨大潜力。

文献报道PEI介导的基因转染对不同的细胞系转染效率有较大差别,而且转染过程中缓冲液^[4]及血清^[4,11]等因素的影响较大,使用Hank's液及无血清培养液时效率最高。这些性质也限制了PEI在体内的应用。因此我们初步观察了PEI-PBLG对几种不同细胞系的转染效率,并进一步考察了PEI-PBLG对血清、缓冲液的敏感性。实验发现PEI-PBLG对不同的细胞系也存在不同的转染效率(HeLa > COS-7 > Vero-E6 > SK-OV-3 > ECV304),对生长旺盛的细胞效率较高,有研究者认为这一现象是由于在细胞分裂期释放于胞浆中的DNA更容易进入核中所致^[12]。PEI-PBLG对缓冲液种类敏感性较低,转染时使用PBS即能达到与Hank's相当的转染效率,而且

在含10%血清的培养液中,在保证细胞良好的生长状态的情况下能够更好的发挥高效的转染活性,具有良好的生物相容性,这一性质明显优于PEI,在体内应用方面更具潜力。

本研究的结果显示,PEI(10kD)-PBLG在体外基因转染的应用中具有很大优势,有望作为基因导入细胞的体外转染试剂及其向体内投递的载体系统。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Remy JS, Zanta M, Boussif O, et al. Gene Transfer with lipospermines and polyethylenimins. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, **30**: 85 - 95.
- [2] Godbey WT, Mikos AG. Poly-(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release*, 1999, **60**: 149 - 160.
- [3] Bragonzi A, Biffi A, Muggia A, et al. Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs. *Gene Ther*, 1999, **6**: 1995 - 2004.
- [4] Li JZ(李经忠), Wang QQ(王青青), Yu H(余海), et al. Identification and optimization of influencing factors on polyethylenimine transfection efficiency. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报), 2004, **20**(2): 234 - 240.
- [5] Harpe AV, Li Y, Kissel T. Characterisation of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *J Control Release*, 2000, **69**: 309 - 322.
- [6] Holger P, Dagmar F, Thomas K. Synthesis, Characterization, and Biocompatibility of Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) Block Copolymers. *Macromolecules*, 2002, **35**: 6867 - 6874.
- [7] Ahn CH, Bae YH, Kim SW. Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery. *J Control Release*, 2002, **80**: 273 - 282.
- [8] Gharwan H, Wightman L, Kircheis R, et al. Nonviral gene transfer into fetal mouse livers (a comparison between cationic polymer PEI and naked DNA). *Gene Ther*, 2003, **10**(9): 810 - 817.
- [9] Ogris M, Brunner S, Schuller S, et al. PEGylated DNA/ transferring-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther*, 1999, **6**(4): 595 - 605.
- [10] Zhu AT, Law LP, Feng M, Ho KM, et al. Amphiphilic core-shell nanoparticles with poly(ethylenimine) shells as potential gene delivery carriers. *Bioconj Chem*, 2005, **16**(1): 139 - 146.
- [11] Dash PR, Read ML, Fisher KD, et al. Decreased binding to proteins and cells of polymeric gene delivery vectors surface modified with a multivalent hydrophilic polymer and retargeting through attachment of transferrin. *J Biol Chem*, 2000, **275**(6): 3793 - 3802.
- [12] Rolland AP. From genes to gene medicines: recent advances in nonviral gene delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1998, **15**