

综 述

阳离子聚合物在非病毒基因转染中的研究进展

任先越^{1,2}, 杨立群³, 梁玄³, 刘珍珍³, 邓宇斌^{1,2}

1 中山大学附属第一医院转化医学中心实验室, 广东 广州 510080

2 中山大学中山医学院病理生理学教研室, 广东 广州 510080

3 中山大学化学与化学工程学院高分子研究所 聚合物复合材料及功能材料教育部重点实验室 新型聚合物材料设计合成与应用广东省高校重点实验室, 广东 广州 510275

任先越, 杨立群, 梁玄, 等. 阳离子聚合物在非病毒基因转染中的研究进展. 生物工程学报, 2013, 29(5): 568–577.

Ren XY, Yang LQ, Liang X, et al. Advances in cationic polymers used as nonviral vectors for gene delivery. Chin J Biotech, 2013, 29(5): 568–577.

摘 要: 基因治疗为治疗先天性遗传疾病和严重后天获得性疾病提供了一条新途径。目前, 基因载体分为两类: 病毒载体和非病毒载体。病毒载体转染效率高, 但由于某些病毒载体存在免疫原性、致癌性、宿主 DNA 插入整合等缺点, 从而限制了它们的应用。非病毒载体具有价格低、制备简单、安全有效、无免疫原性等优点, 成为基因载体研究的热点。阳离子多聚物是非病毒载体的典型代表。文中综述近年来阳离子多聚物作为基因载体的研究现状和进展, 重点介绍了阳离子多聚物基因载体的分类和与 DNA 的相互作用和传递机制。

关键词: 基因治疗, 非病毒载体, 阳离子聚合物

Advances in cationic polymers used as nonviral vectors for gene delivery

Xianyue Ren^{1,2}, Lique Yang³, Xuan Liang³, Zhenzhen Liu³, and Yubin Deng^{1,2}

1 Laboratory of Research Center for Translational Medicine, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

2 Department of Pathophysiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

3 Key Laboratory of Designed Synthesis and Application of Polymer Material, Key Laboratory for Polymeric Composite and Functional Materials of Ministry of Education, Institute of Polymer Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, Guangdong, China

Abstract: Gene therapy has been considered as a promising method for treatment of many diseases, such as acquired and

Received: November 19, 2012; **Accepted:** March 4, 2013

Supported by: Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, China (Nos. 2009B020313001, 201213091100457).

Corresponding author: Yubin Deng. Tel: +86-20-87755766-8630; E-mail: dengyub@mail.sysu.edu.cn

广东省科技计划项目 (Nos. 2009B020313001, 201213091100457) 资助。

genetic diseases. At present, there are two major vehicles for gene delivery including viral vectors and nonviral vectors. Viral vectors appear as high gene transfection efficiency, but some deficiencies such as inflammatory responses, recombination and mutagenesis have limited their use. On account of low pathogenicity, safety and cost-effectiveness, nonviral vectors have been attracted much attention. Cationic polymers are one of the nonviral vectors which have been widely studied. This review focuses on the structure of the cationic polymers and the interaction mechanism between the vector and DNA. We try to provide a framework for the future design and synthesis of nonviral vectors with high transfection efficiency and low toxicity for gene therapy.

Keywords: gene therapy, nonviral vectors, cationic polymer

基因治疗是一种将外源基因导入目的细胞并有效表达从而达到治疗目的的方法,为治疗先天性遗传疾病和严重后天获得性疾病提供了一条新途径。DNA 的有效转染需借助于物理方法或基因载体。物理方法包括水动力传送法、超声、电穿孔、磁转法、基因枪、光动力疗法等,局部转染比全身转染效果好,因为局部转染避免了循环系统的清除,并且在靶部位具有更高的浓度,因此低剂量的基因转染可以用物理方法^[1]。但物理方法需要使用专门的设备,不能进行全身性使用,并且会对组织和细胞产生严重损害^[2],采用基因载体有望克服物理方法的缺陷。基因载体包括病毒载体和非病毒载体,过去的几十年中,病毒载体的研究得到了很大的发展,除了转染效率高,病毒载体还具有运载单个 DNA 分子的能力,能将单个 DNA 分子整合到自己的 DNA 中,而非病毒载体只能将多个 DNA 分子连接到载体的各个分支链上从而形成纳米粒,近年来“多孔纳米容器”的发展有望解决非病毒载体的这个缺点^[3]。但是病毒载体由于其免疫原性、有限的 DNA 承载能力、与宿主 DNA 插入整合、致癌性和价格高等缺点,限制了其在临床的应用,非病毒载体具有价格低、制备简单、便于大规模生产、无免疫原性等优点^[4],但其转染效率低,特别是

体内转染效率低、靶向性差、有一定的毒性等缺点需要改善。阳离子聚合物是非病毒载体的一种,具有较强的 DNA 结合及保护能力,便于进行靶向性及生物适用性改性,成为基因载体研究中的一个重要研究对象。近年来文献中报道了很多阳离子聚合物基因载体如聚乙烯亚胺 PEI、多聚赖氨酸 PLL、聚酰胺-胺树枝状大分子等类型。本课题组基于聚酰胺-胺 (PAMAM) 的树枝化的结构特点,利用点击化学反应将含炔基的 PAMAM 基元偶联到壳聚糖主链上,拟合成一种安全、高效的树枝状阳离子聚合物基因载体,其以壳聚糖为主链、PAMAM 基元为侧链,可以改善壳聚糖的水溶性,增加正电性,以达到提高转染效率的目的^[5]。然而,虽然文献报道了很多含不同功能基团的阳离子聚合物,但是很难把不同种类的阳离子聚合物的功能基团的具体结构与功能效应之间的关系联系起来。

了解阳离子聚合物载体的转染机制对于设计合成高效低毒的阳离子聚合物载体至关重要。目前对于阳离子载体的作用机制还不清楚,有学者提出以下假说:带正电的阳离子聚合物与带负电的 DNA 通过静电吸附作用,将体积较大的 DNA 压缩和包裹成体积较小表面带正电荷的聚合物/DNA 复合物纳米小球。当带正电的复合

物与膜电位为负电的细胞接触时,通过细胞膜内吞作用进入细胞内形成内涵体,在内涵体中被酸化,与溶酶体融合,在这个过程中 DNA 很容易被溶酶体酶降解,为了保证 DNA 能有效地运输到细胞核,阳离子载体必须通过某种跨膜机制安全地逃离内涵体,携带 DNA 到核附近或者进入细胞核,表达成相应的蛋白质。

1 阳离子聚合物/DNA 复合物的形成、结构和稳定性

1.1 阳离子聚合物的结构

阳离子聚合物包括天然的 DNA 结合蛋白、PEI、PLL、阳离子树枝状分子、2-二甲基(氨基乙基)甲基丙烯酸酯(pDMAEM)、聚赖氨酸、聚酰胺基胺、聚氨基酯、聚脒、带有阳离子侧基的聚烯烃、碳水化合物为基础的聚合物,如壳聚糖等。其中,PEI、PLL 和壳聚糖是被研究最多的阳离子聚合物。阳离子聚合物/DNA 复合物的转染效率低和缺乏特异性,这些可以通过改变阳离子多聚物的结构而得到改善, Sun 等通过对 PEI、PLL 和 PMAPA 进行进一步的改善使转染效率得到一定程度的提高^[6]。本课题组利用多糖生物相容性好、易降解、无毒等优点,将以具有超支化结构的天然多糖——支链淀粉为原料,合成一系列带胺基基团的超支化阳离子支链淀粉衍生物,超支化阳离子支链淀粉衍生物对 293T 和 A549 细胞系有较低的细胞毒性及较高的基因转染性能,并且转染效率与阳离子支链淀粉衍生物中偶联的多胺基团种类、浓度、阳离子载体中氨基/DNA 磷酸基的比例(N/P 比值)及细胞种类有关^[7]。

阳离子聚合物缺少疏水结构,因此不能直接与细胞的膜结构接触融合或者破坏膜的稳定性。实际上,第一代阳离子载体如多聚赖氨酸、多聚精氨酸在内涵体逃逸和基因转染中的效率很低。第二代阳离子聚合物能通过质子海绵效应有效地逃离内涵体,如 PEI、PAMAM。

1975 年,研究者发现了多聚赖氨酸对 DNA 有强大的复合能力,并将该载体用于体内外基因转染。PLL 是用于基因转移的第一种阳离子聚合物,它的生物可降解性是在体内应用的优点,然而,PLL 形成的复合物迅速与血浆蛋白结合并从循环系统中清除。单纯的聚赖氨酸的转染效率很低^[8],这是因为聚赖氨酸与 DNA 的复合物通过内吞作用进入细胞后,被限制在内涵体的酸性环境中^[9],聚赖氨酸及其所携带的 DNA 可被其中的水解酶降解破坏。可见,增强复合物的内涵体破坏能力将增强其转染效率。为了改善复合物从内涵体的逃逸能力,可以在形成复合物时添加氯喹^[10]、膜破坏性肽^[11]及聚丙烯基丙烯酸^[12]等。其中氯喹虽然可以明显提高转染效率,但是具有较大的细胞毒性。膜破坏性肽及聚丙烯基丙烯酸能随着 pH 的变化而发生构象转变,在较低 pH 值条件下可以插入细胞内膜,导致膜上成孔,使膜内包含物逸出。将载体接枝 PEG 可以减少阳离子聚合物/DNA 复合物的聚集,从而减少被内皮网状系统的清除,从而提高它在循环系统中的半衰期^[13]。为了增强转染效率,可将靶向配体接到聚合物链上。比如在 PLL 上接 PEG 和靶向配体^[14]。或者通过在 PLL 骨架上引入氨基酸残基使其形态类似于具有质子海绵效应的 PEI,研究显示 L 精氨酸修饰的 PLL 转染效率显著提高^[15]。

1.2 阳离子聚合物/DNA 复合物的形成

DNA 分子通常以带负电的疏松状态存在, 体积较大, 与细胞表面之间存在排斥作用, 难以进入细胞; 另外, 血液及细胞内存在大量的水解酶尤其是核酸酶, 能将裸 DNA 分子破坏, 因此单独使用 DNA 转染时, 效率较低^[16]。复合物的形成通常是通过动力学控制的, 即阴离子和阳离子在离子力的作用下快速形成的, 整个过程几乎是不可逆的, 这个过程在转染效率与转染稳定性方面都具有重要作用。复合物的形成过程中, 组成成分的添加顺序 (包括将聚合物溶液添加到 DNA 溶液中的顺序) 影响复合物的大小和对细胞的转染效率。这种效应可能是由于 DNA 和聚阳离子浓度不同造成的。

PEI 在近年来的阳离子聚合物中具有重要的地位。PEI 通过静电吸附作用将 DNA 和 RNA 压缩成稳定的颗粒。由 PEI/DNA 形成的复合物中, DNA 的体积急剧减小。增加 PEI 的量使 N/P 从 2 增加到 20, 可以观察到复合物颗粒的粒径从 $>1\ 000\ \text{nm}$ 减小到 $100\sim 200\ \text{nm}$, 同时聚合物的分散性也减小^[17]。

聚合物的络合作用和凝结作用与许多聚合物的特性有关, 比如: 分子量、数量、电荷密度、多聚物与 DNA 的比例等。实际上, 低电荷密度和小分子量可以削弱阳离子聚合物对 DNA 的压缩能力。因此支化度低的 PEI 相对于支化度高的需要更高的 N/P 比来完成 DNA 的压缩^[18]。溶液的成分也是复合物形成的一个重要的影响因素。在生理盐水中形成的 PEI/DNA 复合物粒径大小呈现出对溶液离子强度的依赖性。随着盐水浓度的增加, 复合物粒径也增大, 说明 PEI 与 DNA 的结合减弱。用线性分子量为 $22\ \text{kDa}$ PEI, 在

5% 的葡萄糖溶液中复合的复合物 ($30\sim 60\ \text{nm}$) 比在生理盐水中复合的复合物 ($>1\ 000\ \text{nm}$) 粒径小得多。用支化的分子量为 $25\ \text{kDa}$ PEI 在离子溶液中复合的复合物粒径 $<100\ \text{nm}$ ^[19]。

增大复合物中阳离子聚合物的正电位与核苷酸磷酸二酯的负电位的比例到 >1 可以加强对 DNA 的压缩和增加复合物表面电荷。在电荷比为 1 时, DNA 通常已经完全结合, 在许多情况下已经被压缩了。然而在电中性附近时, 复合物经常聚集导致溶解度很低。在高电荷时, 阳离子聚合物部分结构处于游离状态, 没有结合 DNA^[20]。

1.3 阳离子聚合物/DNA 复合物的结构

阳离子多聚物的支化程度影响复合物的特性。超支化 PEI 具有更多的伯胺和仲胺基团, 比树枝状大分子具有更低的毒性和更高的基因转染效率^[21]。

N 的类型在基因转染中的作用不同, 如咪唑环上和三级胺的 N 对于形成 DNA 复合物贡献很小, 但它们在内涵体的破坏过程中有重要贡献。主体阳离子聚合物的 N 类型不但影响内涵体释放 DNA, 还可以影响阳离子聚合物对 DNA 的结合能力, 因此改变阳离子聚合物的 N 类型, 也可以实现对基因转染效率的提高和增加生物安全性。用具有永久电荷的四级胺代替低级胺有利于增强阳离子聚合物的阳离子特性和水溶性。控制聚合物的 N 类型应根据待改性阳离子聚合物的实际情况, 因为不同的 N 在基因转染中有不同的作用, 盲目地将一种胺转化为另一种胺反而可能降低转染效率。

1.4 阳离子聚合物/DNA 复合物的电位和稳定性

阳离子聚合物表面的正电荷对于形成复合

物充分溶解所需的复合物周围的亲水性阳离子圈非常重要^[22]。尽管 PEI 和 DNA 均有很好的水溶性, PEI 和 DNA 形成的复合物在电中性时形成不溶于水的复合物。储存复合物一定时间可能会影响复合物的结构, 最终影响基因转染效率。例如, 将高度支化的 PEI 制成的复合物储存 3 周能将转染效率提高 8 倍^[23], 这可能是由于更强的静电相互作用, 进而形成压缩更紧密的复合物。盐溶液的浓度越高, DNA 与阳离子多聚物之间的结合亲和力下降^[24], 可能是由于在高浓度盐溶液中产生的电荷屏蔽效应造成的。

复合物的粒径大小也是基因转染效率的一个重要影响因素。复合物的粒径大小是由复合物的络合作用 (即与 DNA 的亲和力) 和结构控制的。结合松散的载体/DNA 复合物具有较大的粒径。通常阳离子聚合物的主链越长或者支化度越高, DNA 压缩越紧密, 这样可以使复合物更有效地抵抗细胞外环境的降解, 以及更好地通过静电吸附作用与带负电的细胞膜表面接触从而内吞进入细胞。DNA 压缩通过溴化乙锭荧光猝灭来检测显示, 高分子量 PEI (25 kDa) 在低 N/P 时比低分子量的 PEI (5.4 kDa) 更有效^[25]。

在体外转染细胞时, 复合物的粒径大小对生物相容性和内涵体逃逸等起着关键的作用^[26]。由于阳离子聚合物/DNA 复合物被看成是独立的单个压缩物, 所以认为那些大颗粒的物质是由这些小单位聚集而成的。带正电荷的复合物显示出与孵育时间相关聚集倾向。复合物聚集的影响因素包括表面电位和溶液介质的离子强度。聚集的倾向, 可能是由于屏蔽组件的存在, 它们的存在会降低 PEI 复合物单体之间的相互作用, 也会降低

复合物和循环系统的血液成分之间的相互作用。这些屏蔽组件能抑制大的聚合物被网状内皮系统快速的清除^[27]。通常, 在低的 N/P (2~5) 之间时形成的复合物由于疏水作用和范德华力的作用而产生聚集现象^[28]。相反, 在高 N/P 时形成的复合物由于复合物表面高正电位形成的静电排斥力而减少而发生聚集, 这种效应可能导致复合物在生理盐水溶液中保持稳定。多余的 PEI 会与这些压缩后的复合物颗粒结合, 使在 0.9% NaCl 溶液中的 zeta 电位高至 +25 mV^[29]。有报告认为粒径较大的复合物适合在体外转染中使用^[30], 他们认为这些复合物由于沉降作用能更多地与细胞接触并被细胞摄取, 而在体内转染实验时粒径较大则不适合。

2 阳离子聚合物/DNA 复合物结构与功能的关系

阳离子多聚物可被合成为不同的长度、不同的几何形状 (线性或者分枝状)、不同的取代物或者是添加一些功能基团。这就开启了大量的结构与功能关系之间关系的研究^[31]。文中通过讨论阳离子聚合物/DNA 复合物的结构在各个转染步骤中的作用来研究阳离子聚合物/DNA 复合物结构与功能的关系。

2.1 细胞结合与摄取

表面电荷的阳离子对与细胞结合和细胞内吞都至关重要^[32], 细胞表面带负电荷的蛋白多糖参与复合物进入细胞的过程。表面带正电的复合物 (N/P 在 5 左右) 经常被用于转染。通过去除多余的 PEI 来纯化复合物的过程减小了细胞毒性, 然而, 这也导致转染效率降低。这可能是由

于游离的 PEI 促进内涵体逃逸, 这个假设通过再添加游离的 PEI 可以恢复转染效率得到支持^[33]。

复合物转染效率与细胞和阳离子聚合物的类型有关。von Gersdorff 等报道在 COS-7 细胞(非洲绿猴肾)和 HUH-7 细胞(肝癌细胞)中, 依赖网格蛋白途径是线性 PEI 转染的主要途径。然而, 在 Hela 细胞中依赖脂质途径和依赖网格蛋白途径均参与转染过程, 以前者更显著^[34]。Rejman 等报道在 A549 和 Hela 细胞中, PEI 复合物通过这两种途径进入细胞, 但是通过网格蛋白途径进入细胞的复合物在溶酶体中降解, 而通过小穴进入细胞的复合物最终成功转染^[35]。与 von Gersdorff 等的结果相比, van der Aa 等研究在 COS-7 细胞中, 阻断小穴介导的转染, 当网格蛋白途径和小穴途径介导的内吞增加时, PEI 和 pDMAEMA 复合物介导的转染几乎全部被抑制^[36]。用流体相的内吞作用的特异性阻断剂显示小穴介导的通路显示小穴途径也参与了 PEI-25/DNA 复合物转染 CHO-K1 和 HeLa 细胞过程中^[37]。

2.2 内涵体逃逸

PEI 是一种在废水处理和造纸业中很常用的一种阳离子多聚物。Pollard 等^[38]提出质子海绵效应假说来解释 PEI 介导的高转染效率。假设在生理 pH 条件下, 只有 1~6 个氮原子质子化, 在 pH 较低时, 比如在内涵体中, 质子化的氮原子数量增加, 形成一个电位梯度, 导致氯离子内流进内涵体, 增加的氯离子浓度形成的电位梯度导致水内流, 最终导致内涵体肿胀破裂。PEI 和 PAMAM 在内涵体中能够存在一段时间, 因此促使了溶酶体的渗透导致肿胀破裂。近年来质子海绵效应假

说已经被广泛接受。有研究者用活细胞共聚焦显微镜为质子海绵效应假说提供了证据^[39]。减速酸化, 增加了氯离子的聚集, 内含 PEI 的内涵体体积增加了 140%^[40]。另外, 去除季铵化的加成质子胺基导致转染效率降低 20 倍左右^[41]。然而, 仅仅质子海绵效应假说不足以完全说明 PEI 或者 PAMAM 作为基因载体促进内涵体逃逸中的显著效果。近年来, Benjaminsen 等研究表明, PEI 不会按照以前的设想诱导溶酶体 pH 的变化, 通过量化溶酶体中 PEI 的浓度发现质子海绵效应不一定是复合物内涵体逃逸的主要机制^[42]。

阳离子聚合物在内涵体环境中的功能以及和内涵体膜之间的相互作用的分子机制需要进一步深入的研究。复合物结构在复合物与内涵体膜之间的相互作用中的功能也有待继续研究说明。

2.3 阳离子聚合物/DNA 复合物的解聚

内涵体逃逸后, 复合物需要定位到细胞核并且解聚。阳离子聚合物对 DNA 较高的亲和力导致与 DNA 的解离困难可能也是限制基因转染的原因。低分子量 PLL 形成的复合物比较容易解离, 它的转染效率比高分子量 PLL (解离困难) 高。PEI 形成的复合物的解离动力非常缓慢。通过对 PEI/DNA 复合物进行双荧光标记后荧光显微镜观察其在细胞内的定位, 发现与 B16F10 细胞共培养 4 h 后, 细胞内的复合物没有解离^[43]。用双荧光标记的 PEI/DNA 复合物转染胰腺癌细胞 18 h 后发现仅有少量完整的复合物颗粒, 更多的是游离的 PEI, 这可能是复合物解聚的结果^[44]。目前设计了很多种方法来证明复合物在细胞内解聚。比如已经合成了一种可还原的 PLL 复合

物,在细胞内环境中可以降解,有利于释放 DNA,它可以提高基因表达 180 倍^[45]。

2.4 核运输

通过复合物将质粒转染进入细胞核早在 1988 年 Pollard 等就开始研究。他们发现通过微量注射 PEI/DNA 复合物到细胞浆比单独注射 DNA 或者 DOTAP/DNA 脂质体的转染效率高。这个结果被认为主要是因为 PEI 直接帮助 DNA 进入细胞核。然而也不能排除 PEI 通过其他间接途径帮助 DNA 进入细胞核,包括更好地保护 DNA 和提高细胞质流动性。

有研究者认为核膜是最主要的 DNA 进入细胞核的障碍,核孔复合物调节核运输时核膜的变化,核孔复合物的直径大约 9 nm,离子和中小分子可以自由穿过,比如: 40~60 kDa 的蛋白质、小于 300 bp 的核酸等,大分子物质不能自由穿过核膜^[46]。对于休眠细胞,大分子蛋白通过运输蛋白识别具体序列的核定位信号肽进入细胞核,蛋白-核定位为信号肽/运输蛋白复合物通过核孔复合物进入细胞核^[47]。对于正在复制的细胞, DNA 进入细胞核的机制是细胞分裂时核膜解散和重组过程中出现短暂的不完整, DNA 被动进入细胞核。然而,转染效率高低对细胞周期的状态的要求在不同的转染系统系统中不同。例如,线性 PEI 形成的复合物和电穿孔的转染效率对细胞周期不敏感,而支化的 PEI 与脂质体形成的复合物的转染效率依赖于细胞周期^[48]。

3 总结

本文旨在探讨阳离子聚合物的结构和功能之间的关系,为用于基因转染的阳离子聚合物的

设计和合成提供依据。对阳离子聚合物的理化性质、阳离子多聚物/DNA 的结构、细胞内吞、内涵体逃逸、核运输等的了解有助于基因载体的设计。实际上,转染效率的高低与载体的转染途径是体内或者体外、细胞类型、给药途径等都有关系。非病毒载体用于基因转染时虽然没有病毒载体免疫原性、插入突变等弊端,但不同的阳离子聚合物对细胞的转染效率高低不同,并且都具有一定的细胞毒性。近年来,世界各地的研究者都在不断研究非病毒方法,特别是化学合成的载体,尽管有很多阳离子聚合物的转染效率很高,但是目前报道的非病毒载体的转染效率仍比病毒载体的转染效率低。未来的基因载体的设计主要是提高转染效率、治疗靶向性、降低生物毒性等,这些改善将依赖于我们更好地理解 and 克服非病毒载体的限制步骤。将非病毒和病毒载体联系起来,可能对获得更有效的、持久的、无毒基因传递系统有所帮助。

REFERENCES

- [1] Guo J, Fisher KA, Darcy R, et al. Therapeutic targeting in the silent era: advances in non-viral siRNA delivery. *Molecular Biosystems*, 2010, 6(7): 1143–1161.
- [2] Jafari M, Soltani M, Naahidi S, et al. Nonviral approach for targeted nucleic acid delivery. *Curr Med Chem*, 2012, 19(2): 197–208.
- [3] Cisse I, Okumus B, Joo C, et al. Fueling protein DNA interactions inside porous nanocontainers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(31): 12646–12650.
- [4] Braeckmans K, Buyens K, Naeye B, et al. Advanced fluorescence microscopy methods illuminate the transfection pathway of nucleic acid nanoparticles. *J Control Release*, 2010, 148(1):

- 69–74.
- [5] Deng J, Zhou YF, Xu B, et al. Dendronized chitosan derivative as a biocompatible gene delivery carrier. *Biomacromolecules*, 2011, 12(3): 642–649.
- [6] Sun X, Zhang N. Cationic polymer optimization for efficient gene delivery. *Mini Rev Med Chem*, 2010, 10(2): 108–125.
- [7] Zhou YF, Yang B, Ren XY, et al. Hyperbranched cationic amylopectin derivatives for gene delivery. *Biomaterials*, 2012, 33(18): 4731–4740.
- [8] Sun J, Luo T, Sheng R, et al. Preparation of functional water-soluble low-cytotoxic poly (methacrylate)s with pendant cationic L-lysines for efficient gene delivery. *Macromol Biosci*, 2013, 13(1): 35–47.
- [9] Männistö M, Vanderkerken S, Toncheva V, et al. Structure-activity relationships of poly (L-lysines): effects of pegylation and molecular shape on physicochemical and biological properties in gene delivery. *J Control Release*, 2002, 83(1): 169–182.
- [10] Abes S, Williams D, Prevot P, et al. Endosome trapping limits the efficiency of splicing correction by PNA-oligolysine conjugates. *J Control Release*, 2006, 110(3): 595–604.
- [11] Mok H, Park TG. Self-crosslinked and reducible fusogenic peptides for intracellular delivery of siRNA. *Biopolymers*, 2008, 89(10): 881–888.
- [12] Yessine MA, Leroux JC. Membrane-destabilizing polyanions: interaction with lipid bilayers and endosomal escape of biomacromolecules. *Adv Drug Delivery Rev*, 2004, 56(7): 999–1021.
- [13] Malam Y, Lim EJ, Seifalian AM. Current trends in the application of nanoparticles in drug delivery. *Curr Med Chem*, 2011, 18 (7): 1067–1078.
- [14] Sun W, Fletcher D, van Heeckeren RC, et al. Non-covalent ligand conjugation to biotinylated DNA nanoparticles using TAT peptide genetically fused to monovalent streptavidin. *J Drug Target*, 2012, 20(8): 678–690.
- [15] Sun X, Liu C, Liu D, et al. Novel biomimetic vectors with endosomal-escape agent enhancing gene transfection efficiency. *Int J Pharm*, 2012, 425(1/2): 62–72.
- [16] Liu N, Hao Y, Yin Z, et al. Self-assembled human serum albumin-coated complexes for gene delivery with improved transfection. *Pharmazie*, 2012, 67(2): 174–181.
- [17] Erbacher P, Bettinger T, Belguise-Valladier P, et al. Transfection and physical properties of various saccharide, poly (ethyleneglycol) and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). *J Gene Med*, 1999, 1(3): 210–222.
- [18] Fischer D, Bieber T, Li Y, et al. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res*, 1999, 16(8): 1273–1279.
- [19] Goula D, Remy JS, Erbacher P, et al. Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther*, 1998, 5(5): 712–717.
- [20] Ernst Wagner. Strategies to improve DNA polyplexes for in vivo gene transfer: will artificial viruses be the answer? *Pharm Res*, 2004, 21(1): 8–14.
- [21] Steele TW, Shier WT. Dendrimeric alkylated polyethylenimine nano-carriers with acid-cleavable outer cationic shells mediate improved transfection efficiency without increasing toxicity. *Pharm Res*, 2010, 27(4): 683–698.
- [22] Bacalocostantis I, Mane VP, Kang MS, et al. Effect of thiol pendant conjugates on plasmid DNA binding, release, and stability of polymeric delivery vectors. *Biomacromolecules*, 2012, 13(5): 1331–1339.
- [23] Banerjee P, Reichardt W, Weissleder R, et al. Novel hyper-branched dendron for gene transfer *in vitro* and *in vivo*. *Bioconjug Chem*, 2004, 15(5): 960–968.
- [24] Kabanov AV, Kabanov VA. Interpolyelectrolyte and block ionomer complexes for gene delivery: physico-chemical aspects. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 30(1/3): 49–60.

- [25] Kunath K, von Harpe A, Fischer D, et al. Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and *in vivo* distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J Control Release*, 2003, 89(1): 113–125.
- [26] Chen M, Cooper HM, Zhou JZ, et al. Reduction in the size of layered double hydroxide nanoparticles enhances the efficiency of siRNA delivery. *J Colloid Interface Sci*, 2012, 390(1): 275–281.
- [27] Dash PR, Read ML, Barrett LB, et al. Factors affecting blood clearance and *in vivo* distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther*, 1999, 6(4): 643–650.
- [28] Ogris M, Steinlein P, Kursa M, et al. The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther*, 1998, 5(10): 1425–1433.
- [29] Merdan T, Callahan J, Petersen H, et al. Pegylated polyethylenimine-Fab' antibody fragment conjugates for targeted gene delivery to human ovarian carcinoma cells. *Bioconjug Chem*, 2003, 14(5): 989–996.
- [30] Wightman L, Kircheis R, Rossler V, et al. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery *in vitro* and *in vivo*. *J Gene Med*, 2001, 3(4): 362–372.
- [31] Elouahabi A, Ruyschaert JM. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol Ther*, 2005, 11(3): 336–347.
- [32] Sunshine JC, Peng DY, Green JJ. Uptake and transfection with polymeric nanoparticles are dependent on polymer end-group structure, but largely independent of nanoparticle physical and chemical properties. *Mol Pharm*, 2012, 9(11): 3375–3383.
- [33] Boeckle S, von Gersdorff K, van der Piepen S, et al. Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *J Gene Med*, 2004, 6(10): 1102–1110.
- [34] von Gersdorff K, Sanders NN, Vandenbroucke R, et al. The internalization route resulting in successful gene expression depends on both cell line and polyethylenimine polyplex type. *Mol Ther*, 2006, 14(5): 745–753.
- [35] Rejman J, Bragonzi A, Conese M, et al. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol Ther*, 2005, 12(3): 468–474.
- [36] van der Aa MA, Huth US, Häfele SY, et al. Cellular uptake of cationic polymer-DNA complexes via caveolae plays a pivotal role in gene transfection in COS-7 cells. *Pharm Res*, 2007, 24(8): 1590–1598.
- [37] Hufnagel H, Hakim P, Lima A, et al. Fluid phase endocytosis contributes to transfection of DNA by PEI-25. *Mol Ther*, 2009, 17(7): 1411–1417.
- [38] Pollard H, Remy JS, Loussouarn G, et al. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem*, 1998, 273(13): 7507–7511.
- [39] Merdan T, Kunath K, Fischer D, et al. Intracellular processing of poly ethyleneimine/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. *Pharm Res*, 2002, 19(2): 140–146.
- [40] Sonawane ND, Szoka FC Jr, Verkman AS, et al. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem*, 2003, 278(45): 44826–44831.
- [41] Thomas M, Klibanov AM. Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(23): 14640–14645.
- [42] Benjaminsen RV, Mattheijberg MA, Henriksen JR, et al. The possible "Proton Sponge" effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH. *Mol Ther*, 2013, 21(1): 149–157.
- [43] Ogris M, Steinlein P, Carotta S, et al. DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression. *AAPS*

- Pharm Sci, 2001, 3(3): E21.
- [44] Bieber T, Meissner W, Kostin S, et al. Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. J Control Release, 2002, 82(2/3): 441-454.
- [45] Read ML, Bremmer KH, Oupicky D, et al. Vectors based on reducible polycations facilitate intracellular release of nucleic acids. J Gene Med, 2003, 5(3): 232-245.
- [46] Powers MA, Forbes DJ. Nuclear transport: beginning to gel? Curr Biol, 2012, 22(23): R1006-1009.
- [47] Capelson M, Doucet C, Hetzer MW. Nuclear pore complexes: guardians of the nuclear genome. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2010, 75: 585-597.
- [48] Brunner S, Fürtbauer E, Sauer T, et al. Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. Mol Ther, 2002, 5 (1): 80-86.

(本文责编 郝丽芳)

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 (不用单列标题书写)。目的 (Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法 (Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results): 本文最后得出的结果 (实验数据部分)。结论 (Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的 (如 DNA、ATP 等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。