基础研究 文章编号:0253-3626(2008)s1-0014-06

新型靶向纳米材料介导基因治疗胶质瘤的体外研究

梁 兵[1],肖中鹏[2],李 艺[1],孔祥复[3],帅心涛[12],彭 英[1]

(1.中山大学附属第二医院神经内科,广州 510020; 2.中山大学化学及化工学院,广州 510020;
3.香港中文大学何鸿燊防治传染病研究中心)

【摘 要】目的:合成可降解性叶酸(FA)-PEG-PEI和PEG-PEI并研究其负载质粒DNA的能力,比较所形成纳米材料/DNA复合物在体外对细胞的毒性大小及其转染效率,为进一步体内基因治疗做好准备。方法:化学方法合成可降解性FA-PEG-PEI和PEG-PEI,检测所形成纳米材料/DNA复合物的粒径、zeta-电位和凝胶阻滞能力,以及对C6(叶酸受体中度表达)、293T(叶酸高度表达)和HepG2(叶酸不表达)3种细胞的细胞毒性,并对3种细胞进行转染,分别用流式细胞仪、荧光素酶基因表达水平和倒置荧光显微镜检测转染效果。结果:FA-PEG-PEI与PEG-PEI复合pDNA后进行电位、粒度分析表明其带正电,粒径在200~300nm,FA-PEG-PEI和DNA的完全结合在N/P比为5,PEI和PEG-PEI与DNA的完全结合则出现在N/P比为10。MTT法证实了复合物在C6、293T、HepG23种细胞中的细胞毒性表明其细胞毒性比常用的PEI 25ku低;在3种细胞中,转染效率从整体来看,N/P比=15时,FA-PEG-PEI萤光素酶基因表达水平最高;类似的,通过流式细胞仪和倒置荧光显微镜更直观的检测了转染效果,表明FA-PEG-PEI对C6、293T细胞都有靶向效果且在N/P比为15时靶向效果最好,而在HepG2细胞中没有靶向效果。结论:此研究结果为叶酸靶向基因治疗神经胶质瘤寻找行之有效的基因载体提供了理论和实践基础,可进一步于动物体内进行联合基因治疗神经胶质瘤。

【关键词】A-PEG-PEI;体外基因转染;转染效率;肿瘤靶向;叶酸受体

【中国图书分类法分类号】R72 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

Synthesis and characterization of novel nonviral vectors for tumor-targeted gene delivery to C6 glioma cells in vitro

LIANG Bing, et al

(*Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University*)

【Abstract】 *Objective*: To enhance the transfection efficiency and to reduce the toxicity of the polyethyleneimine (PEI), we synthesized PEI derivatives and tested their toxicity and transfection efficiency in different cell lines. *Methods*: We first developed PEGylated PEI to decrease the toxicity of PEI, and then we conjugated folate on the distal end of the novel PEG-PEI to introduce specificity for special tumor cells. Following we checked the characterization of polymers and tested their toxicity and transfection efficiency in three cell lines with MTT assay, EGFP/fluorescent image, reporter assay and flow cytometry. *Results*: These copolymers effectively condensed plasmid DNA(pDNA) into nanoparticles with positive surface charge under a sui table N/P ratio. These derivatives reduced the cytotoxicity of PEI 25ku in different cell lines (i.e., HEK 293T, glioma C6 and hepatoma HepG2 cells). More importantly, compared with PEI 25ku, the transfection efficiency was increased. Reporter assay and flow cytometry showed that FA-PEG-PEI/pDNA complexes exhibited higher transgene activity than that of PEG-PEI/pDNA or PEI/pDNA in folate-receptor(FR) positive(HEK 293T and C6) cells but not FR-negative(HepG2) cells. *Conclusion*: These results indicated that FA-PEG-PEI might be a promising candidate for gene delivery with the characteristic of good biocompatibility and relatively high gene transfection efficiency.

【Key words】 FA-PEG-g-hy-PEI; In vitro gene transfer; Transfection efficiency; Tumor targeting; FA-receptor

作者介绍:梁 兵(1978-),男,博士,
研究方向:基因治疗、脑血管病、肿瘤治疗
通讯作者:彭英,男,教授,E-mail:pengy12@yahoo.com。
基金项目:国家科学基金项目(30672411 to YP 和 50673103 to XS)。

分子生物学与基因工程技术的发展,为神经系统疾病发病机制的认识和治疗提供了崭新的手段和思路,而DNA重组和基因转染技术的发展使基因治疗从理论上的可能性成为现实[1]。基因治疗目前已

被认为是恶性胶质瘤治疗的发展方向或将来可能成为最后的克星。

在基因治疗研究领域，载体问题一直是至关重要的核心问题之一[2,3]。一个理想的载体系统至少必须满足2个条件，即有效性和安全性。目前使用的作为基因转移载体的纳米粒子主要是阳离子高分子纳米材料，常用的如聚乙烯亚胺(Polyethylenimine，PEI)[4,5]、多聚赖氨酸(Poly-L-lysine，PLL)[6]、脱乙酰壳多糖(Chitosan)[7,8]等。研究证实，高分子量的PEI在具有较高转染效率的同时也具有较强的毒性，但它易于进行表面修饰，因此在PEI分子上通过可降解连接分子聚乙二醇(PEG)后，即可保持PEI的转染效率，同时可降低其细胞毒性[9,10]。

肿瘤细胞需要叶酸来生长和分裂，其在生长过程中较正常组织需要更多的叶酸，所以肿瘤细胞有比较丰富的叶酸受体。最近的研究表明，约有30%的肿瘤细胞对叶酸受体高度表达，特别是上皮来源的肿瘤，这就意味着这可以以肿瘤细胞叶酸受体为靶向因子来进行靶向基因治疗[11~14]。

因此，本文合成叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺(FA-PEG-PEI)和聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺(PEG-PEI)并研究了其负载质粒DNA(pDNA)的能力，形成复合物的粒径、zeta-电位，并在体外检测了其细胞毒性和转染效率，以便了解FA-PEG-PEI的基因转染效率及细胞毒性作用，为寻找崭新的、行之有效的恶性胶质瘤基因治疗方法打下理论和实践基础。

1 材料与方法

1.1 试验试剂

大多数化学材料包括PEI 25 000U、单甲基PEG(mPEG-OH) 3 400U、顺式丁烯二酸酐、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和MTT均从美国Sigma-Aldrich(St Louis，MO，USA)公司购买。

1.2 质粒DNA(pDNA)的制备

本研究应用能表达绿色荧光蛋白的pAAV-EGFP和表达荧光素酶的pCL3。质粒在大肠杆菌中扩增，然后用QIAGEN试剂盒提取纯化。得到的质粒通过紫外分光计在260nm和280nm波长处检测其含量；在1.0%的琼脂糖凝胶上以100V电压电泳40min，检测其完整性。检测合格的质粒保存于-20℃备用。

1.3 叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺 (FA-PEG-PEI)的合成

如表1所示，0.2g FA-PEG-COOH用DCC/NHS活化，0.45g 25ku hy-PEI溶解在10mlPBS(pH=7.4)中，然后把已活化的FA-PEG-COOH转移到hy-PEI溶液中，室温下，避光室温，搅拌反应24h，用MWCO=8ku透析袋在蒸馏水中透析48h，冷冻干燥得黄色粘稠固体0.5g(产率78%)[15-17]。

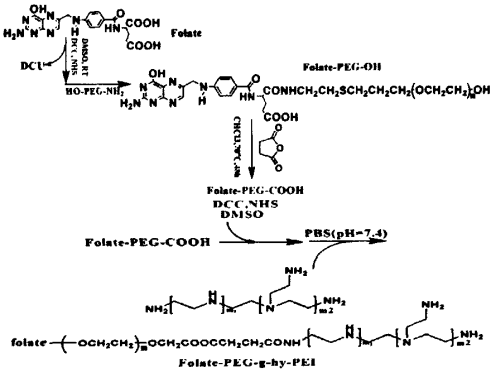


图1 叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺(FA-PEG-PEI)的合成路线

1.4 细胞培养

C6大鼠胶质瘤细胞(C6 glioma)，人胚肾细胞(293T)和人肝癌细胞(HepG2)使用加有10% FBS和1%抗生素(青霉素/链霉素)的DMEM培养基在5%CO_2培养箱37℃中培养。

1.5 纳米材料/pDNA复合物的制备

在Eppendorf管中，将1μg pDNA稀释在50μl不含FBS的DMEM中，振荡均匀，按不同N/P比把相应量的纳米材料加入到另外一管装有50μl不含FBS的DMEM的Eppendorf管中，然后把两溶液在室温下振荡5min得到均匀复合物。

1.6 粒径和zeta-电位的测量

纳米材料/pDNA复合物在N/P比为15配成纳米材料浓度6.5mg/ml，马尔文Nano-ZS90粒度及zeta电位分析仪上测定，条件为25℃，入射光波长为625nm。

1.7 琼脂糖凝胶电泳

FA-PEG-PEI、PEG-PEI和PEI分别配制成一系列不同浓度的磷酸缓冲溶液，pAAV-EGFP和纳米材料按N/P比为1、5、10、15、20、25、和30复合后，和6倍的琼脂糖染色剂结合，上样到含有EtBr(0.1μg/ml)的1.0%琼脂糖上，在PBS中以100V的电压跑40min，通过紫外灯观察结果。

1.8 细胞毒性试验(MTT法)

MTT比色法具体试验过程如下：3种细胞以每孔6 000个细胞接种在96孔板中；24h后每孔加入含有150ng pAAV-EGFP的纳米材料/pDNA复合物的150μl不含血清培养液进行转染，每个N/P浓度复制在4个孔中，48h之后加入20μl MTT溶液(5mg/ml)，继续培养4h，小心吸出孔内培养上层清液后，加入100μl DMSO，室温振荡5min后，通过化学发光酶标仪测定在570nm处的吸光值。其中3种细胞各为1组，同时检测各纳米

材料/pDNA复合物的毒性,并以C6细胞检测了各纳米材料的毒性。

1.9 转染效果试验

1.9.1转染过程　将细胞以1×10⁵个细胞每孔接种在24孔板上培养24h,待细胞丰度70%,在转染前4h用不加FBS的DMEM培养基置换培养液,然后把其吸走后每孔加入含有1μg pDNA不同N/P比的复合物和200μl不含FBS的DMEM培养基,在37℃下培养4h,吸去转染液,加入DMEM培养基在37℃下继续培养20h。

1.9.2荧光素酶基因表达水平检测　纳米材料与pGL3复合物在24孔板上按照上述方法进行转染,每个浓度分别培养在四个孔中,48h后用PBS冲洗,每孔加入100μl细胞裂解液,室温放置10min,用漩涡振荡器震动细胞10~15min。取出50μl上层清液,加入到试管中,每孔加入50μl荧光素酶分析底物,在光度计中检测,用相对光度单位/孔蛋白含量(RUL/well)表示。其中3种细胞各为1组,同时检测各纳米材料/pDNA复合物的转染效率。

1.9.3倒置荧光显微镜观测　pAAV-ECFP同纳米材料复合后对C6、293T和HepG2细胞转染后,弃去上层培养液,通过倒置荧光显微镜观测pDNA在3种细胞中的转染效果,照片用Nikon荧光软件捕获。其中3种细胞各为1组,同时检测各纳米材料/pDNA复合物的转染效率。

1.9.4流式细胞仪观测　pAAV-ECFP同纳米材料复合并对3种细胞转染后,弃去上层培养液,细胞用500μl Hank's平衡盐溶液悬浮,然后应用FACS AriaTM系统计数表达绿色荧光蛋白的细胞的百分比。其中3种细胞各为1组,同时检测各纳米材料/pDNA复合物的转染效率。

1.10 统计学分析

实验数据采用($\bar{x}\pm s$)表示,应用SPSS11.0统计软件进行统计学分析,差异显著性检验所选用的统计方法有t检验等;$P<0.05$及$P<0.01$分别表示差别具有统计学意义和显著统计学意义。

2 结　果

2.1 粒径和zeta-电位

本试验在MALVERN Zetasizer Nano ZS90仪器上测定FA-PEG-PEI/pDNA、PEG-PEI/pDNA2种纳米复合体的粒径和zeta-电位,如图2所示,FA-PEG-PEI/pDNA复合体粒径为(264±5)nm,而PEG-PEI/pDNA的粒径则达到(396±5)nm,FA-PEG-PEI/pDNA复合体电位是(+20.6±3)mV,后者的电位相对而言就比较低,只有(+6.92±3)mV,从此结果看FA-PEG-PEI/pDNA结合的比较好($P<0.05$)。

2.2 琼脂糖凝胶电泳

如图3所示,FA-PEG-PEI和DNA的完全结合在N/P比为5即达到结合,而PEG-PEI、PEI和DNA的完全结合则出现在N/P比为10。所以FA-PEG-PEI作为转染试验需要在N/P≥5,而PEG-PEI和PEI则需要≥10。

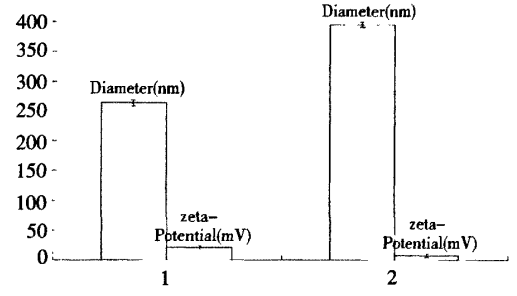


图2　FA-PEG-PEI/pDNA(1)、PEG-PEI/pDNA(2)两种纳米复合体的粒径和zeta-电位

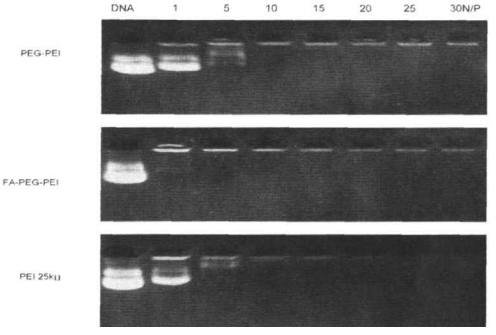


图3　琼脂糖凝胶电泳结果

1.3 细胞毒性试验

以PEI 25ku为对照,在不同的N/P分别对C6,293T和HepG2细胞进行了MTT检测,所有的纳米材料载体都有一定的细胞毒性[18,19]。从图4可以得出,在3种细胞中,在试验范围内的N/P内,FA-PEG-PEI和PEG-PEI的细胞存活率比PEI要高($P<0.01$),N/P<15时,PEG-PEI和FA-PEG-PEI/pDNA的存活率相当,只是在N/P>15时FA-PEG-PEI的细胞存活率才比PEG-PEI低($P<0.05$)。

2.4 细胞转染效果

纳米材料与pGL3结合后转染3种细胞的荧光素酶基因表达水平如图5所示,在3种细胞中,从整体来看,随N/P比增大,RLU/well增高,在N/P=15时达到最大值。为了更直观检测纳米材料负载pDNA的转染效果,纳米材料与pAAV-EGFP在N/P=15时复合后,在3种细胞中进行转染,然后分别用倒置荧光显微镜和流式细胞仪观测。在C6和293T两种细胞中,FA-PEG-PEI/pAAV-EGFP复合物比另外两种复合物的

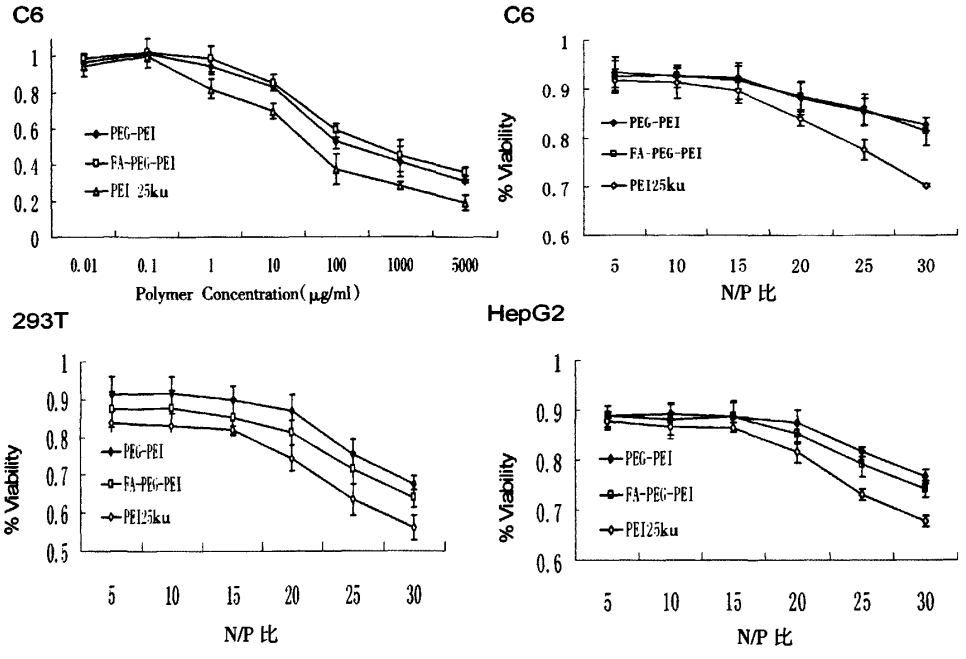


图4 纳米材料载体及复合体在不同细胞中的细胞毒性

绿色荧光多($P<0.05$)。荧光照片如图6所示,FA-PEG-PEI/pAAV-EGFP表达出最大的荧光,在293T细胞中其荧光表达强度比另外的荧光强度都大很多,而在HepG2细胞中,FA-PEG-PEI/pAAV-EGFP未表达出比其它复合物荧光强度大的效果。图7流式细胞仪的结果也证实了这一结论。

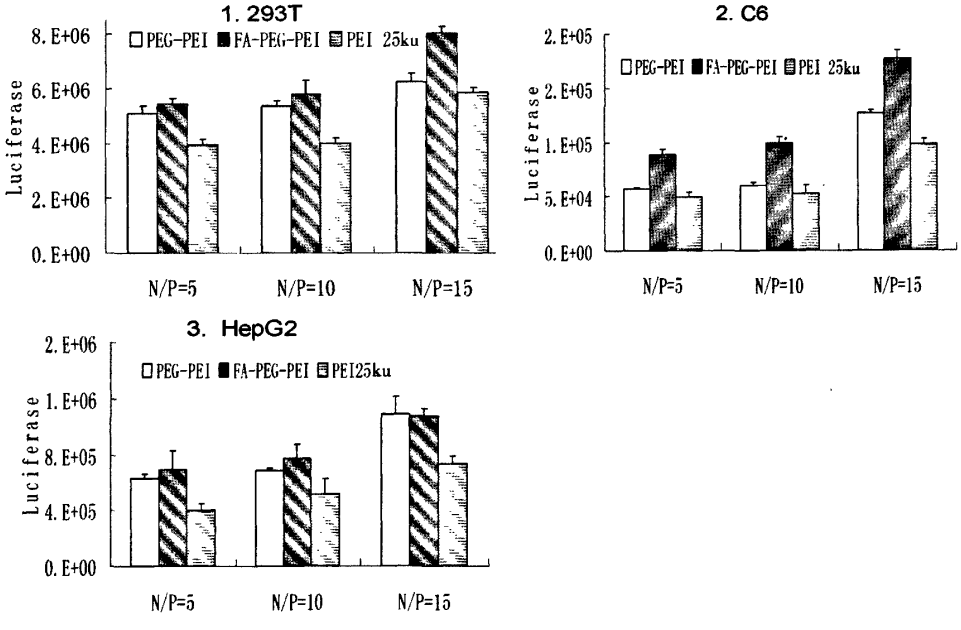


图5 复合物在不同的N/P比荧光素酶基因表达水平

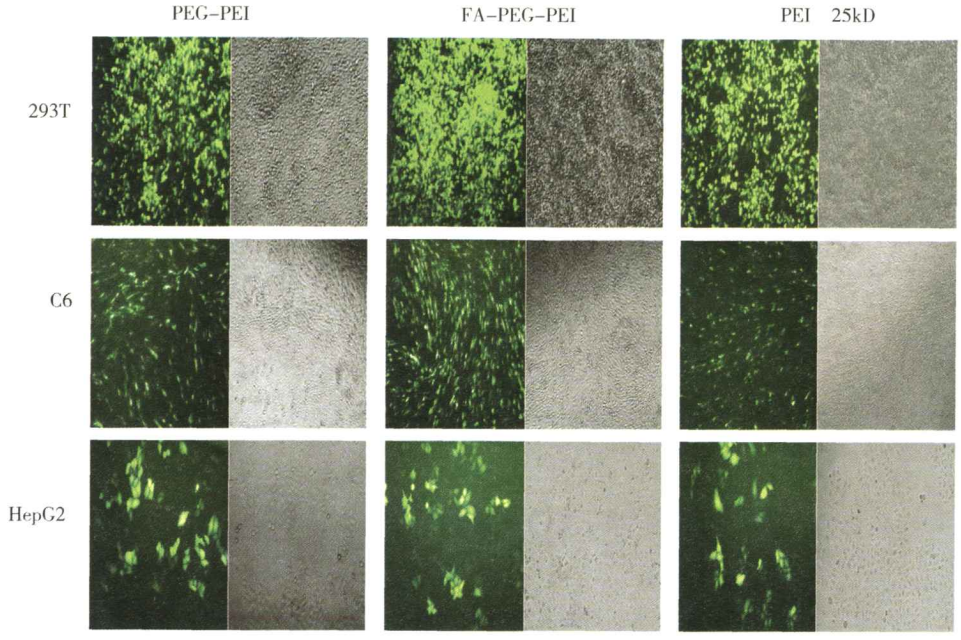
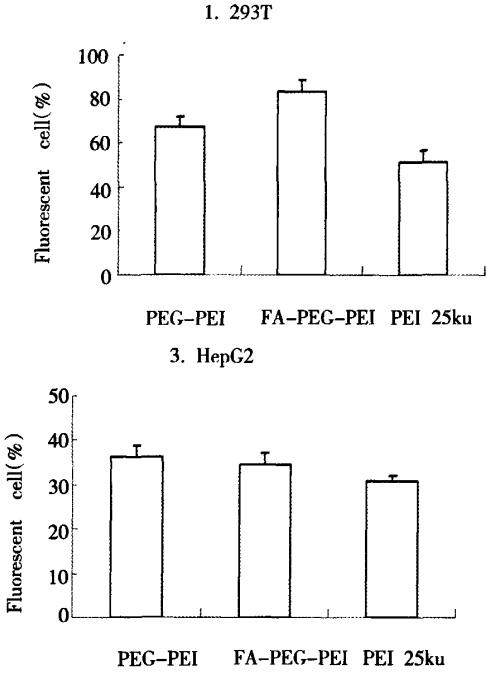


图6　复合物在N/P=15绿色荧光蛋白表达水平



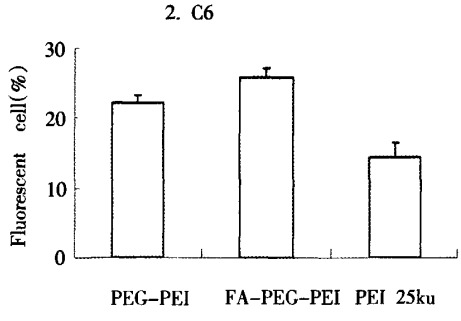


图7　复合物在N/P=15绿色荧光蛋白表达细胞比例

3　讨　论

安全高效的基因传输载体是实现基因治疗的关键之一。阳离子纳米材料易于合成和改性、无免疫原性等优点使其成为非病毒基因载体的一种重要类型;但由于其对细胞有正电荷相关的毒性、转染效率较病毒载体低、缺乏传输特异性等缺点制约了其在临床上的应用。本文从提高基因靶向转染效率出发,合成并体外检测了叶酸偶联聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺(FA-PEG-PEI)、单甲基醚聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺(PEG-PEI)的理化特性、毒性和靶向传输及转染能力。

粒径和zeta-电位是衡量复合物结合细胞的能力以及通过胞吞作用进入细胞的参数;FA-PEG-PEI与PEG-PEI复合pDNA后进行电位、粒度分析表明其带正电,粒径在200~300nm,而FA-PEG-PEI/pDNA粒径较小、电位较高,说明FA-PEG-PEI与质粒的结

合较PEG-PEI和PEI 25ku要好,更容易与细胞膜结合。

纳米材料载体和DNA通过静电作用结合后,其结合强度和结合效率,一般通过琼脂糖凝胶电泳来研究。FA-PEG-PEI和pDNA的完全结合在N/P比为5,PEI和PEG-PEI与pDNA的完全结合则出现在N/P比为10;所以FA-PEG-PEI作为转染试验需要在N/P≥5,而PEG-PEI则需要≥10,由此可以减少纳米材料的用量,以便减轻毒性。

基因载体的转染效率是和纳米材料载体或者复合体的细胞毒性相关的,如果复合物的毒性比较高,则相应的转染表达水平也要下降。MTT比色法是免疫学衡量细胞增值的经典方法,本实验采用了MTT比色法研究FA-PEG-PEI和PEG-PEI两种纳米材料载体复合pDNA后的细胞毒性,在3种细胞中,FA-PEG-PEI和PEG-PEI在所有的N/P范围内,细胞存活率都比PEI要高;在N/P<15时,FA-PEG-PEI细胞存活率和PEG-PEI的细胞存活率基本相当,达到92%,但N/P>15时,FA-PEG-PEI细胞存活率相对PEG-PEI下降,但比PEI高,从而说明合成的纳米材料在同样用量的时候毒性大大降低了。

为了衡量转染效果,纳米材料在不同的N/P比和表达荧光素酶的pGL3与表达绿色荧光蛋白的pAAV-EGFP复合后在C6、293T和HepG2 3种细胞中进行转染,分别采用荧光素酶基因表达水平方法和更直观的在荧光显微镜下观测以及流式细胞仪检测。在293T细胞中,FA-PEG-PEI/pGL3转染的荧光素酶基因表达水平比PEG-PEI和PEI 25ku都高,这是由于293T细胞是叶酸受体高度表达的,所以FA-PEG-PEI/pGL3传输转染时可以通过叶酸调节靶向而提高转染效果,使荧光素酶基因表达水平提高[20];在C6细胞中,FA-PEG-PEI的荧光素酶基因表达水平比另外两种载体的表达水平都高,这有可能是由于C6细胞的叶酸受体中度表达,FA-PEG-PEI/pGL3可以通过叶酸受体调节靶向而内吞进入细胞转染而使其效果好,故荧光素酶基因表达水平相对另外两种无叶酸配体来调节的复合物要高[21]。HepG2细胞则由于叶酸受体不表达,从其转染效果可以看出,FA-PEG-PEI/pGL3的萤光素酶基因表达水平甚至比PEG-PEI都低。荧光显微镜下观测以及流式细胞仪检测结果也证实了FA-PEG-PEI的转染效率最好。由此可以得出结论:FA-PEG-PEI可以作为C6和293T细胞基因靶向传输的载体。

总之,本研究明确了FA-PEG-PEI的基因转染效率及细胞毒性作用,为叶酸靶向基因治疗神经胶质瘤寻找行之有效的基因载体提供了理论和实践基础,可进一步用于动物体内进行联合基因治疗神经胶质瘤。

参 考 文 献

[1] Mulligan RC.The basic science of gene therapy[J]. Science,1993;260:926-932.

[2] Zabner J,Fasbender AJ,Moninger T,et al.Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid[J]. J Biol Chem,1995;270:18997-9007.

[3] Zhdanov RI,Kutsenko NG,Fedchenko VI.Nonviral methods of gene transfer in gene therapy[J]. Vopr Med Khim,1997;43(1):3-12.

[4] Godbey WT,Wu KK,Mikos AG.Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery[J]. J Control Release,1999;60(2-3):149-160.

[5] 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[J]. Pharm Res,1999;16(8):1273-1239.

[6] Boussif O,Lezoualc'h F,Zanta MA,et al.A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo:polyethylenimine[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1995;92(16):7297-7301.

[7] Fischer D,von Harpe A,Kunath K,et al.Copolymers of ethylene imine and N-(2-hydroxyethyl)-ethylene imine as tools to study effects of polymer structure on physicochemical and biological properties of DNA complexes[J]. Bioconjug Chem,2002;13:1124-1133.

[8] Nguyen HK. Evaluation of polyether-polyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents[J]. Gene Ther,2002;7(2):126-138.

[9] Ogris M,Brunner S,Schuller S,et al.PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes:reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery[J]. Gene Ther,1999;6(4):595-605

[10] Zalipsky S. Functionalized poly (ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates[J]. Bioconjug Chem,1995;6(2):150-165.

[11] Lee RJ,Huang L.Folate-targeted,anionic liposome-entrappedpolylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer[J]. J Biol Chem,1996;271(14):8481-8487.

[12] Gottschalk S,Cristiano RJ,Smith LC,et al.Folate receptor mediated DNA delivery into tumor cells:potosomal disruption results in enhanced gene expression[J]. Gene Ther,1994;1(3):185-191.

[13] Shiokawa T,Hattori Y,Kawano K,et al.Effect of polyethylene glycol linker chain length of folate-linked microemulsions loading aclacinomycin a on targeting ability and antitumor effect in vitro and in vivo[J]. Clin Cancer Res,2005;11(5):2018-2025.

[14] Saul JM,Annapragada A,Natarajan JV,et al.Controlled targeting of liposomal doxorubicin via the folate receptor in vitro[J]. J Control Rele

(下转第 22 页)

射外源性ANG后脑缺血大鼠脑内神经细胞凋亡数目未见显著性下降,可能与本研究中外源性ANG(rh ANG)的剂量、用药途径、样本量偏小及观察时间等有关。在今后的研究中可改变ANG用量及用药途径、增加样本量、采用不同时间点观察,对外源性ANG对脑缺血的作用进行进一步研究。

参 考 文 献

[1] 包俊敏,曹贵松,景在平.动脉注射血管生长素促进缺血肢体血管生长作用的研究[J].解放军医学杂志,2001;26(9):699-700.

[2] Kaya D,G ü rsoy-Ozdemir Y,Yemisci M,et al.VEGF protects brian against facal ischemia without increa sin g blood-brain permea bility when administered intracerebroventricularly[J]. J Cereb Blood Flow Metab,2005;25(9):1111-1118.

[3] Ay I,Sugimori H,Finklestein S.Intravenous basic fibrobalst growth factor(bFGF)decreases DNA fragmentation and prevents down regulation of Bcl-2 expression in the ischemic brain following middl e cerebral artery occlusion in rats[J].Mol Brain Res,2001;87(1):71-80.

[4] Moenner M,Gusse M,Hatzi E,et al. The widespread expression of angiogenin in different human cells suggests a bio log ical functio n not only related to angiogenesis[J]. Eur J Biochem,1994;226:483-490.

[5] Nagasawa H,Kogure K.Correlation between cerebral blood flow and histo log ic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J].Stroke,1989;20:1037-1047.

[6] Longa EZ,Weinstein PR,Carlson S,et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989;20(1):84-91.

[7] 章军建,阮旭中,张苏明.大鼠局灶性脑缺血模型缺血半暗带的定位研究[J]. 中国临床神经科学,2000;8(3):159-161.

[8] 楼 敏,刘建仁,黄鉴政.地塞米松对大鼠脑缺血再灌注后神经元凋亡的影响[J]. 浙江医学,2001;23(9):529-531.

[9] Krupinski J,Kaluza J,Kumar P,et al.Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke[J]. Stroke,1994;25:1794-1798.

[10] Bellomo M,Adamo EB,Deodato B,et al.Enhancement of expres sion of vascular endothelial growth factor after adeno-associated virus gene transfer is associated with improvement of brain ischemia injury in the gerbil[J]. Pharmacol Res,2003;48:309-317.

[11] 李志刚,梅 举,张宝仁.携带Ad.ANG的骨髓基质细胞移植于缺血心肌的试验研究[J]. 中华胸心血管外科杂志,2003;19(1):43-46.

(上接第 19 页)

ase,2003;92(1-2):49-67.

[15] Bettio F,Canevari M,Marzano C,et al.Synthesis and biological in vitro evaluation of novel PEG-psoralen conjugates[J]. Biomacromo lecules,2006;7(12):3534-2541.

[16] Shuai XT,Merdan T,Unger F,et al.Supramolecular gene delive ry vectors showing enhanced transgene expression and good biocomp atibility[J]. Bioconjug Chem,2005;16(2):322-329.

[17] Shuai XT,Merdan T,Unger F,et al.Novel biodegradable terna ry copolymers hy-PEI-g-PCL-b-PEG:synthesis, characterization,and potential as efficient nonviral gene delivery vectors[J]. Macromolecu les,2003;36:5751-5759.

[18] Needham D,McIntosh TJ,Lasic DD Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes[J]. Biochim Bio phys Acta,1992;1108(1):40-48.

[19] Petersen H,Merdan T,Kunath K,et al.Poly (ethylenimine-co-L-lactamide-co-succinamide):a biodegradable polyethylenimine deriva tive with an advantageous pH-dependent hydrolytic degradation for gene delivery[J]. Bioconjug Chem,2002;13(4):812-821.

[20] Singh AK,Kasinath BS,Lewis EJ.Interaction of polycations with cell-surface negative charges of epithelial cells[J]. Biochim Biophys Acta,1992;1120(3):337-342.

[21] Chul CK,Hoon JJ,Jung Chung,et al.Folate receptor-me diated intracellular delivery of recombinant caspase-3 for inducing apoptosis [J]. J control Release,2005;108(1):121-131.

第九届全国神经生化会议将于
2009 年 5 月在湖南长沙举行,欢迎届时参加!