

精氨酸修饰壳聚糖提高基因转染效率的研究

朱敦皖 张海玲 柏金根 刘文广 冷希岗 宋存先 杨健 李晓卫
金旭 宋丽萍 刘兰霞 李秀兰 张杨 姚康德*

(天津大学高分子材料研究所, 天津 300072; 中国医学科学院生物医学工程研究所, 天津市生物医学材料重点实验室, 天津 300192; 天津医院, 天津 300211. * 联系人, E-mail: ripm@tju.edu.cn)

摘要 富精氨酸短肽由于其独特的内在化机理而受到了广泛的关注. 研究结果表明, 精氨酸和胍基能有效转运穿透细胞膜, 在细胞穿膜过程中扮演非常重要的角色. 本文将精氨酸接枝到壳聚糖上制备了一种新型的壳聚糖衍生物——精氨酸修饰的壳聚糖(Arg-CS), 并用复凝聚的方法制备了Arg-CS/DNA纳米复合物. 对Arg-CS及Arg-CS/DNA复合物的物理化学性质进行了表征, 并以HeLa细胞为宿主细胞研究了Arg-CS/DNA复合物的转染行为和效率. Arg-CS介导的荧光素酶质粒的表达较壳聚糖介导的荧光素酶的表达提高了大约 100 倍, 而MTT实验表明, Arg-CS及其与DNA复合物在整个实验浓度范围内细胞毒性均很小, Arg-CS有望成为一种高效、安全的壳聚糖基非病毒载体.

关键词 壳聚糖 精氨酸修饰的壳聚糖 非病毒载体 富精氨酸短肽 基因释放系统

基因治疗通过将外源基因导入到靶细胞核内以修复或置换导致疾病的缺陷基因, 为先天和后天的基因缺陷疾病提供了新的治疗方法^[1~3]. 寻求合适的载体将治疗基因导入到靶细胞内无疑成为基因治疗成功与否的关键所在. 由于具有安全性好、免疫原性低、毒性低、携带基因能力强及费用低等优点, 非病毒载体, 如脂质体^[4,5]、聚L-赖氨酸^[6]、聚乙烯亚胺(PEI)^[7,8]、聚酰胺-胺型树状高分子^[9,10]、明胶^[11]和壳聚糖^[12,13]等, 受到了越来越多的关注. 然而, 非病毒载体的基因转染效率与病毒载体相比还有一定的差距, 成为制约其在实际临床应用中的瓶颈^[14,15]. 开发高效、安全的非病毒载体已成为基因治疗的热门研究内容之一.

壳聚糖是一种可生物降解、生物相容性良好、无毒的天然多糖, 由 $\beta(1,4)$ 糖苷键连接D-氨基葡萄糖和N-乙酰-D-氨基葡萄糖这两个基本单元结构而成^[16]. 在低pH条件下, 壳聚糖的伯胺可发生质子化, 质子化后的壳聚糖与带负电的DNA形成聚电解质复合物, 从而有效地保护DNA免受DNA酶的降解^[17,18]. 自从Mumper等人^[19]首次将壳聚糖用作非病毒载体以来, 很多研究组对壳聚糖基非病毒载体的研究做了大量的工作. Park等人^[20]开发了半乳糖化壳聚糖接枝聚乙二醇(GCP)非病毒基因载体. 壳聚糖半乳糖化以提供载体识别肝细胞的靶向性, 接枝聚乙二醇以增强复

合物在水中的稳定性. 由于亲水性PEG的保护, DNA-GCP复合物更加稳定, 可以免受细胞质中酶的降解. 同时, GCP具有较小的尺寸(100 nm), 且GCP-DNA复合物仅仅转染具有脱唾液酸糖蛋白受体的HepG2 细胞, 说明半乳糖化的壳聚糖可以用作肝细胞靶向的基因载体. 本课题组^[21,22]发现十二烷基壳聚糖能提高DNA的热稳定性并保护DNA免受DNA酶的降解. Kim等人^[23]开发了脱氧胆酸修饰的壳聚糖载体. Kiang等人^[24]考察了壳聚糖的脱乙酰度对基因转染效率的影响, 发现在血清条件下, 随着脱乙酰度的降低基因转染效率也随之降低, 这可能与复合物的稳定性下降有关.

为提高非病毒载体的转染效率, 人们尝试了很多方法, 如连接细胞特异性配体和细胞穿透肽(CPPs)、TAT衍生多肽或者寡肽. 细胞穿透肽通常指具有穿透细胞膜并转运药物到细胞内能力的一类短肽, 常少于 30 个氨基酸残基, 如HIV-1 病毒反式激活蛋白(Tat)衍生的肽段^[25]、果蝇触角足转录因子的同源异构结构域^[26]、单纯疱疹病毒 1 型VP22 转录因子^[27]. 这些肽段有个共同的特点就是都富含精氨酸残基. 1997 年, Vives等人^[28]报道了Tat蛋白的富精氨酸片段(位点 48~60, GRKKRRQRRPPQ)在转运过程中起着非常关键的作用, 其中 13 个氨基酸残基中包含了 6 个精氨酸残基. VP22, 34 个氨基酸残基中包含 9

个精氨酸(位点 267~300), 其独特的性质使其在体外培养和体内的情况下均能从感染的细胞转运到非感染的细胞. 如果将其他蛋白结合到VP22 上, 它也能成功地将其他的蛋白递送到细胞内^[29]. Penetratin, 源于触角足同源异构结构域的第三螺旋(位点 43~58), 16个氨基酸残基中包含3个精氨酸残基, 能有效地穿透质膜并且与温度无关^[30]. 虽然许多现象暗示富精氨酸短肽能有效地提高转染效率, 但富精氨酸短肽介导基因转染的机理依然不大清楚, 明显有别于受体介导的内吞机制^[31].

目前, 探讨精氨酸对壳聚糖/DNA复合物的物理化学性质和基因转染效率的影响还未见文献报道. 在壳聚糖上引入亲水性且富含伯胺的精氨酸, 不会降低壳聚糖的电荷密度进而影响壳聚糖的水溶性. 我们前期的工作表明, 精氨酸修饰的壳聚糖表现出良好的抗凝血性能^[32], 这对于非病毒载体在体内进行基因转染时非常重要. 本文将精氨酸接枝到壳聚糖上, 用多种方法研究了精氨酸修饰的壳聚糖及其与DNA的相互作用, 考察了Arg-CS对细胞的毒性及作为非病毒载体转染细胞的可行性.

1 材料和方法

() 材料. 壳聚糖(CS)(分子量 50 kDa, 脱乙酰度 82%) 购自青岛海汇生物技术公司. L-精氨酸, 溴化乙锭, 胰蛋白酶, TEMED, 聚乙烯亚胺(PEI, 枝状, 25 kD), 卡那霉素, 1-乙基-3(3-二甲胺丙基)碳二亚胺(EDC)和 N-羟基-丁二酰亚胺(NHS)购自 Sigma 公司. RPMI 1640 培养基, 胎牛血清购自 Gibco 公司. pGL3-Control (5.3 kb)质粒, 荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司. 去内毒素核酸提取试剂盒购自 Qiagen 公司. BCA 蛋白检测试剂盒购自 Pierce 公司.

() 精氨酸修饰壳聚糖(Arg-CS)的制备. 以 EDC和NHS为偶联剂, 对壳聚糖进行精氨酸化修饰^[32]. 0.5 g壳聚糖溶于pH 4.5~5.0 的TEMED/HCl缓冲溶液中, 然后加入一定量的EDC和NHS偶联剂, 搅拌均匀后, 再加入壳聚糖氨基摩尔量 50%的精氨酸, 在磁力搅拌下室温连续反应 6~10 h, 然后经脱盐水透析和冷冻干燥处理得到最终产品——精氨酸修饰的壳聚糖.

() Arg-CS/DNA复合物的制备. 用复凝聚的方法制备Arg-CS/DNA纳米复合物^[33]. 将Arg-CS溶于pH为 5.5 的NaAc/HAc缓冲液中至浓度为 0.02% (w/w), 过滤灭菌后置于 4℃ 冰箱保存. DNA溶于 5

mmol/L NaCl溶液中. 根据所要制备纳米复合物的正负电荷比(+/-)的不同, 分别取所需精氨酸修饰的壳聚糖和DNA溶液并在 55℃ 的水浴锅中加热 10 min, 然后将二者快速混合, 用高速匀浆机搅拌 40 s, 制备的复合物置于 4℃ 冰箱保存待用.

() 傅里叶变换红外光谱(FTIR). 将壳聚糖、精氨酸以及 Arg-CS 分别经 KBr 压片后在 Bio-Rad FTS135 傅里叶红外光谱仪上测试.

() ¹³C 核磁共振. 将一定量的壳聚糖、精氨酸以及 Arg-CS 分别溶解在 D₂O/H₂O(1:1, V/V)的溶剂中, 在 Varian UNITY plus 400 核磁共振谱仪上记录 ¹³C-NMR 谱.

() 琼脂糖凝胶电泳阻滞实验. 10 μL 不同电荷比的壳聚糖/DNA 复合物和 Arg-CS/DNA 复合物在 DYY-2 型电泳仪上观测电泳条带. 电泳条件为: 0.8%琼脂糖凝胶, 电泳缓冲液为 1× ATE, 电压为 60 V, 时间为 40 min.

() 动态光散射. 在室温和 90°固定角条件下, 运用 Brookhaven BI-9000AT 激光光散射仪来检测不同电荷比壳聚糖/DNA 和 Arg-CS/DNA 复合物的粒径大小和粒径分布. 为避免灰尘对测量结果的影响, 复合物溶液经 0.45 μm 滤器过滤后再上机检测. 每个样品重复检测 3 次.

() 原子力显微镜(AFM)观察. 借助原子力显微镜(Nanoscope IV Bioscopet, Digital Instruments, Veeco)来观察 Arg-CS/DNA 复合物的尺寸大小和表面形态. 在新剥离的云母片上滴加 1~2 μL Arg-CS/DNA 纳米复合物, 室温干燥后放入洁净的玻璃平皿中待测.

() MTT 实验. 以 1×10^4 细胞/孔的密度将 HeLa 细胞接种到 96 孔板中, 在 37℃, 5%CO₂ 条件下孵育 24 h 后分别加入 20 μL 终浓度分别为 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μg/mL 的壳聚糖, Arg-CS, PEI 溶液. 培养 24 h 后, 每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μL, 37℃ 继续孵育 4 h, 终止培养, 小心吸取孔内培养上清液后, 每孔加入 150 μL DMSO, 在 37℃ 继续孵育 30 min. 选择 570 nm 波长, 在 Spectramax plus 384 紫外分光光度计上测定各孔吸光值, 检测前自动混匀 300 s. 细胞活性的表达结果为: 细胞存活率(%) = $A_{570}(\text{sample}) / A_{570}(\text{control}) \times 100$, 其中 $A_{570}(\text{sample})$ 为聚合物及其复合物加入的孔的吸光值, $A_{570}(\text{control})$ 为只含培养基的孔的吸光值. 聚合物/DNA 复合物(1 μg DNA/孔)对细胞的

毒性同样按照上述的方法进行检测。

() 细胞转染实验. 以 5×10^4 细胞/孔的密度将 HeLa 细胞接种到 24 孔板中, 在 37 , 5%CO₂ 条件下孵育 18~24 h 后至细胞融合度为 60%~80%. 转染前 2 h, 将完全培养基吸去, 用 D-Hanks 洗涤两次, 加入 500 μ L pH 分别为 6.0, 6.2, 6.5, 6.8, 7.0, 7.2, 7.5, 7.8 的无血清培养基(pH 用 5% NaHCO₃ 或者 1 mol/L HCl 调节). 加入不同电荷比的聚合物/DNA 复合物(每孔含 1 μ g DNA)孵育 5 h 后, 将无血清培养基换成完全培养基. 48 h 后, 按照试剂盒所提供的说明书在 TD- 20/20ⁿ 化学发光仪上检测光子的强度. 用 BCA 检测出总蛋白的浓度, 从而将结果统一标准化成 RLU/mg 蛋白(每毫克蛋白所对应的相对光子数)^[34].

2 结果和讨论

2.1 FTIR 和 NMR 光谱分析

在精氨酸与壳聚糖反应过程中, 精氨酸可发生分子间反应, 故用截留分子量为 8000 的透析袋将未反应的反应物和副产物透析除去. 图 1 为壳聚糖、精氨酸、精氨酸修饰壳聚糖的红外光谱图. 在壳聚糖的红外谱图中, 1657 cm⁻¹ 出现了壳聚糖 C=O 酰基的弯曲振动带, 1564 cm⁻¹ 的振动带归属于壳聚糖酰胺键的不对称伸缩振动, 壳聚糖吡喃环上的 C—O 伸缩振动带出现在 1089~1031 cm⁻¹; 在精氨酸的红外谱图中, 1630 cm⁻¹ 处的峰归属于精氨酸的胍基, 1419 cm⁻¹ 处的吸收带属于羧基 COO—的对称伸缩振动, 1136 和 772 cm⁻¹ 分别属于 C—C—N 键的非对称伸缩振动和羧基 COO—的弯曲振动. 在 Arg-CS 的红外谱图中,

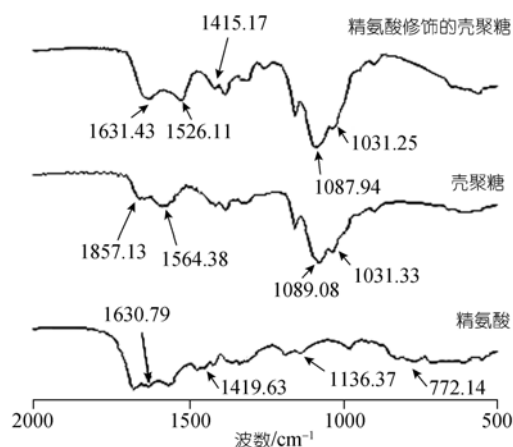


图 1 精氨酸、壳聚糖及精氨酸修饰的壳聚糖的红外光谱

1631 和 1415 cm⁻¹ 处出现了精氨酸的特征峰, 同时也出现了壳聚糖吡喃环的特征伸缩振动带, 在 1526 cm⁻¹ 出现的吸收峰归属于由壳聚糖和精氨酸相互反应生成的酰胺键. 核磁共振谱图进一步证实了精氨酸已经结合到了壳聚糖上^[32]. 根据元素分析结果估算出精氨酸对壳聚糖的取代度为 6.8%(数据未给出).

2.2 凝胶阻滞实验分析

用琼脂糖凝胶电泳来考察不同配比 Arg-CS/DNA 复合物中 DNA 的迁移能力, 可以反映 Arg-CS 与 DNA 之间的静电相互作用与结合状态. 如图 2 所示, 在低 N/P 比(小于 2:1)时, 可以观察到未被完全包覆的裸 DNA 发生迁移, 但随着电荷比的增加, 未被包覆的 DNA 的量逐渐减少. 当电荷比大于或等于 2:1 时, Arg-CS 能完全阻滞 DNA 的迁移, 表明所有的 DNA 均已被 Arg-CS 完全包覆. 与 Arg-CS 相比, 壳聚糖需要在电荷比为 4:1 时才能开始完全包覆住 DNA, 说明 Arg-CS 包覆 DNA 的能力比壳聚糖要强一些, 可以认为精氨酸修饰的壳聚糖的正电荷密度较壳聚糖有所提高, 从而增强了与 DNA 的静电相互作用.

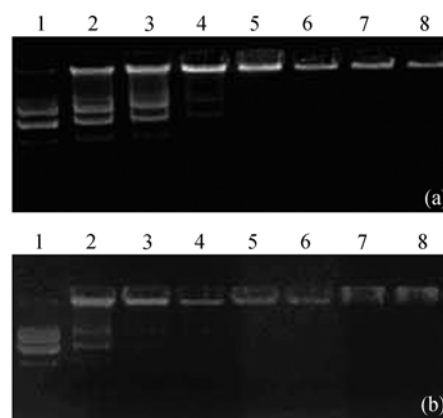


图 2 壳聚糖/DNA 复合物(a)及精氨酸修饰的壳聚糖/DNA 复合物(b)的凝胶电泳图

条带 1, 质粒 DNA; 条带 2(+/-), 1:4; 条带 3, 1:2; 条带 4, 1:1; 条带 5, 2:1; 条带 6, 4:1; 条带 7, 8:1; 条带 8, 10:1

2.3 动态光散射分析

基因释放系统的尺寸和形状对外源基因转运到靶细胞和治疗基因的表达非常重要, 因此非常有必要获取相关的信息. 动态光散射为研究非病毒载体/DNA 复合物的尺寸与分布的提供了有效的方法. 图 3(b)为光子相关光谱检测的不同电荷比精氨酸修饰的壳聚糖与 DNA 所形成复合物的平均粒径, 当 N/P

为 2:1, 4:1, 8:1, 10:1 时, 复合物的平均粒径分别为 126.1, 118.9, 179, 174.9 nm, 均为纳米级尺寸. 当电荷比从 2:1 增加到 4:1 时, 正电荷密度的增加使得载体与 DNA 之间的静电相互作用增强, 促使 DNA 进一步被浓缩, 复合物的平均粒径相应减小, 粒子的平均粒径从 126 nm 减小到 119 nm; 当电荷比进一步升高以后, 粒子表面的正电荷密度相应提高, 使得富余的正电荷之间的排斥作用成为主导因素, 斥力的增加使得复合物的平均粒径依次增加. 图 3(a) 为光子相关光谱检测的不同电荷比的壳聚糖/DNA 复合物的平均粒径. 当电荷比从 1:1 增加到 4:1 时, 复合物粒径从 123 nm 减小到 100 nm, 电荷比高于 4:1 继续增加时, 复合物粒径也相应地增大. 在 pH 为 6.8 的介质中, 壳聚糖/DNA 复合物(N/P=4:1, 8:1)的 zeta 电位大约分别为 3.3 mV 和 3.5 mV, 而 Arg-CS/DNA 复合物(N/P=4:1, 8:1)的 zeta 电位大约分别为 6.3 mV 和 10.8 mV (数据未提供). 由此可见, 壳聚糖及其衍生物与 DNA 形成的复合物的粒径大小和 zeta 电位均适于复合物进入细胞内.

2.4 原子力显微镜观察

原子力显微镜可用来有效地观测复合物的尺寸大小和表面形态. 与透射电子显微镜相比, 原子力显微镜可在多种模式下, 不需要对样品进行染色或增强背景的情况下观察复杂的表面. 图 4(b) 所示为原子力显微镜下 N/P 为 2:1 时 Arg-CS/DNA 纳米复合物的表面形态. 从图中我们可以看到, 在 N/P 为 2:1 时, 精氨酸修饰的壳聚糖可非常有效地将 DNA 完全包覆并形成了类似球形的纳米复合物, 复合物的尺寸分布比较均匀, 大多在 100~180 nm 之间, 这与我们用

透射电子显微镜和光子相关光谱检测的结果基本吻合. 与壳聚糖/DNA 复合物的原子力显微镜图(图 4(a), N/P = 4:1)相比, 精氨酸修饰的壳聚糖与 DNA 可形成更加紧凑的结构, 这可能是由于精氨酸修饰的壳聚糖与 DNA 之间的静电相互作用更加强烈的原因.

2.5 细胞毒性评价

加入 1~50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的载体 24 h 后, 用 MTT 比色实验来评价壳聚糖及其衍生物对 HeLa 细胞的毒性. 图 5 为加入不同浓度的壳聚糖和 Arg-CS 对 HeLa 细胞存活率的影响. 当壳聚糖及 Arg-CS 的浓度在 1~50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, HeLa 细胞的存活率没有显著的差别, 均高于 90%. 当与 DNA 复合后, 同样得到类似的结果. 然而, PEI 的细胞毒性随着浓度的提高而增加, 在 HeLa 细胞中加入 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 PEI 后, 细胞的存活率降至 37%. 当与 DNA 复合后, PEI/DNA 复合物和 Arg-CS/DNA 复合物的细胞毒性均有一定程度的降低. 阳离子载体所带的正电荷部分被带负电的质粒 DNA 所平衡而导致构象发生变化, 复合物的毒性要相应地低于其载体本身所产生的细胞毒性. 由此可见, 精氨酸修饰的壳聚糖有望作为毒性小、生物相容性好、安全的基因载体.

2.6 细胞转染实验

要有效、顺利地将基因递送到靶向位点, 需要克服许多障碍, 这些障碍主要包括: 靶向细胞的定位、转运通过细胞膜、被内涵体吞噬、从溶酶体中逃逸出来、进入细胞核以及表达出治疗蛋白等. 对于壳聚糖基因递送系统来说, 很多因素都会影响壳聚糖/DNA 复合物的转染效率, 诸如壳聚糖的分子量, 脱乙酰度, 电荷比, pH, 血清浓度等. 壳聚糖的分子量和脱乙酰

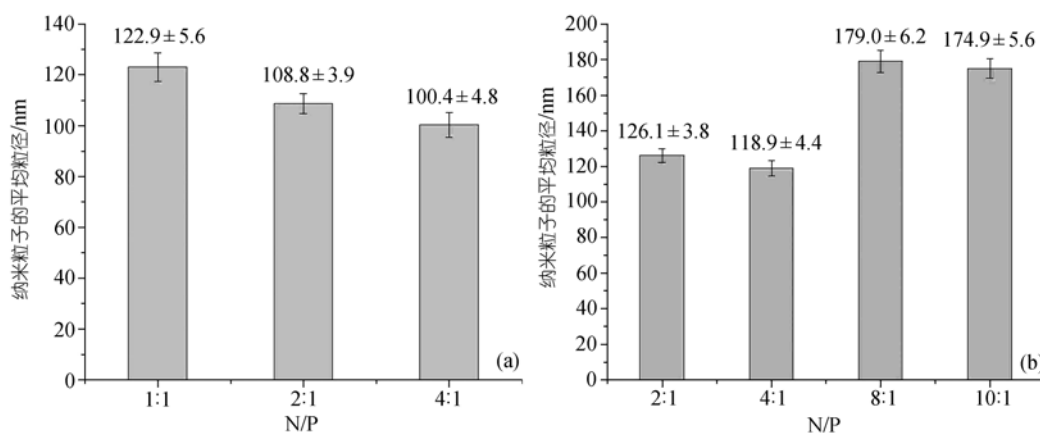


图3 不同电荷比的壳聚糖/DNA 复合物(a)及精氨酸修饰的壳聚糖/DNA 复合物(b)的平均粒径

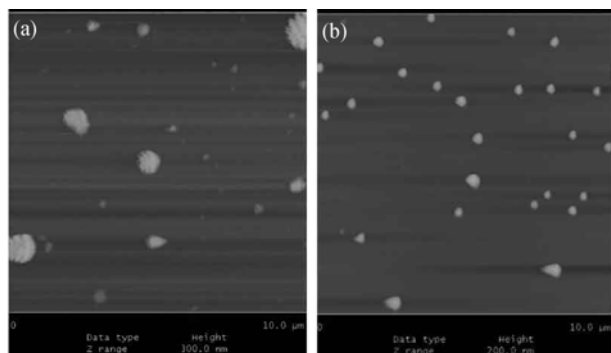


图 4 壳聚糖/DNA 复合物(N/P=4:1)(a)及精氨酸修饰的壳聚糖/DNA 复合物(N/P=2:1)(b)的 AFM 图像

度对转染效率的影响已有文献报道 [24,35,36], 本文主要考察电荷比和 pH 对壳聚糖/DNA 和精氨酸修饰的壳聚糖/DNA 复合物转染效率的影响。

本文以荧光素酶载体 pGL3-control 为报告基因来考察 Arg-CS/DNA 复合物在不同 pH 和不同电荷比下基因转染的情况(图 6(b)). 从图中可以看出, 荧光素酶表达量先随着电荷比的升高而增加, 在电荷比为 2:1 时达到最大值(接近于 PEI 的转染效率), 但电荷比进一步升高时荧光素酶表达量反而有所降低。这种现象可以解释为在低电荷比情况下, 载体不能有效地包覆 DNA 而导致部分 DNA 受到 DNA 酶的降

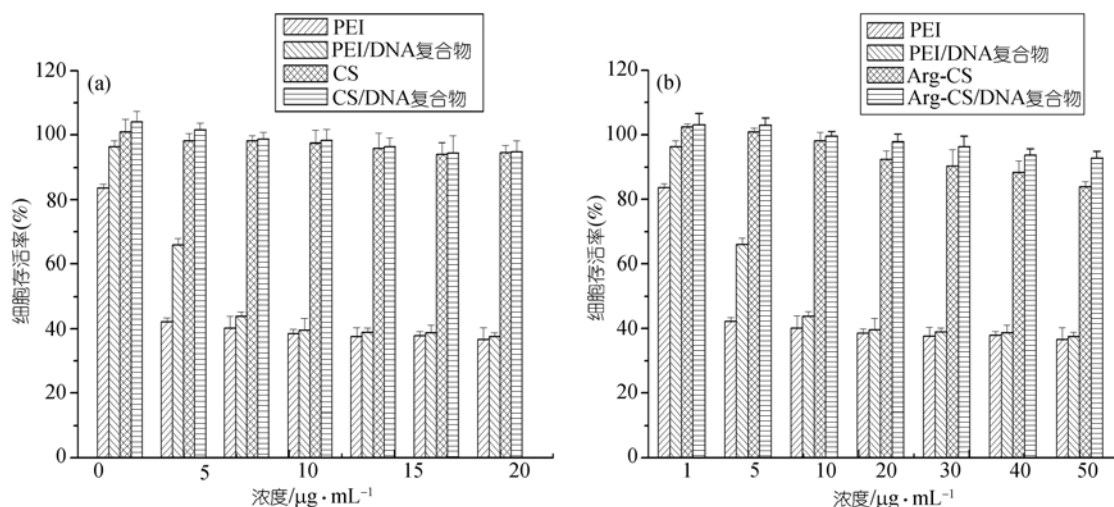


图 5 壳聚糖及其与 DNA 的复合物(a)与 Arg-CS 及其与 DNA 的复合物(b)对 HeLa 细胞存活率的影响

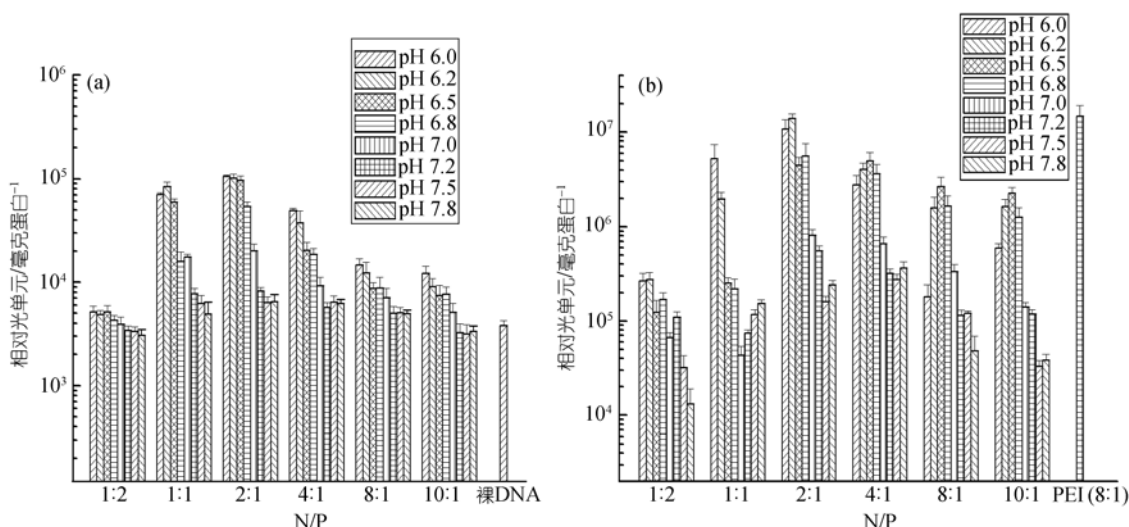


图 6 不同电荷比和不同 pH 条件下, 壳聚糖/DNA 复合物(a)及精氨酸修饰的壳聚糖/DNA 复合物(b)转染荧光素酶质粒的表达量($P < 0.05$)

解,而电荷比太高时,载体与DNA的静电相互作用太强,DNA进入细胞后不能从复合物中适时解离出来进入细胞核,从而影响了目的基因的表达.在相同条件下,Arg-CS介导基因转染表达的荧光素酶的量大约比未修饰的壳聚糖提高了100倍左右.

培养基的pH对壳聚糖的基因转染行为有很大的影响,我们考察了不同pH对Arg-CS/DNA复合物转染行为的影响.从图6可以看出,Arg-CS/DNA和壳聚糖/DNA复合物的转染效率与pH密切相关.通常,在低pH(6.0~6.8)条件下转染效率比高pH(7.0~7.8)条件下要高,并随着pH的升高而降低.在同一pH条件下,壳聚糖/DNA和Arg-CS/DNA复合物均在电荷比为2:1时获得最高的转染效率.低pH时的转染效率较高可能与壳聚糖的 pK_a (大约6.5)有关,因为在 pK_a 附近有利于壳聚糖质子化.

精氨酸修饰壳聚糖后引入了胍基官能团,而精氨酸和胍基官能团被发现能有效穿透细胞膜^[37].含有胍基官能团的多肽,如Tat肽段(48~60),7个精氨酸的肽段,肽核酸和氨基糖甙,都表现出很强的跨膜能力.虽然侧链上的亚甲基的长度对跨膜能力没有影响,但若把含有胍基的精氨酸替换成含有尿素的瓜氨酸后,这些肽的细胞膜穿透能力完全消失了^[38],这说明具有胍基活性基团的精氨酸修饰壳聚糖可能在DNA转运到细胞内的过程发挥着非常重要的作用.胍基与RNA上的磷酸和脂双分子层的磷脂均可以形成氢键^[39].氢键的形成以及胍基的强碱性($pK_a \sim 12.5$)在控制细胞膜转运过程中起着非常重要的作用,并促进了荧光素酶的表达.此外,细胞摄取实验证明,转染后4 h内细胞对Arg-CS/DNA复合物的摄入量明显高于壳聚糖/DNA复合物,这可能与Arg-CS/DNA复合物zeta电位的提高有关,从而加剧了对细胞膜的扰动^[40].

3 结论

精氨酸修饰的壳聚糖与DNA能形成利于基因转染的聚电解质复合物,与壳聚糖相比较,精氨酸修饰的壳聚糖对HeLa细胞的荧光素酶的表达量提高了大约100倍,精氨酸的胍基可能在细胞膜的穿过程中起着非常重要的作用,促进了外源基因的表达.寡精氨酸和富精氨酸短肽的转运机制目前还不清楚,既不能用吸附性内吞,也不能用受体介导的内吞作用解释.本课题组对精氨酸促进壳聚糖基因转染的机

理和体内的转染效率正在进行更深入的研究.

参 考 文 献

- 1 Jin H, Kim T H, Hwang S K, et al. Aerosol delivery of urocanic acid-modified chitosan/programmed cell death 4 complex regulated apoptosis, cell cycle, and angiogenesis in lungs of K-ras null mice. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(4):1041—1049[DOI]
- 2 Blau H, Khavari P. Gene therapy: Progress, problems, prospects. *Nat Med*, 1997, 3(6): 612—613[DOI]
- 3 Curriel D T, Gerritsen W R, Krul M R. Progress in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(8): 1197—1199
- 4 Gao X, Huang L. Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry*, 1996, 35(3): 1027—1036[DOI]
- 5 Audouy S A, Leij L F, Hoekstra D, et al. In vivo characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy. *Pharm Res*, 2002, 19(11): 1599—1605[DOI]
- 6 Choi Y H, Liu F, Park J S, et al. Lactose-poly(ethylene glycol)-grafted poly-L-lysine as hepatoma cell-targeted gene carrier. *Bioconjug Chem*, 1998, 9(6): 708—718[DOI]
- 7 Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, et al. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 60(2): 247—266[DOI]
- 8 Boussif O, Lezoualch F, Zanta M A, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(16): 7297—7301[DOI]
- 9 Zhang X Q, Wang X L, Huang S W, et al. In vitro gene delivery using polyamidoamine dendrimers with a trimesyl core. *Biomacromolecules*, 2005, 6(1): 341—350[DOI]
- 10 Braun C S, Vetro J A, Tomalia D A, et al. Structure/function relationships of polyamidoamine/DNA dendrimers as gene delivery vehicles. *J Pharm Sci*, 2005, 94(2): 423—436[DOI]
- 11 Truong-Le V L, August J T, Leong K W. Controlled gene delivery by DNA-gelatin nanospheres. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(12): 1709—1717
- 12 Liu W G, Yao K D. Chitosan and its derivatives—a promising non-viral vector for gene transfection. *J Contr Rel*, 2002, 83(1): 1—11[DOI]
- 13 Liu W G, Sun S J, Cao Z Q, et al. An investigation on the physico-chemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes. *Biomaterials*, 2005, 26(15): 2705—2711[DOI]
- 14 Leong K W, Mao H Q, Truong-Le V L, et al. DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *J Contr Rel*, 1998, 53(1-3): 183—193[DOI]
- 15 Garnett M C. Gene-delivery systems using cationic polymers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1999, 16(2): 147—207
- 16 Erbacher P, Zou S, Bettinger T, et al. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: Biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res*, 1998, 15(9): 1332—1339
- 17 MacLaughlin F C, Mumper R J, Wang J, et al. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *J Contr Rel*, 1998, 56(1-3): 259—272[DOI]
- 18 Richardson S C, Kolbe H V, Duncan R. Potential of low molecular

- mass chitosan as a DNA delivery system: Biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *Int J Pharm*, 1999, 178(2): 231—243[DOI]
- 19 Mumper R J, Wang J, Claspell J M, et al. Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. *Proc Intl Symp Contr Rel Bioact Mater*, 1995, 22: 178—179
- 20 Park I K, Kim T H, Park Y H, et al. Galactosylated chitosan-graft-poly(ethylene glycol) as hepatocyte-targeting DNA carrier. *J Contr Rel*, 2001, 76(3): 349—362[DOI]
- 21 Liu W G, Zhang X, Sun S J, et al. N-alkylated chitosan as a potential nonviral vector for gene transfection. *Bioconj Chem*, 2003, 14(4): 782—789[DOI]
- 22 Li F, Liu W G, Yao K D. Preparation of oxidized glucose-crosslinked N-alkylated chitosan membrane and in vitro studies of pH-sensitive drug delivery behaviour. *Biomaterials*, 2002, 23(2): 343—347[DOI]
- 23 Kim Y H, Gihm S H, Park C R, et al. Structural characteristics of size-controlled self-aggregates of deoxycholic acid-modified chitosan and their application as a DNA delivery carrier. *Bioconj Chem*, 2001, 12(6): 932—938[DOI]
- 24 Kiang T, Wen J, Lim H W, et al. The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials*, 2004, 25(22): 5293—5301[DOI]
- 25 Becker H M, McAllister S S, Dowdy S F. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods*, 2001, 24(3): 247—256[DOI]
- 26 Derossi D, Joliot A H, Chassaing G, et al. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*, 1994, 269(14): 10444—10450
- 27 Phelan A, Elliott G, O'Hare P. Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat Biotech*, 1998, 16(5): 440—443[DOI]
- 28 Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 1997, 272(25): 16010—16017[DOI]
- 29 Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, 1997, 88(2): 223—233[DOI]
- 30 Derossi D, Chassaing G, Prochiantz A. Trojan peptides: The penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol*, 1998, 8(2): 84—87
- 31 Brooks H, Lebleu B, Vives E. Tat peptide-mediated cellular delivery: Back to basics. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(4): 559—577[DOI]
- 32 Liu W G, Zhang J R, Cao Z Q, et al. A chitosan-arginine conjugate as a novel anticoagulation biomaterial. *J Mater Sci Mater Med*, 2004, 15(11): 1199—1203[DOI]
- 33 Mao H Q, Roy K, Troung-Le V L, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: Synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Contr Rel*, 2001, 70(3): 399—421[DOI]
- 34 Smith P K, Krohn R I, Hermanson G T, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985, 150(1): 76—85[DOI]
- 35 Lavertu M, Methot S, Tran-Khanh N, et al. High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 2006, 27(27): 4815—4824[DOI]
- 36 Bozkir A, Saka O M. Chitosan nanoparticles for plasmid DNA delivery: Effect of chitosan molecular structure on formulation and release characteristics. *Drug Deliv*, 2004, 11(2): 107—112[DOI]
- 37 Umezawa N, Gelman M A, Haigis M C, et al. Translocation of a beta-peptide across cell membranes. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(3): 368—369[DOI]
- 38 Mitchell D J, Kim D T, Steinman L, et al. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res*, 2000, 56(5): 318—325[DOI]
- 39 Calnan B J, Tidor B, Biancalana S, et al. Arginine-mediated RNA recognition: The arginine fork. *Science*, 1991, 252(5010): 1167—1171[DOI]
- 40 张海玲, 朱敦皖, 杨健, 等. 壳聚糖修饰对细胞摄取和细胞毒性的影响. *中国医学科学院学报*, 2006, 29(4): 486—491