论文

PEI 基因载体靶向遮蔽体系的制备和表征

林琳^①, 田华雨^①, 夏加亮^{①②}, 焦自学^①, 董璇^{①②}, 陈学思^{①*}^① 中国科学院长春应用化学研究所, 生态环境高分子材料重点实验室, 长春 130022^② 中国科学院研究生院, 北京 100049

*通讯作者, E-mail: xschen@ciac.jl.cn

收稿日期: 2010-09-30; 接受日期: 2010-10-20

doi: 10.1360/032010-700

摘要 将 RGD 短肽接枝到聚谷氨酸(PGA)上, 制备了一种靶向性的基因载体遮蔽材料 PGA-RGD. 通过凝胶电泳实验及体外转染实验证明得出 RGD 的引入增加了载体材料与细胞表面受体的特异性作用, 在载体表面正电荷得到遮蔽的同时, 转染效率还得到了一定程度的增加. 同时, 对转染了 48 h 的三元复合物进行 MTT 细胞毒性测试表明, PGA 遮蔽的基因载体体系(PGA/PEI/DNA)和 PGA-RGD 遮蔽的基因载体体系(PGA-RGD/PEI/DNA)的细胞毒性均低于 PEI/DNA 复合物体系. 本文开发的基因载体改性方法不仅可以对复合物颗粒表面的正电荷进行遮蔽, 从而降低复合物体系对非目标组织的非特异性作用; 同时引入的 RGD 靶向短肽还可以提高载体的靶向性, 这一改性策略对推动阳离子聚合物基因载体在体内的应用具有重要意义.

关键词

PEI

基因载体
遮蔽体系
靶向作用
聚谷氨酸

1 引言

近年来, 在基因治疗中, 由于病毒载体存在着诸多缺陷^[1], 非病毒载体如阳离子脂质体和阳离子共聚物越来越受到重视^[2, 3], 其中聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)是目前研究较多的聚阳离子型基因载体^[4], 因其独特的“质子海绵效应”, 而被大家公认为阳离子聚合物基因载体性能评价的参照标准.

在基因治疗的研究中, 关键问题是如何将基因载体安全有效地传输到特定的靶细胞中. 单纯的 PEI 作为基因载体时, 存在着细胞毒性高, 生物相容性差, 体内不稳定性, 没有细胞靶向性等缺点. 当 PEI 与 DNA 形成复合物颗粒时, 复合物表面会呈较强的正电性, 体液中带负电的细胞外基质通常会与复合物颗粒相互作用, 导致复合物颗粒凝聚或者解体, 从而阻止了复合物颗粒有效地将 DNA 运载至目标组织^[5-8]. 因此, 考虑引入具有靶向基团和带有负电荷的遮蔽体系^[9]来掩盖复合物表面多余的正电荷是解

决以上诸多问题的有效方法之一. 表面带负电的聚谷氨酸(PGA)是一种良好的遮蔽材料. 同时, 为了增强载体的靶向性, 在 PGA 侧链上偶联靶细胞的配体或抗体, 通过靶向性分子与细胞表面特异性受体结合, 可实现基因治疗的主动靶向功能.

研究表明, 肿瘤细胞及肿瘤内活化的血管内皮细胞(endothelial cell, EC)膜表面特异表达细胞整合素(integrin)受体 $\alpha_v\beta_3$, 而人体其他部位的正常细胞膜表面几乎不存在该整合素受体^[10]. 另外, 多肽精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)可以特异性地与细胞膜上的 $\alpha_v\beta_3$ 牢固结合. 因此, 对肿瘤及其 EC 膜表面具有靶向性识别的基因载体成为近年来的研究热点^[11-14].

本文将 RGD 接枝到 PGA 上, 得到 PGA-RGD 基因载体的遮蔽材料, 对其进行了一系列的理化性质和生物性能方面的表征评价. 通过比较 PEI/DNA、PGA/PEI/DNA 和 PGA-RGD/PEI/DNA 的肿瘤细胞靶向效果以及对正电荷的遮蔽效果, 验证基因载体遮

蔽体系的研究思想. 这肯定了基因载体遮蔽体系的研究思想, 对其实际应用研究具有重要的指导意义.

2 实验部分

2.1 试剂

超支化聚乙烯亚胺(PEI-25K) (Sigma, $M_w = 25000$); 小牛胸腺 DNA (Sigma); 荧光素酶质粒(pGL3-control)、细胞裂解液、荧光素酶检测试剂盒(Promega); 噻唑蓝(MTT, Sigma); BCA 法蛋白检测试剂盒(Pierce); 溴化乙锭(EB, Sigma); 透析袋(MWCO5000, 上海绿鸟).

2.2 仪器

Zeta 电位及粒度分析仪(ZetaPALS 型, 美国布鲁克海文); 核磁共振仪(Bruker AV300 NMR); 紫外可见分光光度计(UV-2401PC, 日本岛津); 酶标仪(Bio-Rad, 美国); 光度计(GloMaxTM20/20, Promega); 凝胶成像系统(UVP Inc., Upland, 美国).

2.3 PGA-RGD 的合成

称量 20 mg 分子量为 20 K 的聚谷氨酸(PGA), 溶解于 10 mL pH 为 5.5 的碱性水中. 称量 100 mg EDC·HCl 溶于 2 mL 水中, 在搅拌的条件下将 EDC·HCl 加入到 PGA 中. 称量 40 mg 的端基为氨基的 RGD(RGD-NH₂)溶于 2 mL 水中, 在搅拌的条件下分多次缓慢将 RGD-NH₂ 加入到 PGA 体系中, 室温搅拌条件下反应 48 h. 反应后的产物用截留量为 7 K 的透析袋对 5 L 的二次水透析 3 d, 然后样品冻干待用.

2.4 PGA/PEI/DNA 及 PGA-RGD/PEI/DNA 三元复合物的制备

DNA 的浓度为 0.1 mg/mL, PEI-25K, PGA-20K, PGA-RGD 分别用无菌双蒸水配制成 0.1 mg/mL 和 1 mg/mL 的水溶液. PEI-25K 和 DNA 以质量比 2.5:1 的比例混合搅拌均匀后静止 30 min, 制得 PEI/DNA 复合物颗粒, 其中 DNA 的浓度为 10 μ g/mL. 向 PEI/DNA 复合物颗粒中加入确定量的 PGA-20K 和 PGA-RGD, 混合均匀后静止 30 min, 制得 PGA/PEI/DNA 和 PGA-RGD/PEI/DNA 三元复合物颗粒. 文中所提到的所有复合物中, PEI/DNA 的质量比都为 2.5:1.

2.5 三元复合物颗粒的粒径与表面电位表征

制备用不同复合比例的 PGA 和 PGA-RGD 遮蔽 PEI/DNA(2.5:1)的三元复合物颗粒, 粒径大小与表面电位通过 Zeta 电位及粒度分析仪进行测定.

2.6 细胞毒性实验

细胞毒性实验采用 MTT 方法, HeLa 细胞接种于 96 孔细胞培养板, 细胞密度为 1.2×10^4 个/孔; DMEM 培养液中含 10%FBS, 100 units/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素, 每孔 180 μ L; 在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 孵箱中培养 24 h 后, 分别加入不同比例的 PGA 和 PGA-RGD 的三元复合物溶液 20 μ L. 继续培养 48 h 后, 每孔加入 20 μ L MTT 溶液(5 mg/mL, 溶于 PBS 中, 滤除不溶杂质). 在 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 4 h. 小心弃去培养液, 每孔加入 200 μ L DMSO, 振荡 10 min. 然后用酶标仪检测光吸收, 测试波长选用 492 nm. 细胞存活率按下面公式计算:

$$\text{Cell viability}(\%) = (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100(\%)$$

A_{sample} 是与阴离子聚合物溶液或三元复合物颗粒作用的细胞样品孔的吸收; A_{control} 空白细胞作为阴性对照, 每组实验做 4 个平行对照, 重复 3 次.

2.7 凝胶阻滞电泳

配制不同 PGA 及 PGA-RGD 比例的三元复合物溶液, 室温下孵育 20 min, 用 1%的琼脂糖跑电泳, 100 V 电压 45 min, EB 溶液(0.06 μ g/mL)染色 20 min 后用凝胶成像系统分析. 本实验中以荧光素酶质粒 DNA(pGL3-control)为模型 DNA.

2.8 细胞转染实验

细胞转染实验用人宫颈癌细胞(HeLa 细胞)进行, 选择荧光素酶质粒 DNA (pGL3-control plasmid)为报告基因. 具体操作步骤如下: 将细胞接种于 96 孔板中, 细胞密度为 1.2×10^4 个/孔, DMEM 培养液培养 24 h. 转染前更换 DMEM 培养液 180 μ L/孔, PEI-25K 和 DNA 以质量比 2.5:1 的比例混合搅拌均匀后静止 30 min, 取等量复合物加入到配制好的不同质量比的 PGA 及 PGA-RGD 中, 形成三元复合物, 再继续孵育 30 min 后加入到 96 孔板中, 20 μ L/孔. 继续培养 48 h 后, 小心移去培养液, 使用 PBS 缓冲液轻洗两遍, 完全吸除 PBS 后每孔加入 50 μ L 的细胞裂解液, 吹打均匀后放入-80 $^{\circ}$ C 冰箱中冻存, 1 h 后取出溶解后吹打

混匀. 从中取出 20 μL 裂解液用于荧光素酶分析系统检测. 另取 25 μL 裂解液用于 BCA 法检测, 测定裂解液中的总蛋白含量, 最终结果的荧光素酶活性表示为每毫克蛋白的相对单位(RLU).

3 结果与讨论

3.1 遮蔽材料的合成与表征

在先前的报道中, 已经有研究者采用一些阴离子电解质做遮蔽体系对阳离子基因载体复合物进行遮蔽. 在所选用的阴离子电解质中有天然高分子透明质酸, 也有合成类的高分子聚丙烯酸等. 天然高分子虽然具有较低的细胞毒性, 但是其结构较为复杂, 与一些特定细胞之间的相互作用并未完全被研究清楚, 要选用这些材料作为阳离子基因载体的遮蔽体系必须十分谨慎. 而聚丙烯酸这类材料虽然结构清晰, 具有丰富的负电荷, 但是它的不可降解性将影响其在体内的进一步应用. 本文选用聚谷氨酸(PGA)这类合成聚氨基酸作为遮蔽材料, 它具有良好的生物相容性和可生物降解性, 而且其结构清晰, 制备过程易于控制. 另一方面, 选用与一些细胞表面的整合素受体特异结合的 RGD 多肽作为靶向配体与 PGA 进行接枝反应, 获得具有靶向性的遮蔽材料. 本文采用的 RGD 是特殊制备的具有 $\text{NH}_2\text{-GRGDSY}$ 序列结构的多肽. RGD 与 PGA 的反应利用 EDC 缩合的方法进行(图 1). 反应后的产物经过透析纯化处理后, 利用氘代三氟乙酸和氘代氯仿 1:1 混合溶剂溶解进行核磁表

征. 在图 2 的核磁图中分别出现了 PGA 和 RGD 的特征峰, 这证明本文利用 EDC 缩合的方法将 RGD 接枝到 PGA 上的方法是成功的.

3.2 复合物的粒径与表面电位

遮蔽材料对 PEI/DNA 复合物的遮蔽效果, 通过三元复合物的粒径大小, 及表面电位来判断. 如图 3(a)的粒径测试结果可以得出如下结论: 当没有遮蔽材料参加复合时, 单纯的 PEI/DNA 复合物颗粒的粒径在 100 nm 左右, 而随着遮蔽材料 PGA 及 PGA-RGD 投入量的增加, 三元复合物的粒径有显著的增大, 但继续增加遮蔽材料的量, 三元复合物颗粒的粒

图 2 PGA-RGD 的 ^1H NMR 谱图, 测试溶剂为氘代三氟乙酸和氘代氯仿 1:1 混合, 峰位的归属对应图 1 标注

图 3 PEI/DNA, PGA/PEI/DNA 和 PGA-RGD/PEI/DNA 复合物的粒径(a)和电位(b)

图 1 PGA-RGD 的合成

径会有减小的趋势,这可以从图3(b)三元复合物颗粒的表面电位的变化趋势得到解释.由图3(b)的表面电位结果可以看出:单纯的PEI/DNA复合物颗粒的表面电位在+27 mV左右,而随着遮蔽材料投入质量的增加,复合物的表面电位由正电性变为负电性,而且负电性继续增加.这样,在少量的遮蔽材料遮蔽到PEI/DNA复合物颗粒上的时候,由于负电性的PGA和PGA-RGD与正电性的PEI之间的作用,会使三元复合物变得疏松,因而整个复合物粒径会有显著的增加.但是继续增加遮蔽材料的用量,整个复合物颗粒的负电荷继续增加,复合物颗粒之间相互压缩的力增加,复合物颗粒的粒径会逐渐变小.由后面图4(a)电泳实验的结果可知,对于PGA遮蔽的复合物颗粒而言,在遮蔽比例达到20/2.5/1的时候,DNA已经被PGA触发释放了,因此图3中并没有PGA/PEI/DNA遮蔽比例高于20/2.5/1的粒径和电位数据.

3.3 凝胶阻滞电泳

在转染过程中,PEI/DNA复合物颗粒在细胞内会被一些阴离子电解质触发,释放其中复合的DNA,这是转染的一个必要步骤.本文中,利用负电性的PGA和PGA-RGD做遮蔽体系遮蔽在PEI/DNA复合物颗粒上,被PEI复合的DNA是否会被PGA和PGA-RGD触发释放,这在制备三元复合物的时候必须考虑的问题.利用凝胶阻滞电泳实验可有效监测这一问题.如图4(a)和(b)所示,PEI/DNA复合比例在2.5:1的时候,PEI可以对DNA进行完全阻滞.对于PGA/PEI/DNA复合物颗粒,当复合比例高于20/2.5/1的时候,复合物中的部分DNA会被释放出来了,这是由于PGA和DNA之间的竞争作用造成的.当PGA

图4 (a) PGA/PEI/DNA复合物的凝胶阻滞电泳. 1为裸DNA; 2为PEI/DNA(2.5:1); 3~8为不同比例的PGA对PEI/DNA(2.5:1)进行遮蔽,遮蔽材料PGA的遮蔽比例分别为2.5, 5, 10, 20, 40, 80. (b) PGA-RGD/PEI/DNA三元复合物的凝胶阻滞电泳. 1为裸DNA; 2为PEI/DNA(2.5:1); 3~8为不同比例的PGA-RGD对PEI/DNA(2.5:1)进行遮蔽,遮蔽材料PGA-RGD的遮蔽比例分别为2.5, 5, 10, 20, 40, 80

的量增大到一定程度的时候,PGA与PEI之间的作用会被PEI复合的DNA置换出来.而对于PGA-RGD/PEI/DNA,由于RGD与PGA的部分羧基反应,使得PGA-RGD的负电荷密度降低,因此在较大的复合比例下,DNA仍然不会被PGA-RGD触发释放.

3.4 细胞毒性

用MTT法分别测试PGA/PEI/DNA和PGA-RGD/PEI/DNA复合体系在转染48 h后的细胞毒性,复合物制备条件和进行转染时复合物的制备条件相同.如图5所示:随着遮蔽材料PGA投入质量的增加,基因载体表面的正电荷被逐渐遮蔽,因此细胞存活率显著上升;尽管与PGA相比,PGA-RGD充当遮蔽材料的时候细胞存活率有所降低,但其存活率却均高于单纯用基因载体PEI时的存活率,并且其细胞存活率的降低还与基因蛋白在细胞内的高转染表达有关.

3.5 细胞荧光素酶转染实验

本文选用荧光素酶质粒DNA(pGL3-control)作为报告基因,利用HeLa细胞评价各基因载体体系的转染效率,转染结果如图6所示. PEI/DNA复合物颗粒被PGA遮蔽之后,转染效率显著降低.而利用靶向遮蔽体系PGA-RGD遮蔽的复合物体系,其转染效率都高于PGA遮蔽的复合物体系,而且在适宜的遮蔽比例下,其转染效率比PEI有明显的提高,最佳转染条件下,其转染效率是PEI的4倍.

从图3(b)可见,PGA遮蔽PEI/DNA复合物颗粒后,会迅速降低复合物颗粒表面表面电位,而且当遮蔽比例高于5/2.5/1的时候,复合物颗粒的表面电位

图5 PEI/DNA, PGA/PEI/DNA和PGA-RGD/PEI/DNA复合物的细胞毒性

图6 PEI/DNA, PGA/PEI/DNA 和 PGA-RGD/PEI/DNA 复合介导荧光素酶质粒 DNA 在 HeLa 细胞中转染效率

由正电性变为负电性。由于在体液环境中, 细胞膜表面带有负电荷, 复合物颗粒表面的电荷状态对复合物与细胞膜之间的作用有很大的影响。带有正电荷的复合物颗粒易于吸附在细胞膜表面, 进而增加细胞对复合物颗粒的内吞效率, 为实现高效率转染创造条件。但是, 复合物颗粒表面的正电荷也是其对非目标组织具有较强特异性作用的重要原因。在体内传输的时候表面带正电荷的复合物颗粒可以与任何非目标组织的细胞相互作用并且被内吞, 这不仅是降低基因载体转染效率的问题, 还可能引起意想不到的副作用。而单纯的降低复合物颗粒表面的正电荷又会极大地降低基因载体对目标组织的转染效率, 这从图 6 中 PGA/PEI/DNA 的转染效率就可以看到, 当然 PGA 遮蔽 PEI/DNA 导致复合物颗粒的粒径过大也是导致转染效率降低的重要原因, 但是 PGA/PEI/DNA 的粒径过大也是由于其表面电荷的改变引起的。因此如何有效控制复合物颗粒表面电荷状态降低基因载体对非目标组织的非特异性作用, 提高基因载体对目标组织的靶向作用和转染效率是急需解决的问题。而从图 6 中的转染结果看, 所开发的 PGA-RGD/PEI/DNA 靶向

遮蔽体系可以很好地解决这一问题。

当少量的 PGA-RGD 遮蔽到 PEI/DNA 复合物上 (PGA-RGD/PEI/DNA = 5/2.5/1) 的时候, 复合物的表面正电荷会减少, 这会降低复合物颗粒的转染效率, 而 PGA-RGD 上的 RGD 与 HeLa 细胞表面受体的特异性作用又会补偿这种损失。因而, 复合物颗粒的转染效率和 PEI/DNA 相比, 并没有明显降低。继续增加 PGA-RGD 的用量, 虽然复合物颗粒的电位继续降低, 粒径继续变大, 由于有更多的 RGD 在遮蔽在复合物颗粒表面增强与细胞膜的作用, 整个复合物颗粒的转染效率与 PEI/DNA 遮蔽体系相比有明显的增加。当 PGA-RGD/PEI/DNA 比例为 40/2.5/1 的时候, 复合物的粒径为 150 nm 左右, 虽然复合物颗粒表面为负电荷, 但是三元复合物的转染效率却达到最高。这说明起主导作用的是遮蔽体系上的 RGD 与细胞膜之间的特异性作用。而 PGA-RGD/PEI/DNA 的比例继续增大到 80/2.5/1 的时候, 由于复合物颗粒表面的负电荷继续增加, 复合物体系的转染效率又有所降低。

4 结论

本文制备了一种带有 RGD 配体的聚谷氨酸靶向遮蔽材料 PGA-RGD, 该材料可以对阳离子基因载体和 DNA 的复合物颗粒进行遮蔽。适当比例的靶向遮蔽体系不会将复合物颗粒中的 DNA 置换出来。利用该靶向遮蔽体系, 得到了一种表面正电荷被遮蔽但是具有负电荷和靶向作用的基因载体体系。将基因载体体系表面的电荷转变为负电荷, 有利于降低基因载体体系对非目标组织的特异作用; 另一方面在转染体系中引入了靶向基团 RGD, 增加了基因载体体系对目标组织的靶向作用。本文开发的靶向遮蔽体系对提高阳离子聚合物基因载体的体内实用性具有重要的意义。

致谢 本工作得到国家自然科学基金 (50873102, 50903009, 21074129, 50733003), 国家自然科学基金-A3 前瞻计划 (20621140369), 吉林省科技发展项目 (20090128, 20096018) 的支持, 特此致谢。

参考文献

- 1 Kaneda Y. New vector innovation for drug delivery: Development of fusogenic non-viral particles. *Curr Drug Targets*, 2003, 4 (8): 599-602
- 2 Shimizu K, Ito A, Arinobe M, Murase Y, Iwata Y, Narita Y, Kagami H, Ueda H, Honda H. Effective cell-seeding technique using magnetite nanoparticles and magnetic force onto decellularized blood vessels for vascular tissue engineering. *J Biosci Bioeng*, 2007, 103 (5): 472-478

- 3 Tang T, Zheng JW, Chen B, Li H, Li X, Xue KY, Ai X, Zou SQ. Effects of targeting magnetic drug nanoparticles on human cholangiocarcinoma xenografts in nude mice. *Hepatob Panc Dis Int*, 2007, 6 (3): 303—307
- 4 Merdan T, Kopecek J, Kissel T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliver Rev*, 2002, 54 (5): 715—758
- 5 Shuai XT, Merdan T, Unger F, Kissel T. Supramolecular gene delivery vectors showing enhanced transgene expression and good biocompatibility. *Bioconjugate Chem*, 2005, 16 (2), 322—329
- 6 Tian HY, Xiong W, Wei JZ, Wang Y, Chen XS, Jing XB, Zhu QY. Gene transfection of hyperbranched PEI grafted by hydrophobic amino acid segment PBLG. *Biomaterials*, 2007, 28(18): 2899—2907
- 7 Lin C, Blaauboer C-J, Timoneda MM, Lok MC, van Steenberg M, Hennink WE, Zhong ZY, Feijen J, Engbersen JFJ. Bioreducible poly(amido amine)s with oligoamine side chains: synthesis, characterization, and structural effects on gene delivery. *J Control Release*, 2008, 126(2) 166—174
- 8 Peng Q, Zhong ZL, Zhuo RX. Disulfide cross-linked polyethylenimines (PEI) prepared via thiolation of low molecular weight PEI as highly efficient gene vectors. *Bioconjugate Chem*, 2008, 19 (2), 499—506
- 9 夏加亮, 陈杰, 田华雨, 陈学思. 阳离子基因载体的 PH 敏感遮蔽体系的制备及表征. *中国科学:化学*, 2010, 40(3): 255—261
- 10 Zitzmann S, Ehemann V, Schwab M. Arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-peptide binds to both tumor and tumor-endothelial cells *in vivo*. *Cancer Res*, 2002, 62: 5139—5143
- 11 Temming K, Schiffelers RM, Molema G, Kok RJ. RGD based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature. *Drug Resist Updat*, 2005, 8 (6): 381—402
- 12 Huveneers S, Truong H, Danen HJ. Integrins: Signaling, disease, and therapy. *Int J Radiat Biol*, 2007, 83 (11212): 743—751
- 13 Ginsberg MH, Qartridge A, Shattil SJ. Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17 (5): 509—516
- 14 Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*, 2006, 119 (19): 3901—3903

Synthesis and characterization of targeting shielding system for PEI gene carrier

LIN Lin¹, TIAN HuaYu¹, XIA JiaLiang^{1,2}, JIAO ZiXue¹, DONG Xuan^{1,2} & CHEN XueSi¹

1 Key Laboratory of Polymer Ecomaterials, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Science, Changchun 130022, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: RGD peptides were grafted to the carboxyl groups of poly(glutamic acid) to get a targeting shielding carrier (PGA-RGD) for polyethyleneimine (PEI) gene carrier. The experiment results showed that PGA-RGD can effectively shield PEI/DNA complex particles. Gel retardation assay showed that DNA can not be released by PGA-RGD from complexes under experimental conditions for gene transfection. For PGA/PEI/DNA system, its gene transfection efficiency obviously decreased because PGA shielding carrier coating on PEI/DNA complex decreased the surface charges of the complex particles. On the other hand, for PGA-RGD/PEI/DNA shielding system, although its surface charges were decreased by PGA-RGD shielding, its gene transfection efficiency were effectively improved because of the specific binding affinity between RGD and receptors on tumor endothelial cell membranes. MTT assay further presented that PGA-RGD/PEI/DNA has better biocompatibility than PEI/DNA. The improvement method developed in this paper for gene carriers can not only shield the positive charges on complex particles and decrease the non-specific uptake by non-targeting cells, but also introduce targeting functions to gene carrier system. The shielding system for gene complex particles is an effective strategy for promoting *in vivo* application of polycation gene carriers.

Key words: polyethyleneimine (PEI), gene carrier, shielding system, targeting, poly(glutamic acid)