

## 分枝 PEI 修饰的 PLGA 纳米粒转染 DNA 的研究 \*

季明辉<sup>1,2</sup> 胡贵方<sup>1Δ</sup> 顾大勇<sup>2Δ</sup> 谢伟东<sup>3</sup> 谈书勤<sup>1</sup> 徐 华<sup>4</sup> 欧青叶<sup>4</sup>

(1 南方医科大学公共卫生与热带医学学院 广东 广州 515000 ; 2 深圳出入境检验检疫局疾病预防控制中心 广东 深圳 518045 ; 3 清华大学深圳研究生院 广东 深圳 518045 ; 4 南通大学公共卫生学院 江苏 南通 226019)

**摘要** 目的:建立基于聚(乳酸-羟基乙酸)纳米粒(PLGA)载 DNA 的基因转染体系,比较用空白聚(乳酸-羟基乙酸)纳米粒(PLGA-E)吸附质粒 DNA 和用分枝 PEI 修饰后的 PLGA 纳米粒(PLGA-BPEI)吸附质粒 DNA 优缺点。方法:用乳化蒸发法制备纳米粒,对纳米粒进行表征研究,包括包封率、Zeta 电位、粒径大小、稳定性,用荧光显微镜观察它们对 NIH3T3 和 HEK293 细胞的转染效率,用 MTT 检测对它们细胞的毒性。结果:制备了两种基于 PLGA 的纳米粒,PLGA-E 和 PLGA-BPEI 粒径大小为 200-270nm, zeta 电位为 0-30mV,在血清和不同的 pH 值时两者均较稳定,转染效率 PLGA-BPEI 较 PLGA-E 高,且释放时间早,但前者较后者对细胞毒性大。结论:这两种基于 PLGA 纳米粒均能有效转染质粒 DNA,它们存在不同的优缺点,应根据不同需要进行选择。

**关键词** 聚(乳酸-羟基乙酸);纳米粒;基因转染

中图分类号:Q782,Q75 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)26-5009-06

## Surface Modification of PLGA Nanoparticles with Branches Polyethyleneimine for DNA Transfection Research\*

Ji Ming-hui<sup>1,2</sup>, Hu Gui-fang<sup>1Δ</sup>, Gu Da-yong<sup>2Δ</sup>, Xie Wei-dong<sup>3</sup>, Tan Shu-qin<sup>1</sup>, Xu Hua<sup>4</sup>, Ou Qing-ye<sup>4</sup>

(1 School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou Guangdong 515000, China;

2 Institute of Disease Control and Prevention, Shenzhen International Travel Health Care Center, Shenzhen Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen Guangdong 518045, China;

3 Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen Guangdong 518045, China;

4 School of Public Health, Nantong University, Nantong Jiangsu 226019, China)

**ABSTRACT Objective:** To build up two PLGA nanoparticle (NP)-based gene delivery systems, namely plasmid DNA (pDNA) encapsulated PLGA NPs (PLGA-E) and surface adsorbed pDNA on PLGA-BPEI NPs (PLGA-BPEI), with respect to the extent of internalization and intracellular release of pDNA. **Methods:** Several formulations have also been evaluated systematically for determination of the optimal transfection efficiency. The zeta-potential, particle size measurements and DNase I protection assay established the importance of the BPEI chain length in regulating the effective loading and condensation of pDNA with PLGA-BPEI NPs and pDNA protection ability of PLGA-BPEI NPs. The stability of these formulations was also investigated as a function of serum concentration. In vitro time-dependent gene transfection efficiencies were studied in presence as well as in absence of serum for NIH3T3 and HEK293 cells. The cell viability were also investigated using MTT assay. **Results:** We build up two PLGA nanoparticle (NP)-based gene delivery systems namely, plasmid DNA (pDNA) encapsulated PLGA NPs (PLGA-E) and surface adsorbed pDNA on PLGA-BPEI NPs (PLGA-BPEI), the size of PLGA-E and PLGA-BPEI are between 200 to 270 nm, zeta are from 0 to 30mV, In serum and different pH both are stable, the transfection efficiency of PLGA-BPEI are higher than PLGA-E and release early, but the former have more toxic to the cell. **Conclusion:** We have developed two kinds of PLGA-based gene delivery systems and investigated their transfection efficiencies. Therefore it can be assumed that this kind of study should provide a strong basis in choosing appropriate delivery system for specific gene expression.

**Key words:** PLGA; Nanoparticles; Gene transfection

**Chinese Library Classification(CLC):** Q782, Q75 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2012)26-5009-06

## 前言

基因治疗需要有把治疗性基因转载到靶细胞的载体,这些

载体需要转染效率高,对人类安全,而且在基因到达靶细胞之前阻止其被降解。除了这些特性外,它们应该具有细胞和组织

的靶向性<sup>[1]</sup>。尽管病毒载体有非常高的转染效率,但其相关的毒

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81072680,30972827);质检总局项目(2010IK212);深港创新圈计划(联合资助)项目(ZYB200907090128A);深圳市科技计划切块项目(HZ0907004)

作者简介:季明辉(1983-),男,硕士研究生,主要研究方向:生物纳米材料和生物芯片

Δ通讯作者:顾大勇,电话:0755-83391344, E-mail: wanhood@163.com; 胡贵方,电话:020-61648653, E-mail: hgf@fimmu.com

(收稿日期:2012-03-11 接受日期:2012-04-05)

性和免疫原性限制其作为载体在基因治疗中的使用。有必要发展非病毒载体用于基因治疗<sup>[2,3]</sup>。目前的许多非病毒载体多集中在可降解的纳米粒的研究,即包裹或吸附 DNA、siRNA 的可降解的多聚体纳米粒,例如 PLGA (polylactic-co-glycolic acid)、PLA 等。因此,对这几个纳米粒载体在体内和体外研究显示较高的转染效率和较好的生物相容性<sup>[4,5]</sup>。一般将质粒 DNA 包载到纳米粒内<sup>[6]</sup>。该方法能有效地保护 DNA 免受血清酶的降解,能够使基因缓慢释放,但由于在制备过程中使暴露在水和有机界面的 DNA/siRNA 不稳定,所载 DNA 的量也受到限制<sup>[7]</sup>。一方面,由于采用的生物材料是高分子材料,被包裹的 DNA 相对缓慢释放,因此,可能达不到期望的治疗效果。另一方面的障碍是 PLGA 水解产生酸性介质引起的 DNA 的降解<sup>[8]</sup>。为了克服这个问题,有学者采用阳离子多聚体修饰可降解纳米粒的表面来吸附 DNA/siRNA。在 PLGA 纳米粒吸附 DNA 是一个较新的方法<sup>[9]</sup>。通过 DNA 的负电荷可以与附在纳米粒上的正电荷相互作用。用阳离子表面活性剂、多聚体或两者的联合可以制备带正电荷的纳米粒,从而便于 DNA 的结合,且有利于与带负电荷的细胞膜相互作用,增加细胞对纳米粒的摄取。PEI 为“质子海绵”,可以吸附负电荷的 DNA,并阻止酶对 DNA 的降解<sup>[10]</sup>。所以,PEI 常常作为阳离子多聚体用于修饰 PLGA 纳米粒。此外,研究显示 PEI 是良好的转染试剂,进入细胞后因“质子海绵”的酸化而逃脱细胞内体的作用<sup>[11]</sup>。因此,该方法有利于提高 DNA 的载量和运载质粒 DNA 到细胞内。但是,需要对其 DNA 的保护能力和表面结合的 DNA 的可控释放进行研究。尽管两种不同基因传递的 PLGA 纳米粒体系的这些显著特征,即对 DNA 的包封和表面吸附体系,但对其整个过程仍了解不多。评价不同基因载体系统有助于阐明其机制和功能上的差异。我们认为基于 PLGA 的基因载体系统在细胞内释放 DNA 可能不同。本研究旨在比较两个基于 PLGA 纳米粒的 DNA 载体系统的物理特性、细胞吸收、细胞分布和 DNA 的释放。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

PLGA (50:50) ( $MW:3$  万), poly (vinyl alcohol) (PVA) (80%水解), 分枝 PEI (25K) 购自 Sigma-Aldrich。DMEM 培养基购自 Invitrogen, DNase I 购自 TaKaRa 公司, DMEM、青霉素-链霉素、胎牛血清购自 Promega 公司, 质粒 pIRES-EGFP 购自 Invitrogen 公司, DH5 $\alpha$  由本室保存, 质粒 DNA 的纯化采用试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA)。

### 1.2 方法

**1.2.1 PLGA-BPEI 和 PLGA-E 纳米粒的制备** 在本研究中,我们采用改进的乳化挥发法制备纳米粒<sup>[12]</sup>。BPEI (25K) 直接溶解在 1 mL 含 PLGA 的二氯甲烷中, 终浓度为 5% (BPEI/PLGA: W/W)。再将溶液倒入 2 mL 3% PVA 溶液中, 冰浴, 70 W 超声 5 分钟形成水包油乳化液。将乳化液 (O/W) 立即倒入 50 mL 0.3% PVA 溶液, 500 rpm 搅拌 6 小时, 使二氯甲烷挥发干净。纳米悬液用 14000 rpm 离心, 用 ddH<sub>2</sub>O 清洗重悬, 重复 3 次。重悬的纳米粒进行真空冷冻干燥 (FD-1000, EYELA)。PLGA-E 纳米粒的制备不含 BPEI, 其余的步骤同上。

**1.2.2 质粒 DNA 吸附到 PLGA-BPEI 纳米粒上** 将 pDNA 加到

等体积不同浓度的纳米粒溶液中, 轻轻混合, 在室温下孵育 30 分钟, 以便它们充分结合。

**1.2.3 纳米粒的表征** (1) 粒径和表面电荷的检测 纳米的平均粒径和表面电荷用质子相关光谱仪和 Malvern 4700 亚微粒分析仪进行检测。胶体的稳定性用纳米粒与含 10-50% (V/V) RPMI 的培养基, 37℃ 孵育 10 分钟到 3 小时 (2) 用扫描电子显微镜分析纳米粒的表面形状。 (3) 纳米粒载 pDNA 效率的评估。纳米粒载质粒 DNA 效率的评价, 用检测纳米粒与 pDNA 孵育结合 30 分钟后, 通过离心除去结合在 NP 上的 DNA, 然后检测上清液中的 DNA 含量, 推测 NP 的结合 DNA 的效率。

**1.2.4 凝胶阻滞实验** 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PLGA-BPEI 纳米粒对质粒 DNA 的结合。用一定量的质粒 DNA 加到系列纳米溶液中, 孵育 30 分钟后电泳, 在紫外线下观察质粒 DNA 与纳米粒的结合。

**1.2.5 体外释放实验** 将 5 mg PLGA-BPEI 和 PLGA-E 分别加入到 1 mL DPBS (pH 7.4) 中, 37℃, 振荡, 孵育 24 小时后, 一半样品转移到 25 mM 乙酸钠缓冲液 (pH 5.0) 中模拟溶酶体的酸化。样品在设置的时间点进行 14000 rpm 离心 10 分钟获得 NPs, 除去上清液, 再加新鲜的缓冲液, 重悬 NPs, 上清液保存在 4℃ 直到用 UV 检测。未被修饰的 PLGA NPs 作为背景对照。

**1.2.6 DNase I 保护实验** 将 400 ng pDNA 和 400  $\mu$ g PLGA-BPEI 混合, 接着加 100  $\mu$ L 1U DNase I 的反应缓冲液制备 NPs/pDNA 复合物, 在 37℃ 孵育 0, 30, 60, 120 分钟, 然后用 20  $\mu$ L 0.5 M EDTA 使反应终止, 4℃ 保存, 加入 80  $\mu$ L 肝素溶液 (2 mg/mL), 37℃ 孵育 30 分钟让 pDNA 与 NPs 解离, 然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

**1.2.7 荧光显微镜观察质粒的转染效率** HeLa 和 HEK 293 以  $4 \times 10^4$  孔培养在 24 孔细胞培养板, 在 500  $\mu$ L 含有 10% FBS, 青霉素和链霉素的 DMEM 培养液中孵育 24 小时。将 NPs 与质粒 pIRES-EGFP 孵育 30 分钟后, 加到细胞培养板中, 用 500  $\mu$ L 无血清的培养液培养 4 小时后, 用 PBS 洗一次, 再加含 10% FBS 培养液继续培养 20 小时, 在荧光显微镜下观察结果。

**1.2.8 细胞活性实验** MTT 检测 PLGA-E 和 PLGA-BPEI/pDNA 的细胞毒性。以  $1 \times 10^4$  密度的细胞种到 96 孔细胞培养板孔内, 培养方法同上。培养 24 小时后, 用 PBS 洗一次, 再加 200  $\mu$ L 新鲜培养基和 20  $\mu$ L MTT 溶液 (5 mg/mL) 继续培养 4 小时。然后除去培养基, 加入 150  $\mu$ L DMSO 溶解染料。取 100  $\mu$ L 在 570 nm 检测 OD 值。未用纳米粒处理的对照视为 100% 细胞活性。

### 1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{X} \pm S$ ) 表示, 用 SPSS 16.0 软件处理数据, 两组间均数比较用 t 检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 纳米粒的鉴定

在 DPBS (pH 7.4) 中, PLGA-BPEI 和 PLGA 的表面电荷是正电荷, 值为 0-30 mV, 粒径范围为 200-270 nm, PLGA-BPEI 的直径比 PLGA 纳米粒稍大。pDNA 和 PLGA-BPEI 的混合使得 PLGA-BPEI 的电荷减少了一些, 当 PLGA-BPEI/pDNA 的比

例达到 50 时, PLGA-BPEI/pDNA 复合物的大小从 220 nm 增加到 380 nm, 然后渐渐减少(图 1)。当两者的比例在 50 时, 纳米粒能完全吸附质粒, 可见凝胶阻滞实验(图 2), 此时电荷的

相互作用达到饱和状态, 并且复合物没有发生聚集, 其 zeta 电位为 0 mV, 见图 1B。

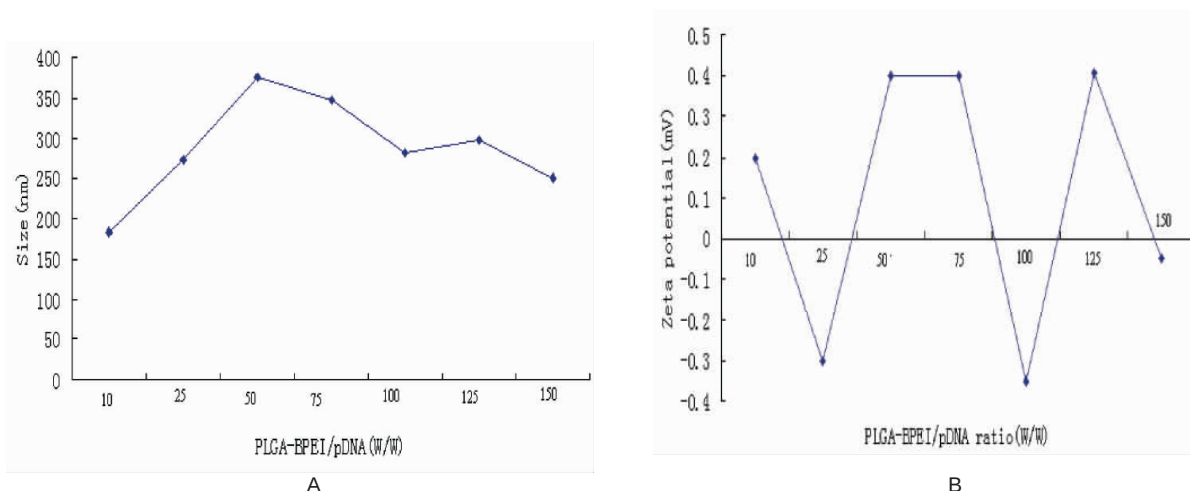


图 1 PLGA-BPEI/pDNA 的比值对纳米粒粒径(A)和电荷(B)的影响

Fig. 1 Effect of PLGA-BPEI/pDNA wt ratios on the size (A) and zeta-potential (B)

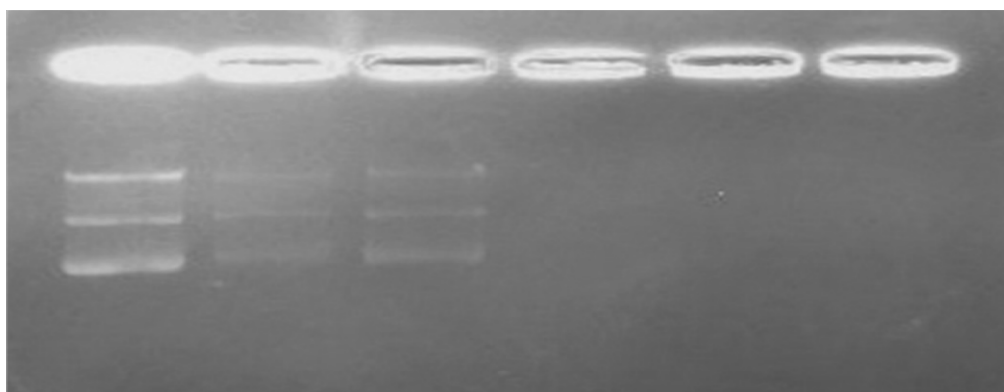


图 2 PLGA-BPEI 吸附质粒后的凝胶电泳

Fig.2 Gel retardation assay of pDNA complexed with PLGA-BPEI

## 2.2 琼脂糖凝胶阻滞实验

为了成为有效的基因载体, 纳米粒需要具有结合和浓缩 DNA 的能力, 并且能防止 DNA 降解。为此, 我们进行了凝胶阻滞实验(图 2)。PLGA-BPEI 与 pDNA 的质量比为 0, 10, 25, 50, 75, 150 孵育 30 min 后跑胶, 如图当纳米粒与质粒比值为 50 时, 刚好能使质粒完全被吸收。

## 2.3 纳米粒在血清中的稳定性

纳米粒的大小和稳定性是药物传递体系的重要因素, 与靶向淋巴系统和细胞摄取紧密相关<sup>[13]</sup>。本实验在 0-150 分钟时间内, 测定 PLGA-BPEI 和 PLGA-E 在 10% 血清的 RPMI 培养基中孵育质粒后粒径随时间变化的曲线, 当 PLGA-BPEI/pDNA 的大小在孵育到 120 分钟时, 其大小从 315 nm 增加到 463 nm, PLGA-E/pDNA 粒径随时间变化不明显(图 3)。为了评估在血清条件培养基中的物化性质, 检测了血清浓度 0-50% 时对纳米粒稳定性的影响。随着血清浓度从 0 到 50%, PLGA-BPEI 的粒径也轻微地增加, 从 135 nm 到 165 nm(图 4A), 这可能是血清中非特异蛋白吸附到正电荷的 PLGA-BPEI 纳米粒, 导致粒子间的聚集导致粒径增大。两种纳米粒的电荷的变化差异明

显, PLGA-E 纳米粒的电荷变化更剧烈(图 4B)。上述数据表明 PLGA-E 纳米粒比 PLGA-BPEI 纳米粒稳定性更高, 其粒径大小和表面电荷一致, 同时不易聚集, 没有非特异性的相互作用。

## 2.4 DNase I 酶切实验

用琼脂糖凝胶电泳进行了研究纳米粒的保护作用研究。结果说明, 疏水的 PLGA 粒子能有效的保护 pDNA, 避免了来自血浆中蛋白和酶的作用。对于 PLGA-BPEI 纳米粒, 不能确保被吸附的 pDNA 的稳定性, 因为 pDNA 位于纳米粒结构的最外层, 经常暴露的血清环境中, 位于 PLGA 纳米粒表面的 BPEI 可能影响 DNase I 对 pDNA 的降解。

## 2.5 体外 pDNA 的释放

NPs 的降解以及 DNA 的释放的时间对基因的表达有重要的调节作用<sup>[14]</sup>。通过比较 pH 7.4 和 pH 5.0 时 pDNA 的释放, 来说明 pH 值对 PLGA-BPEI 和 PLGA-E 的 pDNA 释放的影响。为了模仿细胞摄取后细胞内的溶酶体的酸化, NPs 在 pH 7.4 的缓冲液孵育 24 小时, 然后转移一半到 pH 5.0 的缓冲液中, 在预定的时间点检测溶液中的 DNA 含量。PLGA-E 初始暴发释放, 且量比 PLGA-BPEI 高些。在第 48 小时 PLGA-E 和 PLGA-

BPEI 纳米粒释放 pDNA 的量分别为 53 和 31 % ,接着缓慢释放直到第 9 天(图 5)。在 pH 5.0 时 ,在第 9 天释放突然加速 ,这一结果可能是 PLGA 的降解所致。这个结果说明 ,BPEI 能影响

pDNA 的释放率 ,比 PLGA-E 慢约 20 % ,这可能因为 BPEI 和 pDNA 强烈的静电相互作用 ,推迟 pDNA 的释放。

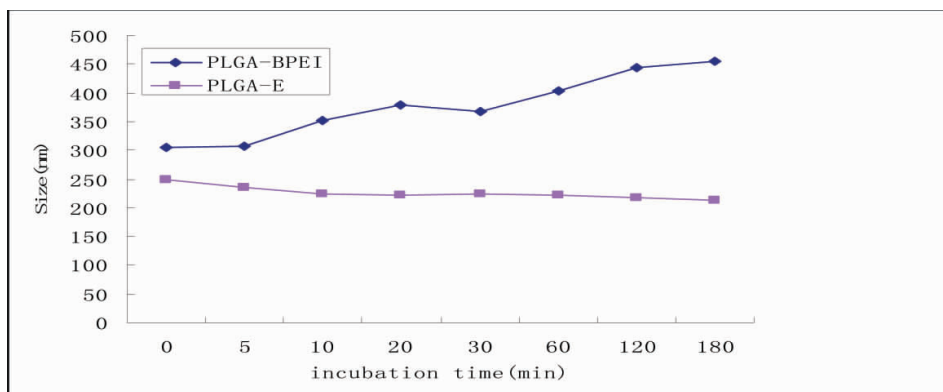


图 3 PLGA-BPEI/pDNA 以及 PLGA-E/pDNA 在含有 10% RPMI 培养基中孵育粒径变化

Fig.3 Particle size measurements of PLGA-BPEI/pDNA and PLGA-E/pDNA complexes in 10 % serum contained RPMI media with incubation time

\*P<0.01 compared with each group

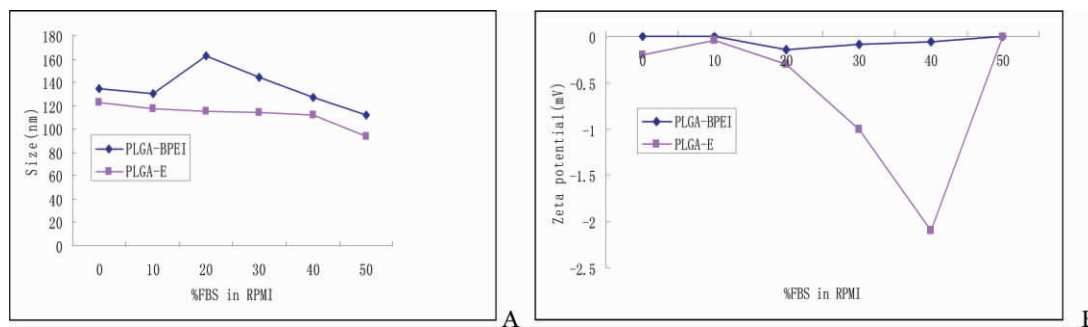


图 4 血清浓度变化对 PLGA-BPEI 以及 PLGA-E 粒径和电位的影响

Fig.4 Effect of serum concentration on the size (A) and zeta-potential (B) changes of PLGA-E and PLGA-BPEI nanoparticles

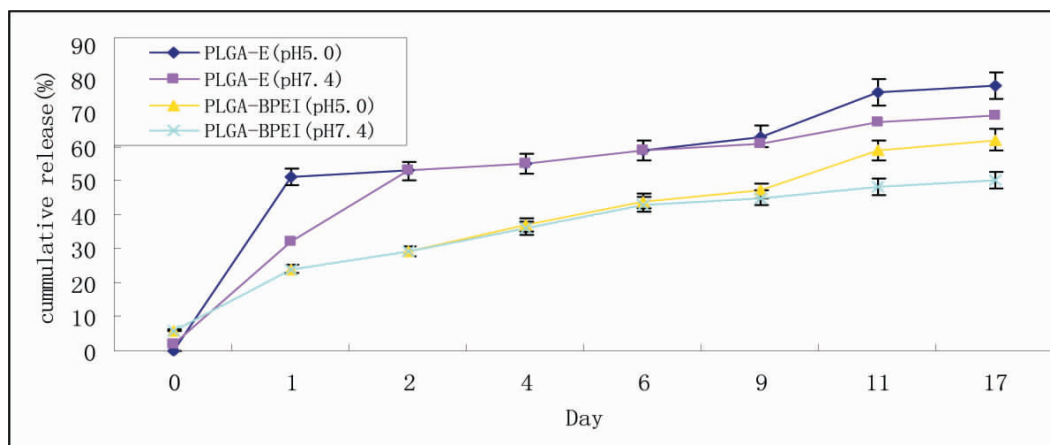


图 5 在 pH7.4 和 pH 5.0 时 ,PLGA-BPEI/pDNA 以及 PLGA-E/pDNA 的 pDNA 释放曲线

Fig.5 Cumulative release of pDNA from PLGA-BPEI and PLGA-E into DPBS (pH7.4) or 25 M sodium acetate buffer (pH 5.0) at 37 °C

## 2.6 体外基因转染效率的比较

纳米粒与 pDNA 孵育后 ,转染 HeLa 和 HEK293 细胞 ,在不同时间点观察 EGFP 的表达。我们发现 PLGA-BPEI 纳米粒的转染效率较 PLGA-E 高 ,表明阳离子的多聚体修饰 PLGA 纳米粒可以增加其转染效率 ,这与其他文献表述一致<sup>[15]</sup> ,这是因

为 PLGA-BPEI 纳米粒的阳离子表面能与负电荷的细胞膜的静电相互作用强化细胞的摄取。而且 ,PLGA-BPEI 纳米粒表面的亲水性 ,BPEI 通过水化能加速纳米粒的降解释放 BPEI/pDNA 复合物 ,而没有游离的 pDNA<sup>[15]</sup>。对于 PLGA-E 纳米粒 ,位于 PLGA-E 纳米粒的表面的 pDNA 在转染的早期迅速

释放,接着是 PLGA 被分解,包裹在纳米粒内的质粒释放。这个过程比 PLGA-BPEI 纳米粒相对快些,可能是因为缺乏静电相互作用。PLGA-BPEI 纳米粒比 PLGA-E 纳米粒的转染效率高

2 倍。这可能由于 BPEI 诱导的细胞毒性,使得 PLGA-BPEI 纳米粒比 PLGA-E 的细胞毒性大,导致质粒被大量摄取,如图 6。

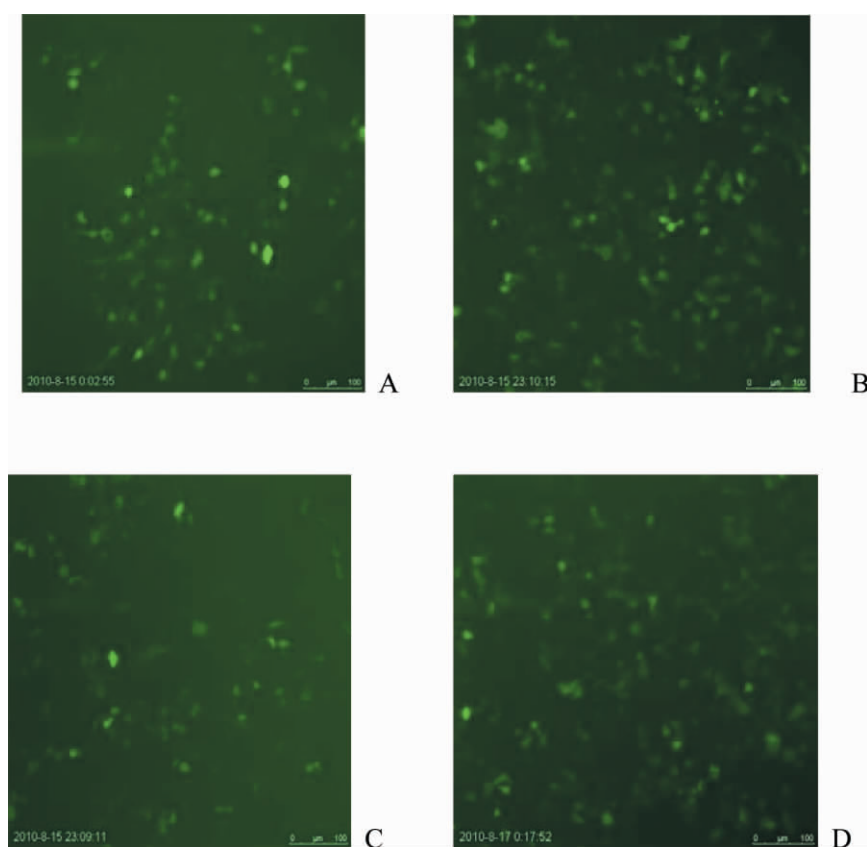


图 6 HEK293 细胞吸收纳米粒后发出荧光

(A/B):PLGA-BPEI/piRES-EGFP(A: 24 h; B:48 h); (C/D):PLGA-E/piRES-EGFP (C: 24 h; D: 48 h)

Fig.6 HEK293 cell absorb nanoparticle to send out fluorescence

(A/B)PLGA-BPEI/piRES-EGFP(A: 24h; B: 48h); (C/D):PLGA-E/piRES-EGFP (C: 24 h; D: 48 h)

## 2.7 细胞活性

用 MTT 实验比较 PLGA-BPEI 和 PLGA 纳米粒的细胞毒性。同预料的一致,PLGA-E 纳米粒转染的细胞存活率大于 90%

(图 7) ,PLGA-BPEI 纳米粒比 PLGA-E 有显著的细胞毒性。说明尽管 BPEI 有较高的转染效率,但对细胞有一定的毒性。

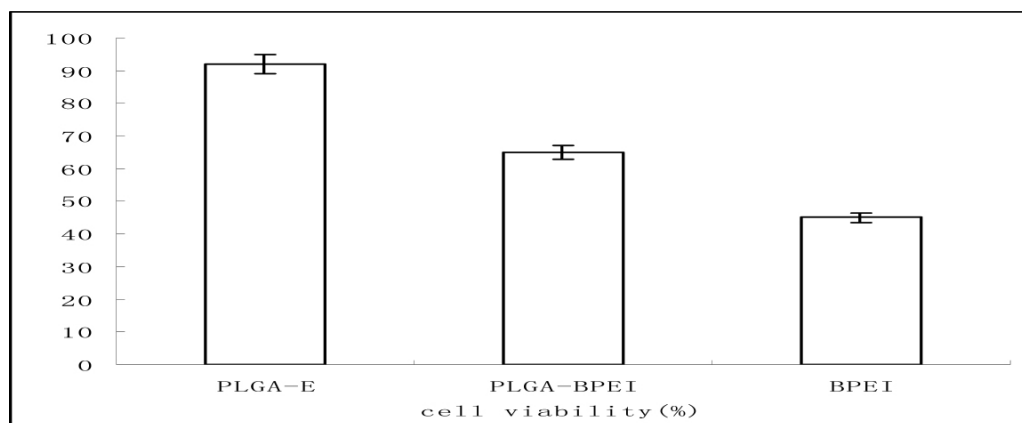


图 7 HEK293 细胞吸收 PLGA-BPEI, PLGA-E 和 BPEI 后的活性

Fig.7 The cell viabilities of PLGA-BPEI, PLGA-E and BPEI for HEK293 cells

Data were shown as mean  $\pm$  S.D (n=3)

### 3 讨论

基因转载的受 NPs 的物理化学特性的影响,而这又与制备 NPs 的方法相关。在本研究中,我们采用改进后的 W/O/W 乳剂方法制备 PLGA-E 和 PLGA-BPEI 纳米粒。结果显示 PLGA-BPEI 较 PLGA-E 纳米粒较大的电荷和直径,这表明 BPEI 链被有效地引入到 PLGA 表面,从而影响其物理化学特性。从吸收质粒的能力来看,PLGA-BPEI 吸附的 pDNA 的量是 PLGA-E 的 2-2.5 倍。纳米粒的稳定性实验表明 PLGA-E 纳米粒稳定性更高,其粒径大小和表面电荷一致,同时不易聚集,没有发现非特异性的相互作用,原因可能是 PLGA-E 比 PLGA-BPEI 的成分相对简单。在细胞毒性实验中的结果显示 PLGA-BPEI 比 PLGA-E 对细胞毒性大,表明虽然 BPEI 有较高的转染效率,但是细胞毒性较高。

本研究两种纳米粒 PLGA-BPEI 和 PLGA-E 载 pDNA 的能力以及在细胞中的释放、运输和分布。这两种基于纳米粒均能有效转染质粒 DNA,它们存在不同的优缺点,应根据不同需要进行选择,为选择纳米粒运载质粒用于转染细胞提供了理论基础。

#### 参考文献(References)

- [1] Ian SB, Zara C. Animal Models for Target Diseases in Gene Therapy-using DNA and siRNA Delivery Strategies[J]. *Pharmaceutical Research*, 2009, 26(1):1-18
- [2] Seow Y, Wood MJ. Biological Gene Delivery Vehicles: Beyond Viral Vectors[J]. *Molecular Therapy*, 2009, 17 (5):767-777
- [3] Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Nonviral vector-mediated RNA interference: its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy [J]. *Advanced drug delivery reviews*, 2009, 61(9):760-766
- [4] Klose D, Siepmann F, Elkharraz K, et al. PLGA-based drug delivery systems: importance of the type of drug and device geometry [J]. *Int J Pharm*, 2008, 354(1):95-103
- [5] F Rancan, D Papakostas, S Hadam. Investigation of Polylactic Acid (PLA) Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Local Dermatotherapy[J]. *Pharmaceutical Research*, 2009, 26( 8):2027-2036
- [6] Mok H, Park TG. Direct plasmid DNA encapsulation within PLGA nanospheres by single oil-in-water emulsion method [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008,68(1):105-111
- [7] Ando S, Putnam D, Pack DW, et al. PLGA microspheres containing plasmid DNA: preservation of supercoiled DNA via cryopreparation and carbohydrate stabilization[J]. *J Pharm Sci*, 1999, 88(1):126-130
- [8] Li Z, Ning W, Wang J, et al. Controlled gene delivery system based on thermosensitive biodegradable hydrogel [J]. *Pharm Res*, 2003, 20(6): 884-888
- [9] Singh M, Briones M, Ott G, et al. Cationic microparticles: a potent delivery system for DNA vaccines [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97 (2):811-816
- [10] Kim WJ, Changa CW, Lee M, et al. Efficient siRNA delivery using water soluble Lipopolymer for anti-angiogenic gene therapy [J]. *Control Release*, 2007, 118(3):357-363
- [11] 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*, 1995, 95(16):7297-7301
- [12] Oster CG, Kim N, Grode L, et al. Cationic microparticles consisting of poly(lactide-co-glycolide) and poly-ethylenimine as carriers systems for parental DNA vaccination[J]. *J Control Release*, 2005, 104(2): 359-377
- [13] Nafee N, Taetz S, Schneider M, et al. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/ RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides[J]. *Nanomedicine*, 2007, 3 (3):173-183
- [14] Wang C, Ge Q, Ting D, et al. Molecularly engineered poly (ortho ester) microspheres for enhanced delivery of DNA vaccines [J]. *Nat Mater*, 2004, 3:190-196
- [15] Messai I, Munier S, Ataman-Onal Y, et al. Elaboration of poly(ethyleneimine) coated poly(D, L-lactic acid) particles. Effect of ionic strength on the surface properties and DNA binding capabilities[J]. *Colloid Surf B -Bio-interfaces*, 2003, 32(4):293-305