

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.19.005

聚乙二醇化学修饰的聚乙烯亚胺衍生物的制备及其细胞毒性研究 *

马琳¹ 苏靖² 邱明丰² 盛净^{1△} 陆平^{1△}

(1 上海交通大学医学院附属第九人民医院老年科 上海 200011; 2 上海交通大学药学院 上海 200240)

摘要 目的:合成聚乙二醇(PEG)化的聚乙烯亚胺衍生物(PEI-Et)基因输送载体 PET 1 和 PET 2,并考察两个载体材料在 HeLa 细胞、MCF-7 细胞中的细胞毒性及在 HeLa 细胞中的转染效率。**方法:**将亚乙基二氯甲酸酯与 PEI 800 Da 交联制备成交联 PEI 衍生物 PEI-Et,进一步将 PEI-Et 与聚乙二醇(PEG)以不同摩尔比例(1:1,2:1)交联连接,得到 PEG 化的 PET 1 和 PET 2。采用 MTT 法检测 PEI-Et、PET 1、PET 2 对 HeLa 细胞、MCF-7 细胞的细胞毒性。检测单位质量的荧光强度测定转染效率。**结果:**PET 的细胞毒性随浓度增大而增大,在同一浓度下 PET 的细胞毒性小于 PEI 25 KDa($P<0.01$);并且与 DNA 复合后,复合物细胞毒性随质量比的增高而增大,在同一质量比下 PET 的细胞毒性小于 PEI 25 KDa($P<0.01$),特别是 PET 1。并且最佳比例时,PET 1 的转染活性最高。**结论:**作为非病毒基因载体,PET 1 具有高的转染效率及低的细胞毒性。

关键词:基因输送;聚乙烯亚胺(PEI);PET;细胞毒性

中图分类号:R915 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)19-3616-05

Study on Preparation and Cytotoxicity of Polyethylenimine Derivatives Modified by Polyethylene Glycol*

MA Lin¹, SU Jing², QIU Ming-feng^{2△}, SHENG Jing^{1△}, LU Ping^{1△}

(1 Department of Geriatrics, Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200011, China; 2 Shanghai Jiao Tong University School of Pharmacy, Shanghai, 200240, China)

ABSTRACT Objective: Gene delivery vectors: PET 1 and PET 2 were synthesized by chemically conjugating polyethylene glycol (PEG) with polyethylene imine derivatives (PEI-Et). Respectively, the article investigated the cytotoxicity of the two vectors on HeLa cells, MCF-7 cells and transfection efficiency on HeLa cells. **Methods:** PEI-Et was prepared by cross-linking PEI 800 Da with ethylene biscalbamate linkages. Then PEI-Et were conjugated with polyethylene glycol (PEG) in different molar ratios (1:1, 2:1), to get the PET 1 and PET 2. MTT method was used to detect the toxicity of PEI-Et, PET 1, PET 2 on HeLa cells, MCF-7 cells. The transfection efficiency was detected by the fluorescence intensity. **Results:** The cytotoxicity of PET increased with the increasing of the concentrations and weigh ratios. Compared to PEI 25 KDa, PET cytotoxicity was significantly reduced at the same concentration and weigh ratio, especially PET 1. And the transfection efficiency of PET 1 was the highest at the optimal weight ratio. **Conclusions:** As a non-viral gene carrier, PET 1 showed high transfection efficiency and low cytotoxicity.

Key words: Gene Delivery; Polyethylenimine(PEI); PET; Cytotoxicity

Chinese Library Classification(CLC): R915 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)19-3616-05

前言

基因疗法应用于人体的关键是寻找安全有效的基因运载系统。聚乙烯亚胺(PEI)是目前研究较多的一类非病毒载体材料,通过质子海绵效应与基因结合^[1-4]。近年来,研究者在 PEI 的基础上引入不同的官能基团,以降低载体的毒性提高其转染效率,例如:壳聚糖^[5]、 β -环糊精^[6]、组氨酸^[7]、聚乙二醇(PEG)^[8]等。

本课题组之前将亚乙基二氯甲酸酯连接 PEI 800 Da,合成聚乙烯亚胺衍生物 PEI-Et,发现其具有较高的基因转染效率^[9]。

但是,PEI-Et 表面正电荷过多,细胞毒性较大。因此,本研究在 PEI-Et 的基础上引入 PEG,以增强 PEI-Et 组织相容性,提高细胞的生存能力^[10]。

本研究中,基于之前的工作,我们将 PEI-Et 与 PEG 以不同的摩尔比例合成 PEG 修饰的 PEI-Et,即 PET。检测其在人子宫癌细胞 (HeLa) 和人乳腺癌细胞 (Michigan Cancer Foundation-7, MCF-7) 中的毒性,筛选细胞毒性小、转染率高的材料作为基因输送载体。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81300092)

作者简介:马琳(1987-),女,硕士研究生,主要研究方向:基因输送,电话:18817821556, E-mail: chongchongdan@126.com

△通讯作者:陆平,女,博士,主要研究方向:平滑肌细胞增殖相关研究, E-mail: luping.shanghai@163.com;

盛净,男,教授,主要研究方向:老年人心血管疾病, E-mail: shengjing60@163.com

(收稿日期:2015-02-10 接受日期:2015-02-28)

1 材料与方法

1.1 实验材料

支链 PEI (25 KDa, 800 Da)、亚乙基二氯甲酸酯[ethylene bis(chloroformate)]、MTT(Sigma-Aldrich);单甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺碳酸酯 (mPEG-Sc)(Yare Biotech)。胎牛血清、DMEM 培养基、胰酶(Hyclone);HeLa(人宫颈癌细胞)、MCF-7(人乳腺癌细胞)(中科院上海生命科学院细胞资源中心)。酶标仪(Moleclar Devices)。

1.2 细胞培养

HeLa、MCF-7 培养在 DMEM 培养基中(含 10%胎牛血清)。细胞置入 37 °C, 5% CO₂ 的恒温培养箱中。

1.3 PEI-Et 的合成

氮气保护、冰浴中,将 0.04 mol 亚乙基二氯甲酸酯的氯仿溶液(体积 40 mL)缓慢滴入 0.06 mol PEI 800 Da 氯仿溶液(体积 6 mL),反应 24 h。24 h 后蒸除氯仿,得到粗品。然后将粗品溶于超纯水,透析袋透析 (MWCO: 3500 Da)48 h,48 h 后冻干得 PEI-Et。样品储存于 -20 °C 冰箱备用^[9]。

1.4 PET 的合成

0.02 mmol mPEG-Sc 碳酸氢钠溶液(0.1 M)逐滴滴入 0.02 mmol PEI-Et 碳酸氢钠溶液(0.1 M)中,室温下反应 4 h,透析袋透析(MWCO: 3500 Da)48 h,48 h 后冻干得 PET 1^[10]。同样方法合成 PET 2 (PEI-Et 与 mPEG-Sc 摩尔比为 2:1)。样品储存于 -20 °C 冰箱备用。

1.5 PET/DNA 复合物的制备

PET/DNA 复合物要现用现配,PET 与 DNA 分别溶于 PBS 中配制成适当浓度的溶液。根据不同质量比(w/w),将等体积的 PET 溶液加入到 DNA 溶液中混合均匀,室温下孵育 30 min,制备得复合物。

1.6 细胞毒性试验

使用 MTT 法检测 PET 及 PET/DNA 复合物的细胞毒性。PEI 25 KDa 组作为阳性对照,未予药物处理组作为阴性对照。细胞悬液加入到 96 孔板,每孔 100 μ L,细胞浓度为 5000/孔。细胞培养 24 h 后加入不同浓度的 PET 或不同质量比的 PET/DNA 复合物(以无酚红 DMEM 配制),每孔 100 μ L,37 °C 孵育 4 h。4 h 后吸除溶液,PBS 冲洗,每孔加入 125 μ L 0.5 mg/mL MTT 溶液(无酚红 DMEM 配制),继续培养 6 h。6 h 后吸除 MTT 溶液,PBS 冲洗,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷(DMSO),震荡 1 min。酶标仪检测记录 570 nm、630 nm 处的吸光度取差值。阴性对照组细胞活力定位 100%。实验组细胞活力计算公式:实验组细胞活力 = 实验组 D(570 nm-630 nm)/对照组 D(570 nm-630 nm)。每组设置 6 个复孔,取平均值。实验重复 3 次。

1.7 细胞转染试验

采用 Micro BCA 的方法检测细胞的蛋白总量,以单位质量的荧光强度表示转染效率。PEI 25 KDa 组作为阳性对照,荧光素酶质粒作为阴性对照。细胞悬液加入到 48 孔板,每孔 500 μ L,细胞浓度为 8×10^4 /孔。细胞培养 24 h 后,每孔加入 50 μ L 复合物(最佳质量比,以 PBS 配制)及 250 μ L DMEM。轻轻震荡培养板,置培养箱 4 h。4 h 后吸除溶液,PBS 冲洗,每孔加入

500 μ L 的完全培养基继续培养,48 h 后检测转染活性。每个样品设置 3 个复孔。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。以计量数据,采用 t 检验及方差分析进行组间比较。 $P < 0.01$ 表示具有显著性差异, $P < 0.05$ 表示具有差异,差异具有统计学意义。

2 结果

两种细胞 MTT 结果显示:与 PEI 25 KDa、PEI-Et 相比,PET 1、PET 2 的细胞毒性低,安全性高。在最佳质量比,PET 1 的转染效率高于 PEI 25 KDa、PEI-Et,证明了降低材料的毒性,提高细胞的生存率,可提高其转染效率。

2.1 细胞毒性

图 1 示:PET 对 MCF-7 的细胞毒性。由图 1B、1D 可知:质量比和浓度增高,材料的细胞毒性随之增高。但与 PEI 25 KDa 相比,PEI-Et、PET 1、PET 2 的细胞毒性的增长趋势较缓和。

图 1A:同一质量比,不同材料的细胞毒性。与 PEI 25 KDa 相比,PEI-Et、PET 1、PET 2 的细胞毒性较低, $w/w \geq 3$ (3, 5, 10, 20, 40, 60),差异具有显著性($P < 0.01$)。与 PEI-Et 相比,PET 1 的细胞毒性低, $w/w \geq 10$ (10, 20, 40, 60),具有差异($P < 0.05$);但 PET 2 与 PEI-Et 细胞毒性无差异。 $w/w \leq 40$ (1, 3, 5, 10, 20, 40),PET 1 的细胞存活率 $> 90\%$;PET 2 的细胞存活率 $> 69\%$ 。 $w/w = 20$,PEI-Et 细胞存活率 $79\% \pm 3\%$;PET 1 细胞存活率 $99\% \pm 3\%$,PET 2 细胞存活率 $84\% \pm 2\%$; $w/w = 40$,PEI-Et 细胞存活率 $44\% \pm 1\%$;PET 1 细胞存活率 $90\% \pm 3\%$,PET 2 细胞存活率 $69\% \pm 4\%$ 。图 1C:比较相同浓度时不同材料的细胞毒性。PEI-Et、PET 1、PET 2 的细胞毒性低于 PEI 25 KDa,浓度 $> 5 \mu\text{g/mL}$ 时,具有显著性差异($P < 0.01$)。与 PEI-Et 相比,PET 1 的细胞毒性相对较低,浓度 $> 20 \mu\text{g/mL}$ 时,二者具有显著性差异($P < 0.01$);但 PET 2 细胞毒性与 PEI-Et 相比无差异。浓度 $< 50 \mu\text{g/mL}$ 时,PET 1 细胞存活率 $> 91\%$,PET 2 细胞存活率 $> 67\%$ 。浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$ 时,PEI-Et 细胞存活率为 $77\% \pm 3\%$,PET 1 细胞存活率 $94\% \pm 4\%$,PET 2 细胞存活率为 $82\% \pm 1\%$;浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$ 时,PEI-Et 细胞存活率为 $59\% \pm 4\%$,PET 1 细胞存活率 $91\% \pm 3\%$,PET 2 细胞存活率为 $67\% \pm 2\%$ 。

图 2 示:PET 在 HeLa 细胞中毒性。图 2B、2D 示:随质量比和浓度的增高,细胞毒性增高。与 PEI 25 KDa 相比,PEI-Et、PET 1、PET 2 的细胞存活率降低趋势减缓。

图 2A:同一质量比,不同材料的细胞毒性。与 PEI 25 KDa 相比,PEI-Et、PET 1、PET 2 的细胞毒性低; $w/w \geq 3$ (3, 5, 10, 20, 40, 60),具有显著性差异($P < 0.01$)。与 PEI-Et 相比,PET 1 的细胞存活率相对较高, $w/w \geq 10$ (10, 20, 40, 60),具有显著性差异($P < 0.01$);但 PET 2 与 PEI-Et 的细胞毒性相比无差异。 $w/w \leq 40$ (1, 3, 5, 10, 20, 40),PET 1 细胞存活率 $> 90\%$;PET 1 细胞存活率 $> 63\%$ 。 $w/w = 20$,PEI-Et 细胞存活率 $83\% \pm 4\%$,PET 1 细胞存活率 $97.5\% \pm 3\%$,PET 2 细胞存活率 $90\% \pm 2\%$; $w/w = 40$,PEI-Et 细胞存活率 $63\% \pm 3\%$,PET 1 细胞存活率 $90\% \pm 3\%$,PET 2 细胞存活率 $63\% \pm 2\%$ 。图 2C:相同浓度时,不同材料的细胞毒性。与 PEI 25 KDa 相比,PEI-Et、PET 1、PET 2 的细胞毒性低,浓度 $> 5 \mu\text{g/mL}$ 时,具有显著性差异($P < 0.01$)。与 PEI-Et

相比, PET 1、PET 2 的细胞毒性相对较低, 浓度 $>10 \mu\text{g/mL}$ 时, 毒性具有差异($P<0.05$)。浓度 $<50 \mu\text{g/mL}$ 时, PET 1 细胞存活率 $>92\%$, PET 2 细胞存活率 $>70\%$ 。浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$ 时, PEI-Et 细胞存活率为 $82\% \pm 2\%$, PET 1 细胞存活率 $97\% \pm 1\%$, PET 2

细胞存活率为 $84\% \pm 2\%$; 浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$ 时, PEI-Et 细胞存活率为 $68\% \pm 1\%$, PET 1 细胞存活率 $92\% \pm 3\%$, PET 2 细胞存活率为 $70\% \pm 2\%$ 。

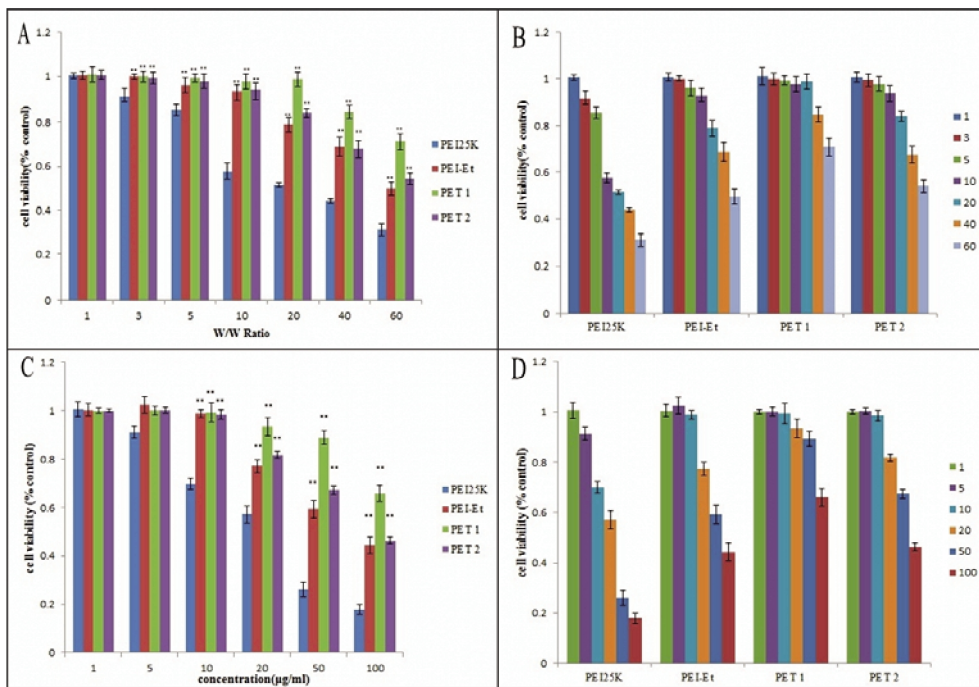


图 1 聚合物/DNA 复合物(A/B)和聚合物(C/D)对 MCF-7 的细胞毒性(** $P<0.01$ vs PEI 25 KDa)

Fig. 1 Cytotoxicity of polymer/DNA(A/B) and polymer(C/D) in MCF-7 cells(** $P<0.01$ vs PEI 25 KDa)

Notes: PET 1: $n_{\text{PEI-Et}}: n_{\text{PEG}}=1:1$, PET 2: $n_{\text{PEI-Et}}: n_{\text{PEG}}=2:1$.

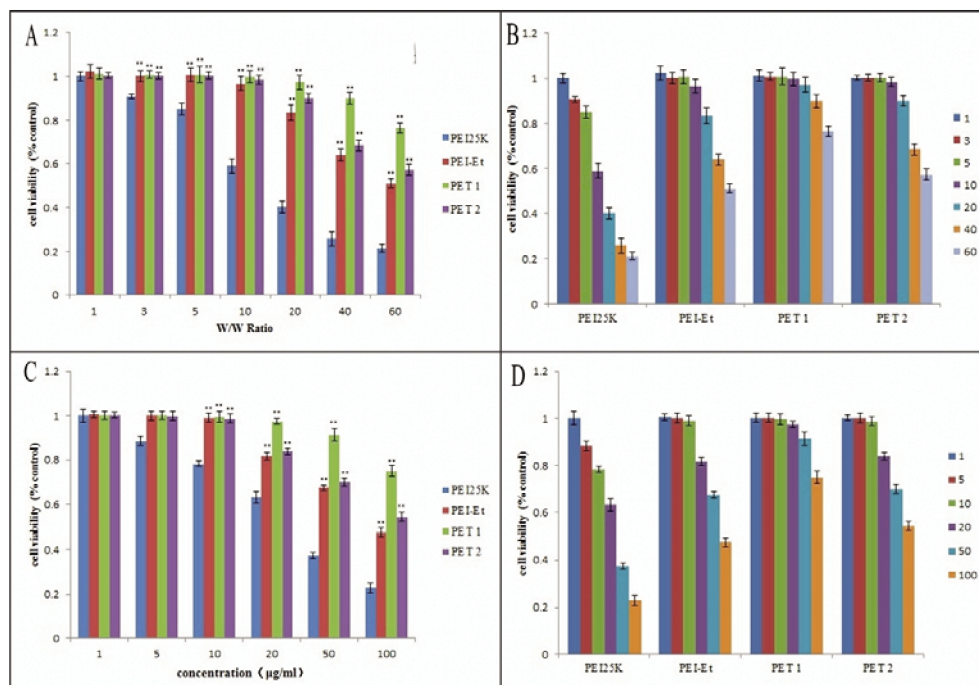


图 2 聚合物/DNA 复合物(A/B)和聚合物(C/D)对 HeLa 的细胞毒性(** $P<0.01$ vs PEI 25 KDa)

Fig. 2 Cytotoxicity of polymer/DNA(A/B) and polymer(C/D) in HeLa cells(** $P<0.01$ vs PEI 25 KDa)

Notes: PET 1: $n_{\text{PEI-Et}}: n_{\text{PEG}}=1:1$, PET 2: $n_{\text{PEI-Et}}: n_{\text{PEG}}=2:1$

由细胞毒性结果可知: 与 PEI 25 KDa、PEI-Et 相比, PET 1 在较大质量比和较高浓度时毒性均较小, 细胞存活率高, 因此

PET 1 的治疗区间较广, 安全性较 PEI 25 KDa、PEI-Et 更高。

2.2 转染效率

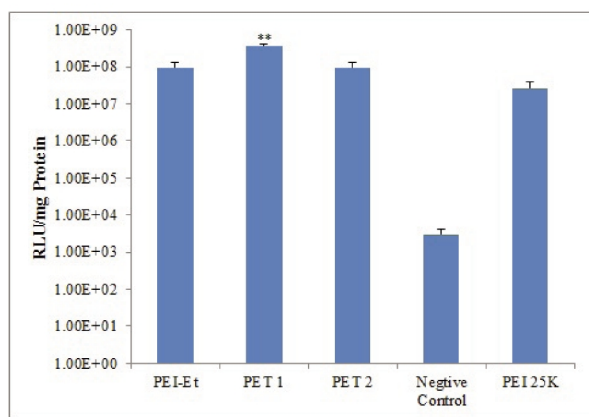


图3 HeLa 细胞中聚合物/DNA 的细胞转染效率

Fig. 3 Transfection efficiency of polymer/DNA in HeLa cells
(**P<0.01 vs PEI 25KDa)

Notes: PET 1: $n_{\text{PEI-Et}}: n_{\text{PEG}}=1:1$, PET 2: $n_{\text{PEI-Et}}: n_{\text{PEG}}=2:1$

通过检测四种载体输送荧光素酶质粒的能力评价其转染效率。图3示:在最佳质量比时,PET 1 转染率在 10^8 ,是 PEI-Et 的 3.35 倍,PEI 25 KDa 的 5.21 倍(P<0.01)。

综上实验结果:无论载体本身的毒性,还是载体与 DNA 复合后复合物的毒性,PET 1 的毒性小于 PEI-Et, 并且在最佳质量比时,PET 1 的转染效率高。因此 PET 1 更适合作为基因的运载体。

3 讨论

研究表明体内 DNA、siRNA 可以迅速被 DNA 酶、RNA 酶降解并通过肾脏排出^[12]。并且基因分子量大、带有负电荷,裸 DNA 或 siRNA 不能穿过细胞膜进入细胞^[13]。因此安全有效的基因运载系统是研究的重点。

PEI 类衍生物是合成的一系列高分子聚合物,体内外均具有较高的转染效率。聚合物的转染效率与其分子量、其与基因复合的质量比、粒径、表面电荷相关。近年来,研究发现 PEI 转染效率及毒性具有结构依赖性^[14]。与线型 PEI 相比,分支型 PEI 具有更多的氨基末端,可以复合更多的 DNA 或 RNA。但这些研究选择 PEI 25 KDa 作为分子骨架,众所周知 PEI 的毒性与其分子量成正相关,因此本实验选择分支型 PEI 800 Da 作为分子骨架,以达到降低毒性的目的。

分支型 PEI 的氨基末端增多虽然可以复合较多的 DNA,但载体表面电荷密度也相应增大。PEI 携带的正电荷可以与携带负电荷的蛋白结合,破坏细胞膜的结构,载体表面电荷密度越大,载体毒性越高^[15]。为了克服这一障碍,对分支型 PEI 进行简单的修饰可以降低毒性,如:伯胺乙酰化^[16]、引入带负电荷的丙酸或琥珀酸^[16]、引入中性的壳聚糖^[17]。

同时聚乙二醇 (PEG) 作为亲水官能基团广泛连接于 PLA^[18]、金纳米粒^[19]等纳米粒子,免于纳米粒子与蛋白结合,增强其渗透性。PEG 是一种电中性的亲水性分子,无毒、无免疫性、生物相容性良好^[20]。大量的研究表明经 PEG 修饰后,可以屏蔽载体多余正电荷,同时提高细胞的存活率^[21-24]。因此本研究在 PEI-Et 的基础上引入 PEG, 以达到屏蔽纳米材料表面正电荷,降低毒性的作用。

本研究选择分子量低的分支型 PEI 800 Da 作为分子骨架,

以 PEG 屏蔽多余的表面电荷,以达到保障原有转染效率的同时降低细胞毒性的目的。细胞毒性实验显示 PEG 官能基团的引入降低载体的毒性。转染实验中,最佳质量比时 PET 1 表现出比 PEI 25 KDa 更高的转染活性(P<0.01),并且转染效率高与 PEI-Et。从而证明了引入 PEG 后,转染活性未受影响。转染活性高的原因可能是载体材料细胞毒性较低,细胞存活率高。同时转染实验也可表明 PET 1 可以与质粒 DNA 复合,形成较小的复合物,成功的将基因运载入细胞,有效表达基因。

4 结论

本研究中合成 PEG 化学修饰的 PEI-Et 即 PET, 其细胞毒性明显低于 PEI 25 KDa 及 PEI-Et。PET 1 与 PET 2 相比,细胞毒性较低。最佳比例时,PET 1 细胞转染率更高,作为基因运载体具有应用价值。

参考文献 (References)

- [1] Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, et al. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2005, 60 (2): 247-266
- [2] Molinaro R, Wolfram J, Federico C, et al. Polyethylenimine and chitosan carrier for the delivery of RNA interference effectors [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2013, 10(12): 1653-1668
- [3] Fang G, Zeng F, Yu C, et al. Low molecular weight PEIs modified by hydrazine-based crosslinker and betaine as improved gene carriers[J]. Colloid Surf B Bionterfaces, 2014, 122: 472-481
- [4] Mahmoudi A, Oskuee RK, Ramezani M, et al. Preparation and in-vitro transfection efficiency evaluation of modified cationic liposome-polyethylenimine-plasmid nanocomplexes as a novel gene carrier[J]. Curr Drug Deliv, 2014, 11(5): 636-642
- [5] Yu P, Liang L, Sydney P. Glial cell line-derived neurotrophic factor gene delivery via a polyethylene imine grafted chitosan carrier[J]. INT J Nanomedicine, 2014, 9: 3163-3174
- [6] Yuan P, Qida H, Guping T, et al. FGFR-targeted gene delivery mediated by supramolecular assembly between β -cyclodextrin-crosslinked PEI and redox-sensitive PEG [J]. Biomaterials, 2013, 34 (27): 6482-6494
- [7] Tseng WC, Su LY, Fang TY. PH responsive PEGylation through metal affinity for gene delivery mediated by histidine-grafted polyethylenimine[J]. Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2013, 101(2): 375-386
- [8] Chunxi L, Fengxi L, Lixia F, et al. The targeted co-delivery of DNA and doxorubicin to tumor cells via multifunctional PEI-PEG based nanoparticles[J]. Biomaterials, 2013, 34(10): 2547-2564
- [9] Wang YQ, Su J, Wu F, et al. Biscarbamate cross-linked polyethylenimine derivative with low molecular weight, low cytotoxicity, and high efficiency for gene delivery [J]. INT J Nanomedicine, 2012, 7: 693-704
- [10] Weber ND, Merkel OM, Kissel T, et al. PEGylated poly (ethyleneimine) copolymer-delivered siRNA inhibits HIV replication in vitro[J]. Control Release, 2012, 157(1): 55-63
- [11] Wang YQ, Wang F, Deng XQ, et al. Delivery of Therapeutic AGT shRNA by PEG-Bu for Hypertension Therapy [J]. PLoS One, 2013, 8 (7): e68651

- [12] Peer D, Lieberman J. Special delivery: targeted therapy with small RNA[J]. *Gene Ther*, 2011, 18(12): 1127-1133
- [13] Salcher EE, Wagner E. Chemically Programmed Polymers for targeted DNA and siRNA Transfection [J]. *Top Curr Chem*, 2010, 296: 227-249
- [14] Kwok A, Hart SL. Comparative structural and functional studies of nanoparticle formulations for DNA and siRNA delivery [J]. *Nanomedicine*, 2011, 7(2): 210-219
- [15] Ruponen M, Galli E, Raasmaja A, et al. Mechanisms of polyethylenimine-mediated DNA delivery: free carrier helps to overcome the barrier of cell-surface glycosaminoglycans [J]. *J Gene Med*, 2011, 13(7-8): 402-409
- [16] Zintchenko A, Philipp A, Dehshahri A, et al. Simple modifications of branched PEI lead to highly efficient siRNA carriers with low toxicity [J]. *Bioconjug Chem*, 2008, 19(7): 1448-1455
- [17] Park SC, Nam JP, Kim YM, et al. Branched polyethylenimine-grafted-carboxymethyl chitosan copolymer enhances the delivery of pDNA or siRNA in vitro and in vivo[J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8: 3663-3677
- [18] Garofalo C, Capuano G, Sottile R, et al. Different insight into amphiphilic PEG-PLA copolymers: influence of macromolecular architecture on the micelle formation and cellular uptake [J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(1): 403-415
- [19] Qin JB, Peng C, Zhao BH, et al. Noninvasive detection of macrophages in atherosclerotic lesions by computed tomography enhanced with PEGylated gold nanoparticles [J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9: 5575-5590
- [20] Ernsting MJ, Murakami M, Roy A, et al. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles[J]. *J Control Release*, 2013, 172(3): 782-794
- [21] Bridal S.L, Nicolas V, Jaillard D, et al. The performance of PEGylatednanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent[J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 1723-1731
- [22] Banerjee P, Weissleder R, Bogdanov A. Linear polyethylenimine grafted to a hyperbranched poly (ethylene glycol)-like core: a copolymer for gene delivery[J]. *Bioconjug Chem*, 2006, 17(1): 125-131
- [23] Glodde M, Sirsi SR, Lutz GJ. Physicochemical properties of low and high molecular weight poly (ethylene glycol)-grafted poly (ethylenimine) copolymers and their complexes with oligonucleotides[J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7(1): 347-356
- [24] Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, et al. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy[J]. *Nanomedicine (Lond.)*, 2011, 6: 715-728

(上接第3604页)

- development to disease[J]. *Circulation*, 2012, 125(14): 1795-1808
- [2] Kage H, Borok Z. EMT and interstitial lung disease: a mysterious relationship[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2012, 18(5): 517-523
- [3] MengF, Wu G. The rejuvenated scenario of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer metastasis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2012, 31(3-4): 455-467
- [4] Medici D, Kalluri R. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype [J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(5-6): 379-384
- [5] Kahlert UD, Nikkhah G, Maciaczyk J. Epithelial-to-mesenchymal (-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas [J]. *Cancer Lett*, 2013, 331(2): 131-138
- [6] Zhao J, Tang N, Wu K, et al. MiR-21 simultaneously regulates ERK1 signaling in HSC activation and hepatocyte EMT in hepatic fibrosis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e108005
- [7] Srivastava SP, Koya D, Kanasaki K. MicroRNAs in kidney fibrosis and diabetic nephropathy: roles on EMT and EndMT[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 13(376): 125469
- [8] Sohal SS, Walters EH. Role of epithelial mesenchymal transition (EMT) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD)[J]. *Respir Res*, 2013, 214(16): 120
- [9] Siddesha JM, Valente AJ, Sakamuri SS, et al. Angiotensin II stimulates cardiac fibroblast migration via the differential regulation of matrixins and RECK[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 65(24): 9-18
- [10] Wang X, Lu J, Khaidakov M, et al. Aspirin suppresses cardiac fibroblast proliferation and collagen formation through downregulation of angiotensin type 1 receptor transcription [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 259(3): 346-354
- [11] Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(3): 524-529
- [12] Lang H, Fekete DM. Lineage analysis in the chicken inner ear shows differences in clonal dispersion for epithelial, neuronal, and mesenchymal cells[J]. *Dev Biol*, 2001, 234(1): 120-137
- [13] Zeisberg EM, Kalluri R. Origins of cardiac fibroblasts [J]. *Circ Res*, 2010, 107(11): 1304-1312
- [14] Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it [J]. *Dev Dyn*, 2005, 233(3): 706-720
- [15] Nawshad A, Hay ED. TGFbeta3 signaling activates transcription of the LEF1 gene to induce epithelial mesenchymal transformation during mouse palate development [J]. *J Cell Biol*, 2003, 163 (6): 1291-1301
- [16] Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, et al. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 43(2): 161-172
- [17] Chen LJ, Ye H, Zhang Q, et al. Bleomycin induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in pleural mesothelial cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 283(2): 75-82
- [18] Zhou Q, Yang M, Lan H, et al. miR-30a negatively regulates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition and peritoneal fibrosis by targeting Snail[J]. *Am J Pathol*, 2013, 183(3): 808-819
- [19] Yu JW, Duan WJ, Huang XR, et al. MicroRNA-29b inhibits peritoneal fibrosis in a mouse model of peritoneal dialysis [J]. *Lab Invest*, 2014, 94(9): 978-990
- [20] Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis[J]. *Nat Med*, 2007, 13(8): 952-961
- [21] Wang Y, Mu JJ, Liu FQ, et al. Salt-induced epithelial-to- mesenchymal transition in Dahl salt-sensitive rats is dependent on elevated blood pressure[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2014, 47(3): 223-230