

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.23.022

新型抗体靶向性核酸转移系统关键组分 SPA-PEI 交联物的生物学功能研究*

刘云¹, 刘晓芬², 翟源慧², 吴强², 刘晓波^{2△}

(1. 川北医学院基础医学院, 四川南充 637100; 2. 广东药科大学基础学院, 广州 510006)

[摘要] **目的** 考察新型抗体靶向性核酸转移系统的关键组分葡萄球菌 A 蛋白-聚乙烯亚胺交联物(SPA-PEI)的生物学功能,即结合 IgG 与压缩、复合 DNA 的能力。**方法** 采用酶联免疫吸附试验和中和抑制实验测定 SPA-PEI 交联物与多种来源 IgG 的结合能力;采用 DNA 凝胶阻滞实验测定 SPA-PEI 交联物与 DNA 片段的结合;采用溴化乙锭拒掺实验测定 SPA-PEI 交联物压缩 DNA 的能力。**结果** SPA-PEI 交联物可与多种种属来源的 IgG 良好结合;SPA-PEI 交联过程对 SPA 的结合特性无明显影响,SPA 活性保持较好;SPA-PEI 交联物能较好地中和质粒 DNA 或脱氧核酶(DzTi)的负电荷,压缩 DNA 片段能力接近游离 PEI。**结论** 制备的 SPA-PEI 交联物保持了 SPA 和 PEI 的生物学活性;SPA-PEI 交联物可用于抗体靶向性核酸转移系统的构建。

[关键词] 葡萄球菌 A 蛋白-聚乙烯亚胺交联物;核酸转移系统;免疫球蛋白 G 结合;DNA 结合

[中图分类号] R392.12

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)23-3238-03

Biological functions of SPA-PEI conjugate as one key component for construction of a novel antibody-targeted DNA delivery system

Liu Yun¹, Liu Xiaofen², Zhai Yuanhui², Wu Qiang², Liu Xiaobo^{2△}

(1. School of Basic Medical Sciences, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637100, China;

2. School of Basic Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the biological function of SPA-PEI conjugate(staphylococcal protein A-polyethylenimine cross-linker), which is one key component for construction of a novel antibody-targeted DNA delivery system. **Methods** The binding capacity of SPA-PEI conjugate with multiple sources of IgG was determined by enzyme-linked immunosorbent assay and neutralization inhibition assay. The binding capacity of SPA-PEI conjugate with DNA fragment was determined by DNA gel retardation assay, and its DNA condensing ability was measured by Ethidium bromide exclusion assay. **Results** SPA-PEI conjugate could bind well to many species-derived IgGs. SPA-PEI conjugate had no significant effect on the binding properties of SPA. SPA-PEI conjugate could neutralize negative charges of the plasmid DNA or DzTi. Its DNA condensing ability was nearly same to that of free PEI, which suggested a excellent DNA condensing ability of the SPA-PEI conjugate. **Conclusion** SPA-PEI cross-linkers prepared by this project group maintained the biological activity of SPA and PEI. SPA-PEI cross-linkers could be used for the construction of a novel antibody-targeted non-virus DNA delivery system.

[Key words] staphylococcal protein A-polyethylenimine conjugate; DNA delivery system; IgG binding; DNA complexation

聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)是一类聚阳离子聚合物,是目前最有前途的非病毒核酸转移载体之一,它具有以下特性:带有强大正电荷,能结合并压缩核酸分子使其易进入细胞;PEI 携带大量的氨基,易使携带的核酸进入细胞质而具有较高的表达效率^[1-2]。以特异性抗体作为靶向物质构建抗体-PEI 核酸载体,能使 PEI 载体具有组织细胞靶向性或特异性。葡萄球菌 A 蛋白(staphylococcal protein A, SPA)是一种性能稳定的小分子蛋白,能与 IgG 抗体以高亲和力、非共价迅速结合^[3],将 SPA 与 PEI 共价交联,形成 SPA-PEI 交联物,再与 IgG 抗体非共价结合即可避免因抗体与 PEI 直接化学交联而使活性受损伤等问题^[3-4]。IgG 抗体-SPA-PEI 与核酸结合或复合即成为一种新型的抗体靶向性核酸转移系统,其中 SPA-PEI 交联物起着“桥梁”或“接头”作用,为该抗体靶向性核酸转移系统的关键组分。

本项目组已制备出 SPA-PEI 交联物并对其理化等特性进行了表征,本文主要探讨该 SPA-PEI 交联物的生物学活性,即分别结合 IgG 和 DNA 片段的活性;压缩 DNA 的能力。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 药品试剂 SPA(相对分子质量为 20×10^3), PEI(相对分子质量为 25×10^3)购自 Sigma 公司;SPA-PEI 交联物采用氮-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯(SPDP)交联法制备^[3,5]。溴化乙锭(EB),鲑鱼精 DNA 购自武汉博士德公司。

1.1.2 IgG 类 正常山羊血清 IgG、正常兔血清 IgG、正常人血清 IgG、正常小牛血清 IgG,辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗小鼠 IgG、HRP 标记的山羊抗兔 IgG、HRP 标记的山羊抗人 IgG、HRP 标记的山羊抗牛 IgG、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自均为武汉博士德公司;小鼠抗人 CSPG4 单抗由广东药科大学病原生物学与免疫学系提供。

1.1.3 质粒和菌种 绿色荧光蛋白质粒(pEGFP-C1)、感受态细菌由广东药科大学病原生物学与免疫学系提供;按常规细菌转化方法将 pEGFP-C1 质粒转化至感受态细菌,筛选、扩增质粒,采用 QIAprep Spin Miniprep 质粒提取试剂盒(德国 Qiagen 公司产品)提取纯化 pEGFP-C1 质粒;紫外分光光度计于 260

nm 波长处测定质粒 DNA 含量。

1.1.4 脱氧核酶 (DzTi) 为针对人端粒酶催化亚基 (hTERT) 基因的核酶, 长度 34 nt, 由广东药科大学病原生物学与免疫学系提供。

1.2 方法

1.2.1 样品的包被 用酶联包被液 (0.01 mmol/L NaHCO₃) 将 SPA-PEI 交联物或 PEI、SPA 稀释成终浓度 10 μg/mL, 将稀释的样品加入酶联条板中 (100 μL/孔) 于 4 °C 过夜即可。

1.2.2 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 按文献 [3] 方法进行实验。大致过程: 正常山羊血清封闭后洗涤; 分别加入不同种属 IgG, 经孵育洗涤后, 加入各自对应的 HRP 标记的山羊抗体 (二抗), 继续孵育; 同上洗涤后, 加入酶联底物液 TMB (武汉博士德公司产品) 显色、硫酸终止显色反应, 紫外分光光度计于 450 nm 波长处测吸收光度 (A) 值 (A₄₅₀)。

1.2.3 中和抑制实验 按文献 [3] 方法进行。一定浓度的 HRP 标记的兔抗小鼠 IgG 与不同浓度的 SPA-PEI 交联物混合后于 4 °C 过夜; 取 SPA 包被的酶联条板去上清液, 同上封闭, 洗涤, 加入上述混合物, 同上孵育, 洗涤, 加入酶联底物液显色, 测定 A₄₅₀, 按公式计算抑制率。抑制率 (%) = (1 - 抑制物孔 A₄₅₀ / 对照孔 A₄₅₀) × 100%。抑制物孔即 HRP 标记的兔抗小鼠 IgG + SPA-PEI 交联物、SPA 或 PEI; 对照孔即仅 HRP 标记的兔抗小鼠 IgG。

1.2.4 核酸片段的凝胶阻滞实验 参照文献 [3-4] 方法进行实验。(1) SPA-PEI/DNA 复合物制备: 将 pEGFP-C1 质粒或 DzTi 用 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 平衡盐溶液 (HBS) 稀释成浓度 0.125 μg/μL 或 0.5 μg/μL, 取 5 μL 稀释液与不同浓度的 SPA-PEI 交联物等体积混合, 于室温下作用 60 min 即制备成 SPA-PEI/DNA 复合物; 按照文献方法计算 P/N 比值 [6]。(2) 琼脂糖凝胶电泳: 制备 1% 或 2% 的琼脂糖凝胶, 在样品孔中加入 SPA-PEI/DNA 复合物等, 常规方法电泳、观察。

1.2.5 溴化乙锭拒掺实验 参照文献 [7] 方法进行。大致步骤: 将鲑鱼精 DNA 用 Tris-HCl (pH 7.4) 稀释成浓度 30 μg/mL, 加入到 96 孔板中, 然后加入不同体积的浓度为 50 μg/mL 的 PEI 或 SPA-PEI, 使孔中 N/P 比值在 0.2~4.0; 室温下静置 10 min 后, 每孔加入浓度为 100 μg/mL 的 EB 溶液 20 μL, 经充分混合后, 采用荧光光谱仪检测 (激发波长 518 nm, 发射波长 605 nm)。

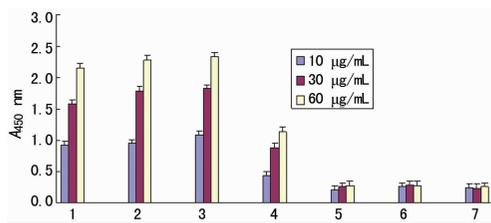
1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件分析数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SPA-PEI 交联物与多种 IgG 的结合 兔 IgG (HRP 标记的兔抗小鼠 IgG、正常兔血清 IgG)、正常人血清 IgG 及小鼠 IgG (小鼠抗人 CSPG4 单抗) 均能与包被的 SPA-PEI 交联物结合, 且具有 IgG 浓度依赖性, 而山羊 IgG (HRP 标记的山羊抗兔 IgG、正常山羊血清 IgG)、正常小牛血清 IgG 则结合阴性 (图 1、2), 提示 SPA-PEI 交联物可与多种 IgG 抗体较好地结合, 但有一些动物种属限制; 包被的 SPA 能与兔抗小鼠 IgG 良好结合, 但包被的 PEI 与兔抗小鼠 IgG 结合阴性 (图 2)。

2.2 SPA-PEI 交联物与 IgG 结合的特异性及结合能力 SPA-PEI 交联物、游离 SPA 均能抑制 HRP 标记的兔抗小鼠 IgG 与包被的 SPA 结合, 且呈浓度依赖性, 但游离 PEI 无抑制作用, 提示 SPA-PEI 交联物与 IgG 结合具有 SPA 特异性 (图 3); 虽然 SPA-PEI 交联物的抑制作用较游离 SPA 有所降低, 但两者抑制曲线接近, 提示 SPA 与 PEI 的化学交联过程对

SPA 的活性无明显影响, 仍保持了 SPA 结合 IgG 的功能。见图 3。



1: 正常兔血清 IgG; 2: 兔抗小鼠 IgG; 3: 正常人血清 IgG; 4: 小鼠抗人 CSPG4; 5: HRP 标记的山羊抗兔 IgG; 6: 正常小牛血清 IgG; 7: PBS 对照

图 1 ELISA 法检测包被的 SPA-PEI 交联物与多种种属来源的 IgG 结合

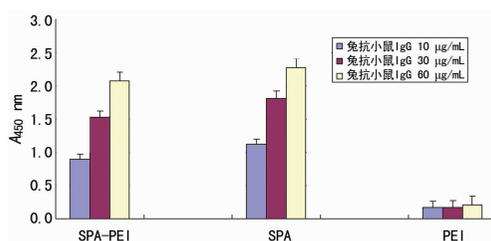


图 2 ELISA 法检测 HRP 标记的兔抗小鼠 IgG 与包被的 SPA-PEI 交联物、游离 SPA 及游离 PEI 的结合

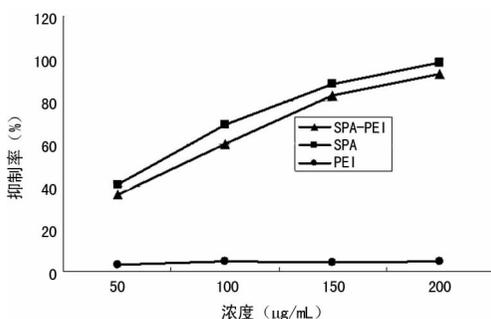
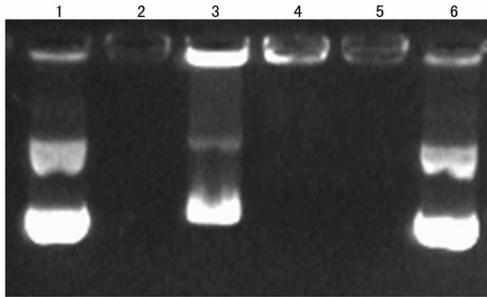


图 3 ELISA 检测 SPA-PEI 交联物、游离 SPA 或游离 PEI 抑制 HRP 标记的兔抗小鼠 IgG 与包被的 SPA 结合

2.3 SPA-PEI 交联物与质粒的结合 SPA-PEI 交联物能抑制 pEGFP-C1 质粒在电场中的移动, 且具有剂量依赖性, 表现为 N/P 比值的依赖性 (图 4)。N/P 比值为 2.5 时, SPA-PEI 交联物不能抑制 pEGFP-C1 质粒的泳动 (图 4, lane 3), 当 N/P 比值为 5.0、10.0 时, SPA-PEI 交联物能完全抑制 pEGFP-C1 质粒的泳动, 表现为无 pEGFP-C1 质粒条带出现 (图 4, lane 4、5); PEI 能抑制 pEGFP-C1 质粒的泳动 (图 4, lane 2), 而 SPA 无抑制作用 (图 4, lane 6)。这些结果表明, SPA-PEI 交联物能较好地中和质粒 DNA 的负电荷, 形成电中性或带正电荷的 SPA-PEI/pEGFP-C1 质粒复合物, 具有 PEI 特异性。

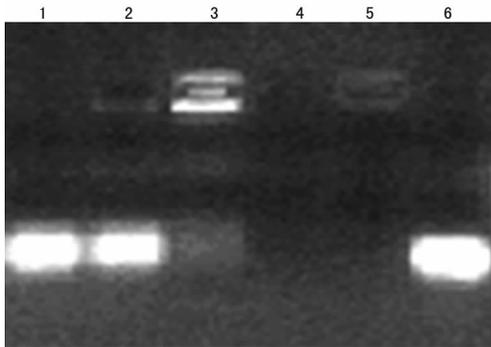
2.4 SPA-PEI 交联物与 DzTi 的结合 SPA-PEI 交联物能抑制 DzTi 的泳动, 具有剂量依赖性, 表现为 N/P 比值的依赖性 (图 5)。N/P 比值为 2.5 时, SPA-PEI 交联物不能抑制 DzTi 的泳动 (图 5, lane 2); 当 N/P 比值为 5.0 时, SPA-PEI 交联物几乎能完全抑制 DzTi 的泳动, 当 N/P 比值为 10.0 时, SPA-PEI 交联物能完全抑制 DzTi 的泳动, 表现为无 DzTi 条带出现 (图 5, lane 3、4)。PEI 抑制作用很强 (图 5, lane 5), 而 SPA 则无抑制作用 (图 5, lane 6)。表明, SPA-PEI 交联物也能较好地

中和 DNA 短片断(如核酶等)负电荷,形成电中性或带正电荷的 SPA-PEI/DNA 片段复合物,具有 PEI 特异性。



1:pEGFP-C1 质粒;2:pEGFP-C1+PEI(N/P 比值=6.0);3:pEGFP-C1+SPA-PEI(N/P 比值=2.5);4:pEGFP-C1+SPA-PEI(N/P 比值=5.0);5:pEGFP-C1+SPA-PEI(N/P 比值=10.0);6:pEGFP-C1+SPA(1 000 µg/mL)

图 4 DNA 凝胶阻滞实验检测 SPA-PEI 交联物与质粒 DNA 的结合



1:DzTi;2:DzTi+SPA-PEI(N/P 比值=2.5);3:DzTi+ SPA-PEI(N/P 比值=5.0);4:DzTi+ SPA-PEI(N/P 比值=10.0);5:DzTi+PEI(N/P 比值=6.0);6:DzTi+SPA(1 000 µg/mL)

图 5 DNA 凝胶阻滞实验检测 SPA-PEI 交联物与 DzTi 的结合

2.5 SPA-PEI 交联物包裹压缩 DNA 的能力 在 N/P 比值为 0 即无 SPA-PEI 交联物或 PEI 情况下, DNA 处于伸展状态, EB 染料易渗入 DNA 分子中, 表现为荧光信号强; 当 SPA-PEI 交联物或 PEI 加入, DNA 被包裹压缩, EB 染料不易渗入; 随着 N/P 比值增加, SPA-PEI 交联物或 PEI 含量增加, DNA 被包裹压缩程度增强, EB 染料掺入量降低, 因此荧光信号逐渐减弱, 提示 SPA-PEI 交联物或 PEI 均有包裹压缩 DNA 片段的能力(图 6)。SPA-PEI 交联物的压缩曲线与 PEI 近于重合, 提示 PEI 与 SPA 的化学交联未明显影响 PEI 对 DNA 的包裹压缩能力。

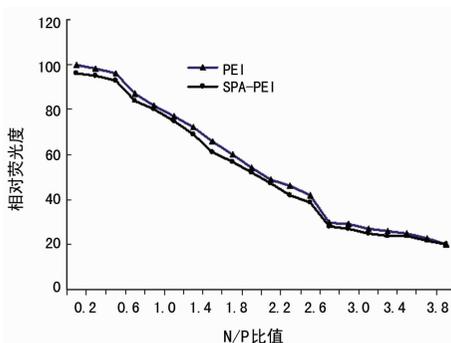


图 6 溴化乙啶拒染实验检测 SPA-PEI 交联物包裹压缩 DNA 的能力

3 讨论

SPA 是来源于金黄色葡萄球菌细胞壁的一种蛋白成分, 其分子量依据提取方法不同而不同。SPA 有许多优点^[3,8,11]: 分子量小, 易制备纯化, 性质较稳定, 加热或甲醛处理不影响其活性, 故易保存; SPA 与 IgG 的 Fc 结合并不干扰 IgG 抗体与抗原结合; 另外 SPA 有一重要特性, 即能与 IgG 抗体以高亲和力, 非共价迅速结合, 且结合过程受温度等影响较小; SPA 与 IgG 结合有一定种属特性, 能与豚鼠、人、兔、猪、小鼠等动物 IgG 结合, 而不与牛、羊等动物的 IgG 结合。本项目组曾将 SPA 与 PLL 共价交联制备了 SPA-PLL 交联物, 希望以此作为“桥”能将 IgG 抗体和 DNA 分子以非共价键结合起来构建具有靶向作用的基因转移系统, SPA-PLL 交联物显示出结合多种来源 IgG 的活性^[3-4]。本文研究制备的 SPA-PEI 交联物也可与多种种属来源的 IgG 较好地结合, 且具有 SPA 特异性, 其结合活性由 SPA-PEI 交联物中 SPA 结构所赋予; SPA-PEI 交联物的抑制作用较游离 SPA 有所降低, 但两者抑制曲线接近, 提示 SPA 与 PEI 的化学交联过程对 SPA 的活性无明显影响。

PEI 是一类聚阳离子聚合物, 是目前最有前途的非病毒核酸转移载体之一^[1-2], 其作用原理及优点^[3,9-11]: 带强大正电荷的聚阳离子聚合物能中和核酸片段的负电荷, 并且包裹压缩核酸片段形成致密小颗粒, 使整个复合物呈电中性或带正电荷, 有利于核酸片段与带负电荷的细胞结合; 被 PEI 紧密包裹压缩的核酸片段可免受核酸酶的降解, 稳定性增强; 另外, PEI 携带大量的氨基, 具有“质子海绵效应”易使携带的核酸进入细胞质而具有较高的表达效率^[1,12-14], 因此其转染的核酸表达效率理应优于 PLL 等聚阳离子多肽。本项目组曾将 SPA 与 PLL 共价交联制备了 SPA-PLL 交联物, SPA-PLL 交联物显示出压缩复合 DNA 的能力^[3-4]。本文研究显示, SPA-PEI 交联物能较好地中和质粒 DNA 或 DzTi 的负电荷, 形成电中性或带正电荷的 SPA-PEI/DNA 片段复合物, 并且能包裹压缩 DNA(图 6), 具有 PEI 特异性, 其活性由 SPA-PEI 交联物中 PEI 结构所赋予; SPA-PEI 交联物包裹压缩 DNA 能力近于游离 PEI(图 6), 提示 PEI 与 SPA 的化学交联对 PEI 的活性无明显影响。

基于 SPA-PEI 交联物的核酸转移系统由三部分构成: IgG 抗体, SPA-PEI 交联物和核酸片段。其中 SPA-PEI 交联物起着“桥梁”或“接头”作用, 为该抗体靶向性核酸转移系统的关键组分, 它也可以被认为有两条“臂”: 一条“臂”即 SPA, 可与 IgG 抗体非共价连接, 能避免抗体的活性受损等问题; 另一条“臂”即 PEI, 能中和预导入的核酸片段的负电荷, 包裹压缩核酸片段形成致密颗粒, 使整个复合物电荷呈中性或带正电荷有利于进入细胞, 并且易使携带的核酸逃逸内吞体进入细胞质, 因此具有较高的表达效率^[1-2]。

参考文献

- [1] 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 U S A, 1995, 92(16): 7297-7301.
- [2] Jiang QY, Lai LH, Shen J, et al. Gene delivery to tumor cells by cationic polymeric nanovectors coupled to folic acid and the cell-penetrating peptide octaarginine[J]. Biomaterials, 2011, 32(29): 7253-7262.
- [3] 刘晓芬, 刘云, 张萃, 等. 一种新型抗体(下转第 3244 页)

后固定对 Feulgen 染色是有作用的,可以影响细胞核大小,以及 DNA 对酸和染料的接触。散点图上的“J”形细胞分布是由不完全染色引起的。大的细胞核被完全染色,小的细胞核只有部分被染色,过小的细胞核不利于细胞核 DNA 含量的测定^[15-16]。醛类固定液中的甲醛对染色有影响。甲醛的含量会影响染色深浅和细胞核大小。但是,甲醛会与硫堇结合,破坏硫堇染色,使染出的颜色偏黄绿色,并产生沉淀。因此,细胞片进入染液之前,要把固定液彻底冲洗干净,避免固定液污染硫堇染液。

综上,根据细胞核的结构特点,采用醛类固定液进行后固定,硫堇对细胞核 DNA 染色,与细胞学染色相结合,获得了良好的染色效果,为后续的多技术联合诊断提供依据。此外,DNA 定量分析系统(DNA-ICM)能测定多种细胞核形态参数,如球形度、偏心率、核致密度等。这些大数据有待科学工作者进一步挖掘,以广泛、深入了解不同固定液的作用机制。

参考文献

- [1] Biesterfeld S, Beckers S, Del Carmen Villa Cadenas M, et al. Feulgen staining remains the Gold standard for precise DNA image cytometry[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(1): 53-58.
- [2] Barlogie B, Drewinko B, Schumann J, et al. Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man[J]. *Am J Med*, 1980, 69(2): 195-203.
- [3] Bremner JF, Brakenhoff RH, Broeckaert MA, et al. Prognostic value of DNA ploidy status in patients with oral leukoplakia[J]. *Oral Oncol*, 2011, 47(10): 956-960.
- [4] Collin F, Salmon I, Rahier I, et al. Quantitative nuclear cell image analyses of thyroid tumors from archival material[J]. *Hum Pathol*, 1991, 22(2): 191-196.
- [5] 韩永良,涂露霞,王洁. 常规细胞学与 DNA 定量分析联合诊断在宫颈 CINⅢ及以上级别病变中的应用[J]. *诊断病*

理学杂志, 2015, 22(10): 631-633, 650.

- [6] 王春兰, 仲玉英, 耿建祥, 等. 967 例女性宫颈细胞 DNA 定量检测的临床研究[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(29): 4959-4962.
- [7] 苏杰, 陶伟, 张培, 等. 细胞 DNA 定量分析技术在尿路上皮癌诊断中的应用价值[J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(5): 750-753.
- [8] 孙海梅, 尚宏伟, 张立新, 等. 不同固定液对大鼠脾石蜡切片 HE 染色标本的影响[J]. *中国医学装备*, 2011, 8(10): 48-50.
- [9] 李晶晶, 朱鸿, 施彩虹. 三种方法对大鼠视网膜固定效果的比较研究[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2011, 31(8): 1105-1107.
- [10] 杨群, 胥维勇, 何娟, 等. 不同固定液冷冻切片 HE 染色质量的对比观察[J]. *实用医院临床杂志*, 2010, 7(3): 69-70.
- [11] 万鸿飞, 周全, 张盛忠, 等. 固定时间对不同组织染色的影响[J]. *诊断病理学杂志*, 2011, 18(6): 476.
- [12] 刘成龙, 余琦, 周会芹, 等. 7 种固定液对冷冻组织切片固定效果的比较[J]. *诊断病理学杂志*, 2010, 17(2): 138.
- [13] 黄宏森, 张超, 郭晓珍, 等. 不同固定液及固定时间对小鼠肝组织结构的影响[J]. *广州医学院学报*, 2007, 35(2): 65-68.
- [14] 郭志杰. 病理制片中固定液的选择[J]. *中国医药导报*, 2009, 6(6): 146, 149.
- [15] 魏清柱, 夏潮涌, 黄中新, 等. 光衍射现象对细胞核 DNA 含量检测的影响[J]. *中国体视学与图像分析*, 2001, 6(2): 78-82.
- [16] 魏清柱, 夏潮涌, 刘江欢. 染色质浓缩对细胞核 DNA 含量检测的影响[J]. *中国体视学与图像分析*, 2007, 12(2): 123-125.

(收稿日期: 2016-01-10 修回日期: 2017-03-10)

(上接第 3240 页)

- 导向核酸转移系统关键组分的制备及鉴定[J]. *广东药学院学报*, 2015, 31(3): 372-377.
- [4] 刘晓波, 余学清, 李艳艳, 等. CD44 抗体靶向绿色荧光蛋白质粒导入系统的构建及其特异性转染大鼠肾小管上皮细胞的观察[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(6): 1232-1234.
- [5] Carlson J, Drevin H, Axen R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation[J]. *Biochem J*, 1978, 173: 723-737.
- [6] 李经忠, 王青青, 余海, 等. 聚乙烯亚胺载体介导的基因转移[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2004, 33(3): 229-234.
- [7] Merdan T, Callahan J, Petersen H, et al. Pegylated Polyethyleneimine-Fab' antibody fragment conjugates for targeted gene delivery to human ovarian carcinoma cells[J]. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14: 989-996.
- [8] Yolken RH, Leister FJ. Staphylococcal protein A-enzyme immunoglobulin conjugates: versatile tools for enzyme immunoassays[J]. *J Immunol Methods*, 1981, 43(2): 209-

218.

- [9] Wu GY, Wu CH. Specific inhibition of hepatitis B viral gene expression in vitro by targeted antisense oligonucleotides[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 12436-12439.
- [10] Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(10): 4429-4432.
- [11] Puls R, Minchin R. Gene transfer and expression of a non-viral polycation-based vector in CD4⁺ cells[J]. *Gene Ther*, 1999, 6(10): 1774-1778.
- [12] 王艳波. 新型 PEI 衍生材料的合成及在肿瘤基因递送中的应用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [13] 刘晓芬, 刘晓波. 靶向性聚乙烯亚胺作为基因载体的研究现状[J]. *国际药学研究杂志*, 2015, 42(4): 478-482, 487.
- [14] 刘晓芬. 一种新型抗体导向核酸载体的初步研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2015.

(收稿日期: 2017-03-10 修回日期: 2017-04-16)