聚酰胺-胺树枝状高分子的聚乙二醇改性 及作为基因载体的性能

王 持,潘仕荣*,吴红梅,温玉婷,曾 昕,冯 敏

(中山大学附属第一医院, 广东 广州 510080)

摘要:以IDPI为偶联剂,由相对分子量2000的甲氧端基聚乙二醇 (mPEG-2k)和5代聚酰胺-胺 (PAMAM-G5) 通过二步法合成了聚酰胺-胺-聚乙二醇 (PAMAM-PEG)共聚物。红外光谱和¹H NMR 谱分析证实了共聚物的生 成,并计算出 2 个共聚物的聚乙二醇 (PEG)结合率分别为 10%和 30%。MTT 法的结果发现, PEG 修饰后共聚物 的细胞毒性明显降低,随 PEG 结合率的提高,毒性下降更明显。凝胶阻滞电泳说明, PAMAM-PEG 可以与 DNA 结合形成复合物。动态光散射的测定数据证明,当 N/P≥50 时,共聚物/DNA 复合物的粒径在 150~200 nm, zeta 电位在 10~25 mV。基因转染的结果表明,在 N/P≤50 时,PAMAM-PEG 共聚物的基因转染率稍低于 PAMAM-G5, 但可以通过提高 N/P 值或延长转染时间的方法来提高转染率。综合考虑毒性和转染率,PAMAM-PEG-13 比 PAMAM-PEG-39 的改性效果更好。

关键词: 基因载体; 树枝状高分子; 聚乙二醇; 细胞毒性; 转染 中图分类号: R944 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2011) 01-0102-07

PEGylation of polyamidoamine dendrimer and the properties for gene vectors

WANG Chi, PAN Shi-rong^{*}, WU Hong-mei, WEN Yu-ting, ZENG Xin, FENG Min

(The First Affiliated Hospital, Sun Yet-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Polyamidoamine-polyethylene glycol (PAMAM-PEG) copolymers were synthesized using IPDI as coupling reagent by two-step method. The copolymers were characterized by IR spectrum and ¹H NMR spectrum, and the PEG conjugating ratios of the copolymers were calculated equal to 10% and 30% separately. MTT assay indicated that after PEGylation a lower cytotoxicity of the copolymers could be found, and with increasing PEG conjugating ratio the cytotoxicity decreased obviously. Agarose gel retardation assay demonstrated that PAMAM-PEG copolymers could be combined with DNA and PAMAM-PEG/DNA complexes were prepared by self-assembly. DLS measurement showed that when N/P \geq 50, the particle size of copolymer/ gene complexes was in a range of 150–200 nm, and the zeta potential was in a range of 10–25 mV. *In vitro* gene transfection illustrated that when N/P \leq 50, the gene transfection efficiency of PAMAM-PEG copolymers was a little less than that of PAMAM-G5, but the transfection efficiency aspects PAMAM-PEG-13 was more effect than PAMAM-PEG-39 in PEGylation.

Key words: genetic vector; dendrimer; poly(ethylene glycol); cytotoxicity; transfection

收稿日期: 2010-09-06.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30870618).

^{*}通讯作者 Tel: 86-20-87330757, Fax: 86-20-87330396, E-mail: gzpshr @163.com

随着基因治疗的发展,非病毒基因载体的研究 也越来越深入。树枝状高分子聚酰胺-胺 (PAMAM dendrimer) 是近年发展起来的一类重要的聚阳离子 型非病毒型基因载体,它具有三维有序、对称性、单 分散性和功能性等优点。PAMAM 分子的外周含有大 量的伯胺,质子化后能成为正电性基团,容易与负电 性的基因发生结合, PAMAM 分子内部也存在许多空 隙,使其具有负载药物的能力^[1-3]。一般来说, PAMAM 由于表面阳离子密度较大, 在转染过程中作用于细 胞膜的正电位也较大,容易对细胞造成损害,有一定 的细胞毒性^[4]。PEG 作为常用的生物材料,具有无毒、 无免疫原性、优良的生物相容性、极强的亲水性等优 点^[5,6]。实践表明. 经PEG改性 (PEG化或PEGylation) 后的基因载体可以明显减少被体内网状内皮系统 (RES) 的吞噬, 延长基因传递系统在血液循环中的 半衰期。PEG 连接在 PAMAM 表面的伯胺基团上, 表面氨基减少,加上它的屏蔽作用,使表面正电位下 降,细胞毒性有所下降。近年,国内外学者对PAMAM 的 PEG 化进行了研究, Oi 等^[7]提出, 采用 PEG-5000 修饰 PAMAM-G5, PEG 结合率 8% 时的基因转染率最 好。Kim 等^[8]曾报道,采用 PEG-500 或 PEG-750 改性, PEG结合率≤25%时可有效降低毒性,并能保持良好 的水溶性。

PAMAM随着"代"数增加,转染率和细胞毒性 也同时增加^[9]。1~3 代的 PAMAM 毒性很小,但基 因转染率却很低,PEG 改性没有意义;4代 PAMAM 有一定毒性、但改性后使本来就不高的基因转染率 变得更低,使用价值不高;5代 PAMAM 的毒性较大, 单独使用受限制,改性后毒性有很大改善,而转染 率损失在尚可接受的范围。本文采用 mPEG-2k 修饰 PAMAM-G5,制备了两种不同PEG 结合率的PAMAM-PEG 共聚物,通过红外、核磁表征谱确定共聚物的化 学结构;通过粒径和 zeta 电位测定、MTT (四甲基偶 氮唑蓝)细胞毒性试验、凝胶电泳和细胞转染试验 等评价基因传递系统的体外性能,研究不同 PEG 结 合率对 PAMAM 的细胞毒性和转染率的影响,为降低 PAMAM-G5 的细胞毒性提供有效途径。

材料与方法

试剂 丙烯酸甲酯,乙二胺,甲醇,N,N-二甲基 甲酰胺 (分析纯,广州化学试剂厂);聚乙二醇单甲 醚 (mPEG-2k, *M*_r为2000, Fluka公司);异佛尔酮二 异氰酸酯 (IPDI,广州市汇采涂料化学品有限公司); 二月桂酸二丁基锡 (DBTL, 广东丽宝涂料助剂公司); 四甲基偶氮唑蓝 (Sigma 公司); RPMI 1640 培养基, 小牛血清, 二甲基亚砜 (Gibco 公司)。

细胞 Bel 7402 肝癌细胞 (中山大学北校区动物实验中心提供)。Bel 7402 肝癌细胞在含 10% 小牛血清, 100 u 青霉素、链霉素双抗的 RPMI 1640 培养基中培养,在 37℃, 5% CO₂的培养箱中生长。当细胞生长到高密度 (相连贴壁)时,将细胞洗脱分散,稀释,继续传代。

基因 增强型绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFP-C1 (华西医科大学微生物实验室提供)。

PAMAM-G5的制备 PAMAM的合成采用发散 法^[10, 11]。乙二胺与过量的丙烯酸甲酯在 25 ℃,发生 加成 (Michael) 反应 48 h,生成-0.5代的甲酯端基的 PAMAM,再与过量的乙二胺在 25 ℃,发生酰胺化反 应 48 h,生成端氨基的 0代 PAMAM。加成反应和酰 胺化反应如上反复交替进行,PAMAM 的代数逐步 升高,随着分子量的增加,反应时间适当延长,最后 得到 5代的 PAMAM (G5.0)。每步结束后,使用旋转 蒸发器低温减压去除甲醇和过量的反应试剂。将 PAMAM-G5.0 粗品溶解于适量蒸馏水,装入截留分子 量 10 000 的透析管内,于蒸馏水中透析 48 h,每 12 h 更换透析液,以除去低分子杂质,冷冻干燥,得到淡 黄色透明的黏稠状的 PAMAM-G5.0 纯化合物。

PAMAM-PEG共聚物的制备 mPEG-2k 的氯仿 溶液和 10 倍摩尔的 IPDI 的氯仿溶液中加入 0.6% (v/v) DBTL,反应物在 75 ℃下回流 10 h,产物倒入石油醚 中沉淀,再经多次氯仿溶解和石油醚沉淀,除去未反 应的 IPDI 和 DBTL,真空干燥,最后得到白色固体异 氰酸酯单端基聚乙二醇 (mPEG-NCO)。将适当摩尔 比的 mPEG-NCO 与 PAMAM 分别溶解于脱水处理的 *N*,*N*-二甲基二酰胺溶液中,60 ℃搅拌反应 24 h,产物 用大量乙醚沉淀,再经多次溶解和沉淀纯化,干燥, 得到 PAMAM-PEG 共聚物 (图 1)。使用 EQUINOX 55 傅里叶变换红外光谱仪 (德国 Bruker 公司)测定共聚 物的 IR 谱,使用 AVANCE 核磁共振谱仪 (德国 Bruker 公司,400 Hz)测定共聚物的 ¹H NMR 谱,表征共聚 物的化学结构和组成。PEG 的结合率 = *X*/128×100%, *X* 为修饰后每个 PAMAM 分子结合的 PEG 分子数。

PAMAM-PEG 的毒性评价 以 PAMAM G5.0 为阳性对照组,无血清的 RPMI 1640 溶液为阴性对 照组, PAMAM-PEG 为受试组,将 PAMAM G5.0 和 PAMAM-PEG 样品分别溶解于 RPMI 1640 培养液中 形成系列浓度的溶液: 0.80、0.60、0.50、0.40、0.30、



Figure 1 Preparation of PAMAM-PEG copolymers

0.20、0.15、0.10、0.05 和 0.01 mg·mL⁻¹。Bel 7402 细胞接种到 96 孔板中 (2×10⁴ 个/孔),在 37 ℃,5% CO₂培养箱中培育 24 h。待细胞汇合度达 75%~80% 时,吸干孔内培养液,加入无血清 RPMI 1640 溶液培 养 4 h,含 10%小牛血清的培养基再培养 48 h。每孔 加入 MTT 溶液 (5 mg·mL⁻¹在 PBS 中) 20 µL 培养 4 h 后弃上清,再加入 200 µL DMSO 溶解甲臜结晶。使 用 ELISA microplate reader 酶联免疫检测仪 (美国, Bio-Rad 公司)测定每孔 490/620 nm 两波长的吸收度, 由吸收度之差 (ΔA) 计算细胞相对存活率 ($\Delta A_{~gutal}/$ $\Delta A_{~mtxmax}$ ×100%)。取平行 4 孔的实验结果计算平均 值,由存活率评价材料的细胞毒性,存活率越高,表 示细胞毒性越小。

PAMAM-PEG/DNA 复合物的自组装 PAMAM-PEG与DNA 复合物的构建是借助它们的正负电荷相 互作用,采用自组装的方式制得。共聚物与 pEGFP-C1 的比例以 N/P 比 (摩尔比)来衡量,N/P 比中 N 代表 共聚物中的氨基摩尔数,P 代表 DNA 中的磷酸基团 摩尔数。共聚物与 DNA 各自的去离子水溶液以一定 N/P 比例混匀, 蜗旋 30 s, 静置 30 min,即能自组装 成共聚物载体/基因复合物溶液,设 DNA 最终浓度为 20 mg·mL⁻¹。

复合物的凝胶阻滞电泳 配制不同 N/P 比的 PAMAM-PEG/pEGFP-C1 复合物,电泳条件为:1%琼 脂糖 (含 0.5 μg·mL⁻¹溴化乙锭) 作电泳凝胶,1×TBE (Tris-硼酸-EDTA) 缓冲液,100 V 下电泳 30 min。UV 灯下观察凝胶的 DNA 条带,在UVIpro凝胶成像系统 (英国 UVItec 公司)中拍照,并以 PAMAM-G5.0/DNA 复合物作为对照。

复合物的粒径与 zeta 电位 使用 ZetasizerNano Series 90 粒径分析仪 (英国马尔文公司), 动态光散 射法 (DLS) 测量复合物的粒径与 zeta 电位。

PAMAM-PEG的转染实验 用 Qiagen 柱式质粒 抽提试剂盒大量提取基因质粒 pEGFP-C1, 用去离子 水稀释至40 µg·mL⁻¹, 与共聚物的去离子水溶液组装 成一定 N/P 比的复合物溶液。加入含 Bel 7402 细胞 的 24 孔板中进行转染, 在 37 ℃, 5% CO₂ 细胞培养箱 中孵育4h后,弃去共聚物的转染溶液,加入新鲜的 含 10% 胎牛血清的 1640 培养液继续培养 48 h。除去 培养液,在 CKX41 荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司) 下观察绿色荧光蛋白的表达状况, 用图形软件 Image pro plus 5.0 拍摄荧光下细胞图片。将各孔细胞 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 用 0.25% 胰酶 200 µL 消化 2 min, 加入血清培养液 200 µL 中止消化, 离心, 弃 上清液,最后用含 0.5% 多聚甲醛的 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 500 µL 悬浮细胞。流式细胞仪 FACS Caliber System (Becton-Dickinson, San Joes, CA) 测定荧光细 胞的百分数, 求细胞转染率。

结果与讨论

1 共聚物的组成与相对分子质量

利用 IPDI 的异氰酸酯基与 mPEG 的端羟基反应, 生成活化的 mPEG-NCO。再利用 PEG-NCO 的异氰 酸酯端基与 PAMAM 表面的伯胺反应,最后生成 PAMAM-PEG 共聚物。前一反应 IPDI 必须过量,保 证 PEG 分子之间不发生偶联。DBTL 作为催化剂可 降低反应温度和缩短反应时间。

该反应的反应物和生成物的红外光谱见图 2。 mPEG 的红外光谱 (图 2A) 在 2 886 cm⁻¹处出现 C-H 的伸缩振动吸收峰, 1 106 cm⁻¹处出现 C-O 醚键的伸 缩振动峰^[12,13]。PAMAM-G5 的红外光谱 (图 2B) 在 3 306 cm⁻¹处出现 N-H 的伸缩振动峰, 1 635 cm⁻¹处出 现 C=O 的伸缩振动峰 (酰胺 I), 1 558 cm⁻¹处出现 N-H 的伸缩振动峰 (酰胺 II)^[12]。PAMAM-PEG-13 和 PAMAM-PEG-39 两谱图 (图 2C, 2D) 在 3 306、 2 886、1 635、1 558 和 1 106 cm⁻¹都相应出现上述两 种反应物的特征峰,说明它们之间生成了共聚物。 PAMAM-PEG-13 和 PAMAM-PEG-39 谱图外形相似, 只是图 2D 的 1 106 cm⁻¹峰比图 2C 略大一些,因为它 含 PEG 比例多的缘故。

反应物和生成物的¹H NMR 谱图见图 3。mPEG 的谱图 (图 3A) 中, δ 3.65 和 3.38 分别为 PEG 分子内 -CH₂CH₂- 和链端 -CH₃^[7, 12, 14]。PAMAM-G5 的谱图中 (图 3B), δ 3.29、2.82、2.60 和 2.43 表示分子内不同位 置-CH₂-的氢原子。PAMAM-PEG-13 和 PAMAM-PEG-



Figure 2 IR spectrum of PAMAM-PEG copolymers. A: mPEG; B: PAMAM-G5; C: PAMAM-PEG-13; D: PAMAM-PEG-39

39 谱图 (图 3C, 3D) 保留了 mPEG 的δ 3.65 和 3.38, 1.57 处出现的 P 峰为 PAMAM 分子内-CH₂-^[14], 1.26 处出现的 P 峰为 IPDI 脂环上连接的-CH₂-。PAMAM-

PEG-13 和 PAMAM-PEG-39 两谱图都具有相似于 PEG 和 PAMAM 的化学位移,但 3.65/1.57 两峰面积 的比值不同,表明它们有不同的 PEG 结合率。由 PEG 的 δ 3.65 和 PAMAM 的 δ 1.57 峰面积比,可以计算出 PAMAM-PEG 共聚物的 PEG 结合率^[15](表 1)。

2 PAMAM-PEG 共聚物的细胞毒性

MTT 是一种浅黄色粉末,细胞摄取后被细胞质中的线粒体脱氢酶 (琥珀酸脱氢酶为主)氧化成为蓝色甲臜颗粒,用酶标仪测定溶液吸收度值 (A),便可计算细胞存活数。

Lee 等^[9]指出, PAMAM 的毒性随其"代"数提高而增加。本实验结果表明, PAMAM-G5显示一定毒性(图 4)。引入 PEG 链后,两个 PAMAM-PEG 共聚物样品的毒性都比 PAMAM-G5 明显降低, PEG 结合率越大, PAMAM-PEG 的毒性越低, PAMAM-PEG-39的毒性低于 PAMAM-PEG-13。显微镜观察发现,



Figure 3 ¹H NMR spectra of PAMAM-PEG copolymers. A: mPEG; B: PAMAM-G5; C: PAMAM-PEG-13; D: PAMAM-PEG-39

Table 1 The PEG conjugating ratios of PAMAM-PEG copolymers.a: Determined by ¹H NMR spectrum; b: Theoretical value ofperipheral amino groups on PAMAM-G5 is 128

Copolymer	Fidding NCO/ NH ₂ by mol		Composition in PAMAM-PEG copolymer by mol		PEG conjugating	Relative molecular
	mPEG-2k-NCO	PAMAM-NH ₂	mPEG-2k ^a	PAMAM-NH2 ^b	ratio/%	mass of copolymer
PAMAM-PEG-13	1	8	13	115	10	4.9×10 ⁴
PAMAM-PEG-39	1	1	39	89	30	9.1×10^4

PAMAM-G5 样品细胞破裂明显,而 PAMAM-PEG-13 和 PAMAM-PEG-39 的细胞则相对完好。用 PEG 改性 PAMAM 后,表面氨基数减少,加上 PEG 链的屏蔽作用,减轻了 PAMAM 对细胞膜的破坏,降低了细胞毒性,改善了共聚物的生物相容性^[5]。



Figure 4 Viability of Bel 7402 cells at different concentration of polymers after incubation for 24 h

3 PAMAM-PEG 共聚物与基因的结合

使用凝胶阻滞电泳可以评价共聚物与基因的结合能力^[15]。随着 N/P 比的提高,即复合物中的正电荷 增多,共聚物对基因的结合能力增大,达到一定值后 能实现与基因完全结合,此时在电泳条件下看不到 分离出来的蛋白泳带。图 5 表明, PAMAM-G5/DNA 在 N/P≥0.8 时能完全结合 DNA, PAMAM-PEG-13/ DNA 在 N/P≥2.2 时也能完全结合 DNA, 而 PAMAM-PEG-39/DNA 在 N/P≥2.5 时才可完全结合 DNA。可 见, PAMAM-G5 结合 DNA 的能力最强,随着修饰的 PEG 量增多,结合 DNA 能力下降,这是引入 PEG 链 后降低表面正电荷强度的结果。

4 PAMAM-PEG/DNA 复合物的粒径和 zeta 电位

N/P 比很小时聚合物不足以完全压缩 DNA, 只能部分压缩, 形成松散的结构。随着 N/P 比的增大, 聚合物压缩 DNA 能力逐渐增强, 粒子变得紧密, 粒径有所减小。随着 N/P 值增大, zeta 电位升高, 达到一定 N/P 值后, zeta 电位趋于稳定 (图 6)。N/P 值太高会使细胞毒性增大, 影响转染效果。在相同 N/P 值时, PAMAM-G5/DNA 的粒径最小, zeta 电位最大; PAMAM-PEG-39/DNA 的粒径最小, zeta 电位最大; PAMAM-PEG-13/DNA 粒径和 zeta 电位都居中。引入 PEG 链后, PEG 取代了部分表面的伯胺基团, 正电荷密度下降, 致使 zeta 电位值下降, 对 DNA 的压缩能力略有下降, 粒径稍有变大。当 N/P≥50 时, 共聚物/DNA 复合物的粒径为 150~200 nm, zeta 电位在



Figure 5 Agarose gel retardation assay of PAMAM-PEG/DNA complexes at different N/P ratios. A: PAMAM-G5; B: PAMAM-PEG-13; C: PAMAM-PEG-39

10~25 mV, 此范围有利于复合物对基因的传递。

5 PAMAM-PEG/DNA 复合物的体外转染

由图7A可见,对于PAMAM-G5,N/P值上升,转 染率上升,在N/P=50时达到最大值,随后N/P值继 续上升,转染率反而下降,这是因为高 N/P 值下,表面 电位提高,其细胞毒性增加引起部分细胞死亡的缘 故。对于 PAMAM-PEG-13 和 PAMAM-PEG-39, N/P 值上升,转染率上升,在N/P=80时达到最大值,以 后才随 N/P 值上升而下降。当 N/P≤50 时, PAMAM-PEG-13 和 PAMAM-PEG-39 的转染率小于 PAMAM-G5。然而,在N/P=80时,2个PAMAM-PEG的转 染效率与 PAMAM-G5 相似, 直到 N/P = 100 时, 2 个 PAMAM-PEG 的转染效率超过 PAMAM-G5。这证明 了 PAMAM-PEG 比 PAMAM-G5 的生物相容性更好, 即使在高的 N/P 值下也不会对细胞产生很大的损害, 仍保持良好的转染效率。PAMAM-PEG-39 由于 PEG 的结合率较大,正电荷密度降低明显,转染效率低于 PAMAM-PEG-13。此外,转染时间对转染率也有影响, 随着转染时间的延长, PAMAM-G5 样品在 Bel 7402 细胞的转染率下降十分明显,而 PAMAM-PEG-13 样 品在 6 h 达到最佳转染率, 6 h 后转染率只有缓慢下降, 表现出转染对时间的良好稳定性。PAMAM-PEG-39 和 PAMAM-PEG-13 类似、只是前者的转染率低于后



Figure 6 Particle size and zeta potential of polymer/DNA complexes. A: Particle size distribution of PAMAM-G5/DNA complexes at N/P = 100; B: Particle size distribution of PAMAM-PEG-13/DNA complexes at N/P = 100; C: Particle size distribution of PAMAM-PEG-39/DNA complexes at N/P = 100; D: Particle sizes of polymer/DNA complexes at different N/P ratios; E: Zeta potential of polymer/DNA complexes at different N/P ratios



Figure 7 Transfection of polymer/DNA complexes in Bel 7402 cells. A: *In vitro* gene transfection efficiency; B: Fluorescence images of transfected Bel 7402 cells; C: Flow cytometry analyzed graphs

者。以上结果表明, PEG 的引入虽然降低了 PAMAM 的表面电荷, 使转染率有所降低, 但可以通过提高 N/P 值和延长转染时间的方法提高转染率, 使转染率的 降低得到一定补偿。实验结果表明, PAMAM-PEG-13 比 PAMAM-PEG-39 的改性效果更好。

结论

以 IDPI 为偶联剂, 由 mPEG-2k 和 PAMAM-G5 可以通过二步法合成 PAMAM-PEG 共聚物, 红外 光谱和 ¹H NMR 谱证实了共聚物的结构, 并计算出 PEG 的结合率。PAMAM 用 PEG 改性后, 细胞毒性明 显降低, 且随 PEG 结合率的提高, 毒性下降更明显。 PAMAM-PEG 共聚物可以与 DNA 自组装形成复合物, 其粒径在 200 nm 左右, zeta 电位在 10~25 mV, 表现 出良好的基因载体特性。在 N/P≤50 时, PAMAM-PEG 共聚物的基因转染率稍低于 PAMAM-G5, 但可以通 过提高 N/P 值或延长转染时间的方法提高转染率。总 之, 作为基因载体, PAMAM-PEG 细胞毒性能有效降 低, 但转染率也有所降低, 引入少量 (10%) PEG 改 性的效果更为显著。

References

- Svenson S, Donald A, Tomalia DA. Dendrimers in biomedical applications — reflections on the field [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57: 2106–2129.
- [2] Cheng YY, Xu ZH, Ma ML, et al. Dendrimers as drug carriers: applications indifferent routes of drug administration [J]. J Pharm Sci, 2008, 97: 123–143.
- [3] Kong SY, Tang GT, Pei YY, et al. PEGylated polyamidoamine dendrimer/methotrexate complex: pharmacokinetics and antitumor activity in normal and tumor-bearing rodents [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2009, 44: 85–90.
- [4] Duncana R, Izzo L. Dendrimer biocompatibility and toxicity
 [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57: 2215–2237.
- [5] Yang H, Lopina ST, DiPersio LP, et al. Stealth dendrimers for drug delivery: correlation between PEGylation, cytocompatibility,

and drug payload [J]. J Mater Sci Mater Med, 2007, 19: 1991–1997.

- [6] Zhang W, Pan SR, Zhang X, et at. In vitro study on polyethylene glycol-chitosan copolymer as a gene delivery vector [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2008, 43: 848-854.
- [7] Qi R, Gao Y, Tang Y, et al. PEG-conjugated PAMAM dentrimers mediate efficient intramuscular gene expression [J]. AAPS J, 2009, 11: 395–405.
- [8] Kim Y, Klutz AM, Jacobson KA. Systematic investigation of polyamidoamine dendrimers surface-modified with poly (ethylene glycol) for drug delivery applications: synthesis, characterization, and evaluation of cytotoxicity [J]. Bioconjug Chem, 2008, 19: 1660–1672.
- [9] Lee CC, MacKay JA, Frechet JM, et al. Designing dendrimers for biological applications [J]. Nat Biotech, 2005, 23: 1517– 1526.
- [10] Cheng YY, Xu ZH, Ma ML, et al. Dendrimers as drug carriers: applications indifferent routes of drug administration [J]. J Pharm Sci, 2008, 97: 123–143.
- [11] Zhao G, Ye L, Zhang JF, et al. Synthesis of biomaterial polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and preliminary biological evaluation of biocompatibility *in vitro* [J]. Chin J Biomed Eng (中国生物医学工程学报), 2005, 24: 750-754.
- [12] Khambere H, Gautam SP, Karthikeyan C, et al. A new approach for PEGylation of dendrimers [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20: 4279–4281.
- [13] Chandrasekar D, Sistla R, Ahmad FJ, et al. Folate coupled poly(ethylene glycol) conjugates of anionic poly(amidoamine) dendrimer for inflammatory tissue specific drug delivery [J]. J Biomed Mater Res, 2007, 82A: 92–103.
- Weilun K, Kun S, Rongqin H, et al. Gene delivery targeted to the brain using an angiopep-conjugated polyethylene glycolmodified polyamidoaminu dendrimer [J]. Biomaterials, 2009, 30: 6976–6985.
- [15] Luo D, Haverstick K, Belcheva N, et al. Poly(ethylene glycol)-conjugated PAMAM dendrimer for biocompatible highefficiency DNA delivery [J]. Macromolecules, 2002, 35: 3456– 3462.