

# 基因传输载体综合实验设计

程 度, 李晓霞, 乔立红

(中山大学材料科学与工程学院, 广州 510275)



**摘 要:** 选用 *N,N*-碳酰二咪唑 (CDI) 方法活化聚乙二醇 (PEG) 的羟基, 制备 PEG 修饰的聚乙烯亚胺 (PEG-PEI), 不仅具有较高的产率, 还能降低实验成本和简化操作步骤, 使基因传输载体综合实验在本科生阶段开展具有可行性。基因传输载体综合实验设计也纳入了载体聚合物的制备与表征、纳米粒子组装与表征、细胞毒性评价、载体负载和传输核酸能力的评价, 使学生能较为系统地了解 and 掌握基因传输载体材料的设计、制备、组装和评价等方面的实验方法和技能。

**关键词:** 基因传输载体; CDI 活化; 功能评价; 生物材料

中图分类号: C 45 文献标志码: A

文章编号: 1006-7167(2020)08-0022-05

## Design of Integrated Experiment for Polymeric Gene Delivery Carrier

CHENG Du, LI Xiaoxia, QIAO Lihong

(School of Materials Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** To improve successful probability and simplify operation procedure, the CDI, an easily available reagent for carboxyl group activation, is used to activate hydroxyl-terminated polyethyleneglycol (PEG-OH). The PEG-grafted PEI polymer is prepared via the formation of amido linkage between PEG-CDI and PEI under mild condition, it allows to be applied as an integrated biomaterials experiment for students. Nanocomplex complexing pDNA is fabricated and characterized using several approaches including dynamic light scattering (DSL), cytotoxicity, and gene expression analyses. The integrated experiment is favor of training the student's research ability and learning the knowledge and skills about the design, fabrication, and functional evaluation of biomaterials.

**Key words:** gene delivery carrier; CDI activation; functional evaluation; biomaterials

## 0 引 言

随着现代生物医学技术的快速发展, 基因组测序、生物信息学以及基因编辑等新技术和新策略不断涌现, 这些技术极大推进基因治疗等技术的发展, 为肿瘤等重大疾病以及众多遗传病的治疗提供了有效手段。目前, 向细胞内传输核酸分子的载体材料主要有病毒载体和非病毒载体两大类。虽然病毒载体具有传输效

率高的优点, 但其较强免疫原性也限制了其临床应用。基于高分子材料的基因传输载体因其功能多样性、无免疫原性和基因传输效率高的特点, 在临床基因治疗方面展示出很好的应用前景。

经过近 20 年的发展, 根据临床的需求, 高分子材料基因传输载体发展出了多种类型的载体材料, 不仅满足了低毒性和生物可降解的临床需求<sup>[1-2]</sup>, 也发展出具有体内长循环、生理微环境 (如 pH、还原性、酶) 响应性、诊疗一体化等功能多样的基因输送载体<sup>[3-6]</sup>。而且随着生物材料学科的发展, 新的基因输送新技术和载体体会不断涌现, 为生物医学的发展带来新的变革。为了使学生对基因载体的设计、材料制备方法、纳米粒子组装及其生物功能评价有较为全面的认知和掌握, 本文选择经典的高分子基因载体材料—聚乙二醇-聚乙

收稿日期: 2019-12-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (21875289); 科技部国家重点研发计划国际合作交流重点项目 (2016YFE0117100)

作者简介: 程 度 (1972-), 男, 河南鹤壁人, 博士, 副教授, 研究方向为生物医用高分子材料。

Tel.: 020-84112172; E-mail: chengdu@mail.sysu.edu.cn

烯亚胺设计综合实验。

## 1 实验部分

### 1.1 实验试剂

聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI,  $M_n = 25$  kDa) 聚乙二醇单甲醚 (mPEG-OH,  $M_n = 2$  kDa) 溴化氢的醋酸溶液 (33%) 对甲苯磺酰氯 (p-toluenesulfonyl chloride, TsCl), N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS), N,N'-二环己基碳二亚胺 (dicyclohexylcarbodiimide, DCC), 1-乙基-(3-二甲氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐 (N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC), 二甲基亚砜 (DMSO) 均为分析纯, 购于 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); 其他化学试剂均购于广州化学试剂厂, 用时根据需要经过干燥纯化处理或直接使用。透析袋 (MWCO: 1, 3.5, 14 kDa) 购于上海绿鸟生物科技有限公司。MTT 检测试剂盒购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 细胞培养所用胰蛋白酶和胎牛血清 (FBS) 购自美国 Invitrogen 公司 (Carlsbad, CA, USA); 人卵巢癌 SKOV3 细胞购自中科院上海细胞库, 由本教学实验室冻存保存。表达绿色荧光蛋白的质粒 DNA (pDNA) pcDNA3.1-EGFP 购自上海康朗生物科技

有限公司。

### 1.2 实验仪器

氢谱<sup>1</sup>H-NMR: 采用 VARIAN Mercury-Plus 300 型核磁共振仪进行分析, 使用 CDCl<sub>3</sub> 作为溶剂。凝胶电泳装置: EPS-100 电源、HE-120 电泳槽和 Tanon-1600 成像系统购自上海天能科技有限公司。粒径和表面电位测定: 使用 BI-200 SM 动态光散射系统 (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY), 在 25 °C 下检测。散射光以 90° 检测, 自动加速器上收集。倒置荧光显微显微镜采用徕卡 DMi8 (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL 60089 United States)。CO<sub>2</sub> 细胞培养箱采用 377 型号 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)。

### 1.3 单甲醚聚乙二醇-聚乙烯亚胺 (PEG<sub>2k</sub>~PEI<sub>25k</sub>) 聚合物的制备

(1) 用 N,N'-羰基二咪唑 (CDI) 活化单甲醚聚乙二醇 (mPEG<sub>2k</sub>-OH), 反应路线如图 1 所示。mPEG<sub>2k</sub>-OH (4.0 g) 加入到 250 mL 圆底烧瓶中, 70 °C 条件下真空干燥 4 h, 加入 30 mL 四氢呋喃溶解 mPEG<sub>2k</sub>-OH, 再加入 3.2 g (10 eq.) 的 CDI, 在氩气保护下室温反应 24 h 后, 加入无水乙醚沉淀产物, 减压过滤得到沉淀, 干燥得白色粉末状产物, 产率 89%。

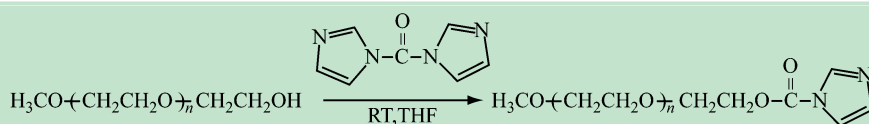


图1 PEG-CDI 的合成路线

(2) mPEG<sub>2k</sub>-CDI 和 PEI<sub>25k</sub> 上的氨基反应制备阳离子两嵌段聚合物 PEG<sub>2k</sub>-PEI<sub>25k</sub>, 反应路线如图 2 所示。在 50 mL 圆底烧瓶中用二甲基亚砜 (DMSO, 20 mL) 溶解 PEI<sub>25k</sub> 聚合物 (1 g), 再加入上步制备的 mPEG<sub>2k</sub>-

CDI 800 mg (10 eq.) 室温下搅拌反应过夜。所得溶液在纯水中透析 48 h, 每 4 h 换一次蒸馏水, 透析袋规格为: MWCO = 14 kDa。冷冻干燥后得白色产物, 产率 83%。

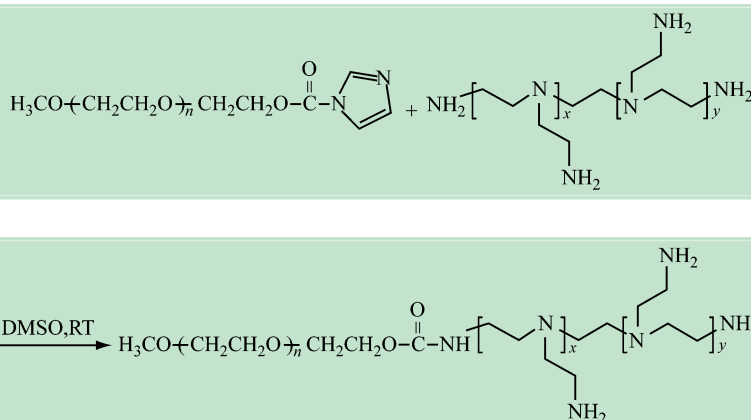


图2 阳离子聚合物 PEG<sub>2k</sub>-PEI<sub>25k</sub> 的合成路线图

### 1.4 负载 pDNA 纳米载体的制备

本综合实验所使用的 pDNA 为表达绿色荧光蛋白

的质粒 pcDNA3.1-EGFP, 由综合实验室提前制备。质粒 DNA 溶于 TE 缓冲液中, 浓度为 1 g/L。一定量

pDNA(如 1  $\mu\text{g}$ ) 加入到已知量的载体聚合物 PEG<sub>2k</sub>-PEI<sub>25k</sub> 的溶液中,按照阳离子聚合物中氨基与 pDNA 磷酸根的摩尔比(N/P)为 0、0.5、1、2、4、8、10、20 的条件,将聚合物和 pDNA 相混合,加入去离子水定容到一定体积,充分混匀后,室温下振荡孵育 30 min,再静置 10 min,即得不同 N/P 条件下 pDNA 的纳米粒子。

### 1.5 纳米粒子理化性能的评价

(1) 粒径电位的测定。按照 1.4 中的方法制备负载 pDNA 的纳米粒子,用动态光散射系统测定 N/P = 10 时纳米粒子的粒径和 Zeta 电位。温度 25  $^{\circ}\text{C}$ ,入射角 45 $^{\circ}$ 。每组样品均取 5 次测量的平均值。

(2) 聚合物 PEG-PEI 复合 pDNA 的能力。按照 1.4 中的条件,在不同 N/P 下,将聚合物 PEG-PEI 和 pDNA 充分混匀,将混合溶液加入到含 GoldView(DNA 染料)的 1% 琼脂糖凝胶的加样孔中进行电泳分析,100 V 的电压下电泳 20 ~ 30 min,电泳结束后,在紫外灯下观察琼脂糖凝胶中电泳条带。

### 1.6 基因输送性能的评价

(1) 细胞培养。细胞培养基为 RPMI 1640 培养基(添加 10% 胎牛血清和 1% 双抗)的培养条件为 37  $^{\circ}\text{C}$  和 5% CO<sub>2</sub>。当细胞密度达到 80% ~ 90% 时,用胰酶(Trysin 0.25%)消化细胞,进行分瓶传代。

(2) 细胞毒性评价。通过四唑盐比色法(MTT)检测纳米载 pDNA 纳米粒子对细胞的杀伤作用。细胞以 1  $\times 10^3$  /孔的密度接种于 96 孔细胞培养板,培养过夜。次日,弃去原有细胞培养基,更换成不含血清的新鲜培养基,加入不同 N/P 条件下制备的载 pDNA 纳米粒子。进行 MTT 分析时,弃去原有培养基,加入 150  $\mu\text{L}$  不含血清的 RPMI 1640 新鲜培养基,加入 50  $\mu\text{L}$  MTT 溶液(5 mg/mL),在 37  $^{\circ}\text{C}$  下继续孵育 4 h,弃去培养孔中的上清液,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,震荡 5 min,用酶联免疫检测仪(美国国腾)检测 OD<sub>570 nm</sub> 处的吸光度值,按照以下公式计算细胞增殖率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组吸光度值}}{\text{对照组吸光度值}} \times 100\%$$

(3) 基因表达效率评价。将细胞(密度为 1  $\times 10^4$  细胞/孔)接种于 24 孔培养板上,加入 400  $\mu\text{L}$  培养基培养过夜。次日,更换为新鲜培养基,加入不同 N/P 比下制备的载质粒 DNA 的纳米粒子,在 37  $^{\circ}\text{C}$  下继续培养 48 h。倒置荧光显微镜下观察细胞表达绿色荧光蛋白的情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 聚合物材料的制备与表征

将末端羟基 PEG 接枝到 PEI 上,需要对 PEG 上的羟基进行活化。根据综合实验的实际情况和需求,采用一种步骤较少和易于操作的方法活化 PEG 上的羟

基。如图 3(a) 所示,首先用 CDI 活化 PEG,其中化学位移的归属如下:  $\delta = 3.4$  (s, 3H, CH<sub>3</sub>-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-),  $3.65$  (s, 4H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-),  $4.6$  (m, 2H-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O(C=O)-),  $7.05$  (s, 1H, -CO-NCH=CH-N-),  $7.40$  (s, 1H, -CO-N-CH=CH-N-),  $8.12$  (s, 1H, -CO-N-CH=N-)。由  $\delta 3.4$   $\mu\text{m}$  及  $\delta 7.40$   $\mu\text{m}$  两处化学位移的积分面积算出端基转化率为 81%。然后再把 PEG-CDI 偶联到 PEI 上,如图 3(b) 所示,在  $\delta 2.5 \sim 3.5$   $\mu\text{m}$  处出现了 PEI 上 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH- 的质子特征化学位移,同时  $\delta 4.4$   $\mu\text{m}$ ,  $\delta 7.05$   $\mu\text{m}$ ,  $\delta 7.40$   $\mu\text{m}$ ,  $\delta 8.12$   $\mu\text{m}$  等处的化学位移消失,表明 PEG-CDI 已经成功地连接到 PEI 上,其中的咪唑基团已经被作为副产物除掉。

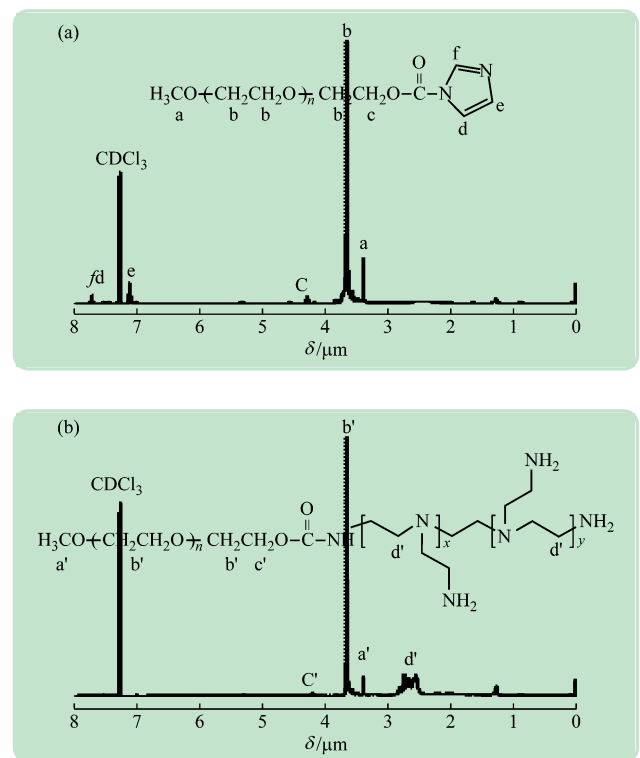


图 3 聚合物 mPEG<sub>2k</sub>-CDI (a) 和 PEG<sub>2k</sub>-PEI<sub>25k</sub> (b) 的 <sup>1</sup>H-NMR 图谱(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

### 2.2 纳米粒子的组装

PEI 聚合物具有枝化结构,携带有伯胺、仲胺和叔胺(图 4(a)),在 pH 7.4 条件下,部分胺基可质子化,携带较强的正电荷,通过静电相互作用与携带负电荷的 pDNA 组装形成纳米粒。根据不同状态 pDNA 在电场下泳动速度和距离的不同,可用凝胶阻滞方法评价 PEG-PEI 复合 pDNA 的能力(图 4(b))。在 N/P  $\leq 4$  时,PEG-PEI 量相对较少,部分 pDNA 仍处于游离状态,形成较窄的 DNA 电泳条带。随着 N/P 的提高,游离 pDNA 条带亮度逐渐降低直至消失,而弥散 DNA 带型则呈逐渐增加而后消失的现象。其原因在于:随着 PEG-PEI 含量的增加,PEI 的正电荷逐步中和 pDNA

的负电荷,使游离的 pDNA 减少;当 PEG-PEI 量仍不足以完全复合 pDNA 时,纳米粒子上的 pDNA 未被完全中和,形成携带不同负电荷的纳米粒子,从而导致

pDNA 在凝胶上呈现出弥散的带型;在  $N/P \geq 8$  时, pDNA 带型完全消失,表明 pDNA 的负电荷已被完全中和, pDNA 在电场下的泳动被阻滞。

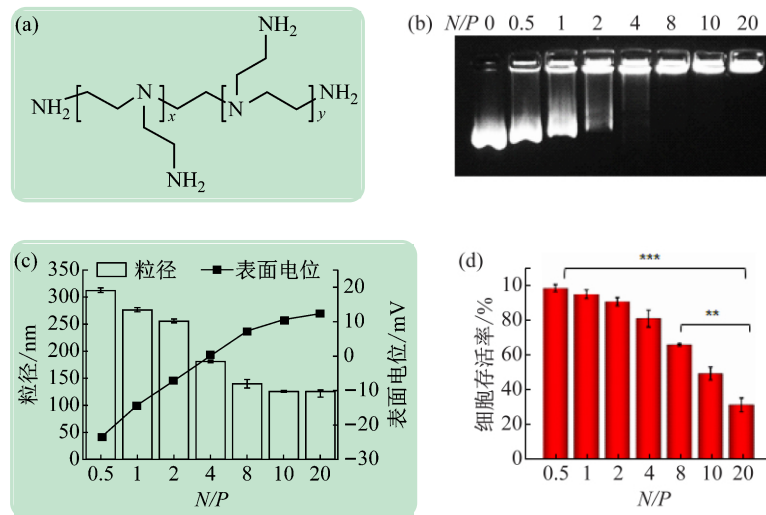


图4 (a) PEI 结构式; (b) 不同  $N/P$  比下所制备纳米粒子的凝胶阻滞电泳; (c) 不同  $N/P$  条件下,所制备纳米粒子的粒径和表面电位; (d) MTT 法评价不同  $N/P$  下所制备纳米粒子的细胞毒性

但是凝胶阻滞并不能对所形成的纳米粒子的表面电位和粒径给予定量表征,而这些是影响纳米粒子转染细胞效率的重要因素。因此,需要进一步通过动态光散射对 PEG-PEI 和 pDNA 所形成纳米粒子的表面电位和粒径进行表征。如图 4(c) 所示,在  $N/P = 0.5$  时,表面电位和粒径分别为  $-23$  mV 和  $313$  nm,表明 pDNA 未被完全复合和压缩,导致粒径偏大和电位偏负;随着  $N/P$  增加到 4,纳米粒子负电位减小直至为 0,粒径呈现减小的趋势;当  $N/P > 4$  时,纳米粒子表面电位的正电性逐渐增加,而粒径逐渐减小;在  $N/P$  在  $10 \sim 20$  时,纳米粒子表面电位和粒径则稳定在  $+10$  mV 和  $125$  nm 左右。

由此可见,当 PEG-PEI 刚好完全中和 pDNA 的负电荷时,并没有很好地压缩 pDNA,未形成较为致密和稳定的纳米粒子;高  $N/P$  下,纳米粒子具有较强的正电位和较小的粒径,有利于提高细胞转染效率。但是,较高正电荷会导致明显的细胞阳离子毒性。因此,需要选择合适  $N/P$ ,合理调控纳米粒子的表面电位和粒径,才能获得较高的转染效率。

### 2.3 基因载体的安全性初步评价

MTT 方法是一种简单实用的评价聚合物细胞安全性的方法,在材料的安全性评价中得到广泛的应用。如图 4(d) 所示,当  $N/P < 2$  时,细胞存活率大于  $90\%$ ,与对照组没有显著差异,当  $N/P > 10$  时,细胞存活率逐渐下降, $N/P = 20$  时,细胞存活率低于  $50\%$ 。

因此,综合考虑表面电位、粒径以及细胞毒性等数据,在  $N/P = 8$  时制备的纳米粒子,具有较为适宜的电位、较小的粒径和较低的细胞毒性,是较为适宜的载基

因纳米粒子制备条件。

### 2.4 基因转染效率的评价

考察不同特性纳米粒子对转染效率的影响。如图 5 所示,用  $N/P = 8$  条件下所制备纳米粒子转染细胞时,表达绿色荧光蛋白的细胞数量最多,而且绿色荧光强度最高;在  $N/P = 0.5$  条件下,所制备纳米粒子为负表面电性和较大的粒径,导致其基因转染效率降低,表达绿色荧光蛋白的细胞数量最少;当  $N/P = 20$  时,所制备纳米粒子转染细胞,虽然表达绿色荧光蛋白的细胞百分比也较高,但是存活的细胞数量明显降低,这表明纳米粒子具有较高的细胞毒性。

## 3 讨论

PEI 的结构单元 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2-$ ) 含有一个可质子化的氮原子,正电性氨基可有效复合和压缩质粒 DNA,而且仲氨和叔氨在酸性条件下的质子海绵效应发挥破溶酶体的作用,这些因素协同提高了 PEI 转染基因的效率。但是,PEI 强正电荷具有较强的细胞毒性和吸附血液或细胞培养基的蛋白,导致转染效率的下降<sup>[7-8]</sup>。PEG 是一种无毒和低免疫原性的水溶性聚合物,具有优良的生物相容性,在药物改性方面有广泛的应用<sup>[9]</sup>,PEG 修饰可降低 PEI 的细胞毒性和减少蛋白在其表面的沉积。在 PEG 修饰改性技术中,采用具有琥珀酰亚胺酯端基、环氧化物端基或醛基端基的活性 PEG 修饰 PEI 是行之有效的方法<sup>[10-11]</sup>。但是这些具有特异性端基活性 PEG 的制备复杂且价格昂贵,限制了其在学生实验中的应用。端羟基 PEG 来源广泛且价格较低,是较为理想的供学生实验使用 PEG 修饰

剂。但是羟基的反应活性较低,需要对其进行活化。已有多项文献报道了活化端羟基 PEG 的方法,如通过丁二酸酐或马来酸酐与羟基反应引入羧基,再用 DCC/NHS 活化羧基,再和 PEI 上的氨基进行酰胺化反应,从而将 PEG 接枝到 PEI<sup>[12]</sup>。但是该方法操作步骤

较多,不利于本科生实验的开展。二异氰酸酯也可作为端羟基 PEG 的活化剂<sup>[13]</sup>,但要经过多次纯化去除干净二异氰酸酯,才能避免残余二异氰酸酯和 PEI 的副反应,也增加了实验操作步骤和难度。

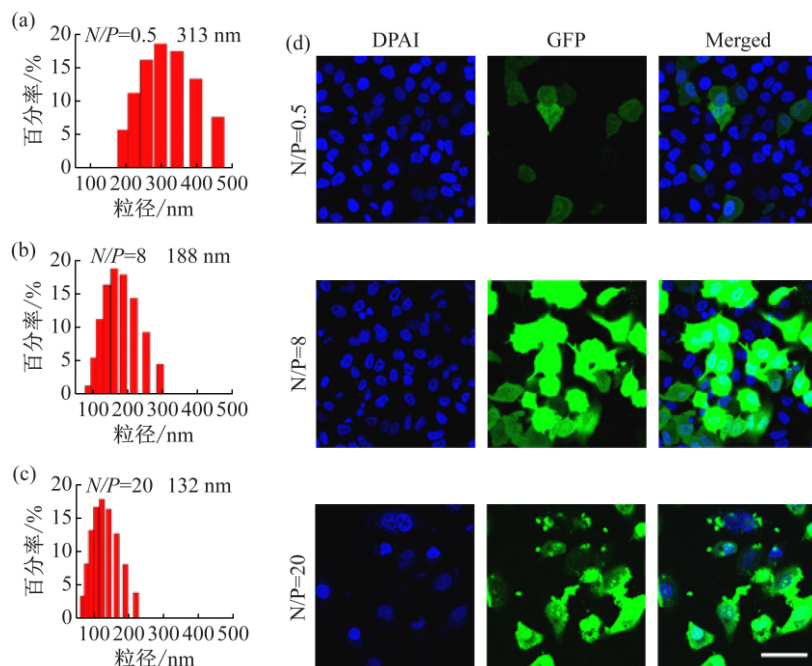


图 5 制备纳米粒子的粒径及其分布及转染细胞的荧光显微成像(细胞核经 DAPI 染色后发蓝色荧光, GFP 蛋白发绿色荧光。图(d)中的标尺为 50  $\mu\text{m}$ )

N,N-碳酰二咪唑(CDI)是一种羧酸活化和甲酰基转移的试剂<sup>[14]</sup>,具有反应活性高、反应后处理简单和易得廉价的特点,常用来合成酰胺类聚合物。与 EDC 和 DCC 等同类试剂相比,CDI 在学生实验中具有更高的应用价值。由于咪唑基团的影响,CDI 中的碳酰基具有非常好的甲酰化反应活性,可与羧酸反应生成具有高反应活性的酰基咪唑。酰基咪唑与胺可在非常温和的条件下生成相应的酰胺<sup>[15]</sup>,可以应用于多肽的合成。

所设计的综合实验选择操作简单且易于掌握的方法来实施,便于学生实验的开展。将实验分解为载体制备与表征、纳米粒子组装与表征、基因的负载与表征和生物功能评价 4 个模块,较为全面体现了基因载体研究的基本内容。通过该综合实验可以使学生对基因载体的制备与评价有较为全面了解,并初步掌握基因载体的研究方法,是对高年级本科生进行科研训练较为适宜的综合实验。

#### 4 结 语

本实验设计通过 CDI 活化 PEG 的羟基来制备 PEG-PEI 聚合物,聚合物和纳米粒子表征结果表明,所制备聚合物可以高效负载 pDNA,并将 pDNA 导入细胞和表达绿色荧光蛋白。实验设计需要使用核磁、动

态光散仪、凝胶电泳和倒置荧光显微镜和细胞培养箱等仪器。可使生物材料专业的学生掌握常见基因载体的制备方法,综合运用材料制备、纳米粒子表征和生物评价等方面的知识解决问题,深化对生物材料设计、结构和应用的认识,巩固理论课所学知识,培养高年级本科生操作能力和研究性科研思维能力,为其后续的学习深造和工作奠定良好的基础。

#### 参考文献(References):

- [1] 古晓晓,杜宝吉,汪尔康,等. 基于纳米材料的基因载体[J]. 化学进展,2015,27(8): 1093-1101.
- [2] Chen J, Wang K, Wu J, et al. Polycations for gene delivery: dilemmas and solutions[J]. Bioconjugate Chemistry, 2018, 30(2): 338-349.
- [3] Li J, Yu X, Wang Y, et al. A reduction and pH dual-sensitive polymeric vector for long-circulating and tumor-targeted siRNA delivery[J]. Advanced Materials, 2014, 26(48): 8217-8224.
- [4] Wu J, Huang J, Kuang S, et al. Synergistic microRNA therapy in liver fibrotic rat using MRI-visible nanocarrier targeting hepatic stellate cells[J]. Advanced Science, 2019, 6(5): 180-189.
- [5] Cheng D, Cao N, Chen J, et al. Multifunctional nanocarrier mediated co-delivery of doxorubicin and siRNA for synergistic enhancement of glioma apoptosis in rat[J]. Biomaterials, 2012, 33(4): 1170-1179.

(下转第 55 页)

件、图像、音频、视频服务器上,这样就完成了非结构化数据文件的迁移。

### 3 结 语

Web 系统非结构化数据经过数据治理后获得的新的扁平化的 Web 系统架构如图 1 所示,最终用户访问新 Web 系统时,如果要获取图像、音频、视频或者其他普通文件等非结构化数据,仅需访问 Web 服务器和数据库服务器各一次,取得 URL 信息后,客户端直接从相应的服务器去获取实际的数据文件,不会给 Web 服务器或数据库服务器带来多次访问的压力,消除了访问瓶颈,提高了系统响应速度。扁平化的 Web 系统结构非常易于横向扩展而无需对程序软件做任何修改,保护了用户投资的同时,也缩短了规模化部署周期。此外,新系统也可以很方便地部署负载均衡设备、CDN(Content Delivery Network,内容分发网络)设备、以及实施静态化页面等 Web 系统优化措施<sup>[15]</sup>,这些为下一步提升 Web 数据的标准化水平、提升数据质量和共享融合水平奠定了坚实的基础,从而为最终迈向良好的数据中心数据生态圈提供了先决条件。

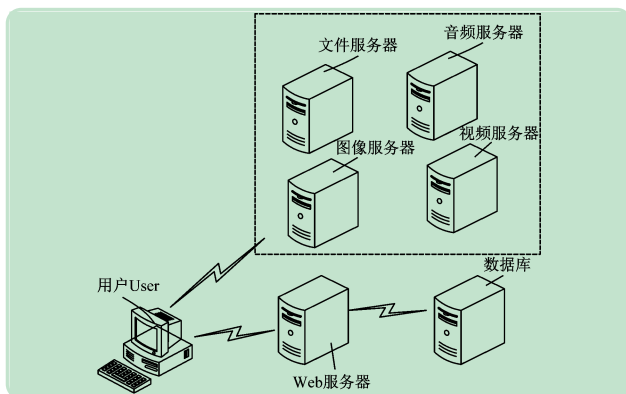


图 1 数据治理后的扁平化 Web 系统架构

(上接第 26 页)

- [6] Huang J, Lin C, Fang J, et al. pH-Sensitive nanocarrier-mediated codelivery of simvastatin and noggin siRNA for synergistic enhancement of osteogenesis [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(34): 28471-28482.
- [7] Liu S, Zhou D, Yang J, et al. Bioreducible zinc (II)-coordinative polyethylenimine with low molecular weight for robust gene delivery of primary and stem cells [J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(14): 5102-5109.
- [8] Liu L, Zheng M, Librizzi D, et al. Efficient and Tumor Targeted siRNA Delivery by Polyethylenimine-graft-polycaprolactone-block-poly(ethylene glycol)-folate (PEI-PCL-PEG-Fo) [J]. Molecular Pharmaceutics, 2016, 13(1): 134-143.
- [9] Yang Z, Gao D, Cao Z, et al. Drug and gene co-delivery systems for cancer treatment [J]. Biomaterials Science, 2015, 3(7): 1035-1049.
- [10] Chen C Y, Li G Y, Zhang L, et al. MicroRNA delivery mediated by PEGylated polyethylenimine for prostate cancer therapy [J].

### 参考文献(References):

- [1] 吴小东,韩建军. 云数据中心基于阈值的虚拟机迁移节能调度算法 [J]. 华中科技大学学报(自然科学版), 2018, 46(9): 30-34.
- [2] 甘似禹,车品觉,杨天顺,等. 大数据治理体系 [J]. 计算机应用与软件, 2018, 35(6): 1-8.
- [3] 熊一君,苗放. 面向数据体系结构的数据性能与价值研究 [J]. 成都大学学报(自然科学版), 2019, 38(1): 47-51.
- [4] 郝志杰,李莉,荣娟. 数据治理在解决“一张表”问题中的实践 [J]. 实验室研究与探索, 2019, 38(12): 261-265, 307.
- [5] 张志强,王伟钧,施达. 一种大容量数据文件抽取算法的优化研究 [J]. 成都大学学报(自然科学版), 2019, 38(1): 52-55.
- [6] 余鹏,李艳. 大数据视域下高校数据治理方案研究 [J]. 现代教育技术, 2018, 28(6): 60-66.
- [7] 吴信东,董丙冰,堵新政,等. 数据治理技术 [J]. 软件学报, 2019, 30(9): 2830-2856.
- [8] 梅兵. 探究统计数据生态圈建设 [J]. 现代信息科技, 2018, 2(1): 174-177.
- [9] 尤宇峰,杨文晖,苗放. 基于云平台的分布式数据注册中心访问性能 [J]. 科学技术与工程, 2018, 18(11): 264-269.
- [10] 潘明明,李丁丁,汤庸,等. 一种基于中间件的异构数据库融合访问方法及系统 [J]. 计算机科学, 2018, 45(5): 163-167.
- [11] 吴秀君. 面向电子政务的 MongoDB 与 MySQL 混合存储策略 [J]. 计算机与现代化, 2014, 30(8): 62-66.
- [12] 车冬娟,周建伟,毛刚. 基于 GPU 的 Base64 并行算法研究 [J]. 福建电脑, 2016, 32(3): 23-24.
- [13] 朱亚锋,程光. 基于时空特性的恶意流量生成方法的研究与实现 [J]. 网络空间安全, 2018, 9(1): 79-85.
- [14] 蒋鹏,李勇鹏,吴锋,等. 基于均值滤波的大规模无线传感网能耗及海量数据去冗余方法研究 [J]. 四川大学学报(工程科学版), 2017, 49(2): 145-151.
- [15] 谏俊昇,邓飞其. 基于混合二进制粒子群的 Web 系统优化算法 [J]. 计算机工程与应用, 2017, 53(23): 224-229.

Open Chemistry, 2018, 16(1): 1257-1267.

- [11] Sung S J, Min S Y, Cho K Y, et al. Effect of polyethylene glycol on gene delivery of polyethylenimine [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2003, 26(4): 492-500.
- [12] Wang Y, Gao S J, Ye W H, et al. Co-delivery of drugs and DNA from core-shell nanoparticles self-assembled from a biodegradable copolymer [J]. Nature Materials, 2006(5): 791-796.
- [13] Tian H Y, Deng C, Lin H, et al. Biodegradable cationic PEG-PEI-PBLG hyperbranched block copolymer: synthesis and micelle characterization [J]. Biomaterials, 2005, 26, 4209-4217.
- [14] Kishikawa K, Nakahara S, Nishikawa Y, et al. A ferroelectrically switchable columnar liquid crystal phase with achiral molecules: superstructures and properties of liquid crystalline ureas [J]. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127(8): 2565-2571.
- [15] Iliiev B, Linden A, Heimgartner H. An unexpected formation of a 14-membered cyclodepsipeptide [J]. Helvetica Chimica Acta, 2003, 86(9): 3215-3234.