

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.01.033

· 专论与综述 ·

PEI 介导的大规模基因瞬时转染研究进展 *

刘少娇¹ 李巍巍¹ 杨黎明² 陈彦田^{1△} 齐念民¹

(1 上海交通大学药学院 上海 200240; 2 泰因生物技术有限公司 海沃德 94540 美国)

摘要: 基因重组蛋白具有巨大的商业和科研价值。近年来,大规模基因瞬时表达(large scale transient gene expression, TGE)技术的出现提供了一种相较于传统筛选稳定细胞株重组蛋白生产工艺而言更加高效(high efficient)和更加节约人力(labor consuming)、物力(cost effective)和时间(time consuming)的解决方案。通过基因瞬时表达技术,可以在短时间内获得毫克至克级别的在分子结构、理化特性和生物学功能等方面都接近于原始存在的蛋白质分子,可以满足细胞信号转导、新药筛选和临床前研究等药物研发前期的阶段对重组蛋白的巨大需求。因此,该技术成为当前研究的热点。阳离子聚合物-聚乙烯亚胺(PEI)是目前报道的工业化、大规模瞬时转染表达重组蛋白领域最广泛使用的基因载体和转染试剂。本文就近年来 PEI 介导的大规模瞬时转染的转染机理、宿主细胞选择以及转染优化措施等各方面的最新研究进展作一综述。

关键词: PEI; 瞬时转染; 大规模; 哺乳动物细胞; 优化

中图分类号: Q78; Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)01-145-05

Progress of Research and Application of PEI-mediated Large-Scale Transient Transfection*

LIU Shao-jiao¹, LI Wei-wei¹, YANG Li-ming², CHEN Yan-tian^{1△}, QI Nian-min¹

(1 School of pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240, China; 2 cBiopharm. Inc, Hayward, 94540, USA)

ABSTRACT: Large-scale gene transient transfection technology has developed in recent years because it is a new way to produce recombinant proteins which can be used in preclinical research and drug screening. Cationic polymers- Polythyleneimine (PEI) has been the most commonly used gene delivery vector in large scale transient transfection for the advantage of time consuming, labor consuming and time consuming. This paper has reviewed the PEI-mediated large-scale transient transfection in the aspects of transfection mechanism, host cells and optimization measures.

Key words: PEI; Transient transfection; Large scale; Mammalian cells; Optimization

Chinese Library Classification(CLC): Q78; Q81 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)01-145-05

由于重组蛋白在生物化学、信号转导、新药筛选、疾病治疗等领域具有广泛的需求,其制备工艺成为众多科研机构和制药企业的研究热点^[1,2]。与传统的构建稳定细胞株表达重组蛋白的工艺相比,大规模基因瞬时表达(transient gene expression, TGE)技术更加高效、经济,并且可以在短时间内(2~4周)获得毫克至克级别的在结构、理化特性和生物学功能等方面都合格的重组蛋白^[3,4],可以满足药物筛选和临床前研究中对蛋白的需求。因此,该技术成为当前重组蛋白表达工艺领域研究的热点之一。在众多的基因载体中,阳离子聚合物-聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)具有成本低廉,应用简便,可以在多种哺乳动物细胞中达到较高的转染效率,适用于无血清悬浮转染环境,包装容量不受限制等优势^[5,7]。因此,PEI已经成为大规模基因瞬时表达领域最广泛使用的转染试剂。

1 聚乙烯亚胺介导基因瞬时转染机理

* 基金项目:“十二五”国家科技重大专项(2011ZX092023-022)

作者简介:刘少娇(1987-),女,硕士研究生,药学,电话:021-34204745, E-mail: shjl_sjtu@163.com

△ 通讯作者:陈彦田, E-mail: bioreactor@gmail.com

(收稿日期:2014-05-25 接受日期:2014-06-23)

1995年, Boussif等人^[8]首次报道了PEI作为真核细胞基因转染试剂,随后PEI成为非病毒基因载体研究中的一个热门研究领域,其基因传递机制也被逐步揭示。PEI分子按结构划分主要可分为两大类:直链形式和支链形式,其中直链形式的PEI由2代-2恶唑啉单体(2-substituted 2-oxazoline monomer)聚合而成^[9]。PEI的基本结构单元为一个由2个碳原子和一个氨基氮原子构成的三分子骨架,其中的氨基氮原子具有高度质子化的能力,并且由于聚合物的分子结构使得这种质子化作用能够在整个化合物分子内部快速传递和积累,最终导致PEI分子可以携带大量的正电荷,这些特性决定了PEI成为一种高效的基因传递载体(gene delivery vehicle)。

由于DNA分子所携带的负电荷与PEI分子所携带的正电荷发生相互作用,DNA分子被PEI结合并压缩形成纳米级的颗粒。压缩形成的PEI/DNA分子复合物颗粒主要呈圆环胶束

状结构,这种闭合的结构被证明能有效的防止 DNA 分子进入细胞后被溶酶体降解^[10]。形成复合物后,包裹在复合物外围的 PEI 分子仍然携带过量的正电荷,因此,它可以与细胞表面带负电的糖蛋白和蛋白聚糖等发生非特异性结合,从而经过细胞的内存作用(endocytosis)进入胞浆^[11]。根据细胞类型的不同,还有少量的复合物通过细胞的吞噬作用(phagocytosis)或者胞饮作用(potocytosis)进入细胞^[12]。进入胞浆之后,DNA/PEI 复合物进入了内溶酶体通路(endolysosomal pathway)。复合物在胞浆内释放的过程主要是基于一种“质子海绵假说”(proton sponge hypothesis)^[13],即复合物与处于细胞核附近的酸性溶酶体融合,在酸性环境下,复合物吸收大量的质子,膨胀,破裂,将重组 DNA 质粒释放入胞浆中,同时,这样一种吸附膨胀效应也避免了释放进入胞浆的 DNA 被酸性溶酶体降解的可能性。从而得以进入细胞核。

2 大规模基因瞬时表达的宿主细胞

最早应用于表达毫克至克级重组蛋白的大规模基因瞬时表达工艺研究所使用的宿主细胞是 COS 细胞系^[14],然而 COS 细胞强烈的贴壁依赖性和转染试剂对其的明显毒性,限制了该技术的大规模应用。人胚胎肾细胞(HEK293)和中国仓鼠卵巢细胞(CHO)细胞是目前工业大规模瞬时转染领域使用最为广泛的宿主细胞。

2.1 HEK293 细胞家族

HEK293 细胞是第一个被成功的应用于大规模基因瞬时表达的宿主细胞^[15]。由于其易于培养,极易转染,293 细胞家族成为大规模瞬时转染工艺研究早期公认的最佳细胞。

在 HEK293 细胞家族中,两种经过基因改造的子克隆-293-EBNA(将 Epstein-Barr virus 的 EBNA-1 gene 整合进入 293 宿主细胞)^[16]和 293-T(将 SV40 病毒的 large T-antigen 基因整合进入 293 宿主细胞)^[17]是最常用于大规模基因瞬时表达的细胞。这两种细胞可以增强外源基因在细胞内的保持和自我复制,表现出更高的转染效率和蛋白表达能力。除了这两种细胞株外,经过悬浮驯化的 293-EBNA 的细胞系-293-SFE(293SF-3F6)^[18]和 Invitrogen 公司开发的无血清悬浮驯化细胞株-293 Freestyle(293-F)^[19]均被报道应用于大规模基因瞬时表达。此外,德国 Bayer 公司以 HKE293 细胞和 B 淋巴瘤细胞为基础,通过细胞融合得到了 HKB-11 细胞株^[20],被证明在某些情况下比传统的 293 细胞系具有更高的瞬时基因表达能力。

2.2 CHO 细胞家族

CHO 细胞一直被用于筛选稳定细胞株生产重组蛋白药物,目前绝大多数被批准销售的商品化重组蛋白药物都是由 CHO 细胞株生产的。在最近几年,CHO 细胞成为大规模基因瞬时转染使用最多的另一种宿主细胞。选择 CHO 细胞的最重要原因是 CHO 与 293 的蛋白 N 端糖基化水平存在差异^[21],选用 CHO 细胞进行瞬时转染生产蛋白可以保同种证药物在研发和生产的整个过程(瞬时表达阶段与稳定表达阶段)中蛋白表达质量的一致性,避免因细胞株转换而造成一些争议。

目前应用于大规模基因瞬时转染的 CHO 细胞为 CHO DG44(dhfr^{-/-})细胞和 Invitrogen 公司出售的悬浮驯化的 CHO-S 细胞株。此外,向 CHO 细胞基因组插入牛 I 型乳头瘤病毒 E2

基因(bovine papilloma virus Type 1 derived E2 gene)^[22]或者多头瘤病毒大 T 抗原基因(polyoma virus large T antigen gene)^[23]可以增强 CHO 细胞对于游离基因的保持和自发性扩增。

2.3 其他细胞

除了 293 细胞和 CHO 细胞家族外,还有其他的细胞系^[24,25]。例如淋巴造血细胞系(lympho-hematopoietic lineages)、肿瘤细胞系(carcinoma cells)、非洲绿猴肾细胞(Vero cells)和人胚胎干细胞(human embryonic stem cells)均被研究应用于基因瞬时表达,但是这些研究还局限于较小规模。

3 基因瞬时表达的条件优化

基因瞬时表达过程中外源 DNA 并不插入宿主染色体中,因此表达过程时间短、蛋白表达量较低(通常为毫克~数十毫克每升的级别),与稳定哺乳动物细胞株克每升级别的表达量相距甚远。这也是大规模基因瞬时表达技术所面临的最大瓶颈。为了改善这一现状,对于大规模基因瞬时表达优化是目前研究的一个重点。

3.1 质粒构建优化

通过向基因瞬时表达使用的重组质粒中插入额外的调控元件,可以提高被转染细胞的蛋白表达效率或延长基因瞬时表达的过程,最终提高收获的蛋白量。具体的优化目前集中于两个方向,一是在质粒中添加增强元件,影响转录及转录后的相关过程,提高蛋白表达。Durocher 等人^[26]在 pCDNA3.1 质粒中加入了 PMB1 origin 序列,使分泌型碱性磷酸酶(SEAP)表达量分别提高了 10 倍。二是在质粒中加入外源基因复制稳定元件,延长外源质粒存在时间。含有 EBV 病毒或者 SV40 病毒的复制起始子 oriP(pEAK8 和 pEAK12 和 pCEP4 表达质粒)或 SV40ori 序列(pCDNA3.1 表达质粒)的质粒可以通过提高 293EBNA 或 293-T 细胞的外源游离基因的保持和自主复制而提高蛋白表达^[22,23]。Kunaparaju 等人^[23]在质粒中加入 Py origin, OriP 等原件转染 Epi-CHO 细胞,成功提高了蛋白的表达。

3.2 转染过程条件优化

PEI 介导的大规模基因瞬时表达过程一般包括如下几个步骤:收获处于对数生长期的细胞重悬于新鲜培养液中,在孵育介质中混合质粒 DNA 和 PEI 形成复合物颗粒,将复合物加入细胞中转染数小时使细胞尽可能吞噬外源质粒,转染一定时间后离心换新鲜培养液去除 PEI 毒性的影响,然后开始转染后细胞培养和蛋白表达过程。

根据以上步骤和原理可以看出,PEI 介导的基因瞬时转染很大程度取决于孵育得到 DNA/PEI 复合物的结构、粒径和表面电荷等因素以及细胞与复合物发生相互作用的过程。影响这两个方面的因素包括:PEI 的选择、转染条件、孵育介质等几个因素。

3.2.1 PEI 试剂选择 根据对不同分子量(2.5-800kDa)的支链和直链 PEI 分子的研究结果,PEI 的转染效率和细胞毒性主要是由分子量、支链化程度和阳离子电荷密度决定的^[27]。随着分子量的增大,转染效率逐渐提升,同时细胞毒性的大幅提升^[27]。直链 PEI 分子与支链 PEI 分子相比细胞毒性更低,同时其具有更强的对 DNA 分子的压缩能力,增加了形成复合物的平均粒径从而增加细胞与复合物接触的机会,最终提高转染效率^[28]。

虽然目前的研究在一定程度上表明线性 25kDa PEI 在 293 细胞和 CHO 细胞的大规模瞬时转染上优于其他 PEI 试剂^[29,30],然而在最适合转染的 PEI 分子的选择上目前仍然存在分歧。如, Tait 等人^[31]使用 25KD 支链 PEI 作为 DNA 传递载体转染 CHO 细胞,建立了一种简单、易放大的转染过程。对于 PEI 分子结构与 DNA 的压缩、细胞毒性以及转染效率之间的关系的研究仍然处在一个相对较浅的层次。

3.2.2 转染条件的选择 常用的转染条件,一般是指 DNA 用量,PEI 与 DNA 的比例,DNA 与 PEI 混合后的孵育时间以及转染时间(复合物与细胞接触时间)。DNA 浓度的不同最终会影响转染后单个细胞获得的外源质粒拷贝数,进而影响蛋白表达。DNA 与 PEI 的比例则会极大地影响最终所形成的复合物的粒径、结构和所携带的表面电荷,被认为是所有条件中最关键的一个因素。孵育时间会影响 DNA 分子与 PEI 分子结合和相互作用,也在一定程度上影响最终复合物的“成熟”过程。转染时间的不同影响细胞与外源 DNA/PEI 复合物的接触时间,也会影响细胞吞噬的外源基因数量。这四个因素对于转染过程而言都非常重要,为了获得高的转染效率和蛋白表达量,需要细致地考察以获得最佳的参数。

3.2.3 孵育介质 DNA 分子和 PEI 分子混合孵育时所使用的介质同样会影响最终得到的复合物的理化性质。分散介质对于基因瞬时表达的影响主要是由介质的 pH 值影响复合物的表面电荷和介质的离子强度和复合物的粒径大小来影响转染的。研究表明,降低孵育介质的 pH 值可以提高转染效率^[8]。同时 DNA/PEI 复合物在低离子强度的缓冲液(如 5%葡萄糖,10 mM HEPES,HBG)中形成的粒径较小(50~70 nm),而在高离子强度缓冲液(如 150 mM NaCl,20 mM HEPES)中形成粒径变大,并有聚集趋势^[32,33]。除此之外,血清的存在对于复合物的形成也存在影响^[32,33]。

3.3 转染后条件优化

除了设计适合基因瞬时转染的质粒和优化转染过程中的各项条件外,在转染结束后,为了改善这种情况,目前的优化集中在以下方面:

补充营养延长蛋白表达过程:在蛋白表达过程加入营养物质是一种传统的提高蛋白表达量的手段,具体方式有分批补料培养、在细胞培养基中加入水解蛋白等。在大规模瞬时基因表达研究中,这种传统方式也被用来增强瞬时转染后的蛋白表达。Kiseljak 等人^[34]通过补料分批培养将 HEK293EBNA 大规模瞬时转染表达重组蛋白产量提到到 2g/L。Pham 等人^[35]报道了不同水解蛋白加入对于瞬时转染后蛋白表达的增强作用。此外,为了弥补转染过后细胞增殖速度降低的负面作用,Galbraith 等人^[36]加入了生长因子用于促进转染细胞的增殖,单抗的表达量相应提高了 5-10 倍。

降低外源基因丢失:Ye 等^[37]人在转染过程中和过程后添加 DMSO 和 LiAC,两者都能改变细胞膜的性质、增强壁渗透率,使质粒更加容易进入到细胞。进一步的实验证明,两者都能够极大的改善转染后质粒的丢失,增强细胞对外源 DNA 的保持能力。

3.4 其他优化措施

高密度转染法:早期的大规模瞬时转染的报道中所使用的转染时细胞密度多为 $2\sim 5 \times 10^5$ cells/mL,高密度转染法是将转染细胞密度提高 10-20 倍,这种高细胞密度、高复合物浓度的环境,大大增加了细胞与复合物接触和摄入的机会,从而显著的提高转染效率和蛋白表达。Kiseljak 等人^[38]优化了转染细胞密度从 1×10^6 到 6×10^6 cells/mL,实验结果表明在细胞密度为 4×10^6 时,蛋白达到最大的表达量。Sun 等人^[39]将转染细胞密度提到 1×10^7 cells/mL,在 2 L 和 10.7 L 反应器中,将重组蛋白促红细胞生成素(EPO)产量分别提高到了 80.8 mg 和 227 mg。

直接转染法:直接转染法是指取消传统转染过程中 DNA 和 PEI 预先混合孵育的步骤,将 DNA 直接加入到要转染细胞中,经过数分钟混匀后再加入一定比例的 PEI^[39]。Raymond 等人^[39]对比研究了直接转染法和常规转染法,6 孔板培养时,分泌性碱性磷酸酶(SEAP)的产量分别为 61 mg/L 和 70 mg/L;125 mL 摇瓶中培养时,SEAP 的产量分别 75 mg/L 和 88 mg/L,实验结果显示直接转染法与传统转染法相比,转染效率和蛋白产量略低,但并无显著性差异,此工艺在保证蛋白表达的情况下可以简化操作步骤,更易于工艺的放大,具有较好的工业应用价值。

多次转染法:多次转染法是在第一次转染后的在不同时间,继续加入 PEI-DNA 复合物,增加细胞与复合物的接触机会,提高重组蛋白的表达量^[40]。Swiech 等人^[40]研究了不同培养温度条件下,多次瞬时转染 HEK293 细胞,表达重组人凝血八因子(rhFVIII)。其在 125 mL 摇瓶中培养细胞,在第一次转染后的 48 h 和 96 h,两次添加 PEI-DNA 复合物,使得转染后的整个过程中细胞的转染效率和重组蛋白的产量明显高于单次转染的对照组,在相同的转染和培养条件下,多次转染组比对照组 FVIII 表达量提高了 50% 左右。本课题组也正对多次转染法进行改良和优化,将其应用于大规模转染 CHO 和 293 细胞表达重组单克隆抗体的工艺过程中,初步研究结果表明,多次转染法可以将大规模瞬时转染表达蛋白的工艺周期延长至 14~21 天,提高一个批次收获蛋白总量。

4 展望

根据最新的市场预测,2013 年全球基因重组生物技术药物市场规模将达到 400~500 亿美元,这其中基因重组蛋白又占据了绝大多数的市场份额。近年来,伴随着市场的巨大需求,PEI 介导的大规模瞬时转染技术也在不断发展,该技术在工业化生产中的应用规模越来越大,最大已达到 100L 的水平;蛋白的产量也越来越高,在 CHO 细胞中已可达到数百毫克每升的级别^[41]。大规模瞬时转染技术在新药研发和临床前研究所需蛋白的获得过程中的重要地位日益显现。然而,该技术在现阶段仍存有不足^[42-44],例如对于 PEI 介导的基因输送内部机制研究的缺乏限制了转染效率的进一步提高,与稳定细胞株相比表达量仍然较低,批次间表达蛋白在质量上存在差异以及现有工艺不适合大规模工业化生产等。相信随着进一步研究的深入和工艺的优化,具有广泛应用前景的大规模瞬时转染技术将在重组蛋白表达和单克隆抗体生产领域占有愈来愈重要的地位。

参考文献(References)

- [1] Koehn J, Hunt I. High-Throughput Protein Production (HTPP): a review of enabling technologies to expedite protein production [J]. In-

- High Throughput Protein Expression and Purification, Springer: 2009: 1-18
- [2] Baldi L, Hacker DL, Meerschman C, et al. Large-scale transfection of mammalian cells. In Protein Expression in Mammalian Cells [J]. Springer: 2012: 13-26
 - [3] De Jesus MJ, Wurm FM. Mammalian Cells in Biotech Production [J]. Pharmaceutical Biotechnology: Drug Discovery and Clinical Applications, Second Edition, 2012: 43-57
 - [4] Florea S, Andreeva K, Machado C, et al. Elimination of marker genes from transformed filamentous fungi by unselected transient transfection with a Cre-expressing plasmid [J]. Fungal Genetics and Biology, 2009, 46 (10): 721-730
 - [5] Zhang X, Stettler M, De Sanctis D, et al. Use of orbital shaken disposable bioreactors for mammalian cell cultures from the milliliter-scale to the 1,000-liter scale [J]. In Disposable bioreactors, Springer, 2010: 33-53
 - [6] Shukla AA, Thömmes J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins [J]. Trends in biotechnology, 2010, 28 (5): 253-261
 - [7] Ansorge S, Lanthier S, Transfiguración J, et al. Development of a scalable process for high yield lentiviral vector production by transient transfection of HEK293 suspension cultures [J]. The journal of gene medicine, 2009, 11 (10): 868-876
 - [8] 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]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995, 92 (16): 7297-7301
 - [9] Riess G, Hurtrez G, Bahadur P. Encyclopedia of polymer science and engineering [J]. Academic, New York, 1985: 324-434
 - [10] Dash PR, Toncheva V, Schacht E, et al. Synthetic polymers for vectorial delivery of DNA: characterisation of polymer-DNA complexes by photon correlation spectroscopy and stability to nuclease degradation and disruption by polyanions in vitro [J]. Journal of Controlled Release, 1997, 48 (2-3): 269-276
 - [11] Godbey W, Wu KK, Mikos AG. Tracking the intracellular path of poly (ethyleneimine)/DNA complexes for gene delivery [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96 (9): 5177-5181
 - [12] Mellman I. Endocytosis and molecular sorting [J]. Annual review of cell and developmental biology, 1996, 12 (1): 575-625
 - [13] Akinc A, Thomas M, Klivanov AM, et al. Exploring polyethyleneimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis [J]. The journal of gene medicine, 2005, 7 (5): 657-663
 - [14] Blasey HD, Aubry J-P, Mazzei GJ, et al. Large scale transient expression with COS cells [J]. Cytotechnology, 1995, 18 (3): 183-192
 - [15] Kiseljak D, Backliwal G, Hacker DL, et al. High Cell Density Transient Gene Expression in HEK 293 EBNA Cells [A]. In Proceedings of the 21st Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dublin, Ireland, June 7-10, 2009 [C]. 2012: 125-128
 - [16] Shaw G, Morse S, Ararat M, et al. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells [J]. The FASEB Journal, 2002, 16 (8): 869-871
 - [17] Querol A, Barrio E, Ramón D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization [J]. Systematic and Applied Microbiology, 1992, 15 (3): 439-446
 - [18] Pham P, Perret S, Cass B, et al. Transient gene expression in HEK293 cells: peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 90 (3): 332-344
 - [19] Liu C, Dalby B, Chen W, et al. Transient transfection factors for high-level recombinant protein production in suspension cultured mammalian cells [J]. Molecular biotechnology, 2008, 39 (2): 141-153
 - [20] Fischer S, Charara N, Gerber A, et al. Transient recombinant protein expression in a human amniocyte cell line: The CAP-T® cell system [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109 (9): 2250-2261
 - [21] Van den Nieuwenhof IM, Koistinen H, Easton RL, et al. Recombinant glycodelin carrying the same type of glycan structures as contraceptive glycodelin-A can be produced in human kidney 293 cells but not in Chinese hamster ovary cells [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267 (15): 4753-4762
 - [22] Erbel PJ, Card PB, Karakuzu O, et al. Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix-loop-helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100 (26): 15504-15509
 - [23] Kunaparaju R, Liao M, Sunstrom NA. Epi-CHO, an episomal expression system for recombinant protein production in CHO cells [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 91 (6): 670-677
 - [24] Mazda O, Satoh E, Yasutomi K, et al. Extremely efficient gene transfection into lympho-hematopoietic cell lines by Epstein-Barr virus-based vectors [J]. Journal of immunological methods, 1997, 204 (2): 143-151
 - [25] Harada Y, Iwai M, Tanaka S, et al. Highly efficient suicide gene expression in hepatocellular carcinoma cells by Epstein-Barr virus-based plasmid vectors combined with polyamidoamine dendrimer [J]. Cancer gene therapy, 2000, 7 (1): 27-36
 - [26] Durocher Y, Perret S, Kamen A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells [J]. Nucleic acids research, 2002, 30 (2): e9
 - [27] Godbey W, Wu KK, Mikos AG. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly (ethyleneimine) as a gene delivery vehicle [J]. Journal of biomedical materials research, 1999, 45 (3): 268-275
 - [28] Kiseljak D, Backliwal G, Hacker DL, et al. Nigel Jenkins, Niall Barron and Paula Alves ESACT Proceedings Proceedings of the 21st Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dublin, Ireland, June 7-10, 2009 10.1007/978-94-007-0884-6_21? Springer Science High Cell Density Transient Gene Expression in HEK 293 EBNA Cells [J].
 - [29] Cervera L, Gutiérrez S, Martínez M, et al. Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium [J]. Journal of biotechnology, 2013, 166(4): 152-165
 - [30] Kadlecova Z, Nallet S, Hacker DL, et al. Poly (ethyleneimine) Mediated Large-Scale Transient Gene Expression: Influence of Molecular Weight, Polydispersity and N-Propionyl Groups [J]. Macromolecular bioscience, 2012, 12 (5): 628-636

- [31] Tait AS, Brown CJ, Galbraith DJ, et al. Transient production of recombinant proteins by Chinese hamster ovary cells using polyethyleneimine/DNA complexes in combination with microtubule disrupting anti-mitotic agents [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 88 (6): 707-721
- [32] Stathopoulos PB, Zheng L, Li G-Y, et al. Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry[J]. *Cell*, 2008, 135 (1): 110-122
- [33] Wightman L, Kircheis R, Rüssler V, et al. Different behavior of branched and linear polyethyleneimine for gene delivery in vitro and in vivo[J]. *The journal of gene medicine*, 2001, 3 (4): 362-372
- [34] Kiseljak D, Rajendra Y, Backliwal G, et al. Recombinant antibody yield over 2 g/L by transient transfection of HEK 293 EBNA cells in a fed-batch process [A]. In *Proceedings of the 21st Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT)*, Dublin, Ireland, June 7-10, 2009[C], 2012: 497-500
- [35] Pham PL, Perret S, Doan HC, et al. Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: Peptone additives improve cell growth and transfection efficiency [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 84 (3): 332-342
- [36] Galbraith DJ, Tait AS, Racher AJ, et al. Control of Culture Environment for Improved Polyethyleneimine-Mediated Transient Production of Recombinant Monoclonal Antibodies by CHO Cells [J]. *Biotechnology progress*, 2006, 22 (3): 753-762
- [37] Ye J, Kober V, Tellers M, et al. High-level protein expression in scalable CHO transient transfection [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 103 (3): 542-551
- [38] Sun X, Hia HC, Goh PE, et al. High-density transient gene expression in suspension-adapted 293 EBNA1 cells [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 99 (1): 108-116
- [39] Raymond C, Tom R, Perret S, et al. A simplified polyethyleneimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications[J]. *Methods*, 2011, 55 (1): 44-51
- [40] Swiech K, Kamen A, Ansorge S, et al. Transient transfection of serum-free suspension HEK 293 cell culture for efficient production of human rFVIII[J]. *BMC biotechnology*, 2011, 11 (1): 114
- [41] Rajendra Y, Kiseljak D, Baldi L, et al. A simple high-yielding process for transient gene expression in CHO cells[J]. *Journal of biotechnology*, 2011, 153 (1): 22-26
- [42] Backliwal G, Hildinger M, Hasija V, et al. High-density transfection with HEK-293 cells allows doubling of transient titers and removes need for a priori DNA complex formation with PEI[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 99 (3): 721-727
- [43] Backliwal G, Wulhfard S, Delegrange F, et al. A Serum-Free, Transient Transfection System for Enhancing Production of Recombinant Antibodies in Mammalian Cells [J]. *InCells and Culture*, Springer, 2010: 229-232
- [44] Van Der Loo J, Swaney W, Grassman E, et al. Scale-up and manufacturing of clinical-grade self-inactivating γ -retroviral vectors by transient transfection[J]. *Gene therapy*, 2011, 19 (3): 246-254

(上接第 99 页)

- [12] Vergote I, Trope CG, Amant F, et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(10):943-953
- [13] McLean Ka, Shah Ca, Thompson Sa, et al. Ovarian cancer in the elderly: outcomes with neoadjuvant chemotherapy or primary cytoreduction[J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 118(1):43-46
- [14] Weinberg Le, Rodriguez G, Hurteau JA, et al. The role of neoadjuvant chemotherapy in treating advanced epithelial ovarian cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2010, 101(4): 334-343
- [15] Gasgow Ma, Yu H, Rutherford TJ, et al. Neoadjuvant chemotherapy (NACT) is an effective way of managing elderly women with advanced stage ovarian cancer (FIGO Stage III C and IV)[J]. *J Surg Oncol*, 2013, 107(2): 195-200
- [16] Brun J, Rouzier R, Seile F, et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery for stage III/IV ovarian cancer: contribution of diagnostic laparoscopy[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 171-171
- [17] Weinberg Le, Rodriguez G, Hurteau Ja, et al. The role of neoadjuvant chemotherapy in treating advanced epithelial ovarian cancer [J]. *Surg Oncol*, 2010, 101(4):334-343
- [18] Zhao Y, Huang S, Du P. Utilization of paclitaxel combined with cisplatin regimen in the neoadjuvant chemotherapy in locally advanced cervical squamous carcinoma [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2008, 28(11):2072-2074
- [19] Valent S, Oláh O, Sára L, et al. Ultrasonography in the diagnosis of ovarian and endometrial carcinoma [J]. *Orv Hetil*, 2011, 152 (47): 1887-1893
- [20] 李峰, 许志平. 新辅助化疗在晚期卵巢癌患者手术治疗中的作用[J]. *肿瘤研究与临床* 2010, 22(2): 128-130
- Li Feng, Xu Zhi-ping. In the role of neoadjuvant chemotherapy in patients with advanced ovarian cancer surgery [J]. *Cancer research and clinical*, 2010, 22 (2): 128-130
- [21] Guhekin M, Difibas K, Bum E, et al. Interval debulking in epithelial ovarian carcinomas: the past, present and the future[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2008, 29:242-245