

· 实验研究 ·

新型壳聚糖季铵盐载体介导 VEGF siRNA 转染 RPE 细胞的研究

高妍 刘新玲 李筱荣 李春晖 杨纪忠 王效武 彭瑶 李冰

【摘要】 背景 将目的基因安全、有效地导入并使其适度表达是基因治疗的关键。病毒载体具有潜在的致病性、免疫原性及致突变性等缺点,而非病毒载体以其安全、价廉、灵活性成为目前研究的热点。目前, O-羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐/胆固醇(OQLCS/chol)脂质体作为基因载体的相关研究鲜见报道。**目的** 研究 OQLCS/chol 脂质体的性能及其作为非病毒载体的最适转染条件。**方法** 常规培养人视网膜色素上皮(RPE)细胞株;根据 GeneBank 人(NM-00171626)血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 的已知序列制备和抽提质粒 DNA,采用电泳阻滞法研究 OQLCS/chol 脂质体与质粒 DNA 在不同质量比、不同作用时间及是否存在血清等条件下的包装效能,筛选最优转染条件;采用高速离心法进行体外释放动力学实验,绘制体外释放曲线;将培养的细胞分为 OQLCS/chol 脂质体组和 Lipo2000 组,采用共培养法分别用 OQLCS/chol 脂质体和 Lipo2000 转染 RPE 细胞,采用绿色荧光蛋白(GFP)染色法比较和评价其转染效率;利用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测 OQLCS/chol 脂质体转染后 RPE 细胞的存活率,确定 OQLCS/chol 脂质体的最佳转染安全质量浓度。**结果** OQLCS/chol 脂质体纳米粒平均有效粒径为 134 nm,Zeta 电位为 +39.64 mV。体外释放实验显示,载质粒 DNA 的 OQLCS/chol 脂质体的体外快速释放相在最初 5 d,质粒释放量约为 70.0%,至 14 d 缓释量呈稳态相。OQLCS/chol 的最高安全质量浓度为 20 μ g/ml,OQLCS/chol 与质粒 DNA 质量比 $\geq 2:1$ 、混合时间为 30 ~ 40 min、无血清培养条件下转染条件为最优。载质粒 DNA 的 OQLCS/chol 脂质体转染组 RPE 细胞转染率为 71.05%,Lipo2000 转染组为 70.58%,差异无统计学意义($\chi^2=0.534, P=0.465$)。**结论** 自行制备的跨膜肽修饰的 OQLCS/chol 脂质体具有粒径均匀、分散性好、Zeta 电位高、细胞毒性小、能在较短时间释放达到治疗质量浓度的基因且后续可缓慢平稳释放等特性。OQLCS/chol 脂质体将 VEGFsiRNA 转染到 RPE 细胞的转染效率与 Lipo2000 接近。

【关键词】 基因传递;纳米粒;非病毒载体;小干扰 RNA;细胞转染;视网膜色素上皮细胞

Study of novel polymeric liposome as a nonviral vector for transfection of VEGF siRNA into RPE cells Gao Yan, Liu Xinling, Li Xiaorong, Li Chunhui, Yang Jizhong, Wang Xiaowu, Peng Yao, Li Bing. Shanxi Eye Hospital, Taiyuan 030002, China

Corresponding author: Li Bing, Email: libingeye@126.com

【Abstract】 Background It is a key step to transfect the therapeutic gene into target tissue safely and effectively. Because of its potential pathogenicity, immunogenicity and mutagenicity, viral vector is limited in clinical application. Therefore, nonviral vector is becoming a study hotspot due to its security, low price and flexibility. However, the study of octadecyl-quaternized lysine modified chitosan/cholesterol (OQLCS/chol) as genetic vector is rare. **Objective** This study was to investigate the optimal conditions for gene transfection by new polymeric liposome-OQLCS/chol. **Methods** Human retinal pigment epithelial (RPE) cells were cultured in modified 1640 medium containing fetal bovine serum. Plasmid DNA was prepared and extracted based on the sequence of human vascular endothelial growth factor (VEGF) from GeneBank. The loading efficiency of OQLCS/chol liposome to plasmid DNA was clarified by electrophoresis to select the optimal transfected conditions, including the mass ratio, action time as well as with or without blood serum. The dissolution curve of OQLCS/chol liposome was drafted by supercentrifuge process. The RPE cells were transfected by OQLCS/chol liposome and Lipo2000, respectively, and the transfected efficiency was detected by green fluorescence protein (GFP) and compared between the OQLCS/chol liposome group and Lipo2000 group. The *in vitro* survival rate of the cells was evaluated by cell counting kit-8 (CCK-8).

DOI:10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2015.07.010

作者单位:030002 太原,山西省眼科医院(高妍、杨纪忠、王效武、李冰);300384 天津医科大学附属眼科医院(刘新玲、李筱荣);030001 太原,山西医科大学第一临床医学院眼科(李春晖);300070 天津大学材料科学与工程学院纳米生物技术研究所(彭瑶)

通信作者:李冰,Email:libingeye@126.com

Results The average size of OQLCS/chol liposome nanoparticles was 134 nm, and the Zeta potential was +39.64 mV. About 70% of total encapsulated plasmid DNA was rapidly released within initial 5 days followed by a constant and sustained release for 14 days. This new polymeric liposome was safe for biological use under the 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, with the optimal OQLCS/chol:plasmid DNA of $\geq 2:1$ and incorporation time of 30–40 minutes in the free-serum medium. The transfected cell rate was 71.05% in the OQLCS/chol liposome group, and that in the Lipo2000 group was 70.58%, showing a significant difference between the two groups ($\chi^2 = 0.534$, $P = 0.465$). **Conclusions** OQLCS/chol liposome is synthesized successfully with uniform size, better stability, less cytotoxicity, higher Zeta potential and cellular uptake efficiency in comparison with Lipo2000. This novel polymeric liposome loaded plasmid DNA can transfect VEGF siRNA into RPE cells efficiently like a Lipo2000.

[Key words] Gene delivery; Nanoparticles; Non-viral vectors; Small interfering RNA; Transfection; Retinal pigment epithelial cells

选择安全、有效的载体是基因治疗的关键^[1]。近年来,在基因治疗领域,基于可生物降解的大分子多聚体给药系统的应用已成为趋势,其具有制备简单、携带的基因不受限制及无特异性免疫反应等特点^[2]。作为天然的碱性多糖,壳聚糖具有低细胞毒性、生物可降解性和跨细胞膜特性,目前已被尝试用作非病毒转基因载体。壳聚糖具有转染效率低和靶向性欠佳的缺点,但对其加工后的衍生物可改善其溶解性、可加工性和对基因的转运能力,而增加其转染效率。壳聚糖衍生物在神经外科、肿瘤科的研究中发挥了有效转染的作用,但仍存在转染效率较低、细胞毒性大等问题。本研究中应用经穿膜肽表面修饰的 O-羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐/胆固醇(octadecyl quaternized lysine modified chitosan/cholesterol, OQLCS/chol)脂质体,首次介导 siRNA 转染视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞,筛选最优转染条件,观察其转染效率和细胞毒性,为下一步体内转染研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

壳聚糖(青岛海普生物技术有限公司);生化级胆固醇(合肥博美生物科技有限责任公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)(日本同仁公司);跨膜肽修饰的 OQLCS/chol 脂质体^[3](天津大学材料学院纳米生物技术研究所);Lipo2000(美国 Invitrogen 公司)。JEOL-100CX II 型透射电子显微镜(日本电子光学公司);激光粒度仪、Zeta 电位仪、BI-90 plus 纳米/亚微米激光粒度分析仪(美国布鲁克海文仪器公司);孵育箱、Drop 2000 型紫外分光光度计(美国 Thermo 公司);酶联免疫检测仪(瑞士 Tecan 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人 RPE 细胞株(中南大学湘雅医院细胞中心)置于改良胎牛血清 1640 含体积分数

10% 培养液中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 孵育箱内进行培养。

1.2.2 血管内皮生长因子 siRNA 的设计与合成 根据 GeneBank 人(NM-00171626)血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) mRNA 的已知序列,用 RNA structure 5.2 软件预测其二级结构,尽量使设计靶点部位的二级结构活化能较低。合成的 siRNA 正义链和反义链的 DNA 模板之间用 7 个碱基组成的一段环序列隔开,两端分别加入 BamH I 和 ECOR I 酶切位点及绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP),靶序列为 5'-GCTACTGCCATCCAATCGA-3'。人 VEGF siRNA 序列:F:5'-CACCGCTACTGCCATCCAA TCGATTCAAGAGATCGATTGGATGGCAGTGTCTTTT-3'; R:5'-GATCCAAAAAAGCTACTGCCATCCAATCGATCT CTTGAATCGATTGGATGGCAGTAG-3',由上海吉凯基因公司合成并行质粒 DNA 抽提,行双酶切及基因测序鉴定。

1.2.3 电泳阻滞实验验证 OQLCS/chol 脂质体与质粒 DNA 的结合 无血清 1640 培养基中 OQLCS/chol 脂质体与质粒 DNA 的质量比分别为 0:1、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1;含胎牛血清的 1640 培养基中 OQLCS/chol 脂质体与质粒 DNA 的质量比分别为 2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、8:1、10:1,混合液总体积为 100 μl (相当于 1.0 μg 质粒 DNA)。培养液室温静置 30 min 后分别行质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳,120 V 电泳 30 min。电泳结束后用紫外线摄影凝胶成像系统观察并拍照。无血清 1640 培养基中,按照 OQLCS/chol 与质粒 DNA 的质量比为 2:1(1.0 μg 的质粒 DNA)配制总体积为 100 μl 的混合液,混合时间分别为 0、10、20、30、40、60 min,行 0.75% 琼脂糖凝胶电泳,观察 OQLCS/chol 脂质体与质粒 DNA 的结合情况。

1.2.4 采用 GFP 染色法比较 OQLCS/chol 脂质体与 Lipo2000 的转染效率 RPE 细胞接种到 12 孔板,每孔 5×10^4 个细胞,待细胞融合至 70% 时,分别应用

OQLCS/choI 和 Lipo2000 为载体进行转染。OQLCS/choI 脂质体与 DNA 质量比为 2:1, Lipo2000 用量参照说明书, 每孔转染 4 μg 质粒。转染 6 h 后换液, 48 h 后荧光显微镜下观察 GFP 的表达, 每孔选取 3 个具有代表性的视野, 观察 100 个细胞, 计算阳性细胞率。

1.2.5 OQLCS/choI 脂质体体外释放试验 精确量取 OQLCS/choI/质粒 DNA 混悬液 1 000 μl (相当于质量浓度 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ siRNA), 加入等容积 pH 7.4 的 PBS, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床振荡 (100 r/min)。分别于混合后 1 h、12 h、24 h、3 d、5 d、7 d、10 d、12 d、14 d 取样, 离心半径为 6 cm, 65 000 r/min 离心 30 min, 取上清 3 μl , 紫外分光光度计测定 260 nm 处上清液的吸光度 (A) 值。用 PBS 补充相应的上清样品量, 继续 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育。计算各时间点的 siRNA 释放量和释放率: 释放率 = 上清液中 siRNA 量/纳米粒中 siRNA 总量 $\times 100\%$, 绘制释放曲线。

1.2.6 采用 CCK-8 法测定转染细胞的存活率 RPE 细胞接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 分别加入不同质量浓度 OQLCS/choI, 使最终质量浓度为 0.0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 和 80.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 每个浓度设 2 个复孔。以 Lipo2000 作为阳性对照, 按说明书每孔加 0.5 μl (相当于终质量浓度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 并设未加 OQLCS/choI 或 Lipo2000 的空白对照组, 分别培养 12、24、48 h 后每孔加入 10.0 μl CCK-8 试剂, 混匀后继续培养 4 h, 用酶联免疫检测仪在 450 nm 波长处检测 A 值, 确定 OQLCS/choI 转染的最佳安全质量浓度。细胞存活率 = 实验组 A 值/空白对照组 A 值 $\times 100\%$ 。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。本研究检测指标的数据资料经 W 检验证实呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用均衡分组单因素干预实验设计, 各检测指标的总差异比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD- t 检验; 率的差异比较采用 χ^2 检验。采用双尾检验法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OQLCS/choI 脂质体表征

OQLCS/choI 脂质体在水系中稳定性好, 无聚集与沉淀。纳米粒集中分布在 120 ~ 140 nm, 呈窄带分布, 平均有效粒径为 134 nm, Zeta 电位为 +39.64 mV, 包载了质粒 DNA 的 OQLCS/choI 脂质体粒径在 230 ~ 240 nm, 呈窄带分布, 平均有效粒径为 236 nm。透射电子显微镜下纳米粒呈大小均匀的圆形或椭圆形粒子, 直径约为 100 nm (图 1), 与光粒度分析结果相符。

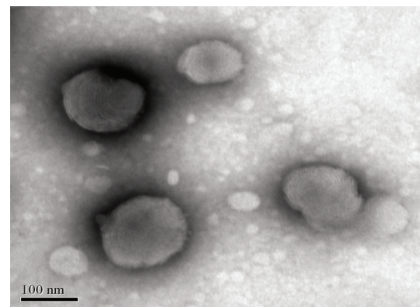


图 1 纳米颗粒的透射电子显微镜下形态特征 (标尺 = 100 nm)

2.2 OQLCS/choI 脂质体与质粒 DNA 的结合情况

OQLCS/choI 脂质体与质粒 DNA 的质量比达到 2:1 以上时, 就可以看到泳道内不再有荧光条带, 说明质粒 DNA 已被完全包裹, 不能在电场中泳动 (图 2)。OQLCS/choI 脂质体与质粒 DNA 以质量比 2:1 混合后 30 min 及 40 min 条带均消失, 混合后 60 min 时出现弱条带 (图 3)。在含血清的情况下, OQLCS/choI 脂质体与质粒 DNA 的质量比达到 4:1 以上时, 泳道内不再有荧光条带 (图 4)。

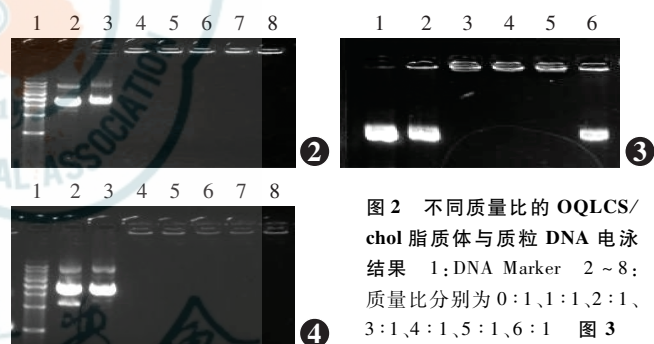


图 2 不同质量比的 OQLCS/choI 脂质体与质粒 DNA 电泳结果 1: DNA Marker 2~8: 质量比分别为 0:1、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1 图 3

OQLCS/choI 脂质体与质粒 DNA 以 2:1 混合后不同时间点电泳结果 1~6: 混合时间分别为 0、10、20、30、40、60 min 图 4 含血清培养基中不同质量比的 OQLCS/choI 脂质体与质粒 DNA 的电泳结果 1: DNA Marker 2~8: 质量比分别为 2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、8:1、10:1

2.3 OQLCS/choI 脂质体体外释放速率

载质粒 DNA 的 OQLCS/choI 脂质体在体外 12 h 时可以检测到质粒 DNA 的释放, 4 ~ 5 d 质粒 DNA 释放量约为 70.0%, 此后释放量逐渐下降, 7 d 时释放量平稳, 14 d 时共释放 91.6%, 而 Lipo2000 组释放速率较快, 5 d 时释放量约为 95.0% (图 5)。

2.4 OQLCS/choI 脂质体的细胞毒性

不同质量浓度 OQLCS/choI 脂质体与 RPE 细胞共培养 12、24、48 h 后, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组和 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组人 RPE 细胞存活率明显下降, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组细胞存活率均在 70% 以上, 明显高于 Lipo2000 组, 差异有统计学意义 (12 h: $t = 2.760$, $P = 0.009$; 24 h: $t = 3.280$, $P = 0.002$;

48 h: $t = 6.260$, $P = 0.000$) (表 1), 因此, OQLCS/chol 脂质体的最高安全质量浓度为 $20 \mu\text{g/ml}$ 。

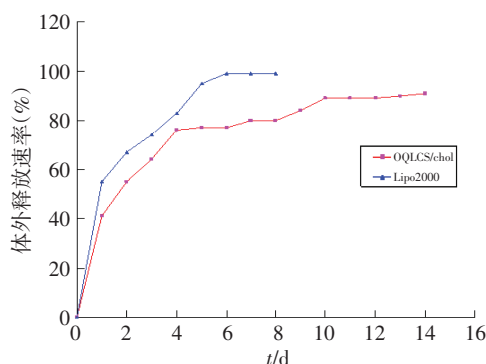


图 5 载质粒 DNA 的 OQLCS/chol 脂质体体外释放曲线 OQLCS/chol: O-羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐/胆固醇

表 1 不同质量浓度 OQLCS/chol 脂质体作用不同时间细胞存活率 ($\bar{x} \pm s$, %)

OQLCS/chol 脂质体质量浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	样本量	不同时间点细胞存活率		
		12 h	24 h	48 h
2.5	30	0.99 ± 0.01	0.97 ± 0.02	0.92 ± 0.07
5.0	30	0.89 ± 0.08	0.93 ± 0.04	0.84 ± 0.11
10.0	30	0.83 ± 0.06	0.78 ± 0.18	0.78 ± 0.09
20.0	30	0.79 ± 0.12	0.76 ± 0.10	0.72 ± 0.15
40.0	30	0.49 ± 0.19	0.51 ± 0.23	0.42 ± 0.31
80.0	30	0.34 ± 0.12	0.24 ± 0.16	0.33 ± 0.25
Lipo2000	30	0.73 ± 0.29	0.71 ± 0.15	0.59 ± 0.21
F		15.09	11.56	16.24
P		0.00	0.00	0.00

注: OQLCS/chol: O-羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐/胆固醇 (单因素方差分析, LSD- t 检验)

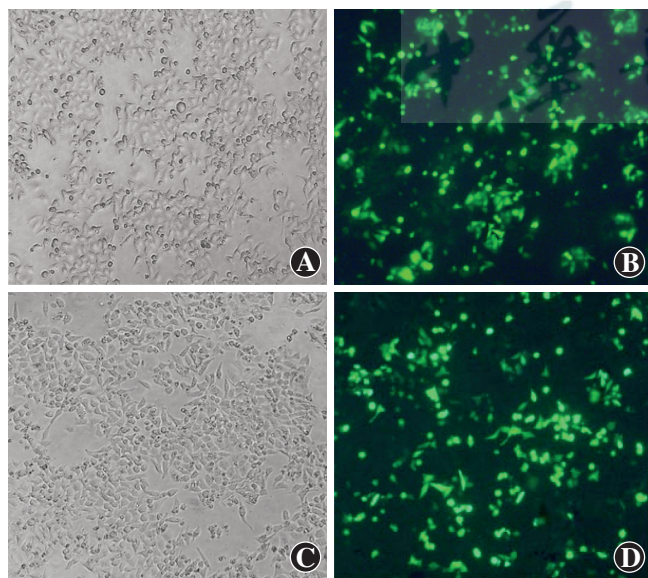


图 6 OQLCS/chol 脂质体与 Lipo2000 分别转染 RPE 细胞 ($\times 200$) A: 光学显微镜下显示 Lipo2000 转染 RPE 细胞 B: A 图的荧光显微镜下观察 (GFP) C: 光学显微镜下显示 OQLCS/chol 脂质体转染 RPE 细胞 D: C 图的荧光显微镜下观察 (GFP)

2.5 OQLCS/chol 脂质体与 Lipo2000 转染效率的比较

光学显微镜下观察显示, OQLCS/chol 脂质体与 Lipo2000 分别转染 RPE 细胞 48 h 后细胞贴附正常, 生长状态良好, 荧光显微镜下观察相应视野下 GFP 的表达, 结果显示 GFP 能激发峰值 508 nm 的绿色荧光, 而阴性细胞则无 (图 6)。每孔选取 3 个具有代表性的视野, 计算阳性细胞的百分率。OQLCS/chol 脂质体转染效率较 Lipo2000 略高, 但差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.534$, $P = 0.465$) (表 2)。

表 2 OQLCS/chol 脂质体和 Lipo2000 转染效率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	阳性细胞数 (个/视野)	细胞总数 (个/视野)	转染效率 (%)
OQLCS/chol 脂质体组	20	103.0 ± 4.8	145.0 ± 11.3	71.05
Lipo2000 组	20	96.0 ± 5.6	136.0 ± 20.4	70.58
χ^2		-	-	0.534
P		-	-	0.465

注: OQLCS/chol: O-羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐/胆固醇; -: 未进行统计学分析 (χ^2 检验)

3 讨论

在缺血、缺氧等病理条件下, 由视网膜血管周细胞、RPE 细胞和血管内皮细胞分泌 VEGF, 尤以 RPE 表达的 VEGF 最显著^[4], 在疾病发生和发展过程中还伴有 RPE 细胞异常增生和移行^[5], 此外 RPE 外屏障破坏可导致脉络膜新生血管在视网膜神经上皮生长, 同时 RPE 分泌大量的细胞因子, 促使新生血管生成^[6], 因此 RPE 细胞是相关疾病基因治疗的重要靶细胞。

基因载体的构建是基因治疗的焦点。能安全、有效地将外源基因导入到相应的部位并得以适度表达是基因治疗的关键。研究表明, 阳离子多聚物载体比较稳定, 其相对分子质量和聚合物易调整, 可引入侧链和特异靶向性基团来调整和改善载体的性能, 成为研究的热点^[7]。

壳聚糖是天然高分子多聚糖, 具有抗菌性、生物可降解性、安全性、生物相容性、细胞黏附性等特点, 适合作为基因递送的载体^[8], 但存在一定的缺点, 如稳定性欠佳, 水溶液中分散性不好; 官能团少, 不易进行表面修饰, 功能单一; 基因转染效率低等, 限制了其在临床上的应用, 因此研制稳定的多功能脂质体具有重要的理论意义和实用价值。本研究采用自制的跨膜肽修饰的 OQLCS/chol 替代磷脂, 利用脂质体制备技术, 成功制备了表面带有正电荷并同时含有氨基和羧基等官能团的新型阳离子高分子脂质体 OQLCS/chol。OQLCS/chol 脂质体具备以下特点: (1) 将壳聚糖季铵化, 提高了壳聚糖的水溶性, 质子化的可溶性壳聚糖能

使细胞膜形成短暂的通道,提高基因跨膜运输效率^[9]。(2)合成的 OQLCS/choI 脂质体粒径约为 134 nm,呈球形,分布均匀,无聚集现象,其水溶液透明。(3)Zeta 电位可达 +39.64 mV,脂质体表面存在较多的亲水性季铵基团,形成一种稳定的双层膜结构,小分子胆固醇镶嵌其中,起到稳定作用。高正电性使脂质体更易与带负电荷的细胞膜结合,增强其跨膜能力。(4)OQLCS/choI 脂质体同时含有氨基和羧基等官能团,容易进行多功能组装^[3]。

细胞的天然屏障作用是影响转染效率的主要障碍。跨膜肽来源于获得性免疫缺陷病毒,可直接穿过细胞膜、细胞核膜并锚定于特异的基因调控区。跨膜肽对反应条件的要求不高,转导效率高,可介导多种物质进入细胞,对细胞的损伤比较小。本研究中制备的跨膜肽修饰的 OQLCS/choI 脂质体与 Lipo2000 的转染效率相当,显示当转染试剂与质粒 DNA 的质量比为 3:1~5:1 时,可完全包裹 DNA,形成载体-质粒 DNA 复合物,而质量比越高,形成复合物颗粒就越小且越致密,更利于复合物质粒的转染。但高浓度的转染试剂毒性较大,因而包载率较高的转染试剂有较高的安全性。Ye 等^[10]发现壳聚糖/聚乙二醇/聚乙烯亚胺(CS/PEG/PEI)与质粒 DNA 的质量比超过 5:1 后能将基因完全包裹。本研究显示当高分子脂质体与质粒 DNA 质量比达到 2:1 时即可以完全包裹基因,形成中性复合物,在电场的作用下不再移动。混合时间过长可能导致游离 DNA 与复合物非特异性结合,在电场的作用下分离^[11]。

稳定的聚合物可为 DNA 提供保护作用,免受细胞内外核酸酶攻击,但由于释放的限制而可能无法达到最大转染效率。相反,稳定性较差的聚合物可以很快解除对 DNA 的包裹,使后者在细胞质区域过早降解,无法发挥作用,因此稳定性适中的聚合物才能达到理想的转染效率^[12]。本研究中的高分子脂质体 12 h 时可检测到质粒 DNA 的释放,3~5 d 时释放约 70.0%,此后释放平稳缓慢,14 d 时共释放 91.6%,与 Lipo2000 相比具有缓释现象,理论上药物浓度能维持较长时间。

根据聚合物的侵害对象,基因载体的毒性可分为细胞毒性、血液毒性和组织毒性,其中细胞毒性是评价基因载体的重要指标。壳聚糖具有生物黏附性、生物相容性和可降解性,通过对壳聚糖改性制备其衍生物,保留了壳聚糖的生物可降解性,同时其相对分子质量减小,细胞毒性降低,使其更适合作为基因转染材料^[13]。本研究中,OQLCS/choI 脂质体质量浓度小于

20 μg/ml, CCK-8 法检测 3 个时间点 RPE 细胞存活率与空白对照组比较均在 70% 以上,较 Lipo2000 毒性低。阳离子脂质体聚乙烯亚胺的安全剂量为 8~10 μg/ml^[14],聚乙二醇为 10 μg/ml^[10],因此,本研究中研制的 OQLCS/choI 脂质体安全范围更大。

综上所述,跨膜肽修饰的 OQLCS/choI 可有效地转染 RPE 细胞,转染效率较 Lipo2000 略高,有望应用于由 RPE 病变引起的视网膜和脉络膜的相关疾病的靶向治疗。

参考文献

- [1] Cotrim AP, Baum BJ. Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects [J]. *Toxicol Pathol*, 2008, 36 (1): 97-103. doi: 10.1177/0192623307309925.
- [2] Zhang S, Zhao B, Jiang H, et al. Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA [J]. *J Control Release*, 2007, 123 (1): 1-10. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.07.016.
- [3] Wang H, Zhao P, Liang X, et al. Construction of a novel cationic polymeric liposomes formed from PEGylated octadecyl-quaternized lysine modified chitosan/cholesterol for enhancing storage stability and cellular uptake efficiency [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106 (6): 952-962. doi: 10.1002/bit.22773.
- [4] Mousa SA, Lorelli W, Campochiaro PA. Role of hypoxia and extracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells [J]. *J Cell Biochem*, 1999, 74 (1): 135-143. doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(19990701)74:1<135::AID-JCB15>3.0.CO;2-#.
- [5] Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, et al. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retina cells [J]. *Arch Ophthalmol*, 1995, 113 (12): 1538-1544.
- [6] Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, et al. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies [J]. *Surv Ophthalmol*, 2003, 48 (3): 257-293.
- [7] Liang XF, Wang HJ, Luo H, et al. Characterization of novel multifunctional cationic polymeric liposomes formed from octadecyl quaternized carboxymethyl chitosan/cholesterol and drug encapsulation [J]. *Langmuir*, 2008, 24 (14): 7147-7153. doi: 10.1021/la703775a.
- [8] Alameh M, Jean M, Dejesus D, et al. Chitosanase-based method for RNA isolation from cells transfected with chitosan/siRNA nanocomplexes for real-time RT-PCR in gene silencing [J]. *Int J Nanomedicine*, 2010, 5: 473-481.
- [9] Liang XF, Wang HJ, Luo H, et al. Synthesis, structure and properties of novel quaternized carboxymethyl chitosan with drug loading capacity [J]. *Acta Phys Chim Sin*, 2008, 24 (2): 223-229.
- [10] Ye H, Qian Y, Lin M, et al. Cationic nano-copolymers mediated IKKβ targeting siRNA to modulate wound healing in a monkey model of glaucoma filtration surgery [J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 2502-2510.
- [11] 谈娟, 郝朋, 张喜慧, 等. 非病毒载体聚乙烯亚胺介导 DNA 转染的研究 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2007, 4 (3): 229-233. doi: 10.3870/j.issn.1672-8009.2007.03.009.
- [12] Schaffer DV, Fidelman NA, Dan N, et al. Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 67 (5): 598-606. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000305)67:5<598::AID-BIT10>3.0.CO;2-G.
- [13] Borchard G. Chitosans for gene delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 52 (2): 145-150. doi: 10.1016/S0169-409X(01)00198-3.
- [14] Kunath K, von Harpe A, Fischer D, et al. Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine [J]. *J Control Release*, 2003, 89 (1): 113-125.

(收稿日期: 2015-04-15)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)