

阳离子脂质体递送STAT3 siRNA抑制黑色素肿瘤细胞探究

邹瑞¹, 彭正松^{1,2*}

(1.西华师范大学生命科学院,四川南充 637009; 2.西昌学院农业科学学院,四川西昌 615000)

摘要:利用阳离子脂质体作为载体,用其搭载鱼精蛋白与STAT3 siRNA复合物,通过一系列实验证实该复合体系可显著抑制STAT3基因在黑色素瘤细胞B16中的表达,促进肿瘤细胞的凋亡。首先对载体材料进行了一列表征测定,检测了不同复合比例下载体和siRNA复合物的粒径和电位。利用载体和siRNA的复合物对B16细胞进行转染并测定转染效率,随后对复合材料的毒性进行了检测。此外还进行了细胞凋亡、平板克隆、荧光定量PCR以及Western Blot等一系列实验来进一步确定载体复合物的有效性。实验结果表明,阳离子脂质体搭载了鱼精蛋白的STAT3siRNA表现出了良好的靶向治疗性及优秀的递送效率,且复合体系稳定性良好,毒性低。

关键词:阳离子脂质体;鱼精蛋白;siRNA;STAT3

中图分类号:R739.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-1891(2019)01-0028-06

A Study on Delivery of STAT3 siRNA by Cationic Liposome Carrier to Inhibit Melanoma Tumor Cell Growth

ZOU Rui¹, PENG Zhengsong^{1,2*}

(1. School of Life Science, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637009, China;

2. School of Agricultural Science, Xichang University, Xichang, Sichuan 615000, China)

Abstract: Using cationic liposome as a carrier to deliver a complex of protamine and STAT3 siRNA, and through a series of in vitro experiments, we confirmed that the complex system could significantly inhibit the expression of STAT3 in melanoma cells B16 and promote the apoptosis of tumor cells. First, a series of characterization tests were conducted on the carrier material, and the particle size and potential of the carriers and siRNA complexes of different composite ratio were detected. Subsequently, B16 cells were transfected with the carrier and siRNA complex and the transfection efficiency was determined, then the toxicity of the composite was tested. In addition, a series of experiments such as apoptosis, plate cloning, real-time PCR and Western Blot were performed to further determine the effectiveness of the carrier complex. The results showed that cationic liposome carrying STAT3 siRNA with protamine showed good targeted therapeutic performance and excellent delivery efficiency, and the composite system maintained good stability and low toxicity.

Keywords: cationic liposome; protamine; siRNA; STAT3

1998年,华盛顿卡耐基研究院的Fire A等首次在秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)发现了一个双链RNA能够沉默蠕形秀丽隐杆线虫基因表达,并证明上述现象属于转录后水平的基因沉默^[1],这一现象正式被称为RNA干扰(RNAi)。从1999年人们发现RNAi现象^[2]的存在到2001年, RNAi技术正式应用于哺乳动物细胞基因功能的研究中^[3],短短几年内, RNAi技术得到了飞速发展。毫无疑问,若RNAi技术能有效应用于临床,这将是基因治疗领域的一大

突破。

RNAi能够抵抗转基因或外源性病毒的侵犯。在体外设计与靶基因mRNA同源互补的双链RNA后,将这段双链RNA导入目的细胞,其能够通过同源互补,从而靶向性地降解该mRNA,达到靶基因沉默的效果。迄今为止,有两类小分子RNA在干扰过程中起主要作用:一类是microRNA(miRNA);另一类即siRNA(small interfering RNA)。近年来,全球数万科学家致力于将RNAi有效应用于人类疾病

的临床治疗,为RNAi技术的发展付出了巨大的努力。截至目前, RNAi技术已经在人类病毒感染和癌症等重大疾病的治疗当中取得了显著的治疗成效。

RNAi技术属于基因治疗的一种,基因治疗面临的首要技术问题即为载体的选择。迄今为止,基因治疗载体大致分为两类:病毒载体和非病毒载体;即便病毒载体在基因转移方面具有一定优势,但由于病毒在体内有可能自我复制从而对机体产生危害,因此病毒载体在临床上的应用受到了很大限制。阳离子脂质体作为非病毒载体的一种,因其便于操作、生物安全性较高、转染效率较高、重复性较好等优势在基因治疗领域中得到了广泛应用。其介导的RNAi步骤通常分为三步:首先利用静电吸附使阳离子脂质体与siRNA相结合;随后,脂质体和siRNA的复合体进入细胞并释放siRNA;最后siRNA进入细胞核并在RNase III家族中特异识别双链RNA的一员——Dicer酶的作用下,形成RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC), RISC被激活后,随即通过碱基同源mRNA通过碱基配对精准定位,并在距离siRNA 3'端12个碱基的位置切割靶向mRNA,从而达到使目的基因表达下调的目的。

已有研究表明,信号转导因子与转录激活因子3(STAT3)在很多恶性肿瘤细胞中处于持续激活的状态。在正常细胞中,STAT3负责将细胞外的信号传递到细胞核内,通过诱导靶基因转录表达起到作用。然而在肿瘤细胞中,STAT3在细胞的异常增殖中起到关键作用,现有实验数据证明,STAT3参与恶性肿瘤的发生、发展、侵袭和转移,这一特点使其成为理想的临床治疗靶基因。STAT3在信号通路中能被多种因子激活,活化后的STAT3随即转录激活下游的靶基因(STAT3的靶基因已经被确定包括编码抗凋亡蛋白的BCL-XL、MCL1和BCL2,增殖相关蛋白Cyclin D1和Myc,以及促血管发生因子VEGF),从而进一步引起一系列相关因子的激活和蛋白的表达,促进恶性肿瘤的发展、侵袭和转移。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

小鼠黑色素瘤细胞(B16),购于美国American Type Culture Collection(ATCC)公司。

1.2 主要设备仪器

实时定量PCR仪:Bio-Rad CFX96;核酸电泳装置:Power/PAC1000, BIO-RAD;凝胶成像仪Fluor-S TM MultiImager, BIO-RAD;流式细胞仪:BD

FACSCalibur;低速离心机: Sorvall ST 40, Thermo Fisher SCIENTIFIC;超低温冰箱(-80℃): MLTRALOW, SANYO;细胞培养箱: CO2 incubator, SANYO;酶标仪: Multiskan Mk3, Thermo Scientific;普通光学显微镜: CHS, Olympus;荧光显微镜: DP80, Olympus;RNA浓度检测仪: Nanodrop 2000, Thermo;粒径仪: Malvern Zeta Sizer Nano-ZS Zen 3600。

1.3 实验试剂

(1)siRNA:吉玛制药技术有限公司合成,上海。

(2)RNA提取试剂盒:福际公司,成都。

(3)Real-time PCR引物:擎科梓熙生物技术有限公司,成都。

(4)培养基:DMEM基础培养基+10%胎牛血清+抗生素。

(5)多聚甲醛:市科龙化工试剂,成都。

(6)反转录和荧光定量PCR试剂盒:ABM公司,加拿大。

(7)结晶紫染色溶液:碧云天生物技术有限公司。

(8)STAT3蛋白一抗:Cell Signaling Technology公司。

(9)GAPDH蛋白一抗:Cell Signaling Technology公司。

(10)细胞凋亡试剂盒:碧云天生物技术有限公司。

1.4 体外实验方法

1.4.1 凝胶阻滞实验

为了确定材料与siRNA的最佳复合比,进行了凝胶阻滞实验,具体实验方案如下。首先配置1%的核酸胶待用,随后将浓度为1 mg/mL的Liposome(以下简称LP)、1 mg/mL的Protamine(以下简称P)、1 mg/mL的siRNA按照LP、P、siRNA不同质量比(1/8 : 1/8 : 1/4 : 1/4 : 1/2 : 1/2 : 1 : 1 : 1 : 1 : 2 : 1)混合,其中,P与siRNA先共孵育5 min,而后加入LP再次共孵育10 min,之后分别将上面混合液与1 μL上样缓冲液混合进行电泳,曝光,记录结果。

1.4.2 粒径及电位的测定

按照凝胶阻滞实验所确定的最佳复合比,使用马尔文粒径仪对复合体系和单独材料组{Liposome+Protamine(LPP)、Liposome+Protamine+siRNA(LPP+siRNA)},在25℃下平衡2 min,读取粒径和Zeta电位值。

1.4.3 转染效率实验

为了确定实验设计的可行性,首先进行了复合

体系在 B16 细胞内的转染效率检测,并且同时设置阴性(Control 组)和阳性对照组(P、LP、LPP、PEI)。实验首先将生长状态良好的 B16 细胞按照每孔 10×10^4 的密度接种到 24 孔板内,贴壁过夜。次日,将孔中培养基换为 DMEM 双无培养基,而后将 LPP, PEI 分别与带荧光的 CY3- siRNA 孵育 10 min 后加入孔中,每组三个复孔。4 h 后,将孔中双无培养基更替为新鲜的 DMEM 双有培养基。24 h 后,在荧光显微镜下进行荧光拍照。将拍完照的细胞收集至流式管中,用 PBS 溶液洗涤,随后 1 500 rmp, 5 min 离心,完成后弃上清液,每管加入 300 μ L PBS 重悬细胞,随后上机进行流式检测。

1.4.4 CCK-8 毒性检测实验

为了确定实验结果是否受到材料本身可能产生的细胞毒性作用影响,将生长状态良好的 B16 细胞按照 2×10^4 的密度接种到 96 孔板内,贴壁过夜。随后,将 LPP、PEI 分别配制成分从低到高的浓度梯度(0、0.75、1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50、100、200 μ g/mL), siRNA 0.5 μ g/孔,按照 LP:P:siRNA 质量比 1:2:1、PEI:siRNA 质量比 1:1 的比例进行转染,每个浓度梯度设置 6 个复孔,按顺序依次加入到 96 孔板中,连续培养 48 h。随后,每孔加入 200 μ L CCK-8,再次共孵育 4 h 后使用酶标仪进行检测,读取 OD450。

1.4.5 体外基因沉默实验

为了确定靶基因 STAT3 在分子层面的沉默效果,使用 qPCR 方法检测加入 LPP + siSTAT3 后 STAT3 mRNA 的表达量变化。首先将生长良好的 B16 细胞按照 20×10^4 孔的密度接种到 6 孔板中,贴壁过夜。第二天向实验组(LPP/siSTAT3)孔内加入 LPP/siSTAT3,同时设立空白对照组(Control),空白材料对照组(LPP),无关 siRNA 对照组(LPP/siScramble),放入培养箱继续培养 48 h。具体配制方案如表 1 所示,其中 Liposome、Protamine、siScramble、siSTAT3 均为 1 mg/mL,表 2 同。

表 1 基因沉默实验不同组别配制方案 μ L

组别	Liposome	Protamine	siScramble	siSTAT3
Control	-	-	-	-
LPP	2	4	-	-
LPP/siScramble	2	4	2	-
LPP/siSTAT3	2	4	-	2

STAT3 siRNA 靶序列:5' -UUAGCCCAUGUG AUCUGACACCCUGAA-3' Scramble siRNA 靶序列:5' -AAUUCUCCGAACGUGUCACGU-3'

48 h 后,提取 RNA,随后按照每孔 1 μ g cDNA

进行逆转录(反应程序:85 $^{\circ}$ C, 15 s \rightarrow 42 $^{\circ}$ C, 15 min \rightarrow 16 $^{\circ}$ C, 10 min),逆转录完成后进行 qPCR,反应程序为:95 $^{\circ}$ C, 30 s \rightarrow 35 个循环(95 $^{\circ}$ C, 5 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C, 20 s),引物序列如下所示:

5' -TTCTCGTCCACCACCAAG-3'

3' -GATATTGTCTAGCCAGACCC-5'

1.4.6 Western Blot 实验

为了确定靶基因 STAT3 在蛋白层面的沉默效果,将生长良好的 B16 细胞按照 25×10^4 孔的密度接种到 6 孔板中,贴壁过夜,随后按照体外基因沉默实验的方法进行加药。

共孵育 72 h 后,弃掉每孔旧培养基,使用 PBS 洗涤,重复 2 次。随后每孔加入 100 μ L RIPA 裂解液使细胞充分裂解,使用细胞刮使细胞脱落后,收集细胞碎片的裂解液移至新的 1.5 mL EP 管中。每个 EP 管按照 1:100 的比例加入 10 μ L 100 \times 的蛋白酶抑制剂(PMSF),充分混匀,整个操作在冰上进行,随后静置 10 min。利用超声破碎仪对细胞进行破碎,随后使用 4 $^{\circ}$ C 离心机,12 000 r/min, 20 min 进行离心,取上清液于新 EP 管内。利用 BCA 试剂盒对上清液进行蛋白浓度的检测,加入上样缓冲液进行煮样获得最终样品。随后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳(质量分数为 10% 的分离胶)。按照 10 μ L/孔加样,随后 120 V 进行电泳。100 V 转膜 1.5 h 后脱脂奶粉封闭, TBST 洗涤 3 次后孵育一抗, 4 $^{\circ}$ C 摇晃过夜。次日孵育二抗,室温摇床孵育 1 h, 洗涤后加入显影液进行曝光,使用 GAPDH 作为内参。

1.4.7 平板克隆实验

为了进一步验证实验设计可以达到有效抑制黑色素瘤细胞增殖的目的,进行了 B16 细胞平板克隆实验。首先,将生长良好的 B16 细胞按照 1000/孔的密度接种到 6 孔板内,贴壁过夜。第二天待细胞贴壁后,按照体外基因沉默实验配比进行加样,在加样 4 h 后加入 1 mL 双有培养基,而后放入培养箱继续培养 1 ~ 2 周,每日观察细胞生长状况, 3 ~ 4 d 小心换液。待 6 孔板中细胞生长到肉眼可见的细胞克隆时停止培养,弃掉旧培养基, PBS 漂洗 3 次后, 4% 多聚甲醛按照每孔 200 μ L 的量加入以固定细胞,固定时间为 10 min,随后弃掉废液。随后每孔加入适量过滤后的结晶紫染料进行染色 1 min,流水洗去多余染液,室温晾干,计算克隆抑制率。

1.4.8 细胞凋亡实验

在正常细胞中,磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,简称 PS)主要分布在细胞膜外侧。在细胞发生凋亡的早期,不同类型的细胞都会

把磷脂酰丝氨酸外翻到细胞膜外侧,使得这一变化成为了细胞凋亡早期的显著标志。

Annexin V 是一种广泛分布于真核细胞浆内钙离子依赖的磷脂结合蛋白,可以选择性的结合磷脂酰丝氨酸;利用 Annexin V-FITC 自带绿色荧光的特点,就能够通过流式细胞术的手段简单而直接的检测到 PS 外翻这一细胞早期凋亡的重要特征。当细胞坏死或处于凋亡晚期时,其细胞膜的完整性遭到破坏,可被碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)染色,呈现红色荧光。在细胞膜破碎后,Annexin V-FITC 能够与质膜内侧的 PS 相结合,呈现出绿色荧光。因此,将 Annexin-V 与 PI 联合使用时,PI 则无法对活细胞(Annexin V-/PI-)和早期凋亡细胞(Annexin V+/PI-)进行染色。然而当细胞处于凋亡晚期或坏死状态下,细胞膜的破碎则可使其同时被 FITC 和 PI 染料共同结合从而呈现出红、绿荧光双阳性(Annexin V+/PI+)。

同样,为了验证结果有效性,进行了 B16 细胞凋亡实验。首先将 B16 细胞按照 10×10^4 孔的密度接种到 6 孔板内。待细胞密度达到 80% 左右弃掉旧培养基,改用等量双无培养基洗涤并替换,以对细胞进行饥饿处理。按照表 2 所示加药,每个组三个复孔,以加等量培养基作为空白对照。加药 4 h 后进行换液,而后连续培养 24 h。

表 2 细胞凋亡实验实验不同组别配制方案 μL

组别	Liposome	Protamine	siScramble	siSTAT3
Control	-	-	-	-
LPP	1	2	-	-
LPP/siScramble	1	2	1	-
LPP/siSTAT3	1	2	-	1

24 h 后,将细胞培养液吸出至一合适离心管内,用 PBS 轻轻洗涤细胞一次,加入适量不含 EDTA 的胰酶消化细胞。室温消化至轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来,吸除胰酶消化液,避免胰酶过度消化出现细胞损伤而出现细胞坏死假阳性。按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒使用说明进行后续操作并进行检测。

2 实验结果与讨论

2.1 Liposome (LP)、Liposome-Protamine (LPP) 粒径电位测定以及凝胶阻滞结果

利用马尔文粒径仪对 LP 和 LPP 的粒径和电位进行了测定。如图 1A、1B 所示,1 mg/mL 浓度时,LP 的粒径为 $36.12 \pm 2.98 \text{ nm}$,电位为 $42.8 \pm 1.2 \text{ mV}$;随后将 1 mg/mL 的 LP 与 P 以及 ScramblesiRNA 依

次按照 1:2:1 的质量比例进行定量混合孵育 10 min 后,测定混合物的粒径及电位。如图 1C、1D 所示,LPP+ScramblesiRNA 的粒径为 $43.82 \pm 0.82 \text{ nm}$,电位为 $28.7 \pm 1.5 \text{ mV}$ 。LPPP/siRNA 复合物与 LP 相比,粒径变大,电位值变小。如图 1E、1F 所示,电位测定以及凝胶阻滞(EMSA)结果表明在 LP:P:siRNA 质量比为 1:2:1 的时候,LPP 可以完全阻滞 siRNA。因此,在后续的实验中,均将采用 LP:P:siRNA 质量比 1:2:1 的比例。

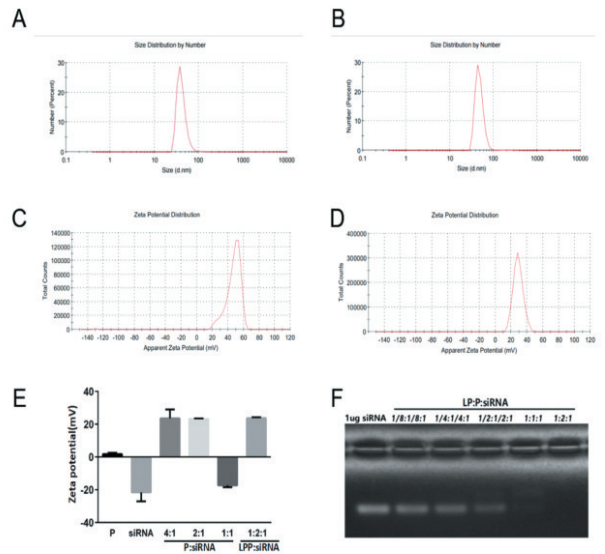


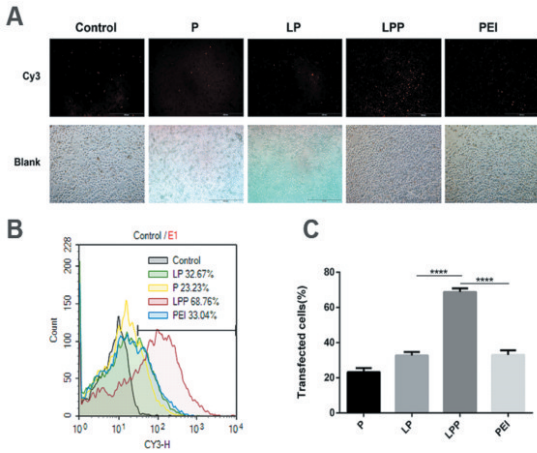
图 1 LP、LPP 粒径电位测定及凝胶阻滞结果

2.2 LPP 转染效率实验

分别用 P、LP 以及 LPP 递送带红色荧光的 Scramble siRNA (Cy3 siRNA) 转染 B16 黑色素瘤细胞系,并利用 PEI 转染试剂作为阳性对照,将不使用包裹材料直接转染的 siRNA 组作为阴性对照,即 Control 组。图 2A 为 LPP, PEI, LP、P 递送 Cy3 siRNA 转染 B16 细胞 24 h 后荧光图。如图 2B 所示,相比于 PEI 组的 33.04%,P 组的 23.23% 以及 LP 组的 32.67%,LPP 递送 Cy3 siRNA 转染 B16 细胞时,转染效率达 68.76%,具有明显的转染效率优势。如图 2C 所示,LPP 组与 PEI 组以及 LP 组具有极显著的统计学差异 ($P < 0.0001$)。

2.3 材料的 CCK-8 毒性实验

为了证明肿瘤细胞的凋亡的确是由于 siRNA 有效的降低了目的蛋白的表达量从而促使肿瘤细胞凋亡从而达到治疗目的,而不是因为递送材料本身对肿瘤细胞的毒副作用导致的细胞凋亡。针对

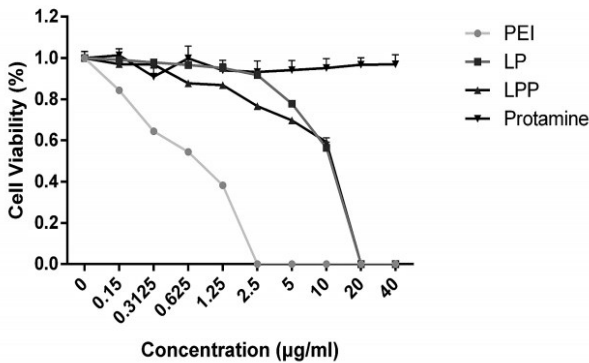


A. P、LP、LPP、PEI 递送 Cy3 siRNA 至 B16 细胞 24 h 后显微镜荧光图；B. P、LP、LPP、PEI 递送 Cy3 siRNA 至 B16 细胞 24 h 后流式结果；C. P、LP、LPP、PEI 递送 Cy3 siRNA 至 B16 细胞 24 h 后转染效率统计图。****表示 $P < 0.0001$ 。

图2 LPP 在 B16 细胞中的转染效率

LPP 是否具有明显的细胞毒副作用进行了 CCK-8 毒性实验。

按照前文所述实验方法进行了组别及实验条件控制,而后进行了 CCK-8 检测。如图 3 所示,实验结果表明,LPP 在 B16 细胞中未表现出明显的细胞毒性,证明了实验过程中,肿瘤细胞的凋亡的确是由于 STAT3 siRNA 发挥了重要作用。



注: B16 细胞在不同浓度梯度 P、LP、LPP、PEI 作用的存活率。

图3 材料的 CCK-8 毒性实验

2.4 抑制 STAT3 基因表达对肿瘤细胞的影响

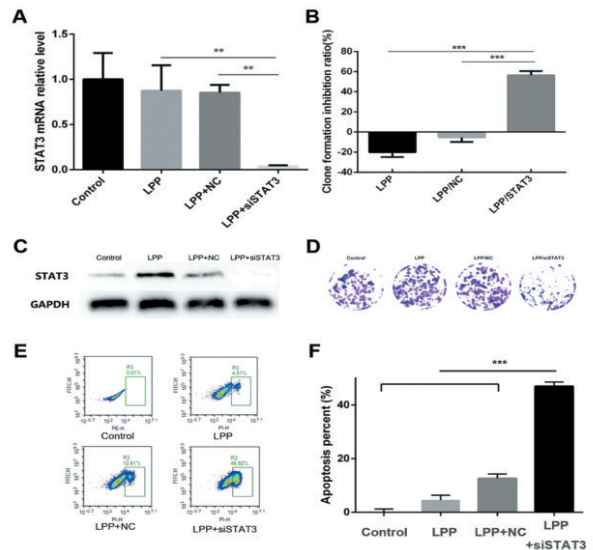
小干扰 RNA (Small interfering RNA, 即 siRNA) 是一个长 20~25 个核苷酸的双股 RNA, 主要介入 RNA 干扰 (RNAi) 现象, 以带有专一性的方式调控基因的表达。其主要功能是介导特异性的 mRNA 发生降解, 从而导致相关蛋白表达量降低, 促使靶基因产生沉默从而使细胞的形态或功能发生变化。

在正常细胞中, STAT3 负责将细胞外的信号传递到细胞核内, 通过诱导靶基因转录表达起到作用。然而在肿瘤细胞中, STAT3 与细胞的异常增殖密切相关。现有研究表明, 在大多数的肿瘤细胞中均存在 STAT3 基因的异常高表达现象。而其中就包括 B16 细胞。

目前, STAT3 已经成为了肿瘤临床治疗中常用的靶基因, 基于此, 实验旨在利用 LPP 递送 STAT3 siRNA 转染 B16 细胞, 降低细胞内 STAT3 靶基因的表达量, 从而达到抑制肿瘤细胞异常增殖, 减小肿瘤组织生长, 促使肿瘤细胞凋亡的效果。

利用 LPP 递送 STAT3 siRNA 对 B16 细胞进行转染后, 无论从分子层面 (表现为靶向 mRNA 的转录水平下调) 还是从蛋白表达量层面 (表现为目的蛋白表达量降低) 均达到了理想的效果。且实验组 (LPP+siSTAT3 组) 与单独材料组 (LPP 组) 及无关 siRNA 组 (LPP+NC 组) 均存在显著的统计学差异性 ($P < 0.01$) (图 4A, 4C)。

如图 4B、4D 所示, LPP+siSTAT3 对 B16 细胞进行转染后, 实验组的细胞克隆形成率明显降低, 且实验组与其他组均存在极显著的统计学差异性 ($P < 0.001$)。



A. LPP 递送 STAT3 siRNA 转染 B16 细胞 48 h 后 qPCR 检测 mRNA 表达量变化; B. LPP 递送 STAT3 siRNA 转染 B16 细胞一周后的克隆形成抑制率; C. LPP 递送 STAT3 siRNA 转染 B16 细胞 24h 后进行 western Blot 检测蛋白表达量变化; D. LPP 递送 STAT3 siRNA 转染 B16 细胞 1 周后平板克隆形成图; E. LPP 递送 STAT3 siRNA 转染 B16 细胞 24 h 后细胞凋亡流式结果; F. LPP 递送 STAT3 siRNA 转染 B16 细胞 24 h 后细胞凋亡率统计。*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$ 。

图4 抑制 STAT3 基因表达对肿瘤细胞 B16 的影响

凋亡实验证明,LPP+siSTAT3 复合体可有效促进 B16 细胞的凋亡,且结果具有极显著差异($P < 0.01$)(图 4E, 4F)。

以上实验结果均表明,利用 LPP 递送 STAT3 siRNA 对 B16 细胞进行转染后,有效抑制了肿瘤细胞的异常增殖,促进了肿瘤细胞凋亡,达到了预期的实验目的。

3 结语

自 1988 年人类首次在秀丽隐杆线虫中发现一个双链 RNA 能够沉默蠕形秀丽隐杆线虫基因表达的能力,从而提出 RNAi 的概念^[4];到 2000 年发现小鼠初期胚胎中及大肠杆菌中也存在 RNAi 现象,再到 2001 年, RNAi 技术被成功地引入到哺乳动物细胞基因功能的研究中;直到如今, RNAi 技术已经开始应用于各种临床治疗当中^[5]。毫无疑问,将 RNAi 技术应用于临床以治疗更多的难治疾病以及恶性肿瘤疾病已成为了必然的趋势;且必定引发人类重大疾病基因治疗的一场新革命。可以肯定,对 RNAi 技术的更深入研究必将成为未来基因治疗领域的一大热点。

目前,如何选择 RNAi 的载体仍然是最主要的问题。迄今为止,用于基因治疗的载体主要分为常

用于基因转移的病毒载体和以阳离子脂质体为代表的非病毒载体两大类。病毒载体虽然在基因转移方面存在一定优势,但由于无法控制其在体内的复制风险以及有效阻断其内在的免疫原性,因此病毒载体在临床上的应用受到了很大限制^[6]。阳离子脂质体(Cationic liposome)作为非病毒载体的一种,因其操作简便、生物安全性较高、转染效率较高、重复性较好等优势,在基因治疗领域中得到了广泛应用^[7]。

通过前期研究发现,阳离子脂质体在满足基因治疗载体所需特质的基础上,不仅能够高效递送 siRNA 进入机体靶细胞内取得理想的疗效,而且其本身对机体不会产生明显的毒性作用,这保证了阳离子脂质体未来应用于临床实验的可能性。从本文所涉及到的针对阳离子脂质体的所有实验均证明阳离子脂质体能够有效保护 siRNA 免遭降解且能够高效递送 siRNA 到达靶细胞以发挥抑制靶基因表达,从而抑制肿瘤细胞异常增殖,最终促进了肿瘤细胞凋亡。

未来,对阳离子脂质体的结构可进行进一步优化,以期可以不再借由鱼精蛋白的辅助即可达到更高层次的转染效率。

参考文献:

- [1] XIONG A, YANG Z, SHEN Y, *et al.* Transcription factor STAT3 as a novel molecular target for cancer prevention[J]. *Cancers (Basel)*, 2014, 6(2): 926–957.
- [2] MOHAN C D, BHARATHKUMAR H, BULUSU K C, *et al.* Development of a novel azaspirane that targets the Janus Kinase–signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo[J]. *J BiolChem*, 2014, 289(49): 34 296–34 307.
- [3] SANTONI M, MASSARI F, DEL Re M, *et al.* Investigational therapies targeting signal transducer and activator of transcription 3 for the treatment of cancer[J]. *Expert OpinInvestig Drugs*, 2015, 24(6): 809–824.
- [4] 郝海红, 卿柳庭, 郭定宗. RNA 干扰技术[J]. *动物医学进展*, 2005, 26 (7) :1042107.
- [5] 伍国强, 刘海龙, 刘左军. RNAi 技术及其在植物中的应用[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(19).
- [6] 叶樱泽, 张旭, 曾智, 等. 去泛素化酶 USP10 RNAi 慢病毒载体的构建及其对 PC12 细胞增殖的影响[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2019(1):6–10.
- [7] 张旭, 丁会芹, 王冰, 等. 脂质体介导 RNAi 的研究[J]. *生物医学工程学杂志*, 2012, 29(4):722–726.