

## 阳离子脂质体介导 RNA 干扰的效果评价

韩文琦<sup>1</sup>, 甄宇红<sup>1</sup>, 张树彪<sup>2</sup>, 赵轶男<sup>2</sup>, 孙永<sup>1</sup>, 郭鑫<sup>1</sup>, 王恩霞<sup>1</sup>, 刘姿<sup>1</sup>, 孙耀庭<sup>1</sup>

1 大连医科大学药学院, 辽宁 大连 116044

2 大连民族大学 生物技术与资源利用国家民委-教育部重点实验室, 辽宁 大连 116600

韩文琦, 甄宇红, 张树彪, 等. 阳离子脂质体介导 RNA 干扰的效果评价. 生物工程学报, 2015, 31(8): 1239-1246.

Han WQ, Zhen YH, Zhang SB, et al. Efficacy of RNA interference mediated by cationic liposomes. Chin J Biotech, 2015, 31(8): 1239-1246.

**摘要:** 考察自制的肽型阳离子脂质体 CDO14 作为 RNA 转染载体的细胞毒性及其运载 siRNA 进行 RNA 干扰的效果。通过 MTT 法检测脂质体对稳定表达荧光素酶的肺癌 A549 (Luc-A549) 细胞的毒性。以脂质体为载体将荧光素酶 siRNA (Luc-siRNA) 转染至 Luc-A549 细胞内, 用发光仪检测转染细胞内荧光素酶含量, BCA 法检测细胞内总蛋白含量。在裸鼠腋下接种 Luc-A549 细胞, 成瘤后尾静脉注射 Luc-siRNA 和脂质体的复合物, 利用活体成像系统检测模型小鼠体内荧光素酶的表达量。细胞毒性实验表明, 自制脂质体的毒性与商品脂质体 DOTAP 相近, 低于商品脂质体 Lipo2000; 细胞转染实验表明自制脂质体作为基因转染载体的转染效率高于 DOTAP; 体内转染实验表明 CDO14 作为载体转染效果优于 DOTAP。结果表明, 肽型阳离子脂质体 CDO14 具有毒性小、转染效率高等优点, 有望作为转染载体用于基因治疗。

**关键词:** 阳离子脂质体, 荧光素酶, A549 细胞, RNA 干扰

**Received:** October 29, 2014; **Accepted:** December 10, 2014

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 20876027, 21176046), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA020707), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. DC12010104), Natural Science Foundation of Liaoning Province (No. 2013023037).

**Corresponding authors:** Yuhong Zhen. Tel/Fax: +86-411-86110414; E-mail: zhenyhwaner@aliyun.com

Shubiao Zhang. Tel/Fax: +86-411-87656141; E-mail: zsb@dlnu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 20876027, 21176046), 国家高新技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA020707), 中央高校自主科研基金 (No. DC12010104), 辽宁省自然科学基金 (No. 2013023037) 资助。

网络出版时间: 2015-02-27

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150227.1139.005.html>

# Efficacy of RNA interference mediated by cationic liposomes

Wenqi Han<sup>1</sup>, Yuhong Zhen<sup>1</sup>, Shubiao Zhang<sup>2</sup>, Yinan Zhao<sup>2</sup>, Yong Sun<sup>1</sup>, Xin Guo<sup>1</sup>,  
Enxia Wang<sup>1</sup>, Zi Liu<sup>1</sup>, and Yaoting Sun<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning, China

<sup>2</sup> SEAC-ME Key Laboratory of Biotechnology and Bio-resources Utilization, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, Liaoning, China

**Abstract:** To investigate the cytotoxicity of the homemade peptide cationic liposome CDO14 and its efficacy of RNA interference (RNAi). MTT method was used to determine the cytotoxicity of the liposome to a human lung cancer cell line Luc-A549 that can express luciferase stably. Luciferase siRNA (Luc-siRNA) was transfected into Luc-A549 cells by CDO14. Contents of luciferase in the transfected cells were detected by luminous instrument and contents of total protein in these cells were detected by BCA method. Nude mice were inoculated with Luc-A549 cells in axilla to establish xenograft tumor model. Complexes of Luc-siRNA and the cationic liposomes were injected into the modeling mice via tail vein. Contents of luciferase in the transfected mice were detected by the whole body imaging system. The cytotoxicity of the homemade cationic liposome was similar to that of commercial liposome DOTAP, and lower than that of Lipo2000. The siRNA transfection efficacy mediated by CDO14 was higher than that mediated by DOTAP. The homemade peptide cationic liposome CDO14 is expected to serve as delivery vector in gene therapy because of its low cytotoxicity and high transfection efficiency.

**Keywords:** cationic liposome, luciferase, A549 cell, RNAi

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是生物体内双链 RNA 介导的同源 mRNA 降解现象, 是一种序列特异性的转录后基因沉默机制<sup>[1-2]</sup>。RNAi 为特异性抑制目的基因的表达提供了有效的方法, 目前主要应用于调节目基因功能, 抗病毒和抗肿瘤的基因治疗等领域<sup>[3-4]</sup>。RNAi 研究近年发展迅速, 但如何高效转运 siRNA, 尤其是以较低浓度的 siRNA 高效沉默目的基因仍是一个急需解决的问题。

目前用于基因转染的载体可分为病毒载体和非病毒载体。虽然病毒作为转载体具有效率高的优点<sup>[5-7]</sup>, 但存在免疫原性高、载体容量小和致癌性等缺点<sup>[8-10]</sup>, 限制了它在临床应用上的应用。非病毒载体中最典型的是阳离子脂质体 (Cationic liposomes), 具有可自然降解、无

免疫原性、可重复转染等优点<sup>[11-15]</sup>, 近年来备受研究者的重视, 至今已有数十种阳离子脂质体被研制出来<sup>[16]</sup>。本文将考察自制的肽型阳离子脂质体 CDO14 (图 1) 的毒性及其介导 RNA 干扰的效果。

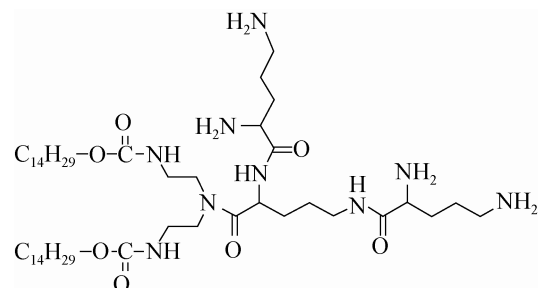


图 1 阳离子脂质体 CDO14 的结构

Fig. 1 Structure of cationic liposome CDO14.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 siRNA 与细胞株

siRNA 购自 Invitrogen 公司; 表达荧光素酶的人肺癌细胞 A549 (Luc-A549) 由美国北卡罗莱纳大学药学院惠赠。

#### 1.1.2 检测试剂及化学试剂

脂质体 DOTAP 和 Lipo2000 购自 Life 公司; CDO14 自制; Luciferase Assay Kit 购自 Promega 公司; D-luciferin Potassium Salt 购自上海科远迪生物科技有限公司。

#### 1.1.3 实验动物

4-6 周雌性 BALB/c-nude 小鼠购自大连医科大学 SPF 动物中心, 实验动物使用许可证号: SCXK (辽) 2010-0002, 于无特异致病原 (SPF) 的环境下饲养。动物饲养和使用符合实验动物管理条例, 动物实验经大连医科大学动物伦理委员会批准。

#### 1.1.4 实验仪器

活体成像仪 IVIS200 购自美国 Xenogen 公司; 发光仪 GioMax™ 96 Microplate Luminometer 购自 Promega 公司; CO<sub>2</sub> 培养箱购自上海智城分析仪器制造有限公司; 酶标仪 FC 购自美国 Thermol 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 MTT 法检测脂质体毒性

将 Luc-A549 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔加入 200 μL 含 10% FBS 不含双抗的 DMEM 培养基, 接种  $4 \times 10^3$ – $5 \times 10^3$  个细胞。将细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 16–24 h, 使细胞密度达 80%–90% 左右。将 DOTAP、

Lipo2000、CDO14 三种脂质体分别用无血清 DMEM 稀释, 每种脂质体均稀释为 0.06、0.006、0.000 6 mg/mL, 室温放置 5 min, 吸弃孔内培养上清液, 每孔加 200 μL 脂质体稀释液, 在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 孵育 4–5 h 后弃除脂质体稀释液, 加入含 FBS 的 DMEM 继续培养, 48 h 后吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 100 μL 0.5 mg/mL MTT, 4–6 h 后每孔加入 100 μL 三联液继续培养, 12–20 h 后用酶标仪检测各孔在 570 nm 下的吸光值。

#### 1.2.2 siRNA 的合成

siRNA 由 Invitrogen 公司合成, Luc-siRNA 序列: 正义 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAT T-3', 反义 3'-TTGAAUGCGACUCAUGAAGC U-5'; 阴性对照 siRNA 序列: 正义 5'-UUCUCCG AACGUGUCACGUTT-3', 反义 3'-ACGUGACA CGUUCGGAGAATT-5', 此序列不与任何人类基因序列同源, 命名为 N-siRNA。

#### 1.2.3 细胞转染

将 A549 细胞接种于 24 孔细胞培养板中, 每孔加入 500 μL 含 10% FBS 不含双抗的 DMEM, 接种  $0.5 \times 10^5$ – $2 \times 10^5$  个细胞, 将细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 16–24 h 使细胞密度达 80%–90% 左右。将 1.5 μg Luc-siRNA 或 N-siRNA 用 PBS 稀释至 50 μL, 3 μg 脂质体 DOTAP 或 CDO14 用 PBS 稀释至 50 μL, 将稀释后的 siRNA 与脂质体混合 (即质量比 1:2), 制备的复合物在室温放置 20 min, 然后每孔加入 100 μL 上述复合物转染细胞。对照组不加 siRNA, 只加相同剂量的脂质体。转染的细胞在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 孵育 4–5 h, 吸弃原培养液, 重新加入 500 μL 含 10% FBS 不含双抗的

DMEM, 继续培养 48 h。

#### 1.2.4 发光值的测定

细胞转染 48 h 后, 去除孔中 DMEM, 用 DPBS 润洗 2 次, 每孔加入 600  $\mu\text{L}$  裂解液 (10% 甘油, 1% Triton-100 溶于 DPBS 中), 室温充分裂解 20 min 后, 取细胞裂解液 20  $\mu\text{L}$  移至 96 孔白板中, 加 80  $\mu\text{L}$  荧光素酶检测液, 使用发光仪测发光值, 以发光值表示荧光素酶的量。

#### 1.2.5 总蛋白含量的测定

将 250  $\mu\text{L}$  蛋白检测试剂和 5  $\mu\text{L}$  细胞裂解液混匀, 加到 96 孔透明板中, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min。使用酶标仪测 570 nm 下吸光值, 计算总蛋白含量。

以荧光素酶含量/总蛋白含量 (RLU/mg) 表示细胞内 RNAi 的效果。

#### 1.2.6 裸鼠移植瘤模型的建立

取对数生长期 Luc-A549 细胞, 用胰蛋白酶消化, 离心、收集细胞后用 PBS 洗两次。再次重悬后, 用 PBS 调整体积, 使浓度达到  $2 \times 10^7$  cells/mL。在无菌室内, 将裸鼠常规消毒后, 在前肢腋下皮下接种上述细胞, 每只 0.2 mL。接种后, 定期观察小鼠的精神、饮食及排便等情况, 称量小鼠体重。接种 1 周左右, 可见接种部位皮下长出米粒大小的硬结, 为移植瘤模型建成。接种 15 d 左右, 瘤体积 (计算公式  $V=ab^2/2$ , a 和 b 分别代表移植瘤最大长径和横径) 达到 100–200  $\text{mm}^3$ , 开始实验。

#### 1.2.7 裸鼠体内转染

将 12 只成瘤裸鼠随机分为 4 组, 每组 3 只, 分别为空白对照组、阴性对照组、DOTAP 转染组、CDO14 转染组。每只裸鼠用量为 8  $\mu\text{g}$  siRNA 和 24  $\mu\text{g}$  脂质体, 先将 siRNA 与脂质体

分别稀释于 42  $\mu\text{L}$  与 76  $\mu\text{L}$  PBS 中, 然后将 siRNA 加到脂质体中, 混匀, 制备的复合物室温放置 20 min 后, 给裸鼠尾静脉注射进行体内转染。

#### 1.2.8 裸鼠体重、瘤体积和活体成像检测

于转染前和转染后 48 h 测量并记录裸鼠体重, 用游标卡尺测瘤大小, 并计算瘤体积。活体成像检测体内荧光素酶的表达, 裸鼠腹腔注射荧光素 3 mg/20 g, 自由活动 15 min 后用异氟烷麻醉, 再进入活体成像系统拍照。以转染前后小鼠瘤内的净光密度比表示体内 RNAi 的效果。

#### 1.2.9 数据分析

实验数据用平均数 $\pm$ 标准误 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 应用 SPSS 11.5 统计软件进行分析。两组间均数采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 脂质体对 Luc-A549 细胞的毒性

在给药 48 h 后, MTT 法检测细胞的存活率。由图 2 可见, 在脂质体浓度为 0.000 6 mg/mL 时, 不同脂质体对细胞存活率的影响无显著性差异; 当脂质体浓度为 0.006 mg/mL 时, DOTAP 组和 Lipo2000 组细胞的存活率分别为 80% 和 49%, CDO14 组细胞的存活率为 79%, 自制脂质体组细胞的存活率高于商品脂质体 Lipo2000 ( $P < 0.05$ ), 与 DOTAP 相当; 当脂质体浓度为 0.06 mg/mL 时, 各组的细胞存活率均较低, 但 CDO14 组与 DOTAP 组相当, 明显高于 Lipo2000 组 ( $P < 0.05$ )。可见, 自制脂质体的毒性与 DOTAP 相当, 低于 Lipo2000, 在后续的实验中将采用 DOTAP 作为阳性对照。

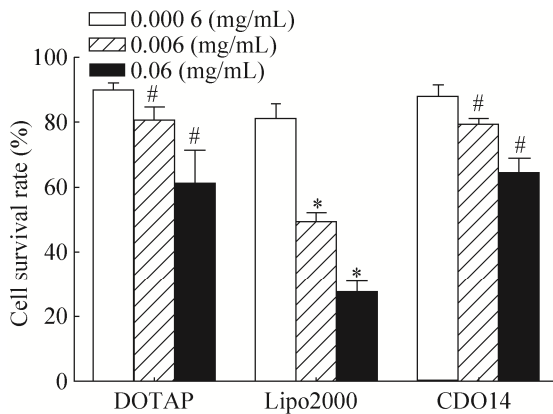


图 2 不同脂质体对 Luc-A549 细胞的毒性

Fig. 2 Cytotoxicity of different liposomes to Luc-A549 cells. \* Compared with DOTAP at the same concentration,  $P < 0.05$ ; # Compared with Lipo2000 at the same concentration,  $P < 0.05$ .

## 2.2 脂质体介导的细胞内 RNAi

将 siRNA 转染至 Luc-A549 细胞, Luc-siRNA 转染组荧光素酶的表达量明显低于 N-siRNA 转染组及未转染 siRNA 组 ( $P < 0.05$ ), N-siRNA 转染组和未转染 siRNA 组间无明显差异, 表明合成的 Luc-siRNA 可在转录水平上抑制荧光素酶报告基因的表达 (图 3)。

两种脂质体介导的 Luc-siRNA 转染组荧光素酶的表达量明显低于无脂质体组 ( $P < 0.05$ ); 以 CDO14 为载体组 Luc-A549 细胞的荧光素酶表达量明显低于以 DOTAP 为载体组 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。

## 2.3 脂质体介导小鼠体内 RNAi

小鼠腋下接种 Luc-A549 细胞 15 d 后进行体内转染, 分别在转染前及转染后 48 h 检测小鼠体内荧光素酶的表达量和小鼠的瘤体积。如图 4 所示, 在小鼠肿瘤接种部位能观察到荧光素酶的表达, Luc-RNAi 特异性转染组荧光素酶表达

量在转染后明显降低。如图 5 所示, 随着时间的推移, 各组小鼠体内肿瘤细胞增多, 瘤体积增大; 转染 48 h 后, 空白对照组和 N-siRNA 非特异性转染组荧光素酶表达量随着肿瘤体积的增加而升高, 而两种脂质体介导的 Luc-RNAi 特异性转染组荧光素酶表达量均显著降低, 以脂质体 CDO14 介导的干扰效果更明显。

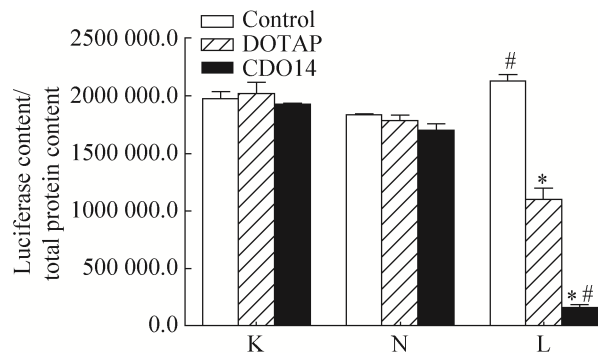


图 3 不同脂质体介导 Luc-A549 细胞内 Luc-RNAi

Fig. 3 Luc-RNAi in Luc-A549 cells mediated by different liposomes. K: not transfected group; N: N-siRNA transfected group; L: Luc-siRNA transfected group; \* Compared with the same liposome in group K,  $P < 0.05$ ; # Compared with DOTAP in the same group,  $P < 0.05$ .

Luc-RNAi 特异性转染组与空白组及 N-siRNA 非特异性转染组相比, 转染前后瘤体积比例无显著差异。说明 Luc-RNAi 并没有影响肿瘤的大小, 只是干扰了荧光素酶的表达。

## 3 讨论

RNAi 是进化上保守的转录后基因沉默途径, 是一种具有巨大潜力的人类疾病治疗工具, 但如何高效运载 siRNA 进入靶组织已成为限制

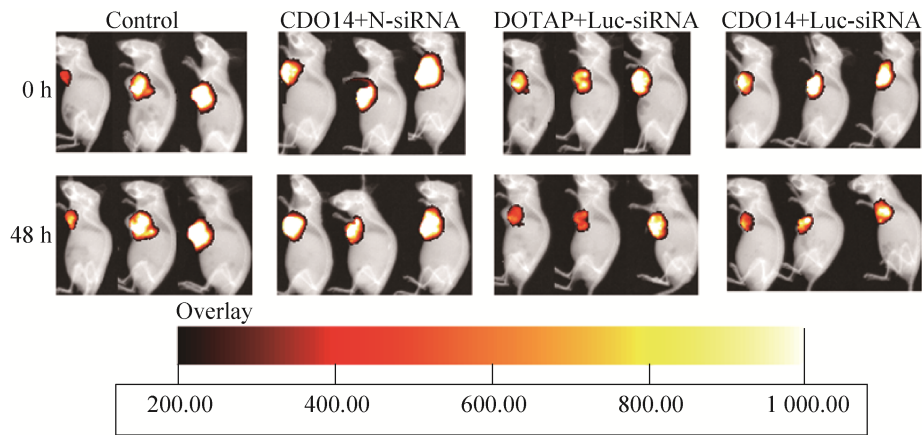


图 4 不同脂质体介导小鼠体内 **Luc-RNAi**

Fig. 4 Luc-RNAi in mice mediated by different liposomes. Control: blank control; CDO14+N-siRNA: CDO14 carrying N-siRNA; DOTAP+Luc-siRNA: DOTAP carrying Luc-siRNA; CDO14+Luc-siRNA: CDO14 carrying Luc-siRNA.

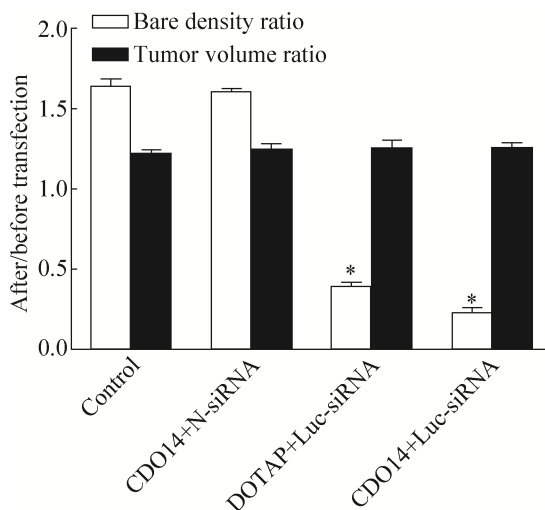


图 5 转染后 48 h 与转染前净光密度比和瘤体积比

Fig. 5 Ratios of bare density and ratios of tumor volume after transfection for 48 h. Control: blank control; CDO14+N-siRNA: CDO14 carrying N-siRNA; DOTAP+Luc-siRNA: DOTAP carrying Luc-siRNA; CDO14+Luc-siRNA: CDO14 carrying Luc-siRNA; \*: compared with control group,  $P < 0.05$ .

RNAi 应用的主要障碍<sup>[17]</sup>。阳离子脂质体是一种由多聚阳离子磷脂和胆固醇构成的表面带有正

电荷的脂质体复合物，是目前公认的转染效率较高的非病毒载体之一，但有一定的细胞毒性<sup>[18]</sup>。其介导基因转染的机制为：带正电荷的阳离子脂质体通过静电作用与带负电的基因 (DNA 或 RNA) 形成脂质体-基因复合物，通过细胞内吞或细胞膜融合作用进入细胞内，进一步释放基因，从而在细胞内转录和翻译<sup>[19]</sup>。

肽型阳离子脂质体与其他类型的阳离子脂质体相比具有良好的生物降解能力和生物相容性，并具有靶向性，近年来受到广泛关注<sup>[20-21]</sup>。阳离子脂质体作为基因转染载体，转染效果与脂质体的氨基酸、多肽等头部有关，而连接键决定了其稳定性和生物降解性<sup>[22-23]</sup>。本研究中考察的肽型阳离子脂质体 CDO14 的极性头部是由 3 个鸟氨酸形成的三肽；疏水尾部是两个 14 碳烷基链，连接键为氨基甲酸酯。细胞毒性实验表明该脂质体的细胞毒性与常用的商品脂质体 DOTAP 相近，其作为 siRNA 转染载体，在体内外的 RNAi 效果均优于 DOTAP。DOTAP

的极性头部是季铵盐, 其与基因的结合域比肽型头部要小, 因而其结合力可能会弱。此外, DOTAP 中的连接键是酯键, 而 CDO14 中的连接键是氨基甲酸酯键, 相对而言后者具有更好的稳定性。DOTAP 的季铵盐头部可能使其毒性大于肽型头部的脂质体, 我们在考察脂质体对 A549 细胞毒性的实验中得到的结果是二者毒性相近, 但对于其他细胞及在体内的毒性如何, 还有待于深入研究。

为了评价体内 siRNA 干扰效果, 我们将稳定表达荧光素酶的细胞株 Luc-A549 接种小鼠腋下, 在裸鼠体内稳定成瘤, 建立了表达荧光素酶的小鼠移植瘤模型。该模型与传统的肿瘤动物模型相比, 能够通过活体成像技术在空间和时间分布上反映细胞内荧光素酶的表达, 便于检测活体动物体内肿瘤的生长和转移情况, 同时可以对同一个研究个体进行长时间反复跟踪成像, 以便长期观察, 并减少了不同实验动物之间的个体差异<sup>[24-25]</sup>。

## 4 结论

本实验结果表明肽型阳离子脂质体 CDO14 与商品脂质体相比具有毒性小、转染效率高等优点, 有望作为转染载体用于基因治疗。但此类脂质体在其他细胞中的毒性及转染效果, 以及其体内毒性还需进一步研究。

## REFERENCES

- [1] Halic M, Moazed D. Dicer-independent primal RNAs trigger RNAi and heterochromatin formation. *Cell*, 2010, 140(4): 504–516.
- [2] Sun P, Zhao W, Liu YL. Principle and application of RNA interference technology. *Med Recapitul*, 2011, 17(2): 164–167 (in Chinese).
- [3] Ntziachristos V, Ripoll J, Wang LV, et al. Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(3): 313–320.
- [4] Notting IC, Buijs JT, Que I, et al. Whole-body bioluminescent imaging of human uveal melanoma in a new mouse model of local tumor growth and metastasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(5): 1581–1587.
- [5] Crystal RG. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science*, 1995, 270(5235): 404–410.
- [6] Chandrashekhar V, Srujan M, Prabhakar R, et al. Cationic amphiphiles with fatty acyl chain asymmetry of coconut oil deliver genes selectively to mouse lung. *Bioconjug Chem*, 2011, 22(3): 497–509.
- [7] Xiu KM, Zhao NN, Yang WT, et al. Versatile functionalization of gene vectors via different types of zwitterionic betaine species for serum-tolerant transfection. *Acta Biomater*, 2013, 9(7): 7439–7448.
- [8] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol*, 2007, 36(3): 184–204.
- [9] Donahue RE, Kessler SW, Bodine D, et al. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med*, 1992, 176(4): 1125–1135.
- [10] Sun JY, Anand-Jawa V, Chatterjee S, et al. Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors. *Gene Ther*, 2003, 10(11): 964–976.
- [11] Nakagawa O, Ming X, Huang L, et al. Targeted intracellular delivery of antisense oligonucleotides via conjugation with small-molecule ligands. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(26): 8848–8849.
- [12] Bishop CJ, Ketola TM, Tzeng SY, et al. The effect and role of carbon atoms in poly( $\beta$ -amino ester)s for DNA binding and gene delivery. *J Am Chem*

- Soc, 2013, 135(18): 6951–6957.
- [13] Clerici AM, Faraoni P, Ferrari C, et al. Carborane derivatives loaded into liposomes as efficient delivery systems for boron neutron capture therapy. *J Med Chem*, 2009, 52(23): 7829–7835.
- [14] Zhang S, Zhao Y, Zhao B, et al. Hybrids of nonviral vectors for gene delivery. *Bioconjug Chem*, 2010, 21(6): 1003–1009.
- [15] Zhi D, Zhang S, Cui S, et al. The headgroup evolution of cationic lipids for gene delivery. *Bioconjug Chem*, 2013, 24(4): 487–519.
- [16] Hyoudou K, Nishikawa M, Umeyama Y, et al. Inhibition of metastatic tumor growth in mouse lung by repeated administration of polyethylene glycol-conjugated catalase: quantitative analysis with firefly luciferase-expressing melanoma cells. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(22): 7685–7691.
- [17] Mandl SJ, Mari C, Edinger M, et al. Multi-modality imaging identifies key times for annexinV imaging as an early predictor of therapeutic outcome. *Mol Imaging*, 2004, 3(1): 1–8.
- [18] Guo B H, Zhang J S, Xie Y J. Development of cationic liposomes in research of gene delivery. *Prog Pharm Sci*, 2000, 24(1): 1–4.
- [19] Tresset G. The multiple faces of self-assembled lipidic systems. *PMC Biophys*, 2009, 2(1): 3–4.
- [20] Rea JC, Gibly RF, Barron AE, et al. Self-assembling peptide-lipoplexes for substrate-mediated gene delivery. *Acta Biomater*, 2009, 5(3): 903–912.
- [21] Rajesh M, Sen J, Srujan M, et al. Dramatic influence of the orientation of linker between hydrophilic and hydrophobic lipid moiety in liposomal gene delivery. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(37): 11408–11420.
- [22] Lamanna CM, Lusic H, Camplo M, et al. Charge-reversal lipids, peptide-based lipids, and nucleoside-based lipids for gene delivery. *Acc Chem Res*, 2012, 45(7): 1026–1038.
- [23] Ashley CE, Carnes EC, Epler KE, et al. Delivery of small interfering RNA by peptide-targeted mesoporous silica nanoparticle-supported lipid bilayers. *ACS Nano*, 2012, 6(3): 2174–2188.
- [24] Wang X, Rosol M, Ge S, et al. Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using *in vivo* bioluminescence imaging. *Blood*, 2003, 102(10): 3478–3482.
- [25] Zhang HY, Li Y, Wang Z, et al. Establishment of xenograft mouse models to study human lung cancer by using *in vivo* imaging system. *Chin J Biotech*, 2009, 25(8): 1204–1210 (in Chinese).  
张海燕, 李艳, 王喆, 等. 用于活体成像的小鼠肺癌移植瘤模型的建立. *生物工程学报*, 2009, 25(8): 1204–1210.

(本文责编 郝丽芳)