

富含支化精氨酸的两亲性阳离子脂质肽体内外 mRNA 基因递送能力及安全性评价

王一醇¹, 蒲艺瑶¹, 毕群杰¹, 宋相容², 金蓉蓉¹, 聂宇^{1*}

(1. 四川大学国家生物医学材料工程技术研究中心/四川大学生物医学工程学院, 四川 成都 610064;
2. 四川大学, 生物治疗全国重点实验室, 四川 成都 610041)

摘要: mRNA 基因治疗因其可扩展、修饰, 不需要进入细胞核及不整合宿主遗传基因等优势而备受关注。在基因治疗中, 将 mRNA 安全有效地递送到细胞内对于基因治疗的成功至关重要。本研究基于前期设计合成的富含支化精氨酸的两亲性阳离子脂质肽 (dendritic arginine & disulfide bond-containing cationic lipopeptide, RLS) 基因载体在斑马鱼体内成功实现比商品化试剂 Lipofectamine 2000 高 1.5 倍的 mRNA 转染效果, 并通过体外细胞毒性和斑马鱼体内生物安全性研究证实其具有良好的生物安全性。首先, 通过核磁共振氢谱 (¹H NMR) 及飞行时间质谱 (MALDI-TOF) 对阳离子脂质肽的化学成分进行表征。通过动态光散射粒度分析仪 (DLS) 测试的粒径和电位结果显示, 在氮磷 (N/P) 比为 20 时, RLS 与 mRNA 复合组装体形成平均粒径约 220 nm、表面 ζ 电位约 +21 mV 的均匀纳米粒子。体外基因转染中, RLS 在人胚肾 293 细胞 (HEK293) 和大鼠间充质干细胞 (MSC) 中的转染效率较 Lipofectamine 2000 分别提高 1.2 和 3 倍。此外, 将 RLS 显微注射至斑马鱼胚胎后, 通过评价生存率、孵化率和致畸率等指标, 进一步证实了其在体内良好的安全性。综上所述, 该富含支化精氨酸的两亲性阳离子脂质肽 RLS 具有优良的 mRNA 递送性能和安全性。

关键词: 支化精氨酸; 两亲性阳离子脂质肽; 基因载体; mRNA 递送; 斑马鱼

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)04-1079-08

mRNA delivery and safety evaluation of arginine-rich amphipathic cationic lipopeptides *in vivo* and *in vitro*

WANG Yi-chun¹, PU Yi-yao¹, BI Qun-jie¹, SONG Xiang-rong², JIN Rong-rong¹, NIE Yu^{1*}

(1. National Engineering Research Centre for Biomaterials/College of Biomedical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: mRNA gene therapy has attracted much attention due to its advantages such as scalability, modification, no need to enter the nucleus and no integration of host genes. In gene therapy, safe and effective delivery of mRNA into cells is critical for the success of gene therapy. In this study, we designed and synthesized an amphiphilic cationic lipopeptide gene vector (dendritic arginine & disulfide bond-containing cationic lipopeptide, RLS) enriched with branched arginine. We achieved a 1.5-fold higher mRNA transfection efficiency in zebrafish compared to the commercial reagent Lipofectamine 2000, and confirmed its good biosafety by *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* biosafety. First, we characterized the chemical composition of the cationic lipid peptides by nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy (¹H NMR) and time-of-flight mass spectrometry (MS). The results of particle size and potential tested by dynamic light scattering particle size analysis showed that at a

收稿日期: 2023-12-25; 修回日期: 2024-02-22.

基金项目: 四川省科技项目 (2023YFH0060); 中德科学基金研究交流中心中德合作小组项目 (GZ1512).

*通讯作者 Tel: 13699024669, E-mail: nie_yu@scu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1443

nitrogen/phosphorus (N/P) ratio of 20, the RLS/mRNA composite assemblies formed homogeneous nanoparticles with an average particle size of about 220 nm and a surface ζ potential of about +21 mV. *In vitro* gene transfection, the transfection experiments demonstrated that RLS exhibited 1.2-fold higher transfection efficiency in human embryonic kidney 293 cells (HEK293) and 3-fold higher transfection efficiency in rat mesenchymal stem cells (MSC) compared to Lipofectamine 2000. In addition, after microinjection of RLS into zebrafish embryos, we evaluated the survival, hatching, and teratogenicity rates, all of which confirmed its favorable *in vivo* safety profile. Thus, this amphiphilic cationic lipid peptide RLS, enriched with branched arginine, exhibits excellent mRNA delivery properties and safety. These findings highlight its potential as a promising gene therapy tool.

Key words: branched arginine; amphiphilic cationic lipid; gene vector; mRNA delivery; zebrafish

mRNA 有着可扩展、可修饰、不需要进入细胞核发挥作用及不整合宿主遗传基因组的优势,近年来在基因治疗中受到广泛关注^[1]。目前,尽管病毒性载体用于 mRNA 递送具有高转染效率,但依然存在免疫原性和病毒性重组等安全性问题^[2]。相比之下,非病毒性载体在递送 mRNA 时,其免疫原性和细胞毒性较低^[3,4],同时也不限制载体容量且化学结构可控制。因此,基于非病毒载体的基因 (mRNA) 治疗现已成为广泛应用于肿瘤^[5]、心血管^[6]及其他免疫缺陷疾病的治疗手段^[7-9]。2019 年冠状病毒的流行加速了基于可电离脂质 (LNP) 的 mRNA 疫苗生产,其中 Moderna 公司的 Spikevax 和辉瑞公司/BioNTech 的 Comirnaty 在 2021 年获得批准^[10]。阳离子脂质是 LNP 的核心组分,通常约占总脂质体的 50%,同时显著影响载体的基因递送性能。作为目前使用最广泛的非病毒载体,阳离子脂质主要由亲水性头部、连接键和疏水性尾部组成,基因递送效率和生物安全性与上述组成成分密切相关。

带正电荷的亲水性头部通过静电相互作用与带负电荷的基因复合,起到包封、保护和递送 mRNA 的作用。然而,过强的正电性会导致核酸结合过紧,从而降低基因传递效率,增加细胞毒性^[11,12]。此外,在血清存在的条件下,为了达到最佳的转染效果,往往需要设置较高的氮磷比,这会进一步增加载体的用量,并增加细胞毒性^[13]。连接键作为基因递送中的关键组分,具有环境响应特性^[14-16],除了影响转染效果^[17-20],还会影响阳离子脂质的稳定性^[21],可降解性和细胞毒性^[22]。其中,具有高氧化还原灵敏度的二硫键作为阳离子脂质连接键,已显示出诸多优点,包括易于制备、降低载体细胞毒性和高效释放基因^[23,24]。阳离子脂质的疏水性尾部通常具有 C8:0 到 C18:1 的碳链长度和不饱和度,其中 C18:1 单不饱和脂肪酸链可以提高膜流动性,从而实现最佳的转染效果^[25]。然而,有研究表明,短饱和和长不饱和和烷链可能降低双分子层的流动性,并且增加烷基链的长度不利于脂质单体的膜间转移和脂质膜混合,导致 DNA 难以逃逸^[26]。因此,设计一个具有高效基因转

染效率和良好安全性的阳离子脂质体至关重要。

目前对阳离子脂质的安全性评估仍局限于细胞层面,缺乏对体内安全性的全面评价,尤其是对动物生长发育的影响方面的研究尚不充分。为了填补这一研究空白,作者选择了斑马鱼作为动物模型,因其具有低饲养成本、短繁殖周期、胚体透明和体外发育等特点,在生命科学领域已被广泛应用^[27]。并且,斑马鱼基因与人类基因的相似性高达 87%,因此将其作为安全性评估的动物模型,可以较为准确地反映材料在人体内的毒性和作用^[28,29]。此外,斑马鱼的胚体发育可以通过光学显微镜实时观察,这有利于实现药物对有机体影响的实时评价,为药物安全性评估和药物筛选提供了有利平台。

根据之前的研究,本课题组设计合成了一种富含支化精氨酸的两亲性阳离子脂质肽 (dendritic arginine & disulfide bond-containing cationic lipopeptide, RLS)。该载体由精氨酸头部、油酸疏水尾部和二硫键连接部分组成,具有良好的基因压缩、内体逃逸性能及良好的环境响应性,在多个细胞中已被证实具有出色的 pDNA^[23,30,31]和 siRNA^[32]基因递送效果。为进一步研究该基因载体的性能和安全性,本研究对其进行了物理性能分析,并在体内外评估了其 mRNA 递送效率及在细胞和动物层面的生物安全性。

材料与方法

材料与动物 二甲基亚砜 (DMSO, 99%, 中国 Adamas); Lipofectamine 2000 (Lipo 2000, 美国 Invitrogen); 人胚肾 293 细胞 (HEK293)、大鼠间充质干细胞 (MSC) (中国科学院上海库); CCK-8 试剂盒 (日本 Dojin); Minimum Essential Medium 培养基 (MEM 培养基)、 α -Minimum Essential Medium 培养基 (α -MEM 培养基)、PBS 缓冲液、南美血清 (美国 Gibco); 琼脂糖 (西班牙 Biowest); 绿色荧光蛋白 mRNA (EGFP mRNA, 本实验室合成); 野生型斑马鱼 (AB line, 国家斑马鱼资源中心)。

仪器 磁力搅拌器 (德国 IKA); 移液器 (德国

Eppendorf); 倒置荧光显微镜 (德国 Leica); 细胞培养箱 (美国 ThermoFisher); 纳米粒度-电位测试仪 (英国 Malvern); LSM 880 激光共聚焦扫描显微镜 (LSM 880)、S9 E 体式显微镜、Discovery V20 体式显微镜 (德国 Zeiss); P-2000 型拉针仪 (美国 Axon); SYS-PV830 显微注射系统 (美国 Word Precision Instruments); DC2200 型高能 LED 光源 (美国 THORLABS)。

两亲性阳离子脂质肽/基因复合物的制备及物理表征

RLS 自组装体的制备 采用注入法制备得到 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ RLS 自组装体。具体实验步骤如下: 称取 1 mg RLS 固体粉末, 将其完全溶于 $100 \mu\text{L}$ DMSO, 用 $10 \mu\text{L}$ 移液枪将其缓慢滴加入快速搅拌下的 $900 \mu\text{L}$ 去离子水中, 滴加完后继续搅拌 1 h , 使 RLS 形成自组装脂质纳米颗粒。

RLS/EGFP mRNA 复合物的制备 将 200 ng EGFP mRNA ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 加入到不同浓度的 RLS 中, 以获得所需 N/P 比例, 然后在室温下静置 20 min 得到 RLS/EGFP mRNA 复合物。

RLS/EGFP mRNA 复合物的粒径电位测定 采用马尔文纳米粒度-电位测试仪对 RLS/EGFP mRNA 复合物在室温下的粒径和电位进行测定。

RLS/EGFP mRNA 复合物基因递送效果评价

体外基因递送效果评价 HEK293 细胞在加入 10% 胎牛血清的 MEM 培养基中培养。MSC 细胞在加入 10% 澳洲胎牛血清的 α -MEM 培养基中培养。

当细胞的融合度达到 80%~90% 时, 将 HEK293 和 MSC 细胞以 1×10^4 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板中, 细胞贴壁培养 24 h , 吸出原培养基, 然后向每孔分别加入含有血清和不含血清的培养基 $90 \mu\text{L}$ 。随后, 加入不同 N/P 比的 RLS/EGFP mRNA 复合物及作为对照的 Lipofectamine 2000 ($0.5 \mu\text{g}/200 \text{ ng}$ mRNA), 与细胞共同培养 4 h 。之后更换含有血清的新鲜培养基 $100 \mu\text{L}$, 继续培养 44 h 后使用荧光显微镜评估转染效率, 并使用 ImageJ 软件进行半定量分析。

体内基因递送效果评价

斑马鱼的饲养 在自动水循环系统内饲养野生斑马鱼, 水温维持在 $28 \text{ }^\circ\text{C}$, 光暗周期为 14/10 h, 每日喂食丰年虫 2 次。雌雄斑马鱼交配周期为 15 天左右, 受精后的胚胎培养在胚胎培养液中, 温度维持在 $28 \text{ }^\circ\text{C}$, 定期观察胚胎发育的情况。

RLS/EGFP mRNA 复合物的制备 以自组装的方式将阳离子脂质 RLS 在 DEPC 水中制备成浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作液, 将 EGFP mRNA 用 DEPC 水稀释成质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作液。使 RLS 与 EGFP

mRNA 于无酶条件下以 N/P 为 20 的比例孵育制备复合物。作为对照, Lipo 2000 按照说明书工作浓度与 EGFP mRNA 复合。以 DEPC 水与 EGFP mRNA 混合制备相同浓度的裸基因阴性对照。

RLS/EGFP mRNA 复合物的体内显微注射 孵育 20 min 后, 将注射液装入显微注射针, 参数调节及注射方式同上。

RLS/EGFP mRNA 复合物体内转染效果表征 于受精后 (hours post fertilization, hpf) 24 和 48 h , 用激光共聚焦显微镜观察斑马鱼胚胎内的 EGFP 蛋白表达情况。并利用 ImageJ 软件统计胚胎内的平均荧光强度。

RLS 体外安全性评估 为了评估 RLS/EGFP mRNA 复合物的细胞毒性, 当细胞的融合度达到 80%~90% 时, 将 HEK293 和 MSC 细胞以 1×10^4 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板中, 细胞贴壁培养 24 h , 吸出原培养基加入含有 10% 血清的新鲜完全培养基。随后, 在每孔中加入不同 N/P 比的 RLS/EGFP mRNA 复合物, 其中含有 200 ng EGFP mRNA, 并以 Lipofectamine 2000 ($0.5 \mu\text{g}/200 \text{ ng}$ mRNA) 作为对照。每组实验设置 4 个复孔。细胞与复合物在无菌培养箱共培养 4 h 后, 更换新鲜完全培养基, 继续培养 44 h 。在培养结束后, 弃去孔中溶液, 并加入含有 10% CCK-8 的无血清培养基 $100 \mu\text{L}$, 继续培养 1 h 后, 使用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度 (A) 值, 并计算细胞存活率。公式如下:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{(A_s - A_b)}{(A_c - A_b)} \times 100\%$$

其中, A_s 、 A_b 、 A_c 分别为实验样品溶液、空白对照、对照样的吸光度值。

RLS 体内安全性评估

胚胎形态、生存期和孵化率的检测 于 24 、 48 、 72 及 96 h 观察注射后斑马鱼胚胎形态, 用体式显微镜进行拍照, 并统计其生存率和孵化率。

致畸率的检测 在胚胎完全孵育后 (约受精后 96 h), 利用体式显微镜对不同组别内斑马鱼幼鱼的尾巴卷曲、脊柱侧凸及心包水肿情况进行观察, 与野生型斑马鱼进行比较, 并统计其百分率。

数据处理 所有实验均进行 3 次独立平行实验, 采用 GraphPad Prism 9.0 进行数据分析和作图, 结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行多组间比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结果与讨论

1 阳离子脂质肽 RLS 的合成与表征

富含支化精氨酸的两亲性阳离子脂质肽 (RLS) 合

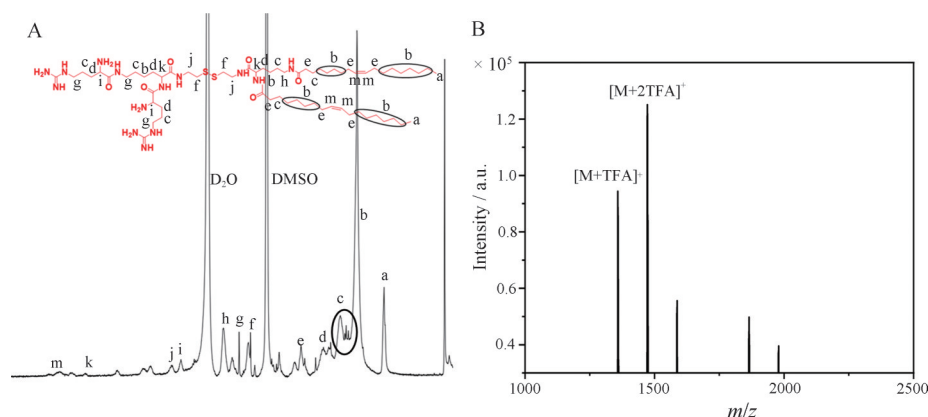


Figure 1 Structural characterization of RLS. A: ^1H NMR spectra of RLS; B: Mass spectrometer of RLS. RLS: Dendritic arginine & disulfide bond-containing cationic lipopeptide

成路线是按照课题组的前期工作所进行^[23]。通过核磁共振氢谱 ^1H NMR 确认 RLS 化学结构, 结果如图 1A 所示: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 5.35 (s, 4H), 4.61 (s, 2H), 3.71 (s, 4H), 3.05 (s, 2H), 2.95 (s, 6H), 2.76 (s, 4H), 2.02 (s, 12H), 1.74 (s, 8H), 1.63 (s, 12H), 1.23 (s, 44H), 0.85 (s, 6H)。

飞行时间质谱结果图 1B 显示 RLS 形成的离子峰 $[\text{M}+\text{TFA}]^+ = 1\ 362.953\ 0$ 。核磁质谱和飞行质谱结果进一步验证了 RLS 的结构正确。

2 RLS 和 RLS/EGFP mRNA 基因复合物的物理表征

据报道, 具有适当的正电荷及尺寸 (50~200 nm) 的纳米粒对于细胞膜黏附和细胞摄取更具有优势^[33]。作者首先使用马尔文纳米粒度-电位测试仪对 RLS 及不同 N/P 比的 RLS/EGFP mRNA 复合物进行粒径和电位测试, 如图 2 所示, RLS 的粒径约 150 nm, 电位约为 +26 mV。随着 RLS/EGFP mRNA 复合物 N/P 比的增加, 粒径呈现下降趋势, 而电位呈上升趋势, 表明基因能很好地被压缩成小尺寸纳米粒。

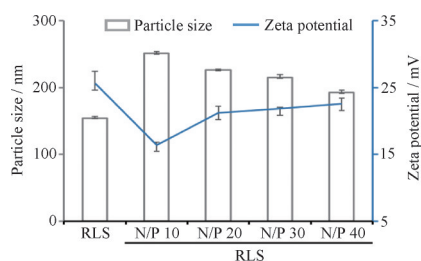


Figure 2 Particle size and zeta potentials of RLS assembly and RLS/gene complexes

3 RLS/EGFP mRNA 基因复合物体外基因递送效果评价

在 HEK293 和 MSC 细胞中评估了 RLS/EGFP mRNA 复合物的体外转染效率, 并考察了不同 N/P 比

及有无血清条件下的转染效果, 以 Lipo 2000 作为阳性对照。随着 RLS 与 EGFP mRNA 的 N/P 比增加, 转染率呈先增高后降低的趋势。当 N/P 比为 20 时, HEK293 和 MSC 细胞表现出最佳的转染效果 (图 3A、B)。通过 ImageJ 半定量分析, 发现在含有血清条件下, N/P 比为 20 的 RLS 在 HEK293 和 MSC 细胞中的平均荧光强度分别是阳性对照组的 1.2 倍和 3 倍 (图 3C、D)。

4 RLS/EGFP mRNA 基因复合物在斑马鱼体内的转染效果表征

将 $2\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ RLS 和 $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ EGFP mRNA 以 N/P 为 20 的比例进行孵育, 随后将每个胚胎注射 2 nL 的体积至斑马鱼胚胎中。在 24 hpf 时期, 与裸 EGFP mRNA 组相比, 可明显观察到 RLS/EGFP mRNA 注射后的斑马鱼胚胎展现出更好的转染效果, 主要分布在躯干区域。而 Lipo 2000/EGFP mRNA 组仅产生自体荧光信号 (图 4A)。在体内基因递送方面, RLS/EGFP mRNA 的效果是 Lipo 2000/EGFP mRNA 和裸 EGFP mRNA 的 1.5 倍 (图 4B)。在 48 hpf 时期, 由于生物体自身的代谢的影响, 各组的荧光信号有所减弱, 但在 RLS/EGFP mRNA 注射的胚胎中可以观察到逐渐向脑部区域的分布。因此, 作者认为 RLS 在体内具有更好的基因递送效果。

5 RLS/EGFP mRNA 基因复合物体外安全性评估

为了评价基因载体系统的生物相容性本研究通过 CCK-8 实验, 在 HEK293 细胞中测定了 RLS/EGFP mRNA 复合物的细胞毒性。如图 5 所示, 在有血清条件下, 使用 N/P 比为 10~40 范围的 RLS 时, 它表现出良好的细胞相容性。尤其是在高 N/P 比下 (N/P = 40), HEK293 细胞的存活率依然为 95% 以上。相比之下, 商品化试剂 Lipo 2000 细胞毒性明显, 其存活率为 82%。

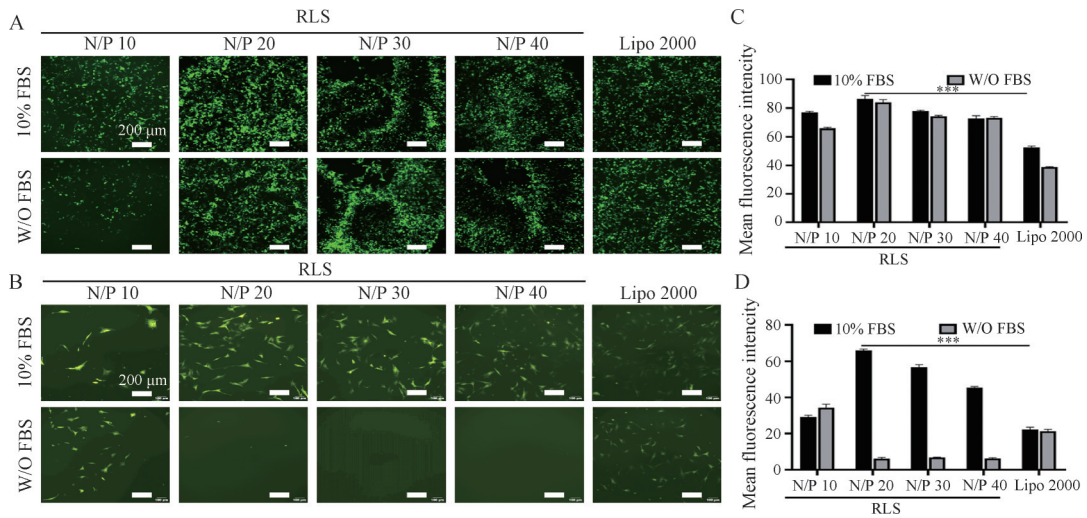


Figure 3 Transfection efficiency of EGFP mRNA in HEK293 (A, C) and MSC (B, D). Fluorescence microscopy images of EGFP mRNA transfected HEK293 (A) and MSC cells (B). Quantitative analysis of mean fluorescence intensity of EGFP mRNA transfected HEK293 (C) and MSC cells (D) with 10% FBS. Scale bars were 200 μm . Lipo 2000 was as the control. $n = 3, \bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ FBS: Fetal bovine serum

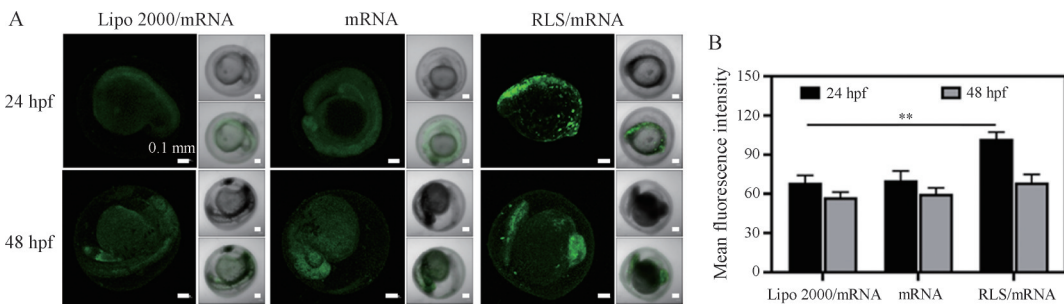


Figure 4 Exploration of the gene delivery effect of RLS *in vivo*. Fluorescence images (A) and corresponding statistical analysis of mean fluorescence intensity (B) of zebrafish embryos at 24 and 48 hpf after micro-injection of mRNA into yolk with various transfection materials. Scale bar was 0.1 mm. Bright field and merged photo of corresponding *Danio rerio* embryo was shown right. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$

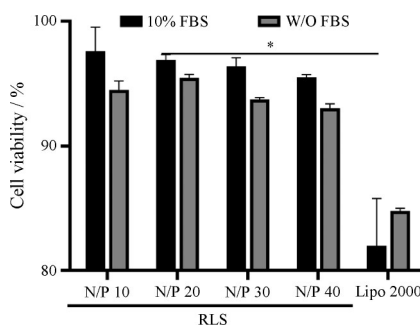


Figure 5 Cytotoxicity of gene lipoplexes incubated for 24 h in HEK293 at different N/P ratio (10-40) with 10% FBS or without FBS. The concentration of pEGFP was $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Lipo 2000 was used as control group. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$

6 RLS/EGFP mRNA 基因复合物体内安全性评估

确认 RLS 在体内能够高效地实现基因递送验证其体内生物安全性十分关键。因此, 将基因载体与 EGFP mRNA 复合后, 通过显微注射方式将其注入斑马鱼胚胎卵黄。以野生型斑马鱼 (AB line) 作为对照

组, 探究其对生物体生存、生长的影响。通过观察胚胎的明场图片, 在 48 及 72 hpf, 对照组和裸 EGFP mRNA 组的胚胎具有较好的存活率, RLS/EGFP mRNA 组胚胎状况良好, 而 Lipo 2000/EGFP mRNA 组出现胚胎皱缩和浑浊 (图 6A)。生存曲线显示, 在 96 hpf, RLS/EGFP mRNA 注射后的斑马鱼存活率约为 87%, 而 Lipo 2000/EGFP mRNA 注射后的存活率略微下降至 83% 左右 (图 6B)。此外, RLS/EGFP mRNA 组胚胎孵化率达到 86%, 而 Lipo 2000/EGFP mRNA 组约为 77% (图 6C)。这些结果表明, 与商品化试剂 Lipo 2000 相比, RLS 在基因递送中展现出更好的生物安全性。

随后, 为了进一步探究基因递送对生物体发育的影响, 观察了 96 hpf 孵化后的斑马鱼幼虫的躯体, 并评估是否出现畸形情况。将尾巴卷曲、脊柱侧弯和心源性水肿纳入评估范围。与野生型斑马鱼正常幼鱼进行比较 (图 7A), RLS/EGFP mRNA 组、Lipo 2000/EGFP mRNA 和裸 EGFP mRNA 组的幼虫都出现一定程度的

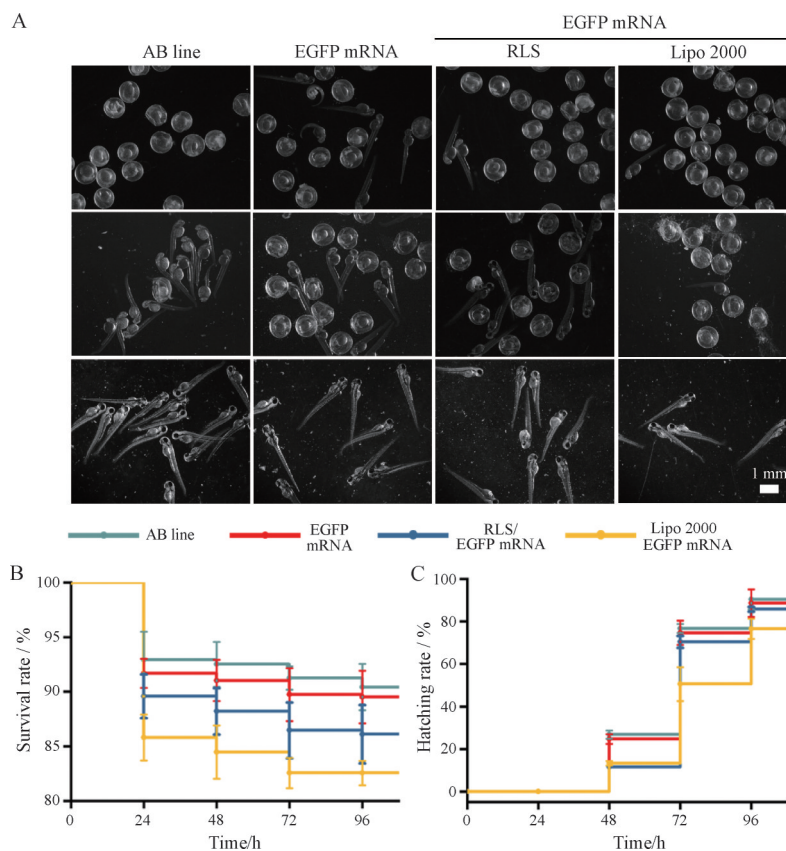


Figure 6 A: Biocompatibility assessment of gene delivery vectors complexed with genes *in vivo*. Bright field photos of zebrafish embryos injected with EGFP mRNA with various transfection materials at 48, 72, and 96 hpf. B, C: Survival rate and hatching rate of zebrafish embryos at 24, 48, 72, and 96 hpf

尾巴卷曲现象, 其致畸率分别为 2.9%、9.5% 和 1.9%。脊柱侧弯的发生率分别为 3.3%、4.2% 和 2.2%。此外, RLS/EGFP mRNA 组和 Lipo 2000/EGFP mRNA 组的斑马鱼出现心源性水肿, 致畸率分别为 0.8% 和 1.3%, 而裸 EGFP mRNA 组几乎没有 (图 7B)。对各组统计后发现, 总体而言, 尽管存在引起心源性水肿的风险, 但与商品化试剂 Lipo 2000 相比, RLS 对 3 种形态畸形的总诱导率最低 (图 7C)。这表明 RLS 具有更高的生物安全性, 与体外实验结果一致。因此, RLS 作为基因递送

载体有望在基因治疗领域取得更广泛的应用前景。

结论

本研究基于 RLS 基因载体, 成功制备了粒径和电位适宜的均一纳米颗粒。通过体外细胞转染及体内斑马鱼转染实验证实了 RLS 对 mRNA 稳定性的优势, 确保了有效的基因递送。实验结果显示, RLS 在 HEK293 和 MSC 的转染效率分别超过商用试剂 Lipofectamine 2000 的 1.2 倍和 3 倍, 突出了其高效递送

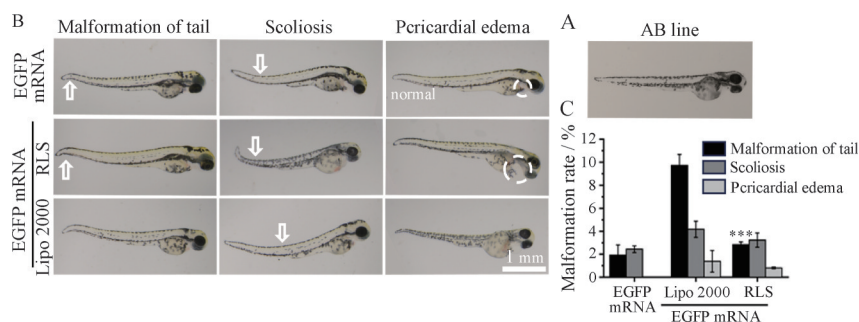


Figure 7 Biocompatibility assessment of gene delivery vectors complexed with genes *in vivo*. A: The normal form of zebrafish larvae; B, C: Main malformations and rate induced by EGFP mRNA with different transfection materials in zebrafish larvae. Lipo 2000 was used as control group. $n = 3, \bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs Lipo 2000/EGFP mRNA group

mRNA 基因的能力。随后, 进一步评估了 RLS 的生物安全性, 包括细胞毒性和体内存活率、孵化率和畸形率实验。研究结果显示, RLS 的细胞毒性仅为 Lipofectamine 2000 的 1/3, 从而减少了递送 mRNA 过程中对细胞的不良影响。在体内研究中, 相比于商用试剂 Lipofectamine 2000, RLS 对斑马鱼胚胎的存活率、孵化率和畸形率影响最小, 显示出其出色的生物安全性。综上所述, RLS 不仅在 mRNA 基因递送方面具有卓越的效果, 还展现了对 mRNA 的稳定性的保护作用及良好的生物安全性。这为 RLS 在 mRNA 治疗领域的广泛应用提供了基础。

作者贡献: 王一醇: 实验、文章构思、文章撰写; 蒲艺瑶: 动物实验辅助、文章构思; 毕群杰: 部分细胞实验; 宋相容: 提供相关实验材料; 金蓉蓉、聂宇: 写作、审校和提供资金支持。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Yan YY, Huang M. Cancer genomics precision medicine [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 2070-2084.
- [2] Yeom JH, Ryou SM, Won M, et al. Inhibition of xenograft tumor growth by gold nanoparticle-DNA oligonucleotide conjugates-assisted delivery of BAX mRNA [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e75369.
- [3] Li XD, Le Y, Zhang ZG, et al. Viral vector-based gene therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 7736.
- [4] Duan X, Zhang Y, Guo MR, et al. Sodium alginate coating simultaneously increases the biosafety and immunotherapeutic activity of the cationic mRNA nanovaccine [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13: 942-954.
- [5] Chen Z, Meng CY, Mai JH, et al. An mRNA vaccine elicits STING-dependent antitumor immune responses [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13: 1274-1286.
- [6] Oduk Y, Zhu WQ, Kannappan R, et al. VEGF nanoparticles repair the heart after myocardial infarction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 314: H278-H284.
- [7] Chen JH. Application of cationic polymer vector for gene delivery systems [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2003, 38: 316-320.
- [8] Guo X, Huang L. Recent advances in nonviral vectors for gene delivery [J]. *Acc Chem Res*, 2012, 45: 971-979.
- [9] Wang HZ, Qin L, Zhang X, et al. Mechanisms and challenges of nanocarriers as non-viral vectors of therapeutic genes for enhanced pulmonary delivery [J]. *J Control Release*, 2022, 352: 970-993.
- [10] Xu X, Xia T. Recent Advances insite-specific lipid nanoparticles for mRNA delivery [J]. *ACS Nanosci Au*, 2023, 3: 192-203.
- [11] Zhi DF, Zhang SB, Cui SH, et al. The headgroup evolution of cationic lipids for gene delivery [J]. *Bioconjug Chem*, 2013, 24: 487-519.
- [12] Brgles M, Šantak M, Halassy B, et al. Influence of charge ratio of liposome/DNA complexes on their size after extrusion and transfection efficiency [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 393-401.
- [13] Lv HT, Zhang SB, Wang B, et al. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery [J]. *J Control Release*, 2006, 114: 100-109.
- [14] Zhi DF, Bai YC, Yang J, et al. A review on cationic lipids with different linkers for gene delivery [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2018, 253: 117-140.
- [15] Chen XB, Yang H, Song X, et al. Integrated and dual-responsive lipopeptide nanovector with parallel effect to tumor and micro-environment regulation by efficient gene and drug co-delivery [J]. *Chin Chem Lett*, 2023, 34: 107753.
- [16] Wang RD, Peng YW, Yang ZZ, et al. Tumor microenvironment responsive liposomes blocking CXCL12/CXCR4 pathway and synergistically enhancing immune efficacy of anti-PD-L1 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 178-187+278.
- [17] He YY, Nie Y, Cheng G, et al. Viral mimicking ternary polyplexes: a reduction-controlled hierarchical unpacking vector for gene delivery [J]. *Adv Mater*, 2014, 26: 1534-1540.
- [18] Ren T, Liu D. Synthesis of diether-linked cationic lipids for gene delivery [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9: 1247-1250.
- [19] Kim BK, Doh KO, Nam JH, et al. Synthesis of novel cholesterol-based cationic lipids for gene delivery [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 2986-2989.
- [20] Puchkov PA, Shmendel EV, Luneva AS, et al. Position of disulfide bond determines the properties of novel stimuli-responsive cationic lipids [J]. *ChemistrySelect*, 2020, 5: 4509-4514.
- [21] Ghosh YK, Visweswariah SS, Bhattacharya S. Nature of linkage between the cationic headgroup and cholesteryl skeleton controls gene transfection efficiency [J]. *FEBS Lett*, 2000, 473: 341-344.
- [22] Bhattacharya S, Dileep PV. Cationic oxyethylene lipids. synthesis, aggregation, and transfection properties [J]. *Bioconjug Chem*, 2004, 15: 508-519.
- [23] Chen XB, Yang J, Liang H, et al. Disulfide modified self-assembly of lipopeptides with arginine-rich periphery achieve excellent gene transfection efficiency at relatively low nitrogen to phosphorus ratios [J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5: 1482-1497.
- [24] Tang FX, Wang W, Hughes JA. Cationic liposomes containing disulfide bonds in delivery of plasmid DNA [J]. *J Liposome Res*, 1999, 9: 331-347.
- [25] Floch V, Loisel S, Guenin E, et al. Cation substitution in cationic phosphonolipids: a new concept to improve transfection activity and decrease cellular toxicity [J]. *J Med Chem*, 2000, 43: 4617-4628.
- [26] Shi J, Yu SJ, Zhu J, et al. Carbamate-linked cationic lipids with different hydrocarbon chains for gene delivery [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 141: 417-422.

- [27] Zheng HL, Hhua YQ, Liu XH, et al. Screening of active components and preliminary mechanism exploration of Lycii Fructus for improving osteoporosis based on the zebrafish model [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2023, 58: 127-138.
- [28] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013, 496: 498-503.
- [29] Qiu YZ, Wang CS, Xu FH. Anti-osteoporosis mechanism of *Panax quinquefolium* L. based on zebrafish model and metabolomics [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2023, 58: 1894-1903.
- [30] Wei Y, He T, Bi QJ, et al. A cationic lipid with advanced membrane fusion performance for pDNA and mRNA delivery [J]. J Mater Chem B, 2023, 11: 2095-2107.
- [31] Bi QJ, Song X, Zhao YY, et al. Mucus-penetrating nonviral gene vaccine processed in the epithelium for inducing advanced vaginal mucosal immune responses [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13: 1287-1302.
- [32] Jiang Q, Chen XB, Liang H, et al. Multistage rocket: integrational design of a prodrug-based siRNA delivery system with sequential release for enhanced antitumor efficacy [J]. Nanoscale Adv, 2018, 1: 498-507.
- [33] Liu YM, Reineke TM. Hydroxyl stereochemistry and amine number within poly(glycoamidoamine)s affect intracellular DNA delivery [J]. J Am Chem Soc, 2005, 127: 3004-3015.