

原代樹突細胞基因遞送系統的構建與應用

于澤萱, 鞠曹雲*, 張 灣**

(中國藥科大學高端藥物制剂與材料研究中心, 南京 210009)

摘要 目前, 安全有效的基因递送系统应用于原代树突细胞(dendritic cell, DC)转染尚未见报道, 本研究针对原代DC构建基于脂质体的基因递送系统, 优化了制备方法以提高原代DC的转染效率。通过共孵育法、乙醇注入法、鱼精蛋白复合法分别制备含不同阳离子脂质的脂质体/siRNA复合物, 并以粒径、电位、对基因药物siRNA的包载能力、安全性、稳定性、DC的摄取效率和基因沉默效率为考察指标, 评价并筛选出具有高转染效率的基因递送系统。与市售制剂Lipo2000相比, 利用共孵育法制备的赖氨酸谷氨酸双油醇酯(OA2)递送系统的DC摄取效率提高约35%, 基因沉默效率提高约10倍, 且细胞存活率比Lipo2000提高20%, 具有良好的DC基因转染效率和体外安全性。本研究为原代DC提供了一种安全有效、制备简单的基因递送载体平台, 具有良好的应用前景。

关键词 原代树突状细胞; 基因递送系统; 阳离子脂质体; siRNA; 基因沉默; 制备方法

中图分类号 R944.9 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)04-0438-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20210406

引用本文 于澤萱, 鞠曹雲, 張灣. 原代樹突細胞基因遞送系統的構建與應用 [J]. 中國藥科大學學報, 2021, 52(4):438–446.

Cite this article as: YU Zexuan, JU Caoyun, ZHANG Can. Construction and application of gene delivery systems for primary dendritic cells [J]. J China Pharm Univ, 2021, 52(4):438–446.

Construction and application of gene delivery systems for primary dendritic cells

YU Zexuan, JU Caoyun*, ZHANG Can**

Center of Advanced Pharmaceuticals and Biomaterials, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Nowadays, there is still no mature gene delivery system for safe and effective transfection on primary dendritic cells (DC). Herein, we constructed a liposome-based gene delivery system for primary DCs and optimized the preparation method to improve the transfection efficiency of siRNA on primary DCs. In this study, different methods, including co-incubation method, ethanol injection method, and protamine compound method, were used to prepare liposome/siRNA complexes based on different cationic lipids. Moreover, particle size, zeta potential, siRNA loading capacity, safety, stability, uptake efficiency and gene silencing efficiency of various liposome/siRNA complexes were detected to screen the optimal cationic lipid as well as its preparation method. We demonstrated that the OA2/siRNA delivery system prepared by the co-incubation method exhibited the best safety, uptake efficiency and gene silencing effect, compared to other siRNA delivery systems including the commercial Lipo2000. In summary, we provide a safe and effective gene delivery vector for primary DC cells through simple preparation method, which could also offer a gene delivery platform for other immune cells.

Key words primary dendritic cells; gene delivery system; cationic liposomes; siRNA; gene silencing; preparation methods

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82073785, No. 81930099, No. 81773664)

收稿日期 2021-04-25 通信作者 *Tel: 025-83271076 E-mail: jucaoyun@cpu.edu.cn

**Tel: 025-83271171 E-mail: zhangcan@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 82073785, No. 81930099, No. 81773664)

树突状细胞(dendritic cells, DC)是一类专职的抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APC),也是整个肿瘤免疫过程中开启免疫反应的始动细胞,在抗肿瘤免疫过程中发挥关键作用^[1]。未成熟DC在摄取抗原后可分化为成熟的DC,并通过主要组织相容性复合体(MHC I类或MHC II类)将抗原呈递给T淋巴细胞;接受抗原递呈的T淋巴细胞进一步分化为细胞毒性T淋巴细胞(CTL)发挥肿瘤杀伤作用。鉴于此,越来越多的研究者开始研发DC肿瘤疫苗,将体外诱导或构建的可特异性识别肿瘤的DC细胞回输到患者体内,在体内将抗原呈递并激活T细胞发挥抗肿瘤免疫作用^[2]。DC肿瘤疫苗在预防肿瘤复发和延长患者生存期方面具有良好的有效性,已有几款DC疫苗进入临床研究,用于前列腺癌、肾癌与胶质瘤的治疗^[3-5]。尽管DC肿瘤疫苗有着诸多优势,但其客观临床响应率仍有待提高^[6]。有文献报道^[7],由于DC在成熟过程中不断受到体内外细胞因子的刺激,促使DC反馈性表达免疫抑制因子,从而影响DC诱导抗肿瘤反应,这是造成DC肿瘤疫苗响应率不足的主要原因之一。如细胞因子信号抑制蛋白1(suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1)是一类由DC产生并反馈性阻断细胞因子信号转导过程的负性调节因子,其能够阻碍DC的抗原呈递以及分泌促炎因子的能力,从而影响DC在体内诱导特异性的抗肿瘤免疫反应^[8-9]。因此,抑制DC生成的免疫抑制因子如SOCS1的表达,是提高DC效力的有效策略之一。

小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)是一种20~25 bp的双链RNA,当其入胞后能够选择性降解特定mRNA,沉默特定基因表达并阻止蛋白翻译^[10],是一种安全性高、免疫原性低、特异性好的基因沉默药物^[11-12]。因此利用siRNA特异性抑制DC生成的免疫抑制基因可能是解决目前DC治疗瓶颈的有效方式。但是由于siRNA是亲水性的负电性大分子,很难跨过细胞膜到达胞质;即使成功被细胞摄取后,也易被溶酶体中的核酸酶降解;必须通过载体递送才能将其有效递送至靶细胞胞质进而提高基因沉默效率。并且,原代DC易受递送材料影响产生非特异性免疫反应以及细胞毒性^[13],对递送载体的要求更为严格。

脂质体是一种理想、安全的药物载体,其具有

类似于细胞质膜的脂质双层^[14],具有较好的细胞亲和力、生物相容性和低免疫原性^[15-16],并且具有基因荷载量大的优势^[17]。但目前脂质体应用于原代免疫细胞的转染效率还无法满足预期。因此,亟需研究新型的针对DC的脂质体基因递送系统以提高DC的转染效率,并降低对DC活力的影响,为解决DC疫苗响应率低提供一种新策略。

本研究将针对原代DC,筛选出安全有效的阳离子脂质,并优化基于该阳离子脂质的基因递送系统的制备方法,用于实现原代DC的安全高效转染。本研究以本课题组前期优选的3种阳离子脂质:包括赖氨酸谷氨酸双油醇酯(OA2)、双十四烷基(4-((2-(1-甲基吡咯烷-2-基)乙基)氨基)-4-氧代丁酰基)谷氨酸(TA7),以及双十四烷基(4-((1-甲基吡咯烷-3-基)氨基)-4-氧代丁酰基)谷氨酸(TA13)进行脂质筛选,以SOCS1 siRNA为模型siRNA,分别采用共孵育法、乙醇注入法以及鱼精蛋白复合法制备siRNA递送系统(脂质体/siRNA复合物)。同时,以脂质体/siRNA复合物的粒径电位、对siRNA的包载能力、体外稳定性、对原代DC的细胞毒性的影响,以及原代DC对脂质体/siRNA复合物的摄取效率和SOCS1的基因沉默效率为考察指标,筛选出安全有效的阳离子脂质,并优化出最佳的制备方法。

1 材 料

1.1 试 剂

OA2、TA7、TA13(本课题组自制);鼠源粒细胞巨噬细胞集落刺激因子GM-CSF(美国PeproTech公司);RPMI 1640培养基、Opti MEM培养基、T细胞扩增培养基T cell expansion Medium(美国赛默飞世尔公司);鱼精蛋白(美国Sigma公司);Fam siRNA、SOCS1 siRNA(正义链:5'-GCATCCGCGT-GCACTTCCA-3',反义链:5'-TGGAAGTGCACGC-GGATGC-3')、SOCS1引物(上游:5'-CCACTCCT-ACCTCTCCATGTTAC-3',下游:5'-AAATGAAG-CCAGAGACCCTCC-3')、NC-siRNA(广州锐博公司);二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)(上海艾韦特医药科技有限公司);GoldviewTM核酸染料(北京赛百盛基因技术有限公司);6×核酸上样缓冲液、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(南京碧云天生物技术)。

1.2 仪器

BS110S 电子分析天平(德国赛多利斯集团); Attune NxT 流式细胞仪(美国赛默飞世尔公司); 超声波细胞破碎仪(JY92, 宁波新芝生物科技公司); Zetasizer 3000 HAS 粒径电位仪(英国 Malvern 公司); Tanon-3500 凝胶成像系统(上海天能公司); DYCP-33B 琼脂糖水平电泳仪(北京六一公司); T11023 碳支持膜(北京新兴百瑞技术有限公司); Mini-Extruder 薄膜挤出器(美国 Avanti Polar Lipids 公司)。

1.3 动物和细胞

C57BL/6J 小鼠, 雄性, 体重 20~22 g, 由河南斯克贝斯生物科技股份有限公司提供, 许可证号: SCXK(豫)2020-0005。小鼠骨髓来源 DC (bone marrow-derived dendritic cell, BMDC, 实验室自提)。所有动物实验均符合中国药科大学动物伦理委员会标准。

2 方法

2.1 采用不同制备方法制备阳离子脂质体/siRNA 复合物

选用本课题组自制的 3 种阳离子脂质: OA2、TA7、TA13, 其结构式如图 1 所示。OA2 是以赖氨酸为头基、油醇双链为尾链的不饱和脂质, 由于不饱和脂质具有较低的相转变温度以及较高的膜融合能力, 有利于其通过膜融合能力促进 siRNA 药物的内涵体/溶酶体逃逸。而 TA7 和 TA13 是以头基为叔胺、十四碳烷基链为尾链的饱和脂质, 在其制备处方中加入不饱和辅助脂质——二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE), 能够有效降低 TA7 和 TA13 制成脂质体的相转变温度, 并提高其膜融合能力^[18], 有利于 siRNA 药物的内涵体/溶酶体逃逸。因此, 根据前期制备方法的筛选, 选择转染效率最高的方法——薄膜挤出法制备 OA2 阳离子脂质体, 采用薄膜分散法制备 TA7 或 TA13 阳离子脂质体。

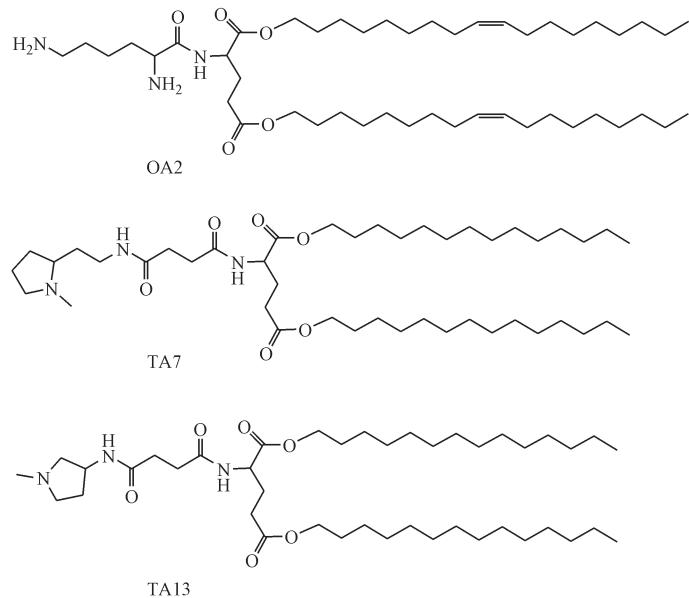


Figure 1 Chemical structures of OA2, TA7 and TA13

2.1.1 共孵育法 共孵育法是通过静电结合的方式使阳离子脂质体与带负电性的 siRNA 紧密结合, 从而形成脂质体/siRNA 复合物。

(1) 空白阳离子脂质体的制备 采用薄膜挤出法制备 OA2 阳离子脂质体。精密称取 OA2 10 mg 并加入氯仿-甲醇混合液(3:2)溶解, 在 37 °C 下减压旋转蒸发形成脂质薄膜并真空干燥。4 h 后, 加

入超纯水 5 mL, 充分振荡并摇匀, 提前开启加热垫并预热挤出装置, 在温度达到 45 °C 时采用挤出器依次挤出通过 0.8、0.45、0.2 μm 的碳酸脂膜各 11 次, 最终得到 OA2 阳离子脂质体。

采用薄膜分散法制备 TA7 和 TA13 阳离子脂质体。精密称取 TA13 或 TA7 阳离子脂质 6 mg, 同时精密称取相同质量的辅助脂质 DOPE, 采用氯

仿-甲醇混合液(3:2)溶解。在37℃减压旋转蒸发形成脂质薄膜后,真空干燥。4 h后,加入5 mL超纯水,充分振荡并摇匀,在37℃水合30 min。水合结束后,以30%功率在冰浴保护下探头超声15 min,最后通过0.45 μm的微孔滤膜过滤,即得到TA7/TA13阳离子脂质体。

(2)脂质体/siRNA复合物的制备 精密吸取siRNA(0.5 mg/mL)5 μL并用无RNA酶的DEPC水将其稀释至50 μL。按照不同氮磷比(N/P,阳离子脂质中亲水部分氮原子摩尔数与核酸药物中磷酸摩尔数之比),吸取相应体积的各组脂质体溶液并用DEPC水稀释至150 μL。将上述稀释后的siRNA溶液与脂质体溶液充分混匀,涡旋15 s,室温静置孵育30 min后得到不同N/P比的脂质体/siRNA复合物。

2.1.2 乙醇注入法 利用乙醇溶剂溶解阳离子脂质并在一定的搅拌速率下将脂质溶液滴加到DEPC水/缓冲盐溶液中,到达滴定终点后透析除去乙醇,即得到粒径均一的脂质体溶液。

精密称取OA2、TA7或TA13阳离子脂质2 mg,采用无水乙醇1 mL溶解各组阳离子脂质,在400 r/min搅拌速率下向其中滴加DEPC水或含有SOCS1 siRNA的DEPC水,当乙醇终浓度达30%时停止滴加。到达滴加终点后,透析2 h除去乙醇溶剂,即得到乙醇注入法制备的空白阳离子脂质体或脂质体/siRNA复合物。

2.1.3 鱼精蛋白复合法 先将鱼精蛋白(pro-tamine)与siRNA复合形成正电性复合物,随后与脂质体溶液孵育,并将混合溶液在-80℃与60℃条件下反复冻融循环,利用冷冻过程产生的冰晶对脂质体产生的物理破坏,使得siRNA进入脂质体的内水相,而高温融化过程又可以使得脂质膜重新融合,如此反复循环来提高脂质体对siRNA的包载率,最终形成脂质体/siRNA复合物。

精密称量鱼精蛋白1 mg并溶解于DEPC水1 mL中。按照鱼精蛋白与siRNA质量比为8:5的比例吸取相应体积的鱼精蛋白与siRNA溶液,将两者溶液混合均匀,室温静置复合10 min,即得到鱼精蛋白/siRNA复合物。在N/P=5的条件下,吸取采用薄膜水化法制备的不同阳离子脂质体并用DEPC水稀释至100 μL,将不同的脂质体溶液分别与上述鱼精蛋白/siRNA复合物混合均匀,室温静

置复合。10~15 min后,将混合溶液放置于-80℃1 min,随后置于60℃恒温水浴锅2 min,如此冻融循环10次,即得到脂质体-鱼精蛋白/siRNA复合物。

2.2 粒径和电位的测定

采用动态光散射法分别测定不同空白脂质体和脂质体/siRNA复合物的粒径电位。

2.3 对siRNA的包载能力

采用琼脂糖凝胶电泳法分别考察各组siRNA的渗漏情况,用于评价不同方法制备的阳离子脂质体对siRNA的包载能力。制备1%琼脂糖凝胶并在室温下静置待其完全凝固。向各孔分别加入6×核酸上样缓冲液4 μL与不同方法制备得到的脂质体/siRNA复合物20 μL,均匀混合。随后使用电泳仪在120 V恒压条件下电泳30 min,最后采用凝胶成像系统观察各组siRNA的条带。

2.4 不同介质中的稳定性

将不同方法制备得到各组脂质体/siRNA复合物(N/P=5)分别用DEPC水、PBS缓冲液、RPMI 1640、Opti MEM或T细胞扩增培养基1.5 mL稀释。在混合均匀后0、2、4、6、12和24 h,分别采用动态光散射法考察脂质体/siRNA复合物在不同介质中粒径随时间变化情况。

2.5 细胞毒性

脱颈处死C57BL/6雄性小鼠,分离胫骨和股骨,将胫骨、股骨内的骨髓细胞冲洗至RPMI 1640培养基中。1 800 r/min离心3 min,弃去上清液并收集细胞沉淀,加入红细胞裂解液2 mL,于4℃条件下裂解红细胞3 min。继续1 800 r/min离心3 min,弃去上清液并收集细胞沉淀,PBS清洗1次。随后使用含有20 ng/mL GM-CSF的RPMI 1640完全培养基重悬细胞并使用细胞计数仪计数。以每毫升 5×10^5 个的细胞密度铺入12孔细胞培养板中,每孔加入含有20 ng/mL GM-CSF的RPMI 1640完全培养基2 mL^[19]。将其放入37℃细胞培养箱中培养,于第2天、第4天半换液,在第6天收获未成熟DC并用于后续研究。收集上述诱导第6天的DC,以每孔每毫升 2×10^6 个细胞的密度接种于12孔板中待用。将不同的脂质体/siRNA复合物(N/P=5)分别与DC共孵($c_{SOCS1\ siRNA}=200\ nmol/L$, $c_{OA2}=74.76\ \mu g/mL$, $c_{TA7}=41.44\ \mu g/mL$, $c_{TA13}=62.4\ \mu g/mL$),于孵育6、12、24、48 h后收集各组DC,使用Annexin V-FITC/PI细胞毒性检测试剂盒检测各组脂质体/

siRNA对DC的安全性。

2.6 DC对脂质体/siRNA复合物的摄取

收集上述诱导第6天的DC,以每孔每毫升 2×10^6 个细胞的密度(0.5 mL)接种于12孔板中待用。以绿色荧光标记的Fam siRNA为模型siRNA,按上述方法制备得到各组脂质体/Fam siRNA复合物。将不同脂质体/Fam siRNA复合物(N/P=5, $c_{\text{Fam siRNA}}=200 \text{ nmol/L}$)与DC共孵育(选择市售制剂Lipo2000作为阳性对照)。6 h后,收集各组DC,采用流式细胞仪检测Fam⁺ DC的阳性率(即摄取Fam siRNA的DC细胞比例)以及Fam siRNA的平均荧光强度(可反应所有DC的摄取数量),用于考察DC对不同制备方法得到的脂质体/Fam siRNA复合物的摄取情况。

2.7 脂质体/siRNA对DC中SOCS1基因的沉默效果

收集上述诱导第6天的DC,以每孔每毫升 2×10^6 个细胞的密度(0.5 mL)接种于12孔板中待用。将3种方法制备得到的各组脂质体/SOCS1 siRNA复合物(N/P=5, $c_{\text{SOCS1 siRNA}}=200 \text{ nmol/L}$)与DC共孵育(选择Lipo2000作为阳性对照)。6 h后换液,随后继续培养,42 h后收集DC,每组加入TRNzol RNA提取液500 μL ,反复吹打细胞并收集于无RNA酶离心管中提取RNA,最后进行逆转录、qPCR实验。qPCR检测程序为:1)95 °C 10 min;2)95 °C 15 s;3)60 °C 30 s,上述步骤程序循环40次,测定融解曲线程序:95 °C 15 s;60 °C 60 s;95 °C 15 s。检测结束后,按照公式(1)(2)(3)可得到各组脂质体/siRNA复合物对DC中SOCS1基因的沉默效率。

$$\Delta T = Ct_{\text{SOCS1}} - Ct_{\beta\text{-actin}} \quad (1)$$

$$\Delta T_{\text{control}} = Ct_{\text{control}} - Ct_{\beta\text{-actin}} \quad (2)$$

$$\text{Gene silencing efficiency (\%)} = \frac{1 - 2^{-\Delta T}}{2^{-\Delta T_{\text{control}}}} \times 100 \quad (3)$$

3 结果与讨论

3.1 不同方法制备的阳离子脂质体/siRNA复合物的表征

3.1.1 阳离子脂质体的粒径和电位 首先采用薄膜水化法以及乙醇注入法制备OA2、TA7和TA13阳离子脂质体,其粒径电位结果如表1所示。乙醇注入法制备阳离子脂质体粒径为130~200 nm,薄

膜水化法制备的阳离子脂质体粒径为60~130 nm。由此可见,薄膜水化法制备而成的脂质体的粒径普遍低于乙醇注入法,可能是因为薄膜水化法会通过超声、挤膜等操作过程降低粒径。但采用两种方法所得空白脂质体粒径的多分散指数PDI均小于0.25,表明采用两种方法均能得到粒径均一的脂质体。

此外,各组阳离子脂质体电位均在+25~+45 mV之间,两种方法所得空白脂质体的电性差异不大。其中OA2阳离子脂质体的正电性最强,可能是因为其亲水头基为伯胺,且整个脂质体只含有阳离子脂质;而TA7和TA13的亲水头基为叔胺,且脂质体中含有电中性的辅助脂质DOPE。由此可见,阳离子脂质体的电性主要取决于阳离子脂质的性质和用量,而与制备方法无关。

Table 1 Particle size, Zeta potential and PDI of liposomes by different preparation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| Cationic lipids | Size/nm | Zeta/mV | PDI |
|-----------------|---------------|--------------|---------------|
| OA2 | 128.03 ± 0.11 | 43.21 ± 1.24 | 0.119 ± 0.012 |
| OA2 (Ethanol) | 198.31 ± 0.26 | 37.85 ± 2.88 | 0.170 ± 0.009 |
| TA7 | 92.51 ± 0.29 | 28.35 ± 2.38 | 0.236 ± 0.007 |
| TA7 (Ethanol) | 131.61 ± 1.35 | 29.89 ± 1.70 | 0.207 ± 0.011 |
| TA13 | 65.38 ± 0.84 | 20.18 ± 0.79 | 0.239 ± 0.004 |
| TA13 (Ethanol) | 144.35 ± 0.33 | 22.33 ± 1.77 | 0.145 ± 0.015 |

3.1.2 对siRNA的包载能力 阳离子脂质体/siRNA复合物对siRNA的包载能力决定着后续的递送效率。因此,本研究采用琼脂糖凝胶电泳法首先考察3种方法制备的脂质体/siRNA复合物对siRNA的包载能力(图2)。结果表明,共孵育法、乙醇注入法和鱼精蛋白复合法制备的各组脂质体/siRNA复合物在N/P=5时均不发生渗漏。因此,后续将以N/P=5制备脂质体/siRNA复合物,以保证siRNA能够被稳定荷载。

3.1.3 脂质体/siRNA复合物的粒径电位 根据共孵育法、乙醇注入法以及鱼精蛋白复合法分别制备得到各组脂质体/siRNA复合物(N/P=5)并对其粒径电位进行测定(图3)。结果显示,3种制备方法均能得到平均粒径为100~250 nm,电位在+10~+25 mV之间的脂质体/siRNA复合物,表明在N/P=5时,各组脂质体均能够有效荷载siRNA并形成粒径均一的弱正电性脂质体/siRNA复合物。

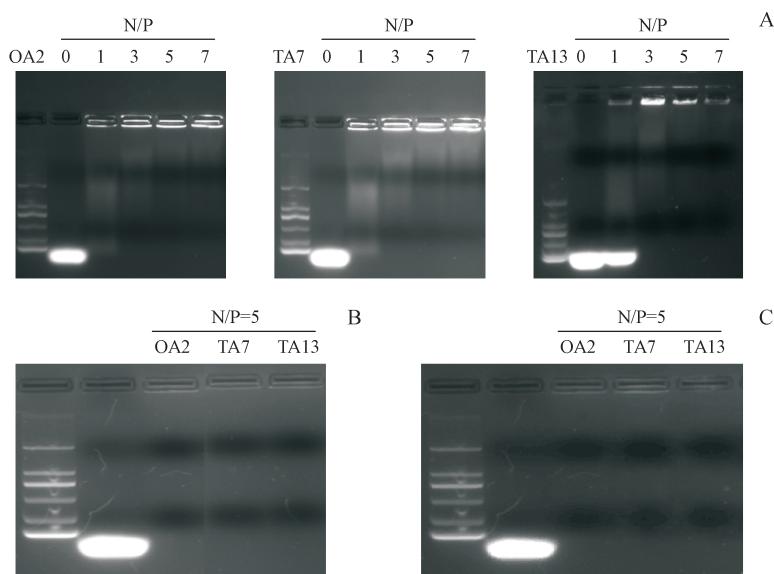


Figure 2 Agarose gel electrophoresis analysis of the liposome/siRNA complexes

A: Liposome/siRNA complexes prepared by co-incubation method; B: Liposome/siRNA complexes prepared by ethanol injection method; C: Liposome/siRNA complexes prepared by protamine compound method

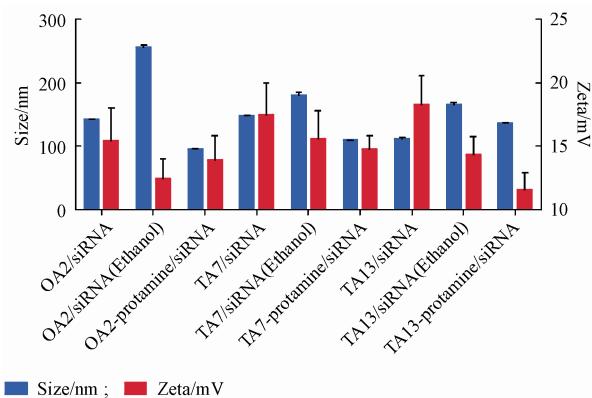


Figure 3 Particle size and Zeta potential of liposome/siRNA complexes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 不同介质中的稳定性

为了保证脂质体/siRNA 复合物在与 DC 共孵育时的稳定性, 本研究考察了各组脂质体/siRNA 复合物在不同孵育介质中 24 h 内的粒径变化, 以筛选出最佳的共孵育介质(图 4)。结果显示, OA2 脂质体/siRNA 复合物在 T 细胞扩增培养基中孵育 24 h 后粒径基本保持不变, 而 TA7 和 TA13 脂质体/siRNA 复合物在 RPMI 1640 培养基中的稳定性更好。因此, 后续将采用各自最优的孵育介质进行脂质体/siRNA 复合物与 DC 的共孵育, 以保证复合物的稳定性。

3.3 细胞毒性

原代 DC 对递送材料敏感, 易于产生细胞毒性。因此, 递送材料的细胞相容性是评价 DC 基因递送载体的重要指标。以市售脂质体转染试剂 Lipo2000 作为阳性对照, 本研究以凋亡试剂盒检测了各组脂质体/siRNA 复合物在 48 h 内对 DC 的细胞毒性(图 5)。结果显示, 在 48 h 时, OA2、TA13、TA7 组 DC 的细胞存活率均高于 80%, 其中, 采用共孵育法制备的 OA2/siRNA 组的细胞相容性最优, 48 h 内 DC 存活率可达 89%, 而 Lipo2000 组 DC 的细胞存活率不足 70%。表明 3 种方法制备的脂质体/siRNA 复合物对于 DC 均具有良好的安全性, 且优于市售制剂 Lipo2000。

3.4 DC 对脂质体/siRNA 复合物的摄取

DC 对脂质体/siRNA 复合物的有效摄取是 siRNA 入胞发挥作用的前提。本研究采用流式细胞仪检测 Fam^+ DC 的阳性率及其平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) (图 6), 以评价 DC 对 3 种方法制备的脂质体/Fam siRNA 复合物的摄取效率。综合考虑 Fam^+ DC 的阳性率和 MFI, DC 对于乙醇注入法制备的脂质体/siRNA 复合物的摄取效率低于 Lipo2000, 而其余两种方法制备的脂质体/siRNA 复合物的摄取效率均高于 Lipo2000, 其中 OA2 复合物组的 Fam^+ DC 阳性率可达到 90% 以

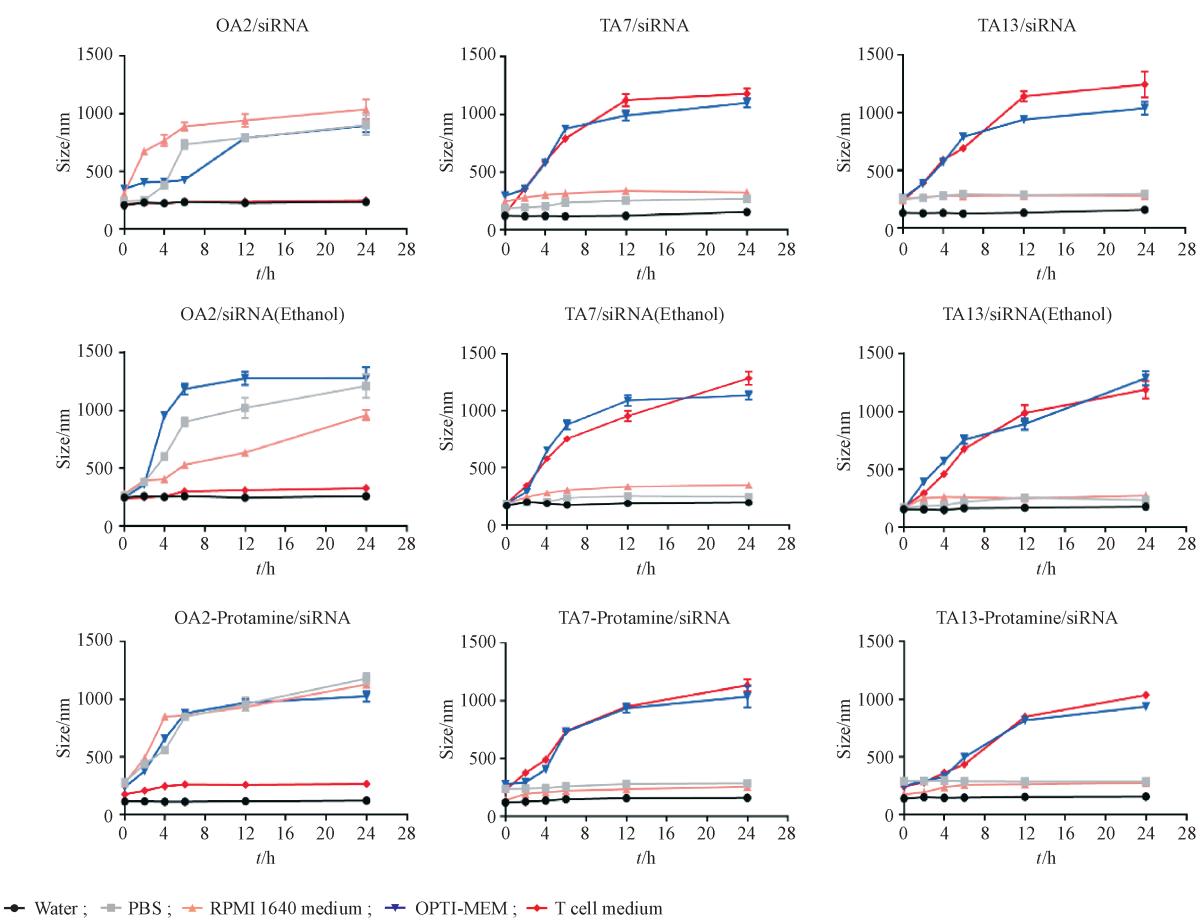


Figure 4 Variations in particle sizes of liposome/siRNA complexes in different medium during 24 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

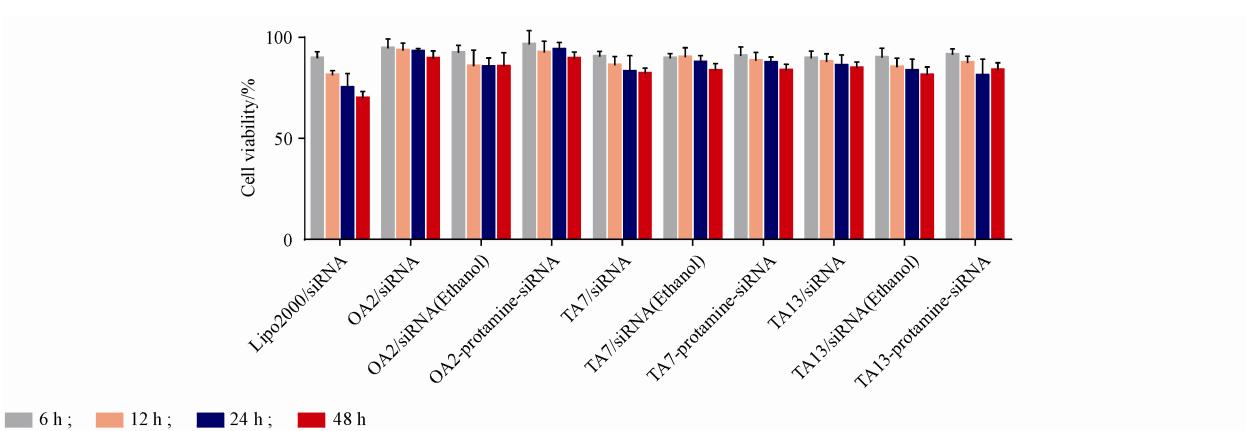


Figure 5 Cell viability of liposome/siRNA complexes over time determined by the Annexin V-FITC/PI assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

上。并且,DC 摄取共孵育法制备的脂质体/siRNA 复合物的 Fam MFI 显著高于鱼精蛋白复合法。因此,根据 DC 细胞毒性以及摄取效率的实验结果,本研究选择共孵育法制备的脂质体/siRNA 复合物进行基因沉默效率的考察。

3.5 DC 中 SOCS1 基因的沉默效率

基因沉默效率是脂质体/siRNA 复合物对 DC 递送 siRNA 有效性的最直接评判指标。本研究通过 qPCR 实验考察共孵育法制备的各组脂质体/SOCS1 siRNA 复合物对 DC 中 SOCS1 mRNA 的沉默

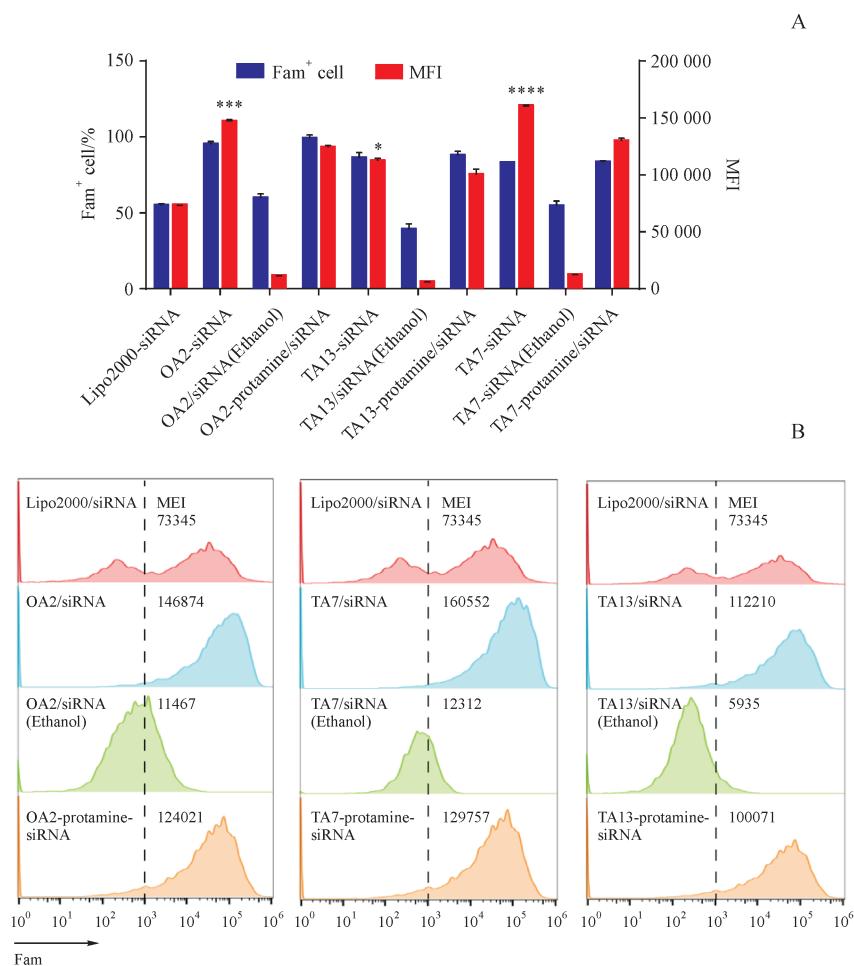


Figure 6 Uptake of Fam siRNA transfected into DC by Lipo2000, OA2, TA13 or TA7 prepared by different methods using flow cytometric assay
A: Statistical chart ($\bar{x} \pm s, n = 3$); B: Peak figure. MFI:Mean fluorescence intensity

* $P < 0.05$ vs TA13-Protamine/siRNA group; *** $P < 0.001$ vs OA2-Protamine/siRNA group; **** $P < 0.0001$ vs TA7-Protamine/siRNA

效率(图 7)。结果显示,相较于 Lipo2000/SOCS1 siRNA 组, OA2/SOCS1 siRNA、TA13/SOCS1 siRNA 以及 TA7/SOCS1 siRNA 均有显著的基因沉默效果。其中,OA2/SOCS1 siRNA 基因沉默效率最高,达到 50%,大约为阳性对照 Lipo2000/SOCS1 siRNA 组的 10 倍,可能是因为 OA2/SOCS1 siRNA 组具有最高的细胞摄取效率。由此可见,本研究通过共孵育法制备的 OA2/siRNA 复合物能够有效降解 DC 胞内免疫抑制基因 SOCS1 的 mRNA,从而有效抑制其蛋白在 DC 胞内的持续表达。

4 总 结

本研究通过共孵育法、乙醇注入法以及鱼精蛋白复合法 3 种方法分别将 3 种阳离子脂质(OA2、

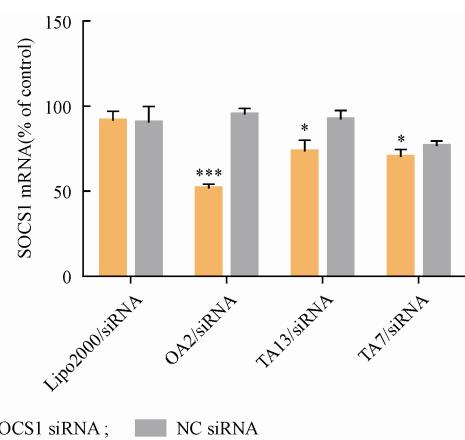


Figure 7 Expression of SOCS1 mRNA in DC after treatment with different liposome/siRNA complexes, compared with untreated group ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs Lipo2000/siRNA group

TA7、TA13)制备成脂质体/siRNA复合物,并探究不同阳离子脂质和脂质体制备方法对脂质体粒径、电位、siRNA包载能力、稳定性、DC细胞毒性、DC摄取和基因沉默效果的影响。研究表明,本研究已筛选出对DC转染安全有效的OA2阳离子脂质,其通过共孵育法制备的OA2/siRNA复合物的细胞摄取效率达到90%以上,基因沉默效率达50%以上,可有效降低DC免疫抑制基因SOCS1的表达,有利于提高DC的抗原呈递能力。后期将进一步研究OA2/SOCS1 siRNA处理后DC的抗原呈递能力和肿瘤治疗效果。本研究为原代DC细胞提供了一种安全有效、制备简单的基因递送载体平台,也为提高DC肿瘤疫苗效力提供了一种可能的策略。

References

- [1] Wculek SK, Cueto FJ, Mujal AM, et al. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, **20**(1):7-24.
- [2] Carreno B, Magrini V, Becker-Hapak M, et al. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells [J]. *Science*, 2015, **348**(6236):803-808.
- [3] Yamanaka R, Homma J, Yajima N, et al. 277. Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(11):4160-4167.
- [4] Leonhartsberger N, Ramoner R, Falkensammer C, et al. Quality of life during dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, **61**(9):1407-1413.
- [5] Draube A, Klein-Gonzalez N, Mattheus S, et al. Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(4):e18801.
- [6] Oshita C, Takikawa M, Kume A, et al. Dendritic cell-based vaccination in metastatic melanoma patients: phase II clinical trial [J]. *Oncol Rep*, 2012, **28**(4):1131-1138.
- [7] Evel-Kabler K, Song XT, Aldrich M, et al. SOCS1 restricts dendritic cells' ability to break self tolerance and induce antitumor immunity by regulating IL-12 production and signaling [J]. *J Clin Invest*, 2006, **116**(1):90-100.
- [8] Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signaling and immune regulation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, **7**(6):454-465.
- [9] Shen L, Evel-Kabler K, Strube R, et al. Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, **22**(12):1546-1553.
- [10] Kanasty R, Dorkin JR, Vegas A, et al. Delivery materials for siRNA therapeutics [J]. *Nat Mater*, 2013, **12**(11):967-977.
- [11] Sioud M. Releasing the immune system brakes using siRNAs enhances cancer immunotherapy [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, **11**(2):176.
- [12] Troegeler A, Lastrucci C, Duval C, et al. An efficient siRNA-mediated gene silencing in primary human monocytes, dendritic cells and macrophages [J]. *Immunol Cell Biol*, 2014, **92**(8):699-708.
- [13] Chen J, Ellert-Miklaszewska A, Garofalo S, et al. Synthesis and use of an amphiphilic dendrimer for siRNA delivery into primary immune cells [J]. *Nat Protoc*, 2021, **16**(1):327-351.
- [14] Crommelin DJA, Hoogeveest P, Storm G. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what [J]. *J Control Release*, 2020, **318**:256-263.
- [15] Ahmed KS, Hussein SA, Ali AH, et al. Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications [J]. *J Drug Target*, 2019, **27**(7):742-761.
- [16] Gao A, Hu XL, Saeed M, et al. Overview of recent advances in liposomal nanoparticle-based cancer immunotherapy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, **40**(9):1129-1137.
- [17] Kumar A, Baycin-Hizal D, Zhang Y, et al. Cellular traffic cops: the interplay between lipids and proteins regulates vesicular formation, trafficking, and signaling in mammalian cells [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, **36**:215-221.
- [18] Lin ZM, Bao M, Yu ZX, et al. The development of tertiary amine cationic lipids achieves safe and efficient siRNA delivery [J]. *Biomater Sci*, 2019, **7**(7):2777-2792.
- [19] Wang R, Wang YM, Cai MJ, et al. Pharmacological effects of anti-melanoma DC vaccine sensitized by fusion proteins of G3G6 and HST1 [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2019, **50**(2):238-245.