

苯硼酸修饰的聚乙烯亚胺系统在 T 细胞小 RNA 转染的应用

黎桂妃¹ 贡一峰^{1,2} 金 言¹ 金 立³ 季黎明⁴

¹(中国科学院深圳先进技术研究院 生物医药技术研究所 深圳 518055)

²(上海大学生命学院 上海 200444)

³(上海交通大学医学院附属同仁医院老年科 上海 200336)

⁴(上海市静安区市北医院内分泌科 上海 200443)

摘 要 小 RNA 是 T 细胞发育、分化和功能的重要调控分子,但目前仍缺乏安全有效的 T 细胞 RNA 转染系统。基于 T 细胞表面唾液酸化的特性,该文利用苯硼酸和唾液酸的相互作用,带动苯硼酸修饰的聚乙烯亚胺系统(Polyethylenimine-Phenylboronic Acid, PEI-PBA)介导小 RNA 的 T 细胞转染。通过细胞计数试剂盒(CCK-8)和羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂(CFSE)实验显示,PEI-PBA 转染系统对 T 细胞无显著细胞毒性和异常增殖。同时,流式检测人源抗 CD3/28 磁珠激活下的分化抗原 3(CD3)阳性 T 细胞在 PEI-PBA 转染系统下,小 RNA 平均摄取率增加到 18.43%,而在鼠源 T 细胞中 PEI-PBA 介导的小 RNA 转染并无明显效果。结果显示,PEI-PBA 纳米转染系统介导小 RNA 的递送具有无毒高效的特点。

关键词 唾液酸靶向; PEI-PBA; miRNA; siRNA; 转染

中图分类号 TG 156 文献标志码 A

Delivery of Small RNAs by Phenylboronic Acid-Grafted Polyethylenimine Nanoparticles into T Lymphocytes

LI Guifei¹ GONG Yifeng^{1,2} JIN Yan¹ JIN Li³ JI Liming⁴

¹(Institute of Biomedicine and Biotechnology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

³(Department of Gerontology, Tongren Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200336, China)

⁴(Department of Endocrinology and Metabolism, Shibe Hospital of Jing'an District, Shanghai 200443, China)

Abstract Small RNAs are essential regulators for T cell development, differentiation and functions. However, it is hard to deliver small RNAs into primary T cells by conventional transfection methods. Here, we reported that amphiphilic PBA-grafted PEI1.8k (PEI-PBA) nanovector facilitates the primary T cell-targeted RNA delivery

收稿日期: 2017-10-26 修回日期: 2017-12-06

基金项目: 国家科技部港澳台合作专项项目(2015DFH50230); 国家自然科学基金项目(31400746); 深圳市基础研究自由探索项目(JCYJ20160531171724757); 上海市卫计委项目(201440428); 上海市长宁区科委重大项目(cnk2014z06)

作者简介: 黎桂妃, 本科, 技术员, 研究方向为食品科学与工程; 贡一峰, 硕士研究生, 研究方向为细胞生物学; 金言(通讯作者), 博士, 副研究员, 博士生导师, 研究方向为分子免疫和肿瘤免疫治疗, E-mail: yan.jin@siat.ac.cn; 金立, 副主任医师, 研究方向为老年消化道疾病诊治、肿瘤早期诊断和综合治疗; 季黎明, 副主任医师, 研究方向为糖尿病、甲状腺疾病、肥胖、肾上腺疾病、骨质疏松的诊治, 及糖尿病血糖精细化调整和并发症控制。

through recognition of sialic groups on cell membrane of the T lymphocytes. CCK-8 (cell counting kit-8) and CFSE (5,6-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) assay showed that the administration of PEI-PBA did not cause significant cell toxicity or abnormal proliferation. Meanwhile, the flowcytometry showed the average intake of miRNA was increased to 18.43% in the anti-CD3/CD28 activated CD3⁺ (cluster of differentiation 3) T lymphocytes by PEI-PBA in human, but not mouse. The results showed that PEI-PBA nano-system had effective delivery of small RNAs in human primary T cells without toxicity.

Keywords sialic acid-targeted; PEI-PBA; miRNA; siRNA; transfection

1 引 言

非编码小 RNA (Small Noncoding RNAs, sncRNA) 是物种间高度保守的、不编码蛋白质的 RNA, 长度在 17~250 个核苷酸^[1-3]。非编码小 RNA 具有广泛的调节功能: 如微小 RNA (microRNA, miRNA) 和小干扰 RNA (small-interfering RNA, siRNA) 等通过 RNA 诱导沉默复合体到靶位点, 发挥调控功能; 如染色质模型、转录后抑制和与 mRNA 3' 端配对后导致的 mRNA 失稳等^[4]。

T 淋巴细胞是机体重要的免疫细胞^[5]。研究显示, 非编码小 RNA 参与了 T 细胞从发育、活化及功能行使等多个生物过程的调节^[6]。因此, 对 T 细胞进行非编码小 RNA 的相关操作, 对炎症疾病^[7,8]、肿瘤^[9]和感染^[10]等疾病的基础研究和临床实践都具有重大意义。但是, 至今仍缺乏针对 T 细胞, 尤其是原代 T 淋巴细胞的小 RNA 有效递送方法。

目前, T 细胞对 RNA 的摄取方法有间接和直接两种。其中, 间接方法主要通过病毒载体, 如腺病毒和慢病毒^[11]转入相应质粒, 进而在感染细胞内进行 RNA 表达。但病毒介导的导入受限于目标细胞的扩增, 并且在突变、炎症和免疫应答等方面存在潜在风险。直接方法有电穿孔和核转染 (Nucleofector), 可直接对 T 细胞进行 RNA 导入。该类方法通过高电压下 T 细胞细胞膜瞬时通透, 小 RNA 可由此进入, 改变电转参数可有

效提高 RNA 转染的效率。但是, 电击后细胞存活率过低^[12]是这类方法的主要缺陷。此外, 还有合成载体, 如阳离子聚合物^[13]、多肽^[14]、脂质体^[15]等直接递送技术, 其可与 RNA 结合成带正电荷的载体复合物, 增加与带负电荷的细胞膜之间的相互作用, 进而提高细胞的内吞作用。以上间接与直接方法转染效率均不高, 并且材料载体对细胞具有较大毒性。Liu 等^[16]尝试构建了纳米递载系统, 对人类 T 细胞系及外周血 T 细胞进行 siRNA 传递。初步研究发现, 单层壁碳纳米管可有效将 siRNA 递送至人源 T 细胞内, 但材料对细胞的毒性和效率都尚未阐述^[17]。

T 细胞细胞膜表面存在唾液酸化修饰。通过唾液酸转移酶来进行唾液酸修饰, 加上敲除小鼠模型的表型表明, 唾液酸修饰参与 T 细胞成熟、分化、迁移和死亡过程的调控^[18]。本研究利用 Ji 等^[19]设计的选择性靶向唾液酸的纳米载体 PEI-PBA——共轭连接了苯硼酸 (Phenylboronic Acid, PBA) 的小分子量 (1.8 k) 聚乙烯亚胺 (Polyethylenimine, PEI), 介导 T 淋巴细胞摄取 miRNA 和 siRNA, 并研究 T 细胞不同亚群对小 RNA 摄取之间的差异。

2 材料与amp;方法

2.1 材料

聚乙烯-苯硼酸 (PEI-PBA) 由中国科学院深圳先进技术研究院马轶凡实验室合成; miRNA-

FAM (miR01204) 和 siRNA-FAM (siR05815) 购自广州市锐博生物科技有限公司; 人源外周血单核细胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) 培养细胞所用培养基为 AIM-V Medium CTS (购自 Gibco by life, 货号为 1860610); 刺激细胞所用磁珠为 Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (购自 Gibco by Thermo Fisher Scientific, 货号为 00347615); 细胞增殖示踪羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (5(6)-Carboxyfluorescein Diacetate N-Succinimidyl Ester, CFSE) 荧光探针 (C1031) 购自碧云天生物科技有限公司; CCK-8 试剂盒 (Cell Counting Kit, CK04) 购自 DOJINDO; 流式分析抗体 anti-human CD3、anti-human CD8、anti-human CD4、anti-human TCR γ/δ 、anti-human TCR V δ 2 及鼠源的 anti-mouse CD3、anti-mouse CD8a、anti-mouse CD4、anti-mouse TCR γ/δ 、anti-mouse NK-1.1 购自 Biolegend 公司。人外周血从 8 位健康志愿者 (21~25 岁, 男性 6 位, 女性 2 位) 手臂抽取静脉血获得, 所有操作均符合中国科学院深圳先进技术研究院人体伦理管理协议 SIAT-IRB-170305-H0415; C57BL/6 小鼠由广东省实验动物中心购得, 所有操作均符合中国科学院深圳先进技术研究院动物伦理管理协议 SIAT-IRB-170306-YYJ-JINY-A0321。

2.2 实验方法

2.2.1 人外周血 T 细胞培养

将采集的人外周血单核细胞 (PBMC) 用淋巴细胞分离液分离后, 重悬于含 200 U/mL IL-2 (白细胞介素 2) 的 (细胞治疗级) 无血清细胞 (AIM-V) 培养基, 置于 37°C、5% CO₂ 培养箱培养。用磁珠 (Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28) 刺激培养至第 6 天、第 8 天分别进行相应试验。

2.2.2 小鼠 T 细胞的培养

取 6~8 周 C57BL/6 小鼠胸腺和脾脏淋巴细胞, 用含 10% FBS (胎牛血清) 的 RPMI-1640 培养基 (含 200 U/mL IL-2) 重悬, 置于 37°C、5%

CO₂ 培养箱培养。

2.2.3 CCK-8 测定

将用磁珠刺激培养至第 8 天的人源 T 细胞, 铺板于 96 孔板 (每孔 2×10^4 个细胞), 实验组加入 PEI-PBA (终浓度 8 ng/mL) 培养 24 h 后, 按照 CCK-8 试剂 (DOJINDO, CK04) 说明书操作于 450 nm 处紫外分光光度计 (BioTek) 检测吸光度值。

2.2.4 荧光染料 CFSE 测定

将磁珠刺激培养至第 6 天的人源 T 细胞: 首先, 用终浓度为 5 μ mol/L 的荧光染料——羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 工作液避光染色 3 min; 其次, 用 1 \times PBS (磷酸盐缓冲液) 洗涤两遍, 重悬于 AIM-V 培养系统, 以每孔 5×10^4 个细胞铺板于 24 孔板中, 并加入材料 PEI-PBA (终浓度 8 ng/mL) 进行培养; 最后, 培养 3 天后收集细胞, 同时加入相应抗体染色, 待用 4% 多聚甲醛固定后, 使用 FACS CANTO II (BD) 进行流式分析。

2.2.5 PEI-PBA 材料介导的转染系统在 T 细胞中对小 RNA 的转染

首先, 将相应的 miRNA-FAM 或 siRNA-FAM (终浓度 100 nmol/L) 与 PEI-PBA 材料 (终浓度 8 ng/mL) 进行混匀, 在室温孵育 10 min; 其次, 将前述混合材料体系移入对应的 T 细胞 (人源和鼠源) 培养系统进行培养, 24 h 后收集细胞, 用相应抗体染色后, 采用 FACS CANTO II (BD) 流式分析。

3 结果与分析

3.1 PEI-PBA 对 T 淋巴细胞的细胞毒性试验

理想的载体本身不对 T 淋巴细胞的生物表型及生物过程具有干扰。Ji 等^[19]的研究已表明, PEI-PBA 材料本身对肿瘤细胞不具备细胞毒性。为了解 PEI-PBA 对正常的淋巴细胞, 尤其是对

T 淋巴细胞是否存在影响, 本文以人类外周血单核细胞为研究对象, 首先将用 anti-CD3/CD28 磁珠刺激第 6 天进入指数级扩增的人外周血 T 淋巴细胞, 采用活细胞荧光标记染料 CFSE 工作液脉冲标记后进行培养(3 天); 其次, 对 2 种处理的细胞: 纳米载体 PEI-PBA 处理和未处理(NC)细胞的增殖能力进行了测定, 并用流式分析显示 CD3⁺ T 细胞的 CFSE 染色状态。CFSE 实验的结果如图 1(a)所示: 与空白对照组相比, PEI-PBA 处理并不影响 T 细胞的增殖。

我们进而通过 CCK-8 实验测定了纳米载体 PEI-PBA 对细胞的毒性情况, CCK-8 效应如图 1(b)所示。实验对 anti-CD3/CD28 磁珠刺激第 8 天的人外周血 T 淋巴细胞进行测定。其中, NC 为不加 PEI-PBA 材料的空白对照组, PEI-PBA 为终浓度 8 ng/mL 的 PEI-PBA 材料处理的样品。结果显示, 当空白对照组相对数值为 100% 时, PEI-PBA 平均值为 72.40%, 二者无显著性差异 ($P>0.05$)。综上所述, PEI-PBA 材料对 T 淋巴细胞不具有明显的细胞毒性作用。

3.2 非扩增原代人外周血 T 淋巴细胞中 PEI-PBA 介导的 miRNA 递送效率

miRNA 是重要的调节分子, 参与 T 细胞多种与细胞扩增无关或偶联的生物过程调控。对参与扩增偶联的 T 细胞而言, 现有方法如慢病毒感染可

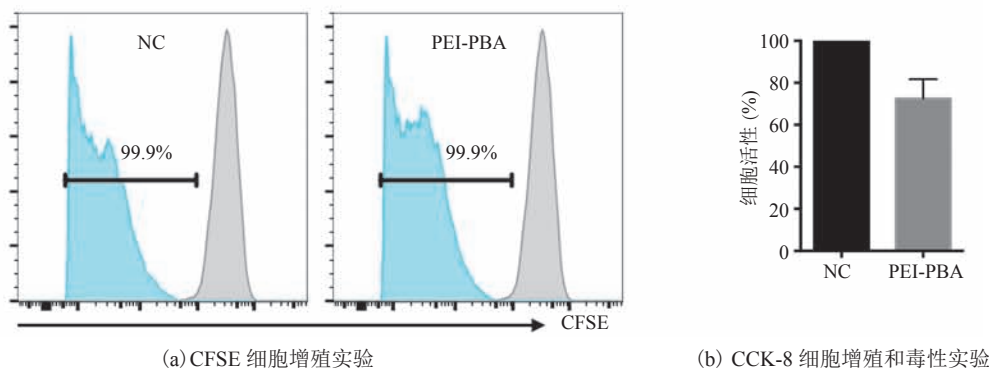
实现对扩增 T 细胞进行基因操作的目的, 从而替代 miRNA 的直接转导。对非扩增状态下的 T 淋巴细胞而言, miRNA 递送效率则更为低下。因此, 本文以原代外周血 T 细胞为非扩增模型, 以 anti-CD3/CD28 刺激 PBMC 扩增的 T 细胞为扩增模型, 分别考察了 PEI-PBA 介导的小 RNA 的摄取效率。

在人外周血原代外周血非扩增模型中, 与空白对照组相比, PEI-PBA 介导的 T 细胞 miRNA 转染效率明显升高, 具体结果如图 2(a)、2(b)所示。结果显示, CD3⁺ T 细胞的效率总体提高至 5.99%。其中, 细胞亚群 CD4⁺ T 细胞提高 5.31%; CD8⁺ T 细胞提高 6.66%; $\gamma\delta$ T 细胞的效率达到 11.10%, 为原代 T 细胞中 miRNA 递送效率最高的一种 T 细胞。

3.3 非扩增原代人外周血 T 淋巴细胞中 PEI-PBA 介导的 siRNA 递送效率

siRNA 是重要的分子生物学研究方法和治疗手段。本文检测了 PEI-PBA 介导 siRNA 对原代 T 细胞的递送效率, 结果如图 2(c)、2(d)所示。在未扩增的人外周血 T 细胞中, PEI-PBA 对 CD3⁺ T 细胞的 siRNA 递送效率达到 6.34%。其中, 细胞亚群 CD4⁺ T 细胞 4.85%, CD8⁺ T 细胞 6.22%, $\gamma\delta$ T 细胞 14.45%。

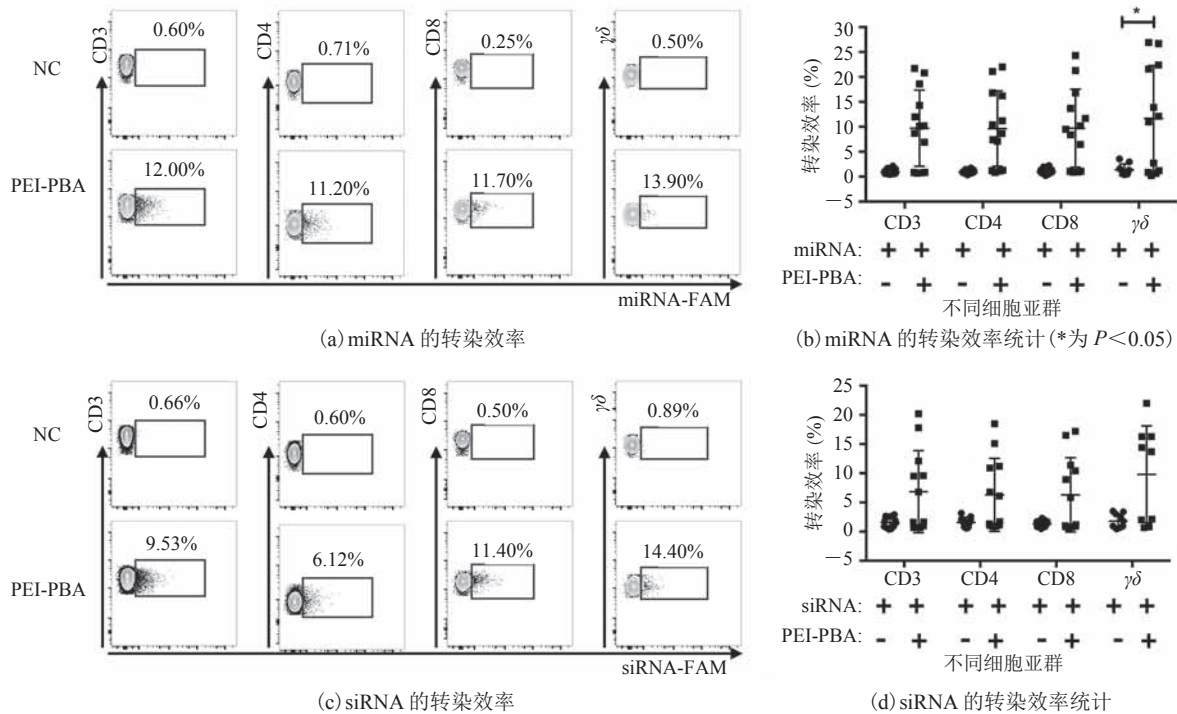
总体而言, 在未扩增的原代 T 细胞体系中, PEI-PBA 介导的 siRNA 递送效率与 miRNA



NC: 不加 PEI-PBA 的空白对照组; PEI-PBA: 终浓度 8 ng/mL 的 PEI-PBA 材料处理的样品

图 1 PEI-PBA 对 T 细胞安全性评估

Fig. 1 Cytotoxicity of PEI-PBA in T cell



注: NC 为不加材料转染小 RNA 的对照组; PEI-PBA 为加材料转染小 RNA 的样品; (b) 图和 (d) 图中的 “+” 为添加该物质, “-” 为无添加该物质

图 2 PEI-PBA 材料介导的转染系统的人外周血 T 细胞未扩增时各亚群对小 RNA 的摄取率

Fig. 2 Uptake of small RNAs in T cell subsets of human PBMC by PEI-PBA

的相当, 可以实现对原代 T 细胞进行小 RNA 水平操纵。

3.4 扩增状态下人源 T 淋巴细胞中的 PEI-PBA 介导的 miRNA 递送效率

随后我们对经过 anti-CD3/CD28 磁珠刺激 (8 天) 并进入指数级扩增的人外周血 T 淋巴细胞进行了 PEI-PBA 包裹的 miRNA 递送效率检测, 结果如图 3(a)、3(b) 所示。结果显示, T 细胞 ($CD3^+$ T 细胞) 整体摄入 miRNA 比例达到 18.43%。其中, 细胞亚群 $CD4^+$ T 细胞 14.59%, $CD8^+$ T 细胞 18.99%, $\gamma\delta$ T 细胞 25.98%。可见, PEI-PBA 对 CD3/CD28 活化扩增至第 8 天的人外周 T 细胞显示出有效的 miRNA 递送能力, 显著高于非扩增状态的 T 细胞各亚群细胞。

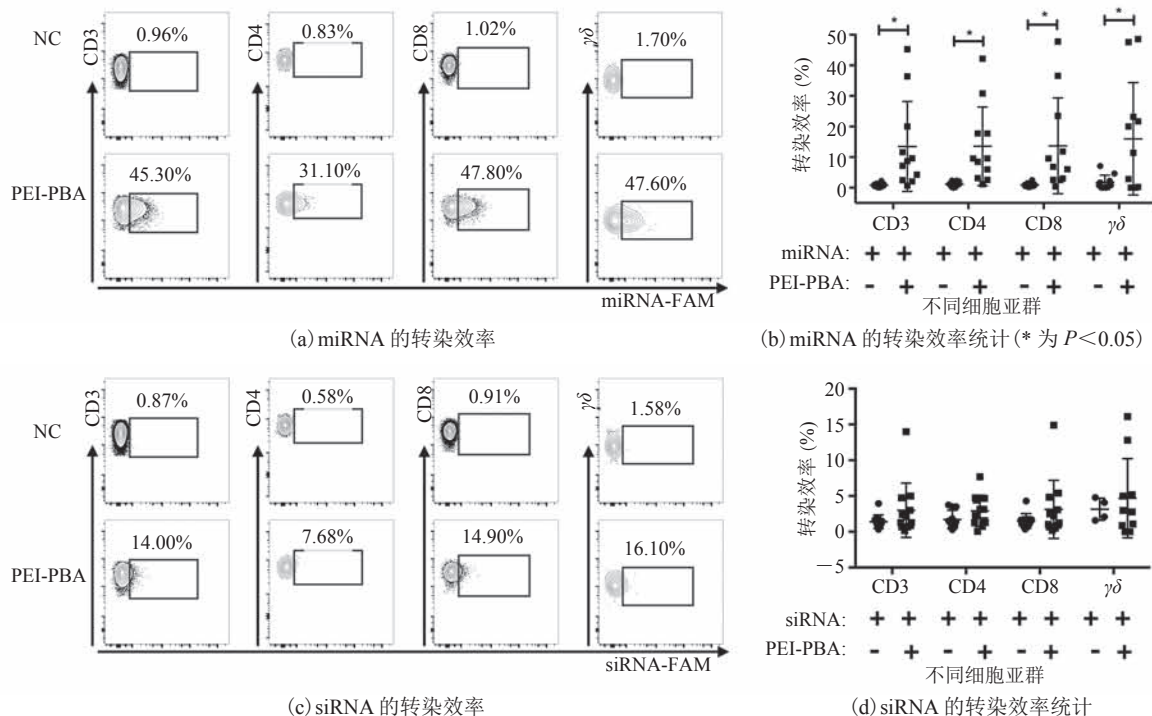
3.5 扩增状态下人源 T 淋巴细胞中的 PEI-PBA 介导的 siRNA 递送效率

与 PEI-PBA 介导 miRNA 递送效率不同的

是, 在 anti-CD3/CD28 磁珠刺激的人外周血 T 淋巴细胞中, 与非扩增性原代 T 细胞组相比, PEI-PBA 介导的 siRNA 递送效率并没有发生显著改变, 结果如图 3(c)、3(d) 所示。 $CD3^+$ T 细胞的 siRNA 转染效率为 5.52%。其中, 细胞亚群 $CD4^+$ T 细胞 4.12%, $CD8^+$ T 细胞 5.82%, $\gamma\delta$ T 细胞 13.67%。T 细胞是否活化和扩增, 对各个亚群的 siRNA 转染效率无关。

3.6 PEI-PBA 介导的原代鼠源 T 淋巴细胞小 RNA 递送效率

为检测 PEI-PBA 系统是否适用于鼠源 T 细胞, 本文对 C57BL/6 小鼠脾脏和胸腺 T 淋巴细胞进行了 PEI-PBA 包裹小 RNA 的转染: 将终浓度为 100 nmol/L 的 miRNA 或 siRNA, 与终浓度为 8 ng/mL 的材料 PEI-PBA 共孵育后移入 C57BL/6 小鼠脾脏和胸腺 T 细胞中培养 24 h 并进行流式分析。图 4 与附录(图 I、II) 结果显示, 与空白对

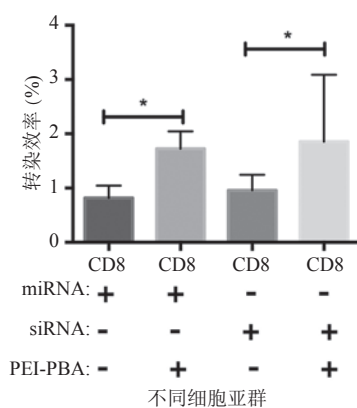


注: NC 为不加材料转染小 RNA 的对照组; PEI-PBA 为加材料转染小 RNA 的样品; (b) 图和 (d) 图中的“+”为添加该物质, “-”为无添加该物质

图 3 PEI-PBA 材料介导的转染系统的人外周血 T 细胞扩增后各亚群对小 RNA 的摄取率

Fig. 3 Uptake of small RNAs in T cell subsets of stimulated human PBMC by PEI-PBA

对照组相比, PEI-PBA 纳米载体仅对小鼠脾脏 $CD8^+$ T 细胞具有递送效率, 对 miRNA 和 siRNA 的摄取效率分别提高至 1.72% 和 1.85%, 并具有显著差异。



注: * 为 $P < 0.05$; “+”为添加该物质, “-”为无添加该物质

图 4 PEI-PBA 介导的原代鼠源脾脏 $CD8^+$ T 淋巴细胞小 RNA 递送效率

Fig. 4 Uptake of small RNAs in $CD8^+$ T cell subsets of spleen from C57BL/6 mice by PEI-PBA

4 讨论与小结

作为近来工程细胞治疗的热点细胞, T 细胞的转染尤其是小 RNA 的转染始终是领域中的技术难点。前期 Liu 等^[16]和 Freeley 等^[17]报道对来源 T 细胞进行 siRNA 传递的纳米管递载系统, 因缺乏对细胞毒性和效率的评估而无法进行实际应用。目前 siRNA 最广泛应用的 Nucleofector 系统, 虽然核转染效率较高, 但转染 24 h 内细胞死亡率过高, 仅 17% 的 T 细胞可以存活^[20]。由于 Nucleofector 的操作步骤复杂且昂贵, 由死亡率反推要求大量的起始细胞数量, 极大地限制了 T 细胞中 siRNA 及小 RNA 的应用和研究。

与肿瘤细胞一样, T 细胞具有细胞膜表面唾液酸化修饰的细胞特征。选择性靶向唾液酸的纳米材料 PEI-PBA 在高唾液酸修饰的肿瘤细胞系统中已证明了安全性和有效性。基于 T 细胞与肿瘤

细胞不同的代谢及修饰途径, 本文在 T 细胞系统中再次检测了 PEI-PBA 的生物安全性。经 PEI-PBA 处理的 T 细胞存活率达 72% 以上, 并且对后续的 T 细胞增殖无影响, 体现了较好的生物应用价值。并且 PEI-PBA 介导的小 RNA 转染方法对起始细胞数没有要求, 可对低细胞数 T 细胞进行转染操作, 操作方法步骤简单、快速, 结合其较高的转染效率, 如对人外周血 CD3⁺ T 细胞 18.43% 的小 RNA 转染效率, 可有效地满足研究和应用的需求。

本文工作系统地比对了人、鼠两种来源 T 细胞的不同亚群, 以及不同类型小 RNA (miRNA 和 siRNA) 摄取之间的差异。结果显示, 纳米载体 PEI-PBA 可以简单、安全、有效地介导人源 T 淋巴细胞小 RNA 转染, 但对鼠源 T 淋巴细胞基本无效。就人源 T 淋巴细胞转染而言, PEI-PBA 可有效介导 miRNA 的转染, 且效率在活化扩增后有显著提高; 而 PEI-PBA 介导的 siRNA 转染效率则不受 T 细胞状态影响。在不同的 T 细胞群体, 如 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞中, PEI-PBA 介导的转染效率不同, 其中对 $\gamma\delta$ T 细胞的转染效率最高。这可能与不同细胞亚群细胞膜表面的唾液酸水平相关。另外, 由于个体差异, 转染效率在不同志愿者中差异较大, 导致结果的统计方差也较大。

参 考 文 献

- [1] Azhikina TL, Ignatov DV, Salina EG, et al. Role of small noncoding RNAs in bacterial metabolism [J]. *Biochemistry Biokhimiia*, 2015, 80(13): 1633-1646.
- [2] He YD, Ju CY, Zhang XB. Roles of small RNAs in the immune defense mechanisms of crustaceans [J]. *Molecular Immunology*, 2015, 68(2, Part B): 399-403.
- [3] Eddy SR. Non-coding RNA genes and the modern RNA world [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2(12): 919-929.
- [4] Affymetrix/Cold Spring Harbor Laboratory ENCODE Transcriptome Project. Post-transcriptional processing generates a diversity of 5'-modified long and short RNAs [J]. *Nature*, 2009, 457(7232): 1028-1032.
- [5] Groux H, Powrie F. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease [J]. *Immunology Today*, 1999, 20(10): 442-445.
- [6] Ruggero K, Guffanti A, Corradin A, et al. Small noncoding RNAs in cells transformed by human T-cell leukemia virus type 1: a role for a tRNA fragment as a primer for reverse transcriptase [J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(7): 3612-3622.
- [7] Steward-Tharp SM, Song YJ, Siegel RM, et al. New insights into T cell biology and T cell-directed therapy for autoimmunity, inflammation, and immunosuppression [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, 1183(1): 123-148.
- [8] Getts DR, Shankar S, Chastain EML, et al. Current landscape for T-cell targeting in autoimmunity and transplantation [J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(7): 853-870.
- [9] Hinterleitner R, Gruber T, Pfeifhofer-Obermair C, et al. Adoptive transfer of siRNACblb-silenced CD8⁺ T lymphocytes augments tumor vaccine efficacy in a B16 melanoma model [J]. *PloS One*, 2012, 7(9): e44295.
- [10] Boutimah F, Eekels JJM, Liu YP, et al. Antiviral strategies combining antiretroviral drugs with RNAi-mediated attack on HIV-1 and cellular co-factors [J]. *Antiviral Research*, 2013, 98(1): 121-129.
- [11] Usme-Ciro JA, Campillo-Pedroza N, Almazán F, et al. Cytoplasmic RNA viruses as potential vehicles for the delivery of therapeutic small RNAs [J]. *Virology Journal*, 2013, 10(1): 1-10.
- [12] Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research [J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 2003, 177(4): 437-447.
- [13] Kesharwani P, Gajbhiye V, Jain NK. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(29): 7138-7150.
- [14] Shukla RS, Qin B, Cheng K. Peptides used in the delivery of small noncoding RNA [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2014, 11(10): 3395-3408.
- [15] Asai T, Oku N. Systemic delivery of small RNA using lipid nanoparticles [J]. *Biological &*

- Pharmaceutical Bulletin, 2014, 37(2): 201-205.
- [16] Liu Z, Winters M, Holodniy M, et al. siRNA delivery into human T cells and primary cells with carbon-nanotube transporters [J]. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 2007, 46(12): 2023-2027.
- [17] Freeley M, Long A. Advances in siRNA delivery to T-cells: potential clinical applications for inflammatory disease, cancer and infection [J]. *The Biochemical Journal*, 2013, 455(2): 133-147.
- [18] Eylar EH, Madoff MA, Brody OV, et al. The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237(6): 1992-2000.
- [19] Ji M, Li P, Sheng N, et al. Sialic acid-targeted nanovectors with phenylboronic acid-grafted polyethylenimine robustly enhance siRNA-based cancer therapy [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(15): 9565-9576.
- [20] Wayteck L, Xiong RH, Braeckmans K, et al. Comparing photoporation and nucleofection for delivery of small interfering RNA to cytotoxic T cells [J]. *Journal of Controlled Release*, 2017, 267: 154-162.

附录

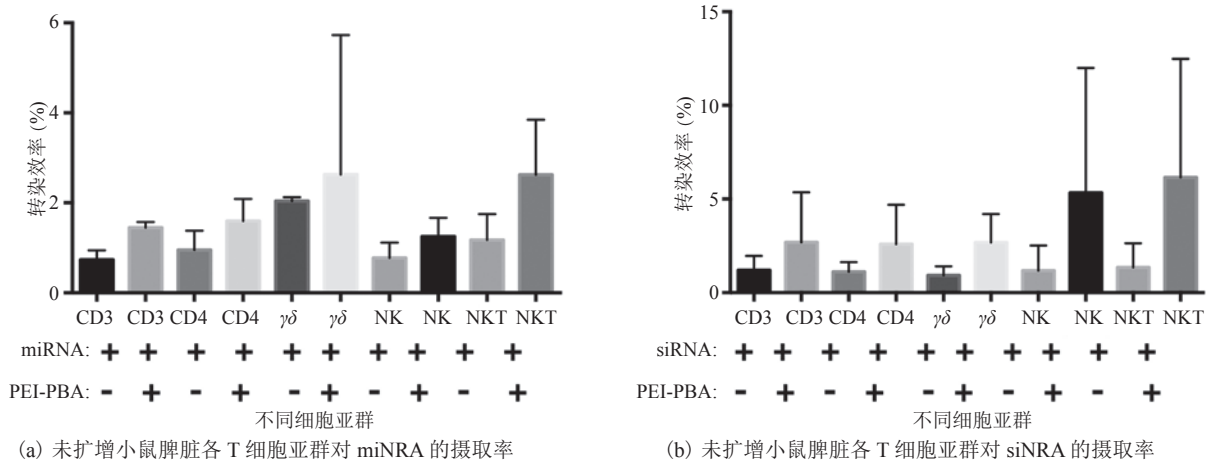


图 I PEI-PBA 材料介导的转染系统的未扩增 C57BL/6 小鼠脾脏各 T 细胞亚群对小 RNA 的摄取率

Fig. I Uptake of small RNAs in T cell subsets of spleen from C57BL/6 mice by PEI-PBA

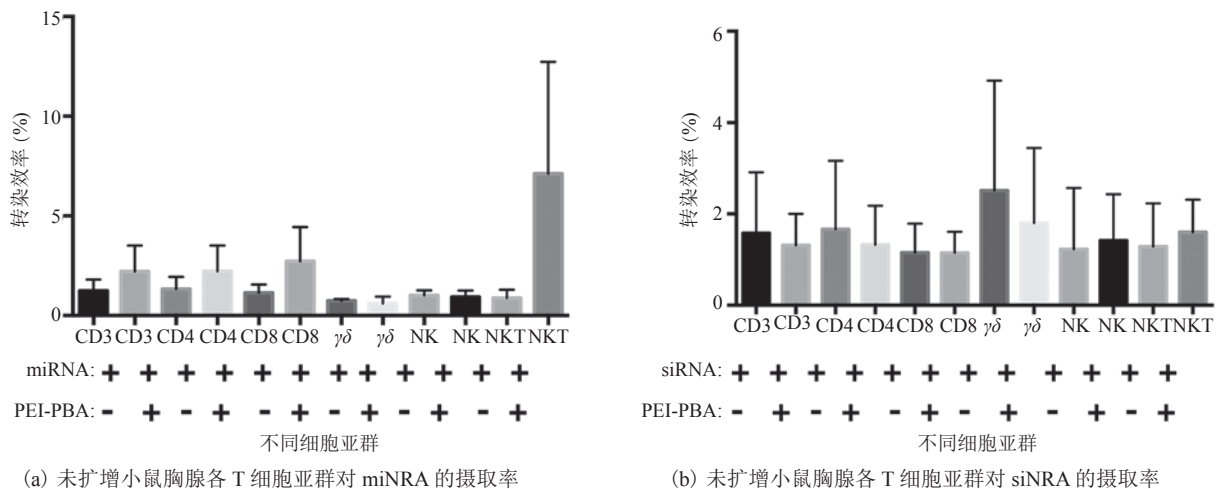


图 II PEI-PBA 材料介导的转染系统的未扩增 C57BL/6 小鼠胸腺各 T 细胞亚群对小 RNA 的摄取率

Fig. II Uptake of small RNAs in T cell subsets of thymus from C57BL/6 mice by PEI-PBA