论文

血清蛋白与阳离子多糖的质量比对 RNAi 效率的
调控作用研究刘会可[†], 张卫奇[†], 孟洁, 刘健*, 许海燕*

北京协和医学院基础学院; 中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005

[†] 同等贡献

* 联系人, E-mail: liujian@ibms.pumc.edu.cn; xuhy@pumc.edu.cn

收稿日期: 2016-03-14; 接受日期: 2016-04-26; 网络版发表日期: 2016-05-31

国家自然科学基金(批准号: 81271688)资助

摘要 阳离子多糖可以通过静电相互作用与核酸分子相结合, 并具有水溶性好和易被生物体降解的优点, 是具有潜在临床应用价值的核酸载体. 但是, 在血清存在的环境中, 阳离子多糖与 siRNA 形成的复合物会吸附血清蛋白, 这是影响 RNA 干扰效率的主要原因之一. 本文以精胺化普鲁兰多糖(Ps)作为阳离子多糖的模型材料, 通过凝胶电泳、等温滴定量热、动态光散射和流式细胞分析方法研究了血清蛋白(Pr)与 Ps 的质量比(Pr/Ps)对 Ps/siRNA 复合物的颗粒尺寸及 RNA 干扰效率的影响. 结果显示, Pr/Ps 对复合物的颗粒尺寸及其进入细胞的能力均起着重要的调节作用, 由此而影响 RNA 干扰的效率.

关键词 RNAi, 精胺化普鲁兰多糖, 血清蛋白

RNA 干扰技术在癌症、病毒感染等蛋白表达相关疾病的治疗中具有良好的应用前景^[1,2]. 合适的 siRNA 载体是 RNA 干扰技术获得临床应用的重要保障, 但传统的病毒载体存在易引起基因突变和具有免疫原性等不足^[3,4]. 非病毒载体包括脂质体类、阳离子型高分子、无机或金属纳米颗粒等多种形式^[5], 其中阳离子型多糖成为发展较快的非病毒载体之一^[6]. 天然多糖分子中分布着许多羧基和羟基, 使其容易被修饰, 有些多糖分子含有支链结构, 支链的高自由度使得可以根据需要对多糖的物理、化学特性进行调整^[7]. 另外, 天然多糖来源广泛, 包括海藻类、植物、

动物和微生物^[8]. 因此, 多糖作为载体具有易修饰、生物相容性良好、易获得等优势. 用精胺、聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)等富含氨基的分子对多糖进行修饰, 可赋予多糖分子与 siRNA 结合的能力, 目前研究较多的有壳聚糖^[9]、普鲁兰多糖^[10]等. 但是, 在正常细胞培养条件下, 血清蛋白的非特异吸附降低了阳离子多糖对 siRNA 的递送效率, 导致 RNA 干扰效率不理想^[11,12]. 为了达到高的转染效率, 在体外应用中通常在无血清条件下孵育细胞, 而这容易引起细胞的死亡. 此外, 血液环境中含有大量的蛋白质, 对阳离子多糖作为核酸载体的体内应用也产生

引用格式: 刘会可, 张卫奇, 孟洁, 等. 血清蛋白与阳离子多糖的质量比对 RNAi 效率的调控作用研究. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 744–750
Liu H K, Zhang W Q, Meng J, et al. Relationship between serum and RNAi efficiency. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 744–750, doi: 10.1360/N052016-00186

了诸多困扰^[13]. 尽管已经有研究报道血清蛋白在阳离子性载体递送核酸的过程中起到重要作用, 但是其作用机制还不清楚^[14-17].

普鲁兰多糖(pullulan)与脱唾液酸糖蛋白受体具有较高亲和性, 经阳离子修饰过的普鲁兰已应用于平滑肌细胞、肝脏细胞、HeLa 等多种细胞的核酸递送^[18-21]. 精胺化普鲁兰多糖(pullulan-spermine, Ps)作为 DNA 载体已被应用于骨髓基质细胞和间充质干细胞^[22,23]. 本课题组之前的研究发现, 血清浓度会影响 Ps/siRNA 复合物进入细胞和从溶酶体中逃逸的能力, 由此而影响 RNA 干扰效率^[24]. 本研究以 Ps 为载体模型, 进一步研究溶液中血清蛋白(Pr)与 Ps 的质量比(Pr/Ps)对 Ps/siRNA 颗粒尺寸、进入细胞的能力以及 RNA 干扰效率的影响.

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

普鲁兰多糖和精胺分别购自 Tokyo Chemical Industry(日本)和 Sigma 公司(美国). 实验中使用的 3 种 siRNA 包括: EGFP siRNA, NC siRNA(非靶标 siRNA)和荧光素标记的 NC siRNA(FAM-siRNA), 均由 GenePharma 公司(上海)合成, 序列如下: EGFP siRNA: 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUC-3', NC siRNA: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'^[23]. 牛血清白蛋白购自 Merck 公司(德国), 胎牛血清购自四季青公司(杭州), L-15 培养基干粉购自 Gibco 公司(美国).

Ps 由本实验室合成^[20], 过程简述如下: 普鲁兰在 0.6 mol/L 硫酸溶液中 80℃水解 90 min; 水解产物通过乙醇进行分级沉淀, 分子量约为 50000 Da 的沉淀物用于进一步合成 Ps. 精胺分子与普鲁兰的连接以 N,N'-羰基二咪唑(N,N'-carbonyldiimidazole, CDI)作为活化剂. 3.74 g 的精胺和 450 mg 的 CDI 加入到 100 mL 含 100 mg 普鲁兰多糖的二甲亚砜(dimethyl sulphoxide, DMSO)中, 35℃下搅拌反应 20 h, 然后将混合液透析 2 天, 透析袋截留分子量为 8~14 kD. 透析完成后进行冷冻干燥即获得 Ps 粉末. 通过元素分析测得精胺导入率约为 25.9%.

1.2 实验样品准备

在分析天平上称取 Ps 并溶于适量焦碳酸二乙酯

(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水溶液(生工生物工程, 上海)中获得浓度为 2 mg/mL 的 Ps 溶液, 经过 0.45 μm 滤膜过滤除菌, 放 4℃储存. 3 种 siRNA 用适量的 DEPC 水溶解, 终浓度为 0.25 μg/μL, 涡旋振荡 5 min, -20℃储存.

1.3 琼脂糖凝胶电泳

分别取 4 μL 的 NC siRNA 溶液与 1, 2, 3, 4, 5, 6 μL 的 Ps 溶液混合, 将混合液在室温下放置 30 min 后与 6×DNA 上样缓冲液混合, 吸取全部溶液加入到含 0.5 μg/mL 溴化乙锭(ethidium bromide, EB)的琼脂糖凝胶上样孔中, 在 TAE 溶液(2 mol/L Tris, 100 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA))中进行电泳, 以裸 NC siRNA 作为对照, 然后用 Binta 2020D 成像系统(Binta, 北京)进行凝胶成像. 电泳条件为 2%琼脂糖、电压 150 V、电泳时间为 10 min.

在分析天平上称取牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)并用适量 DEPC 水溶解, 获得浓度为 0.3, 0.15, 0.075 g/mL 的 BSA 溶液. 将 2.5 μL 的 Ps 溶液与 2 μL 的 NC siRNA 溶液均匀混合, 室温静置 30 min; 将 Ps/siRNA 复合物溶液加入到 10 μL 的 BSA 溶液中, 混合溶液在室温静置 10 min 后进行琼脂糖凝胶电泳, 以裸 NC siRNA 和 Ps/siRNA 的 DEPC 水溶液作为对照. 电泳条件同上.

1.4 等温微量热法

在 MicrocalTM ITC 200(GE Healthcare, 美国)等温微量热仪上进行量热实验. 将浓度为 0.022 mmol/L 的 Ps 溶液注入容量为 200 μL 的量热池, 将一定量的 BSA 溶液(0.2 mmol/L)装入 EP 管中, 进样针从 EP 管中吸取 20 μL BSA 溶液进行滴定. 滴定过程中控制温度在 25℃, 搅拌速率为 1000 r/min, 第一滴的体积为 0.4 μL, 后续每滴的体积为 2.0 μL, 平衡时间为 120 s, 采集数据的时间间隔为 5 s. 为扣除 BSA 溶液的稀释热, 用 BSA 溶液滴定 DEPC 水. 实验数据用 Origin 7.0 进行处理.

1.5 动态光散射

分别取 0.4, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 μL 的 NC siRNA 溶液与 5 μL 的 Ps 溶液混合, 室温静置 30 min 后加入到 1 mL 的 L-15 培养基中, 培养基中的血清浓度分别

为 2.5%, 5%, 10%, 20%, 室温静置 10 min. 取 1 mL 混合溶液加入到比色皿中, 小心放置到 Zetasizer Nano ZS90(Malvern instruments, 英国)动态光散射仪上的样品槽中. 将仪器测试角度设置在 90°, 温度设置在 25°C 下进行水化粒径的测试, 每次测试至少重复 10 次以上.

1.6 细胞培养

人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心(北京), 稳定表达 EGFP 的细胞 MDA-MB-231-EGFP 购自 Cellcyto 公司(北京). 两种细胞的培养基均为含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 L-15 培养基. 培养条件为 37°C 和低 CO₂. 细胞每次传代 1 传 3, 每隔 2 天左右传代 1 次.

1.7 siRNA 转染

MDA-MB-231 细胞种 12 孔板, 约 8×10^4 个/孔; 培养过夜后进行 FAM-siRNA 转染. 5 μ L 的 Ps 溶液分别与 2, 4, 8 μ L 的 FAM-siRNA 溶液混合, 在室温静置 30 min. 将 Ps/FAM-siRNA 复合物加入到 1 mL 的培养基中, 培养基中的血清浓度为 2.5%, 5%, 10%, 20%, 室温静置 10 min. 细胞用含有 Ps/FAM-siRNA 的培养基孵育 4 h 后, 用流式细胞仪检测细胞的荧光强度, 每个实验条件两个复孔, 用正常培养的细胞作对照.

MDA-MB-231-EGFP 细胞种 12 孔板, 约 8×10^4 个/孔, 培养过夜后进行 EGFP siRNA 转染. 5 μ L 的 Ps 溶液分别与 1, 2, 4, 8, 16 μ L 的 EGFP siRNA 混合, 在室温静置 30 min. 将 Ps/EGFP siRNA 复合物加入到 1 mL 的培养基中, 培养基中的血清浓度为 2.5%, 5%, 10%, 20%, 室温静置 10 min. 细胞用含有 Ps/EGFP-siRNA 的培养基孵育 4 h 后, 将培养基换成血清浓度为 10% 的培养基, 继续培养 44 h. 用流式细胞仪检测细胞的荧光强度, 每个实验条件两个复孔, 用正常培养的细胞作对照.

1.8 流式细胞仪检测

弃去细胞培养基, PBS 洗 2 次, 用 0.125% 的胰蛋白酶消化后收集细胞, 用流式细胞仪 C6(Accuri Cytometers, 美国)检测细胞在 FL1-A 通道的荧光强度. 所得数据用 CFlow™ 软件(Accuri Cytometers)和 FlowJo 软件(Treestar, 美国)分析.

1.9 CCK-8 检测细胞活性

将 MDA-MB-231 细胞种于 96 孔板中(4×10^3 个/孔), 培养过夜. 将 20 μ L 的 Ps 溶液与 16 μ L 的 NC siRNA 混合, 在室温静置 30 min. 取 9 μ L 的 Ps/NC siRNA 复合物加入到 1 mL 的培养基中, 培养基中血清浓度为 2.5%, 4%, 5%, 10%, 20%, 室温静置 10 min 后, 加入到 96 孔板中, 100 μ L/孔; 4 h 后将培养基换成含 10% CCK-8 的细胞培养基, 在 37°C 下孵育 1 h, 吸取上清, 检测上清液在 450 和 630 nm 波长处的吸光值. 每个实验条件做 4 个复孔, 用正常培养的细胞作对照. 细胞相对活性=实验组细胞的吸光值/对照组细胞的吸光值.

2 结果

2.1 Ps 与 siRNA 的混合质量比对复合物形成的影响

带负电的裸 siRNA 在琼脂糖凝胶中会向正极移动. 当 Ps 与 siRNA 通过静电相互作用形成 Ps/siRNA 复合物后, siRNA 的移动将受到阻抑. 如图 1 所示, 当 siRNA 的质量固定为 1.0 μ g 时, 随着 Ps 质量的增加, 上样孔的亮度逐渐增强, 向正极移动的条带逐渐减弱; 当 Ps 的质量达到 0.75 μ g 时, 电泳条带消失. 由此可知, 要完全结合 1.0 μ g 的 siRNA, Ps 的最少用量是 0.75 μ g.

2.2 Ps 对 BSA 的吸附及其对 Ps/siRNA 稳定性的影响

血清的主要成分是血清蛋白, 为了避免其他血清成分的干扰, 用 BSA 代替血清蛋白与 Ps 进行等温滴定热分析(isothermal titration calorimetry, ITC). 图 2A 显示了 BSA 与 Ps 的滴定热热曲线, 减去空白

图 1 不同质量比的 Ps 与 siRNA 混合物的琼脂糖凝胶电泳图

每个样品中 siRNA 的质量固定为 1.0 μ g

对照和去除第1滴之后,前6滴都有热量放出;随着滴定的进行,每滴的放热量逐渐减少,第7滴以后不再有热量放出.由此推定,Ps会与BSA结合并放热.

接下来采用琼脂糖凝胶电泳研究了Ps对BSA的吸附是否对Ps/siRNA的稳定性产生影响.电泳样品有5组,从左到右依次为:siRNA的水溶液(siRNA@H₂O)、Ps/siRNA的水溶液(Ps/siRNA@H₂O)和3组Ps/siRNA与不同浓度BSA的混合溶液(Ps/siRNA@BSAaq),3组Ps/siRNA@BSAaq中BSA与Ps的质量比(*Pr/Ps*)依次为150:1,300:1和600:1.图2B显示,1号泳道有一条条带;2号泳道没有条带出现,说明0.5 μg的siRNA完全被Ps结合,所形成的复合物Ps/siRNA带正电;3号泳道与2号的现象相似,即Ps对BSA的吸附不会使得Ps/siRNA中的siRNA游离出来,此时Ps/siRNA与BSA形成的颗粒仍带正电.与对照组相比,4号泳道没有出现正常的siRNA条带,但是,泳道中出现了一个亮度较弱的条带,分子量高于对照组siRNA.分析认为,这是由吸附了BSA的Ps/siRNA所形成的;5号泳道与4号的现象相似,但上样孔的亮度较弱,推测是由于BSA比例的增加,使显色剂EB难以进入Ps/siRNA与BSA形成的更为紧密的负电性颗粒.由此推定,BSA不影响Ps/siRNA复合物的结合稳定性;Ps/siRNA吸附BSA后形成了表面带有负电荷的颗粒.

2.3 *Pr/Ps*对Ps/siRNA粒径的调控

已知Ps/siRNA复合物通过内吞途径进入细胞,因此复合物颗粒尺寸有可能影响细胞的摄取.*Pr/Ps*对复合物颗粒尺寸的影响由DLS实验进行检测.通过BCA法测定血清中蛋白质含量约为60 mg/mL,因此溶液中的*Pr/Ps*为150:1,300:1,600:1和1200:1.在图3A中,*Pr/Ps*为150:1和300:1时,溶液中颗粒的水化粒径分别约为250和200 nm;当*Pr/Ps*增加到600:1时,溶液中有水化粒径约为10和100 nm的两种颗粒;随着*Pr/Ps*增加到1200:1时,溶液中两种颗粒的水化粒径约为10和90 nm,*Pr/Ps*在1200:1时与600:1相比,10 nm左右的散射光强所占比例有所增加.溶液中的颗粒包括血清蛋白和Ps/siRNA两种,血清蛋白的粒径较小,水化粒径约为10 nm;随着*Pr/Ps*的变化粒径发生改变的颗粒是Ps/siRNA.当固定*Pr/Ps*,改变溶液中siRNA的质量时,溶液中颗粒的平均水化粒径没有明显的变化(图3B).因此,*Pr/Ps*对于Ps/siRNA复合物的颗粒粒径具有调控作用,siRNA的数量对于复合物颗粒尺寸没有显著影响.

2.4 *Pr/Ps*对Ps/siRNA进入细胞能力的影响

Ps/siRNA进入细胞是实现RNA干扰的第一步,复合物进入细胞的数量在一定程度上决定了干扰效率.图4A显示,Ps/FAM-siRNA在不同*Pr/Ps*条件下

图2 Ps与BSA的结合及其对Ps/siRNA稳定性的影响

A: 0.2 mmol/L的BSA溶液恒温滴定到0.022 mmol/L的Ps溶液中的滴定量热曲线; B: Ps/siRNA复合物在*Pr/Ps*分别为150:1,300:1和600:1条件下的琼脂糖凝胶电泳,编号代表泳道,箭头所指为非siRNA电泳条带

都可以大量进入细胞, 各个实验组中细胞的荧光阳性率都接近 100%. 当溶液中 FAM-siRNA 的质量固

定时, 随着 Pr/Ps 的增大, 细胞的荧光强度逐渐减小. 由图 4B 可以明显看出, Pr/Ps 的增大降低了细胞的平

图 3 Pr/Ps 对 Ps/siRNA 颗粒粒径的调控作用

A: 10 μ g 的 Ps 与 1 μ g 的 siRNA 结合后, 在不同 Pr/Ps 条件下溶液中的颗粒粒径分布图; B: siRNA 的质量和 Pr/Ps 对溶液中 Ps/siRNA 颗粒平均粒径的影响

图 4 Pr/Ps 对 Ps/siRNA 进入细胞能力及细胞毒性的影响

A: 不同 siRNA 的质量和不同 Pr/Ps 条件下 Ps/FAM-siRNA 在 MDA-MB-231 细胞中的阳性率, 其中 a 为 0.5 μ g siRNA, b 为 1 μ g siRNA, c 为 2 μ g siRNA; B: 用 Ps/FAM-siRNA 转染后 MDA-MB-231 细胞的平均荧光强度, 同一 siRNA 质量条件下, 各 Pr/Ps 组间均具有显著性差异 ($P < 0.01$); C: siRNA 的用量固定为 1 μ g/mL, 不同 Pr/Ps 条件下 MDA-MB-231 细胞的相对活性

均荧光强度;而增加 FAM-siRNA 的量可以提高细胞的平均荧光强度. 因此, Pr/Ps 一定程度上影响了 $Ps/siRNA$ 复合物进入细胞的能力. Ps 带有大量的正电荷,对细胞活性有一定的影响,进一步检测不同 Pr/Ps 比对细胞活性的影响发现,当 Pr/Ps 在 150~300 时,细胞的相对活性随 Pr/Ps 的增大而提高;当 Pr/Ps 在 300~1200 时,细胞相对活性保持在 0.8 左右(图 4C). 因此,综合考虑复合物进入细胞的能力和复合物的细胞毒性, $Pr/Ps=300$ 是比较理想的 Pr/Ps 比值.

2.5 Pr/Ps 对 RNA 干扰效率的影响

由图 5 可以看出,当 siRNA 浓度一定时, RNA 干扰效率随着 Pr/Ps 的增大而降低;在一定的 Pr/Ps 条件下, siRNA 质量的增加对提高 RNA 干扰效率的作用有限;当 siRNA 浓度大于 1 μg 以后, RNA 干扰效率基本保持不变: 当 siRNA 的浓度从 0.25 μg 增加到 4 μg 时(增加了 16 倍),干扰效率增加了不到 10%. 因此, Pr/Ps 对 RNA 干扰效率具有决定性的影响.

图 5 Pr/Ps 对 RNA 干扰效率的影响

不同 siRNA 的质量, 不同 Pr/Ps 条件下 $Ps/EGFP$ siRNA 对 MDA-MB-231-EGFP 细胞中的干扰效率. 同一 siRNA 质量条件下, 各 Pr/Ps 间均具有显著性差异($P<0.01$)

3 讨论

通过以上实验可以看出,在 siRNA 的质量一定的条件下, Pr/Ps 的改变影响了 $Ps/siRNA$ 复合物在凝胶电泳中的行为、颗粒粒径、进入细胞的能力以及 RNA 干扰效率. 可能原因是 Pr/Ps 的增加一方面使得 $Ps/siRNA$ 吸附的血清蛋白增多,改变了复合物的带电性,带负电的颗粒进入细胞的能力远不如带正电的颗粒. 另一方面, Pr/Ps 较低时,多个 $Ps/siRNA$ 颗粒通过血清蛋白的连接形成较大的颗粒;而当 Pr/Ps 较高时,溶液中血清蛋白的数量增加,每个 $Ps/siRNA$ 颗粒单独被多个血清蛋白包裹形成较小的颗粒,复合物外面包裹的血清蛋白的增多,使得 siRNA 从溶酶体内逃逸增加了难度,最终导致 RNA 干扰效率的降低.

在 Pr/Ps 一定的条件下, siRNA 质量的改变对 $Ps/siRNA$ 复合物的颗粒粒径和 RNA 干扰效率都没有显著的影响,但是进入细胞内的 siRNA 的量有明显的增加. 分析认为, siRNA 为 20 bp 左右的小分子,在其与 Ps 结合的过程中,一个 Ps 分子上可以结合多个 siRNA 分子,形成外表面带正电的复合物颗粒,因此在一定的范围内增加 siRNA 的数量对复合物的颗粒粒径没有明显影响;而 siRNA 结合量的增加可以提高复合物对 siRNA 的运载量. 在 Pr/Ps 不变时,转染了 siRNA 较多的细胞的平均荧光强度较强,但这并不能有效提高 RNA 干扰效率.

4 结论

在有血清环境下利用 Ps 介导 siRNA 干扰时, Ps 会吸附血清蛋白;所介导的干扰效率主要受到血清蛋白与 Ps 的质量比(Pr/Ps)的调控;综合考虑血清用量与细胞毒性、干扰效率之间的关系,建议在 siRNA 终浓度达到 1 $\mu g/mL$ 及以上的情况下,最佳 Pr/Ps 为 300.

参考文献

- 1 Dykxhoorn D M, Lieberman J. Knocking down disease with siRNAs. *Cell*, 2006, 126: 231–235
- 2 卢晶, 陈锋, 徐珍, 等. 逆转录病毒载体表达的膜型免疫球蛋白介导 B 细胞受体细胞信号传导. *中国科学: 生命科学*, 2015, 45: 860–870
- 3 Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, et al. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene*, 2003, 22: 5938–5945
- 4 Thomas C E, Ehrhardt A, Kay M A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*, 2003, 4: 346–358

- 5 Gao Y, Liu X L, Li X R. Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 1017–1025
- 6 Howard K A. Delivery of RNA interference therapeutics using polycation-based nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61: 710–720
- 7 Swierczewska M, Han H S, Kim K, et al. Polysaccharide-based nanoparticles for theranostic nanomedicine. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 99: 70–84
- 8 Singh D, Han S S, Shin E J. Polysaccharides as nanocarriers for therapeutic applications. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10: 2149–2172
- 9 Ahmed T A, Aljaeid B M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10: 483–507
- 10 Singh R S, Kaur N, Kennedy J F. Pullulan and pullulan derivatives as promising biomolecules for drug and gene targeting. *Carbohydr Polym*, 2015, 123: 190–207
- 11 Ge C, Tian J, Zhao Y, et al. Towards understanding of nanoparticle-protein corona. *Arch Toxicol*, 2015, 89: 519–539
- 12 Kim J S, Oh M H, Park J Y, et al. Protein-resistant, reductively dissociable polyplexes for *in vivo* systemic delivery and tumor-targeting of siRNA. *Biomaterials*, 2013, 34: 2370–2379
- 13 Elouahabi A, Ruysschaert J M. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol Ther*, 2005, 11: 336–347
- 14 Konopka K, Overlind N, Nagaraj A C, et al. Serum decreases the size of Metafectene- and GeneJammer-DNA complexes but does not affect significantly their transfection activity in SCCVII murine squamous cell carcinoma cells. *Cell Mol Biol Lett*, 2006, 11: 171–190
- 15 Marchini C, Montani M, Amici A, et al. Structural stability and increase in size rationalize the efficiency of lipoplexes in serum. *Langmuir*, 2009, 25: 3013–3021
- 16 Almofti M R, Harashima H, Shinohara Y, et al. Lipoplex size determines lipofection efficiency with or without serum. *Mol Membr Biol*, 2003, 20: 35–43
- 17 Ross P C, Hui S W. Lipoplex size is a major determinant of *in vitro* lipofection efficiency. *Gene Ther*, 1999, 6: 651–659
- 18 Leathers T D. Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62: 468–473
- 19 Mehvar R. Recent trends in the use of polysaccharides for improved delivery of therapeutic agents: pharmacokinetic and pharmacodynamic perspectives. *Curr Pharm Biotechnol*, 2003, 4: 283–302
- 20 Kang J H, Tachibana Y, Kamata W, et al. Liver-targeted siRNA delivery by polyethylenimine (PEI)-pullulan carrier. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18: 3946–3950
- 21 Wang J, Dou B, Bao Y. Efficient targeted pDNA/siRNA delivery with folate-low-molecular-weight polyethyleneimine-modified pullulan as non-viral carrier. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 34: 98–109
- 22 Hu Y L, Miao P H, Huang B, et al. Reversal of tumor growth by gene modification of mesenchymal stem cells using spermine-pullulan/DNA nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10: 299–308
- 23 Nagane K, Kitada M, Wakao S, et al. Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells using spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15: 1655–1665
- 24 Zhang W, Liu J, Tabata Y, et al. The effect of serum in culture on RNAi efficacy through modulation of polyplexes size. *Biomaterials*, 2014, 35: 567–577

Relationship Between Serum and RNAi Efficiency

LIU HuiKe, ZHANG WeiQi, MENG Jie, LIU Jian & XU HaiYan

Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences; School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Cationic polysaccharide is a promising siRNA carrier for its water-solubility, biodegradable character, and the binding ability with nucleic acid. However, the low RNA interference activity in serum containing conditions caused by the adsorption of serum protein is a big barrier for its clinic use. In this study, spermine modified pullulan (pullulan-spermine, Ps), a cationic polymer carrier, was used as a model material to study its hydrodynamic diameter, cell internalization character, and RNAi efficacy in different serum containing conditions. Results showed that the relative amount of protein and Ps could regulate the particle size of Ps/siRNA complex and finally affect the Ps mediated RNAi efficiency.

RNAi, pullulan-spermine, serum protein

doi: 10.1360/N052016-00186