

## 阳离子脂质体的转染机制及转染效率影响因素

# The Mechanism and Efficiency Affecting Factor of Cationic Liposome Transfection

陈彦祥<sup>1</sup>, 乔卫红<sup>1\*</sup>, 刘栋良<sup>2</sup>, 李宗石<sup>1</sup>

CHEN Yan-Xiang<sup>1</sup>, QIAO Wei-Hong<sup>1\*</sup>, LIU Dong-Liang<sup>2</sup> and LI Zong-Shi<sup>1</sup>

1 大连理工大学精细化工国家重点实验室 大连 116012

2 东华大学化学与化工学院 上海 201620

1 State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116012, China

2 College of Chemistry and Chemical Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China

**摘 要** 阳离子脂质体是一种非常具有发展前景的基因载体。简要介绍了阳离子脂质体的结构特点,着重讨论了阳离子脂质体作为基因载体时介导基因转移的机制以及在转染过程中对基因转染效率产生影响的主要因素。

**关键词** 阳离子脂质体, 基因治疗, 转染机制, 转染效率

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0776-05

**Abstract** Cationic liposome is a greatly promising gene carrier. In this paper, the structure trait of cationic liposome was briefly introduced, the mechanism of cationic liposomes mediated gene delivery and the main influencing factor of transfection efficiency in the transfection process were discussed chiefly.

**Key words** cationic liposome, gene therapy, transfection mechanism, transfection efficiency

人类基因组草图的绘制完成及生物化学与分子生物学理论的不断发展为基因治疗打下了坚实基础,基因治疗已成为医学界最活跃的研究领域之一。从最初只是单纯的纠正基因缺陷,到目前能输送表达治疗效应蛋白质的基因,直接或间接杀伤靶器官中的肿瘤细胞,基因治疗的技术在不断地发展,其定义也在不断地完善。1993 年美国食品药品监督管理局(FDA)将基因治疗定义为:基于修饰活细胞遗传物质而进行的医学干预;2003 年中国国家食品药品监督管理局(SFDA)则将基因治疗定义为:以改变细胞遗传物质为基础的医学治疗。实质上基因治疗就是一种以预防和治疗疾病为目的的人类基因转移技术,是以改变人的遗传物质为基础的生物医学治

疗<sup>[1]</sup>。作为一种新的、具有革命性的治疗手段,基因治疗的有效性已得到临床验证<sup>[2-4]</sup>。

在将外源基因引入细胞的过程中,DNA 会被体内的核酸酶降解,在未进入靶细胞,甚至未达到靶器官时便降解成小分子核苷酸,从而失去治疗作用。为了在体内运输过程中更好地保护治疗基因,可以将其与基因载体结合,一个合格的基因载体是基因治疗成功的有力保障。因此,基因载体的开发对基因治疗的发展尤为重要,它的有效开发将推动基因治疗向常规治疗方法的转变<sup>[5]</sup>。目前用于临床的基因载体大致分为病毒载体和非病毒载体两类<sup>[6]</sup>。病毒载体转染效率高,但存在很严重的安全问题,且目的基因容量小,制备复杂,成本高,不能体内反复使

用,非病毒载体具有低毒、低免疫反应,外源基因整合几率低、无基因插入片段大小限制,以及使用简单、制备方便、便于保存和检验等优势,但其转染效率普遍偏低。

脂质体在所有已用于临床试验的基因载体中仅次于病毒载体居第二位,是最有发展前景的非病毒载体。在多种类型的脂质体(如阴离子脂质体、免疫脂质体、pH敏感脂质体、空间稳定化脂质体等)中,由于阳离子脂质体对阴离子型聚电解质阴离子敏感,对带负电荷的DNA有较高的转运能力,还能转运RNA、核糖体及其他大电荷的分子和大分子物质进入细胞,其转染效率比其它脂质体高出许多倍<sup>[7]</sup>,因而被广泛应用于基因转移技术中。

## 1 阳离子脂质体的结构

阳离子脂质体分子主要由三部分构成:阳离子头部、连接键和疏水烃尾。带正电的阳离子脂质体分子头部与带负电的DNA的磷酸根之间存在静电引力,是阳离子脂质体/DNA复合物形成的主要作用力。连接键是脂质体分子的重要组成部分,直接影响脂质体分子的化学稳定性及生物降解性,是转染效率高低以及细胞毒性大小的重要影响因素。疏水尾部大致有两种:一种是两条脂肪链,另一种是胆固醇,它们对形成稳定的双分子层十分重要。

## 2 阳离子脂质体介导基因转移的机制

阳离子脂质体介导基因转移的主要过程如下:首先,阳离子脂质体与带负电的DNA分子通过静电作用形成阳离子脂质体/DNA复合物,由于阳离子脂质体过剩,复合物带正电,然后,带正电的阳离子脂质体/DNA复合物由于静电作用吸附于带负电的细胞膜表面,然后通过与细胞膜融合或胞吞作用进入细胞,最后,阳离子脂质体/DNA复合物在细胞内发生分离,阳离子脂质体连接键断裂形成小分子再通过新陈代谢排出细胞,而基因进一步被传递到细胞核内,并在细胞核内转录和翻译,最终产生目的基因编码的蛋白质<sup>[8]</sup>。下面对这个过程进行具体阐述。

### 2.1 阳离子脂质体/DNA复合物的形成

和其他类型的脂质体不同,阳离子脂质体并不将DNA包裹在其脂质双分子层中,只需将二者直接混合即可得到一种稳定的复合物——lipoplexes,因此,阳离子脂质体/DNA复合物的形成不受DNA体积大小限制<sup>[9]</sup>。

阳离子脂质体/DNA复合物的平均粒径大小受

阳离子脂质体和质粒DNA所带电荷比影响,正负电荷比越大,形成复合物的粒径也越大<sup>[10]</sup>。Zabner等<sup>[8]</sup>和Gerschon等<sup>[11]</sup>用电镜发现,形成的阳离子脂质体/DNA复合物具有多种不同的构型,至今尚不能确定哪一种构型最有利于有效的基因转染,这也许是阳离子脂质体转染基因效率不够稳定的原因之一。

### 2.2 阳离子脂质体/DNA复合物进入细胞

阳离子脂质体/DNA复合物在抵达目的细胞之前,会受到人体内很多其它组分的影响。例如,血浆中的核酸酶能引起复合物分解,使DNA提前从复合物中释放出来,从而降低转染效率<sup>[9]</sup>。一些带阴离子的细胞外物质(如肝素)与阳离子脂质体结合,或者一些带阳离子的细胞外物质与带负电的DNA结合,也容易使复合物分解,降低转染效率。如果能够在阳离子脂质体分子上连接靶向性基团,使其快速集中地富集在目的细胞周围,将有效降低这些不利因素对转染效率的影响。

顺利抵达目的细胞后,阳离子脂质体/DNA复合物通过静电作用吸附在细胞膜上,复合物进入细胞的模式与具体的复合物结构和细胞类型有关。目前已提出的主要有三种模式:(1)直接与细胞膜融合: Felgner等<sup>[12]</sup>将细胞与用碱性蕊香红标记的DOTMA/DOPE/DNA复合物一起培养,发现细胞膜表面分布有荧光标记物,有力地证明了该模式的可能性;(2)通过细胞内吞作用进入,随后与核内体膜发生融合: Zabner等<sup>[8]</sup>用电子显微镜技术研究发现DMRIE/DOPE/DNA复合物主要通过细胞内吞机制进入COS细胞和Hela细胞。;(3)通过细胞质膜上形成的小孔进入:由于基因转染需要较长的时间,有人提出了阳离子脂质体/DNA复合物可能通过细胞膜上形成的小孔而进入细胞,此模式尚需进一步实验证实<sup>[13]</sup>。

### 2.3 阳离子脂质体/DNA复合物进入细胞核

阳离子脂质体/DNA复合物进入细胞后首先会与核内体融合,但只有复合物从核内体中脱离后,才能将DNA释放出来,从而起到治疗作用。有人发现,脂质体的可溶性和细胞内的pH值对复合物和核内体分离起重要作用。当阳离子脂质体/DNA复合物从核内体中脱离后,细胞通过细胞质中的微管网状结构或肌动蛋白微丝等主动转运系统将含DNA的微粒系统转移至细胞核周围<sup>[14]</sup>。随后,DNA从复合物中分离出来,对于处于有丝分裂期的细胞,由于核膜破裂,DNA很容易进入细胞核;但对于非分裂期的细胞,小分子DNA可以通过核孔进入,而

大于 70kD 的大分子 DNA, 只有通过细胞核的主动转运系统进入<sup>[15]</sup>。

### 3 阳离子脂质体介导基因转移的影响因素

国内外对阳离子脂质体已有不少研究, 但面临一个共同的缺点, 就是转染效率低<sup>[7]</sup>。目前人们的主要工作就是试图从提高转染效率、提高生物降解性和降低毒性等方面寻找有应用前景的脂质体。要解决上述问题, 就必须先清楚影响这些性能的因素。下面就阳离子脂质体介导基因转移的影响因素进行讨论。

#### 3.1 阳离子脂质体的结构

如前所述, 阳离子脂质体分子由阳离子头部、连接键和疏水烃尾三部分构成, 它们都会对脂质体的转染效率产生影响。另外, 研究人员为了提高基因转染效率, 还会在形成脂质体的阳离子类脂分子上连接靶向性配体。下面分别从阳离子脂质体的几个结构部分对转染效率的影响进行讨论。

**3.1.1 连接键的影响** 连接键决定了阳离子脂质体的化学稳定性及被生物降解的能力<sup>[16]</sup>。连接键类型对转染效率和毒性会产生影响。在最早研究的类脂分子中, 极性与非极性的连接键多为醚键<sup>[12, 17-21]</sup>。醚是一种很稳定的化合物, 转染后在体内不易分解, 容易积存从而对人体产生毒性。针对这个问题, 易分解的酯键引起人们重视<sup>[7, 22]</sup>, 酯键可以被有效降解代谢, 却又不够稳定, 采用这种连接键的脂质体往往在未到达目标组织时便已在循环系统中分解, 从而影响转染效率。类似的还有酰胺键, 虽能降解, 但转染活力小, 且稳定性不好。

近年趋势是双功能阳离子脂质体<sup>[23-26]</sup>, 即用连接键将亲水部分与亲油部分连接, 再将靶向性配体连接到亲油部分; 亲水部分为多聚阳离子, 增加对 DNA 的结合力度, 综合脂质体与多聚阳离子的优点。连接键仍主要是醚键、酯键和酰胺键, 这些连接键仍旧存在转染效率和细胞毒性方面的问题。Boomer 提出采用对 pH 值敏感的烯醇醚键作为连接键<sup>[27]</sup>, 它在中性条件下稳定, 而在酸性条件下则易于水解。细胞内的 pH 值一般比细胞外低 1~2, 进入细胞后类脂分子酸性水解将 DNA 释放, 可以提高转染效率和降低毒性。类似的还有氨基甲酸酯键, 如二叔丁基二碳酸酯就常用来在中性条件下与氨基反应形成氨基甲酸酯键, 而在酸性条件下被水解掉<sup>[28]</sup>。因此, 由氨基甲酸酯键连接的阳离子类脂也

可提高转染效率和降低细胞毒性。Lee E. R. 等<sup>[29]</sup>采用氯甲酸胆固醇酯和多胺反应, 生成了氨基甲酸酯连接键的胆固醇基阳离子类脂, 考察了胆固醇基和多胺头部对转染效率的影响, 发现有较高的转染效率, 而且随氨基数增加(3~4个)转染效率降低。

**3.1.2 阳离子头部与疏水烃尾的影响** 通常认为脂质体阳离子头部所带正电荷越多, 转染效率就越好, 但细胞毒性也越大。不过也有特例, 有人研究发现, 一种含有多个正电荷的树枝状头部的阳离子脂质体和带一个正电荷的 DOTAP 相比, 在显著提高转染效率的同时细胞毒性却基本没有变化<sup>[30]</sup>。疏水烃尾的长度以及饱和度通常影响脂膜的柔性和流动性, 进而影响脂质体/DNA 复合物的稳定性。本课题组在进行疏水烃尾的长度对转染效率的研究中发现, 当其它条件相同时, 在 12~18 碳长的阳离子类脂中, 疏水烃尾为 12 碳长时转染效率最高。

在筛选脂质体结构时, 需综合考虑这些因素, 根据不同需要选择出最合适的阳离子脂质体分子结构。Lee 等按照疏水基团、亲水基团及连接基团的不同先后设计合成了三类 60 余种不同结构的阳离子脂质体。第一类阳离子脂质体的疏水基团为胆固醇, 连接基团为氨甲酰基, 亲水基团为带不同氨基数量的链状氨基化合物。第二类阳离子脂质体疏水基团、亲水基团与第一类类似, 但连接基团为氨基或其它基团。第三类阳离子脂质体连接基团与第一类相似, 而疏水基团则为两条长链脂肪酸。通过对上述三类阳离子脂质体进行测试比较, 发现第一类阳离子脂质体效果最好。其中疏水基团为胆固醇、连接基团为氨甲酰基、亲水基团为精胺的阳离子脂质所制备的阳离子脂质体其转染效率最高, 约为目前商品化阳离子脂质体转染效率的 100 多倍。1999 年, Tang 等发现在阳离子脂质体上引入二硫键也可提高转染效率<sup>[31]</sup>。

**3.1.3 靶向性基团的影响** 在阳离子载体的结构设计中, 常用细胞表面特异表达的受体或蛋白来解决靶向性的影响。所谓特异表达是指某些细胞常常能表达出大大多于其它细胞的表面受体。靶向基因传递正是利用了细胞表面受体的差异性, 在类脂分子的疏水尾链部分连接了能与这种受体产生特异结合的配体。由这种类脂分子形成的阳离子脂质体/DNA 复合物会选择性地与受体过度表达的细胞结合, 使治疗基因在病变细胞附近富集, 提高基因的转染效率。

例如, 由于哺乳动物肝实质细胞存在一类能专

一识别以非还原半乳糖或 N-乙酰半乳糖为末端的糖蛋白或糖脂的受体<sup>[32]</sup>。有人曾经通过在 PEG 脂质体表面连接半乳糖的衍生物来实现肝癌细胞对常规药物的特异性识别,从而达到靶向性的目的,效果良好,能显著提高转染效率<sup>[33,34]</sup>。常用的靶向性配体有:单克隆抗体,转铁蛋白,叶酸,维生素 D,半乳糖等。

### 3.2 脂质体/DNA 复合物的正负电荷比例

研究显示阳离子脂质体与质粒的不同比例(即电荷比)对脂质体/DNA 复合物的尺寸和形态有影响,并进一步影响到基因的转染效率,当复合物中阳离子脂质体的正电荷与核酸的负电荷在 1:1 或以上时,核酸转运的效果最佳<sup>[35]</sup>。对于这一比例的确定存在着不同看法,但普遍认为应大于 1。脂质体/DNA 复合物带有过量正电荷对转染很关键。由于细胞膜和血清蛋白都带负电荷,可使 DNA 从复合物中分出而降解,而过量的正电荷可以减小或消除这些影响。不过也有人发现,极少数情况下,正负电荷比例小于 1,复合物带负电荷并不影响效率,可能是因为只有部分 DNA 与脂质体形成复合体,或者细胞表面有 DNA 的特异受体。

### 3.3 基因结构

通常 DNA 比 RNA 较易被引入细胞,因为 RNA 易降解且不像 DNA 那样最终整合到染色体上。此外,也有人发现,异源基因内区位置及启动子等因素可影响表达层次。

### 3.4 制备方法

传统的脂质体制备方法有薄膜法、反相蒸发法、钙融合法、去污剂法及挤出器法等,它们都是先用有机溶剂或表面活性剂溶解磷脂,得到粗制的磷脂双层膜,然后对膜进行水化处理,再通过适当方法得到不同大小的脂质体。但由于工艺本身的缺陷,有机溶剂或表面活性剂的残留都会导致 DNA 的生物活性降低,而且很难实现大批量脂质体的制备。新的方法有加热法、超声波法、CO<sub>2</sub> 超临界法等,对于不同的脂质体,不同的制备方法可以得到不同的包封率,进而影响 DNA 的转染率。所以,应根据具体情况选择合适的制备方法或者在现有的方法基础上进行改进。

Templeton 认为用 0.1 μm 的滤器挤压脂质体,可造成内陷结构,使之具有大的表面积。温和的超声波处理比高频的超声波处理效果好。Smith 认为 DNA 可引起脂质体融合,故 DNA 加入脂质体以及将形成的复合物注入组织的时间间隔也会影响效果。

Gao 和 Huang 发现转染效率与加入辅助分子与阳离子脂质体的顺序也有关。若阳离子脂质体已与 DNA 形成复合物再加入辅助分子则无效果,应先把 DNA 与辅助分子混合再加阳离子脂质体。

另外,细胞或组织类型不同,转染效果也会有差异。如转化脂可转染 DNA 进入多种组织细胞,但对小鼠胎儿脑细胞的转染能力则很低。脂质体/DNA 复合物的稳定性好,基因进入细胞质或细胞核的效率高,则阳离子脂质体的转染效率可能高。血清或转染抑制剂的存在,可降低阳离子脂质体的转染活性,甚至抑制转染。

## 4 前景展望

理想的基因载体应该在有效性和安全性上都能满足基因治疗的要求。阳离子脂质体用于基因治疗时,相对于其它的非病毒载体,在转染效率上有明显的优势,而与病毒载体比较时,其安全性又是一大优点。为了提高阳离子脂质体的转染效率,可以在合成和应用两个阶段入手。在合成方面,目前人们的研究大多集中在了针对不同的靶细胞寻找高选择性的靶向性配体方面<sup>[36]</sup>;也有人另辟蹊径,在脂质体结构中引入含有多个氨基或者亚氨基的基团(如含有咪唑基的组氨酸)<sup>[37,38]</sup>,利用其质子海绵效应使阳离子脂质体/DNA 复合物更容易从核内体中脱离出来,在提高转染效率方面颇有成效。在应用方面,将阳离子脂质体和病毒载体混合使用,使非病毒载体的安全性和病毒载体的高效性相结合,也取得了一定进展<sup>[39]</sup>。随着生物化学和分子生物学的不断发展,阳离子脂质体转染基因机制的研究将不断深入,我们可以根据不同的治疗要求在已有的阳离子脂质体中进行选择或者设计合成新的阳离子脂质体,以达到最好的治疗效果。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhang XQ (张新庆). The concept, character, and implication of gene therapy. *Nature Magazine*, 2003, **25**(3):153-156.
- [2] Rudolph KL, Chang S, Millard M, et al. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science*, 2000, **287**:1253-1258.
- [3] Cavazzana Calvo M, Hacein Bey S, De Saint BG, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 2000, **288**(5466):669-672.
- [4] Hood JD, Bednarski M, Frausto R, et al. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science*, 2002, **296**:2404-2407.

- [ 5 ] Barenholz Y. Liposome application :problems and prospects. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2001 **6** :56 – 77.
- [ 6 ] Miller AD. Cationic liposomes for gene therapy. *Angew Chem Int Ed Engl* 1998 **37** :1768 – 1785.
- [ 7 ] Guo X ,Huang L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1991 , **179** :280 – 285.
- [ 8 ] Zabner J ,Fasbender AJ ,Moninger T ,et al. Cellular and molecular barrier to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 1995 **270** ( 32 ) :18997 – 19007.
- [ 9 ] Zelphati O ,Francis C Szoka. Liposome as a carrier for intracellular delivery of antisense oligonucleotides :a real or magic bullet ? *J Control Rel* 1996 **41** :99 – 119.
- [ 10 ] Tomlinson E ,Rolland AP. Controllable gene therapy :Pharmaceutics of non-viral gene therapy :Pharmaceutics of non-viral gene delivery systems. *J Cont rolled Release* 1996 **39** ( 3 ) :357 – 361.
- [ 11 ] Gerschon H ,Ghirlando R ,Guttman SB ,et al. Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry* 1993 **32** ( 28 ) :7143 – 7151.
- [ 12 ] Felgner PL ,Gadek TR ,Holm M ,et al. Lipofectin :A highly efficient ,lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci* 1987 **84** ( 21 ) :7413 – 7417.
- [ 13 ] Van der Woude I ,Visser HW ,ter Beest MB ,et al. Parameters influencing the introduction of plasmid DNA into cells by the use of synthetic amphiphiles as a carrier system. *Biochem Biophys Acta* , 1995 **1240** ( 1 ) :34 – 40.
- [ 14 ] Pouton CW ,Seymour LW. Key issues in non-vired gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1998 **34** ( 1 ) :3 – 19.
- [ 15 ] Gorlich D ,Mattuj IW. Nucleocytoplasmic transport. *Science* 1996 , **271** ( 5255 ) :513 – 518.
- [ 16 ] Balasubramaniam RP ,Bennett MJ ,Aberle AM ,et al. Structural and functional analysis of cationic transfection lipids :the hydrophobi-domain. *Gene Ther* 1996 **3** :163 – 172.
- [ 17 ] Song YK ,Liu F ,Chu S ,et al. Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer *in vivo* by intravenous administration. *Hum Gene Ther* 1997 **8** :1585 – 1594.
- [ 18 ] Ren T ,Liu DX. Synthesis of diether-linked cationic lipids for gene elivery ,Bio-org. *Med Chem Lett* 1999 **9** :1247 – 1250.
- [ 19 ] Ren T ,Liu DX. Synthesis of cationic lipids from 1,2,4-butanetriol. *Tetrahedron Lett* 1999 **40** :209 – 212.
- [ 20 ] Shin J ,Qualls MM ,Boomer JA ,et al. An efficient new route to plasmenyl-type lipids : synthesis and cytotoxicity of a plasmenylcholine analogue of the antitumor ether lipid ET-18-OMe. *J Am Chem Soc* 2001 **123** ( 3 ) :508 – 509.
- [ 21 ] Mueller R ,Yang J ,Duan C ,et al. Long hydrocarbon chain ether diols and ether diacids that favorably alter lipid disorders *in vivo* . *J Med Chem* 2004 **47** ( 21 ) :5183 – 5197.
- [ 22 ] Wang J ,Guo X ,Xu Y ,et al. Synthesis and characterization of long chain alkyl acyl carnitine esters potentially biodegradable cationic lipids for use in gene delivery. *J Med Chem* 1998 **41** ( 13 ) :2207 – 2215.
- [ 23 ] Ren T ,Zhang GS ,Liu DX. Synthesis of bifunctional cationic compound for gene delivery. *Tetrahedron Lett* 2001 **42** :1007 – 1010.
- [ 24 ] Gebeyehu G ,Jessee Joel A. Reagents for intracellular delivery of macromolecules ,US Patent 6075012 2000.
- [ 25 ] Aissaoui A ,Oudrhiri N ,Petit L ,et al. Progress in gene delivery by cationic lipids : guanidinium-cholesterol-based systems as an example. *Current Drug Targets* 2002 **3** :1 – 16.
- [ 26 ] Hirko A ,Tang FX ,Hughes JA. Cationic lipid vectors for plasmid DNA delivery. *Current Medicinal Chemistry* 2003 **10** :1185 – 1193.
- [ 27 ] Boomer JA ,Thompson DH. Synthesis of acid-labile diplasmenyl lipids for drug and gene delivery applications. *Chem Phys Lipids* , 1999 **99** :145 – 153.
- [ 28 ] Kokotos G ,Verger R ,Chiou A. Synthesis of 2-Oxo amide triacylglycerol analogues and study of their inhibition effect on pancreatic and gastric lipases. *Chem Eur J* 2000 **6** :4211 – 4217.
- [ 29 ] Lee ER ,Marshall J ,Siegel CS ,et al. Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. *Hum Gene Ther* 1996 **7** ( 14 ) :1701 – 1717.
- [ 30 ] Kai K ,Ewert Heather M ,Evans Nathan F ,Bouxsein ,et al. Dendritic cationic lipids with highly charged headgroups for efficient gene delivery. *Bioconjugate Chem* 2006 **17** :877 – 888.
- [ 31 ] Tang F ,Hughes JA. Use of dithiodiglycolic acid as a tether for cationic lipids decreases the cytotoxicity and increases transgene expression of plasmid DNA *in vitro* . *Bioconjugate Chem* 1999 **10** ( 5 ) :791 – 796.
- [ 32 ] Wen SM ( 温守明 ). Development of hepatocyte galactose ( H-Gal ) receptor targeting druggery. *Progress in Pharmaceutical Sciences ( 药 学进展 )* 1992 **16** ( 1 ) :1 – 6.
- [ 33 ] Managit C ,Kawakami S ,Nishikawa M ,et al. Targeted and sustained drug delivery using PEGylated galactosylated liposomes. *Int J Pharm* 2003 **266** ( 1 – 2 ) :77 – 84.
- [ 34 ] Xue KC ( 薛克昌 ) ,Zhang SQ ( 张三奇 ) ,Gu Y ( 顾宜 ) ,et al. Characteristics of liver targeting lamivudyl palmitate solid lipid nanoparticles. *Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army* 2004 **20** ( 1 ) :1 – 4.
- [ 35 ] Dodds E ,Dunckley MG ,Naujoks K ,et al. Lipofection of cultured mouse muscle cells :a direct comparison of lipofectamine and DOSPER. *Gene Ther* 1998 **5** ( 4 ) :542 – 551.
- [ 36 ] Crispin R ,Dass Peter FM ,Choong. Selective gene delivery for cancer therapy using cationic liposomes :*In vivo* proof of applicability. *Journal of Controlled Release* 2006 **113** :155 – 163.
- [ 37 ] Takahashi T ,Harada A ,Emi N ,et al. Preparation of efficient gene carriers using a polyamidoamine dendron-bearing lipid :improvement of serum resistance. *Bioconjugate Chem* 2005 **16** :1160 – 1165.
- [ 38 ] Kosuke Shigeta ,Shigeru Kawakami ,Yuriko Higuchi ,et al. Novel histidine-conjugated galactosylated cationic liposomes for efficient hepatocyte-selective gene transfer in human hepatoma HepG2 cells. *Journal of Controlled Release* 2007 **118** :262 – 270.
- [ 39 ] Jason C Steel ,Heather MA Cavanagh ,Mark A Burton ,et al. Modification of liposomal concentration in liposome/adenoviral complexes allows significant protection of adenoviral vectors from neutralising antibody ,*in vitro* . *Journal of Virological Methods* , 2005 **126** :31 – 36.