文章编号：1004-0374(2011)05-0497-06

阳离子脂质体运载基因的跨膜机制

丁会芹[1,2]，崔韶辉[2]，王　冰[2]，洪　洋[1]，张树彪[2*]
(1 中国医科大学基础医学院，沈阳 110001；2 大连民族学院生命科学学院，国家民委-教育部重点实验室，大连 116600)

摘　要：阳离子脂质体等非病毒载体以其制备简单、低毒性、低免疫原性、可生物降解等优点，成为近年来基因转运中的常用载体。理解阳离子脂质体运载基因的机制对阳离子脂质体的研究具有重要意义。从跨膜机制和信号调控的角度，介绍了脂质体 /DNA 复合体以特定构象避免细胞外基质中核酸酶的降解，跨越细胞膜进入细胞的过程；阐明了 DNA 在信号调控的作用下，逃离溶酶体并安全释放的机制；讨论了基因穿过核被膜进入到细胞核的方式，为进一步阐明阳离子脂质体运载基因的分子机制奠定基础。

关键词：基因转染；阳离子脂质体；相结构；内吞作用；信号调控
中图分类号：Q78　　**文献标志码**：A

Transmembrane mechanism of cationic liposome-mediated gene delivery

DING Hui-Qin[1,2], CUI Shao-Hui[2], WANG Bing[2], HONG Yang[1], ZHANG Shu-Biao[2*]
(1 College of Basic Medical Science, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2 Key Laboratory of State Ethnic Affairs Commission - Ministry of Education, College of Life Sciences, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

Abstract: Nonviral vectors such as cationic lipids become general vehicles for gene transfer, because of their favorable properties, including easy preparation, lack of immunogenicity, low toxicity, simple biodegradation, etc. It is of great significance to understand the mechanism of cationic liposome-mediated gene delivery. This article introduced the internalization process of the lipid/DNA complex from the aspects of transmembrane mechanism and signal regulation. The way that DNA avoid being degraded by the nucleases, which present in the extracellular matrix, and successfully escape from the lysosome in the cytoplasm, and finally, across the nuclear envelope was also reviewed here. It is conducive to clarify the molecular mechanism of cationic liposome-mediated gene transfer systematically.

Key words: gene transfection; cationic liposome; phase structure; endocytosis; signal control

近年来，基因转染技术在临床应用和生物学研究领域都已经取得了很大的发展，临床应用主要侧重于向病变的靶细胞中引进目的基因，达到治疗疾病的目的。而生物学研究则在于检测表达蛋白的生物学特性。DNA 分子本身不能很好地完成内在化过程。因此，这项技术的关键在于基因如何有效地进入细胞。目前已经研发出了很多载体系统，包括病毒载体和非病毒载体。尽管非病毒载体介导的转染效率与病毒载体系统相比仍然不够理想，但是病毒载体的安全性问题，如诱导免疫反应和感染等限制了它的推广应用[1]。

阳离子脂质体是最主要的非病毒载体之一，它具有可自然降解、免疫原性低、可重复转染、易于制备等优点。然而，由于细胞内外所存在的某些独特的生物学障碍，例如血清中 DNA 核酸酶的降解

收稿日期：2011-01-03；修回日期：2011-02-25
基金项目：国家自然科学基金项目(2087602, 21046008)；教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-08-0654)；中央高校基本科研业务费专项资金项目(DC10020103)
*通信作者：E-mail: zsb@dlnu.edu.cn; Tel/Fax: 86-0411-87656141

和吞噬细胞对部分 DNA 的清除等 [2]，如果不了解其作用机制，就很难获得思路上的突破，更不能保证体内试验的成功和临床应用 [3]。据此，本文阐述了脂质体与质粒 DNA 的结合、脂质体 /DNA 复合体穿越细胞膜的具体机制、信号调控在 DNA 释放过程中的作用以及目的基因最终进入细胞核的方式，为更好地了解和克服转运过程的生物学障碍提供参考。

1 复合体的形成及构象变化——跨膜前的准备

阳离子脂质体具有两亲性结构，在水溶液中散开时，会自发地形成双分子层，也就是膜的核心结构。根据阳离子脂质体成分以及环境因素，例如含盐量、温度等影响，它由层状转变成非层状结构。这种转变有利于脂质体和蛋白质之间动态的相互作用，能够促进膜融合以及膜稳定性的改变，因此有利于跨膜过程的发生。阳离子脂质体带正电荷，能够随时与负电性的大分子核酸成分发生相互作用。因此，当它们与质粒 DNA 混合时，脂质体 /DNA 复合体——lipoplexes 就会瞬间形成 [4]。

最初，Felgner 和 Ringold 认为阳离子脂质体通过静电作用与 DNA 结合，并且这种作用不会改变复合体的大小和形状。实际上 lipoplexes 的形状和大小与阳离子脂质体和 DNA 的摩尔比有关，且存在动态变化。当正负电荷比例接近于 1 时，结构上会发生明显变化 [5]。Gershon 等在实验的基础上提出阳离子脂质体可能有效地中和带负电荷的 DNA，从而导致 DNA 结构上的相应“塌陷”，“塌陷”的 DNA 由于裸露的表面积变小，所以能被脂质体有效地包住。Radler 等通过研究阳离子脂质体 DOPE/DOTAP(1:1) 与质粒 DNA 的 X- 衍射，证实了这种包裹 DNA 的方式 [5]。而 Behr 指出，DNA 也可以吸附在阳离子脂质体的表面，并得到了 Easman 等的证实。因此，阳离子脂质体与 DNA 的相互作用事实上包括完全包裹以及表面结合两种方式。

lipoplexes 的电荷、尺寸和形态结构对转染效率具有重要影响 [6]。具有稍微过剩正电荷的 lipoplexes 具有更高的转染效率 [7-8]。直径尺寸适中 (0.4~1.4 μm) 的 lipoplexes 比相对较小 (＜ 0.4 μm) 和更大 (＞ 1.4 μm) 的转染效率更高 [9-10]。而 lipoplexes 的形态是由阳离子脂质体组分的性质决定的。首先，阳离子脂质单体的结构，如包裹参数可以影响所形成脂质体的形态。根据包裹参数的不同，复合体可呈锥形、非反转六角形相位 (H phase)、反转六角形相位 (H_{II} phase) 等不同构型 [9]。几个关于复合体的结构特性和相应转染效率的研究显示，使用不同的阳离子脂质体进行试验，最终 H_{II} 结构的复合体大大促进了 DNA 的释放，并且具有较高的转染效率 [10-11]。其次，中性脂类 (例如 DOPE) 可以作为修饰成分，降低脂质体表面的水合态，促进复合体由层状结构向非层状结构转变 [9]，而非层状结构恰好利于转染。另外，聚乙二醇等修饰成分可屏蔽阳离子脂质体表面多余的正电荷，这一方面可以抑制 lipoplexes 的聚集；另一方面还可以阻止复合体与带负电的血清蛋白相互作用 [12]，保护复合体免受巨噬细胞清除。修饰成分影响了 DNA 与复合体的结合，但是在相关生理条件下也可以通过促进 H_{II} 相的形成，更改复合体的形态结构。复合体形成以后，其特定的结构以及表面分子就会与细胞表面相互作用，为跨膜提供条件，诱发内在化过程。

2 lipoplexes穿越细胞膜进入细胞

一般来说，lipoplexes 通过表面正电荷与细胞表面带负电荷的蛋白多糖之间的静电作用，非特异性地吸附于细胞膜表面 [13]，而含有靶向配体的 lipoplexes 通过配体 — 受体相互作用，特异结合于某类细胞表面 [14]。

通常，微粒体进入细胞的途径主要有两种：内吞作用和膜融合。Resina 等 [4] 用具有不同净电荷的 lipoplexes 研究了不同摄取路径的作用。内吞作用是复合体进入细胞的主要方式，主要转运平均直径小于 500 nm 的粒子 [15-16]。温度依赖性 [17](温度低于 15 ℃时内吞作用能够被有效地抑制)、内吞抑制剂的应用 [18-19](尽管其具有一定的毒副作用)，以及更可靠的内吞区域特异性标记物的共定位实验 [20] 等也证明了这一点。真核细胞中存在着多种内吞途径，而在不同细胞的转染中普遍发现了网格蛋白依赖性以及小窝蛋白介导的内吞途径。

2.1 网格蛋白介导的内吞作用

复合体跨越细胞膜的过程并不像人们通常观察到的单分子配体的瞬间内吞作用一样，而是还需要有其他过程的参与 (图 1)，例如驱动受体在复合体及其表面聚集体的影响下发生聚集，进入特殊的网格蛋白区域或者小窝中，继而偶联其他多肽发生质膜凹陷，形成有被小泡外衣，最终在 G 蛋白的作用下脱离细胞膜，或者在膜褶皱区域直接通过吞噬颗粒而完成内吞作用 [21]。而相对大尺寸复合体

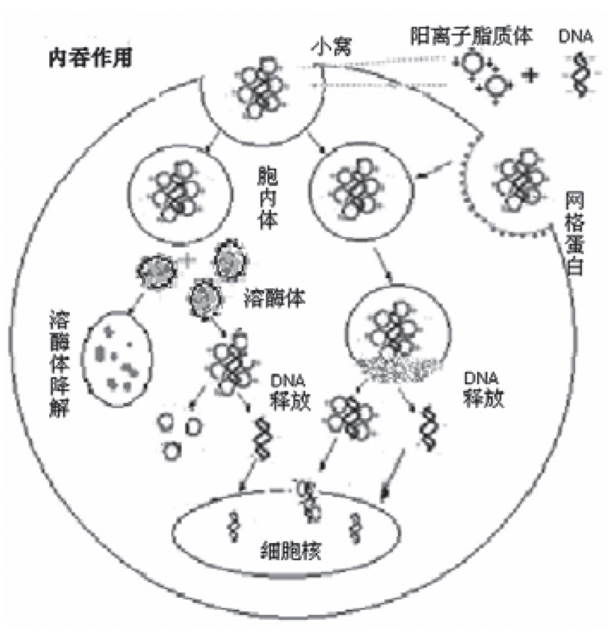

图1 lipoplexes通过内吞作用进入细胞的过程

(700~800 nm) 的内在化更需要考虑这些过程，甚至可能涉及对现有机制的适当调整和扩展，例如几个微小区域的合并等。Zuhorn 等 [22] 在对动物细胞的转染实验中证明了这一点。从这个角度讲，很明显网格蛋白介导的路径更适合 150~200 nm 的复合体或者小尺寸的聚合物 [23]，考虑到常规的网格蛋白尺寸 (通常 100 nm) 的限制，可能也需要网格蛋白支架具有更大的刚性。

2.2　小窝蛋白介导的内吞作用

内吞作用的另一种方式是由小窝蛋白介导完成的，van der Aa 等 [24] 用抑制剂的方法证明了小窝蛋白在 lipoplexes 运载基因传递中的作用。形态研究显示，小窝中富含 GPI- 锚定蛋白和小窝蛋白，并且某些与 G 蛋白偶联的受体，如 M 乙酰胆碱受体、胰岛素受体、IP3 受体以及腺苷酸环化酶等都存在于小窝区域 [25]。经小窝蛋白的跨膜传递是一个触发过程，在这个过程中，阳离子 lipoplexes 能够与脂筏组件相互作用 [26]，即在脂膜上横向移动，通过膜上的 GPI- 锚定蛋白进入微区，由于 GPI- 锚定蛋白的 2 条脂酰链插入到膜脂双层的外层中，小窝蛋白既能识别相应的 GPI- 锚定蛋白并与之相互作用，同时又能与 G 蛋白受体酪氨酸激酶相互作用，最终诱发内吞作用的顺利进行。尽管小窝蛋白通常在细胞表面以直径 50~100 nm 穴样内陷的形式出现，平坦的小窝区域仍可优先作为有效区域完成这种内在化过程 [27]。最近提出的在脂膜侧位上存在的横向扩散和特异硫酸肝素糖蛋白 (HSPG) 的聚集 [28]，即为这种机制的一种展示。较大的复合体穿越细胞膜的过程可以通过几个这种区域的聚集完成，这同目前细菌和病毒进入细胞时所显示的路径是不一样的 [29]。

2.3　膜融合作用

膜融合作用是真核细胞跨膜运输过程中的另一个重要方式 (图 2)。内吞途径是一个能量依赖过程，需要消耗能量，而 4℃是一个低能量的条件，此时细胞处于“休眠”状态，因此，通过内吞途径进入细胞的方式会受到显著抑制，但对融合途径影响甚微 [30-31]。Resina 等 [4] 用包含 5'- 异硫氰酸荧光素标记 ON_{705} 的 lipoplexes 处理 Hela pLuc/705 细胞，并培养于 4℃下，3~6 h 后荧光显微镜下仍然能检测到荧光的存在，证明了膜融合在 lipoplexes 内在化过程中的作用。正常情况下，细胞膜不能自发地融合，而是受某种因素如 Ca^{2+}、渗透压、聚乙二醇等的控制，或者有某种膜融合蛋白参与催化。现在已鉴定出多种膜融合所需要的胞质蛋白，但其作用机制尚不清晰。Hu 等 [32] 研究表明，有两种膜融合蛋白参与介导的融合过程较清楚：一种是 N- 乙基顺丁烯二酰亚胺 - 敏感融合蛋白 (NSF)，为一种 ATP 酶；另一种是可溶性 NSF 连接蛋白 SNAPs，在囊泡停泊位点，SNAPs 识别并结合囊泡膜上的受体 v-SNARE 和靶膜上的受体 t-SNARE，启动融合复合物的组装，膜融合复合物催化囊泡与靶膜的融合，但这是否同样适用于阳离子脂质体介导的基因转运过程还需要进一步验证。

为了进一步弄清内在化机制，仍需要考虑阳离子脂质体自身的电荷能够导致内陷的程度，例如，对脂膜的曲率（一个明显能够促进内在化作用的参数）以及其中胆固醇含量的调节，使其具有不同的稳定性 [33]。另外在某种程度上，细胞本身的特异性也会影响复合体在细胞表面的内在化效率。在内在化过程的最初阶段，与复合体优化的目标属性和

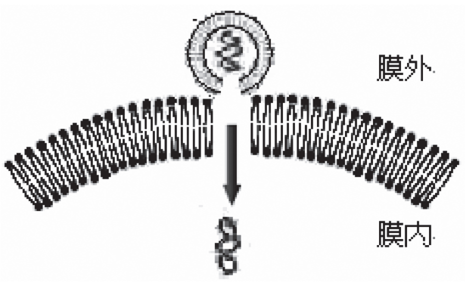

图2 膜融合示意图

(或) 给定细胞类型的细胞属性具有明显的相关性。事实上，研究者已经初步确定了基因转染在细胞类型方面的特异性，这包括细胞周期和细胞分裂次数，也有人认为还应该包括内吞作用的能力[34]。然而，无论通过哪种通道完成内在化过程，复合体进入细胞后都面临着 DNA 释放以及避免被溶酶体降解的难题，这可能需要某些信号的调节作用。

3 DNA释放过程中的信号调控

外界物质经内吞作用进入细胞后，形成内涵体，然后与溶酶体融合，经初级溶酶体、次级溶酶体、残余小体，最终被分解并排出体外[35]。lipoplexes 进入细胞内后，面临着同样的命运。要使转染顺利进行，DNA 必须在内吞作用发生后的早期被释放，并逃离溶酶体，否则 DNA 将被溶酶体降解。利用一些辅助成分诸如多聚物、多肽等，通过去垢剂类似作用机制或渗透作用使溶酶体破裂，可显著提高脂质体转染效率[36]。这说明逃离溶酶体是脂质体转染中的关键步骤。

lipoplexes 的结构形式在 DNA 逃离溶酶体的过程中起重要作用。Koltover 等[37] 利用聚阴离子囊泡模拟溶酶体膜系统，在体外与 lipoplexes 相互作用。最终发现层状结构的 lipoplexes 与聚阴离子囊泡可稳定共存；而反六角相结构 (H_{II}) 的 lipoplexes 与聚阴离子囊泡接触后立即发生膜融合，并且在聚阴离子囊泡内部可观察到游离 DNA[36]。由此推断：反六角相结构是将 DNA 从 lipoplexes 中释放并逃离溶酶体的最有效的结构形式。这种结构利于复合体中脂质成分与溶酶体膜整合，从而使溶酶体膜去稳定，在溶酶体表面形成临时孔洞，为 DNA 逃离溶酶体创造条件，而且溶酶体膜上的磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰丝氨酸 (PS) 等都带有阴性基团，可通过静电吸附作用与阳离子脂质体相互吸引，这就削弱了阳离子脂质与 DNA 的结合，使 DNA 能够从复合体中释放出来。这在一个更直接的实验中同样得到证明，当培养于含有 PS 的囊泡中时，只有复合体呈现 H_{II} 结构时，质粒 DNA 才会从 lipoplexes 中释放，而层状结构明显不利于 DNA 的释放[36]。

复合体的组分以及细胞内的某些蛋白酶能够作为信号分子调节 DNA 的释放过程。Oishi 等[38] 设计了一个共轭肽聚合物 (CPCCtat)，作为一种新的基因载体，它能够通过影响细胞内凋亡蛋白酶 -3(caspase-3) 信号而控制基因表达。这种载体由一个不带电的聚合物主链和一个阳离子肽侧链构成，其中包括 caspase-3 的板基序列和 HIV-1 Tat 的蛋白转导域序列。CPCCtat 与 DNA 通过静电作用形成了一个紧密的复杂结构，并且在这种状态下，基因表达被完全抑制。相反，当有 caspase-3 存在的时候，复合物由于阳离子部分的分解而从 CPCCtat 中降解，这导致了基因表达的激活。然而，在脂质体介导的转运过程中，相应蛋白酶是否也具有同样调节机制还有待进一步证明。

两种新型信号调控系统，即环磷酸腺苷 (cAMP) 依赖蛋白激酶 (PKA)[39] 和 caspase-3[40] 信号反应系统。这些系统使用新合成的阳离子聚合物 PAK 和 PAC。PAK 包含 PKA 中所含的肽基 ARRASLG 作为 PKA 信号的受体，而 PAC 中包含 caspase-3 的基板序列 DEVD。PAK 或者 PAC 与 DNA 形成稳定的聚合体，从而完全抑制该基因的表达。然而，当把活性 PKA 加入到混合物中时，原始 DNA 条带就会完全恢复。在 PAC-DNA 混合物中，活性 caspase-3 的增加也表现出恢复原始 DNA 条带的性质。这些结果清楚地表明，PKA 信号和 caspase-3 信号可以逐个调节脂质体 /DNA 复合体以释放 DNA。

DNA 从 lipoplexes 中释放并逃离溶酶体宣告了脂质体转染过程的结束。此后，DNA 必须依靠自身的力量进入细胞核并表达。

4 DNA穿越核膜进入细胞核

核膜是有效转染的至关重要的障碍，它含有受高度控制的运输结构——核孔复合体。因为核孔的有效直径比较狭窄，只有 80~120 nm。因此，质粒 DNA 向细胞核中的移动受到很大限制[41]。对于阳离子脂质体结构的研究证明，DNA 移动到细胞核的效率可以通过阳离子脂质体结合核蛋白来增强[41]。核蛋白具有独特的性质，它们具有细胞核定位信号，研究证明附着在核酸上的核定位信号能够提高转染效率[17,20]。

DNA 进入细胞核的一个主要机制是依赖于有丝分裂被动入核，在细胞分裂过程中，当核膜消失时，DNA 借机被动进入细胞核。这种机制依赖于 DNA 本身的序列，可以由有丝分裂时细胞核更容易摄取外源 DNA 而证明[42]。另一种机制是主动运输 DNA 穿过核孔，这需要加入携带有核定位信号的修饰成分协助完成。在非有丝分裂的细胞中，DNA 主要通过第二种途径进入细胞核。对神经元细胞的有效转染证明了这种途径的可行性。然而，尺寸比核孔大的质粒 DNA 是如何穿过核孔的还不

清楚[42]。进入细胞核的DNA随着细胞自身染色体的复制而复制，最终完成转录翻译过程，调控目的蛋白的表达。

5 展望

过去的10年中，在阐述脂质体介导基因转染的细胞路径和机制方面取得了重大进展，但是涉及整体转染过程的详细机制迄今还没有系统报道，其中一些步骤的分子机制仍需要进一步阐明。例如，仍然不清楚复合体与质膜结合的启动因子是什么，复合体中存在的导致包被小窝内陷的信号分子是什么，以及在内涵体逃逸这一步中，信号调控DNA释放的具体机制和之后内涵体的去向等。尽管有人提出最终脂质体会被分解，但是能够支持这种假设的证据非常有限。复合体跨越细胞膜的调节机制是一个重要的限速步骤，如果能从信号调控的角度，详细阐明其中涉及的信号分子以及具体作用机制，将有利于更深入地了解基因转染。由此很可能会发现新的内吞机制。另外，核传递作为基因转染的重要阶段，其中涉及的核定位信号尚不明确，这些都将是以后的研究重点。

[参 考 文 献]

[1] Silberner J. A gene therapy death. Hastings Cent Rep, 2000, 30(2): 6
[2] Madeira C, Loura LM, Prieto M, et al. Effect of ionic strength and presence of serum on lipoplexes structure monitorized by FRET. BMC Biotechnol, 2008, 8: 20
[3] Hoag H. Gene therapy rising. Nature, 2005, 435(7041): 530-1
[4] Resina S, Prevot P, Thierry AR. Physico-chemical characteristics of lipoplexes influence cell uptake mechanisms and transfection efficacy. PLoS One, 2009, 4(6): e6058
[5] Yang Y, Zhang Z, Chen L, et al. Effect of multifold charge groups and imidazole-4-carboxaldehyde on physicochemical characteristics and transfection of cationic polyphosphazenes/DNA complexes. Int J Pharm, 2010, 390(2): 191-7
[6] Pelisek J, Gaedtke L, DeRouchey J, et al. Optimized lipopolyplex formulations for gene transfer to human colon carcinoma cells under *in vitro* conditions. J Gene Med, 2006, 8(2): 186-97
[7] Farago O, Gronbech-Jensen N. Simulation of self-assembly of cationic lipids and DNA into structured complexes. J Am Chem Soc, 2009, 131(8): 2875-81
[8] Ciani L, Ristori S, Salvati A, et al. DOTAP/DOPE and DC-Chol/DOPE lipoplexes for gene delivery: zeta potential measurements and electron spin resonance spectra. Biochim Biophys Acta, 2004, 1664(1): 70-9
[9] van der Aa MA, Koning GA, d'Oliveira C, et al. An NLS peptide covalently linked to linear DNA does not enhance transfection efficiency of cationic polymer based gene delivery systems. J Gene Med, 2005, 7(2): 208-17
[10] Esposito C, Generosi J, Mossa G, et al. The analysis of serum effects on structure, size and toxicity of DDAB-DOPE and DC-Chol-DOPE lipoplexes contributes to explain their different transfection efficiency. Colloids Surf B Biointerfaces, 2006, 53(2): 187-92
[11] Lu Y, Hu SX, Li M. Structure and phase transformation of oligodeoxynucleotide/lipid lipoplexes on solid supports. Langmuir, 2010, 26(5): 3539-43
[12] Ramezani M, Khoshhamdam M, Dehshahri A, et al. The influence of size, lipid composition and bilayer fluidity of cationic liposomes on the transfection efficiency of nanolipoplexes. Colloids Surf B: Biointerfaces, 2009, 72(1): 1-5
[13] Wasungu L, Hoekstra D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. J Control Release, 2006, 116(2): 255-64
[14] Ruponen M, Honkakoski P, Ronkko S, et al. Extracellular and intracellular barriers in non-viral gene delivery. J Control Release, 2003, 93(2): 213-7
[15] Hufnagel H, Hakim P, Lima A, et al. Fluid phase endocytosis contributes to transfection of DNA by PEI-25. Mol Ther, 2009, 17(8): 1411-7
[16] Duan Y, Zhang S, Wang B, et al. The biological routes of gene delivery mediated by lipid-based non-viral vectors. Expert Opin Drug Deliv, 2009, 6(12): 1351-61
[17] Medina-Kauwe LK, Xie J, Hamm-Alvarez S. Intracellular trafficking of nonviral vectors. Gene Ther, 2005, 12(24): 1734-51
[18] Elouahabi A, Ruysschaert JM. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. Mol Ther, 2005, 11(3): 336-47
[19] Rejman J. Kozubek A. The effect of alkylresorcinol on lipid metabolism in *Azotobacter chroococcum*. Z Naturforsch C: Biosci, 2004, 59(5-6): 393-8
[20] Khalil IA, Kogure K, Akita H, et al. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. Pharmacol Rev, 2006, 58(1): 32-45
[21] Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, et al. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. Biochem J, 2004, 377(Pt 1): 159-69
[22] Zuhorn IS, Kalicharan R, Hoekstra D. Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. J Biol Chem, 2002, 277(20): 18021-8
[23] Grosse S, Aron Y, Thevenot G, et al. Potocytosis and cellular exit of complexes as cellular pathways for gene delivery by polycations. J Gene Med, 2005, 7(10): 1275-86
[24] van der Aa MA, Huth US, Häfele SY, et al. Cellular uptake of cationic polymer-DNA complexes via caveolae plays a pivotal role in gene transfection in COS-7 cells. Pharm Res, 2007, 24(8): 1590-8
[25] Bieber T, Meissner W, Kostin S, et al. Intracellular route

and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. J Control Release, 2002, 82(2-3): 441-54
[26] Empig CJ, Goldsmith MA. Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses. J Virol, 2002, 76(10): 5266-70
[27] Wong AW, Scales SJ, Reilly DE. DNA internalized via caveolae requires microtubule-dependent, Rab7-independent transport to the late endocytic pathway for delivery to the nucleus. J Biol Chem, 2007, 282(31): 22953-63
[28] Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. Nat Cell Biol, 2001, 3(5): 473-83
[29] Lu J, Tang Y, Zhou M, et al. Gene modification in the genome of Epstein-Barr virus cloned as a bacterial artificial chromosome. Acta Microbiol Sin, 2008, 48(3): 385-90
[30] Fattal E, Barratt G. Nanotechnologies and controlled release systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA. Br J Pharmacol, 2009, 157(2): 179-94
[31] Minchin RF, Yang S. Endosomal disruptors in non-viral gene delivery. Expert Opin Drug Deliv, 2010, 7(3): 331-9
[32] Hu C, Hardee D, Minnear F. Membrane fusion by VAMP3 and plasma membrane t-SNAREs. Exp Cell Res, 2007, 313(15): 3198-209
[33] Kopatz I, Remy JS, Behr JP. A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. J Gene Med, 2004, 6(7): 769-76
[34] Zuhorn IS, Engberts JBFN, Hoekstra D. Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers. Eur Biophys J, 2007, 36: 349-62
[35] Howes MT, Mayor S, Parton RG. Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(4): 519-27
[36] Zuhorn IS, Bakowsky U, Polushkin E, et al. Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency. Mol Ther, 2005, 11(5): 801-10
[37] Koltover I, Salditt T, Radler JO, et al. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. Science, 1998, 281(5373): 78-81
[38] Oishi J, Kawamura K, Kang JH, et al. An intracellular kinase signal-responsive gene carrier for disordered cell-specific gene therapy. J Control Release, 2006, 110(2): 431-6
[39] Katayama Y, Fujii K, Ito E, et al. Intracellular signal-responsive artificial gene regulation for novel gene delivery. Biomacromolecules, 2002, 3(5): 905-9
[40] Kawamura K, Oishi J, Kang JH, et al. Intracellular signal-responsive gene carrier for cell-specific gene expression. Biomacromolecules, 2005, 6(2): 908-13
[41] Zupan K, Herenyi L, Toth K, et al. Binding of cationic porphyrin to isolated DNA and nucleoprotein complex: quantitative analysis of binding forms under various experimental conditions. Biochemistry, 2005, 44(45): 15000-6
[42] Araujo NM, Vianna CO, Moraes MT, et al. Expression of Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) from genotypes A, D and F and influence of amino acid variations related or not to genotypes on HBsAg detection. Braz J Infect Dis, 2009, 13(4): 266-71