

鱼精蛋白硫酸盐对DNA纳米结构入胞能力及胞内溶酶体逃逸的影响^{*}

葛奕辰, 崔伟同, 蔡潇潇[△]

口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院(成都 610041)

【摘要】目的 探究鱼精蛋白硫酸盐对四面体框架核酸入胞能力及胞内稳定性的影响。**方法** 取3日龄C57BL小鼠肢端软骨进行软骨细胞培养,并收集第1~2代细胞用于实验。利用4条DNA单链S1(标记Cy5荧光)、S2、S3、S4,经过退火程序合成四面体框架核酸并超滤提纯。用高通量毛细电泳验证四面体框架核酸合成并拍摄透射电镜图进行表征。向新合成四面体框架核酸中缓慢滴入1 mg/mL鱼精蛋白硫酸盐溶液(以原子数N/P=5/1混合),检测Zeta电位。将细胞分为3组:细胞中加入100 nmol/L经过鱼精蛋白硫酸盐孵育的四面体框架核酸作为实验组1;细胞中加入100 nmol/L未经孵育处理的四面体框架核酸为实验组2;对照组细胞不进行加药处理。在加药后6 h及12 h,用流式细胞术定量检测胞内Cy5荧光,并取部分12 h组细胞,进行免疫荧光染色,于激光共聚焦显微镜下定性观察分析胞内Cy5荧光。加药5.5 h及11.5 h后,加入溶酶体探针针对活细胞溶酶体进行染色,30 min后(6 h及12 h)观察Cy5荧光与溶酶体位置关系。**结果** 经过鱼精蛋白硫酸盐孵育处理后,溶液Zeta电位由负转正,即由(-1.567±0.163) mV转为(4.700±0.484) mV;在6 h及12 h两个时间点,流式细胞仪检测到实验组1胞内四面体框架核酸荧光强度均高于实验组2,差异有统计学意义($P<0.05$)。12 h的免疫荧光染色观察结果与流式细胞术检测结果一致。溶酶体染色结果显示,加药6 h及12 h后,实验组1的Cy5荧光与溶酶体位置重叠现象较实验组2更少;且12 h后,实验组1依然可见大量Cy5荧光,而实验组2的Cy5荧光较少较弱。**结论** 鱼精蛋白硫酸盐孵育处理可有效提升四面体框架核酸入胞能力,并在一定程度上实现四面体框架核酸胞内溶酶体的逃逸。

【关键词】 DNA纳米结构 四面体框架核酸 鱼精蛋白硫酸盐 入胞作用 溶酶体逃逸

Influence of the Protamine Sulfate on Endocytosis and Intracellular Lysosome Escape of DNA Nanostructure GE Yi-chen, CUI Wei-tong, CAI Xiao-xiao[△]. State Key Laboratory of Oral Diseases, National Clinical Research Center for Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: xcai@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the influence of the protamine sulfate on endocytosis and intracellular stability of tetrahedral framework nucleic acid (tFNA). **Methods** Articular cartilage cells were collected from 3-day-old C57BL mice. Cells at passage 1-2 were used in the experiments. 4 single-strand DNAs (S1 was marked by Cy5) were utilized to synthesize tFNAs via annealing process and ultrafiltration for purification. High-performance capillary electrophoresis (HPCE) was used to verify synthesis of tFNAs and transmission electron microscope was used to photo morphological characteristics. The 1 mg/mL protamine sulfate solution was slowly dropped into newly synthesized tFNAs (N/P=5/1). Then, Zeta potential was detected. Cells were treated with 100 nmol/L tFNAs with protamine sulfate in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Exp.1), 100 nmol/L tFNAs in DMEM (Exp.2), and DMEM (Control), respectively. Flow cytometry was used to quantitatively detect intracellular Cy5 fluorescence after 6 h and 12 h treatments. Immunofluorescence staining was used to qualitatively observe internalized Cy5 fluorescence after 12 h treatment by laser confocal microscope. Lysosome of living cells were stained with lysosome probe. Colocalization between lysosome and tFNAs was observed by laser confocal microscope. **Results** After incubating protamine sulfate, negative potential was transformed into positive one (-1.567±0.163) mV to (4.700±0.484) mV. The fluorescence intensity of tFNAs in the Exp.1 group was higher than that of the Exp.2 group in 6 h and 12 h ($P<0.05$). This was consistent with the results of immunofluorescence staining after 12 h. Colocalization of Cy5 fluorescence and lysosome in the Exp.1 group was more rare than that in the Exp.2 group at 6 h and 12 h. Furthermore, a large amount of Cy5 fluorescence was still seen in the Exp.1 group at 12 h, while Cy5 fluorescence of the Exp.2 group was less. **Conclusion** Protamine sulfate can effectively enhance endocytosis, and to some extent it can achieve lysosome escape of tFNAs.

【Key words】 DNA nanostructure Tetrahedral framework nucleic acid Protamine sulfate Endocytosis Lysosome escape

^{*} 国家重点研发计划(No. 2019YFA0110600)和国家自然科学基金(No. 81970986)资助

[△] 通信作者, E-mail: xcai@scu.edu.cn

近年来,以脱氧核糖核酸(DNA)为基础材料,在一定条件下,利用碱基互补配对原则自组装所构建的具有特定空间形态的纳米级材料——DNA纳米结构(DNA nanostructure)在化学、材料学、生物医学等相关学科备受关注^[1-3]。这些自组装的DNA纳米材料易被编辑,具有特殊功能化的位点或其本身就具有某些生物学功能^[4-6],因而在药物或基因运载、生物传感、生物成像、疾病诊断与治疗等领域具有十分广阔的应用前景^[7-8]。以广泛研究的DNA纳米材料——四面体框架核酸(tetrahedral framework nucleic acid, tFNA)为例,其具有一定的自主入胞能力^[9]; tFNAs自身对成纤维细胞、软骨细胞、神经干细胞等多种细胞的增殖、迁移均呈现正向促进作用;同时作为一种运载体,可以携带核酸适配体、miRNA等物质进入细胞发挥特定的生物学功能^[10-14]。然而近年来, DNA纳米材料相关研究报道中也阐述了目前这类材料应用的瓶颈所在^[15],例如: DNA纳米材料对某些细胞入胞困难或入胞需要的纳米材料浓度过高; DNA纳米材料入胞后迅速被胞内溶酶体包裹并降解,无法释放入细胞质发挥预期的生物学功能。针对这些问题的解决方案目前鲜有报道。

鱼精蛋白是从鱼的精子中提取出的多聚阳离子肽,极易与DNA结合,这种结合也称为DNA凝结作用,是DNA免受酶类物质降解的前提^[16]; 鱼精蛋白硫酸盐带正电荷辅助脂质体用于基因转染领域已有报道^[17]。故针对上述DNA纳米结构现存的局限,本实验以 tFNA为对象,引入鱼精蛋白硫酸盐作为辅剂,探究鱼精蛋白硫酸盐对 tFNA入胞及胞内过程的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

4种DNA单链(single-strand DNA, ssDNA)购于TaKaRa Bio公司(日本); 相对分子质量 5.1×10^3 鱼精蛋白硫酸盐购于Sigma Aldrich公司(美国); 用于提取原代软骨细胞的3日龄C57BL乳鼠、DMEM培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素均购于Hyclone公司(美国); 核酸染色剂

DAPI购于Sigma Aldrich公司(美国); 细胞骨架染色剂鬼笔环肽购于Invitrogen公司(加拿大); 溶酶体染色剂Lyso TrackerGreen DND-26购于Thermo Fisher公司(美国)。

1.2 方法

1.2.1 原代软骨细胞提取 收集3日龄C57BL小鼠关节软骨,切成小块,用1×PBS冲洗2次。软骨在0.25%蛋白酶溶液中胰蛋白酶化,溶解于Dulbecco改良的Eagle培养基中(高糖DMEM, 0.1 mmol/L非必需氨基酸, 4 mmol/L谷胱甘肽, 1%青霉素/链霉素溶液)在37℃下放置30 min, 然后转入0.5%的Ⅱ型胶原酶中消化过夜,加入含10%胎牛血清(FBS)的DMEM以体积比1:1中和,并在157×g(相对离心力)下离心5 min。剩余的软骨细胞用青霉素/链霉素重新悬浮在含10%FBS的DMEM中,接种到T25培养瓶,在37℃、体积分数5%CO₂培养箱中培养。本实验中使用第1~2代细胞。

1.2.2 合成并表征 tFNA 4条ssDNA序列见表1。对4种ssDNA进行超微量,与pH8.0的TM buffer配置成总量100 μL反应体系。其中S1链用Cy5荧光进行标记。之后于95℃ 10 min、4℃ 20 min温控条件下完成tFNA的折叠组装并超滤提纯。利用高通量毛细电泳(high-performance capillary electrophoresis, HPCE)验证tFNA的合成^[18]。利用透射电镜观察形貌。

1.2.3 制备鱼精蛋白硫酸盐 tFNA复合溶液 如图1所示,用蒸馏水以1 mg/mL质量浓度配制鱼精蛋白硫酸盐溶液,室温下超声震荡过夜待鱼精蛋白硫酸盐彻底溶解后储存备用。以氮磷比(反应体系中鱼精蛋白硫酸盐所含氮原子数与 tFNA所含磷原子数之比)为N/P=5/1将制备好的鱼精蛋白硫酸盐溶液滴入已完成自组装的 tFNA溶液中,室温下孵育30 min。使用Zeta sizer检测仪分别对孵育前后 tFNA溶液Zeta电位进行检测。

1.2.4 实验分组 将细胞分为3组,以加入经过鱼精蛋白硫酸盐孵育处理的100 nmol/L tFNAs(N/P=5/1)的细胞为实验组1; 加入单纯100 nmol/L tFNAs的细胞为实验组2; 对照组细胞不进行加药处理。

1.2.5 流式细胞术定量检测入胞 以 1×10^6 细胞/孔种于

表 1 DNA单链碱基序列
Table 1 Base sequences of DNA single strands

Single strand	Base sequence (5'→3')
S1	ATTTATCACCCGCCATAGTAGACGTATCACCAAGGAGTTGAGACGAACATTCCTAAGTCTGAA
S2	ACATGCGAGGGTCCAATACCGACGATTACAGCTTGCTACACGATTCAGACTTAGGAATGTTCCG
S3	ACTACTATGGCGGGTGATAAAACGTGTAGCAAGCTGTAATCGACGGGAAGAGCATGCCCCATCC
S4	ACGGTATTGGACCCTCGCATGACTCAACTGCCTGGTGATACGAGGATGGGCATGCTCTTCCCCG

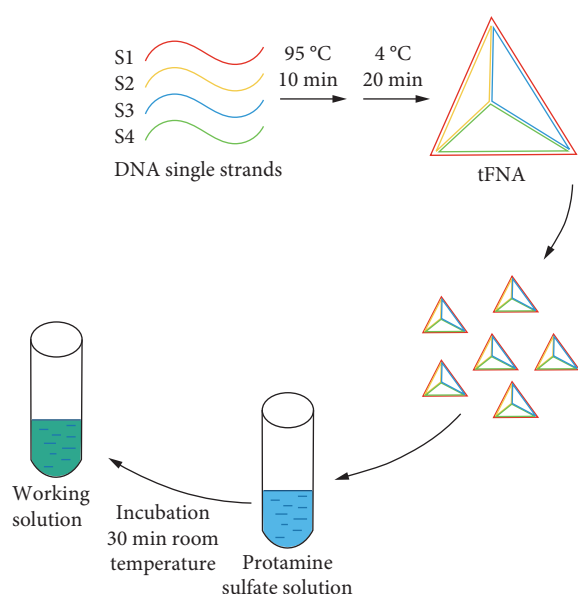


图1 四面体框架核酸合成及鱼精蛋白硫酸盐孵育模式图

Fig 1 Schematic diagram of synthesizing tFNAs with protamine sulfate incubation

6孔板,使用RPMI 1640培养基(含10%FBS及1%青霉素/链霉素)于37 °C、体积分数5%CO₂条件下培养12 h后梯度降低血清浓度,使用含体积分数5%、2%、1%FBS的培养基分别培养2 h。在加药处理后6 h和12 h后收获细胞悬液,上流式细胞仪(FC500 Beckman)检测Cy5荧光。以未经任何药物处理的对照组荧光值为阈值,实验组流式细胞分布图越偏右则说明能够检测到的携带Cy5荧光的细胞数越多。

1.2.6 激光共聚焦显微镜定性观察入胞作用 以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 将细胞种于Petri共聚焦皿,培养条件及加药浓度如前所述。加药12 h后,多聚甲醛固定,使用DAPI及鬼笔环肽分

别对细胞核与微丝蛋白F-actin染色,最后于激光共聚焦显微镜(N-SIM, Nikon)下观察实验组1和实验组2。激光共聚焦显微镜主要在两个维度对实验结果进行观察:细胞内可观测到红色Cy5荧光的数量,红色Cy5荧光的强度。

1.2.7 活细胞溶酶体定位 细胞以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种于Petri共聚焦皿,培养条件及加药浓度如前所述。加药培养5.5 h和11.5 h后,将含有LysoTracker Green DND-26溶酶体探针(50 nmol/L)的培养基预温至37 °C并替代原共聚焦皿中培养基。30 min后(此时距最初加药时间分别为6 h及12 h),再以纯培养基替代含溶酶体探针的培养基,于激光共聚焦显微镜下观察实验组1和实验组2。

1.2.8 统计学方法 数据使用GraphPad Prism软件进行数据分析并制图,每组实验至少重复3次获得3组独立实验结果。实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,采用t检验进行两组间比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。流式细胞术所得数据使用Flow Jo X软件进行制图分析。

2 结果

2.1 tFNA合成与表征

4条DNA单链折叠组成的4个三角形结构遵循碱基互补配对原则结合在一起,从而形成一个四面体结构。HPCE图见图2A,经退火程序后合成的tFNA约180 bp。图2B为TEM拍摄的tFNA侧貌,大致呈三角形,边长约20 nm。由图2C可见,经过30 min的鱼精蛋白硫酸盐孵育后,溶液的Zeta电位发生了变化,1 000 nmol/L单纯tFNAs原液Zeta电位为 $(-1.567 \pm 0.163) \text{ mV}$;以N/P=5/1比例孵育鱼精蛋白硫酸盐后,Zeta电位变为正,为 $(4.700 \pm 0.484) \text{ mV}$ 。

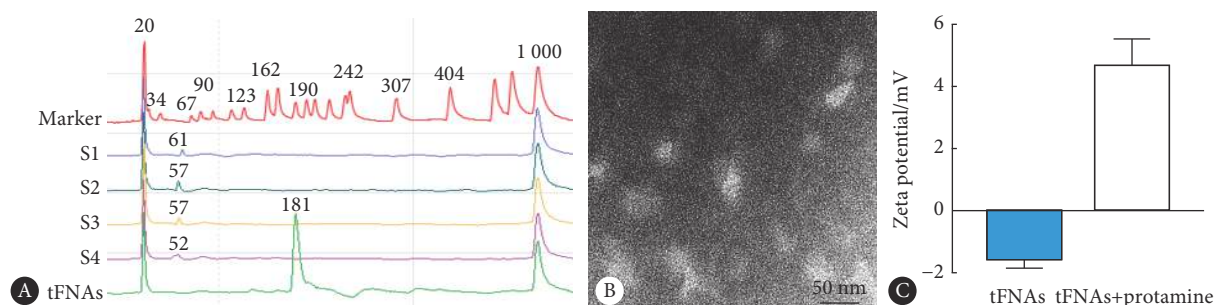


图2 tFNAs的合成、形貌与鱼精蛋白硫酸盐处理前后的Zeta电位

Fig 2 Synthesis, morphological characteristics and Zeta potential of tFNAs

A: High-performance capillary electrophoresis (the unit of values in the figure is bp); B: Transmission electron microscope (TEM); C: Detection of Zeta potential before/after protamine incubation ($n=3$).

2.2 鱼精蛋白硫酸盐提高tFNA入胞效率

流式细胞术检测结果如图3A、3B所示,在6 h及12 h

实验组中,实验组1的平均荧光强度均高于实验组2。具体而言,胞内Cy5荧光强度,6 h,实验组1>实验组2>对照

组($P < 0.01$); 12 h, 实验组1比实验组2和对照组高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而实验组2与对照组相比差异无统计学意义。如图3C、3D所示, 12 h与6 h相比, 实验组1横坐标(即荧光强度)略向对照组方向(向左)移动, 但在3组中仍靠

右, 实验组2横坐标接近对照组结果, 提示经过更长的时间(12 h)后, 实验组1胞内高荧光强度的细胞数量较多, 仍可见与对照组的明显差别, 而此时实验组2荧光表现已类似对照组。

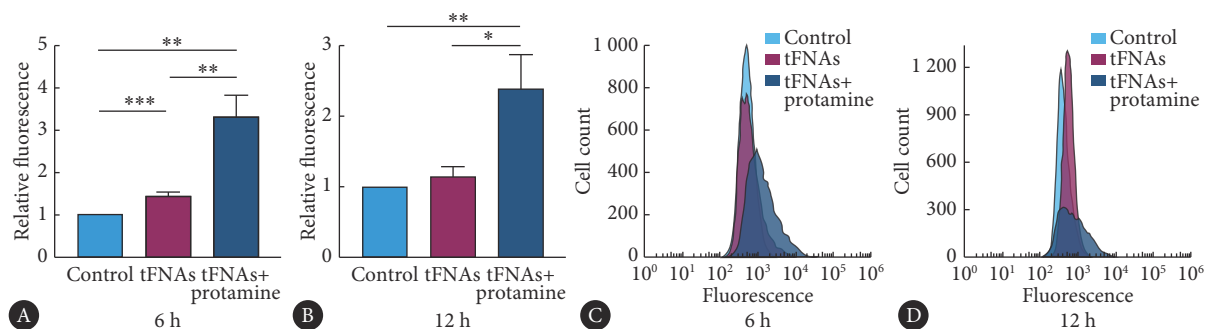


图3 tFNAs入胞能力定量分析 ($n=3$)

Fig 3 Quantitative analysis of internalized tFNAs ($n=3$)

A: Cy5 fluorescence after 6 h; B: Cy5 fluorescence after 12 h; C: Cell count of fluorescence after 6 h; D: Cell count of fluorescence after 12 h.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.3 定性观察鱼精蛋白硫酸盐对 tFNA入胞影响

如图4所示, 实验组1的Cy5荧光的数量和强度均较

实验组2提升。这与流式细胞术进行的定量检测结果一致。

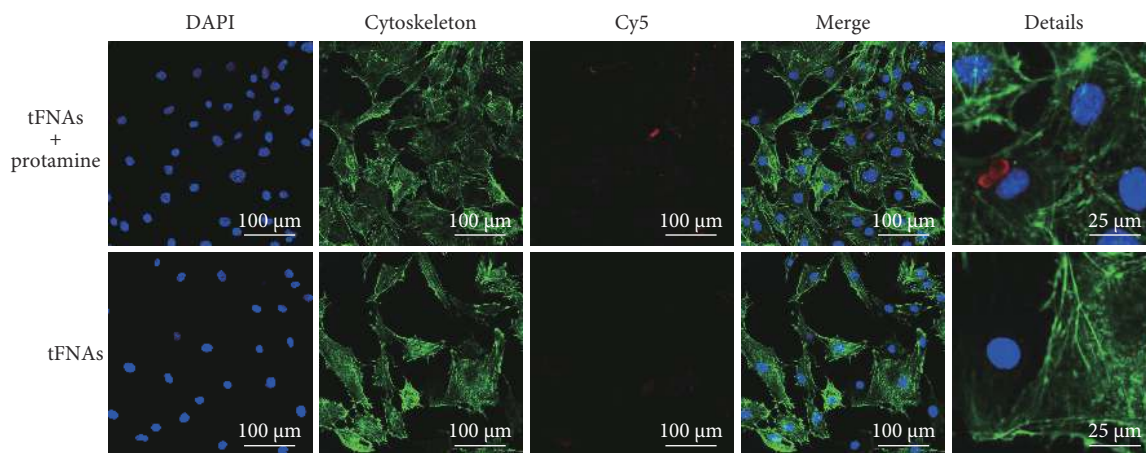


图4 鱼精蛋白硫酸盐孵育tFNAs 12 h后入胞能力增强现象定性观察

Fig 4 Protamine incubation enhanced endocytosis of tFNAs after 12 h

2.4 鱼精蛋白硫酸盐延缓溶酶体对tFNA降解

如图5所示, 加药6 h后, 两个实验组均可见入胞的tFNA, 实验组1胞内红色荧光数量更多, 这与之前实验结果一致; 同时, 实验组2代表tFNA的红色荧光与代表溶酶体的绿色荧光有融合现象, 提示tFNA被溶酶体包裹, 进入了溶酶体降解外源性物质的过程。实验组1加药6 h时红色与绿色荧光重叠的现象尚不明显。加药12 h后结果如图6所示, 实验组1也可见明显黄色的重叠现象, 但大范围的带红色荧光的tFNA依然可见, 与之相比, 实验组2红色荧光少, 大部分tFNA已经被溶酶体降解。

3 讨论

本实验针对目前DNA纳米材料在应用方面所面对的两点局限, 利用鱼精蛋白硫酸盐呈弱碱性带正电荷的特点, 旨在探究其作为辅剂用来辅助DNA纳米材料发挥生物学功能的可能性。

在之前的研究中, 本实验所用的这种具有四面体空间结构的DNA纳米结构已被证实具有一定的自主入胞能力, 尤其是浓度大于250 nmol/L时, 在多种细胞内均可检测到明显的入胞作用, 同时也有诸多研究显示250 nmol/L

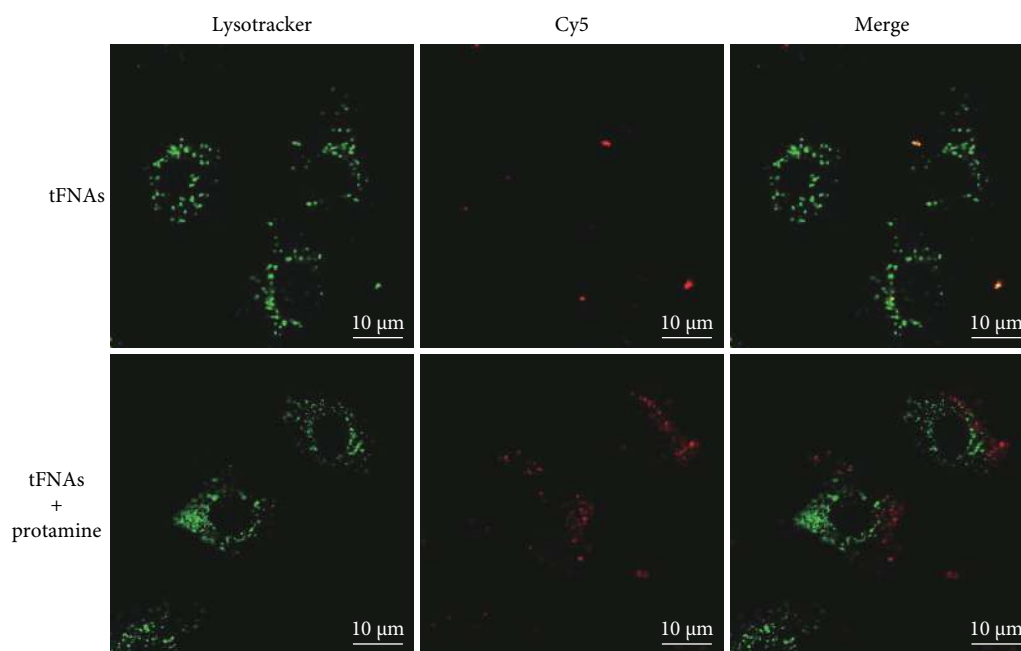


图5 加药6 h后tFNAs与溶酶体荧光共定位

Fig 5 Fluorescence colocalization between tFNAs and lysosomes after 6 h

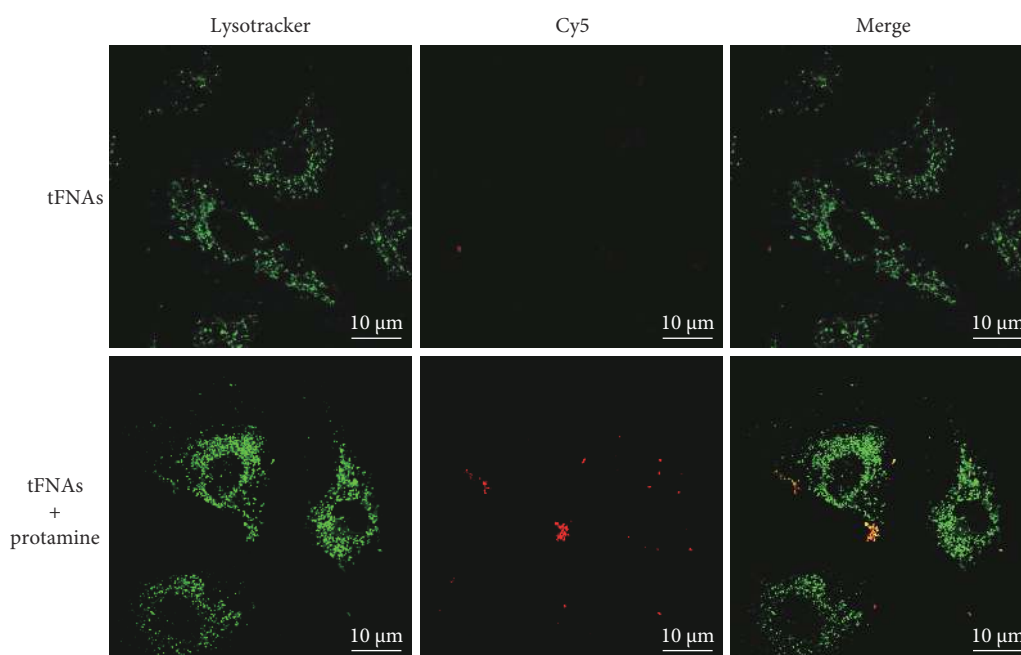


图6 加药12 h后tFNAs与溶酶体荧光共定位

Fig 6 Fluorescence colocalization between tFNAs and lysosomes after 12 h

也是其体现多种生物学功能的最佳浓度^[19-21],但是250 nmol/L仍然是一个较高的浓度,常规合成1 000 nmol/L原液仅稀释4倍来做药物载体或特殊核酸序列载体无疑成本高昂,且考虑到体内环境,使用如此高的浓度并不现实。本实验中所采用的100 nmol/L是一个相对较低的浓度,研究显示在这个浓度下生物学功能不明显^[20],并且对于如实验室常用的Hela细胞、L929等细胞而言,100 nmol/L浓度下

几乎观察不到明显入胞现象^[18]。本实验结果显示,在低浓度tFNA条件下,辅以孵育鱼精蛋白硫酸盐处理后,可达到显著的入胞作用,提高了tFNA的利用率。在参与检测细胞总数相同(均为20 000个)的条件下,流式细胞学结果显示实验组1可以检测到胞内含Cy5荧光的细胞数量比实验组2更多。因此可以认为经过鱼精蛋白硫酸盐孵育后,tFNA入胞能力得到了加强。同时对比12 h组与6 h组

流式细胞术结果,实验组1图像主体有左移趋势,考虑到细胞本身的代谢作用,会降解一部分tFNA导致荧光减弱,这种结果是合理的。基于鱼精蛋白硫酸盐带正电荷的特性,以及Zeta电位的检测结果,目前推测在与tFNA孵育过程中通过静电力相互吸引结合,中和了DNA所带负电,使其与同样带负电荷的细胞膜表面接触概率增加,最终呈现出tFNA入胞增加的结果。

外源性DNA纳米粒子进入细胞后过快被溶酶体包裹并降解是各类纳米颗粒发挥生物学功能的障碍之一,因此如何实现有效的溶酶体逃逸或延缓溶酶体对纳米粒子的降解对DNA纳米结构的应用有十分重要的意义。若携带Cy5荧光的tFNA入胞后进入了溶酶体内,则在激光共聚焦显微镜照片下可见红色荧光与绿色荧光通道重叠后所呈现的黄色荧光,依据黄色荧光的比例,即可对测试时间点tFNAs与溶酶体的位置关系作出直观定性判断。本研究溶酶体定位的实验结果显示,鱼精蛋白硫酸盐孵育处理后tFNA在胞内可以实现一定程度的溶酶体逃逸,延长了tFNA在胞内存在的时间。我们推测是结合了tFNAs的鱼精蛋白在胞浆内缓冲了溶酶体所需的酸性环境,触发了“质子海绵效应”^[22],在胞浆内对tFNAs实现一定的保护作用。目前tFNA多数生物学作用场景均在胞浆内,故增加入胞能力和延长胞内作用时间实现溶酶体逃逸对于进一步强化tFNA及其衍生DNA纳米材料有十分重要的意义。

DNA纳米材料自身容易编辑,便于携带各类具有特定功能的核酸片段或小分子药物^[13, 23]。此类经过修饰的带有特定目的DNA纳米材料,在细胞层面体现出明显的生物学改变需要达到一定的入胞量;此外入胞后被溶酶体包裹降解也是其发挥功能的不利因素之一。本实验应用鱼精蛋白硫酸盐孵育 tFNA,对其入胞能力和溶酶体逃逸能力的提升显著,提示其未来可能在DNA纳米材料研究与应用中有积极意义。

当前研究主要基于细胞学研究层面,现象较为明确,但仍有诸多有待完善之处,例如对于孵育后入胞机制及溶酶体逃逸机制目前尚处于假设阶段,需要进一步设计实验验证;同时,DNA纳米材料最终要成为可以在研究中应用的载体试剂或临床中应用的某种药物,需要其能够在体内环境中发挥作用。相比于细胞层面,体内层面的条件更为复杂,而鱼精蛋白硫酸盐是否在DNA纳米材料的体内研究中同样具有积极意义还需要进一步探索。

参 考 文 献

- [1] WEI B, DAI M, YIN P. Complex shapes self-assembled from single-stranded DNA tiles. *Nature*, 2012, 485(7400): 623–626.
- [2] XAVIER P L, CHANDRASEKARAN A R. DNA-based construction at the nanoscale: emerging trends and applications. *Nanotechnology*, 2018, 29(6): 062001[2020-03-02]. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aaa120>.
- [3] JORGE A F, ERITJA R. Overview of DNA self-assembling: progresses in biomedical applications. *Pharmaceutics*, 2018, 10(4): 268.
- [4] KAHN J S, HU Y, WILLNER I. Stimuli-responsive DNA-based hydrogels: from basic principles to applications. *Acc Chem Res*, 2017, 50(4): 680–690.
- [5] ZHANG Y, TU J, WANG D, *et al.* Programmable and multifunctional DNA-based materials for biomedical applications. *Adv Mater*, 2018, 30(24): e1703658[2020-02-03]. <https://doi.org/10.1002/adma.201703658>.
- [6] 吕家臻, 黄震. 一种新型DNA纳米结构的构建与结晶. *四川大学学报(自然科学版)*, 2020, 57(1): 199–204.
- [7] BAWA R. Regulating nanomedicine—can the FDA handle it? *Curr Drug Deliv*, 2011, 8(3): 227–234.
- [8] DAVIS M E, CHEN Z G, SHIN D M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(9): 771–782.
- [9] LIANG L, LI J, LI Q, *et al.* Single-particle tracking and modulation of cell entry pathways of a tetrahedral DNA nanostructure in live cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(30): 7745–7750.
- [10] ZHAO D, LIU M, LI Q, *et al.* Tetrahedral DNA nanostructure promotes endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis via notch signaling pathway. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(44): 37911–37918.
- [11] MA W, XIE X, SHAO X, *et al.* Tetrahedral DNA nanostructures facilitate neural stem cell migration via activating RHOA/ROCK2 signalling pathway. *Cell Prolif*, 2018, 51(6): e12503[2020-02-03]. <https://doi.org/10.1111/cpr.12503>.
- [12] LI S, SUN Y, TIAN T, *et al.* MicroRNA-214-3p modified tetrahedral framework nucleic acids target survivin to induce tumour cell apoptosis. *Cell Prolif*, 2020, 53(1): e12708[2020-04-03]. <https://doi.org/10.1111/cpr.12708>.
- [13] ZHAN Y, MA W, ZHANG Y, *et al.* DNA-based nanomedicine with targeting and enhancement of therapeutic efficacy of breast cancer cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(17): 15354–15365.
- [14] SHI S, LIN S, LI Y, *et al.* Effects of tetrahedral dna nanostructures on autophagy in chondrocytes. *Chem Commun (Camb)*, 2018, 54(11): 1327–1330.
- [15] PONNUSWAMY N, BASTINGS M M C, NATHWANI B, *et al.* Oligolysine-based coating protects DNA nanostructures from low-salt denaturation and nuclease degradation. *Nat Commun*, 2017, 8: 15654[2020-02-03]. <https://www.nature.com/articles/ncomms15654>. doi: 10.1038/ncomms15654.
- [16] ALDERSON J, WILSON B, LAIBLE G, *et al.* Protamine sulfate protects exogenous DNA against nuclease degradation but is unable to improve the efficiency of bovine sperm mediated transgenesis. *Anim Reprod Sci*, 2006, 91(1/2): 23–30.

- [17] SORGI F L, BHATTACHARYA S, HUANG L. Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. *Gene Ther*, 1997, 4(9): 961–968.
- [18] TIAN T, ZHANG T, ZHOU T, *et al*. Synthesis of an ethyleneimine/tetrahedral DNA nanostructure complex and its potential application as a multi-functional delivery vehicle. *Nanoscale*, 2017, 9(46): 18402–18412.
- [19] CUI W, ZHAN Y, SHAO X, *et al*. Neuroprotective and neurotherapeutic effects of tetrahedral framework nucleic acids on Parkinson's disease *in vitro*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(36): 32787–32797.
- [20] SHAO X, LIN S, PENG Q, *et al*. Tetrahedral DNA nanostructure: a potential promoter for cartilage tissue regeneration via regulating chondrocyte phenotype and proliferation. *Small*, 2017, 13(12): 1602770.
- [21] ZHANG M, ZHU J, QIN X, *et al*. Cardioprotection of tetrahedral DNA nanostructures in myocardial ischemia-reperfusion injury. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(34): 30631–30639.
- [22] EL-SAYED A, FUTAKI S, HARASHIMA H. Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment. *AAPS J*, 2009, 11(1): 13–22.
- [23] LIU Y, SUN Y, LI S, *et al*. Tetrahedral framework nucleic acids deliver antimicrobial peptides with improved effects and less susceptibility to bacterial degradation. *Nano Lett*, 2020, 20(5): 3602–3610.
- (2020-05-03收稿, 2020-08-25修回)
- 编辑 吕熙

本刊征稿启事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是中文核心期刊,曾荣获全国优秀科技期刊一等奖,首届国家期刊奖提名奖,第二、三届全国期刊奖百种重点期刊,四川省十佳科技期刊称号和第一、二、三、四、五届中国高校精品科技期刊奖,2016年度中国高校百佳科技期刊,2016中国国际影响力优秀学术期刊。本刊被中国科学引文数据库(CSCD)、北京大学图书馆中文核心期刊要目总览(北大核心/中文核心)、中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)(科技核心)、美国PubMed《医学索引》(IM/MEDLINE)、Scopus等收录。

为了更好地开展国内外学术交流,促进医药卫生事业的发展,凡符合编辑部稿件要求(见每卷末期稿约),均可向本刊投稿。凡属于国家自然科学基金及其他部省级以上科研基金资助的来稿,编辑部将适当地给予优先。

本刊在线投稿网址: <http://ykxb.scu.edu.cn/>

地址: 四川省成都市人民南路三段17号《四川大学学报(医学版)》编辑部

邮政编码: 610041

电话/传真: (028)85501320

E-mail: scuxbyxb@scu.edu.cn

四川大学学报(医学版)编辑部