

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.14.004

新型 PEI 衍生物的体外表征及对巨噬细胞的转染效果研究 *

郭 信¹ 赵笑天² 吴小雨¹ 刘俊超¹ 刘晓兵^{1Δ}

(1 上海交通大学医学院附属第九人民医院血管外科 上海 200011; 2 上海交通大学药学院 上海 200240)

摘要 目的:以 PEI1.8kDa 为基础连接戊二醛合成新型可降解 PEI 衍生物 GPEI 后,研究 GPEI 包裹质粒转染巨噬细胞后对巨噬细胞合成蛋白及表型的影响。**方法:**合成 GPEI 后,检测了 GPEI 质粒聚合物的粒径及电位,并通过透射电镜观察聚合物形态,通过免疫荧光、WB、RT-PCR、Elisa 及 Transwell 实验检测巨噬细胞 RNA、蛋白、终产物水平变化及表型改变。**结果:**GPEI 能够包裹质粒,形成 100 nm 左右带有正电荷的聚合物,WB、RT-PCR 结果表明 GPEI 转染较 PEI25kDa 有优势($P<0.05$),巨噬细胞转染后 6 天持续分泌 PGI2($P<0.05$)。**结论:**以 PEI1.8kDa 为基础合成的 GPEI 能够包裹 PTGIS 质粒并将其转染进巨噬细胞后对巨噬细胞的表型有明显影响。

关键词:GPEI; 巨噬细胞; 基因转染

中图分类号:R-33; R318.08; R605; R968 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)14-2620-06

Characterization of Novel PEI Derivatives and Transfection Effects on Macrophages*

GUO Xin¹, ZHAO Xiao-tian², WU Xiao-yu¹, LIU Jun-chao¹, LIU Xiao-bing^{1Δ}

(1 Department of Vascular Surgery, The Ninth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200011, China; 2 School of Pharmacy Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200240, China)

ABSTRACT Objective: Synthesizing a novel degradable PEI derivative (GPEI), and studying the protein level and phenotype of macrophage transfected by GPEI-plasmid. **Methods:** The particle size and potential of GPEI-plasmid were detected by Zeta potentiometer. The morphology of GPEI-plasmid was observed by transmission electron microscopy. The RNA, protein, end products and phenotypic changes were detected by immunofluorescence, WB, RT-PCR, Elisa and Transwell experiments. **Results:** Plasmid coated GPEI was positive charge and about 100 nm. GPEI transfection is superior to commercial PEI25kDa ($P<0.05$), and PGI2 was secreted for 6 days by transfected macrophage($P<0.05$). **Conclusion:** The synthesized GPEI can encapsulate the PTGIS plasmid and successfully transfect it into macrophages, which has a significant effect on the phenotype of macrophages.

Key words: GPEI; Macrophage; Gene transfection

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R318.08; R605; R968 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)14-2620-06

前言

下肢动脉缺血是栓塞或动脉粥样硬化等多种因素导致的双侧下肢动脉血流减少或中断的疾病,是下肢截肢的主要原因,严重可导致病人死亡^[1]。目前,针对下肢动脉缺血的主要治疗手段为开放手术或介入治疗的动脉重建^[2]。但是目前治疗方式尚不能一次性彻底解决动脉狭窄情况^[3],病人术后常继续口服前列腺素类药物,但是该药物在体内半衰期非常短,疗效持续短而不稳定^[4]。如能找到能够长时间持续作用的给药方式,那么将明显改善治疗结果,给病人带来长期稳定疗效^[5]。

基因转染的作用时间相对较长,是解决短期作用的办法之一^[6]。动物实验体内目前常用转染试剂主要为腺病毒、脂质体与聚阳离子。脂质体在生物相容性和免疫原性上优于腺病毒,但

是转染效率和细胞毒性上较聚阳离子差^[7]。聚阳离子可以通过静电力作用与质粒结合,形成纳米颗粒,通过质子海绵效应帮助核酸材料内体逃逸,进而在细胞质中释放核酸。聚阳离子具有分子量越大,同时细胞毒性也越大的特点^[8],目前商品化的 PEI25kDa 分子量较大,在转染过程中对细胞的损伤更加严重。以往试验中合成 PEI 衍生物往往是以油性介质为主,本次实验选用 PEI1.8 kDa 作为转染试剂主体,戊二醛作为 PEI1.8kDa 的交联剂,在去离子水中合成戊二醛交联的聚乙烯亚胺(Glutaraldehyde-Polyethyleneimine, GPEI),不需要复杂的去除介质或者表面改性过程,直接可以使用。下肢缺血局部往往富集数量较多的巨噬细胞。巨噬细胞合成蛋白水平旺盛,是下肢缺血修复的工作细胞之一^[9],其本身不能合成环前列腺素(PGI2)。对其转染后就能够把巨噬细胞作为 PGI2 分泌的介质细胞。

* 基金项目:上海市浦江人才计划项目(14PJ1406100)

作者简介:郭信(1993-),硕士研究生,主要研究方向:外科学, E-mail: guo_xin_2015@163.com

Δ 通讯作者:刘晓兵(1976-),硕士生导师,副主任医师,主要研究方向:外科学, E-mail: benny_liuxb@163.com

(收稿日期:2019-03-07 接受日期:2019-03-30)

本文主要考察了 GPEI 对于巨噬细胞的细胞毒性、巨噬细胞在经 GPEI 转染 PTGIS 质粒后合成 PTGIS 蛋白与分泌 PGI₂ 水平的变化,证明了 GPEI 对于下肢缺血部位细胞转染的可行性与有效性。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 荧光定量 PCR 仪 (ABI 美国), 转膜、电泳仪 (Bio-Rad 美国), 酶标仪 (Bio-Tek Synergy HT 美国), CO₂ 培养箱 (THERMO FORMA3111 美国), 超净工作台 (BIO-HAZARD, VCM-420 中国台湾), 荧光显微镜 (LEICA DM6000M 德国), 图像分析系统 (IMAGE PRO PLUS 6.0 美国), 台式高速低温离心机 (Beckman Coulter 法国)。

1.1.2 试剂 PEI1.8kDa (Sigma-Aldrich), PEI25kDa (Sigma-Aldrich), 山羊抗鼠二抗 (Cell Signaling Technology), HRP 标记的 GAPDH (Proteintech), PTGIS 一抗 (Abcam), Raw264.7 巨噬细胞、HUVEC (ATCC), 高糖 DMEM 培养基 (Gibco)。

1.2 实验方法

1.2.1 GPEI 材料的纳米颗粒粒径检测与 zeta 电位检测 用超纯水完全溶解 PEI1.8kDa (2 mg/mL), 再向其中加入终浓度为 0.125 % 的戊二醛, 搅拌均匀后置于玻璃锥形瓶中水浴锅加热至 60℃, 搅拌加热 30 分钟, 溶液变至橙红色, 该合成方式为本实验首创。将购买得到的 PEI25kDa 溶液使用超纯水稀释至 2.0 mg/mL, 在无菌操作台内通过 0.22 μm 的滤膜除菌。将连接有绿色荧光蛋白 (GFP) 的 PTGIS 质粒使用高糖 DMEM 完全培养基稀释到 20 ng/mL。根据实验要求, 配置不同浓度的 GPEI-PTGIS 复合溶液, 混匀后静置 30 分钟。将各样品置于 zeta 电位仪中检测, 每个样品溶液重复三次, 取平均值与标准差作图。

1.2.2 GPEI 材料纳米颗粒的形态学研究 按照以上配置方法将 GPEI 与质粒分别稀释于去离子水中, 以 100 μg/mL 的浓度静置 30 min, 得到稳定的 GPEI-PTGIS 复合物。吸取约 10 μL 样品溶液, 滴加于透射电镜铜网上, 通风干燥后使用透射电镜观察并记录图片。

1.2.3 GPEI 与巨噬细胞共培养的细胞毒性研究 Raw264.7 巨噬细胞常规培养后, 待汇合度达 80 % 时, 消化并重新铺种于 96 孔板中。每孔约 5×10^3 个细胞。待巨噬细胞完全贴壁后将不同浓度 GPEI 溶液和 PEI25kDa 溶液加入到新鲜的培养上清中, 混匀, 放入培养箱中继续培养 6 小时。结束后弃去上清, 反复轻柔冲洗细胞, 按照 CCK-8 说明书加入一定量的新鲜上清与 CCK-8 试剂, 避光培养 1.5 小时后, 在酶标仪内检测, 读取读数并记录。实验重复三次。

1.2.4 GPEI-PTGIS 转染巨噬细胞的细胞免疫荧光实验 生长状态良好的巨噬细胞消化并重新铺种于 24 孔板中, 待细胞汇合度到达 50 % 时, 将 GPEI/ 质粒质量比为 3:1 的复合物加入新鲜细胞上清, 常规培养 6 小时后弃转染上清, 并用 PBS 冲洗两次, 重新加入新鲜完全培养基, 继续培养 48 小时。之后将细胞取出并固定, 行 CD206 与 DAPI 染色, 染色成功后在细胞荧光显微镜下观察并记录图片。

1.2.5 GPEI-PTGIS 转染巨噬细胞后细胞内 PTGIS 水平变化研

究 按不同质量比配置多个 GPEI-PTGIS 复合物溶液, 并按 2:1 质量比配置 PEI25kDa-PTGIS 溶液, 依照上述转染方式转染巨噬细胞。转染完成后, 收集细胞并裂解, 提取巨噬细胞内总蛋白。将各样品蛋白依照蛋白印迹法检测蛋白中 PTGIS 蛋白含量。在成像软件中保存图片, 并使用 ImageJ 软件处理图像得到数据, 制作统计图。实验重复三次。

1.2.6 GPEI-PTGIS 转染巨噬细胞后细胞内 PTGIS-RNA 水平变化研究 按照 1.2.5 中方法收集转染细胞, 使用 Trizol 提取细胞内总 mRNA, 并使用 qPCR 及 RT-PCR 技术扩增基因片段。引物序列为: Forward: ACGCAGATGTGGAGATCCCT; Reverse: GTCGTGTTCCGGCTGCA。扩增完毕后读取荧光定量 PCR 仪中读数, 制作统计图。实验重复三次。

1.2.7 GPEI-PTGIS 转染巨噬细胞后细胞分泌 PGI₂ 水平变化研究 按照 1.2.5 中的方法转染细胞, 在 48 小时后更换新鲜培养基。每隔 24 小时更换新鲜培养基, 并收集更换前的陈旧培养基, 连续收集 6 天。使用 PGI₂ 的 Elisa 试剂盒检测细胞上清中的 PGI₂ 含量。收集数据并制作统计图。实验重复三次。

1.2.8 GPEI-PTGIS 转染巨噬细胞后对 HUVEC 的趋化作用研究 将转染后 48 小时的巨噬细胞与未转染的巨噬细胞消化, 铺种于 transwell 小室下层; 正常培养的脐静脉内皮细胞铺种于小室上层膜表面。铺种完毕后放回培养箱, 继续培养 12 小时。之后取出小室, 擦去膜上层细胞, 固定并染色下层细胞, 在荧光显微镜下观察拍照, 记录数据, 绘制统计图。实验重复三次。

1.3 统计学方法

对全部数据通过均值 ± 标准差方法表示, 其中的计数数据通过百分比表示, 采用 SPSS 21.0 软件对全部数据惊醒处理, 对符合方差齐性要求的数据配对 t 检验, 设置的显著性差异水平为 0.05。

2 结果

2.1 GPEI 材料的纳米颗粒粒径检测与 zeta 电位

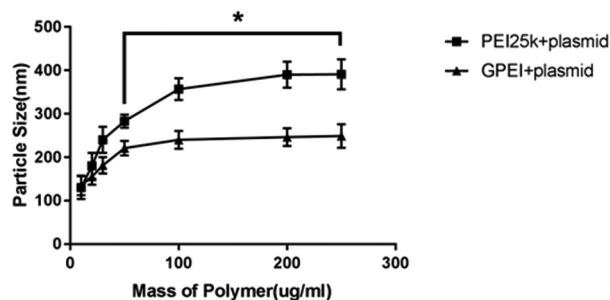


图 1 不同浓度聚阳离子包裹质粒后粒径
聚阳离子浓度高于 50 μg/mL 后 GPEI 形成的聚合物较 PEI25kDa 粒径减小, * 表示 t 检验 $P < 0.05$

Fig.1 Particle size after polycation encapsulated plasmid

When the polycation concentration is higher than 50 μg/mL, the polymer formed by GPEI is smaller than the PEI25kDa particle size. * $P < 0.05$

在不同浓度的聚阳离子与质粒结合后, 聚合物的尺寸总体都在 50-150 nm 范围内。PEI 浓度高于 50 μg/mL 后比 PEI25kDa 粒径更小。200 nm 左右的颗粒是细胞内涵体形成的合适大小^[10]。总体上说, GPEI 浓度提高后, 聚合物能够保持在 200 nm 以下。

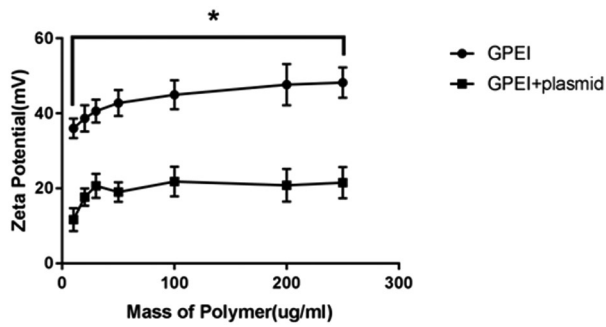


图2 不同浓度 GPEI 包裹质粒前后的电位水平

各浓度下 GPEI 包裹质粒后电位均降低,*表示 t 检验 $P < 0.05$ 。

Fig.2 Potential levels before and after GPEI encapsulated plasmid

The potential of GPEI was reduced after coating the plasmid* $P < 0.05$.

聚合物测得的 zeta 电位约为 10-30 mV,在未包裹质粒时,聚合物 zeta 电位约为 30-50 mV,可知聚阳离子在与质粒混合后能够和带有负电荷的 DNA 质粒结合,并且结合之后仍然保持正电荷,这使得聚合物溶液相对稳定^[6],不会发生聚沉。

2.2 GPEI 材料纳米颗粒的形态学研究

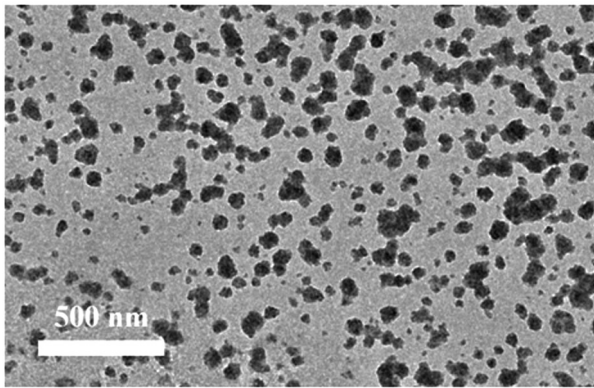


图3 GPEI(100ug/mL)包裹质粒后的透射电镜图片

Fig. 3 TEM image of GPEI (100 ug/mL) wrapped plasmid

我们按照 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 GPEI 浓度与质粒混合,使用透射电镜观察聚合物。聚合物电镜结果可以观察到聚合物与质粒相互结合,形成了纳米颗粒,大小较为均匀,形态呈球状,粒径呈 100 nm 左右分布,与颗粒粒径检测结果相吻合。

2.3 GPEI 与巨噬细胞共培养的细胞毒性研究

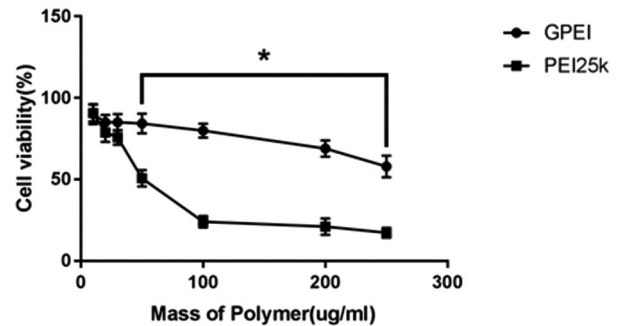


图4 不同种类聚阳离子不同浓度下对巨噬细胞的细胞毒性

聚阳离子浓度高于 50 $\mu\text{g/mL}$ 后 GPEI 的细胞毒性较 PEI25kDa 小,

*表示 t 检验 $P < 0.05$ 。

Fig.4 Cytotoxicity of macrophages at different concentrations of different kinds of polycations

When the concentration is higher than 50 $\mu\text{g/mL}$, the cytotoxicity of GPEI is lower than PEI25kDa.* $P < 0.05$.

为了确认 GPEI 在体外实验环境下对细胞的毒性较 PEI25kDa 更小,我们用多组不同浓度的 GPEI 与 PEI25k 与巨噬细胞在常规的培养条件下共培养相同时间,相互比较两种不同材料环境下细胞存活的数量。根据实验结果,在浓度较低的三组对比中,GPEI 与 PEI25kDa 两组细胞存活数量都较高。当两种材料浓度到达 50 $\mu\text{g/mL}$ 之后,GPEI 对于巨噬细胞毒性较 PEI25kDa 更小。

2.4 GPEI-PTGIS 转染巨噬细胞的细胞免疫荧光

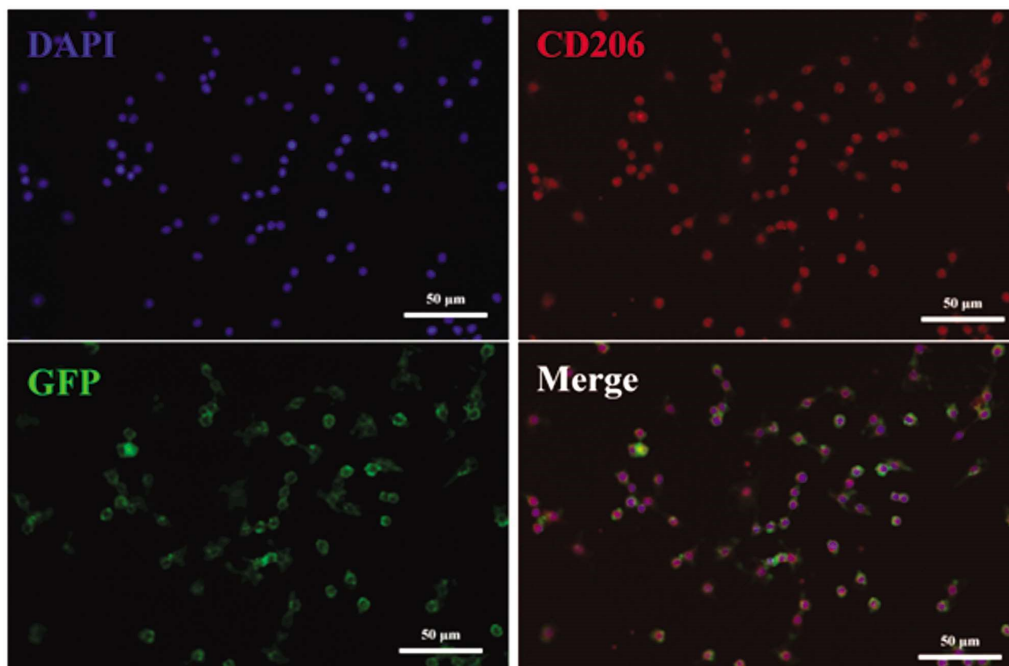


图5 GPEI(100 ug/mL)包裹质粒后转染巨噬细胞免疫荧光图片

Fig. 5 Immunofluorescence picture of macrophage transfected with GPEI (100 ug/mL) wrapped plasmid

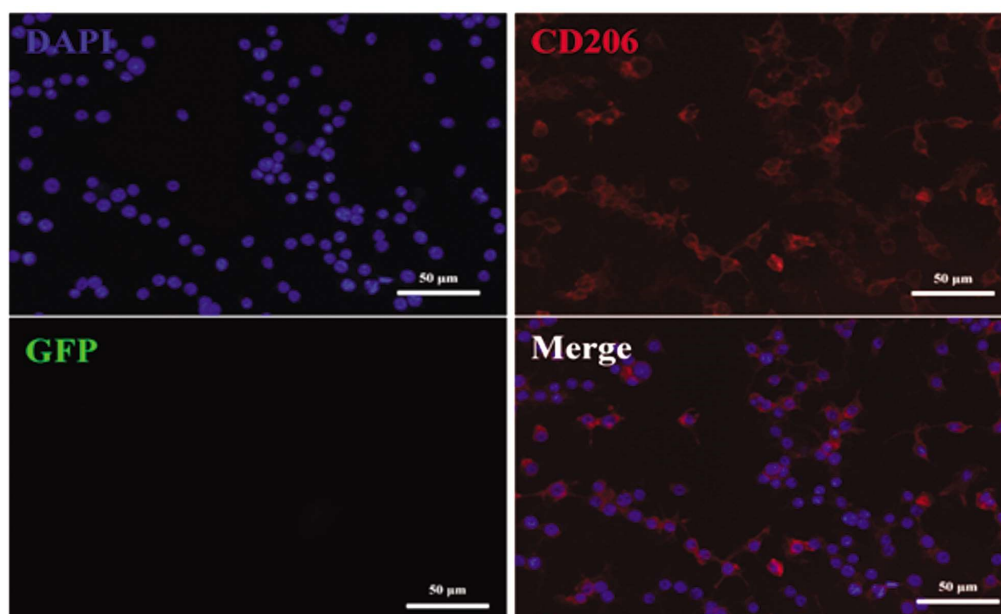


图 6 正常巨噬细胞免疫荧光图片

Fig.6 Normal macrophage immunofluorescence

我们将转染后与未转染巨噬细胞置于荧光显微镜下。红光下显色为 M2 型巨噬细胞表面特异性蛋白 CD206, 绿色荧光为转染后的巨噬细胞内表达的 GFP。质粒转染进细胞后, PTGIS 蛋白得到表达是非常明确的。从本实验结果来看, GPEI-PTGIS 转染巨噬细胞后最终能够在细胞内表达。

2.5 GPEI-PTGIS 转染巨噬细胞后细胞内 PTGIS 水平变化

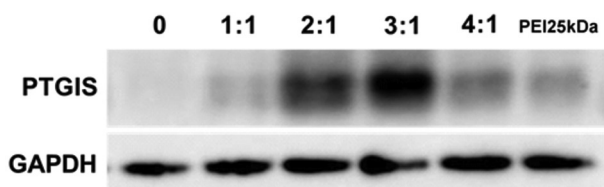


图 7 不同质量比 GPEI 与 PEI25kDa 转染巨噬细胞 Western Blotting 结果
Fig.7 Western Blotting results of different ratios of GPEI and PEI25kDa transfected macrophages

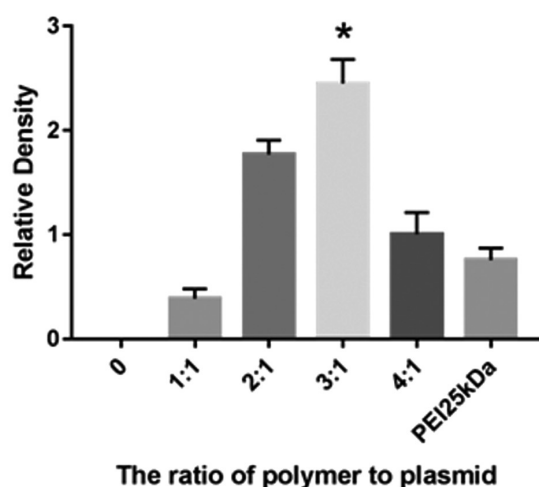


图 8 Western Blotting 结果统计图

Fig.8 Western Blotting results statistics

Note: 3:1 group are expressed as 2.451 ± 0.177 , $n=3$. $*P<0.05$, compared with each other group.

为了明确精确的 GPEI 浓度, 我们按照 GPEI 与质粒不同的质量比设置了多组样品。根据结果可以看出, 在未转染的巨噬细胞内不表达 PTGIS 蛋白, 3:1 质量比组较其他组蛋白水平更高。对于 PEI25kDa 来说, 目前最优的质量比为 2:1, 这也是本次实验选用的 PEI25kDa 的质量比。即使在最优的质量比下, PEI25kDa 与 GPEI 仍存在转染效率的区别。所以我们认为 GPEI 作为 PEI 的衍生物, 在转染效率和细胞毒性方面都是优于 PEI25kDa 的。

2.6 GPEI-PTGIS 转染巨噬细胞后细胞内 PTGIS-RNA 水平变化

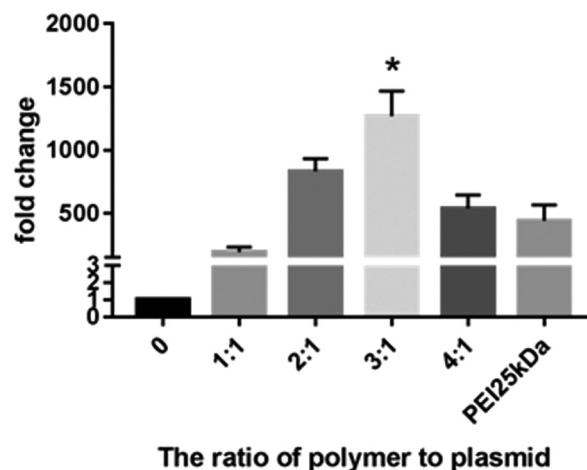


图 9 不同质量比 GPEI 与 PEI25kDa 转染巨噬细胞 RT-PCR 结果
Fig.9 RT-PCR results of different mass ratios of GPEI and PEI25kDa transfected macrophages

Note: 3:1 group are expressed as 1362.961 ± 284.466 , $n=3$. $*P<0.05$, compared with each other group.

如果仅从蛋白水平说明 PTGIS 合成水平是上升的, 就可能遗漏存在蛋白合成后修饰与降解的可能。所以需要进一步验证 PTGIS-RNA。从实验结果可以看出, 空白组巨噬细胞内没有 PTGIS-RNA 表达, 其它组别的样品中 PTGIS-RNA 分别出

现了不同的升高水平。其中与蛋白水平相同的是,GPEI 与质粒质量比 3:1 组较其他组均有明显升高,与蛋白水平波动一致,所以 GPEI 包裹质粒形成聚合物的转染能力是明确的。

2.7 GPEI-PTGIS 转染巨噬细胞后细胞分泌 PGI2 水平变化

PTGIS 是直接合成 PGI2 的蛋白酶,在已证实成功转染 PTGIS 质粒后,我们又测量了体外巨噬细胞培养上清中的 PGI2 含量,从结果可知,转染后的细胞在连续 6 天时间内都可以连续分泌高浓度的 PGI2。连续收集 6 天上清后,转染细胞状态较差,各个培养皿中的细胞都达到生长密度的上限,故没有延长收集天数。

2.8 GPEI-PTGIS 转染巨噬细胞后对巨噬细胞的趋化作用研究

文献表明,局部的内皮细胞数量越多,下肢血流回复情况越好^[11]。所以转染 PTGIS 后的巨噬细胞通过旁分泌作用趋化临近的内皮细胞是修复下肢缺血的重要过程。从结果来看,实验时间至 12 小时后高分泌 PGI2 的转染后巨噬细胞对于上层 HUVEC 的趋化作用明显高于正常巨噬细胞。这个结果说明在

高 PGI2 浓度下,HUVEC 能够更加快速的到达缺血部位修复血管。

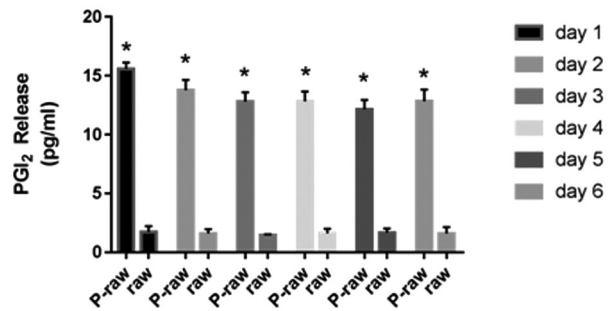


图 10 转染后巨噬细胞分泌 PGI2 结果

Fig.10 Results of secretion of PGI2 by macrophages after transfection

Note: P-raw in each day are expressed as 15.737± 0.912, 14.136±

1.324,13.422± 1.245, 13.548± 1.197, 12.473± 1.261, 13.620± 1.386,

n=3. *P<0.05, compared with raw in the same day.

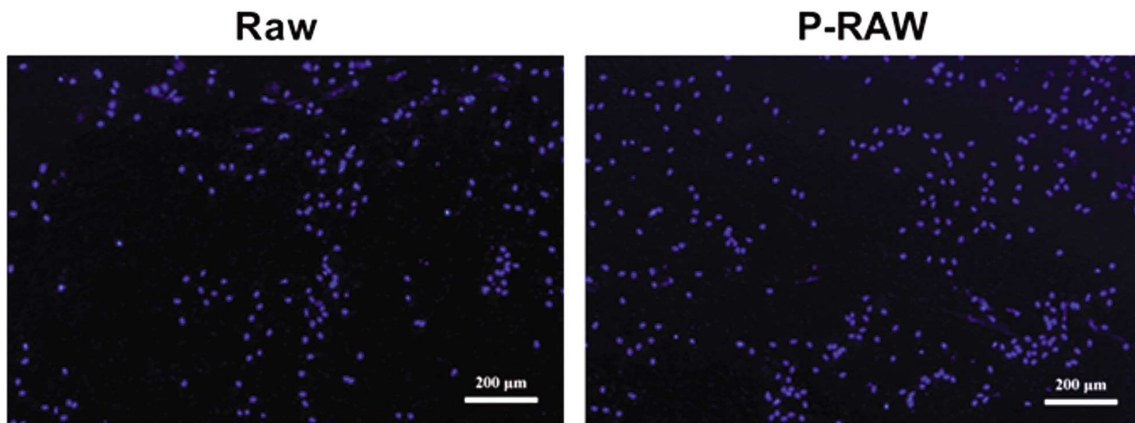


图 11 巨噬细胞对 HUVEC 趋化作用结果

Fig.11 Results of macrophage chemotaxis to HUVEC

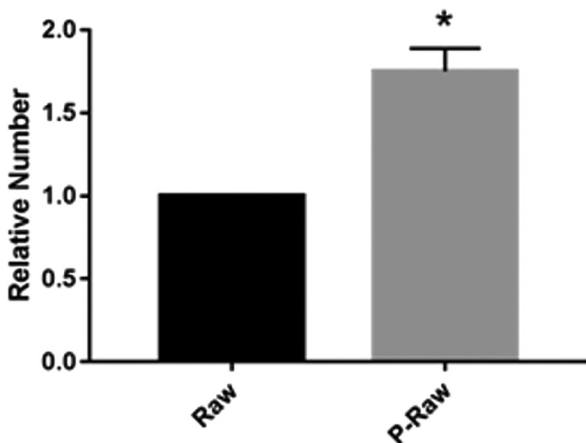


图 12 巨噬细胞对 HUVEC 趋化作用结果统计图

Fig.12 Statistical graph of macrophage cell chemotaxis to HUVEC

Note: P-Raw are expressed as 1.743± 0.178, n=3. *P<0.05, compared with Raw group.

3 讨论

基因治疗的挑战是将 DNA 有效递送至患病细胞^[12]。DNA 的物理化学特征,例如高分子量、负电荷和亲水性,大多数细胞

能够防止其通过被动扩散穿过质膜。用于细胞内传递并且在治疗上可行的基因材料载体应该完成一系列任务,例如:凝聚核酸、保护核酸免于体内泄漏、促进内体逃逸和将 DNA 释放到靶位点^[13]。本实验内验证了 GPEI 聚阳离子包裹质粒后的基本特性,能够确定的是现有方法制作的 GPEI 能够包裹质粒,并且包裹的聚合物总体为正电荷,能够在接触到细胞后与细胞黏附,为细胞吞噬聚合物提供条件;

虽然已经成品的 PEI25kDa 能够满足转染要求,但是其高细胞毒性在很大程度上阻止了其在体内的临床应用^[14],所以我们有必要寻找解决办法,能够避免 PEI25kDa 的缺点,同时提高其作用能力,由于改进后的 PEI 衍生物具有低毒性和高转染效率的特点,我们发现使用戊二醛作为交联剂的低分子量 PEI 聚阳离子能够用于体外和体内 DNA 的细胞内外传递,较 PEI25kDa 有低细胞毒性、高转染效率的优势。GPEI 聚阳离子可以通过静电力相互作用将 DNA 聚合成纳米尺寸的颗粒,聚阳离子外表面的正电荷可以有助于其与细胞膜表面接触。在聚阳离子与质粒聚合物接触到细胞膜之后,细胞会将聚合物以细胞吞噬的形式吞入胞内,形成溶酶体。聚合物会在质子海绵效应的作用下吸引水和氯离子,当达到临界值时,溶酶体膜将会被涨破,释放出包裹的质粒,由此质粒开始发挥其转录 RNA,

进而合成 PTGIS 蛋白的作用。我们在体外研究了细胞接受聚合物转染后发生的变化,细胞免疫荧光显示转染后的巨噬细胞内存在绿色荧光蛋白的存在,从侧面提示 PTGIS 质粒在转染后在细胞内合成;Western Blotting 与 RT-PCR 结果显示不同质量比下 GPEI 转染效率存在差异,在 3:1 质量比下效果最好。

PGI₂ 作为经典的扩血管药物,在临床上使用非常广泛^[15]。下肢动脉缺血病人无论是否采取手术治疗、重建血管后常规需要长时间、每日多次口服或静脉使用 PGI₂^[16]。在体内,PGI₂ 通过其血管舒张,抗炎和抗血栓性质提供血管保护作用^[17]。由于这些有益作用,PGI₂ 已被用于治疗以内皮功能障碍为特征的疾病^[18]。尽管具有良好的临床益处,PGI₂ 治疗仍然很麻烦^[19]。患者必须使用连续输注泵入外源性使用的 PGI₂,因为其循环半衰期短,为 1 至 2 分钟。可以使用更长效的类似物,但都被认为比 PGI₂ 效果差^[20]。本实验中运用 Elisa 与 Transwell 证明巨噬细胞在转染后能跟持续分泌 PGI₂ 并趋化 HUVEC 迁移,能够在体外长时间分泌 PGI₂,能够弥补外源性 PGI₂ 的缺点。

从整个实验结果来看,以 PEI1.8kDa 为基础合成的 GPEI 能够包裹 PTGIS 质粒并将其转染进巨噬细胞,并且对巨噬细胞的表型有明显影响,这为治疗下肢缺血提供了新的方式。

参考文献(References)

- [1] H Reinecke, M Unrath, E Freisinger, et al. Peripheral arterial disease and critical limb ischaemia: still poor outcomes and lack of guideline adherence[J]. *European heart journal*, 2015, 36(15): 932-938
- [2] M Lichtenberg, MA Schreve, R Ferraresi, et al. Surgical and endovascular venous arterialization for treatment of critical limb ischaemia, VASA[J]. *Zeitschrift fur Gefasskrankheiten*, 2018, 47(18): 17-22
- [3] A Farber, R T Eberhardt. The Current State of Critical Limb Ischemia: A Systematic Review[J]. *JAMA surgery*, 2016, 151(16): 1070-1077
- [4] V Vietto, J V Franco, V Saenz, et al. Prostanoids for critical limb ischaemia [J]. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2018, 1(18): CD006544
- [5] S Abe, K Ishida, M Masuda, et al. A prospective, randomized study of inhaled prostacyclin versus nitric oxide in patients with residual pulmonary hypertension after pulmonary endarterectomy[J]. *General thoracic and cardiovascular surgery*, 2017, 65(17): 153-159
- [6] F Liu, L Huang. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery[J]. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2002, 78(02): 259-266
- [7] J Che, A Tao, S Chen, et al. Biologically responsive carrier-mediated anti-angiogenesis shRNA delivery for tumor treatment [J]. *Scientific reports*, 2016, 6(16): 35661
- [8] Y Q Wang, J Su, F Wu, et al. Biscarbamate cross-linked polyethyleneimine derivative with low molecular weight, low cyto toxicity, and high efficiency for gene delivery [J]. *International journal of nanomedicine*, 2012, 7(12): 693-704
- [9] T A Clark, C Sullender, S M Kazmi, et al. Artery targeted photothrombosis widens the vascular penumbra, instigates peri-infarct neovascularization and models forelimb impairments[J]. *Scientific reports*, 2019, 9(19): 2323
- [10] S M Dizaj, S Jafari, A Y Khosroushahi. A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors [J]. *Nanoscale research letters*, 2014, 9(14): 252
- [11] J C Frisbee, A G Goodwill, S J Frisbee, et al. Microvascular perfusion heterogeneity contributes to peripheral vascular disease in metabolic syndrome[J]. *The Journal of physiology*, 2016, 594(16): 2233-2243
- [12] M Thomas, A M Klibanov. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2003, 62(03): 27-34
- [13] M A Valencia-Sanchez, J Liu, G J Hannon, et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs[J]. *Genes & development*, 2006, 20(06): 515-524
- [14] O Gusachenko Simonova, Y Kravchuk, D Konevets, et al. Transfection efficiency of 25-kDa PEI-cholesterol conjugates with different levels of modification [J]. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 2009, 20(09): 1091-1110
- [15] Y Saito, K Nakamura, S Akagi, et al. Epoprostenol sodium for treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. *Vascular health and risk management*, 2015, 11(15): 265-270
- [16] A J Klein, C B Ross. Endovascular treatment of lower extremity peripheral arterial disease [J]. *Trends in cardiovascular medicine*, 2016, 26(16): 495-512
- [17] C Yao, S Narumiya. Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation [J]. *British journal of pharmacology*, 2019, 176 (19): 337-354
- [18] E A Friedman, M L Ogletree, E V Haddad, et al. Understanding the role of prostaglandin E₂ in regulating human platelet activity in health and disease[J]. *Thrombosis research*, 2015, 136(15) 493-503
- [19] S L Dorris, R S Peebles Jr. PGI₂ as a regulator of inflammatory diseases[J]. *Mediators of inflammation*, 2012, 2012(12): 926968
- [20] A Dua, C J Lee. Epidemiology of Peripheral Arterial Disease and Critical Limb Ischemia [J]. *Techniques in vascular and interventional radiology*, 2016, 19(16): 91-95