(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2019 年 10 月 3 日 (03.10.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/184663 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 48/00 (2006.01) *C07C 233/00* (2006.01)
C07C 219/00 (2006.01) *C07F 9/09* (2006.01)
C07C 229/00 (2006.01) *A61P 1/04* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/077004

(22) 国际申请日: 2019 年 3 月 5 日 (05.03.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
PCT/CN2018/081155
2018年3月29日 (29.03.2018) CN

(71) 申请人: 中国医学科学院基础医学研究所 (INSTITUTE OF BASIC MEDICAL SCIENCES CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。

(72) 发明人: 蒋澄宇 (JIANG, Chengyu); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。 李晓芸 (LI, Xiaoyun); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。 杜润超 (DU, Jianchao); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。 梁竹 (LIANG, Zhu); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。 王志清 (WANG, Zhiqing); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。 王晨轩 (WANG, Chenxuan); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。

(74) 代理人: 北京市柳沈律师事务所 (LIU, SHEN & ASSOCIATES); 中国北京市海淀区彩和坊路10号1号楼10层, Beijing 100080 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

WO 2019/184663 A1

(54) **Title:** EXTRACTION OF PLANT SOURCE "MEDICINAL SOUP" AND MANUAL PREPARATION OF "HERBAL MEDICINE" AND RELATED PRODUCTS

(54) 发明名称: 植物来源"汤剂体"的提取和"本草体"的人工制备及其相关产品

(57) **Abstract:** Provided is a preparation method for herbal medicine, comprising the following steps: mixing one or more lipid components and/or with any one or more of the following: nucleic acid, compounds, and macromolecules; and performing heat treatment on the obtained mixture. Also provided is a method for extracting medicinal soup from plants, comprising the following steps: using a solvent to prepare extract solution of a plant; performing differential centrifugation of the extract solution; and using an aqueous solution to re-suspend the precipitate to provide the medicinal soup.

(57) 摘要: 提供制备本草体的方法，包括以下步骤：将一种或多种脂质成分和/或与下列任一项或多项混合：核酸，化合物，大分子；和对所得的混合物进行加热处理。还提供从植物提取汤剂体的方法，包括以下步骤：用溶剂制备所述植物的提取液；对所述提取液进行差速离心；用水性溶液重悬所述沉淀物，以提供汤剂体。

植物来源“汤剂体”的提取和“本草体”的人工制备及其相关产品

本申请要求申请日为2018年03月29日、发明名称为“化合物或中药提取物在制备核酸递送试剂中的应用及其相关产品”、申请号为PCT/CN2018/081155的PCT发明专利申请的优先权，该专利的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

本发明涉及活性物质汤剂体的提取方法以及本草体人工制备方法，具体地涉及从植物药提取活性物质的方法以及本草体人工制备的方法。

背景技术

在中国传统医学研究中，将中药饮片浸泡在水中后煎煮制作成有治疗疾病效果的汤剂。之前大多数有关植物药的研究主要集中在植物药的主要化学成分的功能研究，几乎有很少数的研究关注在植物药中的核酸分子上。

我们之前的研究表明，中草药中存在数百万种小RNA，饮用汤剂后，在人体器官和组织中发现了数以千计的植物药小RNA (Huang et al.，2018)。我们的研究结果表明小RNA可能是植物药的功能成分，并且植物药中小RNA的递送机制可以帮助克服目前临床上治疗性RNAi递送的挑战。自20世纪80年代以来，针对人类基因的核酸的传递药物具有潜在的数万亿美元的市场。自上个世纪以来，FDA批准了六种小RNA药物，包括Vitravene，Macugen，Kynamro，Exondys 51，Defitelio，Spinraza，Patisiran。然而，其递送效果并不是很好，阻碍了核酸的发展。大多数小RNA药物以形成纳米颗粒的形式通过静脉注射递送。

根据中医理论，不同药材的功能成分进入不同的人体器官和组织，针对不同的疾病。人类基因组由大约2万个基因组成，理论上，丰富的植物药小RNA能够调节所有这些基因。我们之前的文章证明，HJT-sRNA-m7可同时下调至少三种纤维化基因(Du et al.，2017)。同时我们实验室提供了筛选和鉴定有效治疗性的小RNA的实验方法和方案。我们认为可以为每个基因鉴定出一

种或者多种植物药小RNA，并且可以通过植物药小RNA来调节人类基因的表达。由于许多疾病涉及不平衡的基因表达，植物药小RNA的组合可能精确地针对疾病中的不平衡基因并提供潜在的治愈效果。

对于植物药小RNA进入人体内的研究，现有技术并没有研究其详细的进入机制，也没有对植物药水煎液进行研究。

本领域需要分离从植物药分离活性组合物，即外泌体样纳米颗粒的新方法以及制备所述活性组合物的新方法。

发明内容

本发明部分基于发明人的下述发现：通过溶剂制备植物药的提取液，然后差速离心可以获得植物药的活性组合物，该活性组合物在用溶剂溶解后为膜结构的纳米颗粒状物质，优选双层膜结构的纳米颗粒状物质，可以口服使用以用于降低一系列炎性因子并且治疗其相关疾病。另外，本发明还部分基于发明的发现：通过加热核酸，特别是小RNA和脂质可以促进核酸插入脂质层中，增加了嵌入脂质膜过程的稳定性。本发明提供了植物活性组合物的新的提取和制备方法以及制备本草体的方法，包括将一种或多种脂质成分或/和下列任一项或多项混合并对混合物进行加热处理：一种或多种合成或提纯的核酸、一种或多种合成或提纯的化合物，一种或多种合成或提纯的大分子。本发明还提供了使用汤剂体或本草体作为有效的治疗疾病的方法。

本发明提供了以下内容:

1.本草体（bencaosome）：人工制备的具有膜结构的纳米颗粒状物质。该膜结构包括一种或多种脂质成分，其特点为来源于化学合成或化学分离提纯，包括但不限于表1或表10所示的脂质或与之有70%及以上近似性的脂质 （脂质近似性由以下方法界定：有相同母体结构），杂质成份低于5%；将脂质与或/和与下列任意一项或多项混合：一种或多种核酸、一种或多种化合物、一种或多种大分子。本草体是通过加热脂质与其他物质，包括一种或多种核酸、一种或多种化合物和/或一种或多种大分子制备的膜结构的纳米颗粒状物质。在本申请中，本草体也可以称为膜结构的活性组合物，优选地通过前文实施方案1-2、5-9或20-28的方法制备的活性组合物。所述一种或多种脂质成分可

以是合成或提纯的，包括但不限于表1或表10所示的脂质；所述一种或多种核酸成分可以是合成或提纯的，包括但不限于表8、9或表13所示的RNA；所述一种或多种化合物可以是合成或提纯的，包括但不限于表2-表5所示的化合物；所述一种或多种大分子成分可以是合成或提纯的，包括但不限于表6或表7所示的蛋白。制备本草体的方法，其包括以下步骤：

(1) 一种或多种脂质成分和下列任一项或多项混合：一种或多种核酸、一种或多种化合物和/或一种或多种大分子；

优选地，所述一种或多种脂质成分是合成或纯化的，选自表1或表10所示的脂质；

(2) 对所得的混合物进行加热处理，

其中优选地，加热温度为约0℃至约100℃，更优选约50℃至约100℃，并且更优选约70℃至90℃，特别优选为约80℃至约90℃，优选90℃；

优选地，加热时间为约0分钟-约24小时，约5分钟-约20小时，约10分钟-约16小时，约30分钟-约12小时，约1小时-约8小时，或者约0.5小时-约4小时，优选5-15分钟；

优选地，所述混合通过将所述脂质成分以有机溶剂中的溶液添加到核酸/大分子/化合物的水性溶液中进行；

优选地，所述有机溶剂包括醇类、醚类、苯类有机溶剂，优选氯仿、乙醚、甲醇、或乙醇；

优选地，所述水性溶液选自水性缓冲液、盐水溶液、有机溶剂的水溶液或水；

优选地，其中所述本草体是膜结构的纳米颗粒状物质，优选双层膜结构的纳米颗粒状物质；

优选地，其中所述本草体用于口服、静脉内施用，如推注或通过连续灌注一段时间，通过皮下、肌肉内、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、损伤内、或吸入路径如鼻内，通常通过静脉内或皮下施用。

2. 根据项1所述的方法，其中所述脂质是Sphinganine(d22:0)，和/或所述小RNA是PGY-sRNA-6或HJT-sRNA-m7，

其中优选地，所述Sphinganine(d22:0)以10mg/ml氯仿溶液使用，

脂质：sRNA= 0.1-20ug:0.1nmol;

其中优选地，所述本草体具有小于60mV、小于50mV、小于0、-80至-20或-60至-20的Zeta电势，并且具有50-1000、90-300或100-200nm的平均粒径。

3. 根据项1或2所述的方法制备的本草体，其用于下列一项或多项：

(1) 降低纤连蛋白和/或alpha-SMA的表达，优选TGF-beta1诱导的MRC-5细胞纤维化模型中纤连蛋白的蛋白表达；

(2) 减少羟脯氨酸，优选肺纤维化模型中的羟脯氨酸，优选小鼠肺纤维化模型中的羟脯氨酸；

(3) 用于预防或治疗纤维化，优选肺纤维化，优选在TGF-beta1诱导的MRC-5细胞的纤维化模型中和博来霉素诱导的小鼠的纤维化模型中；

(4) 降低IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，优选poly(I:C)诱导的A549细胞模型中IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha；

(5) 降低IL-1alpha、IL-1b、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、IL-13、IL-17A、GM-CSF、IFN-gamma或MCP-1beta的水平，优选血浆水平，优选在小鼠炎症模型中；

(6) 或者用于治疗IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha相关疾病，或者用于消炎，优选治疗肺炎、心肌炎、急慢性胃炎、急慢性肠炎、急慢性肝炎、急慢性肾炎、皮炎、脑炎、淋巴炎、结膜炎、角膜炎、虹膜睫状体炎、中耳炎、过敏性鼻炎、哮喘、肺纤维化慢性阻塞性肺疾病、过敏性皮炎、镰状细胞病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、肺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、宫颈癌、乳腺癌、白血病、多发性骨髓瘤、糖尿病和痛风；和

(7) 使小RNA有效进入细胞；和/或

(8) 降低RELA基因表达；

优选地，所述本草体降低纤维化相关蛋白纤连蛋白和alpha-SMA的表达，和/或降低IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，优选poly(I:C)诱导的A549细胞模型中IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha的表达水平。

4. 根据项3所述的本草体用于下列一项或多项的用途，或在制备用于下列一项或多项的药物中的用途，或根据项3所述的本草体用于下列一项或多项的方法：

(1) 降低纤连蛋白和/或alpha-SMA的表达，优选TGF-beta1诱导的MRC-5

细胞纤维化模型中纤连蛋白的蛋白表达;

(2) 减少羟脯氨酸，优选肺纤维化模型中的羟脯氨酸，优选小鼠肺纤维化模型中的羟脯氨酸;

(3) 用于预防或治疗纤维化，优选肺纤维化，优选在TGF-beta1诱导的MRC-5细胞的纤维化模型中和博来霉素诱导的小鼠的纤维化模型中;

(4) 降低IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，优选poly(I:C)诱导的A549细胞模型中IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha;

(5) 降低IL-1alpha、IL-1beta、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、IL-13、IL-17A、GM-CSF、IFN-gamma或MCP-1beta的水平，优选血浆水平，优选在小鼠炎症模型中;

(6) 或者用于治疗IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha相关疾病，或者用于消炎，优选治疗肺炎、心肌炎、急慢性胃炎、急慢性肠炎、急慢性肝炎、急慢性肾炎、皮炎、脑炎、淋巴炎、结膜炎、角膜炎、虹膜睫状体炎、中耳炎、过敏性鼻炎、哮喘、肺纤维化慢性阻塞性肺疾病、过敏性皮炎、镰状细胞病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、肺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、宫颈癌、乳腺癌、白血病、多发性骨髓瘤、糖尿病和痛风; 和

(7) 使小RNA有效进入细胞; 和/或

(8) 降低RELA基因表达;

优选地，所述本草体降低纤维化相关蛋白纤连蛋白和alpha-SMA的表达，和/或降低IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，优选poly(I:C)诱导的A549细胞模型中IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha的表达水平;

优选地，所述药物用于口服、静脉内施用，如推注或通过连续灌注一段时间，通过皮下、肌肉内、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、损伤内、或吸入路径如鼻内，通常通过静脉内或皮下施用。

5. 有助于核酸递送的方法，其包括将核酸和表1或表10中的一种或多种脂质，优选Sphinganine(d22:0)进行加热或升温处理，加热或升温的温度范围优选为约4℃至约100℃，约25℃至约100℃，更优选约50℃至约100℃，更优选约95℃至约100℃，特别优选约80℃至约100℃，例如4℃，37℃，60℃，80℃或100℃，其中优选地，所述核酸是小核酸，优选是单链或双链的，优选地所述小核酸的长度是14-32bp、16-28bp或18-24bp，优选表8、9和13中的

任一种或多种小RNA，优选PGY-sRNA-6或HJT-sRNA-m7；优选地，所述核酸递送通过口服进行；优选地，所述核酸用于治疗疾病，例如炎症相关疾病以及癌症，例如胃癌或肺癌，优选用于抗炎及抗纤维化，优选用于降低炎症相关因子IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，细胞因子风暴IL-1alpha、IL-1beta、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、IL-13、IL-17A、GM-CSF、IFN-gama、RANTES或MCP-1beta，以及降低纤维化相关蛋白纤连蛋白和α-SMA的表达。

6. 项5所述的方法，所述方法还包括进一步混合一种或多种化合物、一种或多种核酸、和/或一种或多种大分子；其中核酸包括DNA和RNA，优选RNA，更加优选小RNA；

优选混合表2-表5所示的一种或多种化合物、一种或多种表8和/或表9和/或表13所示的小RNA、一种或多种DNA和/或表6或7所示的一种或多种大分子。

或者，项5所述的方法，所述方法还包括进一步混合一种或多种化合物、一种或多种DNA、和/或一种或多种大分子；

优选混合表2或4所示的一种或多种化合物、表3或5所示的一种或多种化合物、一种或多种DNA和/或表6或7所示的一种或多种大分子。

7. 项1-6中任一项的方法，其中所述多种脂质是选自下组的脂质组合：第8号:第41号=6:1的脂质组合；第38号:第41号=6:1的脂质组合；第39号:第41号=6:1的脂质组合；第40号:第41号=6:1的脂质组合；第38:12:41:29号=1:2:1:1的脂质组合；第40:12:41号=2:4:3的脂质组合；第12:41号=1:6的脂质组合；第12:41号=1:1的脂质组合；第12:41号=6:1的脂质组合；第40:12:41号=2:2:2的脂质组合；第4:12:41号=1:1:1的脂质组合；第1:2:3:19:35号=1:1:1:1:1的DG组合；第6:9:10:13:15:16:18:20:21:22:23:24:25:26:27:28:32:33号=1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1的TG组合；第36:37号=1:1的LPC组合；第11:12号=1:1的PC组合；第8:38号=1:1的PE组合；第4:14号=1:1的Cer组合；第17:30:31号=1:1:1的So组合；无第5、7号的第1-36号的等体积组合；无第5、7、34号的第1-36号的等体积组合；无第5、7、1、2、3、19、35号的第1-36号的等体积组合；无第5、7、6、9、10、13、15、16、18、20、21、22、23、24、25、26、27、28、32、33号的第1-36号的等体积组合；无第5、7、36、37号

的第1-36号的等体积组合；无第5、7、11、12号的第1-36号的等体积组合；无第5、7、8号的第1-36号的等体积组合；无第5、7、4、14号的第1-36号的等体积组合；无第5、7、29号的第1-36号的等体积组合；脂质第1号:第34号=2:1；脂质第1号:所述DG组合=2:1；脂质第1号:所述TG组合=2:1；脂质第1号:所述LPC组合=2:1；脂质第1号:第8号=2:1；脂质第1号:第12号=2:1；脂质第1号:所述Cer组合=2:1；脂质第1号:So组合=2:1；脂质第1号:第29号=2:1；脂质第1号:第8号:第12号=1:1:1；脂质第8号:第34号=2:1；脂质第8号:DG组合=2:1；脂质第8号:TG组合=2:1；脂质第8号:LPC组合=2:1；脂质第8号:第37号=4:1；脂质第8号:第12号=2:1；脂质第8号:Cer组合=2:1；脂质第8号:So组合=2:1；脂质第8号:第31号=6:1；脂质第8号:第29号=2:1；第12号:第34号=2:1；第12号:DG组合=2:1；第12号:TG组合=2:1；第12号:LPC组合=2:1；第12号:脂质第8号=2:1；第12号:Cer组合=2:1；第12号:So组合=2:1；第12号:第29号=2:1；第12号:脂质第8号:第1&2号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第15号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第36&37号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第11号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第12号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第4号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第31号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第29号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第34号=3:2:1；第12号:脂质第8号:第34号=4:2:3；第12号:脂质第8号:脂质第2号=4:2:3；第12号:脂质第8号:脂质第2号=16:8:3；第12号:脂质第8号:第32号=4:2:3；第12号:脂质第8号:第37号=4:2:3；第12号:脂质第8号:第11号=4:2:3；第12号:脂质第8号:第38号=4:2:3；第12号:脂质第8号:第4号=4:2:3；第12号:脂质第8号:第31号=4:2:3；第12号:脂质第8号:第29号=4:2:3；第12号:脂质第8号:第29号:第31号=2:1:1:1；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:第34号=4:2:2:2:5；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:脂质第2号=4:2:2:2:5；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:第32号=4:2:2:2:5；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:第11号=4:2:2:2:5；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:第37号=4:2:2:2:5；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:第38号=4:2:2:2:5；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:第4号=4:2:2:2:5；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:第4号:脂质第1号:第16号=2:1:1:3:2:2:3；脂质第1号:脂质第8号:第12号:脂质第1&2号=2:2:2:3；脂质第1号:脂质第8号:第12号:第15号=2:2:2:3；脂质第1号:脂质第8号:第12号:第36&37号=2:2:2:3；脂质第1号:脂质第8号:第12号:第12号=2:2:2:3；脂质第1

号:脂质第8号:第12号:第4号=2:2:2:3; 脂质第1号:脂质第8号:第12号:第31号=2:2:2:3; 脂质第1号:脂质第8号:第12号:第29号=2:2:2:3; 脂质第8号:第34号:脂质第1&2号=2:1:1; 脂质第8号:第34号:第15号=2:1:1; 脂质第8号:第34号:第36&37号=2:1:1; 脂质第8号:第34号:第12号=2:1:1; 脂质第8号:第34号:第4号=2:1:1; 脂质第8号:第34号:第31号=2:1:1; 脂质第8号:第34号:第29号=2:1:1; 脂质第8号:第31号:第34号=12:3:5; 脂质第8号:第31号:脂质第2号=12:3:5; 脂质第8号:第31号:第37号=12:3:5; 脂质第8号:第31号:第11号=12:3:5; 脂质第8号:第31号:第12号=12:3:5; 脂质第8号:第31号:第4号=12:3:5; 脂质第8号:第31号:第29号=12:3:5; 脂质第8号:第31号:第32号=12:3:5; 脂质第8号:第4号:第34号=12:3:5; 脂质第8号:第4号:脂质第2号=12:3:5; 脂质第8号:第4号:第37号=12:3:5; 脂质第8号:第4号:第12号=12:3:5; 脂质第8号:第4号:第31号=12:3:5; 脂质第8号:第4号:第29号=12:3:5; 脂质第8号:第4号:第32号=12:3:5; 第38号:第34号=2:1; 第38号:脂质第1号=2:1; 第38号:脂质第2号=2:1; 第38号:第1&2号=2:1; 第38号:第15号=2:1; 第38号:第32号=2:1; 第38号:第37号=2:1; 第38号:第37号=4:1; 第38号:第11号=2:1; 第38号:第12号=2:1; 第38号:第11&12号=2:1; 第38号:第12号=4:1; 第38号:脂质第8号=2:1; 第38号:第4号=2:1; 第38号:So(30)=2:1; 第38号:第31号=2:1; 第38号:第29号=2:1; 脂质第1号:第38号:第12号:第34号=2:2:2:3; 脂质第1号:第38号:第12号:第15号=2:2:2:3; 脂质第1号:第38号:第12号:第37号=2:2:2:3; 脂质第1号:第38号:第12号:脂质第8号=2:2:2:3; 脂质第1号:第38号:第12号:第4号=2:2:2:3; 脂质第1号:第38号:第12号:第31号=2:2:2:3; 脂质第1号:第38号:第12号:第29号=2:2:2:3; 第38号:第34号:脂质第1号=2:1:3; 第38号:第34号:第15号=2:1:3; 第38号:第34号:第37号=2:1:3; 第38号:第34号:第12号=2:1:3; 第38号:第34号:脂质第8号=2:1:3; 第38号:第34号:第4号=2:1:3; 第38号:第34号:第31号=2:1:3; 第38号:第34号:第29号=2:1:3; 第38号:第12号:脂质第1号=2:1:3; 第38号:第12号:脂质第2号=4:1:3; 第38号:第12号:第15号=2:1:3; 第38号:第12号:第37号=2:1:3; 第38号:第12号:脂质第8号=2:1:3; 第38号:第12号:第4号=2:1:3; 第38号:第12号:第31号=2:1:3; 第38号:第12号:第29号=2:1:3; 第38号:第12号:脂质第1号:第15号:第34号=22:22:22:33:36; 第38号:第12号:脂质第1号:第15号:第37号=22:22:22:33:36; 第38号:第12号:脂质第1号:第15号:第4号=22:22:22:33:36; 第38号:第12号:脂质

第1号:第15号:第31号=22:22:22:33:36; 第38号:第12号:脂质第1号:第15号:第29号=22:22:22:33:36; 第38号:第34号:第37号:脂质第1号=44:22:33:36; 第38号:第34号:第37号:第15号=44:22:33:36; 第38号:第34号:第37号:第12号=44:22:33:36; 第38号:第34号:第37号:第4号=44:22:33:36; 第38号:第34号:第37号:第31号=44:22:33:36; 第38号:第12号:第4号:第34号=44:22:33:36; 第38号:第12号:第4号:脂质第1号=44:22:33:36; 第38号:第12号:第4号:第15号=44:22:33:36; 第38号:第12号:第4号:第37号=44:22:33:36; 第38号:第12号:第4号:第37号=8:2:5:3; 第38号:第12号:第4号:第31号=44:22:33:36; 第38号:第12号:第4号:第29号=44:22:33:36; 第38号:第12号:第4号:第29号:第34号=88:44:66:72:135; 第38号:第12号:第4号:第29号:脂质第1号=88:44:66:72:135; 第38号:第12号:第4号:第29号:第15号=88:44:66:72:135; 第38号:第12号:第4号:第29号:第37号=88:44:66:72:135; 第38号:第12号:第4号:第29号:第31号=88:44:66:72:135; 第38号:第12号:第4号:脂质第2号=20:10:15:9; 第38号:第12号:第4号:第6号=20:10:15:9; 第38号:第12号:第4号:第17号=20:10:15:9; 第38号:第12号:第4号:第29号=20:10:15:9; 第38号:第12号:第4号:第34号=20:10:15:9; 第38号:第12号:第4号:第37号=20:10:15:9; 第38号:第12号:第31号:第34号=2:1:3:3; 第38号:第12号:第31号:脂质第1号=2:1:3:3; 第38号:第12号:第31号:第15号=2:1:3:3; 第38号:第12号:第31号:第37号=2:1:3:3; 第38号:第12号:第31号:第4号=2:1:3:3; 第38号:第12号:第31号:第29号=2:1:3:3; 第38号:第34号:第37号:第31号:脂质第1号=88:44:66:72:135; 第38号:第34号:第37号:第31号:第15号=88:44:66:72:135; 第38号:第34号:第37号:第31号:第12号=88:44:66:72:135; 第38号:第34号:第37号:第31号:第4号=88:44:66:72:135; 第38号:第34号:第37号:第31号:第29号=88:44:66:72:135; 第38号:第37号:第34号=4:2:3; 第38号:第37号:脂质第1号=4:2:3; 第38号:第37号:脂质第2号=4:2:3; 第38号:第37号:第1&2号=4:2:3; 第38号:第37号:脂质第2号=32:8:5; 第38号:第37号:第32号=32:8:5; 第38号:第37号:第15号=4:2:3; 第38号:第37号:第32号=4:2:3; 第38号:第37号:脂质第8号=4:2:3; 第38号:第37号:第11号=4:2:3; 第38号:第37号:第12号=4:2:3; 第38号:第37号:第11&12号=4:2:3; 第38号:第37号:第12号=4:1:1; 第38号:第37号:第4号=4:2:3; 第38号:第37号:第30号=4:2:3; 第38号:第37号:第31号=4:2:3; 第38号:第37号:第29号=4:2:3; 脂质第8号:第37号:

第32号=4:1:2；脂质第8号:第37号:脂质第2号=4:1:2；第38号:第37号:第15号:第34号=64:16:10:45；第38号:第37号:第15号:脂质第1号=64:16:10:45；第38号:第37号:第15号:第12号=64:16:10:45；第38号:第37号:第15号:第4号=64:16:10:45；第38号:第37号:第15号:第31号=64:16:10:45；第38号:第37号:第15号:第29号=64:16:10:45；第38号:脂质第2号:第37号=4:2:3；第38号:脂质第2号:第31号=4:2:3；第38号:脂质第2号:第29号=4:2:3；第38号:脂质第2号:第34号=4:2:3；第38号:脂质第2号:第32号=4:2:3；第38号:脂质第2号:第12号=4:2:3；第38号:脂质第2号:第12号=4:5:1；第38号:脂质第2号:第4号=4:2:3，脂质第1&2号、第11&12号或第36&37号分别表示任何比例的脂质第1和2号、第11和12号或第36和37号。

8. 促进核酸与脂质形成本草体的方法，其包括加热核酸和脂质的混合物以促进嵌入脂质膜，促进脂质-核酸复合物的稳定性，如通过临界胶束浓度测定的;

其中核酸插入脂质层或被脂质层包裹形成本草体，其是膜结构的纳米颗粒状物质，优选双层膜结构的纳米颗粒状物质;

其中优选地，加热温度为约0℃至约100℃，更优选约50℃至约100℃，并且更优选约80℃至100℃，特别优选为约80℃至约90℃，优选90℃;

优选地，加热时间为约0分钟-约24小时，约5分钟-约20小时，约10分钟-约16小时，约15分钟-约12小时，约1小时-约8小时，或者约2小时-约4小时，优选15分钟;

优选地，所述脂质是表1或表10中的一种或多种脂质，优选Sphinganine(d22:0)，或项7中的脂质组合；优选地，所述核酸是小RNA，优选表8、9和13所示的一种或多种小RNA，优选PGY-sRNA-6或HJT-sRNA-m7。

9. 脂质递送蛋白质至细胞的方法，所述方法包括加热蛋白质和脂质，其中优选地，加热温度为约0℃至约100℃，更优选约50℃至约100℃，并且更优选约80℃至100℃，特别优选为约80℃至约90℃，优选90℃;

优选地，加热时间为约0分钟-约24小时，约5分钟-约20小时，约10分钟-约16小时，约15分钟-约12小时，约1小时-约8小时，或者约2小时-约4小时，优选6小时;

或者所述脂质递送蛋白质至细胞的方法包括将蛋白质溶液与脂质的有

机溶剂溶液混合（v/v=1/5），挥发除去有机溶剂，并且用水性试剂水化；或用水煮法制备，向蛋白质溶液中加入脂质的有机溶剂溶液，混合后进行升温处理；

或者所述脂质递送蛋白质至细胞的方法包括将蛋白质与脂质的有机溶剂溶液混合，然后除去有机溶剂，并且用水性试剂水化；

优选地，所述脂质是表1或表10中的一种或多种脂质，优选sphinganine(d22:0)或PE(16:0/16:0)或PE(16:0/22:1)。

10. 汤剂体（decoctosome）：由脂质、蛋白质、核酸和化合物等物质构成的，来源于植物汤剂中的具有热稳定性的外泌体样的膜结构的纳米颗粒状物质。在本申请中，汤剂体也可以称为膜结构的活性组合物，优选地通过前文实施方案10-13的方法制备的活性组合物。从植物制备汤剂体的方法，所述方法包括以下步骤：

(1) 用溶剂，优选地水性溶剂制备所述植物的提取液，

其中优选地通过煎煮经所述溶剂浸泡的植物制备所述植物的提取液；

其中优选地，所述煎煮是强火煎煮15-45min，优选20-30min，优选30min，然后文火煎煮5-30min，优选5-20min，优选10min；

其中优选地，所述强火的温度是90℃以上，优选90℃-2000℃，90℃-1500℃，90℃-1000℃，90℃-500℃，90℃-300℃，90℃-250℃或90℃-200℃；

优选地，所述文火的温度是50℃以上，优选50℃-2000℃，50℃-1500℃，50℃-1000℃，50℃-500℃，50℃-300℃，50℃-250℃，50℃-200℃，50℃-100℃，50℃-80℃，50℃-70℃或50℃-60℃；

优选地，所述水性溶剂选自水性缓冲液、盐水溶液、有机溶剂的水溶液或水；

(2)对所述提取液在适当的温度，优选0-10℃，4℃条件下进行差速离心，优选以800-5000g，优选1000g-4000g，优选2000-3000g，优选2000g离心20-40min，优选30min离心，取上清液，然后对上清液以6000g-15000g，优选7000g-12000g，优选8000g-11000g，优选10000g离心20-40min，优选30min，取上清液，然后对上清液以100000-200000，优选200000g离心60-120min，优选90min，取沉淀物，所述沉淀物是所述汤剂体的固体形式；以及

(3) 任选地，用水性溶液，优选水性缓冲液，优选PBS缓冲液，更优选

pH7-9，优选pH7.4的PBS缓冲液重悬所述沉淀物，以提供汤剂体，其是膜结构的纳米颗粒状物质，优选双层膜结构的纳米颗粒状物质，所述水性溶液选自水性缓冲液、盐水溶液、有机溶剂的水溶液或水。

11. 通过根据项10所述的方法，其中所述汤剂体具有30-1,000nm，优选80-300nm的平均粒径，且具有20-100mV的电位绝对值。

12. 通过根据项10或11所述的方法，其中所述植物选自蒲公英、红景天、穿心莲、卷心菜和木香等。

13. 通过根据项10-12中任一项所述的方法，其中对于蒲公英，所述汤剂体具有30-300nm，优选150-200nm的平均粒径峰值，且具有-39 ± 3 mV的Zeta电势；对于红景天，所述汤剂体具有50-300 nm，优选150-210 nm的平均粒径，且具有-37 ± 2 mV的Zeta电势；

蒲公英汤剂体具有20-100 mV的电位绝对值范围；红景天汤剂体具有20-100 mV的电位绝对值范围。

14. 通过项10-13中任一项所述的方法制备的汤剂体，其中所述汤剂体是固体形式或液体形式或胶体形式，所述汤剂体包含膜结构的纳米颗粒状物质，优选双层膜结构的纳米颗粒状物质。

15. 根据项14所述的汤剂体，其包含表1或表10所示的一种或多种脂质成分、一种或多种化合物、一种或多种DNA、一种或多种大分子、和/或一种或多种RNA；

优选地，所述汤剂体包含表1或表10所示的一种或多种脂质成分、表2或4所示的一种或多种化合物、表3或5所示的一种或多种化合物、表6或7所示的一种或多种大分子、和/或表8、9或13所示的一种或多种小RNA。

16. 根据项14或15所述的汤剂体，其是用于口服、静脉内施用，如推注或通过连续灌注一段时间，通过皮下、肌肉内、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、损伤内、或吸入路径如鼻内，通常通过静脉内或皮下施用的组合物。

17. 根据项14-16中任一项所述的汤剂体，其用于下列一项或多项：

(1) 降低纤连蛋白的表达，优选TGF-beta1诱导的MRC-5细胞纤维化模型中纤连蛋白的蛋白表达；

(2) 减少羟脯氨酸，优选肺纤维化模型中的羟脯氨酸，优选小鼠肺纤维

化模型中的羟脯氨酸;

(3) 用于预防或治疗纤维化，优选肺纤维化;

(4) 降低IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，优选poly(I:C)诱导的A549细胞模型中IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha;

(5) 降低IL-1alpha、IL-1beta、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、IL-13、IL-17A、GM-CSF、IFN-gamma或MCP-1beta的水平，优选血浆水平，优选在小鼠炎症模型中;

(6) 或者用于治疗IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha相关疾病，或者用于消炎，优选治疗肺炎、心肌炎、急慢性胃炎、急慢性肠炎、急慢性肝炎、急慢性肾炎、皮炎、脑炎、淋巴炎、结膜炎、角膜炎、虹膜睫状体炎、中耳炎、过敏性鼻炎、哮喘、肺纤维化慢性阻塞性肺疾病、过敏性皮炎、镰状细胞病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、肺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、宫颈癌、乳腺癌、白血病、多发性骨髓瘤、糖尿病和痛风; 和/或

(7) 降低RELA基因表达。

18. 根据项14-16中任一项所述的汤剂体用于制备药物的用途，所述药物用于下列一项或多项:

(1) 降低纤连蛋白的表达，优选TGF-beta1诱导的MRC-5细胞纤维化模型中纤连蛋白的蛋白表达;

(2) 减少羟脯氨酸，优选肺纤维化模型中的羟脯氨酸，优选小鼠肺纤维化模型中的羟脯氨酸;

(3) 用于预防或治疗纤维化，优选肺纤维化;

(4) 降低IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，优选poly(I:C)诱导的A549细胞模型中IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha;

(5) 降低IL-1alpha、IL-1beta、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、IL-13、IL-17A、GM-CSF、IFN-gamma或MCP-1beta的水平，优选血浆水平，优选在小鼠炎症模型中;

(6) 或者用于治疗IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha相关疾病，或者用于消炎，优选肺炎、心肌炎、急慢性胃炎、急慢性肠炎、急慢性肝炎、急慢性肾炎、皮炎、脑炎、淋巴炎、结膜炎、角膜炎、虹膜睫状体炎、中耳炎、过敏性鼻炎、哮喘、肺纤维化慢性阻塞性肺疾病、过敏性皮炎、镰状细胞病、多

发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、肺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、宫颈癌、乳腺癌、白血病、多发性骨髓瘤、糖尿病和痛风;

(7) 降低RELA基因表达;

其中所述药物用于口服、静脉内施用，如推注或通过连续灌注一段时间，通过皮下、肌肉内、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、损伤内、或吸入路径如鼻内，通常通过静脉内或皮下施用。

19. 用于以下目的的方法，所述方法包括使用根据项14-16中任一项所述的汤剂体:

(1) 降低纤连蛋白的表达，优选TGF-beta1诱导的MRC-5细胞纤维化模型中纤连蛋白的蛋白表达;

(2) 减少羟脯氨酸，优选肺纤维化模型中的羟脯氨酸，优选小鼠肺纤维化模型中的羟脯氨酸;

(3) 用于预防或治疗纤维化，优选肺纤维化;

(4) 降低IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，优选poly(I:C)诱导的A549细胞模型中IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha;

(5) 降低IL-1alpha、IL-1beta、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、IL-13、IL-17A、GM-CSF、IFN-gamma或MCP-1beta的水平，优选血浆水平，优选在小鼠炎症模型中;

(6) 或者用于治疗IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha相关疾病，或者用于消炎; 和/或

(7) 降低RELA基因表达。

在各个实施方案中，本文所述的汤剂体、本草体、药物或组合物可以通过口服、静脉内施用，如推注或通过连续灌注一段时间，通过皮下、肌肉内、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、损伤内、或吸入路径如鼻内，通常通过静脉内或皮下施用。

在各个实施方案中，本文所述的汤剂体或本草体可以用于(1) 降低纤连蛋白和/或alpha-SMA的表达，优选TGF-beta1诱导的MRC-5细胞纤维化模型中纤连蛋白的蛋白表达; (2) 减少羟脯氨酸，优选肺纤维化模型中的羟脯氨酸，优选小鼠肺纤维化模型中的羟脯氨酸; (3) 用于预防或治疗纤维化，优选肺纤维化，优选在TGF-beta1诱导的MRC-5细胞的纤维化模型中和博来霉素诱

导的小鼠的纤维化模型中；(4) 降低IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，优选poly(I:C)诱导的A549细胞模型中IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha；(5) 降低IL-1alpha、IL-1beta、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、IL-13、IL-17A、GM-CSF、IFN-gamma或MCP-1beta的水平，优选血浆水平，优选在小鼠炎症模型中；(6) 或者用于治疗IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha相关疾病，或者用于消炎；和(7) 使小RNA有效进入细胞；和/或(8) 降低RELA基因表达；可以用于治疗肺炎、心肌炎、急慢性胃炎、急慢性肠炎、急慢性肝炎、急慢性肾炎、皮炎、脑炎、淋巴炎、结膜炎、角膜炎、虹膜睫状体炎、中耳炎、过敏性鼻炎、哮喘、肺纤维化慢性阻塞性肺疾病、过敏性皮炎、镰状细胞病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、肺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、宫颈癌、乳腺癌、白血病、多发性骨髓瘤、糖尿病和痛风。

在各个实施方案中，核酸是合成或提纯的，选自RNA和DNA，例如选自单链或双链或部分双链的RNA和DNA。

在各个实施方案中，RNA选自：信使RNA (mRNA)、rRNA(核糖体RNA)、tRNA(转运RNA)、不均一核RNA (hnRNA)、小核RNA (snRNA)、核仁小RNA (snoRNA)、小胞质RNA、小RNA、转移-信使RNA (tmRNA)、端粒酶RNA和反义RNA，优选小RNA，优选表8、9或13所示的一种或多种小RNA。

在各个实施方案中，DNA选自：互补DNA (cDNA)、叶绿体DNA、多拷贝单链DNA (msDNA)、线粒体DNA (mtDNA)和核糖体DNA (rDNA)。

在各个实施方案中，化合物是合成或纯化的，包括小分子药物和/或表2-5所示的一种或多种化合物。

在各个实施方案中，大分子是合成或纯化的，选自蛋白质或抗体或多糖，和/或表6或7所示的一种或多种大分子。

在各个实施方案中，蛋白质选自抗体、β-乳球蛋白、白蛋白、促红细胞生成素(EPO)、干扰素、集落刺激因子和组织纤溶酶原激活剂和各种标记蛋白质，例如绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、藻红蛋白等。

在各个实施方案中，抗体选自：IgG、IgA、IgM、IgD或IgE类的抗体。

附图说明

图1. 植物药汤剂体的制备流程示意图。

图2. HJT汤剂体的透射电镜结果。

图3. PGY汤剂体的透射电镜结果。

图4. HJT汤剂体的粒径和Zeta电势结果。

图5. PGY汤剂体的粒径和Zeta电势结果。

图6. HJT水煎液可降低TGF-β1诱导的MRC-5细胞纤维化模型中纤连蛋白的蛋白表达。

图7. HJT汤剂体可降低TGF-β1诱导的MRC-5细胞纤维化模型中纤连蛋白的蛋白表达。

图8A-C. PGY水煎液可降低poly(I:C)诱导的A549细胞炎症模型中IL-1β/IL-6/TNF-α mRNA的相对表达。

图9A-C. PGY汤剂体可降低poly(I:C)诱导的A549细胞炎症模型中IL-1β/IL-6/TNF-α mRNA的相对表达。

图9D-E: PGY汤剂和汤剂体可降低A549细胞炎症模型中IL-6的蛋白表达水平。

图9F: HJT汤剂体RNA的RNA酶A和DNA酶I的酶切结果。

图9G: PGY汤剂体RNA的RNA酶A和DNA酶I的酶切结果。

图10. 对照MX和HJT汤剂体在小鼠肺纤维化模型中降低羟脯氨酸表达的测定结果。

图11. 对照MX和HJT汤剂体缓解小鼠肺纤维化模型中的马松染色的结果。

图12. 对照MX和HJT汤剂体缓解小鼠肺纤维化模型中的马松染色的统计结果。

图13. 对照MX和HJT汤剂体缓解小鼠肺纤维化模型中的病理学检测结果。

图14A-B. 对照卷心菜和PGY汤剂体降低小鼠炎症模型中的血浆中细胞因子表达的检测结果。

图15. HJT汤剂体中的脂质鉴定结果。

图16. PGY汤剂体中的脂质鉴定结果。

图17. HJT汤剂体中的小分子鉴定结果。

图18. PGY汤剂体中的小分子鉴定结果。

图19. HJT汤剂体中的蛋白质鉴定结果。

图20. PGY汤剂体中的蛋白质鉴定结果。

图21. HJT汤剂体中小RNA长度分布。

图22. PGY汤剂体中小RNA长度分布。

图23. 本草体的制备流程示意图。

图24. RT-PCR检测HJT-sRNA-m7的相对表达。

图25. 流式细胞术检测HJT-sRNA-m7的进入。

图26. 细胞共聚焦实验检测Cy5标记的HJT-sRNA-m7的进入。

图27. 蛋白免疫印迹实验检测Sphinganine-HJT-sRNA-m7加入后降低细胞纤维化相关蛋白纤连蛋白和α-基质蛋白(α-SMA)的表达。

图28. RT-PCR实验检测不同PGY小RNA在A549细胞炎症模型中降低IL-1β/IL-6/TNF-α相对表达。

图29A-C. RT-PCR检测转染PGY-sRNA-6降低poly(I:C)刺激A549细胞后IL-1β/IL-6/TNF-α的相对表达。

图30A-C. RT-PCR检测转染PGY-sRNA-6降低poly(I:C)刺激的PBMC细胞后IL-1β/IL-6/TNF-α的相对表达。

图31. RT-PCR检测转染PGY-sRNA-6降低poly(I:C)刺激的A549细胞后RELA基因的相对表达。

图32. 双荧光报告基因检测RELA为PGY-sRNA-6的靶基因。

图33. PGY-sRNA-6在PGY水煎液和PGY汤剂体中的峰度分析。

图34. RT-PCR检测PGY-sRNA-6的相对摄取量。

图35. 流式细胞术检测PGY-sRNA-6的进入。

图36. 细胞共聚焦实验检测Cy3标记的PGY-sRNA-6的进入。

图37A-C. RT-PCR检测Sphinganine-PGY-sRNA-6降低poly(I:C)刺激的A549细胞中IL-1β/IL-6/TNF-α mRNA的相对表达。

图38. 双荧光报告基因检测Sphinganine-PGY-sRNA-6加入后相对荧光强度。

图39. Sphinganine- HJT-sRNA-m7缓解小鼠肺纤维化模型中的病理学检测结果。

图40. Sphinganine- HJT-sRNA-m7缓解小鼠肺纤维化模型中的马松染色结果。

图41. Sphinganine- HJT-sRNA-m7缓解小鼠肺纤维化模型中的马松染色统计结果。

图42A-G: Sphinganine-PGY-sRNA-6降低小鼠炎症模型血浆中的细胞因子表达含量检测结果。

图43: 通过测定1,6-二苯基1,3,5-己三烯(DPH)荧光发射强度对表面活性剂浓度的依赖性，显示了仅小RNA以及仅Sphinganine的临界胶束浓度(cmc)值。

图44A-D：在加热处理和未加热处理的情况下，本草体sphinganine(So(d22:0))+200nM或600nM sRNA的CMC性质。

图45: 比较水、So(d22:0)、So(d22:0)+200nM、400nM或600nM sRNA的静态光散射强度。

图46: 比较So(d22:0)、So(d22:0)+200nM、400nM或600nM sRNA的Zeta电位。

图47A-B: So(d22:0)和So(d22:0)+ 600nM sRNA的粒径分布。

图47C-D: So(d22:0)和So(d22:0)+ 600nM sRNA的透射电镜。

图48: 不同类别脂质组合递送单链核酸进入MRC-5。

图49A-B: 脂质组合递送单链核酸进入MRC-5或Caco-2细胞。

图50: 脂质组合递送单链核酸进入细胞。

图51: 脂质组合递送单链核酸进入细胞。

图52: 脂质组合递送单链核酸进入细胞。

图53: 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞。

图54: 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞。

图55: 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞。

图56: 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞。

图57: 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞。

图58: 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞。

图59: 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞。

图60: 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞。

图61：脂质组合递送单链核酸进入A549细胞。

图62：脂质组合递送单链核酸进入A549细胞。

图63：脂质组合递送单链核酸进入A549细胞。

图64：脂质组合递送单链核酸进入A549细胞。

图65：脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞。

图66：脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞。

图67：脂质组合递送双链核酸进入A549细胞。

图68：脂质组合递送双链核酸进入A549细胞。

图69：脂质组合递送双链核酸进入A549细胞。

图70：脂质组合递送双链核酸进入A549细胞。

图71：脂质组合递送双链核酸进入A549细胞。

图72：脂质组合递送双链核酸进入A549细胞。

图73：脂质组合递送双链核酸进入A549细胞。

图74：脂质组合递送双链核酸进入A549细胞。

图75：脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞。

图76：脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞。

图77：脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞。

图78：脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞。

图79：脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞。

图80：脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞。

图81：脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞。

图82：脂质组合促进核酸通过消化道进入肺。

图83：No.8(PE)：No.12(PC)(v:v=1:2)介导抗纤维化HJT-sRNA-m7进入MRC-5细胞降低纤连蛋白表达。

图84：No.8(PE):No.12(PC)(v:v=1:2)介导siRNA进入A549细胞抑制相应蛋白表达。

图85：No.8(PE):No.12(PC)(v:v=1:2)介导siRNA进入A549细胞抑制相应蛋白表达。

图86：No.8(PE):No.12(PC)(v:v=1:2)介导siRNA进入THP-1细胞抑制相应蛋白表达。

图 87： No.8(PE):No.12(PC):No.2(DG)(v:v:v=2:4:3) 介导抗纤维化HJT-sRNA-m7进入MRC-5细胞降低纤连蛋白表达。

图88: No.8(PE):No.12(PC):No.2(DG)(v:v:v=2:4:3)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达（水煮法）。

图89: No.8(PE):No.12(PC):No.4(Cer)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物介导抗纤维化HJT-sRNA-m7进入MRC-5细胞 (水煮法)。

图 90： No.8(PE):No.12(PC):No.4(Cer)(v:v:v=1:2:1) 脂质混合物介导NFκBsiRNA进入THP-1细胞抑制基因表达(水煮法)。

图91：No.8(PE):No.12(PC):No.PC(11)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达。

图 92： No.8(PE):No.12(PC):No.LPC(37)(v:v:v=1:2:1) 脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达。

图 93： No.8(PE):No.12(PC):No.MG(34)(v:v:v=2:3:1) 脂质混合物介导CPSF4siRNA进入A549细胞抑制基因表达。

图94: No.38(PE):No.37(LPC):No.32(TG)(v:v:v=32:8:5)脂质混合物介导抗纤维化HJT-sRNA-m7进入MRC-5细胞 (水煮法)。

图95： No.38(PE):No.37(LPC):No.32(TG)(v:v:v=32:8:5)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达。

图96: No.1(DG)、No.8(PE)、No.12(PC)、No.4(Cer)、No.31(So)、No.29(FA)、No.16(TG)(v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3) 介导抗纤维化HJT-sRNA-m7进入MRC-5细胞 (水煮法)降低纤连蛋白表达。

图97: No.1(DG)、No.8(PE)、No.12(PC)、No.4(Cer)、No.31(So)、No.29(FA)、No.16(TG)(v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达(水煮法)。

图 98： No.8(PE):No.12(PC):No.31(So):No.29(FA):No.4(Cer)(v:v:v:v:v=2:4:2:2:2.5) 介导具有抗纤维化效应的HJT 小RNA HJT-sRNA-3、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3、HJT-sRNA-m7进入MRC-5细胞 (水煮法)降低纤连蛋白表达。

图 99： No.8(PE):No.12(PC):No.31(So):No.29(FA):No.4(Cer)(v:v:v:v:v=2:4:2:2:5) 脂质

混合物可以有效递送核酸进入细胞发挥作用。

图100: No.38(PE):No.37(LPC)(v:v =4:1)介导具有抗纤维化效应的HJT 小RNA HJT-sRNA-3、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3、HJT-sRNA-m7进入MRC-5细胞 (水煮法) 降低纤连蛋白及alpha-基质蛋白表达。

图101: No.38(PE):No.37(LPC)(v:v =4:1)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达(水煮法)。

图102: No.38(PE):No.12(PC):No.2(DG)(v:v:v =4:1:3)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达。

图103: No.38(PE):No.37(LPC):No.12(PC)(v:v:v=4:1:1)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达(逆向蒸发法)。

图104: No.4(Cer): No.12(PC):No.38(PE):No.37(LPC)(v:v:v:v =5:2:8:3)脂质混合物介导抗纤维化小RNA HJT-sRNA-3、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3、HJT-sRNA-m7进入MRC-5细胞 (水煮法)。

图105: No.4(Cer): No.12(PC):No.38(PE):No.37(LPC)(v:v:v:v =5:2:8:3)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达(水煮法)。

图106: No.38(PE):No.2(DG):No.31(So)(v:v:v=4:2:3)脂质混合物介导抗纤维化小RNA HJT-sRNA-3、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3、HJT-sRNA-m7进入MRC-5细胞 (水煮法)。

图107: No.38(PE):No.2(DG):No.31(So)(v:v:v=4:2:3)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达(水煮法)。

图108: 脂质41通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送双链RNA进入A549细胞。

图109: 脂质41通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送双链RNA进入MRC-5细胞。

图110: 脂质41通过水煮法法递送单链RNA进入A549及MRC-5细胞。

图111: 数字PCR(ddPCR)技术检测脂质递送核酸效率。

图112: 流式细胞技术检测脂质递送核酸效率。

图113: 共聚焦荧光显微镜观察脂质递送核酸在细胞中的定位。

图114: Western Blotting实验检测脂质递送核酸的效率。

图115: 脂质单体No.41介导抗纤维化HJT-sRNA-m7进入MRC-5细胞(水煮

法)。

图116：脂质组合1(No.8+No.41=6:1)与脂质组合2(No.38+No.41=6:1)在核酸递送中的作用。

图117：脂质组合3(No.39+No.41=6:1)与脂质组合4(No.40+No.41=6:1)在核酸递送中的作用。

图118：脂质组合5(38+12+41+29=1:2:1:1)在核酸递送中的作用。

图119：脂质组合6(40(PE)+12(PC)+41(So)=2:4:3)在核酸递送中的作用。

图120：脂质组合7(12(PC)+41(So)=1:6)和脂质组合8(12(PC)+41(So)=1:1)在核酸递送中的作用。

图121：脂质组合9(12(PC)+41(So)=6:1)和脂质组合10(40(PE)+12(PC)+41(So)=2:2:2)在核酸递送中的作用。

图122：脂质组合11(4(Cer)+12(PC)+41(So)=1:1:1)在核酸递送中的作用。

图123：脂质38通过水煮法递送双链RNA进入A549细胞及MRC-5细胞。

图124：脂质38通过水煮法递送单链RNA进入A549细胞及MRC-5细胞。

图125：数字PCR(ddPCR)技术检测脂质递送核酸效率。

图126：流式细胞技术检测脂质递送核酸效率。

图127：共聚焦荧光显微镜观察脂质递送核酸在细胞中的定位。

图128：脂质64通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送双链RNA进入A549细胞。

图129：流式细胞技术检测脂质递送核酸效率。

图130：共聚焦荧光显微镜观察脂质递送核酸在细胞中的定位。

图131：脂质40在水煮法和逆向蒸发法中的递送效果。

图132：数字PCR(ddPCR)技术检测脂质递送核酸效率。

图133：共聚焦荧光显微镜观察脂质递送核酸在细胞中的定位。

图134：Western Blotting实验检测脂质递送核酸的效率。

图135：脂质37通过水煮法递送单链RNA进入A549细胞及MRC-5细胞。

图136：脂质39通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送双链RNA进入A549细胞。

图137：数字PCR(ddPCR)技术检测脂质递送核酸效率。

图138：脂质60通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送双链RNA进

入A549细胞。

图139: 脂质62通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送双链RNA进入A549细胞。

图140: 脂质41可以促进小RNA进入血液，保护其在血液中不被降解。

图141: 脂质41可以促进小RNA进入胃部细胞，保护其在胃中不被降解。

图142: 脂质41可以促进小RNA进入小肠细胞，保护其在小肠中不被降解。

图143: 脂质41可以促进小RNA进入肝脏，保护其在肝脏中不被降解。

图144: PE单体(No.38)可以有效口服递送sRNA单链核酸进入小鼠血液。

图145: PE单体(No.40)可以有效口服递送sRNA单链核酸进入小鼠血液。

图146: PE单体(No.64)可以有效口服递送sRNA单链核酸进入小鼠血液。

图147: PE单体(No.71)可以有效口服递送sRNA单链核酸进入小鼠血液。

图148: 脂质在不同温度梯度有效递送单链核酸进入MRC5细胞。

图149A-D: 流式细胞术检测PE(16:0/22:1) -GFP(逆向挥发法)在A549细胞中GFP蛋白的进入。

图150A-H: 流式细胞术检测sphinganine(d22:0)-GFP(逆向挥发法及水煮法)在A549细胞中GFP蛋白的进入。

图151A-D: 流式细胞术检测PE(16:0/16:0)-GFP(逆向挥发法)在A549细胞中GFP蛋白的进入。

图152: 流式细胞术检测PE(16:0/22:1)-GFP(逆向挥发法)在A549细胞中GFP蛋白的进入。

图153: 荧光共聚焦显微镜检测sphinganine(d22:0)-GFP(逆向挥发法)在A549细胞中GFP蛋白的进入。

图154: 荧光共聚焦显微镜检测PE(16:0/16:0)-GFP(逆向挥发法)在A549细胞中GFP蛋白的进入。

具体实施方式

汤剂是经过热加工过的，其主要功能成分肯定是热稳定的。我们的研究首次证明小RNA在煎剂中是一类新的功能成分。我们从汤剂中提取具有热稳定性的“汤剂体”(decoctosome)，并对其进行成分鉴定，发现“汤剂体”中含有

大量的脂质，化合物，蛋白质和核酸。在我们的实验室中通过比较证明“汤剂体”比汤剂有更好的疾病治疗效果。“汤剂体”首次被我们证实可以作为一种新型药物。我们还发现单一化合物鞘氨醇可在口服给药时在小鼠体内传递植物药小RNA，从而达到改善疾病症状的目的。我们将单一化合物鞘氨醇与小RNA混合后，经过热处理，形成“本草体”(bencaosome)。我们也首次揭示了“本草体”的制作方法。这可能是精确医学中的组合药物，而且还为核酸疗法提供了有效的口服递送途径。

经过大量实验，本发明人意外发现，一些植物药(包括红景天、蒲公英、穿心莲及金银花)中存在一些脂质组分，这些源自植物药的脂质能够促进核酸如小RNA吸收/进入细胞和/或有此需要的对象体内靶部位。在本发明中，脂质组分是合成的。

发明人令人惊奇地发现，多种脂质均可以形成脂质核酸复合物，有效促进核酸的细胞吸收与进入，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。进一步研究表明，在不同细胞系上本申请的脂质核酸混合物均能促进核酸吸收与进入细胞的效率，但在不同细胞系上存在差异，这为药物靶向递送提供了可能性。而且这种脂质核酸复合物的核酸递送不具有序列的选择性，可以递送与小RNA大小对应(比如20bp左右)的不同序列的核酸片段。此外，共聚焦激光扫描显微镜实验（Confocal laser-scanning microscopy）证实，人工合成的脂质形成的脂质核酸混合物可以有效促进外源核酸进入细胞质。发明人意外地发现，通过水煮法或逆向蒸发法制备的脂质核酸混合物能够促进核酸如RNA通过非侵入式(如经消化道或经呼吸道以及表面施用)途径进入血液循环中和目标组织中。发明人还意外地发现，本申请的脂质能够促进核酸如RNA进入细胞，并调控(如抑制)其目标序列的表达，而对非目标序列则不显示出这种调控作用，显示出其目标特异性的调控作用，可作为核酸药物的递送方式。

表1. HJT汤剂体和PGY汤剂体中的脂质

编号	离子形式脂质	分子量	分子式	红景天汤剂体	蒲公英汤剂体
1	So(d20:0)+H	330.3366555	C20 H44 O2 N1	390326.091	1
2	So(d22:2)+H	354.3366555	C22 H44 O2 N1	1379473.756	1
3	So(d22:1)+H	356.3523055	C22 H46 O2 N1	3097636.171	1

4	So(d22:0)+H	358.3679555	C22 H48 O2 N1	4320212.925	1
5	LPC(16:0e)+H	482.3605035	C24 H53 O6 N1 P1	4320212.925	1
6	Cer(d14:1/16:0)+H	484.4724205	C30 H62 O3 N1	4586722.432	1
7	LPC(16:0)+H	496.3397685	C24 H51 O7 N1 P1	8208508.397	1
8	DG(6:0/22:5)+H	503.3731015	C31 H51 O5	4.72E+07	1
9	DG(16:1p/13:0)+H	509.4564365	C32 H61 O4	5.42E+07	1
10	LPC(18:0e)+H	510.3918035	C26 H57 O6 N1 P1	5.42E+07	1
11	Cer(d16:0/16:0)+H	512.5037205	C32 H66 O3 N1	2.34E+08	1
12	LPC(18:3)+H	518.3241185	C26 H49 O7 N1 P1	316425.605	4.07E+02
13	LPC(18:2)+H	520.3397685	C26 H51 O7 N1 P1	5807248.56	1075.766
14	LPC(18:1)+H	522.3554185	C26 H53 O7 N1 P1	5078868.945	6711.751
15	LPC(18:0)+H	524.3710685	C26 H55 O7 N1 P1	1.07E+05	6.72E+03
16	Cer(d18:2/16:1)+H	534.4880705	C34 H64 O3 N1	2.97E+07	7810.991
17	Cer(d18:1/16:1)+H	536.5037205	C34 H66 O3 N1	340747.965	14732.878
18	Cer(d18:1/16:0)+H	538.5193705	C34 H68 O3 N1	1.00E+00	3.72E+04
19	Cer(d16:0/18:0)+H	540.5350205	C34 H70 O3 N1	4.54E+06	4.05E+04
20	DG(16:1p/16:1)+H	549.4877365	C35 H65 O4	2373784.858	5.96E+04
21	DG(16:1p/16:0)+H	551.5033865	C35 H67 O4	3785087.325	59743.287
22	Cer(d18:2/16:0+O)+H	552.4986355	C34 H66 O4 N1	328656.286	6.47E+04
23	Cer(d18:1/16:0+O)+H	554.5142855	C34 H68 O4 N1	1709530.119	6.57E+04
24	Cer(d18:0/16:0+O)+H	556.5299355	C34 H70 O4 N1	69546.865	77640.353
25	Cer(d18:0/18:3)+H	562.5193705	C36 H68 O3 N1	8092209.236	78841.083
26	Cer(d18:0/18:0)+H	568.5663205	C36 H74 O3 N1	6263411.658	80672.649

27	DG(16:1p/18:3)+H	573.4877365	C37 H65 O4	3183225.696	95450.14
28	DG(16:1p/18:2)+H	575.5033865	C37 H67 O4	8060692.43	100225.291
29	DG(16:1p/18:1)+H	577.5190365	C37 H69 O4	3008362.348	109555.742
30	Cer(d18:2/18:1+O)+H	578.5142855	C36 H68 O4 N1	154813.142	117172.14
31	MG(33:4)+NH4	578.5142855	C36 H68 O4 N1	198407.509	134402.957
32	Cer(d18:1/18:1+O)+H	580.5299355	C36 H70 O4 N1	9278565.831	139454.808
33	Cer(d18:1/18:0+O)+H	582.5455855	C36 H72 O4 N1	922911.966	140010.676
34	DG(18:4/16:0)+H	589.4826515	C37 H65 O5	414144.075	146303.475
35	DG(16:0/16:0)+Na	591.4958965	C35 H68 O5 Na1	810363.971	159657.752
36	DG(16:0/18:3)+H	591.4983015	C37 H67 O5	1237322.198	161541.242
37	Cer(d20:0/18:0)+H	596.5976205	C38 H78 O3 N1	535487.515	162548.741
38	DG(18:2p/18:3)+H	599.5033865	C39 H67 O4	2100112.341	214838.29
39	DG(16:0e/18:2)+Na	601.5166315	C37 H70 O4 Na1	5987013.807	215132.574
40	DG(18:2p/18:2)+H	601.5190365	C39 H69 O4	5992262.247	215132.574
41	DG(16:0e/18:1)+Na	603.5322815	C37 H72 O4 Na1	911489.165	264655.886
42	DG(18:2p/18:1)+H	603.5346865	C39 H71 O4	293514.636	281788.08
43	DG(18:1p/18:0)+H	607.5659865	C39 H75 O4	125637.415	295480.566
44	Cer(d18:2/20:0+O)+H	608.5612355	C38 H74 O4 N1	1318843.199	312661.769
45	DG(16:0/18:2)+NH4	610.5405005	C37 H72 O5 N1	611494.546	340900.922
46	Cer(d18:1/20:0+O)+H	610.5768855	C38 H76 O4 N1	2.33E+07	380924.111
47	DG(18:4/18:3)+H	611.4670015	C39 H63 O5	1.63E+07	390486.593
48	DG(18:3/18:3)+H	613.4826515	C39 H65 O5	2984204.99	413899.239
49	DG(18:3/18:2)+H	615.4983015	C39 H67 O5	285681.918	414960.383
50	DG(18:1/18:3)+H	617.5139515	C39 H69 O5	2292951.254	421434.548
51	Cer(d18:2/22:0)+H	620.5976205	C40 H78 O3 N1	3293287.666	422725.598
52	TG(4:0/14:0/16:2)+NH4	624.5197655	C37 H70 O6 N1	547860.816	427994.277
53	Cer(d22:0/18:0)+H	624.6289205	C40 H82 O3 N1	547860.816	427994.277
54	Cer(d18:2/24:1)+H	646.6132705	C42 H80 O3 N1	4570947.798	463579.332
55	Cer(d18:2/24:0)+H	648.6289205	C42 H82 O3 N1	927304.311	467709.326

56	Cer(d18:1/24:0)+H	650.6445705	C42 H84 O3 N1	2.26E+05	4.88E+05
57	Cer(d18:0/24:0)+H	652.6602205	C42 H86 O3 N1	191262.664	493993.59
58	DG(17:1/22:5)+H	655.5296015	C42 H71 O5	226398.328	493993.59
59	PE(15:0/15:0)+H	664.4911835	C35 H71 O8 N1 P1	9690748.232	505250.994
60	Cer(d18:2/26:1)+H	674.6445705	C44 H84 O3 N1	1061171.306	5.24E+05
61	SM(d16:0/16:1)+H	675.5435525	C37 H76 O6 N2 P1	5.81E+05	5.24E+05
62	PE(16:1/15:0)+H	676.4911835	C36 H71 O8 N1 P1	1212434.548	527966.642
63	TG(8:0e/13:0/18:2)+NH4	680.6187505	C42 H82 O5 N1	2.10E+07	586734.726
64	TG(8:0p/15:1/18:2)+H	687.5922015	C44 H79 O5	2016850.917	591047.503
65	PE(16:1/16:1)+H	688.4911835	C37 H71 O8 N1 P1	2016850.917	591047.503
66	PE(16:0/16:1)+H	690.5068335	C37 H73 O8 N1 P1	2044649.034	591047.503
67	PE(16:0/16:0)+H	692.5224835	C37 H75 O8 N1 P1	1	596452.251
68	PA(16:0/18:2)+Na	695.4622295	C37 H69 O8 N0 P1 Na1	1583729.741	604589.292
69	CerG1(d18:2/16:1)+H	696.5408955	C40 H74 O8 N1	2.94E+07	607151.481
70	CerG1(d18:2/16:0)+H	698.5565455	C40 H76 O8 N1	1001209.029	612230.949
71	CerG1(d18:1/16:0)+H	700.5721955	C40 H78 O8 N1	1001209.029	612230.949
72	SM(d16:0/18:2)+H	701.5592025	C39 H78 O6 N2 P1	1	615958.136
73	SM(d16:0/18:1)+H	703.5748525	C39 H80 O6 N2 P1	9689636.668	620573.75
74	PE(16:0/17:1)+H	704.5224835	C38 H75 O8 N1	1119078.425	626407.441

			P1		
75	PE(16:1/18:3)+H	712.4911835	C39 H71 O8 N1 P1	4712407.932	641633.829
76	PE(16:0/18:3)+H	714.5068335	C39 H73 O8 N1 P1	4712407.932	641633.829
77	CerG1(d18:2/16:0+O)+H	714.5514605	C40 H76 O9 N1	5374247.838	655355.366
78	PE(16:0/18:2)+H	716.5224835	C39 H75 O8 N1 P1	77238.228	657638.592
79	CerG1(d16:0/18:1+O)+H	716.5671105	C40 H78 O9 N1	163980.93	737837.362
80	PE(16:0/18:1)+H	718.5381335	C39 H77 O8 N1 P1	1894363.216	808505.904
81	PC(16:0e/16:1)+H	718.5745185	C40 H81 O7 N1 P1	1894363.216	808505.904
82	CerG1(d18:2/18:2)+H	722.5565455	C42 H76 O8 N1	6.74E+07	816985.595
83	PE(17:1/18:1)+H	730.5381335	C40 H77 O8 N1 P1	9583122.002	833575.452
84	SM(d16:0/20:1)+H	731.6061525	C41 H84 O6 N2 P1	2523788.556	835252.778
85	PE(16:0/19:1)+H	732.5537835	C40 H79 O8 N1 P1	936107.02	864415.827
86	PC(16:0/16:1)+H	732.5537835	C40 H79 O8 N1 P1	936107.02	864415.827
87	PC(16:0/16:0)+H	734.5694335	C40 H81 O8 N1 P1	1407657.532	879913.51
88	PE(18:3/18:2)+H	738.5068335	C41 H73 O8 N1 P1	9925101.043	985477.837
89	PE(18:2/18:2)+H	740.5224835	C41 H75 O8 N1 P1	3302104.175	1077270.174

90	TG(8:0/14:0/20:0)+NH4	740.6762655	C45 H90 O6 N1	2264998.498	1094998.386
91	PE(18:1/18:2)+H	742.5381335	C41 H77 O8 N1 P1	1150383.999	1109902.361
92	PC(15:0/18:2)+H	744.5537835	C41 H79 O8 N1 P1	1150383.999	1109902.361
93	PE(18:1/18:1)+H	744.5537835	C41 H79 O8 N1 P1	1150383.999	1109902.361
94	PC(16:0e/18:1)+H	746.6058185	C42 H85 O7 N1 P1	1229361.511	1129970.461
95	StE(22:1)+NH4	750.7122555	C51 H92 O2 N1	2745523.195	1129999.635
96	Cer(d18:2/32:4)+H	752.6915205	C50 H90 O3 N1	2745523.195	1129999.635
97	MGDG(16:0/18:3)+H	753.5511265	C43 H77 O10	2832053.494	1144067.874
98	TG(16:0/13:0/14:0)+NH4	754.6919155	C46 H92 O6 N1	4167371.876	1156642.369
99	PC(16:1/18:2)+H	756.5537835	C42 H79 O8 N1 P1	2.92E+07	1187856.898
100	PC(16:0/18:2)+H	758.5694335	C42 H81 O8 N1 P1	573145.979	1202535.92
101	SM(d16:0/22:1)+H	759.6374525	C43 H88 O6 N2 P1	1811041.154	1279973.45
102	PC(16:0/18:1)+H	760.5850835	C42 H83 O8 N1 P1	1811041.154	1279973.45
103	PC(18:0/16:0)+H	762.6007335	C42 H85 O8 N1 P1	1811041.154	1279973.45
104	TG(10:0/16:0/18:2)+NH4	764.6762655	C47 H90 O6 N1	1479856.98	1297842.776

105	TG(16:1/14:0/14:0)+NH4	766.6919155	C47 H92 O6 N1	1571400.019	1312345.569
106	PC(16:0e/20:4)+H	768.5901685	C44 H83 O7 N1 P1	51584.528	1330852.698
107	TG(16:0/14:0/14:0)+NH4	768.7075655	C47 H94 O6 N1	1699184.802	1335516.265
108	PC(18:0e/18:2)+H	772.6214685	C44 H87 O7 N1 P1	1699184.802	1335516.265
109	ZyE(26:4)+NH4	772.6966055	C53 H90 O2 N1	3061880.829	1337721.591
110	StE(24:3)+NH4	774.7122555	C53 H92 O2 N1	1658135.266	1356818.368
111	ZyE(26:3)+NH4	774.7122555	C53 H92 O2 N1	1658135.266	1356818.368
112	MGDG(18:3/18:3)+H	775.5354765	C45 H75 O10	1658135.266	1356818.368
113	MGDG(16:0/20:5)+H	777.5511265	C45 H77 O10	1.23E+07	1397050.829
114	PC(16:1/20:5)+H	778.5381335	C44 H77 O8 N1 P1	1160671.162	1409504.853
115	TG(16:1/14:0/15:1)+NH4	778.6919155	C48 H92 O6 N1	2859743.403	1409504.853
116	PC(16:1/20:4)+H	780.5537835	C44 H79 O8 N1 P1	6388353.447	1421139.681
117	CerG1(d18:2/22:1)+H	780.6347955	C46 H86 O8 N1	3996861.474	1428550.812
118	TG(16:0/13:0/16:1)+NH4	780.7075655	C48 H94 O6 N1	4104926.614	1428550.812
119	PC(16:0/20:4)+H	782.5694335	C44 H81 O8 N1 P1	2293306.68	1443289.679

120	TG(16:0/14:0/15:0)+NH4	782.7232155	C48 H96 O6 N1	4.93E+06	1.45E+06
121	PC(16:0/20:3)+H	784.5850835	C44 H83 O8 N1 P1	1687489.65	1457777.891
122	PC(18:0/18:2)+H	786.6007335	C44 H85 O8 N1 P1	1826384.028	1568242.71
123	SM(d16:0/24:1)+H	787.6687525	C45 H92 O6 N2 P1	1	1574194.876
124	PC(18:0/18:1)+H	788.6163835	C44 H87 O8 N1 P1	201033.513	1578140.397
125	TG(16:0e/13:0/16:0)+K	789.6732845	C48 H94 O5 K1	4905987.584	1586487.641
126	TG(16:1/12:0/18:1)+NH4	792.7075655	C49 H94 O6 N1	793977.438	1624200.908
127	TG(16:0/14:0/16:1)+NH4	794.7232155	C49 H96 O6 N1	2.56E+07	1712458.663
128	Co(Q9)+H	795.6285865	C54 H83 O4	4091215.849	1723000.308
129	TG(16:0/14:0/16:0)+NH4	796.7388655	C49 H98 O6 N1	2545856.286	1757197.789
130	MGDG(18:3/20:6)+H	797.5198265	C47 H73 O10	3828334.683	1796758.817
131	PC(16:0/21:3)+H	798.6007335	C45 H85 O8 N1 P1	3193628.707	1832224.876
132	MGDG(18:2/20:6)+H	799.5354765	C47 H75 O10	3193628.707	1832224.876
133	PE(22:0/18:2)+H	800.6163835	C45 H87 O8 N1 P1	627830.742	1844821.277
134	PC(16:0e/22:2)+H	800.6527685	C46 H91 O7 N1 P1	451258.13	1866334.475

135	CerG1(d22:0/18:1+O)+H	800.6610105	C46 H90 O9 N1	1.25E+07	1885698.509
136	MGDG(18:2/20:5)+H	801.5511265	C47 H77 O10	3218234.483	1975336.948
137	MGDG(18:1/20:4)+H	805.5824265	C47 H81 O10	3218234.483	1975336.948
138	PC(16:0/22:6)+H	806.5694335	C46 H81 O8 N1 P1	3225480.406	1975336.948
139	TG(16:0/15:1/16:1)+NH4	806.7232155	C50 H96 O6 N1	3218234.483	1975890.277
140	CerG1(d18:2/24:1)+H	808.6660955	C48 H90 O8 N1	1515567.592	2036335.679
141	TG(16:0/15:0/16:1)+NH4	808.7388655	C50 H98 O6 N1	5722635.222	2042316.725
142	PC(18:0/20:4)+H	810.6007335	C46 H85 O8 N1 P1	5215144.093	2070037.151
143	TG(16:0/15:0/16:0)+NH4	810.7545155	C50 H100 O6 N1	5215144.093	2070037.151
144	SM(d16:0/26:3)+H	811.6687525	C47 H92 O6 N2 P1	3638255.96	2169861.389
145	PE(16:0/22:1)+K	812.5566165	C43 H84 O8 N1 P1 K1	3171629.347	2240390.664
146	PC(20:1/18:2)+H	812.6163835	C46 H87 O8 N1 P1	1.24E+07	2248084.433
147	SM(d16:0/26:2)+H	813.6844025	C47 H94 O6 N2 P1	3124941.275	2255746.981
148	PG(16:0/22:5)+NH4	814.5592635	C44 H81 O10 N1 P1	3124941.275	2255746.981
149	PC(20:0p/19:1)+H	814.6684185	C47 H93 O7 N1 P1	3124941.275	2255746.981

150	SM(d16:0/26:1)+H	815.7000525	C47 H96 O6 N2 P1	3.07E+07	2266806.368
151	CerG1(d22:1/18:0+2O)+H	816.6559255	C46 H90 O10 N1	7701671.44	2294410.726
152	TG(16:1/14:0/18:2)+NH4	818.7232155	C51 H96 O6 N1	94806.519	2337992.129
153	TG(16:0/14:0/18:2)+NH4	820.7388655	C51 H98 O6 N1	7.68E+07	2437867.716
154	TG(16:0/14:0/18:1)+NH4	822.7545155	C51 H100 O6 N1	6539612.263	2476000.263
155	TG(16:0/16:0/16:0)+NH4	824.7701655	C51 H102 O6 N1	67055.821	2510367.052
156	TG(18:4/16:0/16:0)+H	827.7123165	C53 H95 O6	7602971.241	2515441.944
157	PE(24:0/18:2)+H	828.6476835	C47 H91 O8 N1 P1	1079526.046	2537702.771
158	CerG1(d24:0/18:1+O)+H	828.6923105	C48 H94 O9 N1	8497622.232	2555017.725
159	TG(16:0/16:0/18:3)+H	829.7279665	C53 H97 O6	8845982.298	2555017.725
160	TG(16:1/15:0/18:2)+NH4	832.7388655	C52 H98 O6 N1	8.15E+07	2555864.359
161	TG(16:0/16:1/17:1)+NH4	834.7545155	C52 H100 O6 N1	1665504.949	2583546.213
162	PI(16:0/18:2)+H	835.5331095	C43 H80 O13 N0 P1	7836794.71	2660458.252
163	TG(16:0/15:0/18:1)+NH4	836.7701655	C52 H102 O6 N1	7836794.71	2660458.252
164	TG(16:0/16:0/17:0)+NH4	838.7858155	C52 H104 O6 N1	1	2667039.687

165	TG(14:0/18:2/18:3)+NH4	842.7232155	C53 H96 O6 N1	7457712.048	2698263.487
166	TG(16:0/16:0/18:2)+NH4	848.7701655	C53 H102 O6 N1	3117177.732	2939662.058
167	TG(14:0/18:2/20:5)+H	849.6966665	C55 H93 O6	2882001.001	3019434.864
168	TG(16:0/16:0/18:1)+NH4	850.7858155	C53 H104 O6 N1	1.64E+07	3.07E+06
169	TG(16:0/18:3/18:3)+H	851.7123165	C55 H95 O6	4.38E+07	3076611.31
170	TG(16:0/17:0/17:0)+NH4	852.8014655	C53 H106 O6 N1	3702976.213	3186374.052
171	TG(16:0/16:0/20:5)+H	853.7279665	C55 H97 O6	3278567.909	3259422.694
172	TG(16:0/18:1/18:3)+H	855.7436165	C55 H99 O6	1448986.196	3265491.034
173	TG(15:0/18:2/18:3)+NH4	856.7388655	C54 H98 O6 N1	2962279.683	3272286.838
174	TG(18:0/16:0/18:3)+H	857.7592665	C55 H101 O6	7702748.834	3358029.901
175	TG(15:0/18:2/18:2)+NH4	858.7545155	C54 H100 O6 N1	7702748.834	3358029.901
176	TG(16:0/17:1/18:2)+NH4	860.7701655	C54 H102 O6 N1	5491186.88	3384766.298
177	TG(16:0/17:1/18:1)+NH4	862.7858155	C54 H104 O6 N1	2.14E+07	3470218.27
178	Co(Q10)+H	863.6911865	C59 H91 O4	4268929.475	3556931.782
179	TG(16:0/17:0/18:1)+NH4	864.8014655	C54 H106 O6 N1	5758516.782	3583143.66

180	TG(18:0/16:0/17:0)+NH4	866.8171155	C54 H108 O6 N1	9174698.596	3652349.072
181	TG(10:0p/22:6/22:6)+NH4	868.6813505	C57 H90 O5 N1	9174698.596	3652349.072
182	TG(18:4/18:3/18:3)+H	871.6810165	C57 H91 O6	4572289.266	3715286.618
183	TG(8:0/16:0/21:4)+(CH3CH2)3NH	872.7575895	C54 H100 O6 N2	2.29E+07	3756416.138
184	TG(18:3/18:3/18:3)+H	873.6966665	C57 H93 O6	6310376.314	3793593.876
185	TG(18:3/18:2/18:3)+H	875.7123165	C57 H95 O6	5914201.082	4071221.369
186	TG(16:0/18:1/18:1)+NH4	876.8014655	C55 H106 O6 N1	5914201.082	4071221.385
187	TG(16:0/18:2/20:5)+H	877.7279665	C57 H97 O6	1.90E+07	4148774.509
188	TG(18:0/16:0/18:1)+NH4	878.8171155	C55 H108 O6 N1	1.90E+07	4148774.509
189	TG(16:0/18:1/20:5)+H	879.7436165	C57 H99 O6	7534392.644	4230984.901
190	TG(18:0/16:0/18:0)+NH4	880.8327655	C55 H110 O6 N1	5.34E+07	4475225.248
191	TG(16:0/18:1/20:4)+H	881.7592665	C57 H101 O6	5.54E+07	4475225.248
192	TG(17:0/18:3/18:3)+NH4	882.7545155	C56 H100 O6 N1	5052602.769	4478342.531
193	TG(18:0/16:0/20:4)+H	883.7749165	C57 H103 O6	5784527.473	4660990.822
194	TG(17:0/18:2/18:3)+NH4	884.7701655	C56 H102 O6 N1	4482756.516	4672785.705

195	TG(17:0/18:2/18:2)+NH4	886.7858155	C56 H104 O6 N1	7454754.499	4726088.259
196	TG(17:0/18:1/18:2)+NH4	888.8014655	C56 H106 O6 N1	1265262.193	4764847.927
197	TG(17:0/18:1/18:1)+NH4	890.8171155	C56 H108 O6 N1	140126.277	5149855.933
198	TG(16:0/16:1/21:0)+NH4	892.8327655	C56 H110 O6 N1	4962844.564	5149855.933
199	TG(6:0/18:3/23:4)+(CH3CH2)3NH	894.7419395	C56 H98 O6 N2	9291077.065	5156630.083
200	TG(15:0/14:0/24:0)+NH4	894.8484155	C56 H112 O6 N1	492454.422	5207985.888
201	TG(18:4/18:3/20:5)+H	895.6810165	C59 H91 O6	6089561.802	5245553.541
202	TG(6:0/18:2/23:4)+(CH3CH2)3NH	896.7575895	C56 H100 O6 N2	1582567.8	5259759.322
203	TG(18:3/18:3/20:5)+H	897.6966665	C59 H93 O6	1.17E+07	5350123.549
204	TG(6:0/18:2/23:3)+(CH3CH2)3NH	898.7732395	C56 H102 O6 N2	1630296.575	5439965.387
205	TG(18:3/18:2/20:5)+H	899.7123165	C59 H95 O6	1.62E+07	5651893.831
206	TG(16:2/13:0/18:2)+(CH3CH2)3NH	900.7888895	C56 H104 O6 N2	1	5727851.112
207	TG(20:5/18:2/18:2)+H	901.7279665	C59 H97 O6	6701516.595	5875239.363
208	TG(8:0/18:1/21:2)+(CH3CH2)3NH	902.8045395	C56 H106 O6 N2	6874401.285	5875239.363
209	TG(16:0/18:1/20:2)+NH4	902.8171155	C57 H108 O6 N1	6874401.285	5875239.363

210	TG(18:1/18:2/20:5)+H	903.7436165	C59 H99 O6	6574610.08	6317164.375
211	TG(18:0/18:1/18:1)+NH4	904.8327655	C57 H110 O6 N1	8673046.78	6499861.567
212	TG(18:1/18:2/20:4)+H	905.7592665	C59 H101 O6	5155615.948	6.69E+06
213	TG(18:0/18:0/18:1)+NH4	906.8484155	C57 H112 O6 N1	1.58E+07	6849883.536
214	TG(18:1/18:1/20:4)+H	907.7749165	C59 H103 O6	4559240.845	7196188.345
215	TG(18:0/16:0/20:0)+NH4	908.8640655	C57 H114 O6 N1	2.28E+07	7217491.252
216	TG(18:0/18:1/20:4)+H	909.7905665	C59 H105 O6	8855056.976	7419109.87
217	PG(28:1/18:3)+H	911.6735645	C52 H96 O10 N0 P1	2.68E+06	7.44E+06
218	PG(28:0/18:2)+H	915.7048645	C52 H100 O10 N0 P1	2.25E+07	7479487.582
219	TG(18:1/18:1/19:1)+NH4	916.8327655	C58 H110 O6 N1	7716514.673	7825778.605
220	TG(16:0/18:1/21:1)+NH4	918.8484155	C58 H112 O6 N1	5743432.404	7968577.636
221	TG(16:0/16:1/23:0)+NH4	920.8640655	C58 H114 O6 N1	1.21E+07	8956738.021
222	TG(10:0/15:1/24:6)+(CH3CH2)3NH	922.7732395	C58 H102 O6 N2	343736.931	9258523.996
223	TG(16:0/15:0/24:0)+NH4	922.8797155	C58 H116 O6 N1	2.50E+07	9441741.193
224	TG(20:0/18:2/18:2)+NH4	928.8327655	C59 H110 O6 N1	1.93E+07	1.06E+07

225	TG(20:0/18:1/18:2)+ NH4	930.8484155	C59 H112 O6 N1	2.23E+07	1.07E+07
226	TG(16:0/18:1/22:1)+ NH4	932.8640655	C59 H114 O6 N1	2.74E+07	1.12E+07
227	TG(16:0/18:1/22:0)+ NH4	934.8797155	C59 H116 O6 N1	200369.136	1.20E+07
228	TG(16:0/16:0/24:0)+ NH4	936.8953655	C59 H118 O6 N1	649574.619	1.21E+07
229	TG(21:0/18:2/18:2)+ NH4	942.8484155	C60 H112 O6 N1	1.25E+07	1.25E+07
230	TG(16:0/18:3/23:0)+ NH4	944.8640655	C60 H114 O6 N1	6207969.868	1.25E+07
231	TG(16:0/18:2/23:0)+ NH4	946.8797155	C60 H116 O6 N1	1.81E+08	1.28E+07
232	TG(15:0/18:1/24:0)+ NH4	948.8953655	C60 H118 O6 N1	2.66E+07	1.34E+07
233	TG(25:0/15:0/17:0)+ NH4	950.9110155	C60 H120 O6 N1	2092609.791	1.38E+07
234	TG(22:0/18:2/18:3)+ NH4	954.8484155	C61 H112 O6 N1	5.40E+07	1.39E+07
235	TG(22:0/18:2/18:2)+ NH4	956.8640655	C61 H114 O6 N1	5.40E+07	1.39E+07
236	TG(16:0/18:3/24:0)+ NH4	958.8797155	C61 H116 O6 N1	1.08E+07	1.40E+07
237	TG(16:0/18:1/24:1)+ NH4	960.8953655	C61 H118 O6 N1	1.36E+08	1.43E+07
238	TG(16:0/18:1/24:0)+ NH4	962.9110155	C61 H120 O6 N1	1.41E+07	1.51E+07
239	TG(20:0/16:0/22:0)+ NH4	964.9266655	C61 H122 O6 N1	4.22E+07	1.55E+07

240	TG(23:0/18:2/18:3)+NH4	968.8640655	C62 H114 O6 N1	4357343.609	1.69E+07
241	TG(23:0/18:2/18:2)+NH4	970.8797155	C62 H116 O6 N1	3.47E+07	1.71E+07
242	TG(18:1/18:2/23:0)+NH4	972.8953655	C62 H118 O6 N1	321103.904	1.72E+07
243	TG(25:0/16:0/18:2)+NH4	974.9110155	C62 H120 O6 N1	1.17E+07	1.78E+07
244	TG(27:0/14:0/18:1)+NH4	976.9266655	C62 H122 O6 N1	1.14E+08	2.07E+07
245	TG(18:4/21:4/22:5)+NH4	980.7701655	C64 H102 O6 N1	4.89E+07	2.24E+07
246	TG(24:0/18:3/18:3)+NH4	980.8640655	C63 H114 O6 N1	7.09E+07	2.25E+07
247	TG(24:0/18:2/18:3)+NH4	982.8797155	C63 H116 O6 N1	2002411.796	2.26E+07
248	TG(18:1/18:3/24:0)+NH4	984.8953655	C63 H118 O6 N1	2.41E+08	2.27E+07
249	TG(18:0/18:3/24:0)+NH4	986.9110155	C63 H120 O6 N1	3.58E+07	2.29E+07
250	TG(18:1/18:1/24:0)+NH4	988.9266655	C63 H122 O6 N1	3.20E+07	2.35E+07
251	TG(26:0/16:0/18:1)+NH4	990.9423155	C63 H124 O6 N1	4.21E+08	2.54E+07
252	TG(20:0/20:0/20:0)+NH4	992.9579655	C63 H126 O6 N1	5.91E+07	2.77E+07
253	TG(25:0/18:2/18:2)+NH4	998.9110155	C64 H120 O6 N1	6.62E+07	2.86E+07
254	TG(30:1/15:0/16:1)+NH4	1002.942315	C64 H124 O6 N1	2.76E+07	2.94E+07

255	TG(26:0/18:2/18:3)+NH4	1010.911015	C65 H120 O6 N1	3.49E+07	2.95E+07
256	TG(26:0/18:2/18:2)+NH4	1012.926665	C65 H122 O6 N1	5158621.809	3.08E+07
257	TG(26:0/18:1/18:2)+NH4	1014.942315	C65 H124 O6 N1	4.95E+07	3.26E+07
258	TG(20:0/18:2/24:0)+NH4	1016.957965	C65 H126 O6 N1	4.98E+07	3.29E+07
259	TG(30:0/16:0/16:1)+NH4	1018.973615	C65 H128 O6 N1	1.62E+08	3.71E+07
260	TG(16:0/22:0/24:0)+NH4	1020.989265	C65 H130 O6 N1	2.55E+07	3.80E+07
261	TG(32:1/15:0/16:0)+NH4	1032.989265	C66 H130 O6 N1	1.20E+08	3.85E+07
262	TG(22:0/18:2/24:0)+NH4	1044.989265	C67 H130 O6 N1	1.15E+08	3.92E+07
263	TG(26:1/15:0/24:1)+NH4	1059.004915	C68 H132 O6 N1	1.15E+08	3.92E+07
264	TG(24:0/18:2/24:0)+NH4	1073.020565	C69 H134 O6 N1	1.57E+07	4.03E+07
265	TG(18:1/24:0/24:0)+NH4	1075.036215	C69 H136 O6 N1	1.20E+08	4.06E+07
266	TG(26:0/18:2/24:0)+NH4	1101.051865	C71 H138 O6 N1	3.66E+07	4.31E+07
267	TG(36:1/16:0/18:2)+NH4	1127.067515	C73 H140 O6 N1	7.03E+07	4.40E+07
268	TG(20:0/24:2/24:2)+(CH3CH2)3NH	1195.117539	C77 H146 O6 N2	4.44E+07	4.61E+07
269	LPA(16:0)-H	409.2360665	C19 H38 O7 N0 P1	2232476.522	4.86E+07

270	LPE(16:0)-H	452.2782655	C21 H43 O7 N1 P1	2232476.522	4.86E+07
271	LPE(17:1)-H	464.2782655	C22 H43 O7 N1 P1	6187754.425	4.94E+07
272	LPE(18:1)-H	478.2939155	C23 H45 O7 N1 P1	1.87E+08	4.95E+07
273	LdMePE(16:0)-H	480.3095655	C23 H47 O7 N1 P1	1.26E+08	5.28E+07
274	PAF(14:0e)+HCOO	540.3306955	C25 H51 O9 N1 P1	6.74E+07	5.37E+07
275	PAF(16:1p)+HCOO	564.3306955	C27 H51 O9 N1 P1	7.11E+07	5.50E+07
276	PAF(16:0p)+HCOO	566.3463455	C27 H53 O9 N1 P1	6.73E+07	5.77E+07
277	PAF(16:0e)+HCOO	568.3619955	C27 H55 O9 N1 P1	5.93E+07	6.84E+07
278	PMe(15:0/18:3)-H	669.4500815	C37 H66 O8 N0 P1	2.33E+07	7.01E+07
279	PMe(15:0/18:2)-H	671.4657315	C37 H68 O8 N0 P1	5.36E+07	7.48E+07
280	PEt(16:1/16:1)-H	671.4657315	C37 H68 O8 N0 P1	5.36E+07	7.48E+07
281	PEt(16:0/16:1)-H	673.4813815	C37 H70 O8 N0 P1	1.24E+07	7.71E+07
282	dMePE(16:1/14:0)-H	688.4922805	C37 H71 O8 N1 P1	2.49E+08	8.08E+07
283	dMePE(16:0/14:0)-H	690.5079305	C37 H73 O8 N1 P1	2.49E+08	8.08E+07
284	PEt(16:2/18:2)-H	695.4657315	C39 H68 O8 N0 P1	5.58E+07	8.57E+07

285	PEt(16:0/18:2)-H	699.4970315	C39 H72 O8 N0 P1	2.39E+07	8.62E+07
286	dMePE(17:1/14:0)-H	702.5079305	C38 H73 O8 N1 P1	3.00E+08	9.06E+07
287	dMePE(16:1/16:1)-H	714.5079305	C39 H73 O8 N1 P1	1.81E+08	9.14E+07
288	dMePE(18:1/14:0)-H	716.5235805	C39 H75 O8 N1 P1	5.29E+07	1.10E+08
289	dMePE(19:1/14:0)-H	730.5392305	C40 H77 O8 N1 P1	1.26E+07	2.69E+08
290	dMePE(16:2/18:2)-H	738.5079305	C41 H73 O8 N1 P1	2.72E+08	2.80E+08
291	MGDG(16:0/18:2)+HCOO	799.5577035	C44 H79 O12	5203598.126	2.98E+08
292	PAF(32:2)+HCOO	802.5603605	C43 H81 O10 N1 P1	1.78E+08	3.87E+08
293	PAF(32:1)+HCOO	804.5760105	C43 H83 O10 N1 P1	2.01E+08	6.03E+08
294	PAF(34:6)+HCOO	822.5290605	C45 H77 O10 N1 P1	6.00E+08	1.23E+09
295	MGDG(18:2/18:2)+HCOO	823.5577035	C46 H79 O12	7.59E+08	1.52E+09
296	DGDG(16:0/16:0)-H	891.6050485	C47 H87 O15	7.05E+08	2.27E+09

表2. HJT汤剂体中非功能性的小分子列表

编号	化合物 ID	名称	描述	分子式	得分	质荷比	保留时间(分)
1	HMDB 60017	邻苯三酚-2-O-葡萄糖醛酸盐	Pyrogallol-2-O-glucuronide	C12H 14O9	44.4	285.06	4.02
2	HMDB 41511	甘油 2-(9Z，12Z 十八碳二酸酯)1-十六酸 3-O-[α-D-	Glycerol 2-(9Z,12Z-octadecadienoate) 1-hexadecanoate	C49H 88O15	56.5	939.60	11.20

		半乳糖基-(1->6)-β-D-半乳糖基]	3-O-[alpha-D-galactopyranosyl-(1->6)-beta-D-galactopyranoside]				
3	HMDB41266	槲皮素 3-(6''-咖啡酰磷酸三酯)	Quercetin 3-(6"-caffeoylsophorotrioside)	C42H46O25	44.4	951.23	3.16
4	HMDB40769	二氧吖啶胺 A	Dioxinoacrimarine A	C29H23NO8	55	531.17	2.82
5	HMDB40701	9-羟基-7-巨胆甾烯-3-酮苷	9-Hydroxy-7-megastigmen-3-one glucoside	C19H32O7	40.5	395.20	4.21
6	HMDB40358	(r)- 比塔林 A	(R)-Bitalin A	C13H14O3	52.1	219.10	2.82
7	HMDB39301	表儿茶素 3-O-没食子酸盐(4β->6)-表儿茶素 3-O-没食子酸盐	Epiafzelechin 3-O-gallate-(4beta->6)-epigallocatechin 3-O-gallate	C44H34O20	51.5	883.17	1.29
8	HMDB39286	邻苯三酰果糖	1-O-Galloylfructose	C13H16O10	42.1	315.07	4.75
9	HMDB38057	脱氢植物鞘氨醇	Dehydrophytosphingosine	C18H37NO3	49.8	316.28	6.57
10	HMDB37543	(卤素)-(Z)-2-(5-十四烷基)环丁酮	(卤)-(Z)-2-(5-Tetradecenyl)cyclobutanone	C18H32O	43.7	282.28	10.29
11	HMDB37519	2-(5,8-四癸二烯基)环丁酮	2-(5,8-Tetradecadienyl)cyclobutanone	C18H30O	42.4	280.26	9.75
12	HMDB37476	新红花甙	Neocarthamin	C21H22O11	52.3	433.11	3.33
13	HMDB33538	肉豆蔻酚 B	Fragransol B	C19H22O5	52.5	331.15	2.82
14	HMDB32960	1-辛烯-3-甲基异茜草素	1-Octen-3-yl primeveroside	C19H34O10	46.8	440.25	1.95
15	HMDB32677	大豆皂苷 I	Soyacerebroside I	C40H75NO9	55.3	696.54	12.51
16	HMDB32147	香叶香茅醇	Geranylcitronellol	C20H36O	39.5	310.31	11.01
17	HMDB31068	异棕榈酸	Isopalmitic acid	C16H32O2	43.2	274.27	5.83
18	HMDB30964	亚油酸	Linolenelaidic acid	C18H30O2	51.3	296.26	8.46
19	HMDB29766	(3S，7E，9R)-4,7-巨豆二烯-3,9-二醇 9-[己糖基-(1->6)-葡萄糖	(3S,7E,9R)-4,7-Megastigmadiene-3,9-diol 9-[apiosyl-(1->6)-glucoside]	C24H40O11	53.2	522.29	1.45

		苷]					
20	HMDB29711	海生菌素	Maritimetin	C15H10O6	51.2	287.05	3.33
21	HMDB29348	橙酰阿拉伯呋喃糖基葡萄糖苷	Neryl arabinofuranosyl-glucoside	C21H36O10	53	466.26	3.68
22	HMDB13897	4-烯丙戊酸	4-ene-Valproic acid	C8H14O2	42.4	125.10	1.17
23	HMDB11507	溶血磷脂酰乙醇胺(18:2(9Z，12Z)/0:0)	LysoPE(18:2(9Z,12Z)/0:0)	C23H44NO7P	50.8	478.29	7.89
24	HMDB11127	1,2-二-(9Z，12Z，15Z 十八碳三烯基)-3-(半乳糖基α-1-6-半乳糖基β-1)-甘油	1,2-Di-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-3-(Galactosyl-alpha-1-6-Galactosyl-beta-1)-glycerol	C51H84O15	43.3	959.57	11.39
25	HMDB10386	溶血卵磷脂(18:2(9Z，12Z)	LysoPC(18:2(9Z,12Z))	C26H50NO7P	55.7	520.34	8.08
26	HMDB00413	3-羟基十二烷二酸	3-Hydroxydodecanedioic acid	C12H22O5	49	269.14	7.14
27	HMDB00269	鞘氨醇	Sphinganine	C18H39NO2	41	302.30	6.95

表3. HJT汤剂体中功能性的小分子列表

编号	化合物 ID	名称	英文名称	分子式	得分	质荷比	保留时间(分)	功能描述
1	HMDB10366	透明质酸	Hyaluronan	C28H44N2O23	52.7	799.22203	3.3343	抗纤维化；消炎
2	HMDB05801	山柰酚	Kaempferol	C15H10O6	54.4	287.05458	4.565633333	抗纤维化；抗肿瘤；抗细菌等
3	HMDB10382	溶血卵磷脂(16:0)	LysoPC(16:0)	C24H50NO7P	45.3	496.33797	8.649783333	抗纤维化
4	HMDB13648	棕榈酰乙醇胺	Palmitoleoyl Ethanolamide	C18H35NO2	43.5	320.255	9.00865	消炎；镇痛
5	HMDB12166	4α-羧基-5α-胆甾-8-烯	4alpha-Carboxy-5alpha-cholesta-8-en-3b	C28H46O3	43.9	431.35036	13.47345	消炎

		-3β-醇	eta-ol					
6	HMDB15168	浅蓝菌素	Cerulenin	C12H17NO3	45.9	241.15454	1.018633333	抗真菌；抗肿瘤
7	HMDB40586	维生素 D5	Vitamin D5	C29H48O	41.2	395.36602	10.4718	降低迷走神经活性 **(Decreasing vagus activity)**
8	HMDB61062	7-羟基格拉司琼	7-hydroxy granisetron	C18H24N4O2	48.4	346.22	7.14	抗肿瘤
9	HMDB33214	仙人掌甾醇	Schottenol	C29H50O	48.1	397.38218	12.70096667	调节胆固醇代谢

表4. PGY汤剂体中非功能性的小分子列表

序号	化合物 ID	名称	描述	分子式	得分	质荷比	保留时间(分)
1	HMDB13248	单乙基己基邻苯二甲酸	Monoethylhexyl phthalic acid	C16H22O4	39.9	301.14	0.76
2	HMDB09725	磷脂酰乙醇胺(24:0/20:1(11Z))	PE(24:0/20:1(11Z))	C49H96NO8P	42	880.68	11.88
3	HMDB10689	磷脂酰甘油(18:3(9Z,12Z,15Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	PG(18:3(9Z,12Z,15Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	C46H73O10P	40	817.50	11.49
4	HMDB32843	AS 1-5	AS 1-5	C40H77NO9	47.1	738.54	12.84
5	HMDB37840	氮-(1-脱氧-1-果糖基)亮氨酸	N-(1-Deoxy-1-fructosyl)leucine	C12H23NO7	48.1	294.15	0.91
6	HMDB35402	兵豆苷	Culinariside	C45H87NO10	39.6	824.62	11.69
7	HMDB94265	甘油二酯(21:0/i-13:0/0:0)	DG(21:0/i-13:0/0:0)	C37H72O5	46	619.52	12.65
8	HMDB55993	甘油二酯(15:0/0:0/22:1n9)	DG(15:0/0:0/22:1n9)	C40H76O5	49	654.60	13.03
9	HMDB36855		Cincassiol B	C20H32O8	48.7	423.20	8.02

10	HMDB41511	丙三醇 2-(9Z，12Z 十八碳二酸酯)1-十六酸 3-O-[α-D-半乳糖基 -(1->6)-β-D-半乳糖基]	Glycerol 2-(9Z,12Z-octadecadienoate) 1-hexadecanoate 3-O-[alpha-D-galactopyranosyl-(1->6)-beta-D-galactopyranoside]	C49H88O15	52.8	939.59	13.61
11	HMDB37846	氮-(1-脱氧-1-果糖基)苯丙氨酸	N-(1-Deoxy-1-fructosyl)phenylalanine	C15H21NO7	40.6	328.14	1.07
12	HMDB35970	(3β，17α，23s)-17,23-环氧-3,29-二羟基 -27-norlanosta-7,9(11)-二烯 -15,24-二酮	(3beta,17alpha,23S)-17,23-Epoxy-3,29-dihydroxy-27-norlanosta-7,9(11)-diene-15,24-dione	C29H42O5	38.5	941.61	11.30
13	HMDB11384	磷脂酰乙醇胺(P-18:0/20:3(8Z,11Z,14Z))	PE(P-18:0/20:3(8Z,11Z,14Z))	C43H80NO7P	45.3	776.56	13.41
14	HMDB37344	3‘’,4‘’-二乙酰大波斯菊苷	3",4"-Diacetylcosmosiin	C25H24O12	45.8	499.12	1.42
15	HMDB11127	1,2-二-(9Z，12Z，15Z 十八碳三烯基)-3-(半乳糖基 α-1-6-半乳糖基 β-1)-丙三醇	1,2-Di-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-3-(Galactosyl-alpha-1-6-Galactosyl-beta-1)-glycerol	C51H84O15	41.4	959.56	11.49
16	HMDB00614	磷脂酰丝氨酸(16:0/16:0)	PS(16:0/16:0)	C38H74NO10P	41.1	753.54	13.80
17	HMDB36333	4’-羟基苯乙酮 4’-[4-羟基-3,5-二甲氧基苯甲酰-(->5)-芳基 -(1->2)-葡萄糖苷]	4'-Hydroxyacetophenone 4'-[4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoyl-(->5)-apiosyl-(1->2)-glucoside]	C28H34O15	50.7	628.22	1.24
18	HMDB04816	甲酰胺嘧啶-腺嘌呤	FAPy-adenine	C5H7N5O	40.8	136.06	0.91
19	HMDB33621	楤木脑苷	Araliacerebroside	C40H77NO10	49.2	732.56	11.69
20	HMDB37396	罗斯酸	xi-10-Hydroxyoctadecanoic	C18H36O3	41.7	318.30	5.92

			acid				
21	HMDB35469	氮-(2R-羟基二十二碳酰)-2S-氨基-1,3S，4R-十八烷三醇	N-(2R-Hydroxydocosanoyl)-2S-amino-1,3S,4R-octadecanetriol	C40H81NO5	42.5	678.60	11.69
22	HMDB31658	L-2-氨基-5-羟基戊酸	L-2-Amino-5-hydroxypentanoic acid	C5H11NO3	41.3	116.07	0.91
23	HMDB32794	AS 1-1	AS 1-1	C38H71NO9	44.9	708.51	13.61
24	HMDB29276	顺式咖啡酰酒石酸	Cis-Caffeoyl tartaric acid	C13H12O9	49.5	295.04	1.42
25	HMDB35212	松果糖苷 C	Sonchuionoside C	C19H30O8	42.8	409.18	7.44
26	HMDB38732	α-紫罗兰醇 O-[阿拉伯糖基-(1->6)-葡萄糖苷]	alpha-Ionol O-[arabinosyl-(1->6)-glucoside]	C24H40O10	53.6	511.25	8.22
27	HMDB41140	异戊二烯基顺式咖啡酸酯	Prenyl cis-caffeate	C14H16O4	48.7	266.14	1.07
28	HMDB08765	磷脂酰胆碱(24:0/18:3(9Z,12Z,15Z))	PC(24:0/18:3(9Z,12Z,15Z))	C50H94NO8P	42	850.67	11.30
29	HMDB28725	天冬酰胺酰精氨酸	Asparaginyl-Arginine	C10H20N6O4	43.3	311.14	6.69
30	HMDB02823	二十二碳三烯酸	Docosatrienoic acid	C22H38O2	41.1	352.32	10.15
31	HMDB34159	乙酰柠檬酸三丁酯	Acetyl tributyl citrate	C20H34O8	52.6	425.21	8.22
32	HMDB28802	谷氨酰胺酰赖氨酸	Glutaminyl-Lysine	C11H22N4O4	44.5	292.20	7.07
33	HMDB00269	鞘氨醇	Sphinganine	C18H39NO2	46.8	284.29	11.11
34	HMDB29782	6-epi-7-异脲酸葡萄糖苷	6-Epi-7-isocucurbic acid glucoside	C18H30O8	45.9	357.19	7.44
35	HMDB35159	泡桐酸	Paullinic acid	C20H38O2	48.2	328.32	10.92

表5. PGY汤剂体中功能性的小分子列表

编号	化合物ID	名称	英文名称	分子式	得分	质荷比	保留时间(分)	功能描述
1	HMDB00734	吲哚丙烯酸	Indolearcrylic acid	C11H9NO2	44.6	205.10	1.06608333	消炎
2	HMDB28	赖氨酰	Lysyl-P	C11H21	40.2	226.	1.42	Alleviate

	959	脯氨酸	roline	N3O3		15		inflammation and renal fibrosis
3	HMDB36846	淫羊藿苷B8	Icariside B8	C19H32O8	55.1	411.20	7.44408333	消炎
4	HMDB35988	灵芝酸F	Ganoderic acid F	C32H42O9	44.8	593.27	10.7289167	消炎
5	HMDB02375	莴苣酸	Chicoric acid	C22H18O12	40.4	492.11	1.42343333	Stimulate phagocytosis
6	HMDB35990	脑苷脂B	Cerebroside B	C41H77NO9	39.4	750.54	12.8375833	Inhibit mononuclear cell migration and Cartilage degradation
7	HMDB60681	4-羟基-2,6-二甲基苯胺	4-Hydroxy-2,6-dimethylaniline	C8H11NO	50.5	120.08	1.06608333	Relieve itching, heat, and pain caused by inflammation of the skin; antiarrhythmic
8	HMDB00050	腺苷	Adenosine	C10H13N5O4	45.2	268.10	0.90858333	Dilate blood vessels, arrhythmia drugs of type V
9	HMDB02117	油酰胺	Oleamide	C18H35NO	50.9	282.28	10.53575	Relieve emotion and sleep disorders
10	HMDB10715	2-苯乙酰胺	2-Phenylacetamide	C8H9NO	42.3	118.06	1.06608333	Antiarrhythmic
11	HMDB61104	7-羟基甲氨蝶呤	7-hydroxymethotrexate	C20H22N8O6	41.8	453.16	7.2539	Folic acid antagonist; 抗肿瘤; treat autoimmune diseases
12	HMDB03431	L-组胺醇	L-Histidinol	C6H11N3O	40.7	124.09	11.49425	Enhance effects of 抗肿瘤 drugs

表6. HJT汤剂体中的蛋白列表

序号	蛋白质ID号	蛋白名称	英文名称	得分	密度
1	P42739	聚泛素	Polyubiquitin	18.922	3810200
2	P69310	泛素-60S核糖体蛋白L40-2	Ubiquitin-60S ribosomal protein	13.257	2414600

			L40-2		
3	Q39752	钙调蛋白-5	Calmodulin-5	8.8684	3206100
4	P08477	细胞溶质甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPC2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC2, cytosolic	6.7177	2599300
5	Q27IK6	成膜体定向驱动蛋白	Phragmoplast orienting kinesin	6.7093	19854000
6	K4LMW2	倍半萜合酶 2	Sesquiterpene synthase 2	6.4161	2251300
7	O81028	含有蛋白质 AT2G26790 的五肽重复序列，线粒体	Pentatricopeptide repeat-containing protein At2g26790, mitochondrial	6.1664	2385500
8	Q10D00	ATP 依赖性 RNA 螺旋酶 SUV3，线粒体;	ATP-dependent RNA helicase SUV3, mitochondrial;	5.9266	1658900
9	Q9LQ32	葡糖醛酸氧基 4-O-甲基转移酶 3	Glucuronoxylan 4-O-methyltransferase 3	5.9167	70158000
10	Q6R2K1	蛋白 strubelig 受体家族 5	Protein STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY 5	5.9167	41164000
11	Q8W4H7	延伸因子 1-α2	Elongation factor 1-alpha 2	5.9167	20457000
12	Q9SCJ9	泛素羧基末端水解酶 26	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 26	5.9167	16483000
13	Q05753	含锚蛋白重复域的蛋白质，叶绿体	Ankyrin repeat domain-containing protein, chloroplastic	5.9167	15696000
14	Q67J19	可能的 BRI1 激酶抑制剂 1	Probable BRI1 kinase inhibitor 1	5.9167	12764000
15	P26563	天冬氨酸氨基转移酶 P2，线粒体	Aspartate aminotransferase P2, mitochondrial	5.9167	9863500
16	P04672	结瘤素 44	Nodulin-44	5.9167	9466800
17	Q9SM09	V 型质子 ATP 酶催化亚基 A	V-type proton ATPase catalytic subunit A	5.9167	8766600
18	Q8RWG2	蛋白质高叶绿素荧光 107	Protein high chlorophyll fluorescent 107	5.9167	8229500
19	Q9FYH1	组蛋白乙酰转移酶 2	Histone acetyltransferase HAC2	5.9167	7007400
20	P02857	豆球蛋白 A	Legumin A	5.9167	5423500
21	F4I5D5	WAT1 相关蛋白 at1g70260	WAT1-related protein At1g70260	5.9167	5284100

22	Q9SY74	含锌指 CCCH 结构域蛋白 5	Zinc finger CCCH domain-containing protein 5	5.9167	5050900
23	P0C585	颗粒结合淀粉合成酶 1，叶绿体/淀粉体	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	5.9167	4542000
24	O22197	可能的 E3 泛素蛋白连接酶 A	Probable E3 ubiquitin-protein ligase RHC1A	5.9167	3564800
25	O22056	RNA 聚合酶 sigma 因子 b	RNA polymerase sigma factor sigB	5.9167	3414300
26	O22300	同源盒蛋白结-1 样 Let12	Homeobox protein knotted-1-like LET12	5.9167	3027700
27	Q0JCU7	玉米黄质环氧化酶，叶绿体	Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic	5.9167	2818100
28	P31582	Ras 相关蛋白 rabf2a	Ras-related protein RABF2A	5.9167	2650700
29	Q940K0	可能抗病蛋白 AT1G61180	Probable disease resistance protein At1g61180	5.9167	2376800
30	Q40237	主要花粉过敏原 lol p 5b	Major pollen allergen Lol p 5b	5.9167	2061200
31	Q00864	非光依赖性原叶绿素酸酯还原酶 B 亚单位	Light-independent protochlorophyllide reductase subunit B	5.9167	2028700
32	Q2R2Z0	谷氨酸-tRNA(谷氨酰胺)酰胺转移酶亚基 B	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B	5.9167	1639300
33	O65282	20 kDa 伴侣蛋白，叶绿体	20 kDa chaperonin, chloroplastic	5.9167	1363600
34	Q56W64-2	可能的异天冬氨酸肽酶/1-天冬氨酸酶 3	Probable isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 3	5.9167	1299600
35	A7Y3C4	II 型光系统 D2 蛋白	Photosystem II D2 protein	5.9167	405460
36	Q8VZ79	DE NOVO 2 相关蛋白	Protein INVOLVED IN DE NOVO 2	5.9167	322920
37	P52705	(S)-羟丁腈裂解酶	(S)-hydroxynitrile lyase	5.9167	209640
38	O80467	精胺芥子酰辅酶 A 酰基转移酶	Spermidine sinapoyl CoA acyltransferase	5.9167	167870

表7. PGY汤剂体中的蛋白列表

序号	蛋白 ID	蛋白名称	样品名称	得分	密度

1	P86055	过氧化物酶 2	Peroxidase 2	224.9	37332000
2	Q8RX86-2	α-半乳糖苷酶 2	Alpha-galactosidase 2	194.44	7066200
3	P86067	过氧化物酶 10	Peroxidase 10	107.25	46486000
4	A0A0B4JDK1	非特异性脂质转移蛋白	Non-specific lipid-transfer protein	72.406	206080000
5	P27322	70kDa 热休克蛋白 3	Heat shock 70 kDa protein 3	69.029	72537000
6	P49693	60S 核糖体蛋白 L19-3	60S ribosomal protein L19-3	58.835	6670300
7	Q40677	可能的果糖二磷酸醛缩酶 1，叶绿体	Probable fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic	54.273	37424000
8	B3EWQ2	抗菌肽 2	Antimicrobial peptide 2	53.733	17372000
9	P26320	放氧增强蛋白 1	Oxygen-evolving enhancer protein 1	48.621	101720000
10	Q41246	14-3-3-样蛋白 GF14 omicron	14-3-3-like protein GF14 omicron	42.923	29295000
11	P0C073	泛素 NEDD8 样蛋白 RUB2	Ubiquitin-NEDD8-like protein RUB2	37.614	621770000
12	Q39752	钙调蛋白-5	Calmodulin-5	37.051	60273000
13	P28450	二磷酸核酮糖羧化酶大链	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	28.505	51941000
14	Q9ZT00	二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶活化酶	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	26.205	37659000
15	P27879	18.1 kDa I 型热休克蛋白	18.1 kDa class I heat shock protein	24.306	101640000
16	P26300	烯醇酶	Enolase	22.081	28302000
17	P46523	伴侣蛋白 ClpC1，叶绿体	Chaperone protein ClpC1, chloroplastic	20.657	9179000
18	O49065	根过敏原蛋白	Root allergen protein	18.921	190000000
19	P27337	过氧化物酶 1	Peroxidase 1	16.936	22889000
20	P49249	可能的醛酮还原酶 5	Probable aldo-keto reductase 5	16.249	3262800
21	Q43831	伴侣蛋白 60 β2 亚基，叶绿体	Chaperonin 60 subunit beta 2, chloroplastic	15.476	32546000
22	P85088	ATP 合酶 β 亚基	ATP synthase subunit beta	14.837	9836400
23	P36688	50s 核糖体蛋白 L12	50S ribosomal protein L12	14.819	167360000
24	O04996	超氧化物歧化酶[铜-锌]	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	14.344	324980000

25	P46257	果糖二磷酸醛缩酶	Fructose-bisphosphate aldolase	13.778	72863000
26	P08477	细胞溶质甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPC2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC2, cytosolic	13.706	30987000
27	P30170	肌动蛋白-12	Actin-12	12.918	77830000
28	O49080	放氧增强蛋白 2	Oxygen-evolving enhancer protein 2	12.461	18880000
29	Q43215	组蛋白 H2B.7	Histone H2B.7	12.287	65959000
30	Q9XEK6	40s 核糖体蛋白 S14-1	40S ribosomal protein S14-1	11.553	141790000
31	B3A0N2	非特异性转脂蛋白	Non-specific lipid-transfer protein	11.477	63259000
32	Q8L4N1-2	普应激蛋白 PHOS34	Universal stress protein PHOS34	10.193	13338000
33	Q9LEJ0	烯醇酶 1	Enolase 1	9.3352	5224700
34	Q9ASR1	延长因子 2	Elongation factor 2	8.6402	15693000
35	P48493	磷酸丙糖异构酶	Triosephosphate isomerase	8.6026	54557000
36	P85915	延长因子 1-α2	Elongation factor 1-alpha 2	8.2353	19138000
37	Q8GVE8	磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 4	Phosphoenolpyruvate carboxylase 4	8.1239	17825000
38	Q38872	钙依赖性蛋白激酶 6	Calcium-dependent protein kinase 6	7.4954	70644000
39	Q08080	70kDa 热休克蛋白 6 ,叶绿体	Heat shock 70 kDa protein 6, chloroplastic	7.3833	48170000
40	Q41649	肽基脯氨酰顺反异构酶 FKBP15-1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP15-1	7.3335	8230800
41	P83218	果胶酶/果胶酶抑制剂 3	Pectinesterase/pectinesterase inhibitor 3	7.1315	215680000
42	Q9FLG1	β-D-木糖酶 4	Beta-D-xylosidase 4	7.0715	19208000
43	P47921	核苷二磷酸激酶	Nucleoside diphosphate kinase	6.9705	11757000
44	P83373	苹果酸脱氢酶 1，线粒体	Malate dehydrogenase 1, mitochondrial	6.8677	9450300
45	Q9SWF5	腺苷同型半胱氨酸酶 2	Adenosylhomocysteinase 2	6.822	19916000
46	F4IN32	含 MATH 结构域和螺旋结构域蛋白 At2g42460	MATH domain and coiled-coil domain-containing protein At2g42460	6.8169	3016800
47	Q9FJD6	假定的呼吸爆发氧化酶同系蛋白 H	Putative respiratory burst oxidase homolog protein H	6.8116	8143800

48	P02520	I 型热休克蛋白	Class I heat shock protein	6.6857	34589000
49	P86066	过氧化物酶 9	Peroxidase 9	6.6696	6907400
50	O50003	60s 核糖体蛋白 L12-2	60S ribosomal protein L12-2	6.6548	15793000
51	Q8M9Y8	50s 核糖体蛋白 L20	50S ribosomal protein L20	6.5835	4242500
52	P85962	60s 酸性核糖体蛋白 P2	60S acidic ribosomal protein P2	6.5112	4430800
53	O04350	微管蛋白折叠辅因子 A	Tubulin-folding cofactor A	6.503	6355900
54	Q2R482	DNA 复制许可因子 MCM2	DNA replication licensing factor MCM2	6.4837	493670000
55	Q8GYD9	可能的 RNA 螺旋酶 SDE3	Probable RNA helicase SDE3	6.4036	10678000
56	Q9FEF8-2	RNA 聚合酶 II 转录亚基 36b 的可能性介体	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 36b	6.3693	49624000
57	P83442	晚期胚胎发生丰富蛋白 DC3	Late embryogenesis abundant protein Dc3	6.3587	17038000
58	Q9SML8	苹果酸脱氢酶,胞质 1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 1	6.3468	4554300
59	Q7DMN9	钙调蛋白-5/6/7/8	Calmodulin-5/6/7/8	6.306	31812000
60	Q42662	5-甲基四氢叶酸三氨基甲酸酯--同型半胱氨酸甲基转移酶	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	6.2899	3134700
61	Q9ZU90	F-box 蛋白 SKIP28	F-box protein SKIP28	6.2367	42902000
62	Q9SLN1	丝状植物蛋白 7	Filament-like plant protein 7	6.2279	3639900
63	F4JUI9	驱动蛋白样蛋白	Kinesin-like protein	6.1026	172810000
64	P15252	橡胶延伸因子蛋白	Rubber elongation factor protein	6.0825	9877400
65	B9HCR2	甲基硫核糖-1-磷酸异构酶	Methylthioribose-1-phosphate isomerase	6.0763	6670100
66	Q39615	光合系统 I 反应中心亚基 II-2，叶绿体	Photosystem I reaction center subunit II-2, chloroplastic	6.0636	12355000
67	Q7XYS3	丙烯氧化物合酶 2	Allene oxide synthase 2	6.0586	7798500
68	Q8VY00	前 mRNA 剪接因子 ATP 依赖性 RNA 螺旋酶 DEAH1	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DEAH1	6.0386	1458700

69	P27456	谷胱甘肽还原酶,叶绿体	Glutathione reductase, chloroplastic	6.0181	3722600
70	Q8W171	肽基脯氨酰顺反异构酶 1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1	6.0126	3996200
71	Q9LJX4-2	Pumilio 同系蛋白 5	Pumilio homolog 5	5.9912	13389000
72	Q00383	TIC 214 蛋白	Protein TIC 214	5.9887	17037000
73	Q8LEU3	叶绿素(ide)b 还原酶 NOL，叶绿体	Chlorophyll(ide) b reductase NOL, chloroplastic	5.9849	15552000
74	Q39528	凝集素-1	Agglutinin-1	5.9834	8563200
75	F4JQZ3	Rho GTP 酶激活蛋白 REN1	Rho GTPase-activating protein REN1	5.9802	45841000
76	Q39291	V 型质子 ATP 酶催化亚基 A	V-type proton ATPase catalytic subunit A	5.9751	13904000
77	Q9ZV88	BES1/BZR1 同源蛋白 4	BES1/BZR1 homolog protein 4	5.9713	8200900
78	Q9MB95	1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶 1	1-aminocyclopropane -1-carboxylate synthase 1	5.9712	11179000
79	Q8W4F0	DA1 相关蛋白 1	Protein DA1-related 1	5.951	17844000
80	A6MMS5	成熟酶 K	Maturase K	5.9461	15716000
81	Q0JHF8	果糖-1,6-二磷酸酶	Fructose-1,6-bisphosphatase	5.9436	5507400
82	Q99070	富含甘氨酸的 RNA 结合蛋白 2	Glycine-rich RNA-binding protein 2	5.9435	110970000
83	Q5JLS2	CBL 相互作用蛋白激酶 12	CBL-interacting protein kinase 12	5.9368	4959100
84	F4IGL2	类动蛋白	Kinesin-like protein	5.9359	8858700
85	P35687	40s 核糖体蛋白 S21	40S ribosomal protein S21	5.9336	22222000
86	Q0DUI1	可能的丝氨酸乙酰转移酶 3	Probable serine acetyltransferase 3	5.9311	5516400
87	Q9ZWC8	丝氨酸/苏氨酸激酶 Bri1 样蛋白 1	Serine/threonine-protein kinase BRI1-like 1	5.9226	4741100
88	P26413	70kDa 热休克蛋白	Heat shock 70 kDa protein	5.9225	5500600
89	Q9LM66	木质部半胱氨酸蛋白酶 2	Xylem cysteine proteinase 2	5.9057	8304600
90	Q8VZY6	多梳蛋白 FIE2	Polycomb group protein FIE2	5.9054	3038900
91	Q9FPS9	泛素羧基末端水解酶 15	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	5.9045	7895400
92	Q9FEC4	反式剪接因子 raa3	Trans-splicing factor	5.8962	28562000

			Raa3		
93	Q75W17	Furcatin 水解酶	Furcatin hydrolase	5.8778	3844900
94	Q8LG77	线粒体异柠檬酸脱氢酶(NAD)催化亚基 6	Isocitrate dehydrogenase [NAD] catalytic subunit 6, mitochondrial	5.8737	5903800
95	Q43153	双功能 L-3-氰基丙氨酸合酶/半胱氨酸合酶	Bifunctional L-3-cyanoalanine synthase/cysteine synthase	5.8735	8302400
96	O80673	CDPK 相关激酶 1	CDPK-related kinase 1	5.8663	3386400
97	Q07510	3-氧杂环-[酰基载体蛋白]合酶 III	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	5.8656	12050000
98	Q6KAI0	聚核糖核苷酸核苷酸转移酶 2	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 2	5.8626	5509000
99	Q0D3I7	Wuschel 相关同源框 12	WUSCHEL-related homeobox 12	5.8621	6510400
100	P18905	延长因子 Tu	Elongation factor Tu	5.8615	3084900
101	Q6WNR0	异黄酮 2'-羟化酶	Isoflavone 2'-hydroxylase	5.8569	26449000
102	P85905	翻译控制肿瘤蛋白同系物	Translationally-controlled tumor protein homolog	5.8548	19728000
103	Q0J9V3	驱动蛋白样蛋白 KIN-14H	Kinesin-like protein KIN-14H	5.8546	3860700
104	Q9C5Q8	小 RNA 2 位氧甲基转移酶	Small RNA 2-O-methyltransferase	5.8542	18023000
105	Q00081	葡萄糖-1-磷酸腺嘌呤转移酶大亚基 1	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1	5.8513	12444000
106	Q9FJK7	细胞周期蛋白 C1-2	Cyclin-C1-2	5.8513	53998000
107	Q0WT24	质子根毒性敏感蛋白 2	Protein SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 2	5.8488	5961500
108	P12466	二磷酸核酮糖羧化酶长链	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	5.8477	5198800
109	Q8S9K3	锌指蛋白 VAR3，叶绿体	Zinc finger protein VAR3, chloroplastic	5.8469	5129100
110	Q8LG10	GATA 转录因子 15	GATA transcription factor 15	5.8463	8793300
111	F4IDW9	PARTING DANCERS 蛋白	Protein PARTING DANCERS	5.8442	3152300
112	Q9ZPY2-2	漆酶 6	Laccase-6	5.8436	12149000

113	Q9SBB2	ABC 转运蛋白 1	Protein ABC transporter 1	5.8407	5570200
114	P09753	psbA 内含子 38.5kDa 蛋白	Uncharacterized 38.5 kDa protein in psbA intron 1	5.8387	21558000
115	A4GNA8	磷脂酰丝氨酸脱羧酶原酶 3	Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme 3	5.8376	6961500
116	A1XGT0	Ycf2 蛋白	Protein Ycf2	5.8374	6466300
117	Q9LEL5	3'-羟基-N-甲基-(S)-乌药碱 4'-O-甲基转移酶	3'-hydroxy-N-methyl-(S)-coclaurine 4'-O-methyltransferase	5.8359	4223300
118	Q8WHZ0	30S 核糖体蛋白 S11	30S ribosomal protein S11	5.833	13403000
119	Q9ZUB9	假定的 F 盒蛋白 At1g23770	Putative F-box protein At1g23770	5.8316	4699200
120	Q42831	非共生血红蛋白	Non-symbiotic hemoglobin	5.8313	21708000
121	Q8LPS6	含五肽重复序列蛋白 At1g02150	Pentatricopeptide repeat-containing protein At1g02150	5.831	1790000
122	O64597	假定的 F 盒蛋白 At1g70390	Putative F-box protein At1g70390	5.8308	5481900
123	Q93ZG9	肽基脯氨酸顺反异构酶 FKBP53	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP53	5.8305	1454100
124	P42777	G 盒结合因子 4	G-box-binding factor 4	5.8304	5305500
125	Q9LF41	可能的泛素结合因子 E4	Probable ubiquitin conjugation factor E4	5.8298	4992200
126	P36183	内纤溶酶同系物	Endoplasmin homolog	5.8297	13029000
127	O49696	铝激活苹果酸转运蛋白 12	Aluminum-activated malate transporter 12	5.8294	5467900
128	Q9SFD8	核转录因子 Y 亚基 B-9	Nuclear transcription factor Y subunit B-9	5.8291	2838000
129	Q6ZFZ4	钙蛋白型半胱氨酸蛋白酶 ADL1	Calpain-type cysteine protease ADL1	5.829	5255300
130	Q9LYT5	可能的果胶酶/果胶酶抑制剂 35	Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 35	5.829	3104900
131	Q7XAM0	纺锤体和着丝粒相关蛋白 1 同系物	Spindle and kinetochore-associated protein 1 homolog	5.8289	4385400
132	Q6YXR4	光合系统 1 组装蛋白 Ycf4	Photosystem I assembly protein Ycf4	5.8288	2716300
133	Q9SYM4	α，α-海藻糖磷酸合	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase	5.8279	3427200

		成酶[UDP 形成]1	[UDP-forming] 1		
134	Q1PET6	可能的异戊烯半胱氨酸 α-羰基甲基酯酶 ICMEL2	Probable isoprenylcysteine alpha-carbonyl methylesterase ICMEL2	5.8278	12092000
135	Q9LKG7	UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷转移酶	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	5.8278	18078000
136	Q6NPP4	钙调蛋白结合转录激活子 2	Calmodulin-binding transcription activator 2	5.8277	3782600
137	Q9CAM8	五肽重复序列包含蛋白 At1g63150	Pentatricopeptide repeat-containing protein At1g63150	5.8277	16708000
138	O04204	60s 酸性核糖体蛋白 P0-1	60S acidic ribosomal protein P0-1	5.8274	19674000
139	Q0WRJ2	3-脱氢鞘氨醇还原酶 TSC1A	3-dehydrosphinganine reductase TSC10A	5.8266	3549600
140	Q6AUV1	黄嘌呤脱氢酶	Xanthine dehydrogenase	5.8262	1690900

表8. HJT汤剂体中的小RNA序列

列 1	序列	汤剂	汤剂体	对照	0h	60h
HJT-sRNA-18	TTGGGTGCGAGAGGTCCC	1113	535	866	1135	1108
HJT-sRNA-19	CTTTGTCGCTTCGATTCGT	380	157	0	49	41
HJT-sRNA-20	GAAGTCCTCGTGTTGCACCCC	7539	6007	1	42	33
HJT-sRNA-21	AGTCCTCGTGTTGCACCCCT	17747	13298	1	37	28
HJT-sRNA-22	CTCGGCCTTTTGGCTAAG	657	199	10	28	30
HJT-sRNA-23	ACGACTCTCGGCAACGGA	14450	8944	7	27	21
HJT-sRNA-24	CGACTCTCGGCAACGGATA	16051	7604	7	23	20
HJT-sRNA-25	CATAACGACTCTCGGCAA	841	467	0	20	7
HJT-sRNA-26	CTCGGCAACGGATATCTCG	9252	5581	4	15	18
HJT-sRNA-27	CCTATGTCGCTTCGATTCG	417139	215505	0	9	16
HJT-sRNA-28	CTATGTCGCTTCGATTCGT	422659	208523	0	9	15
HJT-sRNA-29	CTCTCGGCAACGGATATCT	9174	4957	5	14	17
HJT-sRNA-30	CGGATATCTCGGCTCTCG	20596	6860	2	7	16
HJT-sRNA-31	GGTGCGAGAGGTCCCGAGT	429	216	14	17	29

HJT-sRNA-32	ACGGATATCTCGGCTCTC	8662	4222	2	10	12
HJT-sRNA-33	CTGGTTGATCCTGCCAGTAGT	452	480	8	17	16
HJT-sRNA-34	CGACCCCAGGTCAGGCGGG	44210	13924	2	12	9
HJT-sRNA-35	CGGCAACGGATATCTCGGCT	3915	3718	2	7	14
HJT-sRNA-36	GCGACCCCAGGTCAGGCGG	39609	12687	2	12	8
HJT-sRNA-37	GACTCTCGGCAACGGATATC	3876	2756	4	11	13
HJT-sRNA-38	TACCCGGCCGTCGGGGCA	4637	1841	0	11	5
HJT-sRNA-39	TCTCGGCTCTCGCATCGA	10898	4833	0	7	8
HJT-sRNA-40	GGGGATGTAGCTCAGATG	58885	27774	0	9	5
HJT-sRNA-41	TTCCCACAGACGGCGCCA	1144	2106	0	6	8
HJT-sRNA-42	ATTGTGAAGCAGAATTCA	1149	270	200	232	181
HJT-sRNA-43	CCAAGTGTTGGATTGTTCA	6126	2240	1	7	8
HJT-sRNA-44	GGTCATCGCGCTTGGTTGA	18171	9379	3	9	9
HJT-sRNA-45	TGCCGGCCGGGGGACGGA	26430	10501	0	7	5
HJT-sRNA-46	GTTAAGCGTGCTTGGGCGA	10017	5458	0	5	7
HJT-sRNA-47	ACTCGACGGATCGCACGGC	14872	12327	0	6	5
HJT-sRNA-48	CTGGTCGATGGAACAATGT	3808	2992	0	5	6
HJT-sRNA-49	TGCTTTTTGATCCTTCGATG	9523	2830	0	5	5
HJT-sRNA-50	TTGGGTGCGAGAGGTCCCGGGT	1113	535	866	1135	1108
HJT-sRNA-51	CCTGGGAAGTCCTCGTGTTGCACCCCT	7539	6007	1	42	33
HJT-sRNA-52	TTCTCGGCCTTTTGGCTAAGA	657	199	10	28	30
HJT-sRNA-53	CATAACGACTCTCGGCAACGGATA	14450	8944	7	27	21
HJT-sRNA-54	ATTGTGAAGCAGAATTCACC	99	39	193	215	170
HJT-sRNA-55	TGCACCGGATCCCATCAGA	2971	2051	0	8	5
HJT-sRNA-56	CCTTAACGAGGATCCATT	3331	630	2	5	6
HJT-sRNA-57	ATTGGTCATCGCGCTTGG	12495	5966	3	5	7
HJT-sRNA-58	CACGGACCAAGGAGTCTG	1071	637	4	6	7
HJT-sRNA-5	TTAGGGTTCGATTCCGG	15336	2974	6	10	5

9	A					

表 9. PGY 汤剂体中的小 RNA 序列

列 1	序列	TZ	汤剂体	Ctrl	0h	55h
PGY-sRNA-33	CCCGAGAGAGGGGCCCGT	147	95	784	1259	45148
PGY-sRNA-34	GGGGTGCGAGAGGTCCCG	411	80	2942	4643	25291
PGY-sRNA-35	TGGGGTGCGAGAGGTCCC	405	78	2687	4281	23813
PGY-sRNA-36	TTGGGGTGCGAGAGGTCC	411	95	2538	3885	21700
PGY-sRNA-37	TGGGTGCGAGAGGTCCCG	677	268	899	1671	11667
PGY-sRNA-38	TTGGGTGCGAGAGGTCCC	687	269	866	1600	11472
PGY-sRNA-39	GGGTTGCGAGAGGTCCCG	136	53	1001	1661	8788
PGY-sRNA-40	TTGGGTTGCGAGAGGTCC	144	51	860	1398	7574
PGY-sRNA-41	TTGGTTGCGAGAGGTCCC	191	52	246	443	3125
PGY-sRNA-42	TCTGAACTCTGAACTCCAGTCA	1238	18306	1	13	377
PGY-sRNA-43	GGTGCGAGAGGTCCCGAG	276	317	14	25	161
PGY-sRNA-44	GTGCGAGAGGTCCCGAGT	337	517	14	24	145
PGY-sRNA-45	CAAGGAAGGCAGCAGGCG	1200	1957	338	356	409
PGY-sRNA-46	GCGACCCCAGGTCAGGCG	79325	88783	3	15	5
PGY-sRNA-47	AGGCTGGGTGTGGAAGTG	146	644	1	7	9
PGY-sRNA-48	TCGTGTCGTGAGATGTTG	620	1862	1	6	8
PGY-sRNA-49	CGCCCCGAGAGAGGGGCCCGTG	147	95	784	1259	45148
PGY-sRNA-50	TTGGGGTGCGAGAGGTCCCGGGT	411	80	2942	4643	25291
PGY-sRNA-51	TTGGGTGCGAGAGGTCCCGGGT	677	268	899	1671	11667
PGY-sRNA-52	TTGGTTGCGAGAGGTCCCGGGT	191	52	246	443	3125
PGY-sRNA-53	ATCCAAGGAAGGCAGCAGGCG	1200	1957	338	356	409
PGY-sRNA-54	CAGAGTTCTACAGTCCGA	8227	122940	967	1051	3115

通过本申请的技术方案，能够显著改进核酸的高效靶向递送，克服了现有技术中核酸脂质体存在包封率低、安全性差、稳定性差、制备工艺复杂、产品不均一、难以重现、以及靶向性有待进一步提高的缺陷。

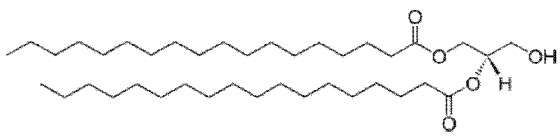
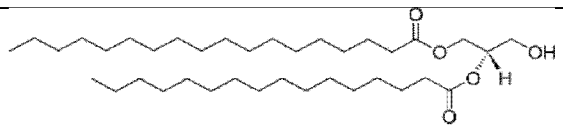
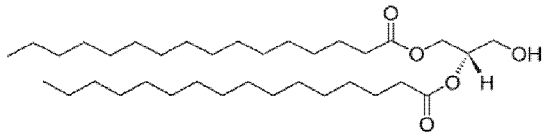
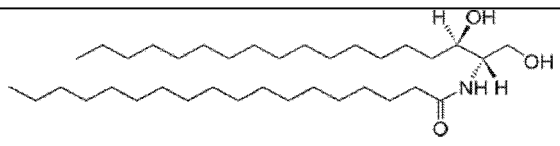
表10 合成的脂质列表

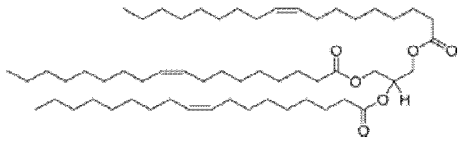
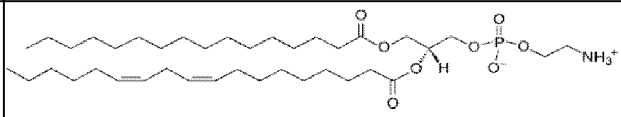
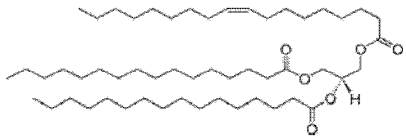
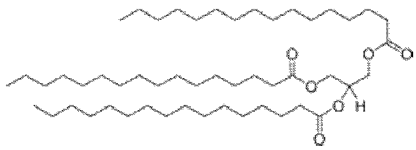
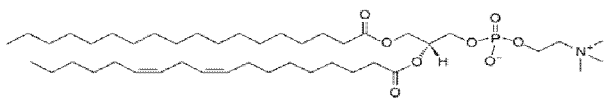
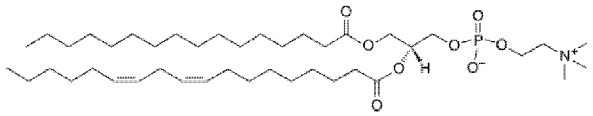
序号	品牌	货号	缩写	工作浓度(mg/mL)
1	Avanti	110882	DG(18:0/18:0/0:0)	5
2	Avanti	110883	DG(18:0/16:0/0:0)	5
3	Avanti	800816C	DG(16:0/16:0/0:0)	10
4	Avanti	860627P	C18 Dihydroceramide (d18:0/18:0)	10
6	Avanti	110613	TG(18:1/18:1/18:1)	1
8	Avanti	850756C	PE(16:0/18:2)	10
9	Avanti	110521	TG(16:0/16:0/18:1)	5
10	Avanti	111000	TG(16:0/16:0/16:0)	10
11	Avanti	850468	PC(18:0/18:2)	10
12	Avanti	850458C	PC(16:0/18:2)	10
13	Avanti	111002	TG(18:2/18:2/18:2)	10
14	Avanti	860634P	C16 Dihydroceramide (d18:0/16:0)	5
15	Sigma	P8577	TG(16:0/18:1/18:2)	1
16	Nu-chek	T-160	TG(18:0/18:0/18:0)	1
17	Matreya	1326	So(d16:0)	1
18	Sigma	D1782	TG(16:0/18:1/18:1)	5
19	Larodan	32-1656-7	DG(16:0/18:2)	5
20	Larodan	34-1603-7	TG(16:0/16:0/18:2)	5
21	Larodan	34-1862-7	TG(16:0/18:2/18:2)	5
22	Larodan	34-3003-7	TG(18:0/16:0/18:1)	5
23	Larodan	34-1822-7	TG(18:0/18:1/18:1)	5
24	Larodan	34-3007-7	TG(18:0/18:1/18:2)	5
25	Larodan	34-1827-7	TG(18:1/18:1/18:2)	5
26	Larodan	34-1828-7	TG(18:1/18:1/18:3)	5
27	Larodan	34-1866-7	TG(18:1/18:2/18:2)	5

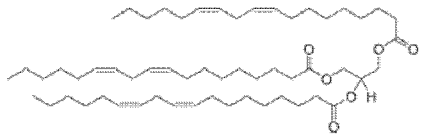
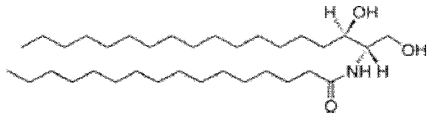
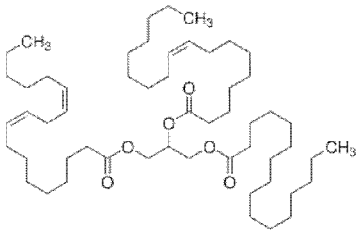
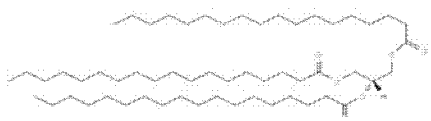
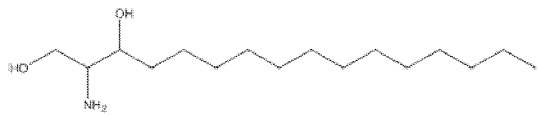
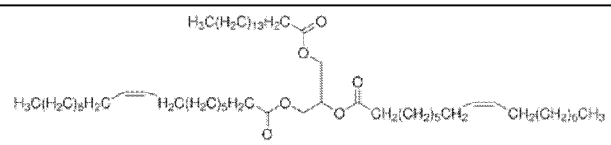
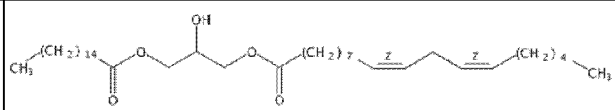
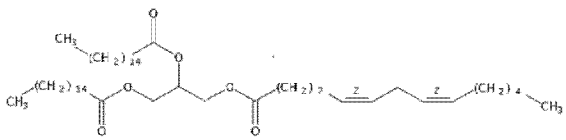
28	Larodan	34-1855-7	TG(18:3/18:2/18:2)	5
29	Larodan	10-1840-4	FA(18:4)	5
30	Avanti	110748	Sphinganine (d18:0)	5
31	Avanti	110749	Sphinganine (d20:0)	1
32	Avanti	110520	TG(18:0/16:0/16:0)	5
33	Larodan	34-1810-7	TG(18:0/16:0/18:0)	10
34	Larodan	31-1820-7	MG(18:2p)	10
35	nu-chek	D-251	DG(18:2/18:2)	10
36	Larodan	38-1802-0	LPC(18:2)	10
37	avanti	791251	LPC(18:3)	10
38	avanti	791016	PE(16:0/16:1)	10
39	avanti	792077C	16:1-18:1PE	10
40	avanti	792078C	16:0-22:1 PE	10
41	avanti	792079P	Sphinganine(d22:0)	10
42	Larodan	31-2220	MG(22:2)	10
43	Larodan	32-1658	DG(16:0/18:3)	10
44	Larodan	34-1289	TG(18:1/18:1/20:4)	10
45	Larodan	34-1870	DG(18:3/18:2)	10
46	Larodan	32-1871	DG(20:5/18:2)	10
47	Larodan	34-1880	TG(18:3/18:2/18:3)	10
48	Larodan	34-2230	TG(18:1/22:1/22:1)	10
49	Larodan	34-3031	TG(16:0/16:1/18:1)	10
50	Larodan	34-3032	TG(16:0/18:1/18:3)	10
51	Larodan	34-3033	TG(16:0/18:1/20:4)	10
52	Larodan	34-3034	TG(18:3/18:2/20:5)	10
53	Avanti	792143	Cer(d16:0/16:0)	10
54	Avanti	792144	Cer(d20:0/18:0)	10
55	Avanti	792145	Cer(d22:0/18:0)	10
56	Avanti	792146	TG(16:0/18:2/18:3)	10
57	Avanti	792147	TG(18:1/18:2/18:3)	10

58	Avanti	792150	PEt(16:1/16:1)	10
59	Avanti	792151	dMePE(16:1/14:0)	10
60	Avanti	792152	dMePE(16:1/16:1)	10
61	Avanti	792153	dMePE(18:1/14:0)	10
62	Avanti	792154	dMePE(16:1/18:1)	10
63	Avanti	792156	PC(18:0/18:3(6Z,9Z,12Z))	10
64	Avanti	792155	PE(15:0/24:1(15Z))	10
65	Avanti	792157	PC(20:0/14:1(9Z))	10
66	Avanti	792160	TG(18:0/18:2/18:3)	10
67	Avanti	792148	TG(18:1/18:2/20:5)	10
68	Avanti	792149	TG(20:5/18:2/18:2)	10
69	Avanti	792158	PC(18:1(11Z)-16:1(9Z))	10
70	Larodan	32-1830-7	DG(18:3/18:3)	25
71	Larodan	37-1620-7	PE(16:0/16:0)	25

表11：脂质1-32的描述

序号	缩写	IUPAC命名	分子式结构
1	DG(18:0/18:0/0:0)	(2S)-1-hydroxy-3-(octadecanoyloxy)propan-2-yl octadecanoate	
2	DG(18:0/16:0/0:0)	(2S)-2-(hexadecanoyloxy)-3-hydroxypropyl octadecanoate	
3	DG(16:0/16:0/0:0)	(2S)-1-(hexadecanoyloxy)-3-hydroxypropan-2-yl hexadecanoate	
4	C18 Dihydroce	N-[(2S,3R)-1,3-dihydroxyoctadecan-2-yl]	

	ramide (d18:0/18:0)	octadecanamide	
6	TG(18:1/18:1/18:1)	1,3-bis[(9Z)-octadec-9-enoyloxy]propan-2-yl (9Z)-octadec-9-enoate	
8	PE(16:0/18:2)	(2-aminoethoxy)[(2R)-3-(hexadecanoyloxy)-2-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoyloxy]propoxy]phosphinic acid	
9	TG(16:0/16:0/18:1)	(2R)-2,3-bis(hexadecanoyloxy)propyl (9Z)-octadec-9-enoate	
10	TG(16:0/16:0/16:0)	1,3-bis(hexadecanoyloxy)propan-2-yl hexadecanoate	
11	PC(18:0/18:2)	trimethyl(2-{[(2R)-2-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoyloxy]-3-(octadecanoyloxy)propyl phosphonato]oxy}ethyl)azanium	
12	PC(16:0/18:2)	(2-{[(2R)-3-(hexadecanoyloxy)-2-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-die	

		noyloxy]propyl phosphonato]oxy}ethyl)trimethylazanium	
13	TG(18:2/18:2/18:2)	1,3-bis[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoyloxy]propan-2-yl (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoate	
14	C16 Dihydroceramide (d18:0/16:0)	N-[(2S,3R)-1,3-dihydroxyoctadecan-2-yl]hexadecanamide	
15	TG(16:0/18:1/18:2)	1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol	
16	TG(18:0/18:0/18:0)	1,3-bis(octadecanoyloxy)propan-2-yl octadecanoate	
17	So(d16:0)	D,L-2-Aminohexadecane-1,3-diol	
18	TG(16:0/18:1/18:1)	1,2-Di(cis-9-octadecenoyl)-3-hexadecanoyl-rac-glycerol	
19	DG(16:0/18:2)	1-Palmitoyl-3-Linoleoyl-sn-glycerol	
20	TG(16:0/16:0/18:2)	1,2-Palmitoyl-3-Linoleoyl-sn-glycerol	

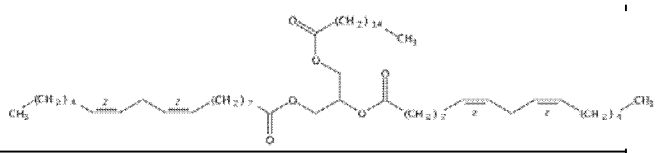
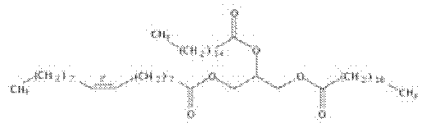
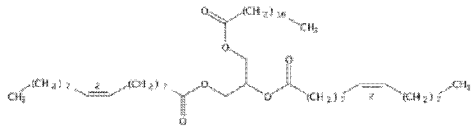
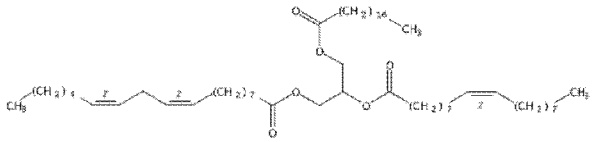
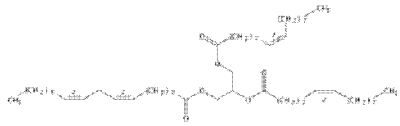
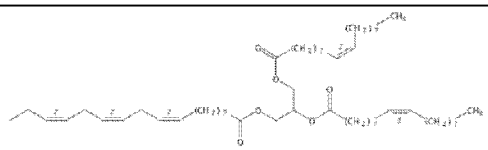
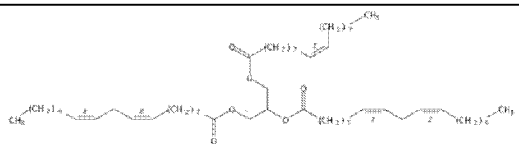
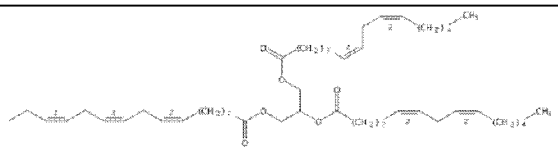
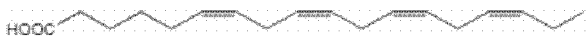
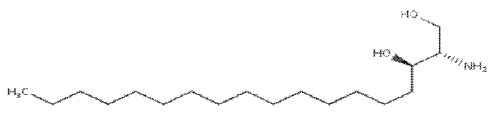
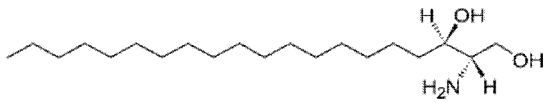
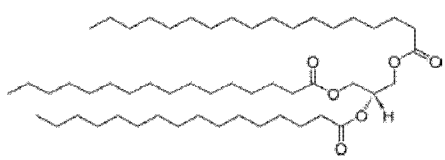
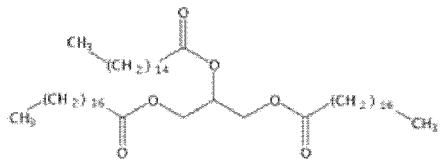
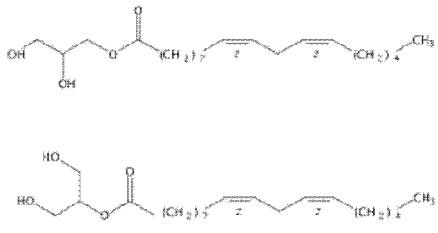
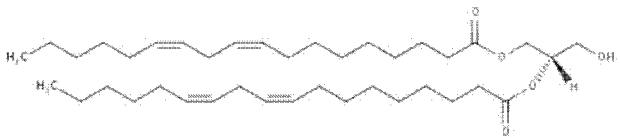
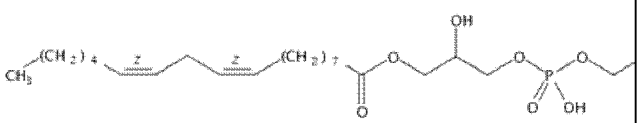
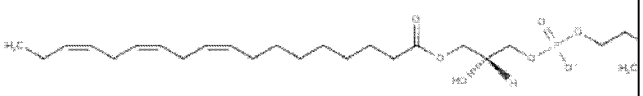
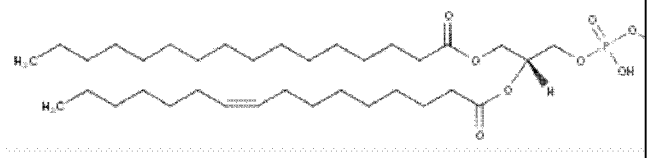
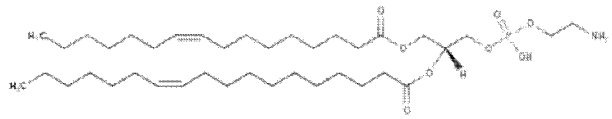
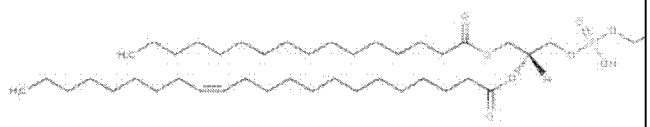
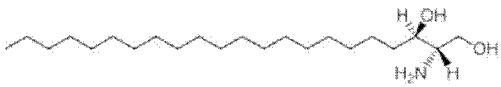
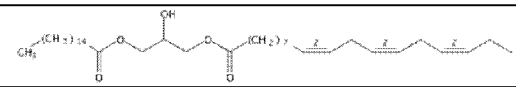
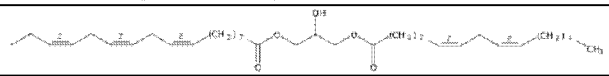
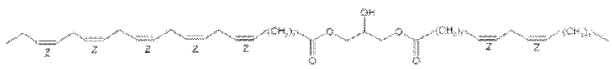
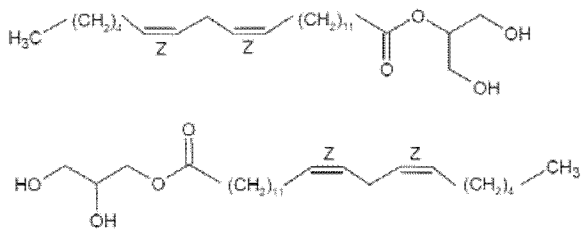
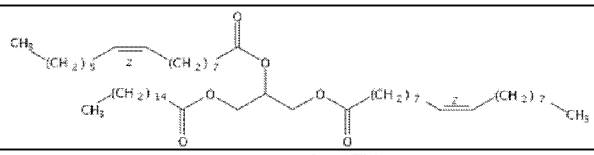
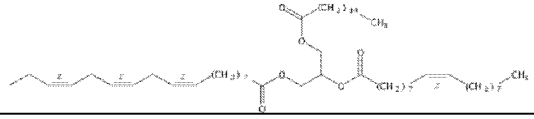
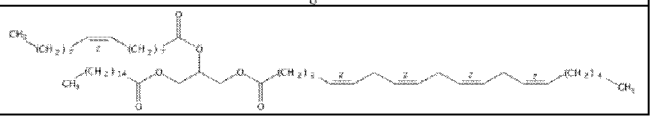
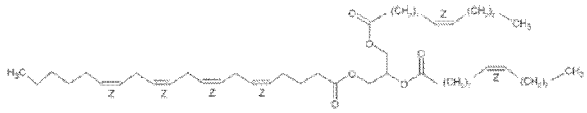
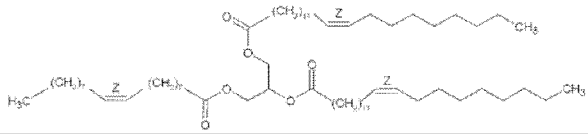
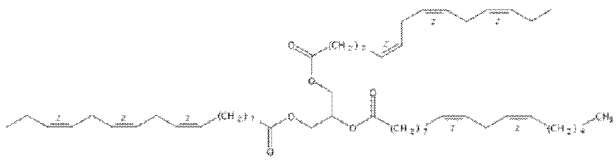
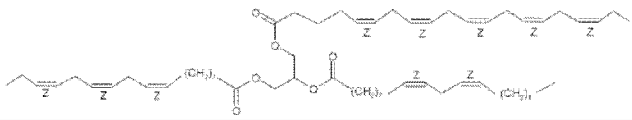
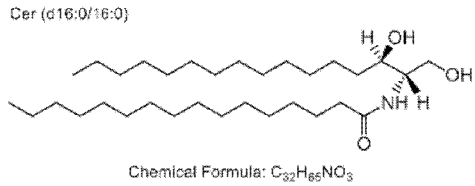
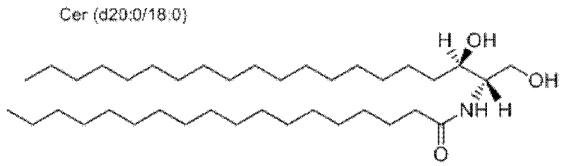
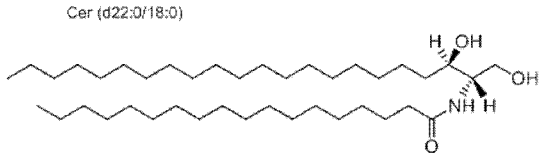
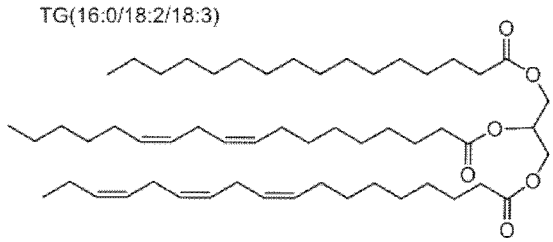
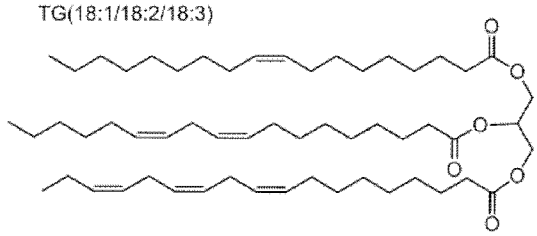
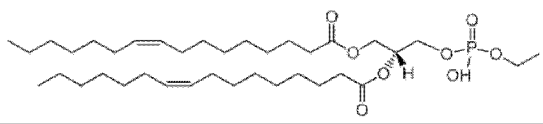
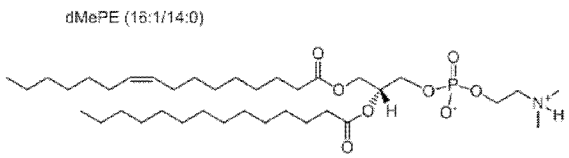
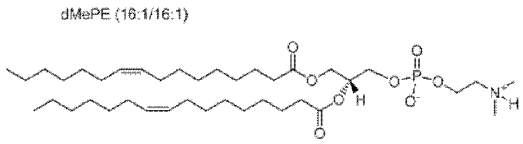
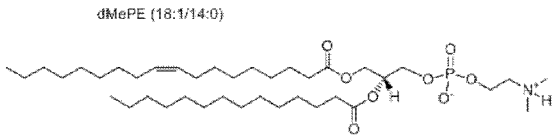
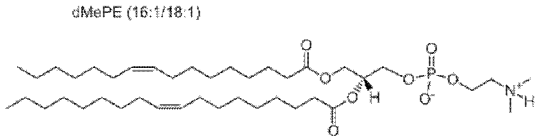
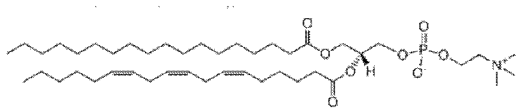
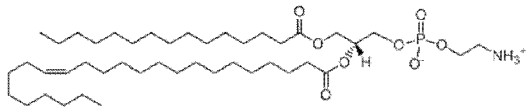
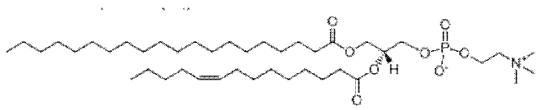
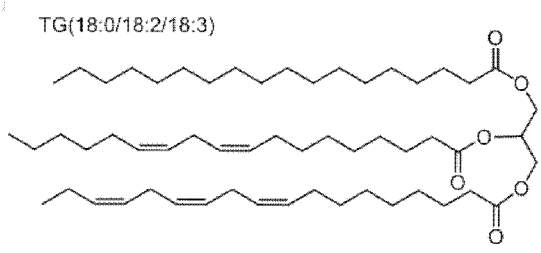
21	TG(16:0/18:2/18:2)	1,2-Linoleoyl-3-Palmitoyl-sn-glycerol	
22	TG(18:0/16:0/18:1)	1-Stearoyl-2-Palmitoyl-3-Oleoyl-sn-glycerol	
23	TG(18:0/18:1/18:1)	1,2-olein-3-stearin	
24	TG(18:0/18:1/18:2)	1-Stearoyl-2-Oleoyl-3-Linoleoyl-sn-glycerol	
25	TG(18:1/18:1/18:2)	1,2-Oleoyl-3-Linoleoyl-sn-glycerol	
26	TG(18:1/18:1/18:3)	1,2-Oleoyl-3-Linolenoyl-sn-glycerol	
27	TG(18:1/18:2/18:2)	1,2-Linoleoyl-3-Oleoyl-sn-glycerol	
28	TG(18:3/18:2/18:2)	1,2-Linoleoyl-3-Linolenoyl-sn-glycerol	
29	FA(18:4)	6c,9c,12c,15c-Octadecatetraenoic Acid	
30	Sphinganine (d18:0)	(2S,3R)-2-aminooctadecane-1,3-diol	
31	Sphinganine (d20:0)	(2S,3R)-2-amino-1,3-eicosanediol	
32	TG(18:0/16:0/16:0)	(2R)-2,3-bis(hexadecanoyloxy)propyl octadecanoate	

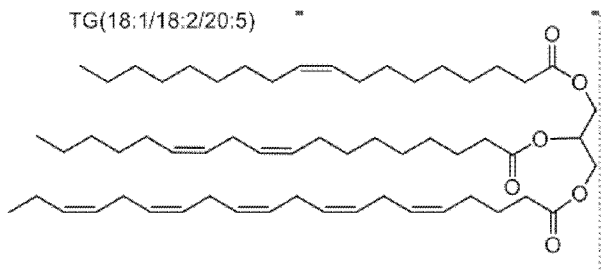
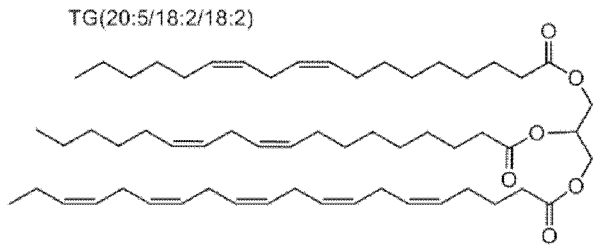
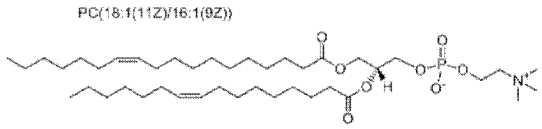
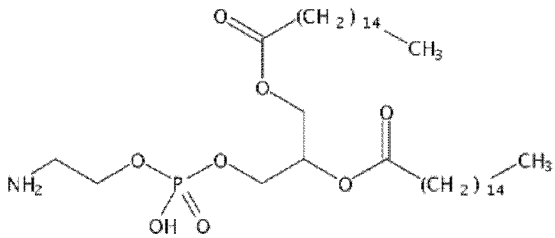
表12：脂质33-71的描述

序号	缩写	IUPAC Name	分子式结构
33	TG(18:0/16:0/18:0)	1,3-Stearin-2-Palmitin 1,3-Octadecanoyl-2-Palmitoyl-glycerol	
34	MG(18:2p)	(9Z,12Z)-Octadeca-9,12-dienoic acid, monoester with glycerol 9,12-Octadecadienoic acid (9Z,12Z)-, monoester with 1,2,3-propanetriol 9,12-Octadecadienoic acid, (Z,Z)-, monoester with 1,2,3-propanetriol	
35	DG(18:2/18:2)	(2S)-1-hydroxy-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoyloxy]propan-2-yl (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoate，	
36	LPC(18:2)	1-Linoleoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholine	
37	LPC(18:3)	(2-{[(2R)-2-hydroxy-3-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoyloxy]propyl phosphonato]oxy}ethyl)trimethylazanium	

38	PE(16:0/16:1)	(2-aminoethoxy)[(2R)-2-[(9Z)-hexadec-9-enoyloxy]-3-(hexadecanoyloxy) propoxy]phosphinic acid	
39	16:1-18:1PE	(2-aminoethoxy)[(2R)-3-[(9Z)-hexadec-9-enoyloxy]-2-[(11Z)-octadec-11-enoyloxy]propoxy]phosphinic acid	
40	16:0-22:1 PE	(2-aminoethoxy)[(2R)-2-[(13Z)-docos-13-enoyloxy]-3-(hexadecanoyloxy)propoxy]phosphinic acid	
41	Sphinganine(d22:0)		
42	MG(22:2)	Monodocosadienoin	
43	DG(16:0/18:3)	1-Palmitin-3-Linolenin	
44	TG(18:1/18:1/20:4)	1,2-Olein-3-Arachidonin (5Z,8Z,11Z,14Z)	
45	DG(18:3/18:2)	1-Linolein-3-Linolenin	
46	DG(20:5/18:2)	1-EPA-3-Linolein	
47	TG(18:3/18:2/18:3)	1,3-Linolenin-2-Linolein	
48	TG(18:1/22:1/22:1)	1,2-Eucin(13Z)-3-Olein	

49	TG(16:0/16:1/18:1)	1-Palmitin-2-Palmitolein -3-Olein	
50	TG(16:0/18:1/18:3)	1-Palmitin-2-Olein-3-Li nolenin	
51	TG(16:0/18:1/20:4)	1-Palmitin-2-Olein-3-Ar achidonin(5Z,8Z,11Z,14 Z)	
52	TG(18:3/18:2/20:5)	1-Linolenin-2-Linolein-3 -EPA	
53	Cer(d16:0/16:0)	C16 dihydroceramide (d16:0/16:0)	
54	Cer(d20:0/18:0)	C18 dihydroceramide (d20:0/18:0)	
55	Cer(d22:0/18:0)	C18 dihydroceramide (d22:0/18:0)	
56	TG(16:0/18:2/18:3)	Triglyceride(16:0/18:2/1 8:3)	
57	TG(18:1/18:2/18:3)	Triglyceride(18:1/18:2/1 8:3)	
58	PEt(16:1/16:1)	1,2-dipalmitoleoyl-sn-gl ycero-3-phosphoethanol	

59	dMePE(16:1/14:0)	1-palmitoleoyl-2-myristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N,N-dimethyl	
60	dMePE(16:1/16:1)	1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N,N-dimethyl	
61	dMePE(18:1/14:0)	1-oleoyl-2-myristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N,N-dimethyl	
62	dMePE(16:1/18:1)	1-palmitoleoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N,N-dimethyl	
63	PC(18:0/18:3(6Z,9Z,12Z))	1-stearoyl-2-linolenoyl(gamma)-sn-glycero-3-phosphocholine	
64	PE(15:0/24:1(15Z))	1-pentadecanoyl-2-nervonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	
65	PC(20:0/14:1(9Z))	1-eicosanoyl-2-myristoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	
66	TG(18:0/18:2/18:3)	Triglyceride(18:0/18:2/18:3)	

67	TG(18:1/18:2/20:5)	Triglyceride(18:1/18:2/20:5)	
68	TG(20:5/18:2/18:2)	Triglyceride(20:5/18:2/18:2)	
69	PC(18:1(11Z)-16:1(9Z))	1-vaccenoyl-2-palmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	
70	DG(18:3/18:3)	Dilinolenin	
71	PE(16:0/16:0)	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylethanolamine	

术语定义

汤剂体（decoctosome）：由脂质、蛋白质、核酸和化合物等物质构成的，来源于植物汤剂中的具有热稳定性的外泌体样的膜结构的纳米颗粒状物质。在本申请中，汤剂体也可以称为膜结构的活性组合物，优选地通过前文项10-13的方法制备的活性组合物。

本草体（bencaosome）：人工制备的具有膜结构的纳米颗粒状物质。该膜结构包括一种或多种脂质成分，其特点为来源于化学合成或化学分离提纯，包括但不限于表1或表10所示的脂质或与之有70%及以上近似性的脂质（脂质近似性由以下方法界定：有相同母体结构），杂质成份低于5%；将脂质与或/和与下列任意一项或多项混合：一种或多种核酸、一种或多种化合物、一种或多种大分子。本草体是通过加热脂质与其他物质，包括一种或多种核酸、一种或多种化合物和/或一种或多种大分子制备的膜结构的纳米颗粒状物质。在本申请中，本草体也可以称为膜结构的活性组合物，优选地通过前文

项1-2、5-9或20-28的方法制备的活性组合物。

所述一种或多种脂质成分可以是合成或提纯的，包括但不限于表1或表10所示的脂质；所述一种或多种核酸成分可以是合成或提纯的，包括但不限于表8、9或表13所示的RNA；所述一种或多种化合物可以是合成或提纯的，包括但不限于表2-表5所示的化合物；所述一种或多种大分子成分可以是合成或提纯的，包括但不限于表6或表7所示的蛋白；

本申请中所述的逆向蒸发法，是指将核酸/大分子/化合物的水溶液加入到脂质有机溶剂溶液中，超声，蒸发挥除有机溶剂后，水化得到脂质与核酸/大分子/化合物的混合物。

本申请所述的水煮法(也称加热法)，是指将脂质的有机溶剂溶液加到核酸/大分子/化合物的水溶液中，约90℃煮15min，得到脂质与核酸/大分子/化合物的混合物；该方法并不限于水煮升温，还可以通过其它现有技术中已知的升温或加热的方式实现。

逆向蒸发法和水煮法，在受控的温度和混合条件下进行。合适的处理时间、和温度可以由本领域技术人员容易地确定。例如，逆向蒸发法的温度的范围优选约25℃至约70℃，更优选约30℃至约65℃，并且更优选约40℃至约60℃，特别是约55℃。水煮法温度的范围优选约0℃至约100℃，更优选约50℃至约100℃，并且更优选约70℃至约90℃，特别优选为约80℃至90℃。

本申请所述的核酸包括合成的以及提纯的DNA和RNA，优选RNA，更加优选小RNA，例如所述小RNA长度可以是14-32bp、16-28bp、18-24bp，具体地其长度可以是14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32bp。

发明人令人惊奇地发现，多种脂质均可以形成脂质-核酸/大分子/化合物复合物，有效促进核酸的细胞吸收与进入，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。进一步研究表明，在不同细胞系上本申请的脂质核酸混合物均能促进核酸吸收与进入细胞的效率，但在不同细胞系上存在差异，这为药物靶向递送提供了可能性。而且这种脂质核酸复合物的核酸递送不具有序列的选择性，可以递送与小RNA大小对应（比如20bp左右）的不同序列的核酸片段。此外，共聚焦激光扫描显微镜实验（Confocal laser-scanning microscopy）证实，人工合成的脂质形成的脂质核酸混合物可以有效促进外源核酸进入细胞

质。发明人意外地发现，通过水煮法或逆向蒸发法制备的脂质核酸混合物能够促进核酸如小RNA通过非侵入式（如经消化道或经呼吸道以及表面施用）途径进入血液循环中和目标组织中。发明人还意外地发现，本申请的脂质能够促进核酸如小RNA进入细胞，并调控（如抑制）其目标序列的表达，而对非目标序列则不显示出这种调控作用，显示出其目标特异性的调控作用，可作为核酸药物的递送方式。

本申请的脂质化合物选自溶血卵磷脂、神经酰胺、甘油二酯、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、甘油三酯、单半乳糖甘油二酯、（神经）鞘氨醇、磷脂酰乙醇、单酰基甘油、脂肪酸、血小板活化因子、或二甲基磷脂酰乙醇胺。在一个实施方案中，脂质是非天然的，例如合成的，或者发酵生产的。

合成或提纯的脂质可以用于将核酸/大分子/化合物递送至靶细胞中。脂质可以用于将核酸/大分子/化合物递送至有此需要的对象体内，进入其血液循环和/或目标部位/细胞中。

合成或提纯的脂质可以选自磷脂酰胆碱，例如1-硬脂酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱（PC(18:0/18:2)，即表1中第11号脂质），和1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱（PC(16:0/18:2)，即表1中第12号脂质）。这两种磷脂酰胆碱（phosphocholine, PC）能够高效地包裹核酸或促进核酸进入细胞。脂质可以是表1中的第41号脂质，即二氢神经鞘氨醇(d22:0)，其能够高效地包裹核酸或促进核酸进入细胞。

本申请提供组合物，其包含本文所述的脂质和核酸、大分子、化合物，优选地所述核酸为小RNA。

可以将组合物配制成供非侵入式施用（如表面施用）和/或注射施用，例如配制成供经消化道、经呼吸道和/或注射施用，例如口服、吸入和/或注射施用。在一些情况下，优选使用侵入式施用途径（如注射施用，包括肌肉注射、皮下注射、静脉注射、动脉注射、腹腔注射、目标组织内注射）；而在另一些情况下，则优选使用非侵入式施用途径。

在组合物中，至少一部分或者全部所述脂质和核酸可以配制成脂质核酸混合物形式。有多种不同的脂质核酸混合物的制备方法已经广泛公开，可以根据实际需要选择合适的脂质核酸复合物的制备方案。

本申请提供一种套装组合，其包含本申请所述的脂质以及核酸，其中所

述脂质和核酸各自独立地提供于第一容器和第二容器中，所述第一容器和第二容器可以相同或不同。在一些实施方案中，在临使用前将所述脂质和所述核酸至少部分地或全部地配制成脂质核酸复合物。

本申请提供一种将核酸、大分子、化合物递送至靶组织/细胞中的方法，其中以本申请所述药物组合物或者套装组合的形式提供所述核酸、大分子、化合物。

本申请提供一种将核酸、大分子、化合物体内递送至有此需要的对象中的方法，其中以本申请所述药物组合物或者套装组合的形式提供所述核酸，例如将所述核酸体内递送至所述对象的血液循环中或者靶组织/细胞中，例如其中所述脂质与所述核酸经非侵入式施用（如表面施用）和/或注射施用，例如经消化道、经呼吸道和/或注射施用，例如口服、吸入和/或注射施用。

本申请提供一种预防和/或治疗能用汤剂体和本草体预防和/或治疗之疾病/病症的方法，其包括向有此需要的对象提供本申请所述的药物组合物或套装组合，例如其中所述脂质与所述核酸经非侵入式施用（如表面施用）和/或注射施用，例如经消化道、经呼吸道和/或注射施用，例如口服、吸入和/或注射施用。令人惊奇地是，这种非侵入式的施用方式（例如经消化道、经呼吸道，包括口服、灌胃、吸入等）能够显著促进核酸的进入和发挥功能。

本申请提供制备前述药物组合物或套装组合的方法，以及用于上述各方面中所述方法的药物组合物和/或套装组合的用途。此外还提供用于本申请上述各种方法的脂质、药物组合物和/或套装组合。

核酸可以是小RNA，例如所述小RNA长度可以是14-32bp、16-28bp、18-24bp，具体地其长度可以是14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32bp。此外，本申请所述小RNA可以是单链的，例如通过茎环结构连接起来，也可以是双链的。例如，本申请所述核酸可以是HJT-sRNA-m7，其具有如下序列：ugagguagua gguugugugg uuguaagc。

本申请的组合物或套装组合或化合物可以用于治疗疾病，例如癌症，例如胃癌、肺癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、宫颈癌、乳腺癌、白血病、多发性骨髓瘤；例如炎症，例如肺炎、心肌炎、急慢性胃炎、急慢性肠炎、急慢性肝炎、急慢性肾炎、皮炎、脑炎、淋巴炎、结膜炎、角膜炎、虹膜睫状体

炎、中耳炎、过敏性鼻炎、哮喘、肺纤维化慢性阻塞性肺疾病、过敏性皮炎、镰状细胞病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎；以及纤维化等。

本申请的组合物或套装组合或化合物可以用于在体外或在体内处理，例如抑制NCI-N87细胞（胃癌细胞），MRC-5细胞（肺成纤维细胞），A549细胞（肺癌细胞）的生长。

在本申请的各种实施方案中，可以通过多种方式获得脂质核酸混合物，例如逆向蒸发法或水煮法。逆向蒸发法，将核酸的水溶液加入到脂质有机溶剂溶液中，超声，蒸发挥除有机溶剂后，水化得到脂质与核酸的混合物。本申请所述的水煮法，是指将脂质的有机溶剂溶液加到核酸的水溶液中，约100℃煮30min，得到脂质与核酸的混合物。逆向蒸发法和水煮法，在受控的温度和混合条件下进行。合适的处理时间和温度可以由本领域技术人员很容易地确定。例如，逆向蒸发法的温度的范围优选约25℃至约70℃，更优选约30℃至约65℃，更优选约40℃至约60℃，特别优选约55℃。水煮法（也称加热法）的温度范围优选约25℃至约100℃，更优选约50℃至约100℃，更优选约70℃至约90℃，特别优选约90℃。

实施例

以下实施例结合附图仅为举例说明本文公开的发明，在任何情况下都不应解释为对所附权利要求保护范围的限制。

材料和方法

表13：实施例所用的部分小RNA及其序列

No	siRNA	序列	长度
1	sly-miR168b-5p	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAC	21
2	Pab-miR3711	GGCCCTCCTTCTAGCGCCA	19
3	CXL-sRNA-17	CAGAGTCGCGCAGCGGAA	18
4	PGY-sRNA-6	GTTCAGAGTTCTACAGTCCGA	21
5	PGY-sRNA-18	CGGGGCTACGCCTGTCTGAGCGTCGC	26
6	HJT-sRNA-m7	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTTGTAAGC	28
7	HJT-sRNA-3	CAGCCAAGGATGACTTGCCGG	21
8	HJT-sRNA-a2	TAGCACCATCCGAAATCGGTA	21

9	HJT-sRNA-h3	TGGGGCTACGCCTGTCTGAGCGTCGCT	27
10	si-XRN2	GAGUACAGAUGAUCAUGUUGAGTACAG ATGATCATGTT	19
11	si-Ssu72	GACUCACGUGAAGCUUCCAGACTCACGT GAAGCTTCCA	19
12	si-CPSF4	GAGUCAUCUGUGUGAAUUAGAGTCATC TGTGTGAATTA	19
13	si-LAMP1	CAAUGCGAGCUCCAAAGAA	19
14	si-LAMP2	GCGGUCUUAUGCAUUGGAA	19
15	si-NFκB	AGUACCCUGAAGCUAUAUUUU	21
16	si-TNFα	CACAACCAACUAGUGGUGCUU	21
17	PGY-sRNA-23	CCCTCCGCGGCCAGCTTCT	19
18	PGY-sRNA-26	TCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGT	25
19	PGY-sRNA-32	CCGGCCCCGAACCCGTCGGC	20
20	PGY-sRNA-1	GCGACCCCAGGTCAGGCGGGA	21
21	PGY-sRNA-2	CAGAGTTCTACAGTCCGA	18
22	PGY-sRNA-3	AGAGTTCTACAGTCCGACGAT	21
23	PGY-sRNA-4	CAGAGTTCTACAGTCCGACGAT	22
24	PGY-sRNA-5	GTTCAGAGTTCTACAGTC	18
25	PGY-sRNA-6	GTTCAGAGTTCTACAGTCCGA	21
26	PGY-sRNA-7	GTTCTACAGTCCGACGATC	19
27	PGY-sRNA-8	CAGAGTTCTACAGTCCGACGATC	23
28	PGY-sRNA-9	GACCGCATAGCGCAGTGGA	19
29	PGY-sRNA-10	CGGTGGCCATGGAAGTCGG	19
30	PGY-sRNA-11	TCTGAACTCTGAACTCCAGTCAC	23
31	PGY-sRNA-12	CGCCTGTCTGAGCGTCGCT	19
32	PGY-sRNA-13	GGCTTTGGTCTAGGGGTATGATTCT	25
33	PGY-sRNA-14	ACGCCTGTCTGAGCGTCGCT	20
34	PGY-sRNA-15	GCTACGCCTGTCTGAGCGTCGCT	23

35	PGY-sRNA-16	GGGCTACGCCTGTCTGAGCGTCGCT	25
36	PGY-sRNA-17	GGGGCTACGCCTGTCTGAGCGTCGCT	26
37	PGY-sRNA-18	CGGGGCTACGCCTGTCTGAGCGTCGC	26
38	PGY-sRNA-19	CGGGGCTACGCCTGTCTGAGCGTCGCT	27
39	PGY-sRNA-20	CCGGGGCTACGCCTGTCTGAGCGT	24

说明：带有“si-”前缀的符号标示为双链sRNA。

表14：实施例中使用的部分抗体

一抗名称	公司	货号	一抗稀释比例	二抗
纤连蛋白	Sigma Aldrich	F7387	1: 2000	M
α-SMA	Abcam	ab7817	1:1000	M
GAPDH	Protein Tech	60004-1-lg	1:5000	M
LAMP1	Santa Cruze	sc-20011	1:1000	M
LAMP2	Santa Cruze	sc-18822	1:1000	M
XRN2	Santa Cruze	sc-365258	1:2000	M
CPSF4	Protein Tech	15023-1-AP	1:1000	R
Ssu72	CST	12816s	1:1000	R
NF-κB	CST	4764S	1:2000	R
β-肌动蛋白	Sigma Aldrich	A5441	1:5000	M
NF-κB p65	CST	#6956	1:1000	R

第一部分实验

实施例1

1. 植物药水煎液的制备和汤剂体的提取

1.1 植物药水煎液的制备

1) 取200g植物药饮片(红景天，蒲公英，购自北京同仁堂药店)，加入1000ml ddH_2O浸泡30min。

2) 煎煮锅强火煎煮30min，文火煎煮10min。

3) 煎煮后的汤剂红景天约250mL，蒲公英约360ml。

1.2 汤剂体的制备

1) 取200g饮片(红景天，蒲公英，购自北京同仁堂药店)，加入1000ml ddH_2O浸泡30min。

2) 煎煮锅强火煎煮30min，文火煎煮10min。

3) 煎煮后的汤剂红景天约250mL，蒲公英约360ml。

4) 所得水煎液经4℃差速离心(2,000g 30min离心取上清，10,000g 30min离心取上清，200,000g 90min弃上清)后得沉淀。

5) 用双蒸水重悬，取适量分装到EP管中真空抽干约5h后获得汤剂体的沉淀物，进行称重定量。

其他植物药的水煎液和汤剂体沉淀物的制备方法与1.1和1.2节中所述的方法相同。汤剂体的制备过程的示意图参见图1。

2. 植物药中汤剂体的特征

2.1 透射电镜观察植物药中汤剂体的形态

用双蒸水重悬1.2节中获得的沉淀物以获得汤剂体溶液。

2)将汤剂体进行透射扫描电镜的形态学观察。

2.2 植物药中汤剂体的粒径和Zeta电位检测

1) 用pH7.4的PBS缓冲液重悬1.2节中获得的沉淀物以获得汤剂体。

2) 用动态光散射技术(DLS)，仪器Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instrument, UK)检测汤剂体的粒径和Zeta电位，并进行数据分析。

红景天和蒲公英的汤剂体的电镜观察结果分别参见图2和图3。红景天和蒲公英汤剂体的粒径分布和Zeta电位分别参见图4和图5。

3. 植物药中汤剂体的组分分析

3.1 植物药中汤剂体的蛋白质组学分析

3.1.1 试剂耗材:

Milli-Q water、Non-powder gloves、Face mask、Hat、10μl和200μl tips(eppendorf)、乙腈(Fisher A/0626/17)、甲醇(Fisher)、硫代硫酸钠·5H2O (Sodium thiosulfate pentahydrate) (Sigma)、铁氰化钾(Potassium ferricyanide) (Sigma)、二硫苏糖醇(Dithiothreitol) (PlusOne)、碘乙酰胺(Iodoacetamide) (Sigma)、胰酶(Trypsin) (Promega V5280)、胰酶重溶液(Trypsin resolve solution) (Promega V530)、碳酸氢铵(Ammonium bicarbonate) (Sigma A6141)、Zip Tip

(Millipore)、FA甲酸(Sigma)、0.2ml和0.5ml EP管(eppendorf)、50ml EP、15ml EP (Corning)。

3.1.2 主要仪器:

Q Exactive mass spectrometer (Thermo fisher)、真空干燥仪、水浴锅、10μ和200μ移液器、废液缸、制冰和装冰设备、200μ管架、剪刀、能装放置了200μ管管架的塑料盒、200μl管离心机

3.1.2实验步骤

1) 蛋白提取:

A.称取适量样品，加入5倍体积的预冷10% TCA-丙酮震荡混合，-20℃沉淀2小时或过夜。

B.4℃，12000g离心10分钟，收集沉淀。

C.加入适量体积的预冷丙酮震荡混合，4℃，12000g离心15分钟，收集沉淀，重复该步骤两次，彻底去除其他杂质。

D.常温下干燥，溶解于1ml样品溶解液中(9M 尿素，4% CHAPS，1% IPG Buffer，1% DTT)，充分溶解蛋白，用于后续实验。

2) 酶切:

取浓度为15 ng/ μL的胰蛋白酶(用25 mmol/L NH_4HCO_3稀释)，按照7-10 μL/管的量加入胰蛋白酶溶液，放入4℃冰箱孵育40 min，取出后每管补加5-10 μL 25 mmol/L NH_4HCO_3溶液，密封置于37℃水浴中酶切16 h。

3) 肽段提取:

加提取液(5% TFA-50% ACN-45%水) 100 μL/管，37℃水浴1 h后，超声5 min，离心5 min，将提取液移入另一新EP管中，重复提取一次，将提取液合并，真空离心干燥。

4) 质谱检测

A. 肽段用样品溶解液(0.1%甲酸、2%乙腈)溶解，充分振荡涡旋，13200rpm，4℃离心10分钟，上清转移到上样管中，进行质谱鉴定;

B. 色谱柱信息:

300 um i.d. x 5mm, 填充有Acclaim PepMap RSLC C18, 5 um, 100Å, nanoViper

Acclaim PepMap 75um X 150mm，C18,3um，100A

流动相A：0.1%甲酸;

流动相B：0.1%甲酸，80%ACN;

流速：300nL/min;

每个组分分析时间：40min;

时间	B相
0	5%
5	5%
25	50%
30	90%
35	90%
45	5%

C. 分离后的肽段直接进行在线检测，具体参数如下:

一级质谱参数:

Resolution: 70,000

AGC target: 3e6

Maximum IT: 40 ms

Scan range: 350 to 1800 m/z

二级质谱参数:

Resolution: 17,500

AGC target: 1e5

Maximum IT: 60 ms

TopN : 20

NCE / stepped NCE: 27

4) 数据库检索

质谱原始文件经过MM File Conversion软件处理转换，得到MGF格式文件，然后用MAXQUANT检索uniprot-Viridiplantae数据库，检索参数如下:

a) 固定修饰(Fixed modifications): Carbamidomethyl (C)

b) 可变修饰(Variable modifications): Oxidation (M)

c) 酶(Enzyme): Trypsin

d) 遗漏酶切位点(Maximum Missed Cleavages): 2

e) 一级质谱误差(Peptide Mass Tolerance): 20ppm

f) 二级质谱误差(Fragment Mass Tolerance): 0.6Da

g) 肽段/碎片离子质量数(Mass values): Monoisotopic(单同位素)

h) 显著性阈值(Significance threshold): 0.05

3.1.3 结果说明

Accession(蛋白在uniprot数据库中的ID号)，Description(蛋白注释)，Exp. q-value(q-value值，越小越好)，Sum PEP Score(蛋白打分，分数越高越好)，Coverage(鉴定到的肽段氨基酸占蛋白总氨基酸的覆盖度)，# Peptides(鉴定到的该蛋白的肽段数)，# PSMs(鉴定到相应蛋白的所有肽段总数)，# Unique Peptides(鉴定到对应蛋白的特异肽段的数目)，# Protein Groups(鉴定到肽段对应的蛋白数)，# Aas(鉴定到相应蛋白的理论氨基酸个数)，MW [kDa](鉴定到相应蛋白的理论分子量)，calc. pI(鉴定到相应蛋白的理论等电点)，score: 蛋白打分; Intensity: 蛋白相对强度。

Sequence(肽段氨基酸序列)，# Proteins肽段对应蛋白的个数 # PSMs鉴定到该肽段的次数，Master Protein Accessions肽段对应蛋白的ID，Theo. MH+ [Da]肽段理论分子量。

蛋白质组学分析测定结果参见上文表6和表7以及图19和20。

3.2植物药中汤剂体的化合物代谢组学分析

1)液相条件:

采用Waters H-class 型号超高效液相色谱对样品进行分离。分析条件如下: 色谱柱: waters HSS C18 (3.0X100mm, 1.7um),柱温 50°C; 流动相A 为0.1%甲酸水，流动相为乙腈; 分析梯度为: 0-1min，2%B; 1-3min, 2%B-15%B; 3-6min, 15%B-50% B; 6-9min, 50-95%B; 9-9.1min, 95-100%B-2%B; 9.1-12min，100%B; 流速为0.5ml/min; 进样体积为5ul

2)质谱条件:

UPLC质谱串联LTQ-Orbitrap velos (Thermo Fisher Scientific, SanJose, CA, USA)质谱，采用电喷雾离子源正离子模式; 鞘气为氮气和辅助气，流速分别为45 arbitrary units and 10 arbitrary units; 质谱扫描范围为100–1000 m/z; spray voltages设为4.2KV; 离子传输管温度350°C。数据采用高分辨傅里叶转换模式(FT)获取，一级分辨率为60000; 二级分辨率为15000; 二级采用数据依赖(data-dependent)分析模式; 动态排除时间为15s; 碎裂方式选择HCD, 相

关参数设置如下: isolation width: 3 Da; 碰撞能量: 根据不同代谢物选择20%，40%和60%; activation time: 30 ms。

3)结果分析:

由UPLC-LTQ orbitrap 获得的原始数据，采用Waters 公司的商业组学分析软件progenesis QI (Version 2.0 , Nonlinear Dynamics, UK)软件进行处理。处理过程包括峰对齐，峰识别和峰校正及输出三维矩阵，即由保留时间和精确质荷比组成的谱峰索引变量、样本名称和峰强度/面积组成。获得的数据根据质控样本的变异系数(CV)筛选CV小于30%的变量进行后续多元统计分析。变量矩阵首先导入SIMCA-P software 14.0 (Umetrics AB, Umea, Sweden)进行PCA 分析，可视化组间变化趋势。组间差异变量通过OPLS-DA模型获取的VIP 值进行筛选，VIP值大于1.5的变量认为是组间显著性差异变量，可作为侯选的潜在标志物。将鉴定得到的差异性变量进行代谢通路分析，分析与疾病进程相关性较强的代谢通路。

红景天和蒲公英汤剂体中小分子分析结果参见表2-5和图17-18。

3.3 植物药中汤剂体的小RNA的高通量测序及分析

1)提取过程中得到的植物药的汤剂体的沉淀，用Trizol(Sigma)裂解进行RNA提取。

2)使用Illumina HiSeq2500平台测序，50SE，由北京贝瑞和康生物技术股份有限公司完成。

3)使用fastx_toolkit软件(v0.0.13)去除测序读段的接头并保留长度大于等于18nt的小RNA序列(调用命令fastx_clipper)，去除质量较低的序列(调用命令fastq_quality_filter，设置参数-q10，-p100)。

4)对小RNA序列进行长度分布统计。

5)对小RNA序列进行去冗余处理，去除重复的读段。

6)用bowtie软件(http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml)对植物药汤汁、汤剂体中的小RNA序列进行建库(调用命令bowtie-build)，并筛选出服用植物药(连续口服植物药(10g, 约100ml)汤剂三天)后人血中既能匹配到植物药汤汁又能匹配到汤剂体的小RNA序列(调用命令bowtie)。

7)对于像红景天这种已知基因组的植物药，需要用bowtie软件将上述小RNA序列匹配植物药的基因组，获得能匹配的序列。

8)从上述得到的小RNA中筛选出在植物药汤汁及汤剂体中读段数大于5，且服用植物药后人血中读段数高于服用植物药前人血中读段数的小RNA序列。

9)对于上述有包含关系的小RNA序列，取长度最短的小RNA序列与在服用植物药(10g, 约100ml)后的人血中读段数最高的序列。

红景天和蒲公英汤剂体中小RNA分析结果参见表8-9和图21-22。

3.4脂质质谱方法:

脂质提取及高效液相色谱-二级质谱联用技术

采用Bligh&Dyer法提取红景天汤剂体和蒲公英汤剂体中的脂质 (Bligh and Dyer, 1959)。高效液相色谱-二级质谱连用分析由上海敏芯信息科技有限公司完成。色谱条件：柱温为45℃； 流速0.4mL/min； 二元梯度洗脱，70%流动相A 2min; 线性增加至少20min至100%流动相B; 100%B 2min; 70%A 5min; 进样量4uL； 阴离子模式质谱条件：源喷射电压为3.0 kV； 加热毛细管温度300℃; 鞘气流速为45 Arb; 辅助气流速为15 Arb; 扫气流速为1 Arb; s-lens RF水平 30%； 扫描范围m/z 200-1，500； 正离子模式质谱条件：源喷射电压为2.5 kV； 加热毛细管温度350℃； 鞘气流速为45 Arb； 辅助气流速为10 Arb; 扫气流速为1 Arb； s-lens RF水平 60%； 扫描范围m/z 200-1，500;

LC-MS数据利用Thermo SIEVE 2.1 Qualitative分析软件(Thermo Fisher Scientific，美国)进行初步分析。然后，将每个样品的数据均一化到总面积，并将具有峰值数[基于保留时间和质量电荷比(m/z)]、样品名称和均一化的峰值强度的所有数据导入SIMCA-P+13.0(Umetrics，瑞典)再次进行处理和分析。

4. 植物药水煎液和汤剂体的细胞模型中的功能验证试验

4.1 MRC-5细胞、A549细胞的培养

实验所用人胚肺成纤维细胞系MRC-5、人肺腺癌细胞系A549购自北京协和医学院细胞培养中心。细胞均置于37°C、5% CO2培养箱内培养。其中，MRC-5细胞于EME培养基(Gibco)中培养； A549细胞置于Ham's F-12培养基(HyClone)中培养； 各培养基均含10%胎牛血清和一定比例的抗生素(青霉素100U/ml &链霉素 100mg/ml)。

4.2蛋白免疫印迹法(Western blot)检测红景天(HJT)水煎液和HJT汤剂体

在TGF-β1诱导的MRC-5细胞纤维化模型中纤连蛋白蛋白表达水平变化

4.2.1水煎液相关实验分组如下:

1) 未处理组:是指未经处理的MRC-5细胞,该组作为空白对照组。

2) TGF-β1刺激组:是指3ng/mL转化生长因子TGFβ1 (Pepro Tech)处理72小时的MRC-5细胞,该组作为阳性对照组。

3)水煎液实验组:是指3ng/mL转化生长因子TGFβ1 (Pepro Tech)处理72小时的MRC-5细胞,提前24小时加入对照植物木香(MX,木香水煎液制备方法与红景天水煎液的制备相同)和HJT的水煎液300ug/ml(每毫升培养液中加入水煎液300ug,水煎液定量以液体抽干后沉淀量计)。

4.2.2 汤剂体相关实验分组如下:

1) 未处理组:是指未经处理的MRC-5细胞,该组作为空白对照组。

2) TGF-β1刺激组:是指3ng/mL 转化生长因子TGFβ1(Pepro Tech)处理72小时的MRC-5细胞,该组作为阳性对照组。

3)汤剂体实验组:是指3ng/mL 转化生长因子TGFβ1(Pepro Tech)处理72小时的MRC-5细胞,提前24小时加入对照植物MX和HJT的汤剂体50ug/ml(每毫升培养液中加入汤剂体50ug,以液体抽干后沉淀量计)。

4.2.3蛋白样品的收集与BCA法浓度测定:

1) 提前24小时干预后TGF-β1刺激72小时的MRC-5细胞的蛋白样品的收集与BCA法测定蛋白浓度:

A.弃去培养基,12孔板细胞(10^6),每孔加入1mL PBS缓冲液清洗一遍,每孔加入100μL预冷的强RIPA裂解液(配方如下),将细胞用枪头刮下并转移到离心管中,置冰上裂解20min;

组分	用量(200ml)	分子量	终浓度
NaCl	1.75g	58.44	150mM
Tris	1.2114g	121.14	50mM
NP-40	2ml		1%
脱氧胆酸钠	1g	414.55	0.5%
SDS	0.2g	288.38	0.1%

B.4℃,12,000rpm,离心10min,转移上清至新的离心管中;

C.将BCA试剂A与B (TIANGEN,#PA115) (50:1,v/v)充分混匀,配制BCA工作液;

D.分别取25μL新鲜配制的BSA标准液和待测样品，加入到96孔板中，每孔中加入200μL BCA工作液，并充分混匀；37℃孵育30 min;

E.用紫外分光光度计(Synergy 4多功能酶标仪)于562 nm处检测其吸光度，根据标准曲线计算出样品中的蛋白浓度;

F.用RIPA裂解液和Loading Buffer (10% SDS 20ml, 蔗糖5g, 溴酚蓝0.2g, beta-巯基乙醇5ml)调节样品浓度，使各样品浓度一致(与最低浓度一致);

G.95℃，变性处理10min。

4.2.4 蛋白免疫印迹法检测(Western blot)

A.制胶：采用10%浓度分离胶(下层胶)和5%浓度的浓缩胶(上层胶)，15孔梳子所做泳道，每个泳道样品蛋白上样量相等;

B.蛋白电泳：加入电泳缓冲液，电泳起始电压80V；当溴酚兰染料到分离胶后，提高电压至120V继续电泳，直至溴酚兰染料达到分离胶底部或全部泳出凝胶;

C.湿法转膜：按照转膜夹板(负极)-海绵-滤纸-凝胶-PVDF膜-滤纸-海绵-转膜夹板(正极)的顺序进行组装；安装后并将整个转膜装置置于4℃冷室；恒定电流300 mA，转膜120 min;

D.封闭：转膜结束后置于3% BSA封闭液中，室温封闭1 h;

E.一抗孵育：将封闭后的PVDF膜转移至杂交袋中，加入含有对应一抗(一抗的信息如下)的3% BSA封闭液，赶出袋中气泡，密封后4℃过夜孵育;

纤连蛋白抗体(sigma F7387)

GAPDH抗体(protein tech 60004-1)

F.洗膜：将PVDF膜取出，用TBST洗膜3次，每次10 min;

G.二抗孵育：弃去TBST，加入含有带有辣根过氧化物酶(HRP)的山羊抗兔或山羊抗小鼠的二抗(购自杭州联科生物技术有限公司)的3%BSA封闭液(二抗稀释比例1:5000)，室温孵育1小时;

H.洗膜：用TBST洗膜3次，每次10 min;

I. 显影：配制Western显色液(1:1，V/V，Merck Millipore，ECL化学发光显色液购自Millipore公司)，并将配制好的显色液均匀滴加于膜结合蛋白的一侧；用保鲜膜小心的将膜包好，显色后观察;

J. 分析：用Image J软件进行分析。

4.3 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测PGY水煎液和PGY汤剂体在poly(I:C)刺激的A549细胞的炎症模型中IL-1β/IL-6/TNF-α的mRNA表达水平

4.3.1水煎液相关实验分组如下:

1) 未处理组：是指未经处理的A549细胞，该组作为空白对照组。

2) poly(I:C)刺激组：是指1μg/mL 双链RNA病毒模拟物poly(I:C)(P1530，Sigma-Aldrich)处理的A549细胞6小时，该组作为阳性对照组。

3)水煎液实验组：是指提前加入对照植物卷心菜(JXC)或蒲公英(PGY)的汤剂(10ug/ml、30ug/ml、100ug/ml)共孵育24小时后，1μg/mL 双链RNA病毒模拟物poly(I:C) 处理的A549细胞6小时。

4.3.2 汤剂体相关实验分组如下:

1) 未处理组：是指未经处理的A549细胞，该组作为空白对照组。

2) poly(I:C)刺激组：是指1μg/mL双链RNA病毒模拟物poly(I:C)(P1530，Sigma-Aldrich)处理的A549细胞6小时，该组作为阳性对照组。

3)汤剂体实验组：是指1μg/mL 双链RNA病毒模拟物poly(I:C)(P1530，Sigma-Aldrich)处理的A549细胞6小时,提前24小时加入对照植物卷心菜(JXC)和蒲公英(PGY)的汤剂体(制备方法与红景天汤剂体的制备方法相同) 2ug/ml、6ug/ml、20ug/ml。

4.3.3 细胞总RNA的提取

A. 12孔板培养细胞(约1×10^6个细胞/孔)，弃培养液后每孔加入1mL TRIzol裂解液后，先置于冰上，待所有的样品都加入TRIzol后，室温放置5min，使其充分裂解;

B. 4℃，12,000rpm离心5min，弃沉淀，将TRIzol转移到新的离心管中;

C. 按200μL氯仿/mL TRIzol加入氯仿，充分振荡，混匀后室温放置5min;

D. 4℃，12,000rpm，离心15min;

E. 吸取上层水相，至另一离心管中，按0.5mL异丙醇/mL TRIzol加入异丙醇混匀，室温放置5-10min;

F. 4℃，12,000rpm，离心15min，弃上清，RNA沉于管底;

G. 加入1mL 75%乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀;

H. 4℃，12,000rpm，离心10min，弃上清，加入1mL 75%乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀;

I. 4℃，12,000rpm，离心10min，弃上清，室温晾干，用50μL RNase-free的H2O溶解RNA样品，测O.D值定量RNA浓度。

4.3.4将总RNA逆转录为cDNA

通过逆转录试剂盒(High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits，Applied Biosystems，cat. no. 4368813)，将RNA逆转录为cDNA，逆转录体系如下：上文提取的总RNA (150 ng/μL) 10μL，10X RT缓冲液2.0μL，25X dNTP Mix (100 mM) 0.8μL，RT随机引物2.0μL，MultiScribeTM逆转录酶1.0μL，RNA酶抑制剂1.0μL (Invitrogen)，无核酸酶H_2O 3.2μL，瞬时离心后，放入PCR仪反应，反应条件如下：(1) 25℃，10 min；(2) 37°C，120 min；(3) 85°C，5 min；(4)4°C，终止反应。反应结束后加入20μL无RNA酶ddH_2O，补足终体积至40μL。

4.3.5定量PCR扩增反应

qPCR反应体系总体积10μL，包括：5μL 2×SYBR Green Master Mix，0.5μL正向引物(10μM)，0.5μL反向引物(10μM)，1μL逆转录得到的cDNA，3μL无RNA酶ddH2O。使用LightCycler 480荧光定量PCR仪，PCR反应条件是：95℃，持续5min预变性，开始进入PCR扩增循环：(1)95℃，10s；(2)55℃，10s；(3)72℃，20s；总共进行40个循环；最后40℃持续10s降温。扩增反应正向引物和反向引物均由北京擎科新业生物技术有限公司设计和合成，引物序列(内参基因UBC正向引物：CTGGAAGATGGTCGTACCCTG，内参基因UBC反向引物：GGTCTTGCCAGTGAGTGTCT；目的基因IL-1β正向引物：CTCGCCAGTGAAATGATGGCT：目的基因IL-1β反向引物：GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT；目的基因IL-6正向引物：GGTACATCCTCGACGGCATCT：目的基因IL-6反向引物：GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC；目的基因TNF-α正向引物：CTGCCCCAATCCCTTTATT：目的基因TNF-α反向引物：CCCAATTCTCTTTTTGAGCC)。

4.3.6 mRNA的相对表达量的计算

利用2-ΔCt法(基因相对表达量 = 2-（Ct目的基因-Ct内参基因))计算相对进入量(单链或双链RNA)。

4.4双荧光报告基因验证PGY-sRNA-6的靶基因

HEK293T细胞经胰酶消化后加入48孔板培养约24h后，使用转染试剂Lipofectamine RNAiMAX瞬时转染PGY-sRNA-6和NC阴性对照(单链NC序列

UUGUACUACACAAAAGUACUG)，终浓度为100nM，24h后使用转染试剂Lipofectamine 2000每孔转染300ng野生型psiCHECK2-3'-UTR (购自Promega，#C8201)及突变型psiCHECK2-3'-mUTR质粒(生工合成，突变序列参见图32)，转染后48 h按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega，#E1960)步骤收取细胞样品检测表达量。

4.5 酶联免疫印记实验（ELISA）检测蒲公英汤剂及汤剂体在poly(I:C)刺激的A549细胞的炎症模型中IL-6的蛋白表达水平

4.5.1 水煎液汤剂相关实验分组如下:

1) 空白组：是指未经处理的A549细胞，收取培养基上清液进行蛋白含量ELISA检测，该组作为空白对照组。

2) poly(I:C)刺激组：是指1μg/mL 双链RNA病毒模拟物poly(I:C)(P1530，Sigma-Aldrich)处理的A549细胞6小时，收取培养基上清液进行蛋白含量ELISA检测。该组作为阳性对照组。

3)汤剂实验组：是指提前加入对照植物卷心菜(JXC)或蒲公英(PGY)的汤剂(10ug/ml、30ug/ml、100ug/ml)共孵育24小时后，1μg/mL 双链RNA病毒模拟物poly(I:C) 处理的A549细胞6小时。收取培养基上清液进行蛋白含量ELISA检测。

根据图9D，100ug/ml汤剂可以降低poly(I:C)刺激引起的A549细胞白细胞介素6的表达。

4.5.2 汤剂体相关实验分组如下:

1) 空白组：是指未经处理的A549细胞，该组作为空白对照对照组。

2) poly(I:C)刺激组：是指1μg/mL 双链RNA病毒模拟物poly(I:C)(P1530，Sigma-Aldrich)处理的A549细胞6小时，收取培养基上清液进行蛋白含量ELISA检测。该组作为阳性对照组。

3)汤剂体实验组：是指提前加入对照植物卷心菜(JXC)或蒲公英(PGY)的汤剂体(2ug/ml、6ug/ml、20ug/ml)共孵育24小时后，1μg/mL 双链RNA病毒模拟物poly(I:C) 处理的A549细胞6小时。收取培养基上清液进行蛋白含量ELISA检测。

根据图9E，20ug/ml汤剂体可以明显降低poly(I:C)刺激引起的A549细胞白细胞介素6的表达，有效性明显高出同剂量汤剂。

4.6 红景天汤剂体RNA提取及琼脂糖凝胶电泳检测汤剂体中的小RNA

1)200g红景天饮片煎煮后差速离心法提取汤剂体;

2)汤剂体沉淀加6毫升TRIZol(sigma-Aldrich)充分裂解,提取汤剂体RNA;

3)将提取后RNA均分4份分别如下处理:不加处理,加入5ul DNA酶I,加入5ul RNA酶A,加入5ul DNA酶I和RNA酶A,37度水浴消化过夜

4)琼脂糖凝胶电泳:用1%琼脂糖凝胶进行凝胶电泳,电泳条件90伏20分钟。结束后于紫外灯下观察。

根据图9F,红景天汤剂体中存在小RNA,25bp左右。

4.7 蒲公英汤剂体RNA提取及琼脂糖凝胶电泳检测汤剂体中的小RNA

1)200g蒲公英饮片煎煮后差速离心法提取汤剂体;

2)汤剂体沉淀加6毫升TRIZol(sigma-Aldrich)充分裂解,提取汤剂体RNA;

3)将提取后RNA均分4份分别如下处理:不加处理,加入5ul DNA酶I,加入5ul RNA酶A,加入5ul DNA酶I和RNA酶A,37度水浴消化过夜

4)琼脂糖凝胶电泳:用1%琼脂糖凝胶进行凝胶电泳,电泳条件90伏20分钟。结束后于紫外灯下观察。

根据图9G,蒲公英汤剂体中存在小RNA,25bp左右。

5. 植物药汤剂体的动物模型中的功能验证试验

5.1 实验动物

实验所用6-8周龄的雄性C57BL/6J小鼠购于北京维通利华,并在北京协和医学院动物实验中心无菌条件下饲养。所有动物实验流程均遵循政府和动物护理和使用委员会的指导方针。

5.1.1博莱霉素诱导小鼠肺纤维化模型

模型组按2.5 U/kg的剂量气管滴注博莱霉素(北京海正辉瑞制药有限公司)造模,对照组仅气管滴注生理盐水。在第21天牺牲小鼠,收取左右肺待检测。

5.1.2小鼠急性肺损伤模型

在无菌条件下,将poly(I:C)溶于PBS中配制贮存液浓度为10mg/mL。按每只小鼠给药500ug poly(I:C)的剂量,每管50uL分装。气管滴注法造急性肺损伤模型,9h后牺牲小鼠,收取血、肺泡灌洗液待检测。

5.2 HJT汤剂体在博来霉素诱导的小鼠纤维化模型中的作用

5.2.1动物实验的分组如下：

1) 对照组：该组仅气管滴注生理盐水，作为Saline对照组。

2) 博来霉素组：是指2.5 U/kg的剂量气管滴注博莱霉素造模，21天后分别收取小鼠左右肺进行检测。该组作为阳性对照组。

3)木香汤剂体实验组：是指2.5 U/kg的剂量气管滴注博莱霉素造模，提前连续三天灌胃给予木香汤剂来源汤剂体，剂量为每只小鼠40g木香汤剂来源汤剂体(500uL)。21天后分别收取小鼠左右肺进行检测。

4)红景天汤剂体实验组：是指2.5 U/kg的剂量气管滴注博莱霉素造模，提前连续三天灌胃给予红景天汤剂来源汤剂体，剂量为每只小鼠40g红景天汤剂来源汤剂体(500uL)。21天后分别收取小鼠左右肺进行检测。

5.2.2动物肺组织羟脯氨酸含量的测定

用羟脯氨酸测定试剂盒(#MAK008，Sigma Aldrich)测定小鼠肺的胶原含量。将小鼠右肺组织真空干燥，称重后在120℃下用6M盐酸水解3小时，按试剂盒说明书进行羟脯氨酸含量测定。羟脯氨酸含量表示为“μg/右肺”，除非另有说明。

5.2.3 动物肺组织病理学检测

1)组织石蜡包埋切片实验步骤

A. 取材：新鲜组织固定于4%多聚甲醛24h以上。将组织从固定液取出在通风橱内用手术刀将目的部位组织修平整，将修切好的组织和对应的标签放于脱水盒内。

B. 脱水：将脱水盒放进吊篮里于脱水机内依次梯度酒精进行脱水。75%酒精4h-85%酒精2h-90%酒精2h-95%酒精1h-无水乙醇I 30min-无水乙醇II 30min-醇苯5-10min-二甲苯I 5-10min-二甲苯II 5-10min-蜡I 1h-蜡II 1h-蜡III 1h。

C. 包埋：将浸好蜡的组织于包埋机内进行包埋。先将融化的蜡放入包埋框，待蜡凝固之前将组织从脱水盒内取出按照包埋面的要求放入包埋框并贴上对应的标签。于-20°冻台冷却，蜡凝固后将蜡块从包埋框中取出并修整蜡块。

D. 切片：将修整好的蜡块置于石蜡切片机上切片，片厚4μm。切片漂浮于摊片机40℃温水上将组织展平，用载玻片将组织捞起，并放进60℃烘箱内

烤片。待水烤干蜡烤化后取出常温保存备用。

2)HE染色实验步骤

A. 石蜡切片脱蜡至水：依次将切片放入二甲苯I20min-二甲苯II20min-无水乙醇I10min-无水乙醇II10min-95%酒精5min-90%酒精5min-80%酒精5min-70%酒精5min-蒸馏水洗。

B. 苏木素染细胞核：切片入Harris苏木素染3-8min，自来水洗，1%的盐酸酒精分化数秒，自来水冲洗，0.6%氨水返蓝，流水冲洗。如果细胞浆有蓝色，则可以延长分化时间

C. 伊红染细胞质：切片入伊红染液中染色1-3min。不要水洗，

D. 脱水封片：将切片依次放入95%酒精I 5min -95%酒精II 5min-无水乙醇I 5min -无水乙醇II 5min -二甲苯I 5min -二甲苯II 5min中脱水透明，将切片从二甲苯拿出来稍晾干，中性树胶封片。

E. 显微镜镜检，图像采集分析。

F. 染色结果：细胞核蓝色，细胞质红色。

5.2.4 动物肺组织马松染色检测

1)石蜡切片脱蜡至水：依次将切片放入二甲苯I 20min-二甲苯II 20min-无水乙醇I 10min-无水乙醇II 10min-95%酒精5min-90%酒精5min-80%酒精5min-70%酒精5min-蒸馏水洗。

2)苏木素染细胞核：masson染色试剂盒内Weigert氏铁苏木素染5min，自来水洗，1%的盐酸酒精分化数秒，自来水冲洗，流水冲洗数分钟返蓝。

3)丽春红染色：masson染色试剂盒内丽春红酸性品红液染5-10 min，蒸馏水快速漂洗。

4)磷钼酸处理：masson染色试剂盒内磷钼酸水溶液处理约3-5 min。

5)苯胺蓝染色：不用水洗，直接用masson染色试剂盒内苯胺蓝液复染5min。

6)分化：1%冰醋酸处理1min。

7)脱水封片：将切片依次放入95%酒精I 5min -95%酒精II 5min-无水乙醇I5min -无水乙醇II5min -二甲苯I5min -二甲苯II5min中脱水透明，将切片从二甲苯拿出来稍晾干，中性树胶封片。

8)显微镜镜检，图像采集分析。

染色结果：胶原纤维、粘液、软骨呈蓝色；肌纤维、纤维素和红细胞呈红色；细胞核呈蓝黑色。

5.3 PGY汤剂体在poly(I:C)诱导的小鼠炎症模型中的作用

5.3.1动物实验的分组如下：

1) 对照组：该组仅气管滴注生理盐水，作为盐水对照组。

2)poly(I:C)组：是指气管滴注500ug poly(I:C)造模，9h后收取小鼠肺泡灌洗液及全血样品。该组作为阳性对照组。

3）卷心菜(JXC)汤剂体实验组：是指提前-72h, -48h, -24h,-3h连续灌胃给予卷心菜汤剂来源汤剂体, 剂量为每只小鼠10mg卷心菜汤剂体(500uL)。气管滴注500ug poly(I:C)刺激建立炎症模型，建模3h后灌胃给与10mg卷心菜汤剂体(500uL)，气管滴注500ug poly(I:C) 9h 后收取小鼠肺泡灌洗液及全血样品。

4）蒲公英汤剂体实验组：是指2.5 U/kg的剂量气管滴注poly(I:C)造模，提前连续三天灌胃给予蒲公英汤剂来源汤剂体10mg(500uL),。气管滴注500ug poly(I:C)造模，造模3h后灌胃给与10mg卷心菜汤剂体(500uL)， 造模9h 后收取小鼠肺泡灌洗液及全血样品。

5.3.2 Bioplex小鼠23细胞因子试剂盒检测小鼠血浆中细胞因子的表达

1)样品处理：小鼠全血收集至EDTA-2K抗凝管中，经2000rpm，4℃离心10min收取血浆。血浆继续12000rpm，4℃离心10min，弃沉淀，上层血浆用于检测。

2)Bioplex实验方法：小鼠肺泡灌洗液及血浆中细胞因子表达检测使用Bioplex小鼠23细胞因子检测试剂盒(Cat#M60009RDPD)根据说明书指示进行检测。标准品设置2个复孔以提高检测结果准确性。

5.4 统计学分析

数据以平均值±SEM形式表示。所有实验数据均经过两次或两次以上的独立重复实验验证，数据呈正态分布，组间差异无显著性。实验组与对照组之间的参数差异通过非配对t检验进行评估。羟脯氨酸含量检测数据及小鼠细胞因子表达含量检测采用GraphPad Prism5.0软件进行统计分析，马松染色结果采用Image Pro PLUS软件进行统计分析，小鼠细胞因子表达含量以poly（I:C）组做均一化，马松染色结果统计以生理盐水组做均一化，$P<0.05$被认为有统计学意义。

6. 本草体的制备以及其功能验证

6.1 本草体的制备过程

6.1.1 实验材料

脂质Sphinganine (d22:0) (AVANTI, #792079P)购于美国Avanti Polar Lipids公司，以10mg/ml的浓度贮存于氯仿中。HJT-sRNA-m7购自广州锐博生物技术有限公司，PGY-sRNA-6购自苏州吉玛基因股份有限公司，贮存浓度20μMol。

6.1.2 制备方法

A. 按照所需剂量将小RNA用去RNA酶的水稀释至100μL体系。

B. 向小RNA稀释液中加入相应剂量的脂质贮存液。小RNA与脂质比例：0.1nmol-20μg，0.2nmol-25μg，0.4nmol-200μg，充分混匀使组分充分分散。

C. 将分散体系于90°C水浴锅中加热15min得到本草体均一体系。

6.2本草体(Bencaosome)在细胞模型中的功能过程验证

6.2.1 MRC-5细胞、A549细胞和293T细胞的培养

实验所用人胚肺成纤维细胞系MRC-5、人肺腺癌细胞系A549、人胚肾细胞系HEK293T购自北京协和医学院细胞培养中心。细胞均置于37°C、5% CO2培养箱内培养。其中，MRC-5细胞于EME培养基(Gibco)中培养；A549、HEK-293T细胞分别置于Ham's F-12培养基(HyClone)和DMEM(Gibco)中培养，各培养基均含10%胎牛血清和一定比例的抗生素(青霉素100U/ml &链霉素100mg/ml)。细胞培养至对数生长期，然后分别铺板到12孔板，细胞密度为6×10^5 /1ml培养基/孔；37℃过夜孵育，待细胞贴壁后进行后续实验

6.2.2实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测本草体在细胞模型上本草体递送核酸的表达量

6.2.2.1本草体相关实验分组如下：

1) 空白对照组：是指未经处理的细胞，该组作为空白对照组。

2) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7或PGY-sRNA-6溶液(终浓度为100nM)，该组作为阴性对照组；

3) 本草体处理组：将步骤2中制备的脂质与HJT-sRNA-m7或PGY-sRNA-6混合物加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7或PGY-sRNA-6的终

浓度为100nM。

6.2.2.2本草体递送核酸表达量检测

与细胞共同孵育12-24h后，用PBS清洗细胞2次，用TRIzol裂解液(Sigma)收取细胞，提取其总RNA，利用RT-qPCR(SYBR Green染料法)检测进入细胞的HJT-sRNA-m7或PGY-sRNA-6丰度，具体步骤如下:

A. 提取细胞总RNA:

1）细胞加入Trizol后，先置于冰上，待所有的样品都加入Trizol后，室温放置5分钟，使其充分裂解;

2）12,000rpm离心5min，弃沉淀，将Trizol转移到新的离心管中;

3）按200μL氯仿/mL Trizol加入氯仿，充分振荡，混匀后室温放置5min;

4）4℃，12,000rpm，离心15min;

5）吸取上层水相，至另一离心管中，按0.5mL异丙醇/mL Trizol加入异丙醇混匀，室温放置5-10min;

6）4℃，12,000rpm，离心15min，弃上清，RNA沉于管底;

7）加入1mL 75% 乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀;

8）4℃，12,000rpm，离心10min，弃上清，加入1mL 75% 乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀;

9）4℃，12,000rpm，离心10min，弃上清，室温晾干，用50μL RNase-free的H2O溶解RNA样品，测O.D值定量RNA浓度。

B. 将总RNA逆转录为cDNA: 通过逆转录试剂盒(High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits，Applied Biosystems，cat. no. 4368813)，用茎环法(stem-loop法)将sRNA逆转录为cDNA，逆转录体系如下: 模板RNA (150 ng/μL) 10μL，10X RT缓冲液2.0μL，25X dNTP Mix (100 mM) 0.8μL，U6 RT stem-loop引物2.0μL，HJT-sRNA-m7 RT stem-loop引物2.0μL（或PGY-sRNA-6 RT stem-loop引物 2.0μL），MultiScribeTM逆转录酶1.0μL，RNA酶抑制剂1.0μL，无核酸酶H2O1.2μL，瞬时离心后，放入PCR仪反应，反应条件如下: (1)25℃，10 min; (2)37°C，120 min; (3)85°C，5 min; (4)4°C，终止反应。反应结束后加入20μL无RNA酶ddH2O，补足终体积至40μL。该逆转录过程中使用的茎环法引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成(U6 内参RT 引物: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAA

AATATG ; HJT-sRNA-m7 RT stem-loop 引物 : GTCGTATCCAGTGCACGCTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCTT ACAA) 。 PGY-sRNA-6 RT 引物 : GTCGTATCCAGTGCACGCTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCGG AC。

C. 定量PCR扩增反应：qPCR反应体系总体积10μL，包括：5μL 2×SYBR Green Master Mix，0.5μL正向引物(10μM)，0.5μL反向引物(10μM), 1μL逆转录得到的cDNA，3μL无RNA酶dH2O。使用LightCycler 480荧光定量PCR仪，PCR反应条件是：95℃，持续5min预变性，开始进入PCR扩增循环：(1)95℃，10s；(2)55℃，10s；(3)72℃，20s；总共进行40个循环；最后40℃持续10s降温。扩增反应正向引物和反向引物均由北京擎科新业生物技术有限公司设计和合成(U6正向引物：GCGCGTCGTGAAGCGTTC，U6反向引物：GTGCAGGGTCCGAGGT，HJT-sRNA-m7 正向引物：TCGCGCTGAGGTAGTAGGTT，HJT-sRNA-m7 反向引物：GTGCACGCTCCGAGGT) 。 PGY-sRNA-6 引物 : GTCGTATCCAGTGCACGCTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCGG AC。

E. 利用2-ΔCt法计算相对进入量。

6.2.3实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测mRNA表达水平

6.2.3.2实验分组如下：

1)空白组：是指未经处理的细胞，该组作为空白对照组。

2) poly(I:C)处理组：加1μg/mL 双链RNA病毒模拟物poly(I:C) 处理A549细胞6小时。该组作为阳性刺激组。

3) So(d22:0)-NC组：加入So(d22:0)-NC本草体溶液(终浓度为400nM)，共孵育24h后，加1μg/mL 双链RNA病毒模拟物poly(I:C) 处理A549细胞6小时。该组作为阴性对照组;

4) So(d22:0)-PGY-sRNA-6本草体处理组：将步骤2中制备的So(d22:0)-PGY-sRNA-6本草体加入细胞中核酸的终浓度为400nM。共孵育24h后，加1μg/mL 双链RNA病毒模拟物poly(I:C) 处理A549细胞6小时。

6.2.2.3 用TRIzol裂解液裂解细胞，提取其中总RNA，利用RT-qPCR(SYBRGreen染料法)检测相关基因的mRNA表达水平，具体步骤如

下：

1)提取细胞总RNA:

细胞加入Trizol后，先置于冰上，待所有的样品都加入Trizol后，室温放置5分钟，使其充分裂解;

12,000rpm离心5min，弃沉淀，将Trizol转移到新的离心管中;

按200μL氯仿/mLTrizol加入氯仿，充分振荡，混匀后室温放置5min;

4℃，12,000rpm，离心15min;

吸取上层水相，至另一离心管中，按0.5mL异丙醇/mLTrizol加入异丙醇混匀，室温放置5-10min;

4℃，12,000rpm，离心15min，弃上清，RNA沉于管底;

加入1mL75%乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀;

4℃，12,000rpm，离心10min，弃上清，加入1mL75%乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀;

4℃，12,000rpm，离心10min，弃上清，室温晾干，用50μL RNase-free的H2O溶解RNA样品，测O.D值定量RNA浓度。

2)将总RNA逆转录为cDNA：通过逆转录试剂盒(High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits，AppliedBiosystems，cat. no. 4368813)，将总RNA逆转录为cDNA，逆转录体系如下：模板RNA (150ng/μL) 10μL，10X RT缓冲液2.0μL，25X dNTP Mix (100 mM) 0.8μL，随机引物(试剂盒中自带) 2.0μL，MultiScribeTM逆转录酶1.0μL，RNA酶抑制剂1.0μL，无核酸酶H2O 3.2μL，瞬时离心后，放入PCR仪反应，反应条件如下：(1)25℃，10min；(2)37°C，120min；(3)85°C，5min；(4)4°C，终止反应。反应结束后加入20μL无RNA酶ddH2O，补足终体积至40μL。

3)定量PCR扩增反应：qPCR反应体系总体积10μL，包括：5μL 2×SYBR Green Master Mix，0.5μL正向引物(10μM)，0.5μL反向引物(10μM),1μL逆转录得到的cDNA，3μL无RNA酶ddH2O。使用LightCycler480荧光定量PCR仪，PCR反应条件是：95℃，持续5min预变性，开始进入PCR扩增循环：(1)95℃，10s；(2)55℃，10s；(3)72℃，20s；总共进行40个循环；最后40℃持续10s降温。扩增反应正向引物和反向引物均由北京擎科新业生物技术有限公司设计和合成。引物序列同上4.3.5节所述。

4)利用2-ΔCt法计算相对表达量。

6.2.4 蛋白免疫印迹法检测(Western blot)蛋白表达水平

6.2.4.1 实验分组如下:

1)空白组:是指未经处理的细胞,该组作为空白对照组。

2) TGF-β1处理组:给予刺激物3ng/mL转化生长因子TGF-β1刺激MRC-5细胞,作用72h后收取细胞,该组作为阳性刺激组。

3) So(d22:0)-NC组:加入So(d22:0)-NC本草体溶液(终浓度为400nM),共孵育24h后,给予刺激物3ng/mL转化生长因子TGF-β1刺激MRC-5细胞,作用72h后收取细胞。,该组作为阴性对照组;

4) So(d22:0)-HJT-sRNA-m7本草体处理组:将制备的So(d22:0)-HJT-sRNA-m7本草体加入细胞中(终浓度为400nM),共孵育24h后,给予刺激物3ng/mL转化生长因子TGF-β1刺激MRC-5细胞,作用72h后收取细胞。

6.2.4.2与细胞共同孵育24h后,给予刺激物3ng/mL转化生长因子TGF-β1刺激MRC-5细胞,作用72小时后,用强RIPA裂解液裂解细胞,收集裂解液利用Western blot检测相关基因的蛋白表达水平。

6.2.5酶联免疫法(ELISA)检测炎症细胞因子表达水平

6.2.5.1实验分组如下:

1)空白组:是指未经处理的A549细胞上清,该组作为空白对照组。

2) poly(I:C)处理组:加1μg/mL 双链RNA病毒模拟物poly(I:C) 处理A549细胞6小时细胞上清。该组作为阳性刺激组。

3) So(d22:0)-NC组:加入So(d22:0)-NC本草体溶液(终浓度为400nM),共孵育24h后,加1μg/mL 双链RNA病毒模拟物poly(I:C) 处理A549细胞6小时。收取细胞上清,该组作为阴性对照组;

4) So(d22:0)-PGY-sRNA-6本草体处理组:将制备的So(d22:0)-PGY-sRNA-6本草体加入细胞中核酸的终浓度为400nM。共孵育24h后,加1μg/mL 双链RNA病毒模拟物poly(I:C) 处理A549细胞6小时,收取细胞上清。

6.2.5.2 细胞上清于4℃,12,000rpm,离心5min,转移细胞上清至新1.5mLEP管中,加入100x x cock tail,利用ELISA检测炎症细胞因子的表达水平,具体步骤如下:

包被：采用R&D公司的自包被ELISA板(试剂盒为：IL-1 #DY201-05, IL-6 #DY206-05, TNF-α #DY210-05，其中包括了相关基因的Detection Antibody和Avidin-HRP)，用PBS稀释Capture Antibody (IL-1, IL-6, TNF-α) (根据说明书上的稀释比例)，室温包被过夜，约16-18h;

洗板：取出包被好的ELISA板，将Capture Antibody液倒掉并在滤纸上将残余液体拍干，而后加入已配置好的洗液(PBS+0.1% tween 20) 300μL进行清洗，每次停留1min (用ELISA板振荡器)，每次也须将液体倒掉并在滤纸上将残余液体拍干(下同)，清洗 4 次;

封闭：清洗完毕后，加入300μL封闭液(PBS+1%BSA)，室温下温育1h;

准备：在1h间须准备相应标准品(IL-1, IL-6, TNF-α)，根据说明书配好最高浓度后按照 1/2 的浓度梯度进行稀释，稀释7次，最后第八管加入稀释液作为0管;

洗板：温育1h后使用洗液清洗4次;

加样：将准备好的标准品加入ELISA板的左右两排，其他孔中加入样品，室温孵育2h;

加一抗：洗液清洗4次，加入100μL Detection Antibody，封好后室温孵育2h;

加二抗：洗液清洗4次，加入100μL Avidin-HRP，封好后室温孵育20min;

加底物：洗液清洗4次，加入100μL TMB Substrate Solution，尽量在暗中操作，而后马上置于抽屉中暗置10~20min左右，带颜色变蓝后，加入100μL终止液终止反应，颜色由蓝变黄;

在30min内进行吸光度测定，450nm检测波长，570nm参考波长。

6.3 本草体在动物模型中的功能过程验证

6.3.1 实验步骤:

1) 本草体制备：采用水煮加热法制备，400μL NC mimic(广州锐博生物技术有限公司提供)或HJT-sRNA-m7 (10nmol)双链RNA DEPC处理的水溶液，分别加入10μL sphinganine (d22:0)脂质混匀后，90℃加热30min。

2) 6-8周龄雄性C57小鼠灌胃给RNA：用灌胃针分别给予脂质与NC或HJT-sRNA-m7的本草体溶液体系，400μL /只，分组如下:

1) Saline对照组：是指不做任何处理，仅给予生理盐水的小鼠;

2) 博来霉素组：是指2.5 U/kg的剂量气管滴注博莱霉素造模，21天后分别收取小鼠左右肺进行检测。该组作为阳性对照组。

3)脂质Sphinganine-NC组：是指2.5 U/kg的剂量气管滴注博莱霉素造模，提前连续三天灌胃给予脂质Sphinganine-NC(0.1mg:5nmol)组成的本草体。气管滴注博莱霉素造模后，第7-14天给予同样剂量的脂质Sphinganine-NC组成的本草体，21天后分别收取小鼠左右肺进行检测。

4)脂质Sphinganine-HJT-sRNA-m7组：是指2.5 U/kg的剂量气管滴注博莱霉素造模，提前连续三天给予脂质Sphinganine-HJT-sRNA-m7(0.1mg:5nmol)组成的本草体。气管滴注博莱霉素造模后，第7-14天给予同样剂量的脂质Sphinganine-HJT-sRNA-m7组成的本草体，21天后分别收取小鼠左右肺进行检测。

6.3.2动物肺组织羟脯氨酸含量的测定

用羟脯氨酸测定试剂盒(#MAK008，Sigma Aldrich)测定小鼠肺的胶原含量。将小鼠右肺组织真空干燥，称重后在120℃下用6M盐酸水解3小时，按试剂盒说明书进行羟脯氨酸含量测定。羟脯氨酸含量表示为“μg/右肺”，除非另有说明。

6.3.3 动物肺组织病理学检测

见5.2.3

6.3.4 动物肺组织马松染色检测

见5.2.4

实施例2. 植物药汤剂体的特征检测

基于图1的植物药的汤剂体的制备示意图，根据实施例1中的具体步骤制备红景天(HJT)和蒲公英(PGY)两种植物药的水煎液，再用差速离心的方式得到HJT和PGY两种植物药的汤剂体沉淀，双蒸水溶解汤剂体沉淀并定量后检测其特征。透视电镜的结果如图2和图3显示，HJT 汤剂体和PGY 汤剂体均呈现的外泌体样纳米颗粒状，最外面有双层膜包裹且直径不均一，但大多数的汤剂体的直径集中在100 nm到200 nm之间。

为了进一步观察汤剂体的特征，我们对其粒径和Zeta电势进行检测，图4和图5显示，HJT汤剂体的平均粒径峰值为197.6 nm，PGY汤剂体的平均粒径峰值为153.2 nm，粒径分散均一，呈正态分布。Zeta电势结果显示HJT汤剂体

和PGY汤剂体电位绝对值大于30mV，体系呈较稳定状态。

实施例3. 植物药汤剂体的细胞模型中的功能验证

将HJT水煎液和从水煎液中提取的HJT汤剂体进行定量后，选取水煎液浓度为300 μg/ml，汤剂体浓度为50 μg/ml在TGF-β1诱导的MRC-5细胞的纤维化模型中验证其功能。结果如图6和图7显示，无论是HJT水煎液还是HJT 汤剂体与同浓度同方法制备的对照木香(MX)的水煎液和汤剂体相比，都可以有效的降低TGF-β1诱导的MRC-5细胞中纤维蛋白纤连蛋白的表达。

将PGY水煎液和从水煎液中提取的PGY汤剂体进行定量后，选取水煎液浓度为10 μg/ml、30 μg/ml、100 μg/ml，PGY 汤剂体浓度为2μg/ml、6 μg/ml、20 μg/ml时在poly(I:C)刺激的A549细胞的炎症模型中验证其功能。结果如图8A-C和图9A-E显示，无论是PGY水煎液还是PGY汤剂体与同浓度同方法制备的对照卷心菜(JXC)的水煎液和汤剂体相比，都可以有效的降低poly(I:C)刺激的A549细胞的炎症模型中IL-1β、IL-6、TNF-α的mRNA的相对表达。

上述结果在细胞模型中完成，HJT和PGY两种植物药的水煎液和汤剂体分别存在抗纤维化和抗炎功能，水煎液的有效浓度明显高于汤剂体的有效浓度，可以证明汤剂体可能是草药的主要发挥功能的混合物的一种存在形式。

实施例4. 植物药汤剂体的动物模型中的功能验证

将从水煎液中提取的HJT 汤剂体进行定量后，选取上文制备的(先前以200g制备)红景天熬煮而得汤剂来源HJT汤剂体在博来霉素诱导的小鼠的纤维化模型中验证其抗纤维化的功能。动物实验的分组如下：

1) 对照组：该组仅气管滴注生理盐水，作为Saline对照组。

2) 博来霉素组：是指2.5 U/kg的剂量气管滴注博莱霉素造模，21天后分别收取小鼠左右肺进行检测。该组作为阳性对照组。

3)木香汤剂体对照组：是指2.5 U/kg的剂量气管滴注博莱霉素造模，提前连续三天灌胃给予木香汤剂来源汤剂体，剂量为每只小鼠40g木香汤剂来源汤剂体(500uL)。21天后分别收取小鼠左右肺进行检测。

4)红景天汤剂体对照组：是指2.5 U/kg的剂量气管滴注博莱霉素造模，提前连续三天灌胃给予红景天汤剂来源汤剂体，剂量为每只小鼠40g红景天汤

剂来源汤剂体(500uL)。21天后分别收取小鼠左右肺进行检测。

结果如图10-图13显示，HJT汤剂体与同样剂量的同方法制备的对照MX汤剂体相比，可以有效的降低博来霉素诱导的小鼠的纤维化模型中小鼠肺部羟脯氨酸的水平(图10)，有效降低博来霉素诱导的小鼠的纤维化模型中小鼠肺部纤维化程度(图11和图12)，有效降低博来霉素诱导的小鼠的纤维化模型中小鼠肺部病理改变程度(图13)。

将从水煎液中提取的PGY汤剂体进行定量后，选取PGY汤剂体量为10mg/只时在poly(I:C)刺激的A549细胞的炎症模型中验证其功能。动物实验的分组如下:

1) 对照组：该组仅气管滴注生理盐水，作为盐水对照组。

2)poly(I:C)组：是指气管滴注500ug poly(I:C)造模，9h后收取小鼠肺泡灌洗液及全血样品。该组作为阳性对照组。

3）卷心菜(JXC)汤剂体对照组：是指提前-72h, -48h, -24h,-3h连续灌胃给予卷心菜汤剂来源汤剂体, 剂量为每只小鼠10mg卷心菜汤剂体(500uL)。气管滴注500ug poly(I:C)刺激建立炎症模型，建模3h后灌胃给与10mg卷心菜汤剂体(500uL)，气管滴注500ug poly(I:C) 9h 后收取小鼠肺泡灌洗液及全血样品。

4）蒲公英汤剂体对照组：是提前连续三天灌胃给予蒲公英汤剂来源汤剂体10mg(500uL),气管滴注500ug poly(I:C)造模，造模3h后灌胃给与10mg蒲公英汤剂体(500uL)， 造模9h 后收取小鼠肺泡灌洗液及全血样品。

结果如图14A-B显示，PGY 汤剂体与同样剂量的同方法制备的对照JXC汤剂体相比，可以有效的降低poly(I:C)诱导的小鼠炎症模型中小鼠血浆中各种细胞因子的表达水平。

上述结果在动物模型中完成，HJT和PGY两种植物药的汤剂体分别存在抗纤维化和抗炎功能。结合实施例3中汤剂体的细胞模型中的功能验证，证实了汤剂体可能是植物药发挥功能的重要单元。

实施例5. 植物药汤剂体的各组分鉴定

既然植物药汤剂体在其药用价值中发挥很重要的作用，研究清楚汤剂体的组成成分至关重要。还是以HJT和PGY两种植物药为例，首先我们对这两种汤剂体利用HPLC-MS/MS鉴定其脂质成分，共鉴定出25大类脂质成分，如

图15红景天汤剂体脂质鉴定、图16红景天汤剂体脂质鉴定显示。其中TG、Cer、DG、PE和PC的含量均占汤剂体中脂质的主要部分。

通过对HJT汤剂体和PGY汤剂体的化合物成分分析，图17显示，共鉴定出HJT汤剂体中含有36类化合物。图18显示，共鉴定出PGY汤剂体中含有47类化合物。

通过蛋白组分分析，图19显示，鉴定出HJT汤剂体中的38种蛋白。同样图20显示，鉴定出PGY汤剂体中的140种蛋白。并且对这些蛋白进行简单的分类，这些鉴定出来的汤剂体中的蛋白成分主要是与代谢、信号转导、泛素化和转录以及翻译相关。

通过提取汤剂体沉淀中的RNA，进行小RNA测序分析，如图21和图22显示，HJT汤剂体和PGY汤剂体中的小RNA的长度主要分布在18nt到25nt。表8-9显示了HJT汤剂体和PGY汤剂体中的小RNA序列的主要信息，HJT汤剂体中鉴定了80,573种小RNA的存在，PGY汤剂体中鉴定了614,545种小RNA的存在。

综上所述，汤剂体中的成分包括脂质、化合物，蛋白和小RNA。

实施例6. 本草体的制备和功能鉴定

我们定义本草体为人工制备的由一种或多种合成的脂质与包括但不限于以下：合成或提取脂质、人工表达或改造的蛋白质、人工合成或纯化的核酸（包括DNA，RNA，包括小RNA），人工合成或提纯的化合物等物质构成的，具有热稳定性的外泌体样的膜结构的纳米颗粒状物质。如图23所示，本草体是人为将脂质、化合物、小RNA和蛋白等两种或者多种有效成分组合在一起，通过加热处理后形成的物质。

我们的研究证实了红景天水煎液中的小RNA: HJT-sRNA-m7在TGF-β1诱导的MRC-5细胞的纤维化模型中和博来霉素诱导的小鼠的纤维化模型中均有很有效的抗纤维化作用(Du. et al., 2017)。我们将一定比例的脂质Sphinganine与HJT-sRNA-m7混合，加热水煮后形成Sphinganine-HJT-sRNA-m7的本草体。如图24-图26显示，运用RT-PCR检测MRC-5细胞中HJT-sRNA-m7的相对表达量，流式细胞术检测MRC-5细胞中HJT-sRNA-m7的进入以及细胞共聚焦实验检测Cy5标记的HJT-sRNA-m7在

A549细胞中的进入及分布，均可以证明Sphinganine-HJT-sRNA-m7的本草体可以使得HJT-sRNA-m7有效的进入细胞中。图27显示Sphinganine-HJT-sRNA-m7在TGF-β1诱导的MRC-5细胞的纤维化模型中发挥着抗纤维化的作用，Sphinganine-HJT-sRNA-m7可有效降低纤维化相关蛋白纤连蛋白和α-SMA的表达。

我们通过合成并筛选了PGY水煎液中峰度最高的前20种小RNA(PGY-sRNA-1~20)对其进行抗炎的功能验证。图28显示在poly(I:C)诱导的A549的炎症模型中，PGY-sRNA-6最有效的降低A549细胞IL-1β、IL-6和TNF-α的表达。将PGY-sRNA-6在poly(I:C)刺激的A549细胞和PUMC细胞炎症模型中验证，图29A-C和图30A-C显示PGY-sRNA-6可有效的降低poly(I:C)刺激的A549细胞和PBMC细胞中*IL-1β*、*IL-6*和TNF-α mRNA的相对表达。同时运用生物信息学分析与双荧光报告基因检测方法，图31和图32显示，RELA (p65，Gene ID: 5970)为PGY-sRNA-6的直接靶基因。如图33显示，生物信息学分析PGY-sRNA-6均在PGY水煎液和PGY 汤剂体中存在且后者中含有更高的峰度。我们将一定比例的脂质Sphinganine与PGY-sRNA-6混合，加热水煮后形成Sphinganine-PGY-sRNA-6的本草体。如图34-图36显示，运用RT-PCR检测A549细胞中PGY-sRNA-6的相对表达量，流式细胞术检测A549细胞中PGY-sRNA-6-FAM的进入以及细胞共聚焦实验检测Cy5标记的PGY-sRNA-6在A549细胞中的进入及分布，均可以证明Sphinganine-PGY-sRNA-6的本草体可以使得PGY-sRNA-6有效的进入细胞中。图37A-C显示Sphinganine-PGY-sRNA-6在poly(I:C)刺激的A549细胞的炎症模型中发挥着抗炎作用，Sphinganine-PGY-sRNA-6可有效降低细胞中*IL-1β*、*IL-6*和*TNF-α mRNA*的相对表达。图38显示Sphinganine-PGY-sRNA-6在HEK 293T细胞中有效降低PGY-sRNA-6靶基因RELA的3'UTR的表达。

脂质Sphinganine与两种有功能的小RNA HJT-sRNA-m7或PGY-sRNA-6合并后形成的本草体均在纤维化和炎症的细胞模型中发挥着有效的抗纤维化和抗炎作用。Sphinganine-HJT-sRNA-m7的本草体如图39-41所示，Sphinganine-HJT-sRNA-m7可以有效的降低博来霉素诱导的小鼠的纤维化模型中小鼠肺部病例改变程度(图39)，有效降低博来霉素诱导的小鼠的纤维化模型中小鼠肺部纤维化程度(图40和图41)。

实施例7: Sphinganine-PGY-sRNA-6合并后形成的本草体在小鼠的炎症模型中发挥着有效的抗炎作用。

1) 本草体制备: 采用水煮加热法制备, 500μL NC mimic或PGY-sRNA-6(5nmol)单链RNA DEPC处理的水溶液, 分别加入10μL sphinganine (d22:0)脂质混匀后, 90℃加热15min。

2)6-8周龄雄性C57小鼠, 用灌胃针分别给予脂质与NC或PGY-sRNA-6的本草体溶液体系, 500μL/只, 分组如下:

1) 空白组: 是指不做任何处理的小鼠;

2) poly(I:C)组: 是指500μg的剂量气管滴注poly(I:C)刺激造模, 给予刺激9小时后收取小鼠血浆进行细胞因子检测。该组作为阳性对照组。

3) 脂质Sphinganine-NC组: 是指提前48h, 24h, 3h给予脂质Sphinganine(d22:0)-NC组成的本草体后, 气管滴注500μg的剂量poly(I:C)刺激造模, 给与刺激3h后再次给予脂质Sphinganine(d22:0)-NC本草体。刺激9小时后收取小鼠血浆进行细胞因子检测。

4)脂质Sphinganine-PGY-sRNA-6组: 是指提前48h, 24h, 3h给予脂质Sphinganine(d22:0)-HJT-sRNA-m7组成的本草体后, 气管滴注500μg的剂量poly(I:C)刺激造模, 给与刺激3h后再次给予脂质Sphinganine(d22:0)-PGY-sRNA-6本草体。刺激9小时后收取小鼠血浆进行细胞因子检测。用试剂盒BIO-Plex Pro™ Mouse Cytokines Standard 23-Plex, Group I kit (#60009RDPD, BIO-RAD)测定小鼠血浆细胞因子表达含量。取全血于EDTA-2K抗凝管, 于4度2000g离心10分钟, 取上层血浆, 4度12,000g离心10分钟, 取上清用于细胞因子检测。

结果参见图42A-G, 本草体有效降低图中所示的细胞因子的水平。

实施例8: 不同方式检测本草体的理化性质

1. 临界胶束浓度(CMC)检测:

用0.25%四氢呋喃: 99.75%水(v/v)配置6 μM的1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH) 溶液。于黑色96孔板每孔加入50 μL DPH溶液加到50 μL 实验组溶液中, 室温避光孵育1小时后, 检测DPH荧光, 激发光波长350 纳米, 发射光波长420 nm。

2 sRNA组：于黑色96孔板每孔加入50 μL DPH溶液加到50 μL sRNA溶液中，室温避光孵育1小时后，检测DPH荧光。

3 Sphinganine(So, d22:0)组：于黑色96孔板每孔加入50 μL DPH溶液加到50 μL So(d22:0)溶液中，室温避光孵育1小时后，检测DPH荧光。

4 本草体组：于黑色96孔板每孔加入50 μL DPH溶液加到50 μL 本草体溶液中，室温避光孵育1小时后，检测DPH荧光。

A 加热法So(d22:0)-HJT-sRNA-m7(200nM)本草体组：于黑色96孔板每孔加入50 μL DPH溶液加到加热法制备的50 μL So(d22:0)-HJT-sRNA-m7(200nM)本草体溶液中，室温避光孵育1小时后，检测DPH荧光。

B 加热法So(d22:0)-HJT-sRNA-m7(600nM)本草体组：于黑色96孔板每孔加入50 μL DPH溶液加到加热法制备的50 μL So(d22:0)-HJT-sRNA-m7(600nM)本草体溶液中，室温避光孵育1小时后，检测DPH荧光。

C 未加热So(d22:0)-HJT-sRNA-m7(200nM)本草体组：于黑色96孔板每孔加入50 μL DPH溶液加到直接混合制备的50 μL So(d22:0)-HJT-sRNA-m7(200nM)本草体溶液中，室温避光孵育1小时后，检测DPH荧光。

D 未加热So(d22:0)-HJT-sRNA-m7(600nM)本草体组：于黑色96孔板每孔加入50 μL DPH溶液加到直接混合制备的50 μL So(d22:0)-HJT-sRNA-m7(600nM)本草体溶液中，室温避光孵育1小时后，检测DPH荧光。

如图43-图44所示，本草体的中小RNA可能以嵌入脂质膜的形式存在，加热可以促进本草体的中小RNA嵌入脂质膜过程的稳定性。

2：静态光散射方式检测本草体的几何分布和zeta电势结果

本草体的粒径和Zeta电位检测

1) 本草体制备：100微升RNA溶液中(2μM，4μM，6μM)，各加入30ug脂质，充分混匀后90度水浴加热15分钟。测量时用ddH2O稀释至1毫升。

2) 粒径测量：1毫升体系转移至比色皿，使用Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instrument, UK)仪器测量。测量温度25度。

3)Zeta电势测量：使用Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instrument, UK)仪器测量。测量温度25度。

3：本草体的粒径分布，zeta 电势检测以及透射电镜形态观察

本草体制备：100 微升水或 RNA 溶液(6μM)中，各加入 30ug 脂质，充分混匀后 90 度水浴加热 15 分钟。测量时用 ddH2O 稀释至 1 毫升。

1) 粒径测量：1毫升体系转移至比色皿，使用Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instrument, UK)仪器测量。测量温度25度。

2) zeta电势检测：1毫升体系转移至比色皿，使用Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instrument, UK)仪器测量。测量温度25度。

3) 透射电镜观察：向200目铜网上滴一滴本草体溶液，多余液体用滤纸吸走。滴加2%磷钨酸(w/w, pH 7.0)负染2分钟，用滤纸吸走多余液体后室温晾干1小时。于JEOL JEM-1400 PLUS 透射电镜观察。观察条件电压80kV。

本草体的几何分布见图45，zeta电势结果见图46以及粒径分布参见图47A-47D。本草体粒径分布100纳米左右，静态光散射强度在50-120kcps，zeta电势小于60mV, 绝对值大于20mV。

实施例9：本草体的蛋白质递送效率和定位

1. **流式细胞技术检测脂质40 PE(16:0/22:1)递送蛋白的效率**

实验材料：A549细胞(购自中国医学科学院细胞中心)，绿色荧光蛋白(内部构建质粒表达，200nM)，脂质40 PE(16:0/22:1) (10mg/mL)，Accuri® C6仪器(购自美国BD公司)

实验方法：用乙醚逆向挥发法制备本草体。将绿色荧光蛋白0.2nmol溶解于20ul水中，分别加入含0ug，1ug, 3ug的100ul脂质乙醚溶液，充分混合后，超声3min，60度挥发除去有机溶剂后，以100uL opti-MEM水化得到本草体溶液。之后将本草体加入A549细胞中，共孵育6h后，收样检测，先用PBS清洗三遍后，用胰酶消化三分钟后，移去胰酶，再用PBS清洗后吹下来。用Accuri® C6仪器测定。

根据图149A-D，绿色荧光蛋白自由进入A549细胞效率是3.6%，10ug/mL脂质40递送绿色荧光蛋白进入A549细胞效率是7.2%，30ug/mL脂质41递送绿色荧光蛋白进入A549细胞效率是9.1%，脂质递送效率更高。脂质40可递送蛋白进入A549细胞。

2. **流式细胞技术检测脂质41 sphinganine(d22:0)递送蛋白的效率**

实验材料：A549细胞(购自中国医学科学院细胞中心)，绿色荧光蛋白(内部构建质粒表达)，脂质41 sphinganine(d22:0)(10mg/mL)，Accuri® C6仪器(购自美国BD公司)

实验方法：用逆向挥发法制备本草体。将绿色荧光蛋白0.2nmol溶解于20ul水中，分别加入含0ug，1ug, 3ug的100ul脂质乙醚溶液，充分混合后，超声3min，60度挥发除去有机溶剂后，以100uL opti-MEM水化得到本草体溶液。之后将本草体加入A549细胞中，共孵育6h后，收样检测，先用PBS清洗三遍后，用胰酶消化三分钟后，移去胰酶，再用PBS清洗后吹下来。用Accuri® C6仪器测定。

根据图150A-D，绿色荧光蛋白自由进入A549细胞效率是3.6%，**10ug/mL**脂质41递送绿色荧光蛋白进入A549细胞效率是23.4%，**30ug/mL**脂质41递送绿色荧光蛋白进入A549细胞效率是26.6%，脂质递送效率更高。脂质41可高效递送蛋白进入A549细胞。

3. **流式细胞技术检测脂质41 sphinganine(d22:0)递送蛋白的效率**

实验材料：A549细胞(购自中国医学科学院细胞中心)，绿色荧光蛋白(内部构建质粒表达)，脂质41 **sphinganine(d22:0)(10mg/mL)**，Accuri® C6仪器(购自美国BD公司)

实验方法：加热法制备本草体。将绿色荧光蛋白0.2nmol溶解于100ul水中，分别加入含0uL，1uL, 3uL的脂质，充分混合后，90度加热15min得到本草体溶液。之后将本草体加入A549细胞中，共孵育6h后，收样检测，先用PBS清洗三遍后，用胰酶消化三分钟后，移去胰酶，再用PBS清洗后吹下来。用Accuri® C6仪器测定。

根据图150E-H，绿色荧光蛋白自由进入A549细胞效率是3.6%，**10ug/mL**脂质41递送绿色荧光蛋白进入A549细胞效率是5.5%，**30ug/mL**脂质41递送绿色荧光蛋白进入A549细胞效率是9.5%，脂质递送效率更高。脂质41可高效递送蛋白进入A549细胞。

4. **流式细胞技术检测脂质71 PE(16:0/16:0)递送蛋白的效率**

实验材料：A549细胞(购自中国医学科学院细胞中心)，绿色荧光蛋白(内

部构建质粒表达)，脂质71 **PE(16:0/16:0) (10mg/mL)**，Accuri® C6仪器(购自美国BD公司)

实验方法：用逆向挥发法制备本草体。将绿色荧光蛋白0.2nmol溶解于20ul水中，分别加入含0ug，1ug, 3ug的100ul脂质乙醚溶液，充分混合后，超声3min，60度挥发除去有机溶剂后，以100uL opti-MEM水化得到本草体溶液。之后将本草体加入A549细胞中，共孵育6h后，收样检测，先用PBS清洗三遍后，用胰酶消化三分钟后，移去胰酶，再用PBS清洗后吹下来。用Accuri® C6仪器测定。

根据图151A-D，绿色荧光蛋白自由进入A549细胞效率是3.6%，**10ug/mL**脂质71递送绿色荧光蛋白进入A549细胞效率是7.1%，**30ug/mL**脂质41递送绿色荧光蛋白进入A549细胞效率是9.1%，脂质递送效率更高。脂质71可有效递送蛋白进入A549细胞。

5. **共聚焦荧光显微镜观察脂质40 PE(16:0/22:1)递送**蛋白质**在细胞中的定位**

实验材料：A549细胞(购自中国医学科学院细胞中心)，绿色荧光蛋白(内部构建质粒表达)，脂质40 **PE(16:0/22:1) (10mg/mL)**，Zeiss LSM780(购自德国Zeiss公司)，Alexa Fluor® 488 phalloidin(购自美国invitrogen)，DAPI(购自美国invitrogen)，多聚甲醛(购自美国sigma公司)

实验方法：用逆向挥发法制备本草体。将绿色荧光蛋白0.2nmol溶解于20ul水中，分别加入含0ug，0.25ug, 0.75ug的100ul脂质乙醚溶液，充分混合后，超声3min，60度挥发除去有机溶剂后，以100uL opti-MEM水化得到本草体溶液。之后将本草体加入A549细胞中，共孵育6h后，收样检测，先用PBS清洗三遍后，4%的多聚甲醛固定，PBS清洗三遍后，Alexa Fluor® 488 phalloidin染色30min，PBS清洗三遍后，Dapi染色5min，PBS清洗，后封片观察。

根据图152，共聚焦显微镜观察下，能明显观察到绿色荧光蛋白的进入，脂质40可有效递送蛋白进入A549细胞。

6. 共聚焦荧光显微镜观察脂质41 sphinganine(d22:0)递送蛋白质**在细胞**

中的定位

实验材料：A549细胞(购自中国医学科学院细胞中心)，绿色荧光蛋白(内部构建质粒表达)，脂质41 **sphinganine(d22:0)**，Zeiss LSM780(购自德国Zeiss公司)，Alexa Fluor® 488 phalloidin(购自美国invitrogen)，DAPI(购自美国invitrogen)，多聚甲醛(购自美国sigma公司)

实验方法：用逆向挥发法制备本草体。将绿色荧光蛋白0.2nmol溶解于20ul水中，分别加入含0ug，0.25ug, 0.75ug的100ul脂质乙醚溶液，充分混合后，超声3min，60度挥发除去有机溶剂后，以100uL opti-MEM水化得到本草体溶液。之后将本草体加入A549细胞中，共孵育6h后，收样检测，先用PBS清洗三遍后，4%的多聚甲醛固定，PBS清洗三遍后，Alexa Fluor® 488 phalloidin染色30min，PBS清洗三遍后，Dapi染色5min，PBS清洗，后封片观察。

根据图153，共聚焦显微镜观察下，能明显观察到绿色荧光蛋白的进入，脂质41可高效递送蛋白进入A549细胞。

7. 共聚焦荧光显微镜观察脂质71 PE(16:0/16:0)递送蛋白质在细胞中的定位

实验材料：A549细胞(购自中国医学科学院细胞中心)，绿色荧光蛋白(内部构建质粒表达)，脂质71 **PE(16:0/16:0)** ，Zeiss LSM780(购自德国Zeiss公司)，Alexa Fluor® 488 phalloidin(购自美国invitrogen)，DAPI(购自美国invitrogen)，多聚甲醛(购自美国sigma公司)

实验方法：用逆向挥发法制备本草体。将绿色荧光蛋白0.2nmol溶解于20ul水中，分别加入含0ug，0.25ug, 0.75ug的100ul脂质乙醚溶液，充分混合后，超声3min，60度挥发除去有机溶剂后，以100uL opti-MEM水化得到本草体溶液。之后将本草体加入A549细胞中，共孵育6h后，收样检测，先用PBS清洗三遍后，4%的多聚甲醛固定，PBS清洗三遍后，Alexa Fluor® 488 phalloidin染色30min，PBS清洗三遍后，Dapi染色5min，PBS清洗，后封片观察。

根据图154，共聚焦显微镜观察下，能明显观察到绿色荧光蛋白的进入，脂质71可高效递送蛋白进入A549细胞。

第二部分实验

方法

1. 植物药中脂质的提取

1.1 植物药的煎煮制备

1) 取100g饮片(红景天，蒲公英，金银花，穿心莲，购自北京同仁堂药店)，加入1000mL ddH_2O浸泡30min。

2) 煎煮锅强火煎煮15min，弱火煎煮20min。

3) 煎煮后的药液400mL 加入旋转蒸发仪，60℃，60rpm，30min浓缩至100mL 。

1.2脂质的提取

1) 向160mL 根据以上1.1项所得汤剂(旋转蒸发仪浓缩)中加入氯仿-甲醇混合液(氯仿:甲醇=1:2，v/v)600mL ，使得氯仿:甲醇:水=1:2:0.8，搅拌混匀10-15min。

2) 向锥形瓶中加入200mL 氯仿，搅拌混匀10min。

3) 向锥形瓶中加入200mL ddH_2O，使得氯仿:甲醇:水=2:2:1.8，搅拌混匀10min。

4) 除去上层液体和中间层的不溶性物质，取下层的氯仿层，-40℃冻存。

1.3 HPLC-MS/MS鉴定脂质成分

仪器条件

1) 色谱条件:

仪器：Ultimate 3000；色谱柱：Kinetex C18 (100×2.1mm, 1.9μm)；柱温：45 °C；流动相：A：乙腈:水(V/V，60:40)，溶液含10 mmol/L甲酸铵，流动相B：乙腈：异丙醇(10:90，V/V)，溶液含10 mmol/L 甲酸铵和 0.1%甲酸。流速：0.4 mL /min；进样量：4 μL。

2) 质谱参数:

a) 正模式：Heater Temp 300 °C, Sheath Gas Flow rate, 45 arb, Aux Gas Flow Rate, 15 arb, Sweep Gas Flow Rate, 1 arb, spray voltage, 3.0 KV, Capillary Temp, 350 °C, S-Lens RF Level, 30%. Scan ranges: 200-1500。

b) 负模式：Heater Temp 300 °C, Sheath Gas Flow rate, 45 arb, Aux Gas

Flow Rate, 15 arb, Sweep Gas Flow Rate, 1 arb, spray voltage, 2.5KV, Capillary Temp, 350 °C, S-Lens RF Level, 60%. Scan ranges: 200-1500。

1.4 植物药来源的脂质鉴定

利用HPLC-MS/MS鉴定其中的脂质成分，共鉴定植物药来源的脂质成分138种，其中阳离子模式鉴定125种，阴离子模式鉴定13种。取表10中所示的化合物1-69继续进行下面的实验。需要说明的是，下文测试的脂质均为商业购买或商业合成的，并且使用方式如表10所述。

2.制备脂质核酸复合物

2.1逆向蒸发法:

制备100μL的脂质乙醚溶液，并按照表1中所示的脂质编号进行分组(脂质浓度见下表)，以5:1的体积比将脂质溶液加入20μL核酸溶液(HJT sRNA或siRNA)，超声3min后，经55°C挥发除去乙醚，然后加入100μL的DEPC处理的水水化，得到核酸脂质混合物。

表15

图	脂质单体或组合	浓度/(mg/mL)	
83	8 + 12 =1:2	No.8	0.0833
		No.12	0.1667
103	38+12+37=4:1:1	No.38	0.2
		No.12	0.05
		No.37	0.05
108/109/111/114	No.41	No.41	0.25
119	40+12+41=2:4:3	No.40	0.0667
		No.12	0.1333
		No.41	0.1
120左	12+41=1:6	No.12	0.0428
		No.41	0.2571
120右	12+41=1:1	No.12	0.15
		No.41	0.15
121左	12+41=6:1	No.12	0.2571
		No.41	0.0428
121右	4+12+41=1:1:1	No.4	0.1
		No.12	0.1
		No.41	0.1
122	4+12+41=1:1:1	No.4	0.1
		No.12	0.1
		No.41	0.1

125	No.38	No.38	0.25
131/132/134	No.40	No.40	0.25
136/137	No.39	No.39	0.25
138	No.60	No.60	0.25
139	No.62	No.62	0.25

2.2水煮法:

100μL的核酸溶液(HJT sRNA或siRNA)加入2-5μL的脂质溶液(浓度见表1)，混匀后，80-100℃加热15-30min，获得核酸脂质混合物。

3. 脂质核酸复合物的体外递送实验

3.1 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测细胞内脂质递送核酸的表达量

3.1.1培养MRC-5细胞(肺胚胎成纤维细胞)，A549细胞(人肺腺癌细胞)，Caco-2细胞(人结肠腺癌细胞)(购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心)至对数生长期，然后分别铺板到12孔板，细胞密度为6×10^5 /1mL 培养基/孔；其中MRC-5 和Caco-2细胞培养于Eagle's MEM培养基(MEM，Gibco)中；A549细胞培养于Ham's F-12培养基(HyClone)中；37℃过夜孵育，待细胞贴壁后进行后续实验。

3.1.2实验分组如下:

1) 未处理组：是指未经处理的细胞，该组作为空白对照组。

2) RNAiMAX处理组：分别用100μL opti-MEM培养基(购自Invitrogen，Thermo Fisher Scientific)稀释2μL Lipofectamine™RNAiMAX转染试剂(试剂全称为Lipofectamine RNAimax，Invitrogen，Thermo Fisher Scientific)和HJT-sRNA-m7溶液，二者混匀后放置15min，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7的终浓度为100nM，该组作为阳性对照组。

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7溶液(终浓度为100nM)，该组作为阴性对照组;

4) 脂质核酸混合物处理组：将步骤2中制备的脂质与HJT-sRNA-m7混合物加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7的终浓度为100nM。

3.1.3与细胞共同孵育12-24h后，用PBS清洗细胞2次，用TRIzol裂解液(购自Sigma-Aldrich)收取细胞，提取其中总RNA，利用RT-qPCR(SYBR Green染料法)检测进入细胞的HJT-sRNA-m7丰度，具体步骤如下:

1)提取细胞总RNA:

A. 12孔板培养的细胞(约1×10^6个细胞/孔)，每孔加入1mL TRIzol裂解液后，先置于冰上，待所有的样品都加入TRIzol后，室温放置5min，使其充分裂解;

B. 4℃，12,000rpm离心5min，弃沉淀，将TRIzol转移到新的离心管中;

C. 按200μL氯仿/mL TRIzol加入氯仿，充分振荡，混匀后室温放置5min;

D. 4℃，12,000rpm，离心15min;

E.吸取上层水相，至另一离心管中，按0.5mL 异丙醇/mL TRIzol加入异丙醇混匀，室温放置5-10min;

F.4℃，12,000rpm，离心15min，弃上清，RNA沉于管底;

G. 加入1mL 75% 乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀;

H. 4℃，12,000rpm，离心10min，弃上清，加入1mL 75% 乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀;

I. 4℃，12,000rpm，离心10min，弃上清，室温晾干，用50μL RNase-free的H2O溶解RNA样品，测O.D值定量RNA浓度。

2)将总RNA逆转录为cDNA：通过逆转录试剂盒(High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits，Applied Biosystems，cat. no. 4368813)，用茎环法(stem-loop法)(参见例如Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR，Nucleic Acids Res. 2005 Nov 27;33(20):e179，通过引用并入本文)将sRNA逆转录为cDNA，逆转录体系如下：模板RNA (150 ng/μL) 10μL，10X RT缓冲液2.0μL，25X dNTP Mix (100 mM) 0.8μL，U6 RT stem-loop 引物2.0μL，HJT-sRNA-m7 RT stem-loop引物2.0μL，MultiScribe™逆转录酶1.0μL，RNA酶抑制剂1.0μL，无核酸酶H_2O1.2μL，瞬时离心后，放入PCR仪反应，反应条件如下：(1)25℃，10 min; (2)37°C，120 min; (3)85°C，5 min; (4)4°C，终止反应。反应结束后加入20μL无RNA酶ddH_2O，补足终体积至40μL。该逆转录过程中使用的茎环法引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成(U6 RT 引物，因为RT-qPCR反应对小RNA的定量只能是相对定量，所以以U6作为标准的参考基因，计算其相对表达量):

GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAA ATATG ; HJT-sRNA-m7 RT stem-loop 引物 : GTCGTATCCAGTGCACGCTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCTTA CAA)。

3)定量PCR扩增反应：qPCR反应体系总体积10μL，包括：5μL 2×SYBR Green Master Mix，0.5μL正向引物(10μM)，0.5μL反向引物(10μM), 1μL逆转录得到的cDNA，3μL无RNA酶dH_2O。使用LightCycler 480荧光定量PCR仪，PCR反应条件是：95℃，持续5min预变性，开始进入PCR扩增循环：(1)95℃，10s；(2)55℃，10s；(3)72℃，20s；总共进行40个循环；最后40℃持续10s降温。扩增反应正向引物和反向引物均由北京擎科新业生物技术有限公司设计和合成(U6正向引物：GCGCGTCGTGAAGCGTTC， U6反向引物：GTGCAGGGTCCGAGGT ， HJT-sRNA-m7 正向引物：TCGCGCTGAGGTAGTAGGTT ， HJT-sRNA-m7 反向引物：GTGCACGCTCCGAGGT)。

4)利用2-ΔCt法(基因相对表达量 = 2-（Ct目的基因-Ct内参基因))计算相对进入量(单链或双链RNA)。

3.2 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测mRNA表达水平

3.2.1培养THP-1细胞(人单核细胞)至对数生长期，然后分别铺板到12孔板，细胞密度为6×10^5/1mL 培养基/孔；THP-1细胞培养于RPMI-1640培养基(HyClone)中；37℃过夜孵育，待细胞贴壁后进行后续实验。

3.2.2实验分组如下：

1) 未处理组：是指未经处理THP-1细胞，该组作为空白对照组。

2) RNAiMAX处理组：分别用100μLopti-MEM(Invitrogen，Thermo Fisher Scientific)培养基稀释2μL Lipofectamine™RNAiMAX转染试剂(nvitrogen，Thermo Fisher Scientific)和核酸溶液(TNF-α siRNA)，二者混匀后放置15min，加入细胞中，混匀，核酸的终浓度为400nM，该组作为阳性对照组。

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入核酸溶液(TNF-α siRNA，终浓度为400nM)，该组作为阴性对照组；

4) 脂质核酸混合物处理组：将步骤2中制备的脂质与核酸混合物

加入细胞中，混匀，核酸的终浓度为400nM。

3.2.3处理细胞24h后，给予1μg/mL大肠杆菌脂多糖(Lipopolysaccharide，LPS，*Escherichia coli* 0111:B4， L4391，Sigma-Aldrich)刺激，9h后用TRIzol裂解液收取细胞，提取其中总RNA，利用RT-qPCR(SYBR Green染料法)检测TNF-α(后续实施例的目标基因视类型而定，结果均显示在图中)的mRNA表达水平，具体步骤如下：

1)提取细胞总RNA:，步骤同3.1.3细胞总RNA的方法。

2)将总RNA逆转录为cDNA：通过逆转录试剂盒(High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits，Applied Biosystems，cat. no. 4368813)，将总RNA逆转录为cDNA，逆转录体系如下：模板RNA (150ng/μL) 10μL，10X RT缓冲液2.0μL，25X dNTP Mix (100 mM) 0.8μL，随机引物2.0μL，MultiScribe™逆转录酶1.0μL，RNA酶抑制剂1.0μL，无核酸酶H_2O 3.2μL，瞬时离心后，放入PCR仪反应，反应条件如下：(1)25℃，10 min；(2)37°C，120 min；(3)85°C，5 min；(4)4°C，终止反应。反应结束后加入20μL无RNA酶ddH_2O，补足终体积至40μL。

3)定量PCR扩增反应：qPCR反应体系总体积10μL，包括：5μL 2×SYBR Green Master Mix，0.5μL正向引物(10μM)，0.5μL反向引物(10μM), 1μL逆转录得到的cDNA，3μL无RNA酶ddH_2O。使用LightCycler 480荧光定量PCR仪，PCR反应条件是：95℃，持续5min预变性，开始进入PCR扩增循环：(1)95℃，10s；(2)55℃，10s；(3)72℃，20s；总共进行40个循环；最后40℃持续10s降温。扩增反应正向引物和反向引物均由北京擎科新业生物技术有限公司设计和合成，引物序列(内参基因UBC正向引物：CTGGAAGATGGTCGTACCCTG，内参基因UBC反向引物：GGTCTTGCCAGTGAGTGTCT；目的基因TNF-α正向引物:CTGCCCCAATCCCTTTATT：目的基因TNF-α反向引物：CCCAATTCTCTTTTTGAGCC)。

4)利用2-ΔCt法计算相对表达量，同上。

3.3蛋白免疫印迹法检测(Western blot)蛋白表达水平

3.3.1培养MRC-5细胞(肺胚胎成纤维细胞)或A549细胞(人肺腺癌细胞)至对数生长期，然后分别铺板到12孔板，细胞密度为6×10^5 /1mL 培养基/孔；

其中MRC-5细胞培养于Eagle's MEM培养基(MEM, Gibco)中；A549细胞培养于Ham's F-12培养基(HyClone)中；37℃过夜孵育，待细胞贴壁后进行后续实验。

3.3.2实验分组如下：

1) 未处理组：是指未经处理的细胞，该组作为空白对照组。

2) RNAiMAX处理组：分别用100μL opti-MEM培养基(Invitrogen，Thermo Fisher Scientific)稀释2μL Lipofectamine™RNAiMAX转染试剂(Invitrogen，Thermo Fisher Scientific)和核酸溶液，二者混匀后放置15min，加入细胞中，混匀，核酸的终浓度为400nM，该组作为阳性对照组。

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入核酸溶液(终浓度为400nM)，该组作为阴性对照组；

4) 脂质核酸混合物处理组：将步骤2中制备的脂质与核酸混合物加入细胞中，混匀，核酸的终浓度为400nM。

3.3.3与细胞共同孵育24h后，给予刺激物(1μg/mL 双链RNA病毒模拟物poly(I:C)(P1530，Sigma-Aldrich)或3ng/mL 转化生长因子TGFβ1(Pepro Tech))刺激细胞，作用一定时间后，用强RIPA裂解液收取细胞，利用Western blot检测相关基因(相关基因类型视具体情况而定，均显示在相应的图中)的蛋白表达水平(A549细胞经poly(I:C)刺激后24h检测REL-A的蛋白表达水平，内参蛋白为β-肌动蛋白；MRC-5细胞经TGF-β1刺激72h后检测纤连蛋白和α-SMA蛋白的表达，内参蛋白为GAPDH；siRNA的递送实验检测相应的敲低基因的蛋白表达，内参蛋白为β-肌动蛋白)，具体步骤如下：

1) 蛋白样品的收集与BCA法浓度测定

H. 弃去培养基，12孔板细胞，每孔加入1mL PBS缓冲液清洗一遍，每孔加入100μL预冷的强RIPA裂解液，将细胞用枪头刮下并转移到离心管中，置冰上裂解20min；

I. 4℃，12,000rpm，离心10min，转移上清至新的离心管中；

J. 将BCA试剂A与B(50:1，v/v)充分混匀，配制BCA工作液；

K. 分别取25μL新鲜配制的BSA标准液和待测样品，加入到96孔板中，每孔中加入200μL BCA工作液，并充分混匀；37℃孵育30 min；

L. 用紫外分光光度计(Synergy 4多功能酶标仪)于562 nm处检测其吸光度，根据标准曲线计算出样品中的蛋白浓度;

M. 用RIPA裂解液和Loading Buffer调节样品浓度，使各样品浓度一致;

N. 95℃，变性处理10min。

2) 蛋白免疫印迹法检测(Western blot)

E. 制胶：采用10%浓度分离胶(下层胶)和5%浓度的浓缩胶(上层胶)，15孔梳子所做泳道，每个泳道样品蛋白上样量相等;

F. 蛋白电泳：加入电泳缓冲液，电泳起始电压80V；当溴酚兰染料到分离胶后，提高电压至120V继续电泳，直至溴酚兰染料达到分离胶底部或全部泳出凝胶;

G. 湿法转膜：按照转膜夹板(负极)-海绵-滤纸-凝胶-PVDF膜-滤纸-海绵-转膜夹板(正极)的顺序进行组装；安装后并将整个转膜装置置于4℃冷室；恒定电流300 mA，转膜120 min;

H. 封闭：转膜结束后置于3%BSA封闭液中，室温封闭1 h;

I. 一抗孵育：将封闭后的PVDF膜转移至杂交袋中，加入含有对应一抗(一抗的信息如下)的3%BSA封闭液，赶出袋中气泡，密封后4℃过夜孵育;

J. 洗膜：将PVDF膜取出，用TBST洗膜3次，每次10 min;

K. 二抗孵育：弃去TBST，加入含有带有辣根过氧化物酶(HRP)的山羊抗兔或山羊抗小鼠的二抗(购自杭州联科生物技术有限公司)的3%BSA封闭液(二抗稀释比例1:5000)，室温孵育1小时;

L. 洗膜：用TBST洗膜3次，每次10 min;

M. 显影：配制Western显色液(1:1，V/V，Merck Millipore，ECL化学发光显色液购自Millipore公司)，并将配制好的显色液均匀滴加于膜结合蛋白的一侧；用保鲜膜小心的将膜包好，显色后观察;

N. 分析：用Image J软件进行分析。

4. 脂质核酸混合物的体内递送实验

4.1 实验步骤:

1) 脂质核酸混合物制备：采用水煮法制备，400μL HJT-sRNA-m7(5nmol)单链RNA DEPC处理的水溶液，分别加入9μL或

18μL脂质组合(脂质PE(No38)&LPC(No37)&TG(No32)，4:2:3，V/V/V)，混匀后，100℃加热30min。

2) 6-8周龄雄性C57BL/6J野生型小鼠灌胃给RNA：用灌胃针分别给予HJT-sRNA-m7水溶液或脂质与HJT-sRNA-m7的混合溶液，400μL/只(HJT-sRNA-m7，5nmol/只)，分组如下：

A.对照组(未处理组)：不做任何处理的小鼠；

B.阴性对照组(lipid组)：灌胃9μL脂质组合(脂质PE(No38)&LPC(No37)&TG(No32)，4:2:3，V/V/V)；

C.自由摄食组(Free uptake)：直接灌胃HJT-sRNA-m7单链RNA溶液；

D.脂质与核酸混合物组：灌胃给脂质组合与HJT-sRNA-m7单链RNA的混合物。

3)收样：灌胃给药3h后，用3mL TRIzol裂解小鼠全肺，匀浆后-80℃冻存。

4)总RNA提取：

A.小鼠肺组织，加入3.0mLTRIzol裂解液，用匀浆器研磨，12,000rpm， 4℃，离心10min，去除未能匀浆充分的组织沉淀；

B.按200μL/mLTRIzol的比例加入氯仿，充分振荡混匀，室温放置15min；

C.12,000rpm，4℃，离心15min，吸取上层水相，至另一离心管中；

D.重复上述步骤，按上层水相加入等量的氯仿，充分混匀后室温放置10min；

E.12,000rpm，4℃，离心15min；

F.吸取上层水相至另一新EP管中，按0.5mL/mLTRIzol加入异丙醇混匀，室温放置5-10min；

G.12,000rpm，4℃，离心15min，弃上清；

H.加入1 mL 75%乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀；

I. 12,000rpm，4℃，离心10min尽量弃上清；

J. 室温晾干5-10min，用50μL DEPC处理过的H2O溶解RNA样品。

5) RT-qPCR(SYBR Green通用染料法)检测HJT-sRNA-m7的丰度。除非另有说明，HJT-sRNA-m7单链溶液指HJT-sRNA-m7单链的DEPC处理水溶液。HJT-sRNA-m7双链溶液指HJT-sRNA-m7双链的DEPC处理水溶液。

实施例1-1：不同类别脂质组合递送单链核酸进入MRC-5细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组：未经处理的MRC-5细胞;

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μLRNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链的DEPC处理水溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为200nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组: 直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为200nM);

4) 脂质与核酸混合物处理组：将3μL脂质单体或脂质组合分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为200nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入3μL脂质单体或脂质组合的氯仿溶液(脂质No1/2/4/9/14/18/19/20/21/22/23/24/25/26/27/28/29/30/32氯仿溶液浓度为5mg/mL ，脂质No3/8/10/11/12/13/33/34/35/36氯仿溶液浓度为10mg/mL ，脂质No6/15/16/17/31氯仿溶液浓度为1mg/mL)，100℃，加热30min;

a) 脂质组合:

b) MG(monoglyceride，单酰基甘油)：3μLNo34脂质;

c) DG(diglyceride，甘油二酯)：3μL No1/2/3/19/35等体积氯仿溶液的混合物;

d) TG(triglyceride，甘油三酯)：3μL No6/9/10/13/15/16/18/20/21/22/23/24/25/26/27/28/32/33等体积氯仿溶液的混合物;

e) LPC(Lysophosphatidylcholine，溶血卵磷脂)：3μL No36/37等体积氯仿溶液的混合物;

f) PC(phosphatidylcholine，磷脂酰胆碱)：3μL No11/12等体积氯仿溶液的

混合物；

g) PE(phosphatidylethanolamine，磷脂酰乙醇胺)：3μL No8/38等体积氯仿溶液的混合物；

h) Cer(Ceramides，神经酰胺)：3μL No4/14等体积氯仿溶液的混合物；

i) So(Sphingoshine，(神经)鞘氨醇)：3μL No17/30/31等体积氯仿溶液的混合物；

j) FA(fatty acid，脂肪酸)：3μL No29

k) 混合物：3μL No1-36(无No5/7)等体积氯仿溶液的混合物；

l) 混合物1：3μL No1-36(无No5/7/34)等体积氯仿溶液的混合物；

m) 混合物2：3μL No1-36(无No5/7/1/2/3/19/35)等体积氯仿溶液的混合物；

n) 混合物3：3μL No1-36(无No5/7/6/9/10/13/15/16/18/20/21/22/23/24/25/26/27/28/32/33)等体积氯仿溶液的混合物；

o) 混合物4：3μL No1-36(无No5/7/36/37)等体积氯仿溶液的混合物；

p) 混合物5：3μL No1-36(无No5/7/11/12)等体积氯仿溶液的混合物；

q) 混合物6：3μL No1-36(无No5/7/8)等体积氯仿溶液的混合物；

r) 混合物7：3μL No1-36(无No5/7/4/14)等体积氯仿溶液的混合物；

s) 混合物8：3μL No1-36(无No5/7/29)等体积氯仿溶液的混合物；

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度200nM，加入细胞12h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，与自由摄取组相比，上述脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图48)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。其中，混合物2、混合物3、混合物5、混合物7、混合物8介导核酸进入MRC-5细胞的量较高。

实施例1-2：脂质组合递送单链核酸进入MRC-5细胞和Caco-2细胞

(一) 实验分组：

测试细胞为MRC-5细胞和Caco-2细胞

1) 未处理组：未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为200nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为200nM);

4) 脂质单体与核酸处理组：将3μL脂质单体(No1或No8或No12)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为200nM。

5) 脂质组合混合物与核酸混合物处理组：将3μL脂质组合(No1/8/12等体积混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为200nM。

6) 脂质组合与核酸混合物处理组：将3μL脂质组合(2μL脂质单体No1或No8或No12与1μL下述脂质类别(MG、DG、TG、LPC、Cer、So或FA)混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为200nM。在图49A和图49B中，该处理组分别共同表示为No. 1 2μL +mix 1μL、No. 82μL +mix 1μL、和No. 12 2μL+mix 1μL，其中横向涵盖范围内，MG表示2μL脂质单体No1或No8或No12+1μL MG，DG表示2μL脂质单体No1或No8或No12+1μLDG，TG表示2μL脂质单体No1或No8或No12+1μLTG，LPC表示2μL脂质单体No1或No8或No12+1μLLPC，Cer表示2μL脂质单体No1或No8或No12+1μLCer，So表示2μL脂质单体No1或No8或No12+1μLSo，FA表示2μL脂质单体No1或No8或No12+1μLFA。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入3μL脂质单体(脂质No1氯仿溶液浓度为5mg/mL ，No8/12氯仿溶液浓度为10mg/mL)或脂质组合，100℃，加热30min;

MG(monoglyceride，单酰基甘油)：2μL No34脂质;

DG(diglyceride，甘油二酯)：2μL No1/2/3/19/35等体积氯仿溶液的混合物;

TG(triglyceride，甘油三酯)：2μL

No6/9/10/13/15/16/18/20/21/22/23/24/25/26/27/28/32/33等体积氯仿溶液的混合物;

LPC(Lysophosphatidylcholine，溶血卵磷脂): 2μL No36/37等体积氯仿溶液的混合物;

Cer(Ceramides，神经酰胺): 2μL No4/14等体积氯仿溶液的混合物;

So(Sphingoshine，(神经)鞘氨醇): 2μL No17/30/31等体积氯仿溶液的混合物;

FA(fatty acid，脂肪酸): 2μL No29

2) 实验条件: HJT-sRNA-m7终浓度200nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的细胞进入量。具体实验方法参见上文"实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量"。所有实验一式三份进行。

结论: 结果表明，对于MRC-5细胞，混合物(No1/8/12等体积混合)，No.1 2μL+ No.8 1μL，No.1 2μL + No.12 1μL，No.1 2μL + MG 1μL，No. 8 2μL + MG 1μL，No 12 2μL+ No.8 1μL以及No 12 2μL+ So 1μL较为有效递送核酸。

对于Caco-2细胞，混合物(No1/8/12等体积混合)，No.1 2μL + No.8 1μL，No.1 2μL + No.12 1μL，No.1 2μL + MG 1μL，No. 8 2μL + MG 1μL，No 12 2μL+ No.8 1μL，No 12 2μL+ LPC 1μL以及No 12 2μL+ So 1μL较为有效递送核酸。

实施例1-3: **脂质组合递送单链核酸进入细胞**

细胞类型: A549、MRC-5和Caco-2细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组: 未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组: 分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组: 直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质单体与核酸处理组: 将3μL脂质单体(No8或No12)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，

RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合PC(No12)&PE(No8)与核酸混合物处理组: 将2.25μL脂质组合(PC(No12)&PE(No8)，2:1，V/V)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

6) 脂质组合与核酸混合物处理组：将3μL脂质组合(2.25μL脂质组合PC(No12)&PE(No8)与0.75μL下述脂质类别DG、TG、LPC、PC、Cer、So或FA混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。在图50中，2.25μL+0.75μL上方横线涵盖的处理组即为该混合物处理组。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件: 100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入脂质单体(脂质No8/12氯仿溶液浓度为10mg/mL)或脂质组合，100℃，加热30min;

DG(diglyceride，甘油二酯)：0.75μL No1/2等体积氯仿溶液的混合物;

TG(triglyceride，甘油三酯)：0.75μL No15氯仿溶液;

LPC(Lysophosphatidylcholine，溶血卵磷脂)：0.75μL No36/37等体积氯仿溶液的混合物;

PC(Lysophosphatidylcholine，溶血卵磷脂)：0.75μL No12氯仿溶液;

Cer(Ceramides，神经酰胺)：0.75μL No4氯仿溶液;

So(Sphingoshine，(神经)鞘氨醇)：0.75μL No31氯仿溶液;

FA(fatty acid，脂肪酸)：0.75μL No29

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，与自由摄取组相比，上述脂质单体及脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图50)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。

对于A549、MRC-5和Caco-2细胞，2.25μL PC(No12)&PE(No8)+0.75μL DG(No1/2等体积氯仿溶液的混合物)取得最佳的递送效率。

实施例1-4：**脂质组合递送单链核酸进入细胞**

细胞类型：A549、MRC-5和Caco-2细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组: 未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组: 分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组: 直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质单体与核酸处理组: 将3μL脂质单体(No1或No8或No12)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合DG(No1)&PE(No8)&PC(No12)与核酸混合物处理组: 将上述3μL脂质组合(DG(No1)&PE(No8)&PC(No12)，1: 1:1，V/V/V)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

6) 脂质组合与核酸混合物处理组: 将3μL脂质组合(2μL脂质组合DG(No1)&PE(No8)&PC(No12)与1μL下述脂质类别DG、TG、LPC、PC、Cer、So或FA混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。在图51中，2μL脂质组合DG(No1)&PE(No8)&PC(No12)+1μL上方横线涵盖的处理组即为该混合物处理组。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件: 100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入3μL脂质单体(脂质No1氯仿溶液浓度为5mg/mL ，No8/12氯仿溶液浓度为10mg/mL)或脂质组合，100℃，加热30min;

DG(diglyceride，甘油二酯): 1μL No1/2等体积氯仿溶液的混合物;

TG(triglyceride，甘油三酯): 1μL No15氯仿溶液;

LPC(Lysophosphatidylcholine，溶血卵磷脂): 1μL No36/37等体积氯仿溶液的混合物;

PC(Lysophosphatidylcholine，溶血卵磷脂): 1μL No12氯仿溶液;

Cer(Ceramides，神经酰胺): 1μL No4氯仿溶液;

So(Sphingoshine，(神经)鞘氨醇)：1μL No31氯仿溶液；

FA(fatty acid，脂肪酸)：1μL No29

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，与自由摄取组相比，上述脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图51)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。

对于细胞类型A549、MRC-5和Caco-2细胞，2μL脂质组合DG(No1)&PE(No8)&PC(No12)与1μL TG(15)取得最佳的递送效果。

实施例1-5：**脂质组合递送单链核酸进入细胞**

细胞类型：A549、MRC-5和Caco-2细胞

(一) 实验分组：

1) 未处理组：未经处理的细胞；

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM；

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为100nM)；

4) 脂质单体与核酸处理组：将3μL脂质单体No8与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM；

5) 脂质组合PE(No8)&MG(No34)与核酸混合物处理组：将上述2.25μL脂质组合(PE(No8)&MG(No34)，2:1，V/V)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

6) 脂质组合与核酸混合物处理组：将3μL脂质组合(2.25μL脂质组合PE(No8)&MG(No34)与0.75μL下述脂质类别DG、TG、LPC、PC、Cer、So或FA混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。在图52中，2.25μL脂质组合

PE(No8)&MG(No34)+0.75μL上方横线涵盖的处理组即为该混合物处理组。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入脂质单体(脂质No8氯仿溶液浓度为10mg/mL)或脂质组合，100℃，加热30min;

DG(diglyceride，甘油二酯)：0.75μL No1/2等体积氯仿溶液的混合物;

TG(triglyceride，甘油三酯)：0.75μL No15氯仿溶液;

LPC(Lysophosphatidylcholine，溶血卵磷脂)：0.75μL No36/37等体积氯仿溶液的混合物;

PC(Lysophosphatidylcholine，溶血卵磷脂)：0.75μL No12氯仿溶液;

Cer(Ceramides，神经酰胺)：0.75μL No4氯仿溶液;

So(Sphingoshine，(神经)鞘氨醇)：0.75μL No31氯仿溶液;

FA(fatty acid，脂肪酸)：0.75μL No29

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，与自由摄取组相比，上述脂质单体及脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图52)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。

对于细胞类型A549、MRC-5和Caco-2细胞，2.25μL PE(No8)&MG(No34)+0.75μL So(31)取得最佳的递送效果。

实施例1-6：脂质组合递送单链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组：未经处理的A549细胞;

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质单体与核酸处理组：将3μL脂质单体No38与HJT-sRNA-m7的单链

核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合与核酸混合物处理组：将上述3μL脂质组合(2μL脂质单体No38与1μL下述脂质类别MG、DG、TG、LPC、PC、PE、Cer、So或FA混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入3μL脂质单体(lipidNo38氯仿溶液浓度为10mg/mL)或脂质组合，100℃，加热30min;

MG(monoglyceride，单酰基甘油)：1μL No34脂质;

DG(diglyceride，甘油二酯)：1μL No1氯仿溶液;

TG(triglyceride，甘油三酯)：1μL No15氯仿溶液;

LPC(Lysophosphatidylcholine，溶血卵磷脂)：1μL No37氯仿溶液;

PC(phosphatidylcholine，磷脂酰胆碱)：1μL No12氯仿溶液;

PE(phosphatidylethanolamine，磷脂酰乙醇胺)：1μL No8氯仿溶液;

Cer(Ceramides，神经酰胺)：1μL No4氯仿溶液;

So(Sphingoshine，(神经)鞘氨醇)：1μL No31氯仿溶液;

FA(fatty acid，脂肪酸)：1μL No29氯仿溶液。

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：对于A549细胞，与自由摄取组相比，2μL脂质单体No38与1μL LPC(37)、TG(15)、PC(12)、DG(1)可以有效递送核酸进入细胞(见图53)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。

实施例1-7 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组：未经处理的A549细胞;

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转

染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合DG(No1)&PE(No38)&PC(No12)与核酸混合物处理组：将上述3μL脂质组合(DG(No1)&PE(No38)&PC(No12)，1:1:1，V/V/V)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合与核酸混合物处理组：将3μL脂质组合(2μL脂质组合DG(No1)&PE(No38)&PC(No12)与1μL下述脂质类别MG、TG、LPC、PE、Cer、So或FA混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件: 100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入3μL脂质组合，100℃，加热30min;

MG(monoglyceride，单酰基甘油): 1μL No34脂质;

TG(triglyceride，甘油三酯): 1μL No15氯仿溶液;

LPC(Lysophosphatidylcholine，溶血卵磷脂): 1μL No37氯仿溶液;

PE(phosphatidylethanolamine，磷脂酰乙醇胺): 1μL No8氯仿溶液;

Cer(Ceramides，神经酰胺): 1μL No4氯仿溶液;

So(Sphingoshine，(神经)鞘氨醇): 1μL No31氯仿溶液;

FA(fatty acid，脂肪酸): 1μL No29氯仿溶液。

2) 实验条件: HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，与自由摄取组相比，2μL脂质组合DG(No1)&PE(No38)&PC(No12)与1μL TG(15)、Cer(4)、So(31)、FA(29)、LPC(37)、PE(8)均可以有效递送核酸进入A549细胞(见图54)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。

实施例1-8 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组: 未经处理的A549细胞;

2) RNAiMAX组: 分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组: 直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合PE(No38)&MG(No34)与核酸混合物处理组: 将上述3μL脂质组合(PE(No38)&MG(No34)，2:1，V/V)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合与核酸混合物处理组: 将3μL脂质组合(2μL脂质组合PE(No38)&MG(No34)与1μL下述脂质类别DG、TG、LPC、PC、PE、Cer、So或FA混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件: 100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入3μL脂质组合，100℃，加热30min;

DG(diglyceride，甘油二酯): 1μL No1氯仿溶液;

TG(triglyceride，甘油三酯): 1μL No15氯仿溶液;

LPC(Lysophosphatidylcholine，溶血卵磷脂): 1μL No37氯仿溶液;

PC(phosphatidylcholine，磷脂酰胆碱): 1μL No12氯仿溶液;

PE(phosphatidylethanolamine，磷脂酰乙醇胺): 1μL No8氯仿溶液;

Cer(Ceramides，神经酰胺): 1μL No4氯仿溶液;

So(Sphingoshine，(神经)鞘氨醇): 1μL No31氯仿溶液;

FA(fatty acid，脂肪酸): 1μL No29氯仿溶液。

2) 实验条件: HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实

验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图55)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。其中，2μL脂质组合PE(No38)&MG(No34)与1μLLPC (37)取得最佳的递送效果。

实施例1-9 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组：

1) 未处理组：未经处理的细胞；

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM；

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为100nM)；

4) 脂质组合PE(No38)&PC(No12)与核酸混合物处理组：将上述3μL脂质组合(PE(No38)&PC(No12)，2:1，V/V)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合与核酸混合物处理组：将3μL脂质组合(2μL脂质组合PE(No38)&PC(No12)与1μL下述脂质类别MG、DG、TG、LPC、PE、Cer、So或FA混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入3μL脂质组合，100℃，加热30min；

MG(monoglyceride，单酰基甘油)：1μL No34脂质；

DG(diglyceride，甘油二酯)：1μL No1氯仿溶液；

TG(triglyceride，甘油三酯)：1μL No15氯仿溶液；

LPC(Lysophosphatidylcholine，溶血卵磷脂)：1μL No37氯仿溶液；

PE(phosphatidylethanolamine，磷脂酰乙醇胺)：1μL No8氯仿溶液；

Cer(Ceramides，神经酰胺)：1μL No4氯仿溶液；

So(Sphingoshine，(神经)鞘氨醇)：1μL No31氯仿溶液；

FA(fatty acid，脂肪酸)：1μL No29

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图56)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。其中，2μL脂质组合PE(No38)&PC(No12)与1μL Cer(4)取得最佳的效果。

实施例1-10 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组：

1) 未处理组：未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合PE(No38)&PC(No12)&DG(No1)&TG(No15)与核酸混合物处理组：将上述3μL脂质组合(PE(No38)&PC(No12)&DG(No1)&TG(No15)，2:2:2:3，V/V/V/V)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合与核酸混合物处理组：将3μL脂质组合(2.2μL脂质组合PE(No38)&PC(No12)&DG(No1)&TG(No15)与0.8μL下述脂质类别MG、LPC、Cer、So或FA混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入3μL脂质组合，100℃，加热30min;

MG(monoglyceride，单酰基甘油)：0.8μL No34脂质;

LPC(Lysophosphatidylcholine，溶血卵磷脂)：0.8μL No37氯仿溶液;

Cer(Ceramides，神经酰胺)：0.8μL No4氯仿溶液；

So(Sphingoshine，(神经)鞘氨醇)：0.8μL No31氯仿溶液；

FA(fatty acid，脂肪酸)：0.8μL No29

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图57)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。其中，2.2μL脂质组合PE(No38)&PC(No12)&DG(No1)&TG(No15)，以及2.2μL脂质组合PE(No38)&PC(No12)&DG(No1)&TG(No15)与0.8μL LPC(37)或So(31)取得较好的递送效率。

实施例1-11 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组：

1) 未处理组：未经处理的细胞；

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM；

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为100nM)；

4) 脂质组合PE(No38)&MG(No34)&LPC(No37)与核酸混合物处理组：将上述3μL脂质组合PE(No38)&MG(No34)&LPC(No37)，4：2：3，V/V/V)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合与核酸混合物处理组：将3μL脂质组合(2.2μL脂质组合PE(No38)&MG(No34)&LPC(No37)与0.8μL下述脂质类别DG、TG、PC、Cer、或So混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件: 100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入3μL脂质组合, 100℃, 加热30min;

DG(diglyceride，甘油二酯): 0.8μL No1氯仿溶液;

TG(triglyceride，甘油三酯): 0.8μL No15氯仿溶液;

PC(phosphatidylcholine，磷脂酰胆碱): 0.8μL No12氯仿溶液;

Cer(Ceramides，神经酰胺): 0.8μL No4氯仿溶液;

So(Sphingoshine，(神经)鞘氨醇): 0.8μL No31氯仿溶液;

2) 实验条件: HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论: 结果表明，上述脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图58)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。

实施例1-12 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组: 未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组: 分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组: 直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合PE(No38)&PC(No12)&Cer(No4)与核酸混合物处理组: 将上述3μL脂质组合PE(No38)&PC(No12)&Cer(No4)，4: 2: 3，V/V/V)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合与核酸混合物处理组: 将3μL脂质组合(2.2μL脂质组合PE(No38)&PC(No12)&Cer(No4)与0.8μL下述脂质类别MG、DG、TG、LPC、So或FA混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件: 100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入3μL脂质组合, 100℃, 加热30min;

MG(monoglyceride, 单酰基甘油): 0.8μL No34脂质;

DG(diglyceride, 甘油二酯): 0.8μL No1氯仿溶液;

TG(triglyceride, 甘油三酯): 0.8μL No15氯仿溶液;

LPC(Lysophosphatidylcholine, 溶血卵磷脂): 0.8μL No37氯仿溶液;

So(Sphingoshine, (神经)鞘氨醇): 0.8μL No31氯仿溶液;

FA(fatty acid, 脂肪酸): 0.8μL No29氯仿溶液。

2) 实验条件: HJT-sRNA-m7终浓度100nM, 加入细胞24h后, 经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文"实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量"。所有实验一式三份进行。

结论: 结果表明, 上述脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图59), 有希望提高临床上核酸药物递送的效率。其中, 2.2μL脂质组合PE(No38)&PC(No12)&Cer(No4)与0.8μL FA(29)递送效率最佳。

实施例1-13 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组: 未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组: 分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液, 二者混匀后放置15min后, 加入细胞中, 混匀, HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组: 直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合PE(No38)&PC(No12)&Cer(No4)&FA(No29)与核酸混合物处理组: 将上述3μL脂质组合PE(No38)&PC(No12)&Cer(No4)&FA(No29), 44: 22: 33: 36, V/V/V/V)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中, 混匀, RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合与核酸混合物处理组: 将3μL脂质组合

(PE(No38)&PC(No12)&Cer(No4)&FA(No29)与1μL下述各脂质类别混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件: 100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入3μL脂质组合，100℃，加热30min;

MG(monoglyceride，单酰基甘油): 1μL No34脂质;

DG(diglyceride，甘油二酯): 1μL No1氯仿溶液;

TG(triglyceride，甘油三酯): 1μL No15氯仿溶液;

LPC(Lysophosphatidylcholine，溶血卵磷脂): 1μL No37氯仿溶液;

So(Sphingoshine，(神经)鞘氨醇): 1μL No31氯仿溶液。

2) 实验条件: HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论: 结果表明，上述脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图60)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。

实施例1-14: 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组: 未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组: 分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组: 直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合PE(No38)&PC(No12)&So(No31)与核酸混合物处理组: 将上述3μL脂质组合PE(No38)&PC(No12)&So(No31)，2: 1: 3，V/V/V)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5)脂质组合与核酸混合物处理组：将3μL脂质组合(2μL PE(No38)&PC(No12)&So(No31)与1μL下述各脂质类别MG、DG、TG、LPC、Cer、FA)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入3μL脂质组合，100℃，加热30min;

DG(diglyceride，甘油二酯)：1μL No1氯仿溶液;

TG(triglyceride，甘油三酯)：1μL No15氯仿溶液;

PC(phosphatidylcholine，磷脂酰胆碱)：1μL No12氯仿溶液;

Cer(Ceramides，神经酰胺)：1μL No4氯仿溶液;

FA(fatty acid，脂肪酸)：1μL No29氯仿溶液。

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图61)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。其中以2μL PE(No38)&PC(No12)&So(No31)与1μL FA(29)递送效果最佳。

实施例1-15 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组：

1) 未处理组：未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合PE(No38)&MG(No34)&LPC(No37)&So(No31)与核酸混合物处理组：将上述3μL脂质组合PE(No38)&MG(No34)&LPC(No37)&So(No31)，

44：22：33：36，V/V/V/V)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5)脂质组合与核酸混合物处理组：将3μL脂质组合(2μLPE(No38)&MG(No34)&LPC(No37)&So(No31)与1μL下述各脂质类别DG、TG、PC、Cer、FA混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1)水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入3μL脂质组合，100℃，加热30min;

DG(diglyceride，甘油二酯)：1μL No1氯仿溶液;

TG(triglyceride，甘油三酯)：1μL No15氯仿溶液;

PC(phosphatidylcholine，磷脂酰胆碱)：1μL No12氯仿溶液;

Cer(Ceramides，神经酰胺)：1μL No4氯仿溶液;

FA(fatty acid，脂肪酸)：1μL No29氯仿溶液。

2)实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，与自由摄取组相比，在2μLPE(No38)&MG(No34)&LPC(No37)&So(No31)的基础上，添加1μL1ul DG(1)、TG(15)、PC(12)、Cer(4)和FA(29)均可以有效递送核酸进入细胞(见图62)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。其中添加1μLPC(12)核酸递送效率最佳能够加强核酸递送效率。

实施例1-16 脂质组合递送单链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组：

1)未处理组：未经处理的细胞;

2)RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合PE(No38)&LPC(No37)与核酸混合物处理组: 将上述3μL脂质组合PE(No38)&LPC(No37)，2：1，V/V)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合与核酸混合物处理组：将3μL脂质组合(2μLPE(No38)&LPC(No37)与1μL下述各脂质类别MG、DG、TG、PC、Cer、So、FA混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件: 100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入3μL脂质组合，100℃，加热30min;

MG(monoglyceride，单酰基甘油)：1μL No34脂质;

DG(diglyceride，甘油二酯)：1μL No1氯仿溶液;

TG(triglyceride，甘油三酯)：1μL No15氯仿溶液;

PC(phosphatidylcholine，磷脂酰胆碱)：1μL No12氯仿溶液;

Cer(Ceramides，神经酰胺)：1μL No4氯仿溶液;

So(Sphingoshine，(神经)鞘氨醇)：1μL No31氯仿溶液;

FA(fatty acid，脂肪酸)：1μL No29氯仿溶液。

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，与自由摄取组相比，上述脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图63)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。在2μL脂质组合PE(No38)&LPC(No37)基础上，添加1μLTG(15)核酸递送效果最佳。

实施例1-17脂质组合递送单链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组：未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7单链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合PE(No38)&LPC(No37)&TG(No15)与核酸混合物处理组：将上述3μL脂质组合(PE(No38)&LPC(No37)&TG(No15)，32：8：5，V/V/V)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合与核酸混合物处理组：将3μL脂质组合(2μLPE(No38)&LPC(No37)&TG(No15)与1μL下述各脂质类别(MG、DG、PC、Cer、So或FA)混合)分别与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件: 100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入3μL脂质组合，100℃，加热30min;

MG(monoglyceride，单酰基甘油)：1μL No34脂质;

DG(diglyceride，甘油二酯)：1μL No1氯仿溶液;

PC(phosphatidylcholine，磷脂酰胆碱)：1μL No12氯仿溶液;

Cer(Ceramides，神经酰胺)：1μL No4氯仿溶液;

So(Sphingoshine，(神经)鞘氨醇)：1μL No31氯仿溶液;

FA(fatty acid，脂肪酸)：1μL No29氯仿溶液。

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法DG、检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图64)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。脂质组合PE(No38)&LPC(No37)&TG(No15)有效递送核酸进入细胞。在该脂质组合PE(No38)&LPC(No37)&TG(No15)基础上进一步添加其它脂质类别未能加强这种效果。

实施例2-1：脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞

(一) 实验分组：

1) 未处理组：未经处理的细胞；

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM；

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7双链RNA溶液(终浓度为100nM)；

4) 脂质单体与核酸处理组：将3μL脂质单体No38与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合与核酸混合物处理组：将上述3μL脂质组合(2μL脂质单体No38与1μL脂质氯仿溶液No. 8、1、2、11、12、34、37、4、30、31、29、32、1+2(等体积混合)或11+12(等体积混合)混合)分别与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入3μL脂质单体(lipidNo38氯仿溶液浓度为10mg/mL)或脂质组合，100℃，加热30min；

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质单体及脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图65)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。脂质单体38能够有效递送双链核酸进入MRC-5细胞，效果接近转染试剂RNAiMAX。在此基础上增加其他脂质未能进一步加强这种效果。

实施例2-2：脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组: 未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组: 分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组: 直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合(No38&No37，2:1，V/V)与核酸处理组: 将3μL脂质组合与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合与核酸混合物处理组: 将上述3μL脂质组合(2μLNo38&No37混合物与1μL脂质氯仿溶液No. 8、1、2、11、12、34、37、4、30、31、29、32、1+2(等体积混合)或11+12(等体积混合)混合)分别与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件: 100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入3μL脂质组合，100℃，加热30min;

2) 实验条件: HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论: 结果表明，上述脂质单体及脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图66)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。No38&No37混合物可以有效将双链核酸递送到MRC-5细胞中。在2μL No38&No37混合物基础上增加1μL除11和34号脂质外的脂质均能够加强这种效果。此外，出乎意料的是，以2μL No38&No37混合物基础上增加1μL脂质32取得了最佳的效果，甚至明显好于RNAiMAX的效果。

实施例2-3 脂质组合递送双链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组: 未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组: 分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组: 直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合(PE(No38)&PC(No12)&Cer(No4))与核酸处理组: 将3μL脂质组合(PE(No38)&PC(No12)&Cer(No4)，4: 2: 3，V/V/V)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合与核酸混合物处理组: 将上述3μL脂质组合(2.5μLPE(No38)&PC(No12)&Cer(No4)混合物与0.5μL脂质(DG(2)、TG(6)、So(17)、FA(29)、MG(34)和LPC(37))混合)分别与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件: 100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入3μL脂质组合，100℃，加热30min;

2) 实验条件: HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法(SYBR Green通用染料法)检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论: 结果表明，上述脂质单体及脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图67)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。在LPE(No38)&PC(No12)&Cer(No4)混合物的基础上添加1/5的LPC(37)能够显著增加核酸的递送效果。此外，添加DG(2)和TG(16)也可以增加进一步加强递送效果。

实施例2-4 脂质组合递送双链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组: 未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合(PE(No38)&DG(No2))与核酸处理组：将3μL脂质组合(PE(No38)&DG(No2))，2：1，V/V)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5) 脂质组合与核酸混合物处理组：将上述3μL脂质组合(2μLPE(No38)&DG(No2)混合物与1μL其他脂质No.37、31、29、34、12或4混合)分别与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入3μL脂质组合，100℃，加热30min;

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图68)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。脂质组合(2μLPE(No38)&DG(No2)混合物可以有效递送双链核酸进入A549细胞。与该脂质组合相比，以2:1的比例混合的脂质组合(2μLPE(No38)&DG(No2)和37、31、12或4可以增加递送效果。

实施例2-5 脂质组合递送双链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组：

1) 未处理组：未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合((PE(No38)&LPC(No37)，4：1，V/V)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入3μL脂质组合，70℃，加热30min;

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图69)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率，效果接近RNAiMAX。

实施例2-6 脂质组合递送双链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组：

1) 未处理组：未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合((PE(No38)&PC(No12)，4：1，V/V)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入3μL脂质组合，70℃，加热30min;

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定

量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合均可以有效递送核酸进入细胞(见图70)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率，效果好于RNAiMAX或与RNAiMAX相等。

实施例2-7 脂质组合递送双链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组：

1) 未处理组：未经处理的细胞；

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM；

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM)；

4) 脂质组合((PE(No38)&PC(No12)&DG(No2)，4：1：5，V/V/V)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入2μL脂质组合，80℃，加热30min；

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合可以有效递送核酸进入细胞(见图71)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。脂质组合((PE(No38)&PC(No12)&DG(No2)，4：1：5，V/V/V)的对A549细胞的双链核酸递送效果好于RNAiMAX。

实施例2-8 脂质组合递送双链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组：

1) 未处理组：未经处理的细胞；

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合((PE(No38)&LPC(No37)&DG(No2)，32：8：5，V/V/V)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入2μL脂质组合，80℃，加热30min;

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合可以有效递送核酸进入细胞(见图72)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率，效果接近RNAiMAX。

实施例2-9 脂质组合递送双链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组：未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合((PE(No8)&PC(No12)，1：2，V/V)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入2μL脂质组合，80℃，加热30min;

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合可以有效递送核酸进入细胞(见图73)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。脂质组合((PE(No8)&PC(No12)，1:2，V/V)的对A549细胞的双链核酸递送效果明显好于RNAiMAX。

实施例2-10 脂质组合递送双链核酸进入A549细胞

(一) 实验分组：

1) 未处理组：未经处理的细胞；

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM；

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM)；

4) 脂质组合((PE(No8)&LPC(No37)，4：1，V/V)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入2μL脂质组合，80℃，加热30min；

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合可以有效递送核酸进入细胞(见图74)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。

实施例2-11 脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞

(一) 实验分组：

1) 未处理组：未经处理的细胞；

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转

染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合((PE(No8)&PC(No12)，1：2，V/V)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM;

5) 脂质组合与HJT-sRNA-m7混合物处理组：3μL脂质组合(2μL PE(No8)&PC(No12)与1μL其他类别脂质(MG(34)、DG(2)、TG(32)、LPC(37)、PC(11)、PE(38)、Cer(4)、So(31)或FA(29))混合)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入3μL脂质组合，80℃，加热30min;

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合可以有效递送核酸进入细胞(见图75)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。PE(No8)&PC(No12)可以有效递送核酸进入细胞，并且效果明显优于RNAiMAX。与PE(No8)&PC(No12)相比，以2:1的比率混合的PE(No8)&PC(No12)和Cer(4)或PE(38)可以增强这种效果。

实施例2-12 脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组：未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合((PE(No8)&PC(No12)&DG(No2)，8：16：3，V/V/V)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，

RNA的终浓度为100nM。

5) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入2μL脂质组合，80℃，加热30min;

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，与自由摄取和RNAiMAX组相比，脂质组合((PE(No8)&PC(No12)&DG(No2)，8：16：3，V/V/V)的递送效果明显高于RNAiMAX的效果(见图76)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。

实施例2-13 脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组：未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

混合物1：PE(8):LPC(37):TG(32)-4:1:2

混合物2：PE(8):LPC(37):DG(2)-4:1:2

混合物3：PE(8):PC(12):So(31):FA(29)-1:2:1:1

5) 实验过程

1) 水煮法条件:100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入2.5μL脂质组合,90℃，加热15min;

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合可以有效递送核酸进入细胞(见图77)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。与RNAiMAX相比，混合物1：PE(8):LPC(37):TG(32)-4:1:2和混合物2：PE(8):LPC(37):DG(2)-4:1:2的递送效果是相当的，而混合物3: PE(8):PC(12):So(31):FA(29)-1:2:1:1的效果明显更好。

实施例2-14 脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞

(一) 实验分组：

1) 未处理组：未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组：直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合混合物与HJT-sRNA-m7混合物作用组：3μL脂质组合混合物(PE(8):PC(12):So(31):FA(29)-1:2:1:1)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM;

5) 脂质组合与HJT-sRNA-m7混合物作用组：3μL脂质组合(2μL脂质组合mix与1μL图78中其他类别脂质即脂质34、2、32、11、37、38或4混合)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入3μL脂质组合，90℃，加热15min;

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合可以有效递送核酸进入细胞(见图78)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。混合物(PE(8):PC(12):So(31):FA(29)-1:2:1:1)的递送效果明显好于RNAiMAX的递送效果。与混合物(PE(8):PC(12):So(31):FA(29)-1:2:1:1)相比，以2:1的比率添加的混合物(PE(8):PC(12):So(31):FA(29)-1:2:1:1)与脂质2、38或4可以明显提高这

种递送效果。

实施例2-15 脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组: 未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组: 分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组: 直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合((PE(No8)&So(No31)，6: 1，V/V)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

5) 实验过程

1) 水煮法条件: 100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入2μL脂质组合，90℃，加热15min;

2) 实验条件: HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞24h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论: 结果表明，脂质组合((PE(No8)&So(No31)，6: 1，V/V)的递送效果明显好于RNAiMAX的递送效果(见图79),有希望提高临床上核酸药物递送的效率。

实施例2-16 脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组: 未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组: 分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组: 直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合(PE(8):So(31)，4:1，V/V)与HJT-sRNA-m7混合物作用组: 2μL脂质组合与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细

胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM;

5) 脂质组合与HJT-sRNA-m7混合物作用组: 脂质组合(PE(8):So(31)，4:1，V/V)与其他类别脂质(MG(34)、DG(2)、LPC(37)、PC(12)、PC(11)、Cer(4)、FA(29)或TG(32))混合(12:3:5，V/V,图80)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件: 100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入2μL脂质组合，90℃，加热15min;

2) 实验条件: HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞12h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论: 结果表明，上述脂质组合可以有效递送核酸进入细胞(见图80)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。PE(8):So(31)(4:1，V/V)可以有效递送核酸进入细胞，效果接近RNAiMAX。与PE(8):So(31)相比，以12:3:5的比例混合的PE(8):So(31): MG(34)、DG(2)、PC(12)、PC(11)、或TG(32)可以增加核酸递送效果，并且PE(8):So(31):)PC(11)的效果最佳，明显好于RNAiMAX。

实施例2-17 脂质组合递送双链核酸进入MRC-5细胞

(一) 实验分组:

1) 未处理组: 未经处理的细胞;

2) RNAiMAX组: 分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

3) 自由摄取(Free uptake)组: 直接加入HJT-sRNA-m7双链溶液(终浓度为100nM);

4) 脂质组合(PE(8):Cer(4)，4:1，V/V)与HJT-sRNA-m7混合物作用组: 2μL脂质组合与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM;

5) 脂质组合与HJT-sRNA-m7混合物作用组: 脂质组合PE(8):Cer(4)与其他类别脂质MG(34)、DG(2)、LPC(37)、PC(12)、PC(31)、FA(29)或TG(32)混合

(12:3:5，V/V,图81)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

(二) 实验过程

1) 水煮法条件：100μL HJT-sRNA-m7双链溶液加入2μL脂质组合，90℃，加热15min;

2) 实验条件：HJT-sRNA-m7终浓度100nM，加入细胞12h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的进入量。具体实验方法参见上文“实时荧光定量PCR检测细胞内脂质递送核酸的表达量”。所有实验一式三份进行。

结论：结果表明，上述脂质组合可以有效递送核酸进入细胞(见图81)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。脂质组合PE(8):Cer(4)可以有效递送核酸进入细胞，效果接近RNAiMAX。与PE(8):So(31)相比，以12:3:5的比例混合的PE(8):So(31): DG(2)、FA(29)、或TG(32)可以增加核酸递送效果，并且FA(29)可以显著提高PE(8):So(31)的递送效果，明显好于RNAiMAX。

实施例3 脂质组合促进核酸通过消化道进入肺

脂质组合如下:

脂质PE(No38)&LPC(No37)&TG(No32)，4:2:3，V/V/V

1. 脂质-核酸复合物的制备:

方法：水煮法

400μL HJT-sRNA-m7(5nmol)单链RNA的DEPC处理的水溶液，分别加入9μL或18μL脂质组合(脂质PE(No38)&LPC(No37)&TG(No32)，4:2:3，V/V/V)，混匀后，100℃加热30min。

2. 核酸的消化道递送实验

6-8周龄雄性C57小鼠灌胃给RNA：用灌胃针分别给予HJT-sRNA-m7 水溶液或脂质与HJT-sRNA-m7的混合溶液，400μL /只(HJT-sRNA-m7，5nmol/只)，分组如下:

(1) 对照组(未处理组)：不做任何处理的小鼠;

(2) 阴性对照组(脂质组)：灌胃9μL脂质组合(脂质PE(No38)&LPC(No37)&TG(No32)，4:2:3，V/V/V);

(3) 自由摄食组(Free uptake)：直接灌胃HJT-sRNA-m7单链RNA;

(4) 脂质与核酸混合物组：灌胃给脂质组合与HJT-sRNA-m7单链RNA的混合物。

灌胃给药3h后，用3mL TRIzol裂解小鼠全肺，提取总RNA，RT-qPCR检测HJT-sRNA-m7的丰度。

结论：如图82所示，与自由摄食组相比，9μL或18μL脂质组合(脂质PE(No38)&LPC(No37)&TG(No32)，4:2:3，V/V/V)显著促进小片段核酸进入肺组织(*表示P值小于0.05)。经过这种(非侵入式)灌胃施用，脂质组合(脂质PE(No38)&LPC(No37)&TG(No32)，4:2:3，V/V/V)可促进小片段核酸进入肺组织，可作为核酸药物的递送方式。

实施例4 脂质混合物介导双链核酸进入细胞的功能实验

1 No.8(PE):No.12(PC)(v:v=1:2)脂质混合物介导核酸进入细胞发挥功能

实验方法：蛋白免疫印迹法，具体参见上文“蛋白免疫印迹法检测蛋白表达水平”。

1) No.8(PE): No.12(PC)(v:v=1:2)介导抗纤维化HJT-sRNA-m7双链进入MRC-5细胞

如图83所示，通过水煮法和逆向蒸发法，No.8(PE):No.12(PC)(v:v=1:2)脂质混合物可以有效递送核酸进入细胞发挥作用。

未处理组：是指未经处理的MRC-5细胞，即空白对照组;

TGFβG1组：MRC-5细胞加入TGFβ1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

NC组：用脂质组合No.8(PE): No.12(PC)(v:v=1:2)与NC mimics双链混合物加入MRC5细胞中混匀，核酸的终浓度为200nM，24h后加入TGFβ1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，TGFβ1刺激72h后收样;

M7组：脂质组合No.8(PE): No.12(PC)(v:v=1:2)与HJT-sRNA-m7双链混合物加入MRC5细胞中，混匀，核酸的终浓度为200nM，24h后加入TGFβ1TGFb1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样。

2) No.8(PE):No.12(PC)(v:v=1:2)介导siRNA进入A549细胞

如图84和85所示，通过加热法，No.8(PE):No.12(PC)(v:v=1:2)脂质混合物可以有效递送核酸进入细胞发挥敲低蛋白表达作用。

图84中的未处理组：是指未经处理的细胞，即空白对照组；

si-NC：脂质组合No.8(PE)：No.12(PC)(v:v=1:2)与si-NC(广州锐博公司合成，序列未知)混合物加入A549细胞中，混匀，终浓度400nM；48h后收取细胞，RIPA强裂解液裂解细胞收取蛋白样品。

si-CPSF30：脂质组合No.8(PE)：No.12(PC)(v:v=1:2)与si-CPSF30混合物加入A549细胞中，混匀，终浓度400nM；48h后收取细胞，RIPA强裂解液裂解细胞收取蛋白样品。

si-LAMP1：脂质组合No.8(PE)：No.12(PC)(v:v=1:2)与si-LAMP1混合物加入A549细胞中，混匀，终浓度400nM；48h后收取细胞，RIPA强裂解液裂解细胞收取蛋白样品。

si-LAMP2：脂质组合No.8(PE)：No.12(PC)(v:v=1:2)与si-LAMP2混合物加入A549细胞中，混匀，终浓度400nM；48h后收取细胞，RIPA强裂解液裂解细胞收取蛋白样品。

图85中自由摄取(Free uptake)组：直接加入核酸溶液

Lipo 2000组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL Lipofectamine™2000转染试剂(Invitrogen，Thermo Fisher Scientific)和si-NFκB溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，核酸溶液终浓度为400nM；24h后加入polyI:C刺激(浓度1μg/mL1ug/mL)，6h后收取蛋白样品。

No.8(PE):No.12(PC)(1:2)：通过加热法，No.8(PE):No.12(PC)(1:2)与si-NFκB溶液混合，加入细胞中，核酸溶液终浓度为400nM；24h后加入polyI:C刺激(浓度1μg/mL)，6h后收取蛋白样品。

上述核酸的类型和序列：见表2。

3) No.8(PE):No.12(PC)(v:v=1:2)介导siRNA进入THP-1细胞

如图86所示，通过水煮法，No.8(PE):No.12(PC)(v:v=1:2)脂质混合物可以有效递送核酸进入细胞发挥作用。

naive组：是指未经处理的细胞，即空白对照组；

LPS组：未加入siRNA，只加入LPS刺激，终浓度1μg/mL，9h后收取RNA样品及细胞上清；

si-NC组：脂质组合No.8(PE)：No.12(PC)(v:v=1:2)与si-NC混合物加入THP-1细胞中，混匀，终浓度400nM；24h后加入LPS，终浓度1μg/mL，刺激

9h后收取细胞TRIzol裂解样品，收集上清做ELISA检测。

si-TNFα组：脂质组合No.8(PE)：No.12(PC)(v:v=1:2)与si-TNFα双链混合物加入THP-1A549细胞中，混匀，终浓度400nM，24h后加入LPS，终浓度1μg/mL，刺激9h后收取细胞TRIzol裂解样品，收集上清做ELISA检测。

2 No.8(PE):No.12(PC):No.2(DG)(v:v:v=2:4:3)脂质混合物介导核酸进入细胞发挥功能

1) No.8(PE):No.12(PC):No.2(DG)(v:v:v=2:4:3) 介导抗纤维化HJT-sRNA-m7进入MRC-5细胞

如图87所示，通过水煮法，No.8(PE):No.12(PC):No.2(DG)(v:v:v=2:4:3)可以有效递送抗纤维化HJT-sRNA-m7进入MRC-5MRC5细胞降低纤连蛋白蛋白表达。

2) No.8(PE):No.12(PC):No.2(DG)(v:v:v=2:4:3) 脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达

如图88所示，通过水煮法，在No.8(PE)、No.12(PC)(v:v=1:2)脂质混合物基础上加入No.2(DG)(v:v:v=2:4:3)脂质混合物可以有效递送核酸进入细胞发挥作用。

未处理组：未处理的A549细胞;

NCsiRNA组：No.8(PE):No.12(PC):No.2(DG)(v:v:v=2:4:3)脂质混合物与si-NC经过水煮法制备的siNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

XRN2 siRNA组：表示No.8(PE):No.12(PC):No.2(DG)(v:v:v=2:4:3)脂质混合物与XRN2 siRNA经过水煮法制备的混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM。

3 No.8(PE):No.12(PC):No.4(Cer)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物介导核酸进入细胞发挥功能

1) No.8(PE):No.12(PC):No.4(Cer)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物介导抗纤维化HJT-sRNA-m7进入MRC-5细胞 (水煮法)

如图89所示，通过水煮法，在No.8(PE):No.12(PC)(v:v:v=1:2)脂质混合物基础上加入No.4(Cer)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物可以有效递送抗纤维化HJT-sRNA-m7进入MRC-5MRC5细胞发挥降低纤维化蛋白表达的作用。

未处理组：未处理的细胞;

TGF-β1组：加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

NC组：用脂质组合No.38(PE):No.37(LPC):No.32(TG)(v:v:v=32:8:5)递送NC mimics 24h后加入TGF-β1TGFb1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

m7组：脂质组合No.8(PE):No.12(PC):No.4(Cer)(v:v:v=1:2:1)与HJT-sRNA-m7双链混合物加入MRC5细胞中，混匀，核酸的终浓度为400nM;24h后加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样。

2) No.8(PE):No.12(PC):No.4(Cer)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物介导NFκBsiRNA进入A549细胞抑制基因表达(水煮法)

如图90所示，在No.8(PE)、No.12(PC)(v:v=1:2)脂质混合物基础上加入No.4(Cer)(v:v:v=1:2:1)可以有效递送核酸进入细胞发挥作用。

未处理组：未处理的细胞;

siNC组：表示No.8(PE):No.12(PC):No.4(Cer)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物与si-NCsiNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

si-NFκB组：表示No.8(PE):No.12(PC):No.4(Cer)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物与NFκB siRNA混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM。

4 No.8(PE):No.12(PC):No.PC(11)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物介导核酸进入细胞发挥功能

1) No.8(PE):No.12(PC):No.PC(11)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达

如图91所示，在No.8(PE)、No.12(PC)(v:v=1:2)脂质混合物基础上加入No.11(PC)(v:v:v=1:2:1)可以有效递送核酸进入细胞发挥作用。

未处理组：未处理的细胞;

si-NC组：表示No.8(PE):No.12(PC):No.PC(11)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物与si-NCsiNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

si-XRN2组：表示No.8(PE):No.12(PC):No.PC(11)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物与XRN2 siRNA混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM。

5 No.8(PE):No.12(PC):No.LPC(37)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物介导核酸进入细胞发挥功能

1) No.8(PE):No.12(PC):No.LPC(37)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物介导XRN2 siRNA双链核酸进入A549细胞抑制基因表达

如图92所示，在No.8(PE)、No.12(PC)(v:v=1:2)脂质混合物基础上加入No.37(LPC)(v:v:v=1:2:1)可以有效递送核酸进入细胞发挥作用。

未处理组：未处理的细胞;

siNC组：表示No.8(PE):No.12(PC):No.LPC(37)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物与siNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

si-XRN2组：表示No.8(PE):No.12(PC):No.LPC(37)(v:v:v=1:2:1)脂质混合物与XRN2 siRNA混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

6 No.8(PE):No.12(PC):No.MG(34)(v:v:v=2:3:1)脂质混合物介导核酸进入细胞发挥功能

1) No.8(PE):No.12(PC):No.MG(34)(v:v:v=2:3:1) 脂质混合物介导CPSF4siRNA进入A549细胞抑制基因表达

未处理组：未处理的细胞;

si-NCsiNC组：表示No.8(PE):No.12(PC):No.MG(34)(v:v:v=2:3:1)脂质混合物与si-NCsiNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

si-CPSF4组：表示No.8(PE):No.12(PC):No.MG(34)(v:v:v=2:3:1)脂质混合物与CPSF4 siRNA混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM。

如图93所示，No.8(PE):No.12(PC):No.MG(34)(v:v:v=2:3:1)脂质混合物可以有效递送核酸进入细胞发挥作用。

7 No.38(PE):No.37(LPC):No.32(TG)(v:v:v=32:8:5)脂质混合物介导核酸进入细胞发挥功能

1) No.38(PE):No.37(LPC):No.32(TG)(v:v:v=32:8:5)脂质混合物介导抗纤维化HJT-sRNA-m7进入MRC-5细胞 (水煮法)

如图94所示，与对照相比，m7明细条带变浅。M7的作用并不足以使细胞恢复到未加刺激的水平。

未处理组：是指未经处理的细胞，即空白对照组;

TGFβ1组：加入TGFβ1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

NC组：用脂质组合No.38(PE):No.37(LPC):No.32(TG)(v:v:v=32:8:5)递送NC mimics 24h后加入TGFβ1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

m7 组： 脂质组合No.38(PE):No.37(LPC):No.32(TG)(v:v:v=32:8:5) 与HJT-sRNA-m7双链混合物加入MRC-5MRC5细胞中，混匀，核酸的终浓度为

400nM; 24h后加入TGFβ1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样。

2) No.38(PE):No.37(LPC):No.32(TG)(v:v:v=32:8:5)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达

如图95所示，No.38(PE):No.37(LPC):No.32(TG)(v:v:v=32:8:5)脂质混合物可以有效递送核酸进入细胞发挥作用。

siNC组：表示No.38(PE):No.37(LPC):No.32(TG)(v:v:v=32:8:5)脂质混合物与siNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

si-XRN2组：表示No.38(PE):No.37(LPC):No.32(TG)(v:v:v=32:8:5)脂质混合物与XRN2 siRNA混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

8 No.1(DG)、No.8(PE)、No.12(PC)、No.4(Cer)、No.31(So)、No.29(FA)、No.16(TG)(v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3)脂质混合物介导核酸进入细胞发挥功能

1) 如图96所示，No.1(DG)、No.8(PE)、No.12(PC)、No.4(Cer)、No.31(So)、No.29(FA)、No.16(TG)(v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3)介导抗纤维化HJT-sRNA-m7进入MRC-5细胞 (水煮法)

未处理组：是指未经处理的细胞，即空白对照组;

TGF-β1组：加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

NC组:用脂质组合No.1(DG)、No.8(PE)、No.12(PC)、No.4(Cer)、No.31(So)、No.29(FA)、No.16(TG)(v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3)递送NC mimics 24h后加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

M7组:脂质组合No.1(DG)、No.8(PE)、No.12(PC)、No.4(Cer)、No.31(So)、No.29(FA)、No.16(TG)(v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3)与HJT-sRNA-m7单链混合物加入MRC5细胞中，混匀，核酸的终浓度为400nM; 24h后加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

2) 如图97所示，No.1(DG)、No.8(PE)、No.12(PC)、No.4(Cer)、No.31(So)、No.29(FA)、No.16(TG)(v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达(水煮法)

No.1(DG)、No.8(PE)、No.12(PC)、No.4(Cer)、No.31(So)、No.29(FA)、No.16(TG)(v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3)脂质混合物可以有效递送核酸进入细胞发挥作用。

siNC组：表示No.1(DG)、No.8(PE)、No.12(PC)、No.4(Cer)、No.31(So)、No.29(FA)、No.16(TG)(v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3)脂质混合物与siNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

si- XRN2组: 表示No.1(DG)、No.8(PE)、No.12(PC)、No.4(Cer)、No.31(So)、No.29(FA)、No.16(TG)(v:v:v:v:v:v:v=2:1:2:2:3:1:3)脂质混合物与XRN2 siRNA混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

No.8(PE):No.12(PC):No.31(So):No.29(FA):No.4(Cer)(v:v:v:v:v=2:4:2:2: 5)脂质混合物介导核酸进入细胞发挥功能

1) 如图98所示，No.8(PE):No.12(PC):No.31(So):No.29(FA):No.4(Cer)(v:v:v:v:v=2:4:2:2:2.5) 介导具有抗纤维化效应的HJT 小RNA HJT-sRNA-3、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3、HJT-sRNA-m7进入MRC5细胞 (水煮法)

未处理组：是指未经处理的细胞，即空白对照组;

TGF-β1组：加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

NC组：用脂质组合No.8(PE):No.12(PC):No.31(So):No.29(FA):No.4(Cer)(v:v:v:v:v=2:4:2:2:5) 递送NC mimics 24h后加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

M7组：脂质组合No.8(PE):No.12(PC):No.31(So):No.29(FA):No.4(Cer)(v:v:v:v:v=2:4:2:2:5) 与HJT-sRNA-m7单链混合物加入MRC5细胞中，混匀，核酸的终浓度为400nM;24h后加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

2) 如图99所示，No.8(PE):No.12(PC):No.31(So):No.29(FA):No.4(Cer)(v:v:v:v:v=2:4:2:2: 5)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达(水煮法)

No.8(PE):No.12(PC):No.31(So):No.29(FA):No.4(Cer)(v:v:v:v:v=2:4:2:2: 5)脂质混合物可以有效递送核酸进入细胞发挥作用。

siNC组：表示No.8(PE):No.12(PC):No.31(So):No.29(FA):No.4(Cer)(v:v:v:v:v=2:4:2:2: 5)脂质混合物与siNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

si- XRN2组：表示

No.8(PE):No.12(PC):No.31(So):No.29(FA):No.4(Cer)(v:v:v:v:v=2:4:2:2: 5)脂质混合物与XRN2 siRNA混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

10 No.38(PE):No.37(LPC)(v:v =4:1)脂质混合物介导核酸进入细胞发挥功能

5 1) 如图100所示，No.38(PE):No.37(LPC)(v:v =4:1)介导具有抗纤维化效应的HJT 小RNA HJT-sRNA-3、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3、HJT-sRNA-m7进入MRC5细胞 (水煮法)

未处理组：是指未经处理的细胞，即空白对照组;

TGF-β1组：加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

10 NC组：用脂质组合No.38(PE):No.37(LPC)(v:v =4:1)递送NC mimics 24h后加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

M7 组： 脂质组合 No.38(PE):No.37(LPC)(v:v =4:1) 与 HJT-sRNA-3 、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3、HJT-sRNA-m7加入MRC5细胞中，混匀，核酸的终浓度为400nM; 24h后加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

15 2) 如图101所示，No.38(PE):No.37(LPC)(v:v =4:1)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达(水煮法)

No.38(PE):No.37(LPC)(v:v=4:1)脂质混合物可以有效递送核酸进入细胞发挥作用。

siNC组：表示No.38(PE):No.37(LPC)(v:v =4:1)脂质混合物与siNC混合物

20 加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

si- XRN2组：表示No.38(PE):No.37(LPC)(v:v =4:1)脂质混合物与XRN2 siRNA混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

11 No.38(PE):No.12(PC):No2(DG)(v:v:v =4:1:3)脂质混合物介导核酸进入细胞发挥功能

25 如图102所示，No.38(PE):No.12(PC):No2(DG)(v:v:v =4:1:3)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达。

将No.8(PE)替换为No.38(PE)，与No.12(PC)、No.2(DG)(v:v:v=4:1:3)混合的脂质混合物可以有效递送核酸进入细胞发挥作用。

siNC组：表示No.38(PE):No.12(PC):No2(DG)(v:v:v =4:1:3)脂质混合物与

30 siNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

si- XRN2组：表示No.38(PE):No.12(PC):No2(DG)(v:v:v =4:1:3)脂质混合物与XRN2 siRNA混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

12 No.38(PE):No.37(LPC):No.12(PC)(v:v:v=4:1:1)脂质混合物介导核酸进入细胞发挥功能

如图103所示，No.38(PE):No.37(LPC):No.12(PC)(v:v:v=4:1:1)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达(逆向蒸发法)

在No.38(PE):No.37(LPC)(v:v=4:1)脂质混合物基础上加入No.12(PC)(v:v:v=4:1:1)可以有效递送核酸进入细胞发挥作用抑制基因表达。

siNC组：表示No.38(PE):No.37(LPC):No.12(PC)(v:v:v=4:1:1)脂质混合物与siNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

si-RNA组：表示No.38(PE):No.37(LPC):No.12(PC)(v:v:v=4:1:1)脂质混合物与XRN2 siRNA、β-肌动蛋白siRNA、Ssu 72 siRNA或CPSF4 siRNA混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

13 No.4(Cer): No.12(PC):No.38(PE):No.37(LPC)(v:v:v:v=5:2:8:3)脂质混合物介导核酸进入细胞发挥功能

1)如图104所示，在No.38(PE)、No.37(LPC)、No.12(PC)脂质混合物基础上加入No.4(Cer)， No.4(Cer): No.12(PC):No.38(PE):No.37(LPC)(v:v:v:v=5:2:8:3)脂质混合物抗纤维化HJT- sRNA-3、HJT- sRNA-a2、HJT- sRNA-h3、HJT-sRNA-m7双链RNA进入MRC5细胞发挥功能，降低纤维化蛋白纤连蛋白表达水平 (水煮法)

未处理组：是指未经处理的细胞，即空白对照组;

TGF-β1组：加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

NC组：用脂质组合No.4(Cer): No.12(PC):No.38(PE):No.37(LPC)(v:v:v:v=5:2:8:3)递送NC mimics 24h后加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

HJT-3&a2&H3 组：表示No.4(Cer): No.12(PC):No.38(PE):No.37(LPC)(v:v:v:v =5:2:8:3)脂质混合物与HJT-sRNA-3、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3双链核酸混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

m7：表示No.4(Cer): No.12(PC):No.38(PE):No.37(LPC)(v:v:v:v =5:2:8:3)

脂质混合物与HJT-sRNA-m7混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

2) 如图105所示， No.4(Cer): No.12(PC):No.38(PE):No.37(LPC)(v:v:v:v =5:2:8:3)脂质混合物介导XRN2 siRNA，v:v:v:v =5:2:8:3)可以有效递送核酸进入细胞发挥作用抑制基因表达。

siNC 组： 表示 No.4(Cer): No.12(PC):No.38(PE):No.37(LPC)(v:v:v:v =5:2:8:3)脂质混合物与siNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

si- XRN2组：表示No.4(Cer): No.12(PC):No.38(PE):No.37(LPC)(v:v:v:v =5:2:8:3)脂质混合物与XRN2混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

14 No.38(PE):No.2(DG):No.31(So)(v:v:v=4:2:3)脂质混合物介导核酸进入细胞发挥功能

1) 如图106所示，No.38(PE):No.2(DG):No.31(So)(v:v:v=4:2:3)脂质混合物介导抗纤维化HJT- sRNA-3、HJT- sRNA-a2、HJT- sRNA-h3、HJT-sRNA-m7双链RNA进入MRC5细胞发挥功能，降低纤维化蛋白纤连蛋白表达水平 (水煮法)

未处理组：是指未经处理的细胞，即空白对照组;

TGF-β1组：加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

NC组：用脂质组合No.38(PE):No.2(DG):No.31(So)(v:v:v=4:2:3)递送NC mimics 24h后加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

HJT-3&a2&H3组：表示No.38(PE):No.37(LPC)(v:v =4:1)脂质混合物与HJT-sRNA-3、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

m7：表示No.38(PE):No.37(LPC)(v:v =4:1)脂质混合物与HJT-sRNA-m7混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

2) 如图107所示，No.38(PE):No.2(DG):No.31(So)(v:v:v=4:2:3)脂质混合物介导XRN2 siRNA进入A549细胞抑制基因表达(水煮法)

No.38(PE):No.2(DG):No.31(So)(v:v:v=4:2:3)脂质混合物可以有效递送核酸进入细胞发挥作用。

siNC组：表示No.38(PE):No.2(DG):No.31(So)(v:v:v=4:2:3)脂质混合物与siNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

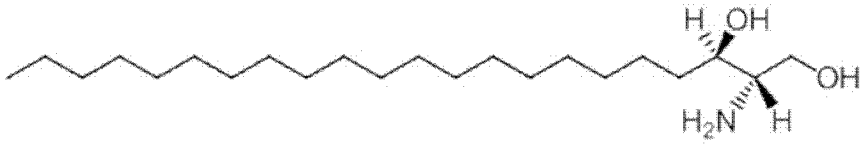
si- XRN2组：表示No.38(PE):No.2(DG):No.31(So)(v:v:v=4:2:3)脂质混合物

与XRN2混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

实施例5：脂质41及其组合物的效果验证

(一)脂质单体通过不同制备方法(逆向蒸发法及水煮法)递送核酸(双链RNA及单链RNA)进入细胞

脂质41. Sphinganine(d22:0)



1. 荧光实时定量PCR(real-time PCR)检测脂质递送核酸效率

如图108所示，脂质41通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送HJT-sRNA-m7双链RNA进入A549细胞。对于A549细胞，在水煮法的情况下，脂质41的递送效果是RNAimax的效果的约2倍，而在逆向蒸发法的情况下，脂质41的递送效果也明显高于RNAimax的效果。

如图109所示，脂质41通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送HJT-sRNA-m7双链RNA进入MRC5细胞。对于MRC5细胞，在水煮法的情况下，脂质41递送双链RNA进入MRC5细胞，而在逆向蒸发法的情况下，脂质41的递送效果明显高于RNAimax的效果。

如图110所示，脂质41通过水煮法递送HJT-sRNA-m7单链RNA进入A549及MRC5细胞。

2. 数字PCR(ddPCR)技术检测脂质递送核酸效率

2.1 实验材料：A549细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心，TRIzol裂解液购自Sigma公司，High capacity cRNA Reverse Transcription Kit逆转录试剂盒购自美国ABI公司，数字PCR相关试剂购自Bio-rad公司。

2.3 实验方法：按照前述方法用TRIzol裂解液收集并提取细胞总RNA，使用High capacity cRNA Reverse Transcription Kit逆转录为cDNA，将不同组cDNA进行数字PCR反应。具体操作步骤参考QX200 Droplet Reader and QuantaSoft Software说明书，利用QuantaSoft软件对结果进行分析。其中分组情况：(1)未处理组：不做任何处理的A549细胞；(2)自由摄取组：直接将HJT-sRNA-m7 dsRNA与细胞共同孵育6h；(3)RNAimax组：用RNAimax将

HJT-sRNA-m7 dsRNA转染进入A549细胞，6h后收样检测；(4)No.41组：脂质41通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送双链RNA进入A549细胞，6h后收样检测。

实验结果与分析：如图111所示，在水煮法或逆向蒸发法中，No.41脂质均可以有效递送HJT-sRNA-m7 dsRNA进入A549细胞，水煮法的效果优于逆向蒸发法。

3. 流式细胞技术检测脂质递送核酸效率

实验材料：A549细胞(购自中国医学科学院细胞中心)，FAM-sRNA(购自锐博生物科技有限公司)，脂质41，Accuri® C6仪器(购自美国BD公司)

实验方法：将PGY-sRNA-6-FAM溶解于100ul水中，并与4ul脂质混合，用水煮法制备。之后将混合物丢入A549细胞中，共孵育6h后，收样检测，先用PBS清洗三遍后，用胰酶消化三分钟后，移去胰酶，再用PBS清洗后吹下来。用Accuri® C6仪器测定。

如图112所示，实验结果：脂质41递送PGY-sRNA-6单链RNA效率是94.1%，比阳性对照RNAiMAX的69.4%相比，递送效率更高。同时脂质41递送PGY-sRNA-6双链RNA效率是96.7%，比阳性对照RNAiMAXd的94.9%相比，递送效率也更高，脂质41可高效递送单链及双链核酸进入A549细胞。

4. 共聚焦荧光显微镜观察脂质递送核酸在细胞中的定位

实验材料：A549细胞(购自中国医学科学院细胞中心)，PGY-sRNA-6-Cy3(购自锐博生物科技有限公司)，脂质41，Zeiss LSM780(购自德国Zeiss公司)，Alexa Fluor® 488 phalloidin(购自美国invitrogen)，DAPI(购自美国invitrogen)，多聚甲醛(购自美国sigma公司)

实验方法：将PGY-sRNA-6-Cy3溶解于100ul水中，并与4ul脂质混合，用水煮法制备。之后将混合物丢入A549细胞中，共孵育6h后，PBS清洗三遍后，4%的多聚甲醛固定，PBS清洗三遍后，Alexa Fluor® 488 phalloidin染色30min，PBS清洗三遍后，Dapi染色5min，PBS清洗，后封片。

如图113所示，实验结果：共聚焦显微镜观察下，能明显观察到红色PGY-sRNA-6-Cy3的进入，脂质41可有效递送双链核酸进入A549细胞。

5. Western Blotting实验检测脂质递送核酸的效率

如图114，脂质单体No.41介导sRNAi进入MRC5A549细胞发挥敲低蛋白

表达作用(逆向蒸发法)。在蛋白质水平上，脂质单体No.41介导蛋白敲低效果显著高于RNAimax介导的HJT-sRNA-m7抑制效果。

未处理：未处理的MRC5A549细胞

siNC:表示脂质单体No.41与siNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

siRNA:表示脂质单体No.41与LAMP2、XPN2、Ssu72、CPSF4或β肌动蛋白 siRNA混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

自由摄取组：直接加入测试物

RNAimax:分别用100ul opti-MEM培养基稀释2ul RNAiMAX转染试剂和核酸溶液，二者混匀后放置15min，加入细胞中，混匀，核酸的终浓度为400nM。

So(41) (逆向蒸发法)：将脂质41与核酸混合物加入细胞中，混匀，核酸的终浓度为400nM。

如图115，脂质单体No.41介导抗纤维化HJT-sRNA-m7双链进入MRC5细胞(逆向蒸发法)。在蛋白质水平上，脂质单体No.41介导的HJT-sRNA-m7抑制效果高于RNAimax介导的HJT-sRNA-m7抑制效果。

TGFβ1组：加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

NC组：用脂质单体No.41递送NC mimics 24h后加入TGF-β1TGFb1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

HJT-3&a2&H3组：表示脂质单体No.41与HJT-sRNA-3、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

m7：表示脂质单体No.41与HJT-sRNA-m7混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

6.脂质41体内实验结果汇总

【实验方法】6-8周龄小鼠，22-24g，饲养于中国医学科学院基础医学研究所动物中心SPF级动物房，小鼠灌胃前禁食12h，将小鼠随机分为3组，分别为：(1)对照组，灌胃400ul DEPC处理的水；(2)自由摄取组，灌胃小RNA(PGY-sRNA-26与PGY-sRNA-32及PGY-sRNA-23，每条小RNA 1nmol/只，溶于400ulDEPC处理的水；(3)脂质41组：灌胃小RNA(PGY-sRNA-26与PGY-sRNA-32)和脂质41用加热法制备的混合物，每条小RNA 1nmol/只，脂

质4110ul/只，溶于400ul DEPC处理的水。灌胃6h后收取各组织器官样品。所有的小RNA为3p末端2-O-甲基化修饰的单链RNA。

【实验结果】

如图140所示，脂质41可以促进小RNA进入血液，保护其在血液中不被降解

如图141所示，脂质41可以促进小RNA进入胃部细胞，保护其在胃中不被降解

如图142所示，脂质41可以促进小RNA进入小肠细胞，保护其在小肠中不被降解

如图143所示，脂质41可以促进小RNA进入肝脏，保护其在肝脏中不被降解

7. 包含脂质41的脂质组合在核酸递送中效果

(1)脂质组合1(No.8+No.41=6:1)与脂质组合2(No.38+No.41=6:1)在核酸递送中的作用

如图116所示，脂质组合1(No.8+No.41=6:1)与脂质组合2(No.38+No.41=6:1)介导抗纤维化HJT-3&a2&H3，HJT-sRNA-m7进入MRC5细胞(加热法)，在蛋白质水平上介导的HJT-sRNA-m7抑制效果显著。

TGF：加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

NC组：表示用脂质单体No.41递送NC mimics 24h后加入TGF-β1TGFb1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

HJT-3&a2&H3组：表示脂质混合物与HJT-sRNA-3、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

HJT-m7：表示脂质混合物与HJT-sRNA-m7混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

(2)脂质组合3(No.39+No.41=6:1)与脂质组合4(No.40+No.41=6:1)在核酸递送中的作用

如图117所示，脂质组合3(No.39+No.41=6:1)与脂质组合4(No.40+No.41=6:1)介导抗纤维化HJT-3&a2&H3，HJT-sRNA-m7进入MRC5细胞(加热法)，在蛋白质水平上介导的HJT-sRNA-m7抑制效果显著。

TGF：加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

NC组: 表示表示用脂质混合物递送NC mimics 24h后加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

HJT-3&a2&H3组：表示脂质混合物与HJT-sRNA-3、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

HJT-m7：表示脂质混合物与HJT-sRNA-m7混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

(3)脂质组合5(38+12+41+29=1:2:1:1)在核酸递送中的作用

如图118所示，脂质组合5(38+12+41+29=1:2:1:1)介导抗纤维化HJT-3&a2&H3，HJT-sRNA-m7进入MRC5细胞(加热法)，在蛋白质水平上介导的HJT-sRNA-m7抑制效果显著。

TGF：加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

NC组: 表示表示用脂质混合物递送NC mimics 24h后加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

HJT-3&a2&H3组：表示脂质混合物与HJT-sRNA-3、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

HJT-m7：表示脂质混合物与HJT-sRNA-m7混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

(4)脂质组合6(40(PE)+12(PC)+41(So)=2:4:3)在核酸递送中的作用

如图119所示，脂质组合6(40(PE)+12(PC)+41(So)=2:4:3)介导抗纤维化HJT-3&a2&H3，HJT-sRNA-m7进入MRC5细胞(加热法及逆向蒸发法)，在蛋白质水平上介导的HJT-3&a2&H3，HJT-sRNA-m7抑制效果显著。

TGF：加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

3’-NC组：表示表示用脂质混合物递送NC mimics 24h后加入TGF-β1TGFb1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

3’-3&a2&H3组：表示脂质混合物与HJT-sRNA-3、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

3’-m7：表示脂质混合物与HJT-sRNA-m7混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

右图：通过逆向蒸发法制备脂质-RNA混合物，脂质组合6(40(PE)+12(PC)+41(So)=2:4:3)可有效递送XRN2、Ssu72、CPSF4siRNA进入

A549细胞，在蛋白水平上显著降低表达水平。

siNC: 表示脂质混合物与siNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

siRNA: 表示脂质混合物与XRN2、Ssu72、CPSF4siRNA混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

(5)脂质组合7(12(PC)+41(So)=1:6)和脂质组合8(12(PC)+41(So)=1:1)在核酸递送中的作用

如图120所示，采用逆向蒸发法，脂质组合7(12(PC)+41(So)=1:6)和脂质组合8(12(PC)+41(So)=1:1)可有效递送Ssu72、CPSF4siRNA进入A549细胞(逆向蒸发法)，在蛋白水平上显著降低表达水平。

siNC: 表示脂质混合物与siNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

siRNA: 表示脂质混合物与XRN2、Ssu72、CPSF4siRNA混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

(6) 脂质组合9(12(PC)+41(So)=6:1)和脂质组合10(40(PE)+12(PC)+41(So)=2:2:2)在核酸递送中的作用

如图121所示，采用逆向蒸发法，脂质组合9(12(PC)+41(So)=6:1)和脂质组合10(40(PE)+12(PC)+41(So)=2:2:2)可有效递送XRN2、Ssu72、CPSF4siRNA进入A549细胞，在蛋白水平上显著降低表达水平。

siNC: 表示脂质混合物与siNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

siRNA: 表示脂质混合物与XRN2、Ssu72、CPSF4siRNA混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

(7)脂质组合11(4(Cer)+12(PC)+41(So)=1:1:1)在核酸递送中的作用

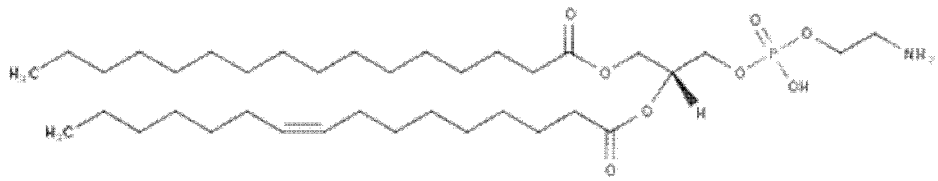
如图122所示，采用逆向蒸发法，脂质组合11(4(Cer)+12(PC)+41(So)=1:1:1)可有效递送Ssu72siRNA进入A549细胞，在蛋白水平上显著降低表达水平。

siNC: 表示脂质混合物与siNC混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM;

siSsu72: 表示脂质混合物与Ssu72siRNA混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM。

实施例6：脂质38及其组合物的效果验证

脂质38. PE(16:0/16:1)



1. 荧光实时定量PCR(real-time PCR)检测脂质递送核酸效率

(1)脂质38通过水煮法递送双链RNA进入A549细胞及MRC5细胞

如图123所示，脂质38通过加热法递送双链RNA进入A549细胞及MRC5细胞。对于MRC5细胞，在加热法的情况下，脂质38对双链RNA的递送效果是RNAimax的效果的约2倍。

（1）未处理组：不做任何处理的A549细胞;

（2）自由摄取组：直接将HJT-sRNA-m7 dsRNA与细胞共同孵育12h；核酸终浓度100nM;

RNAimax组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

4) 脂质与核酸处理组：将2.5μL脂质单体No.38与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法或逆向蒸发法制备混合物，加入A549细胞中，RNA的终浓度为100nM。12h后收样检测进入量。(2)脂质38通过水煮法递送HJT-sRNA-m7单链RNA进入A549细胞及MRC5细胞

如图124所示脂质38通过加热法递送HJT-sRNA-m7单链RNA进入A549细胞及MRC5细胞，递送效率远远高于RNAimax的效果。

（1）未处理组：不做任何处理的A549细胞;

（2）自由摄取组：直接将HJT-sRNA-m7单链核酸溶液与细胞共同孵育12h，核酸终浓度100nM;

（3）RNAimax组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM;

（4）脂质与核酸处理组：将2.5μL脂质单体No.64与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法或逆向蒸发法制备混合物，加入A549细胞中，RNA的终浓度为100nM。12h后收样检测进入量。

2. 数字PCR(ddPCR)技术检测脂质递送核酸效率

2.1 实验材料： A549细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心，TRIzol裂解液购自Sigma公司，High capacity cRNA Reverse Transcription Kit逆转录试剂盒购自美国ABI公司，数字PCR相关试剂购自Bio-rad公司。

2.2 实验方法：按照前述方法用TRIzol裂解液收集并提取细胞总RNA，使用High capacity cRNA Reverse Transcription Kit逆转录为cDNA，将不同组cDNA进行数字PCR反应。具体操作步骤参考QX200 Droplet Reader and QuantaSoft Software说明书，利用QuantaSoft软件对结果进行分析

(1)未处理组：不做任何处理的A549细胞;

(2)自由摄取组：直接将HJT-sRNA-m7 dsRNA与细胞共同孵育6h;

(3)RNAimax组：用RNAimax将HJT-sRNA-m7 dsRNA转染进入A549细胞，6h后收样检测;

(4)No.38组：脂质38通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送双链RNA进入A549细胞，6h后收样检测。

实验结果与分析：如图125所示，在水煮法或逆向蒸发法中，No.38脂质均可以有效递送HJT-sRNA-m7 dsRNA进入A549细胞。

3. 流式细胞技术检测脂质递送核酸效率

实验材料：A549 cells(购自中国医学科学院细胞中心)，FAM-sRNA(购自锐博生物科技有限公司)，脂质38，Accuri® C6仪器(购自美国BD公司)

实验方法：将PGY-sRNA-6-FAM溶解于100ul水中，并与4ul脂质混合，用水煮法制备脂质-sRNA混合物，加入A549细胞中，混匀，共孵育6h后收样检测。PBS清洗三遍后，用胰酶消化细胞为单个细胞，PBS重悬，利用Accuri® C6仪器检测相对进入量。

如图126所示，实验结果：脂质38递送单链RNA效率是72.5%，接近阳性对照RNAiMAX递送效率。

4. 共聚焦荧光显微镜观察脂质递送核酸在细胞中的定位

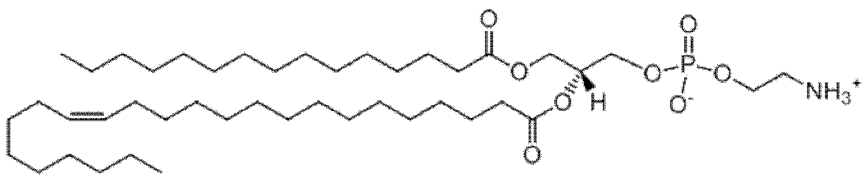
实验材料：A549 cells(购自中国医学科学院细胞中心)，PGY-sRNA-6-Cy3(购自锐博生物科技有限公司)，脂质38， Zeiss LSM780(购自德国Zeiss公司)，Alexa Fluor® 488 phalloidin(购自美国invitrogen)，DAPI(购自美国invitrogen)，多聚甲醛(购自美国sigma公司)

实验方法：将PGY-sRNA-6-溶解于100ul水中，并与4ul脂质混合，用水煮法制备。之后将混合物丢入A549细胞中，共孵育6h后，PBS清洗三遍后，4%的多聚甲醛固定，PBS清洗三遍后，Alexa Fluor® 488 phalloidin染色30min，PBS清洗三遍后，Dapi染色5min，PBS清洗，后封片。

如图127所示，实验结果：共聚焦显微镜观察下，能明显观察到红色PGY-sRNA-6-Cy3的进入，水煮法制备No.38脂质-sRNA混合物均可以有效递送双链进入A549细胞。

实施例7：脂质64及其组合物的效果验证

脂质64. PE(15:0/24:1(15Z))



1. 荧光实时定量PCR(real-time PCR)检测脂质递送核酸效率

(1)脂质64通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送HJT-sRNA-m7双链RNA进入A549细胞

如图128所示，脂质64通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送HJT-sRNA-m7双链RNA进入A549细胞。对于A549细胞，在水煮法的情况下，脂质64的递送效果是RNAimax的效果的约3倍。

（3）未处理组：不做任何处理的A549细胞;

（4）自由摄取组：直接将HJT-sRNA-m7 dsRNA与细胞共同孵育12h；核酸终浓度100nM;

RNAimax组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试

剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

4) 脂质与核酸处理组：将2.5μL脂质单体No.64与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法或逆向蒸发法制备混合物，加入A549细胞中，RNA的终浓度为100nM。12h后收样检测进入量。

2. 流式细胞技术检测脂质递送核酸效率

实验材料：A549 cells(购自中国医学科学院细胞中心)，FAM-sRNA(购自锐博生物科技有限公司)，脂质64，Accuri® C6仪器(购自美国BD公司)

实验方法：将FAM-sRNA溶解于100ul水中，并与4ul脂质混合，用水煮法制备。脂质-sRNA混合物，加入A549细胞中，混匀，共孵育6h后收样检测。PBS清洗三遍后，用胰酶消化细胞为单个细胞，PBS重悬，利用Accuri® C6仪器检测相对进入量。

如图129所示，实验结果：脂质64递送PGY-sRNA-6单链RNA效率可达到阳性对照RNAiMAX的约1/2。

3. 共聚焦荧光显微镜观察脂质递送核酸在细胞中的定位

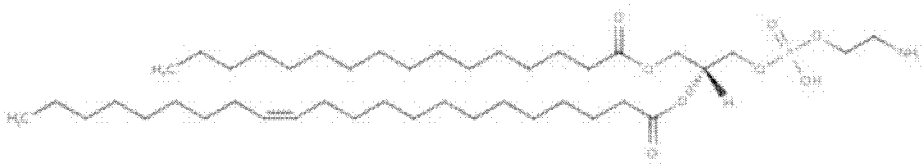
实验材料：A549 cells(购自中国医学科学院细胞中心)，PGY-sRNA-6-Cy3(购自锐博生物科技有限公司)，脂质64， Zeiss LSM780(购自德国Zeiss公司)，Alexa Fluor® 488 phalloidin(购自美国invitrogen)，DAPI(购自美国invitrogen)，多聚甲醛(购自美国sigma公司)

实验方法：将PGY-sRNA-6-溶解于100ul水中，并与4ul脂质混合，用水煮法制备。之后将混合物丢入A549细胞中，共孵育6h后，PBS清洗三遍后，4%的多聚甲醛固定，PBS清洗三遍后，Alexa Fluor® 488 phalloidin染色30min，PBS清洗三遍后，Dapi染色5min，PBS清洗，后封片。

如图130所示，实验结果：共聚焦显微镜观察下，能明显观察到红色PGY-sRNA-6-Cy3的进入。脂质64递送单链RNA进入A549细胞。

实施例8：脂质40及其组合物的效果验证

脂质40. PE(16:0-22:1)



1. 荧光实时定量PCR(real-time PCR)检测脂质递送核酸效率

脂质40通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送双链RNA进入A549细胞

如图131所示，脂质40通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送双链RNA进入A549细胞。对于A549细胞，在逆向蒸发法的情况下，脂质40的递送效果是RNAimax的效果的约1/2。

Naïve组：不做任何处理的A549细胞;

自由摄取组：直接将HJT-sRNA-m7 dsRNA与细胞共同孵育12h；核酸终浓度100nM;

RNAimax组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

4) 脂质与核酸处理组：将2.5μL脂质单体No.40与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法或逆向蒸发法制备混合物，加入A549细胞中，RNA的终浓度为100nM。12h后收样检测进入量。

2. 数字PCR(ddPCR)技术检测脂质递送核酸效率

2.1 实验材料： A549细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心，TRIzol裂解液购自Sigma公司，TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription KitHigh逆转录试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司，数字PCR相关试剂购自Bio-rad公司。

2.3 实验方法：按照前述方法用TRIzol裂解液收集并提取细胞总RNA，使用TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription KitHigh逆转录为cDNA，将不同组cDNA进行数字PCR反应。具体操作步骤参考QX200 Droplet Reader and QuantaSoft Software说明书，利用QuantaSoft软件对结果进行分析。

(1)Naïve组：不做任何处理的A549细胞;

(2)自由摄取组：直接将HJT-sRNA-m7 dsRNA与细胞共同孵育6h;

(3)RNAimax组：用RNAimax将HJT-sRNA-m7 dsRNA转染进入A549细胞，6h后收样检测;

(4)No.40组：脂质40通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送双链RNA进入A549细胞，6h后收样检测。

(5)实验结果与分析：如图132所示，在水煮法或逆向蒸发法中，No.40脂质均可以有效递送HJT-sRNA-m7 dsRNA进入A549细胞。

3.共聚焦荧光显微镜观察脂质递送核酸在细胞中的定位

实验材料：A549 cells(购自中国医学科学院细胞中心)，PGY-sRNA-6-Cy3(购自锐博生物科技有限公司)，脂质40， Zeiss LSM780(购自德国Zeiss公司)，Alexa Fluor® 488 phalloidin(购自美国invitrogen)，DAPI(购自美国invitrogen)，多聚甲醛(购自美国sigma公司)

实验方法：将PGY-sRNA-6-Cy3溶解于100ul水中，并与4ul脂质混合，用水煮法制备。之后将混合物丢入A549细胞中，共孵育6h后，PBS清洗三遍后，4%的多聚甲醛固定，PBS清洗三遍后，Alexa Fluor® 488 phalloidin染色30min，PBS清洗三遍后，Dapi染色5min，PBS清洗，后封片观察。

如图133所示，实验结果：共聚焦显微镜观察下，能明显观察到红色PGY-sRNA-6-Cy3的进入，No.40脂质均可以有效递送HJT-sRNA-m7 dsRNA进入A549细胞。

4. Western Blotting实验检测脂质递送核酸的效率

如图134所示，磷脂酰乙醇胺类脂质单体脂质40介导抗纤维化双链RNA HJT-sRNA-m7进入MRC5细胞，下调纤连蛋白蛋白表达水平

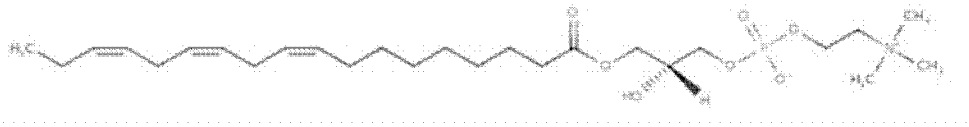
TGF：加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

3'-NC组：表示表示用脂质混合物递送NC mimics 24h后加入TGF-β1蛋白(终浓度3ng/mL)刺激，72h后收样;

3'-m7：表示脂质混合物与HJT-sRNA-m7双链核酸溶液混合物加入细胞，混匀，核酸终浓度为：400nM。

实施例8：脂质37的效果验证

lipid 37.LPC(18:3)



1. 荧光实时定量PCR(real-time PCR)检测脂质递送核酸效率

脂质37通过水煮法递送单链RNA进入A549细胞及MRC5细胞

如图135所示，通过水煮法递送单链RNA进入A549细胞及MRC5细胞。

未处理组：不做任何处理的A549细胞;

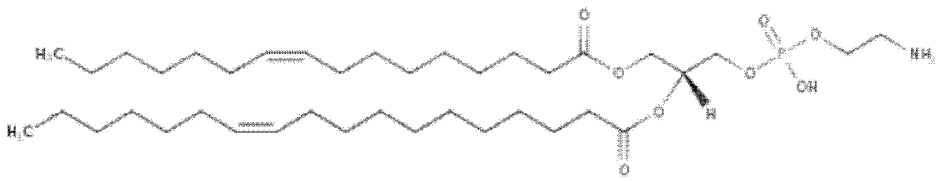
自由摄取组：直接将HJT-sRNA-m7 dsRNA与细胞共同孵育3h；核酸终浓度100nM;

RNAimax组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM;

脂质与核酸处理组：将2.5μL脂质单体No.39与HJT-sRNA-m7的单链核酸溶液经水煮法制备混合物，加入细胞中，RNA的终浓度为100nM。3h后收样检测进入量。

实施例9：脂质39的效果验证

脂质39. PE(16:1-18:1)



1. 荧光实时定量PCR(real-time PCR)检测脂质递送核酸效率

如图136所示，脂质39通过不同制备方法(水煮或逆向蒸发法)递送双链RNA进入A549细胞

（5）Naïve组：不做任何处理的A549细胞;

（6）自由摄取组：直接将HJT-sRNA-m7 dsRNA与细胞共同孵育6h；核酸终浓度100nM;

RNAimax组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

4) 脂质与核酸处理组：将2.5μL脂质单体No.39与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法和逆向蒸发法两种方法制备混合物，加入细胞中，RNA的终浓度为100nM。12h后收样检测进入量。

2. 数字PCR(ddPCR)技术检测脂质递送核酸效率

2.1 实验材料： A549细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心，TRIzol裂解液购自Sigma公司，High capacity cRNA Reverse Transcription Kit逆转录试剂盒购自美国ABI公司，数字PCR相关试剂购自Bio-rad公司。

2.3 实验方法：按照前述方法用TRIzol裂解液收集并提取细胞总RNA，使用High capacity cRNA Reverse Transcription Kit逆转录为cDNA，将不同组cDNA进行数字PCR反应。具体操作步骤参考QX200 Droplet Reader and QuantaSoft Software说明书，利用QuantaSoft软件对结果进行分析。

(1)未处理组：不做任何处理的A549细胞;

(2)自由摄取组：直接将HJT-sRNA-m7 dsRNA与细胞共同孵育6h; 12h;

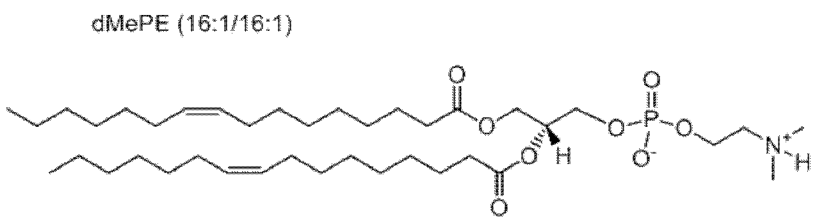
(3)RNAimax组：用RNAimax将HJT-sRNA-m7 dsRNA转染进入A549细胞，6h12h后收样检测;

(4)No.39组：脂质39通过逆向蒸发法递送双链RNA进入A549细胞，6h12h后收样检测。

如图137所示，通过逆向蒸发法，No.39脂质可以有效递送HJT-sRNA-m7双链核酸进入A549细胞。

实施例10：脂质60和62的效果验证

脂质60. dMePE(16:1/16:1)



1. 荧光实时定量PCR(real-time PCR)检测脂质递送核酸效率

如图138所示，脂质60通过不同制备方法(水煮法或逆向蒸发法)递送双链RNA进入A549细胞

未处理组：不做任何处理的A549细胞;

自由摄取组：直接将HJT-sRNA-m7 dsRNA与细胞共同孵育6h；核酸终浓度100nM;

RNAimax组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

4) 脂质与核酸处理组：将2.5μL脂质单体No.60与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法和逆向蒸发法两种方法制备混合物，加入细胞中，RNA的终浓度为100nM。12h后收样检测。

脂质62. dMePE(16:1/18:1)

1. 荧光实时定量PCR(real-time PCR)检测脂质递送核酸效率

如图139所示，脂质62通过不同制备方法(水煮或逆向蒸发法)递送双链RNA进入A549细胞

（1）未处理组：不做任何处理的A549细胞;

（2）自由摄取组：直接将HJT-sRNA-m7 dsRNA与细胞共同孵育6h；核酸终浓度100nM;

（3）RNAimax组：分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7双链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7双链的终浓度为100nM;

（4）脂质与核酸处理组：将2.5μL脂质单体No.62与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经水煮法和逆向蒸发法两种方法制备混合物，加入细胞中，RNA的终浓度为100nM。12h后收样检测。

脂质核酸复合物的体内递送实验

1.实验动物：C57小鼠，雄性，约6周龄。

2.脂质混合物制备：按照每只小鼠10ul脂质-1nmol sRNA剂量进行制备，

sRNA各1nmol用500ul DEPC水于玻璃管中溶解，加入10ul相应脂质，吹打使充分混匀，90℃水浴加热15min后自然冷却，灌胃。

3.sRNA: PGY-sRNA-26, PGY-sRNA-32

4.实验分组:

1)未处理组：灌胃500ul生理盐水;

2)RNAimax处理组：每只小鼠按照10ul RNAimax-1nmol sRNA混匀，灌胃。该组作为阳性对照组。RNAimax购自Invitrogen。

3)自由摄取组：直接灌胃sRNA溶液(1nmol/只，500ul)，该组作为阴性对照组;

4)脂质核酸混合物处理组：将步骤2中制备的脂质-sRNA混合物进行灌胃。

5.相对进入量检测:

1)组织取样提取RNA：小鼠灌胃6h后，眼球取血500ul，加入1.5ml Trizol Reagent LS充分混匀裂解，组织样品取部分加入3ml Trizol Reagent (购自Invitrogen)匀浆使充分裂解，组织取样：肝/胃/小肠。

2)将sRNA逆转录为cDNA：通过逆转录试剂盒(High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits，Applied Biosystems，cat. no. 4368813)，将总RNA逆转录为cDNA，逆转录体系如下：模板RNA (150ng/μL) 10μL，10X RT缓冲液2.0μL，25X dNTP Mix (100 mM) 0.8μL，随机引物2.0μL，MultiScribe™逆转录酶1.0μL，RNA酶抑制剂1.0μL，无核酸酶H_2O 3.2μL，瞬时离心后，放入PCR仪反应，反应条件如下：(1)25℃，10 min；(2)37°C，120 min；(3)85°C，5 min；(4)4°C，终止反应。反应结束后加入20μL无RNA酶ddH_2O，补足终体积至40μL。

3)定量PCR扩增反应：qPCR反应体系总体积10μl，包括：5μL 2×SYBR Green Master Mix，0.5μl 正向引物(10μM)，0.5μl反向引物(10μM), 1μl 逆转录得到的cDNA, 3μl 无RNA酶dH2O。使用LightCycler 480荧光定量PCR仪，PCR反应条件是：95°C，持续5min预变性，开始进入PCR扩增循环：(1)95°C，10s；(2)55°C，10s；(3)72°C，20s；总共进行40个循环；最后40°C持续10s降温。扩增反应正向引物和反向引物均由北京擎科新业生物技术有限公司设计和合成 (U6 F引物：GCGCGTCGTGAAGCGTTC，U6 R引物：:

GTGCAGGGTCCGAGGT)。

3)利用2-ΔCt法计算相对表达量。

实施例11-1：脂质单体No.41递送单链核酸进入体内

1.实验动物：C57小鼠，雄性，约6周龄。

1) 未处理组：灌胃500ul生理盐水;

2)RNAimax处理组：每只小鼠按照10ul RNAimax-1nmol sRNA混匀，灌胃。该组作为阳性对照组。RNAimax购自Invitrogen。

3) 自由摄取(free uptake)组：直接加入sRNA单链混合溶液(各1nmol);

4) POPC与核酸处理组：将10μL POPC与sRNA单链混合溶液(1nmol)经加热法处理后的混合物以灌胃方式给小鼠

5) 脂质单体与核酸处理组：将10μL脂质单体(No41)与sRNA单链混合溶液(PGY-sRNA-23，PGY-sRNA-26和PGY-sRNA-32) (各1nmol)经加热法处理后的混合物以灌胃方式给小鼠。

2.灌胃12h后，眼球取血，同时取各组织(肝脏/胃/小肠)，TRIzol充分裂解后提取RNA检测进入量。

结论:

如图140所示，PE单体(No.41)可以有效口服递送sRNA单链核酸进入小鼠血液保护sRNA不受降解，且递送效果优于POPC与Lipofectamine RNAimax。

如图141所示，PE单体(No.41)可以有效口服递送sRNA单链核酸进入小鼠胃部，保护sRNA不受降解。

如图142所示，PE单体(No.41)可以有效口服递送sRNA单链核酸进入小鼠小肠，保护sRNA不受降解。

如图143所示，PE单体(No.41)可以有效口服递送sRNA单链核酸进入小鼠肝脏，保护sRNA不受降解。

实施例11-2：脂质单体No.38递送单链核酸进入体内

1.实验动物：C57小鼠，雄性，约6周龄。

1) 未处理组：灌胃500ul生理盐水;

2)RNAimax处理组：每只小鼠按照10ul RNAimax-1nmol sRNA混匀，灌胃。该组作为阳性对照组。RNAimax购自Invitrogen。

3) 自由摄取(free uptake)组：直接加入sRNA单链混合溶液(各1nmol);

4) POPC与核酸处理组：将10μL POPC与sRNA单链PGY-sRNA-32混合溶液(1nmol)经加热法处理后的混合物以灌胃方式给小鼠。

5) 脂质单体与核酸处理组：将10μL脂质单体(No38)与sRNA单链混合溶液(PGY-sRNA-32) (1nmol)经加热法处理后的混合物以灌胃方式给小鼠。

2.灌胃12h后，眼球取血，TRIzol法裂解提取RNA检测进入量。

结论：如图144所示，PE单体(No.38)可以有效口服递送sRNA单链核酸进入小鼠血液，且递送效果优于POPC与Lipofectamine RNAimax。

实施例11-3：脂质单体No.40递送单链核酸进入体内

1.实验动物：C57小鼠，雄性，约6周龄。

1) 未处理组：灌胃500ul生理盐水;

2)RNAimax处理组：每只小鼠按照10ul RNAimax-1nmol sRNA混匀，灌胃。该组作为阳性对照组。RNAimax购自Invitrogen。

3) 自由摄取(free uptake)组：直接加入sRNA单链混合溶液(各1nmol);

4) POPC与核酸处理组：将10μL POPC与sRNA单链混合溶液(各1nmol)经加热法处理后的混合物以灌胃方式给小鼠。

5) 脂质单体与核酸处理组：将10μL脂质单体(No40)与sRNA单链混合溶液(PGY-sRNA-26和PGY-sRNA-32) (各1nmol)经加热法处理后的混合物以灌胃方式给小鼠。

2.灌胃12h后，眼球取血，TRIzol法裂解提取RNA检测进入量。

结论：如图145所示，PE单体(No.40)可以有效口服递送sRNA单链核酸进入小鼠血液，且递送效果优于POPC与Lipofectamine RNAimax。

实施例11-4：脂质单体No.64递送单链核酸进入体内

1.实验动物：C57小鼠，雄性，约6周龄。

1) 未处理组：灌胃500ul生理盐水;

2)RNAimax处理组：每只小鼠按照10ul RNAimax-1nmol sRNA混匀，灌胃。该组作为阳性对照组。RNAimax购自Invitrogen。

3) 自由摄取(free uptake)组：直接加入sRNA单链混合溶液(各1nmol);

4) POPC与核酸处理组：将10μLPOPC与sRNA单链混合溶液(各1nmol)经

加热法处理后的混合物以灌胃方式给小鼠。

5) 脂质单体与核酸处理组：将10μL脂质单体(No64)与sRNA单链混合溶液(PGY-sRNA-32) (1nmol)经加热法处理后的混合物以灌胃方式给小鼠。

2.灌胃12h后，眼球取血，TRIzol法裂解提取RNA检测进入量。

结论：如图146所示，PE单体(No.64)可以有效口服递送sRNA单链核酸进入小鼠血液，且递送效果优于POPC与Lipofectamine RNAimax。

实施例11-5：脂质单体No.71递送单链核酸进入体内

1.实验动物：C57小鼠，雄性，约6周龄。

1) 未处理组：灌胃500ul生理盐水;

2)RNAimax处理组：每只小鼠按照10ul RNAimax-1nmol sRNA混匀，灌胃。该组作为阳性对照组。RNAimax购自Invitrogen。

3) 自由摄取(free uptake)组：直接加入sRNA单链混合溶液(各1nmol);

4) POPC与核酸处理组：将10μLPOPC与sRNA单链混合溶液(各1nmol)经加热法处理后的混合物以灌胃方式给小鼠。

5) 脂质单体与核酸处理组：将10μL脂质单体(No71)与sRNA单链混合溶液(PGY-sRNA-32) (1nmol)经加热法处理后的混合物以灌胃方式给小鼠。

2.灌胃12h后，眼球取血，TRIzol法裂解提取RNA检测进入量。

结论：如图147所示，PE单体(No.71)可以有效口服递送sRNA单链核酸进入小鼠血液，且递送效果优于POPC与Lipofectamine RNAimax。

实施例12：**脂质在不同温度梯度有效递送单链核酸进入MRC5细胞**

(一)实验分组:

1)未处理组：未经处理的细胞;

2)RNAiMAX组: 分别用100μL opti-MEM培养基稀释2μL RNAiMAX转染试剂和HJT-sRNA-m7单链溶液，二者混匀后放置15min后，加入细胞中，混匀，HJT-sRNA-m7单链的终浓度为100nM;

3)脂质单体与核酸处理组：将2.5μL脂质单体(No.38)与HJT-sRNA-m7的双链核酸溶液经不同温度水煮法处理后的混合物加入细胞中，混匀，RNA的终浓度为100nM。

4℃：100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入2.5μL脂质单体，4℃放置15min；加入细胞6h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的表达量。

37℃：100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入2.5μL脂质单体，37℃放置15min；加入细胞6h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的表达量。

60℃：100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入2.5μL脂质单体，50℃加热15min；加入细胞6h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的表达量。

80℃：100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入2.5μL脂质单体，80℃加热15min；加入细胞6h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的表达量。

100℃：100μL HJT-sRNA-m7单链溶液加入2.5μL脂质单体，100℃加热15min；加入细胞6h后，经RT-qPCR法检测细胞中HJT-sRNA-m7的表达量。

结论：如图 148 所示，结果表明，脂质在水煮法不同温度条件下可以有效递送核酸进入细胞(统计学意义上有显著差异，$p<0.01$)，有希望提高临床上核酸药物递送的效率。

权利要求书

1. 制备本草体的方法，其包括以下步骤:

(1) 一种或多种脂质成分和下列任一项或多项混合：一种或多种核酸、一种或多种化合物和/或一种或多种大分子;

优选地，所述一种或多种脂质成分是合成或纯化的，例如包含选自表1或表10所示的脂质;

(2) 对所得的混合物进行加热处理，

其中优选地，加热温度为约0℃至约100℃，更优选约50℃至约100℃，并且更优选约70℃至90℃，特别优选为约80℃至约90℃，优选90℃;

优选地，加热时间为约0分钟-约24小时，约5分钟-约20小时，约10分钟-约16小时，约30分钟-约12小时，约1小时-约8小时，或者约0.5小时-约4小时，优选5-30分钟;

优选地，所述混合通过将所述脂质成分以有机溶剂中的溶液添加到核酸、大分子和/或化合物的水性溶液中进行;

优选地，所述有机溶剂包括醇类、醚类、苯类有机溶剂，优选氯仿、乙醚、甲醇、或乙醇;

优选地，所述水性溶液选自水性缓冲液、盐水溶液、有机溶剂的水溶液或水;

优选地，其中所述本草体是膜结构的纳米颗粒状物质，优选双层膜结构的纳米颗粒状物质;

优选地，其中所述本草体用于口服、静脉内施用，如推注或通过连续灌注一段时间，通过皮下、肌肉内、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、损伤内、或吸入路径如鼻内，通常通过静脉内或皮下施用。

2. 根据权利要求1所述的方法，其中所述脂质是Sphinganine(d22:0)，和/或所述小RNA是PGY-sRNA-6或HJT-sRNA-m7，

其中优选地，所述Sphinganine(d22:0)以10mg/ml氯仿溶液使用，

脂质：sRNA= 0.1-20ug:0.1nmol;

其中优选地，所述本草体具有小于60mV、小于50mV、小于0、-80至-20

或-60至-20的Zeta电势，并且具有50-1000、90-300或100-200nm的平均粒径。

3. 根据权利要求1或2所述的方法制备的本草体，优选地，其用于下列一项或多项:

(1) 降低纤连蛋白和/或alpha-SMA的表达，优选TGF-beta1诱导的MRC-5细胞纤维化模型中纤连蛋白的蛋白表达;

(2) 减少羟脯氨酸，优选肺纤维化模型中的羟脯氨酸，优选小鼠肺纤维化模型中的羟脯氨酸;

(3) 用于预防或治疗纤维化，优选肺纤维化，优选在TGF-beta1诱导的MRC-5细胞的纤维化模型中和博来霉素诱导的小鼠的纤维化模型中;

(4) 降低IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，优选poly(I:C)诱导的A549细胞模型中IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha;

(5) 降低IL-1alpha、IL-1b、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、IL-13、IL-17A、GM-CSF、IFN-gamma或MCP-1beta的水平，优选血浆水平，优选在小鼠炎症模型中;

(6) 或者用于治疗IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha相关疾病，或者用于消炎，优选治疗肺炎、心肌炎、急慢性胃炎、急慢性肠炎、急慢性肝炎、急慢性肾炎、皮炎、脑炎、淋巴炎、结膜炎、角膜炎、虹膜睫状体炎、中耳炎、过敏性鼻炎、哮喘、肺纤维化慢性阻塞性肺疾病、过敏性皮炎、镰状细胞病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、肺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、宫颈癌、乳腺癌、白血病、多发性骨髓瘤、糖尿病和痛风; 和

(7) 使小RNA有效进入细胞; 和/或

(8) 降低RELA基因表达;

优选地，所述本草体降低纤维化相关蛋白纤连蛋白和alpha-SMA的表达，和/或降低IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，优选poly(I:C)诱导的A549细胞模型中IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha的表达水平。

4. 根据权利要求3所述的本草体用于下列一项或多项的用途，或在制备用于下列一项或多项的药物中的用途，或根据权利要求3所述的本草体用于下列一项或多项的方法:

(1) 降低纤连蛋白和/或alpha-SMA的表达，优选TGF-beta1诱导的MRC-5细胞纤维化模型中纤连蛋白的蛋白表达;

(2) 减少羟脯氨酸，优选肺纤维化模型中的羟脯氨酸，优选小鼠肺纤维化模型中的羟脯氨酸;

(3) 用于预防或治疗纤维化，优选肺纤维化，优选在TGF-beta1诱导的MRC-5细胞的纤维化模型中和博来霉素诱导的小鼠的纤维化模型中;

(4) 降低IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，优选poly(I:C)诱导的A549细胞模型中IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha;

(5) 降低IL-1alpha、IL-1beta、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、IL-13、IL-17A、GM-CSF、IFN-gamma或MCP-1beta的水平，优选血浆水平，优选在小鼠炎症模型中;

(6) 或者用于治疗IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha相关疾病，或者用于消炎，优选治疗肺炎、心肌炎、急慢性胃炎、急慢性肠炎、急慢性肝炎、急慢性肾炎、皮炎、脑炎、淋巴炎、结膜炎、角膜炎、虹膜睫状体炎、中耳炎、过敏性鼻炎、哮喘、肺纤维化慢性阻塞性肺疾病、过敏性皮炎、镰状细胞病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、肺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、宫颈癌、乳腺癌、白血病、多发性骨髓瘤、糖尿病和痛风; 和

(7) 使小RNA有效进入细胞; 和/或

(8) 降低RELA基因表达;

优选地，所述本草体降低纤维化相关蛋白纤连蛋白和alpha-SMA的表达，和/或降低IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，优选poly(I:C)诱导的A549细胞模型中IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha的表达水平;

优选地，所述药物用于口服、静脉内施用，如推注或通过连续灌注一段时间，通过皮下、肌肉内、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、损伤内、或吸入路径如鼻内，通常通过静脉内或皮下施用。

5. 有助于核酸递送的方法，其包括将核酸和表1或表10中的一种或多种脂质，优选Sphinganine(d22:0)进行加热或升温处理，加热或升温的温度范围优选为约4℃至约100℃，约25℃至约100℃，更优选约50℃至约100℃，更优选约95℃至约100℃，特别优选约80℃至约100℃，例如4℃，37℃，60℃，80℃或100℃，其中优选地，所述核酸是小核酸，优选是单链或双链的，优选地所述小核酸的长度是14-32bp、16-28bp或18-24bp，优选表8、9和13中的任一种或多种小RNA，优选PGY-sRNA-6或HJT-sRNA-m7; 优选地，所述核

酸递送通过口服进行；优选地，所述核酸用于治疗疾病，例如炎症相关疾病以及癌症，例如胃癌或肺癌，优选用于抗炎及抗纤维化，优选用于降低炎症相关因子IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，细胞因子风暴IL-1alpha、IL-1beta、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、IL-13、IL-17A、GM-CSF、IFN-gama、RANTES或MCP-1beta，以及降低纤维化相关蛋白纤连蛋白和α-SMA的表达。

6. 权利要求5所述的方法，所述方法还包括进一步混合一种或多种化合物、一种或多种核酸、和/或一种或多种大分子；其中核酸包括DNA和RNA，优选RNA，更加优选小RNA;

优选混合表2-表5所示的一种或多种化合物、一种或多种表8和/或表9和/或表13所示的小RNA、一种或多种DNA和/或表6或7所示的一种或多种大分子。

7. 权利要求1-6中任一项的方法，其中所述多种脂质是包含选自下组的脂质组合的脂质：第8号:第41号=6:1的脂质组合；第38号:第41号=6:1的脂质组合；第39号:第41号=6:1的脂质组合；第40号:第41号=6:1的脂质组合；第38:12:41:29号=1:2:1:1的脂质组合；第40:12:41号=2:4:3的脂质组合；第12:41号=1:6的脂质组合；第12:41号=1:1的脂质组合；第12:41号=6:1的脂质组合；第40:12:41号=2:2:2的脂质组合；第4:12:41号=1:1:1的脂质组合；第1:2:3:19:35号=1:1:1:1:1的DG组合；第6:9:10:13:15:16:18:20:21:22:23:24:25:26:27:28:32:33号=1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1的TG组合；第36:37号=1:1的LPC组合；第11:12号=1:1的PC组合；第8:38号=1:1的PE组合；第4:14号=1:1的Cer组合；第17:30:31号=1:1:1的So组合；无第5、7号的第1-36号的等体积组合；无第5、7、34号的第1-36号的等体积组合；无第5、7、1、2、3、19、35号的第1-36号的等体积组合；无第5、7、6、9、10、13、15、16、18、20、21、22、23、24、25、26、27、28、32、33号的第1-36号的等体积组合；无第5、7、36、37号的第1-36号的等体积组合；无第5、7、11、12号的第1-36号的等体积组合；无第5、7、8号的第1-36号的等体积组合；无第5、7、4、14号的第1-36号的等体积组合；无第5、7、29号的第1-36号的等体积组合；脂质第1号:第34号=2:1；脂质第1号:所述DG组合=2:1；脂质第1号:所述TG组合=2:1；脂质第1号:所述LPC组合=2:1；脂质第1号:第8号=2:1；脂质第1号:第12号=2:1；脂质

第1号:所述Cer组合=2:1；脂质第1号:So组合=2:1；脂质第1号:第29号=2:1；脂质第1号:第8号:第12号=1:1:1；脂质第8号:第34号=2:1；脂质第8号:DG组合=2:1；脂质第8号:TG组合=2:1；脂质第8号:LPC组合=2:1；脂质第8号:第37号=4:1；脂质第8号:第12号=2:1；脂质第8号:Cer组合=2:1；脂质第8号:So组合=2:1；脂质第8号:第31号=6:1；脂质第8号:第29号=2:1；第12号:第34号=2:1；第12号:DG组合=2:1；第12号:TG组合=2:1；第12号:LPC组合=2:1；第12号:脂质第8号=2:1；第12号:Cer组合=2:1；第12号:So组合=2:1；第12号:第29号=2:1；第12号:脂质第8号:第1&2号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第15号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第36&37号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第11号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第12号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第4号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第31号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第29号=2:1:1；第12号:脂质第8号:第34号=3:2:1；第12号:脂质第8号:第34号=4:2:3；第12号:脂质第8号:脂质第2号=4:2:3；第12号:脂质第8号:脂质第2号=16:8:3；第12号:脂质第8号:第32号=4:2:3；第12号:脂质第8号:第37号=4:2:3；第12号:脂质第8号:第11号=4:2:3；第12号:脂质第8号:第38号=4:2:3；第12号:脂质第8号:第4号=4:2:3；第12号:脂质第8号:第31号=4:2:3；第12号:脂质第8号:第29号=4:2:3；第12号:脂质第8号:第29号:第31号=2:1:1:1；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:第34号=4:2:2:2:5；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:脂质第2号=4:2:2:2:5；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:第32号=4:2:2:2:5；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:第11号=4:2:2:2:5；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:第37号=4:2:2:2:5；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:第38号=4:2:2:2:5；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:第4号=4:2:2:2:5；第12号:脂质第8号:第29号:第31号:第4号:脂质第1号:第16号=2:1:1:3:2:2:3；脂质第1号:脂质第8号:第12号:脂质第1&2号=2:2:2:3；脂质第1号:脂质第8号:第12号:第15号=2:2:2:3；脂质第1号:脂质第8号:第12号:第36&37号=2:2:2:3；脂质第1号:脂质第8号:第12号:第12号=2:2:2:3；脂质第1号:脂质第8号:第12号:第4号=2:2:2:3；脂质第1号:脂质第8号:第12号:第31号=2:2:2:3；脂质第1号:脂质第8号:第12号:第29号=2:2:2:3；脂质第8号:第34号:脂质第1&2号=2:1:1；脂质第8号:第34号:第15号=2:1:1；脂质第8号:第34号:第36&37号=2:1:1；脂质第8号:第34号:第12号=2:1:1；脂质第8号:第34号:第4号=2:1:1；脂质第8号:第34号:第31号=2:1:1；脂质第8号:第34号:第29号=2:1:1；

脂质第8号:第31号:第34号=12:3:5; 脂质第8号:第31号:脂质第2号=12:3:5; 脂质第8号:第31号:第37号=12:3:5; 脂质第8号:第31号:第11号=12:3:5; 脂质第8号:第31号:第12号=12:3:5; 脂质第8号:第31号:第4号=12:3:5; 脂质第8号:第31号:第29号=12:3:5; 脂质第8号:第31号:第32号=12:3:5; 脂质第8号:第4号:第34号=12:3:5; 脂质第8号:第4号:脂质第2号=12:3:5; 脂质第8号:第4号:第37号=12:3:5; 脂质第8号:第4号:第12号=12:3:5; 脂质第8号:第4号:第31号=12:3:5; 脂质第8号:第4号:第29号=12:3:5; 脂质第8号:第4号:第32号=12:3:5; 第38号:第34号=2:1; 第38号:脂质第1号=2:1; 第38号:脂质第2号=2:1; 第38号:第1&2号=2:1; 第38号:第15号=2:1; 第38号:第32号=2:1; 第38号:第37号=2:1; 第38号:第37号=4:1; 第38号:第11号=2:1; 第38号:第12号=2:1; 第38号:第11&12号=2:1; 第38号:第12号=4:1; 第38号:脂质第8号=2:1; 第38号:第4号=2:1; 第38号:So(30)=2:1; 第38号:第31号=2:1; 第38号:第29号=2:1; 脂质第1号:第38号:第12号:第34号=2:2:2:3; 脂质第1号:第38号:第12号:第15号=2:2:2:3; 脂质第1号:第38号:第12号:第37号=2:2:2:3; 脂质第1号:第38号:第12号:脂质第8号=2:2:2:3; 脂质第1号:第38号:第12号:第4号=2:2:2:3; 脂质第1号:第38号:第12号:第31号=2:2:2:3; 脂质第1号:第38号:第12号:第29号=2:2:2:3; 第38号:第34号:脂质第1号=2:1:3; 第38号:第34号:第15号=2:1:3; 第38号:第34号:第37号=2:1:3; 第38号:第34号:第12号=2:1:3; 第38号:第34号:脂质第8号=2:1:3; 第38号:第34号:第4号=2:1:3; 第38号:第34号:第31号=2:1:3; 第38号:第34号:第29号=2:1:3; 第38号:第12号:脂质第1号=2:1:3; 第38号:第12号:脂质第2号=4:1:3; 第38号:第12号:第15号=2:1:3; 第38号:第12号:第37号=2:1:3; 第38号:第12号:脂质第8号=2:1:3; 第38号:第12号:第4号=2:1:3; 第38号:第12号:第31号=2:1:3; 第38号:第12号:第29号=2:1:3; 第38号:第12号:脂质第1号:第15号:第34号=22:22:22:33:36; 第38号:第12号:脂质第1号:第15号:第37号=22:22:22:33:36; 第38号:第12号:脂质第1号:第15号:第4号=22:22:22:33:36; 第38号:第12号:脂质第1号:第15号:第31号=22:22:22:33:36; 第38号:第12号:脂质第1号:第15号:第29号=22:22:22:33:36; 第38号:第34号:第37号:脂质第1号=44:22:33:36; 第38号:第34号:第37号:第15号=44:22:33:36; 第38号:第34号:第37号:第12号=44:22:33:36; 第38号:第34号:第37号:第4号=44:22:33:36; 第38号:第34号:第37号:第31号=44:22:33:36; 第38号:第12号:第4号:第34号=44:22:33:36; 第38

号:第12号:第4号:脂质第1号=44:22:33:36; 第38号:第12号:第4号:第15号=44:22:33:36; 第38号:第12号:第4号:第37号=44:22:33:36; 第38号:第12号:第4号:第37号=8:2:5:3; 第38号:第12号:第4号:第31号=44:22:33:36; 第38号:第12号:第4号:第29号=44:22:33:36; 第38号:第12号:第4号:第29号:第34号=88:44:66:72:135; 第38号:第12号:第4号:第29号:脂质第1号=88:44:66:72:135; 第38号:第12号:第4号:第29号:第15号=88:44:66:72:135; 第38号:第12号:第4号:第29号:第37号=88:44:66:72:135; 第38号:第12号:第4号:第29号:第31号=88:44:66:72:135; 第38号:第12号:第4号:脂质第2号=20:10:15:9; 第38号:第12号:第4号:第6号=20:10:15:9; 第38号:第12号:第4号:第17号=20:10:15:9; 第38号:第12号:第4号:第29号=20:10:15:9; 第38号:第12号:第4号:第34号=20:10:15:9; 第38号:第12号:第4号:第37号=20:10:15:9; 第38号:第12号:第31号:第34号=2:1:3:3; 第38号:第12号:第31号:脂质第1号=2:1:3:3; 第38号:第12号:第31号:第15号=2:1:3:3; 第38号:第12号:第31号:第37号=2:1:3:3; 第38号:第12号:第31号:第4号=2:1:3:3; 第38号:第12号:第31号:第29号=2:1:3:3; 第38号:第34号:第37号:第31号:脂质第1号=88:44:66:72:135; 第38号:第34号:第37号:第31号:第15号=88:44:66:72:135; 第38号:第34号:第37号:第31号:第12号=88:44:66:72:135; 第38号:第34号:第37号:第31号:第4号=88:44:66:72:135; 第38号:第34号:第37号:第31号:第29号=88:44:66:72:135; 第38号:第37号:第34号=4:2:3; 第38号:第37号:脂质第1号=4:2:3; 第38号:第37号:脂质第2号=4:2:3; 第38号:第37号:第1&2号=4:2:3; 第38号:第37号:脂质第2号=32:8:5; 第38号:第37号:第32号=32:8:5; 第38号:第37号:第15号=4:2:3; 第38号:第37号:第32号=4:2:3; 第38号:第37号:脂质第8号=4:2:3; 第38号:第37号:第11号=4:2:3; 第38号:第37号:第12号=4:2:3; 第38号:第37号:第11&12号=4:2:3; 第38号:第37号:第12号=4:1:1; 第38号:第37号:第4号=4:2:3; 第38号:第37号:第30号=4:2:3; 第38号:第37号:第31号=4:2:3; 第38号:第37号:第29号=4:2:3; 脂质第8号:第37号:第32号=4:1:2; 脂质第8号:第37号:脂质第2号=4:1:2; 第38号:第37号:第15号:第34号=64:16:10:45; 第38号:第37号:第15号:脂质第1号=64:16:10:45; 第38号:第37号:第15号:第12号=64:16:10:45; 第38号:第37号:第15号:第4号=64:16:10:45; 第38号:第37号:第15号:第31号=64:16:10:45; 第38号:第37号:第15号:第29号=64:16:10:45; 第38号:脂质第2号:第37号=4:2:3; 第38号:脂质

第2号:第31号=4:2:3；第38号:脂质第2号:第29号=4:2:3；第38号:脂质第2号:第34号=4:2:3；第38号:脂质第2号:第32号=4:2:3；第38号:脂质第2号:第12号=4:2:3；第38号:脂质第2号:第12号=4:5:1；第38号:脂质第2号:第4号=4:2:3，脂质第1&2号、第11&12号或第36&37号分别表示任何比例的脂质第1和2号、第11和12号或第36和37号。

8. 促进核酸与脂质形成本草体的方法，其包括加热核酸和脂质的混合物以促进嵌入脂质膜，促进脂质-核酸复合物的稳定性，如通过临界胶束浓度测定的;

其中核酸插入脂质层或被脂质层包裹形成本草体，其是膜结构的纳米颗粒状物质，优选双层膜结构的纳米颗粒状物质;

其中优选地，加热温度为约0℃至约100℃，更优选约50℃至约100℃，并且更优选约80℃至100℃，特别优选为约80℃至约90℃，优选90℃;

优选地，加热时间为约0分钟-约24小时，约5分钟-约20小时，约10分钟-约16小时，约15分钟-约12小时，约1小时-约8小时，或者约2小时-约4小时，优选15分钟;

优选地，所述脂质是表1或表10中的一种或多种脂质，优选Sphinganine(d22:0)，或权利要求7中的脂质组合;优选地，所述核酸是小RNA，优选表8、9和13所示的一种或多种小RNA，优选PGY-sRNA-6或HJT-sRNA-m7。

9. 脂质递送蛋白质至细胞的方法，所述方法包括加热蛋白质和脂质，其中优选地，加热温度为约0℃至约100℃，更优选约50℃至约100℃，并且更优选约80℃至100℃，特别优选为约80℃至约90℃，优选90℃;

优选地，加热时间为约0分钟-约24小时，约5分钟-约20小时，约10分钟-约16小时，约15分钟-约12小时，约1小时-约8小时，或者约2小时-约4小时，优选6小时;

或者所述脂质递送蛋白质至细胞的方法包括将蛋白质溶液与脂质的有机溶剂溶液混合，优选v/v=1/5，除去有机溶剂，优选挥发除去有机溶剂，并且用水性试剂水化;

或用水煮法制备，向蛋白质溶液中加入脂质的有机溶剂溶液，混合后进行升温处理;

优选地，所述脂质是表1或表10中的一种或多种脂质，优选sphinganine(d22:0)或PE(16:0/16:0)或PE(16:0/22:1)。

10.从植物制备汤剂体的方法，所述方法包括以下步骤:

(1) 用溶剂，优选地水性溶剂制备所述植物的提取液，

其中优选地通过煎煮经所述溶剂浸泡的植物制备所述植物的提取液;

其中优选地，所述煎煮是强火煎煮15-45min，优选20-30min，优选30min，然后文火煎煮5-30min，优选5-20min，优选10min;

其中优选地，所述强火的温度是90℃以上，优选90℃-2000℃，90℃-1500℃，90℃-1000℃，90℃-500℃，90℃-300℃，90℃-250℃或90℃-200℃;

优选地，所述文火的温度是50℃以上，优选50℃-2000℃，50℃-1500℃，50℃-1000℃，50℃-500℃，50℃-300℃，50℃-250℃，50℃-200℃，50℃-100℃，50℃-80℃，50℃-70℃或50℃-60℃;

优选地，所述水性溶剂选自水性缓冲液、盐水溶液、有机溶剂的水溶液或水;

(2)对所述提取液在适当的温度，优选0-10℃，4℃条件下进行差速离心，优选以800-5000g，优选1000g-4000g，优选2000-3000g，优选2000g离心20-40min，优选30min离心，取上清液，然后对上清液以6000g-15000g，优选7000g-12000g，优选8000g-11000g，优选10000g离心20-40min，优选30min，取上清液，然后对上清液以100000-200000，优选200000g离心60-120min，优选90min，取沉淀物，所述沉淀物是所述汤剂体的固体形式；以及

(3) 任选地，用水性溶液，优选水性缓冲液，优选PBS缓冲液，更优选pH7-9，优选pH7.4的PBS缓冲液重悬所述沉淀物，以提供汤剂体，其是膜结构的纳米颗粒状物质，优选双层膜结构的纳米颗粒状物质，所述水性溶液选自水性缓冲液、盐水溶液、有机溶剂的水溶液或水。

11. 通过根据权利要求10所述的方法，其中所述汤剂体具有30-1,000nm，优选80-300nm的平均粒径，且具有20-100mV的电位绝对值。

12. 通过根据权利要求10或11所述的方法，其中所述植物选自蒲公英、红景天、穿心莲、卷心菜和木香等。

13. 通过根据权利要求10-12中任一项所述的方法，其中对于蒲公英，所

述汤剂体具有30-300nm，优选150-200nm的平均粒径峰值，且具有-39 ± 3 mV的Zeta电势；对于红景天，所述汤剂体具有50-300 nm，优选150-210 nm的平均粒径，且具有-37 ± 2 mV的Zeta电势；

蒲公英汤剂体具有20-100 mV的电位绝对值范围；红景天汤剂体具有20-100 mV的电位绝对值范围。

14. 通过权利要求10-13中任一项所述的方法制备的汤剂体，其中所述汤剂体是固体形式或液体形式或胶体形式，所述汤剂体包含膜结构的纳米颗粒状物质，优选双层膜结构的纳米颗粒状物质。

15. 根据权利要求14所述的汤剂体，其包含表1或表10所示的一种或多种脂质成分、一种或多种化合物、一种或多种DNA、一种或多种大分子、和/或一种或多种RNA；

优选地，所述汤剂体包含表1或表10所示的一种或多种脂质成分、表2或4所示的一种或多种化合物、表3或5所示的一种或多种化合物、表6或7所示的一种或多种大分子、和/或表8、9或13所示的一种或多种小RNA。

16. 根据权利要求14或15所述的汤剂体，其是用于口服、静脉内施用，如推注或通过连续灌注一段时间，通过皮下、肌肉内、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、损伤内、或吸入路径如鼻内，通常通过静脉内或皮下施用的组合物。

17. 根据权利要求14-16中任一项所述的汤剂体，其用于下列一项或多项：

(1) 降低纤连蛋白的表达，优选TGF-beta1诱导的MRC-5细胞纤维化模型中纤连蛋白的蛋白表达；

(2) 减少羟脯氨酸，优选肺纤维化模型中的羟脯氨酸，优选小鼠肺纤维化模型中的羟脯氨酸；

(3) 用于预防或治疗纤维化，优选肺纤维化；

(4) 降低IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，优选poly(I:C)诱导的A549细胞模型中IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha；

(5) 降低IL-1alpha、IL-1beta、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、IL-13、IL-17A、GM-CSF、IFN-gamma或MCP-1beta的水平，优选血浆水平，优选在小鼠炎症模型中；

(6) 或者用于治疗IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha相关疾病，或者用于消炎，优选治疗肺炎、心肌炎、急慢性胃炎、急慢性肠炎、急慢性肝炎、急慢性肾炎、皮炎、脑炎、淋巴炎、结膜炎、角膜炎、虹膜睫状体炎、中耳炎、过敏性鼻炎、哮喘、肺纤维化慢性阻塞性肺疾病、过敏性皮炎、镰状细胞病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、肺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、宫颈癌、乳腺癌、白血病、多发性骨髓瘤、糖尿病和痛风；和/或

(7) 降低RELA基因表达。

18. 根据权利要求14-16中任一项所述的汤剂体用于制备药物的用途，所述药物用于下列一项或多项：

(1) 降低纤连蛋白的表达，优选TGF-beta1诱导的MRC-5细胞纤维化模型中纤连蛋白的蛋白表达；

(2) 减少羟脯氨酸，优选肺纤维化模型中的羟脯氨酸，优选小鼠肺纤维化模型中的羟脯氨酸；

(3) 用于预防或治疗纤维化，优选肺纤维化；

(4) 降低IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，优选poly(I:C)诱导的A549细胞模型中IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha；

(5) 降低IL-1alpha、IL-1beta、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、IL-13、IL-17A、GM-CSF、IFN-gamma或MCP-1beta的水平，优选血浆水平，优选在小鼠炎症模型中；

(6) 或者用于治疗IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha相关疾病，或者用于消炎，优选肺炎、心肌炎、急慢性胃炎、急慢性肠炎、急慢性肝炎、急慢性肾炎、皮炎、脑炎、淋巴炎、结膜炎、角膜炎、虹膜睫状体炎、中耳炎、过敏性鼻炎、哮喘、肺纤维化慢性阻塞性肺疾病、过敏性皮炎、镰状细胞病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、肺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、宫颈癌、乳腺癌、白血病、多发性骨髓瘤、糖尿病和痛风；

(7) 降低RELA基因表达；

其中所述药物用于口服、静脉内施用，如推注或通过连续灌注一段时间，通过皮下、肌肉内、动脉内、腹膜内、肺内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、损伤内、或吸入路径如鼻内，通常通过静脉内或皮下施用。

19. 用于以下目的的方法，所述方法包括使用根据权利要求14-16中任一

项所述的汤剂体:

(1) 降低纤连蛋白的表达，优选TGF-beta1诱导的MRC-5细胞纤维化模型中纤连蛋白的蛋白表达;

(2) 减少羟脯氨酸，优选肺纤维化模型中的羟脯氨酸，优选小鼠肺纤维化模型中的羟脯氨酸;

(3) 用于预防或治疗纤维化，优选肺纤维化;

(4) 降低IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha，优选poly(I:C)诱导的A549细胞模型中IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha;

(5) 降低IL-1alpha、IL-1beta、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70、IL-13、IL-17A、GM-CSF、IFN-gamma或MCP-1beta的水平，优选血浆水平，优选在小鼠炎症模型中;

(6) 或者用于治疗IL-1beta、IL-6和/或TNF-alpha相关疾病，或者用于消炎; 和/或

(7) 降低RELA基因表达。

20. 权利要求1、2或5的方法，其中所述核酸是合成或提纯的，选自RNA和DNA，例如选自单链或双链或部分双链的RNA和DNA。

21. 权利要求20的方法，其中所述RNA选自: 信使RNA (mRNA)、rRNA(核糖体RNA)、tRNA(转运RNA)、不均一核RNA (hnRNA)、小核RNA (snRNA)、核仁小RNA (snoRNA)、小胞质RNA、小RNA、转移-信使RNA (tmRNA)、端粒酶RNA和反义RNA，优选小RNA，优选表8、9或13所示的一种或多种小RNA。

22. 权利要求20的方法，其中所述DNA选自: 互补DNA (cDNA)、叶绿体DNA、多拷贝单链DNA (msDNA)、线粒体DNA (mtDNA)和核糖体DNA (rDNA)。

23. 权利要求1、2或6的方法，其中大分子是合成或纯化的，选自蛋白质或多糖类药物，和/或表6或7所示的一种或多种大分子。

24. 权利要求23的方法，其中所述蛋白质选自抗体类药物、β-乳球蛋白、白蛋白、促红细胞生成素(EPO)、干扰素、集落刺激因子、组织纤溶酶原激活剂和各种标记蛋白质，例如绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、藻红蛋白等。

25. 权利要求24的方法，其中所述抗体选自: IgG、IgA、IgM、IgD或IgE

类的抗体。

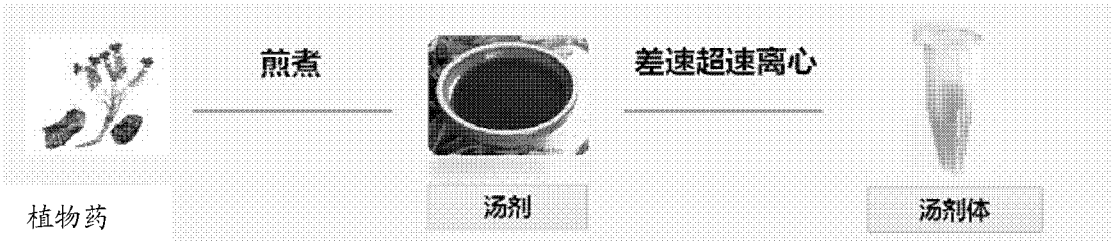


图 1

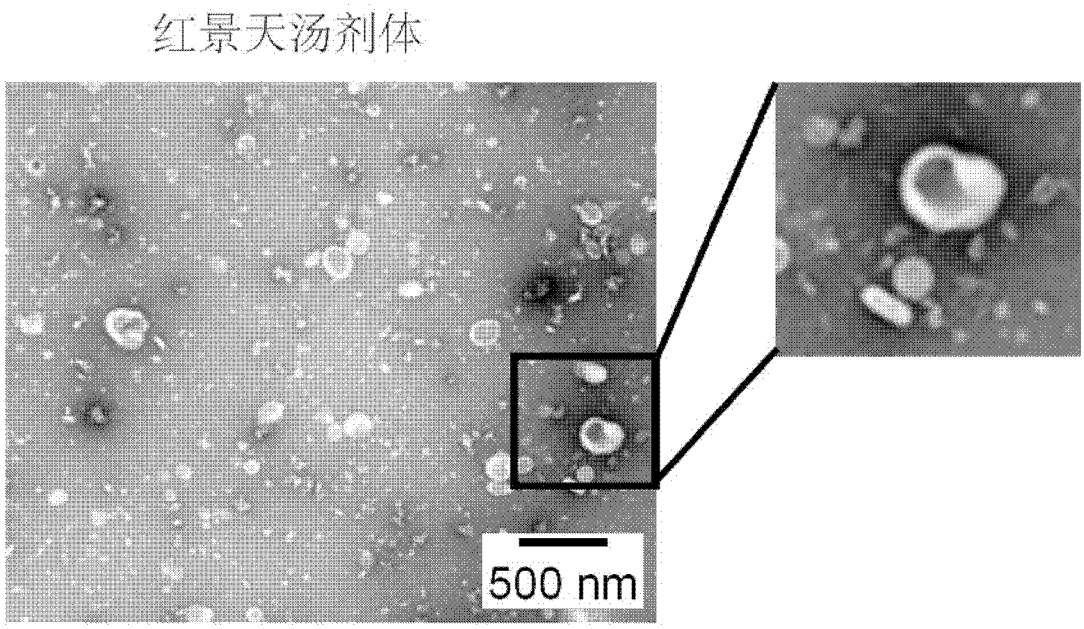


图 2

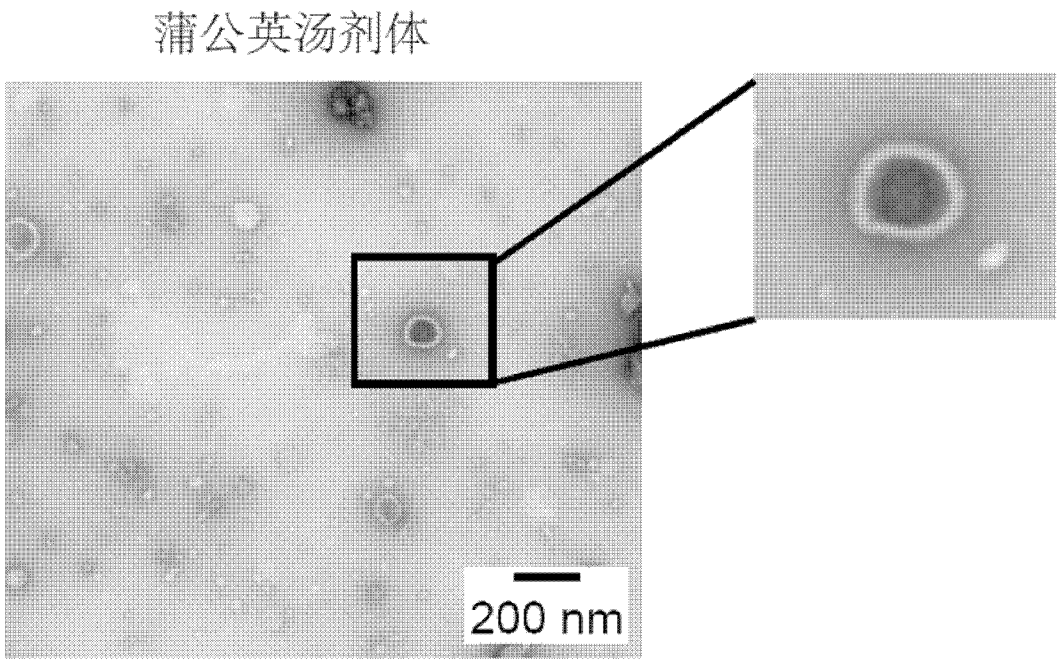

蒲公英汤剂体
200 nm

图 3

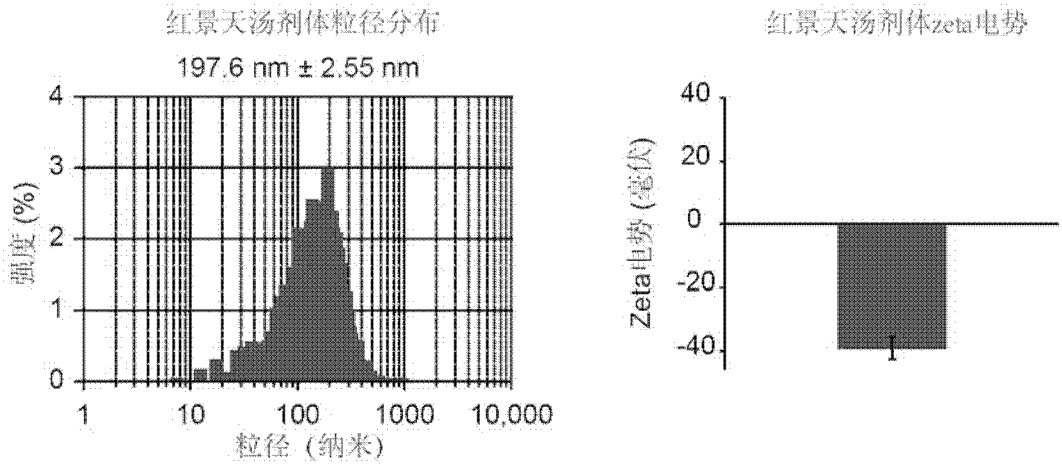

红景天汤剂体粒径分布
197.6 nm ± 2.55 nm
强度 (%)
粒径（纳米）
红景天汤剂体zeta电势
Zeta电势 (毫伏)

图 4

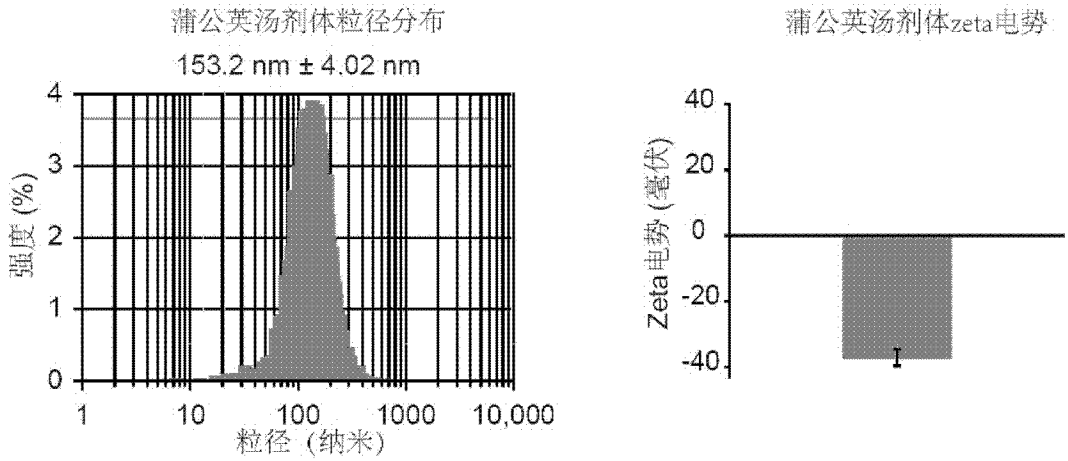

蒲公英汤剂体粒径分布
153.2 nm ± 4.02 nm
强度 (%)
粒径（纳米）
蒲公英汤剂体zeta电势
Zeta电势 (毫伏)

图 5

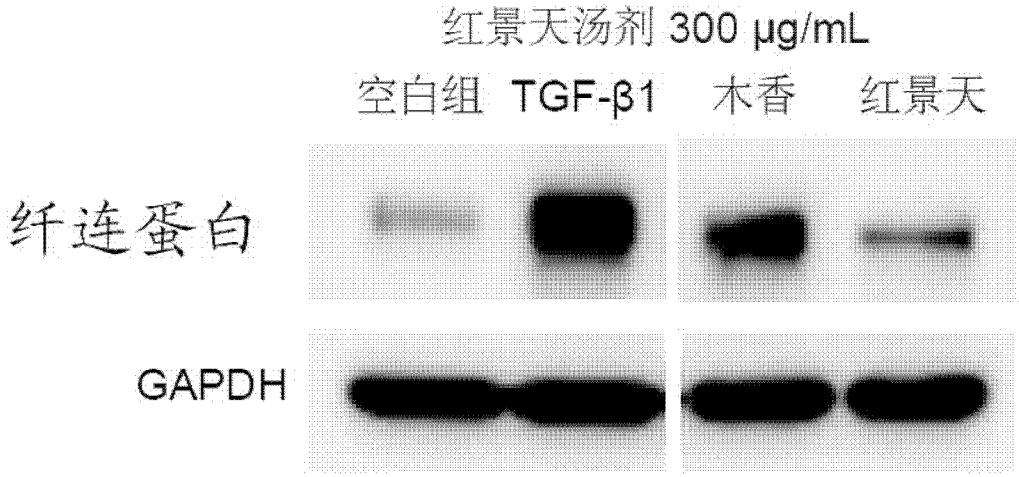

红景天汤剂 300 μg/mL
空白组
TGF-β1
木香
红景天
纤连蛋白
GAPDH

图 6

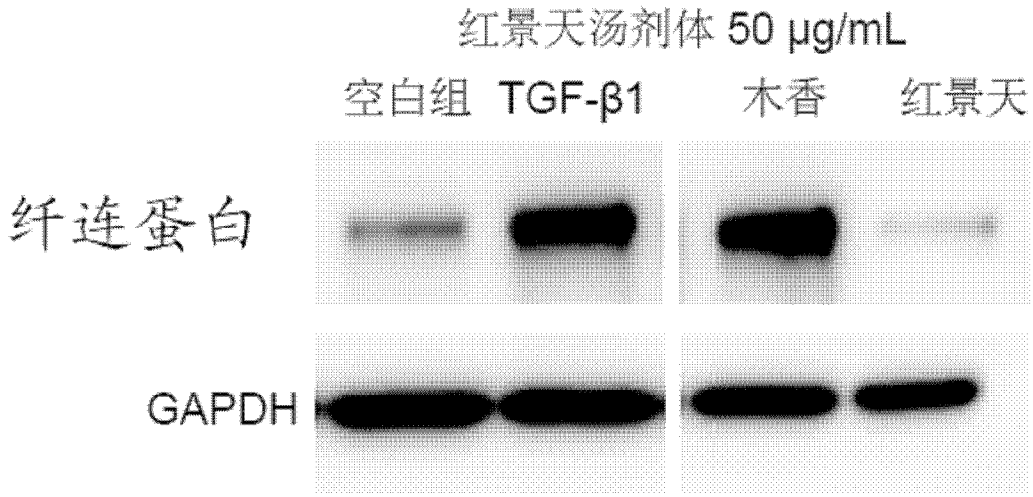

红景天汤剂体 50 μg/mL
空白组
TGF-β1
木香
红景天
纤连蛋白
GAPDH

图 7

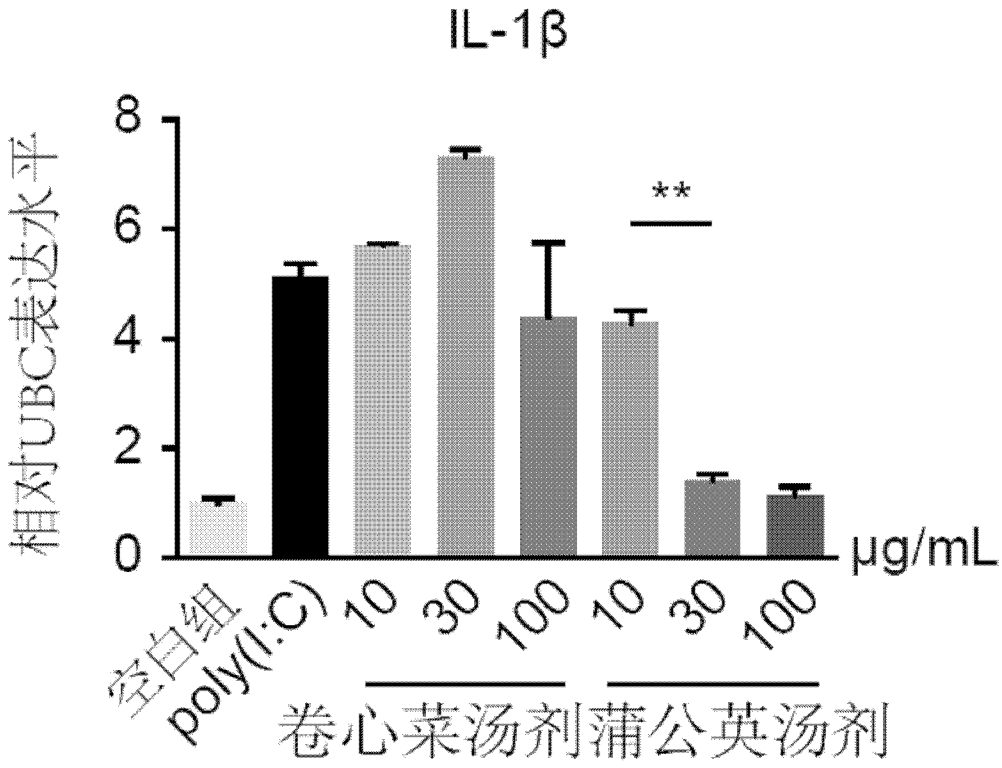

IL-1β
相对UBC表达水平
8
6
4
2
0
**
μg/mL
空白组
poly(I:C)
10
30
100
10
30
100
卷心菜汤剂
蒲公英汤剂

图 8A

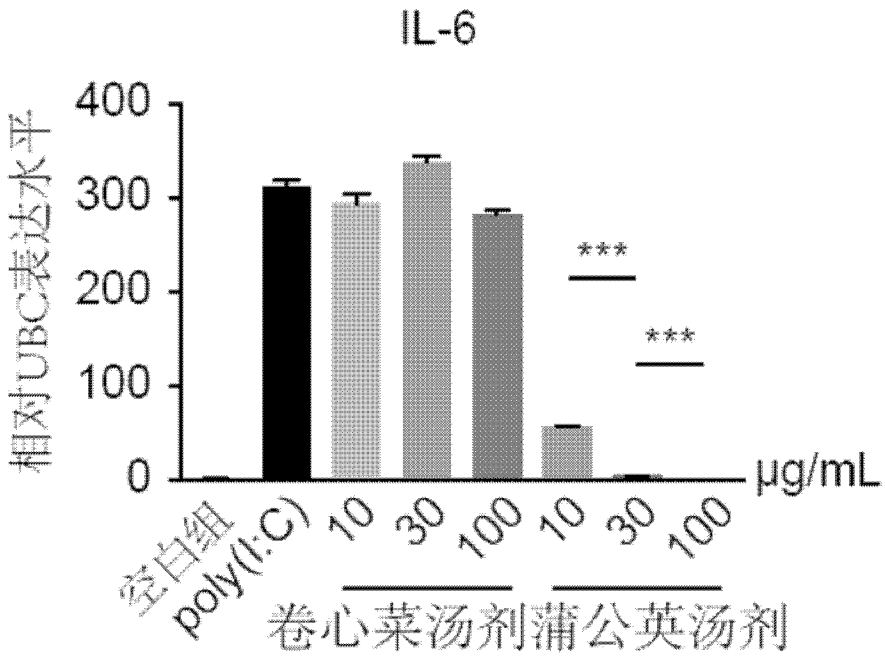

IL-6
相对UBC表达水平
400
300
200
100
0
***
***
μg/mL
空白组
poly(I:C)
10
30
100
10
30
100
卷心菜汤剂
蒲公英汤剂

图 8B

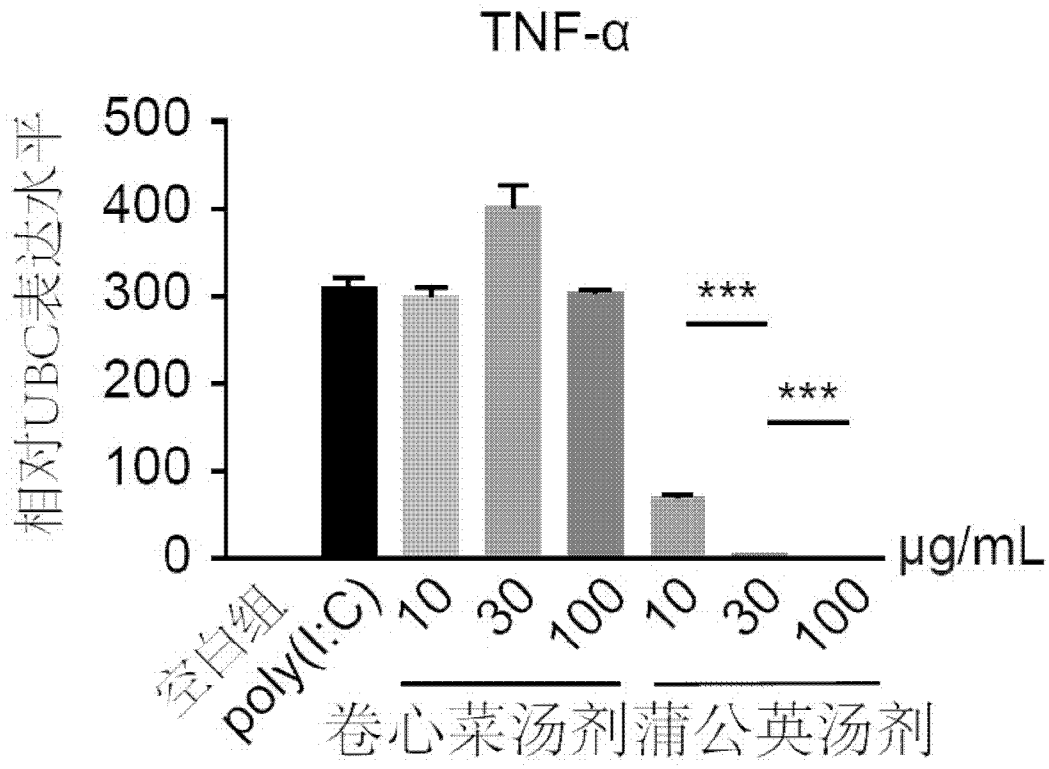

TNF-α
相对UBC表达水平
500
400
300
200
100
0
***
***
μg/mL
空白组
poly(I:C)
10
30
100
10
30
100
卷心菜汤剂
蒲公英汤剂

图 8C

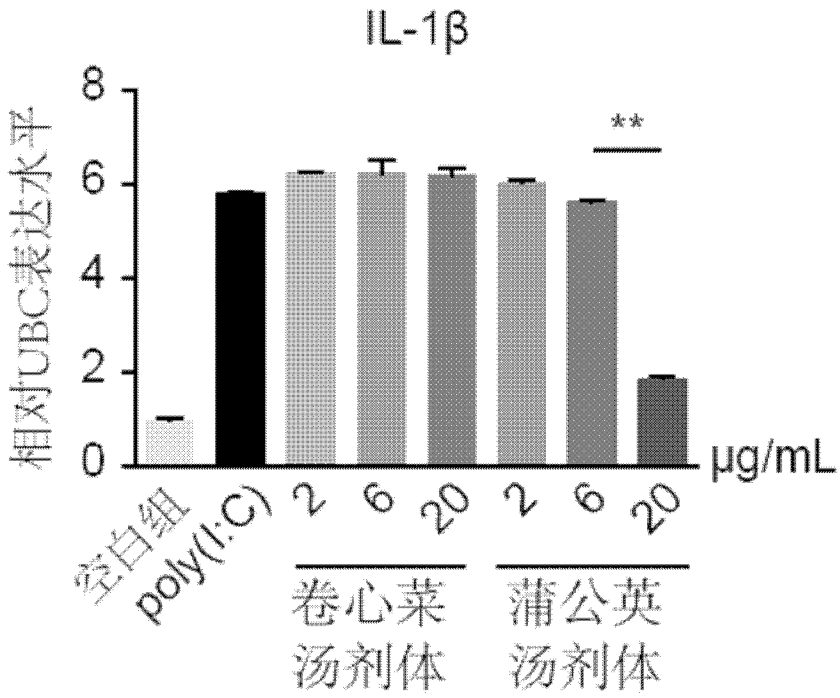

IL-1β
相对UBC表达水平
8
6
4
2
0
**
μg/mL
空白组
poly(I:C)
2
6
20
2
6
20
卷心菜
汤剂体
蒲公英
汤剂体

图 9A

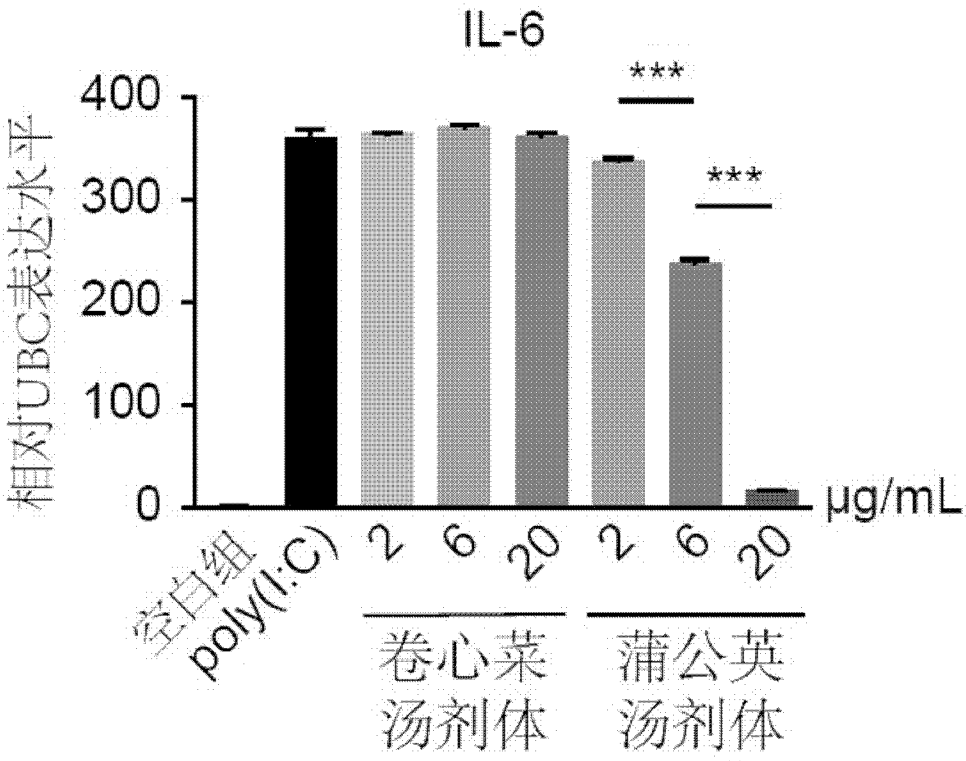

IL-6
相对UBC表达水平
400
300
200
100
0
***
***
μg/mL
空白组
poly(I:C)
2
6
20
2
6
20
卷心菜
汤剂体
蒲公英
汤剂体

图 9B

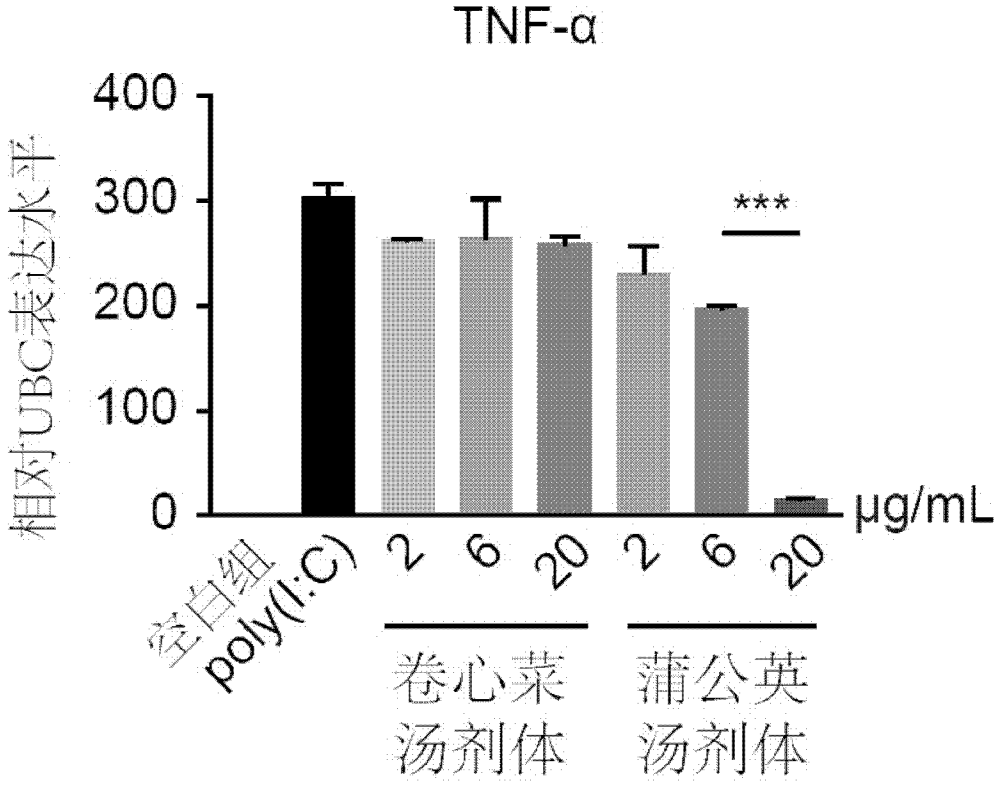

TNF-α
相对UBC表达水平
400
300
200
100
0
***
μg/mL
空白组
poly(I:C)
2
6
20
2
6
20
卷心菜
汤剂体
蒲公英
汤剂体

图 9C

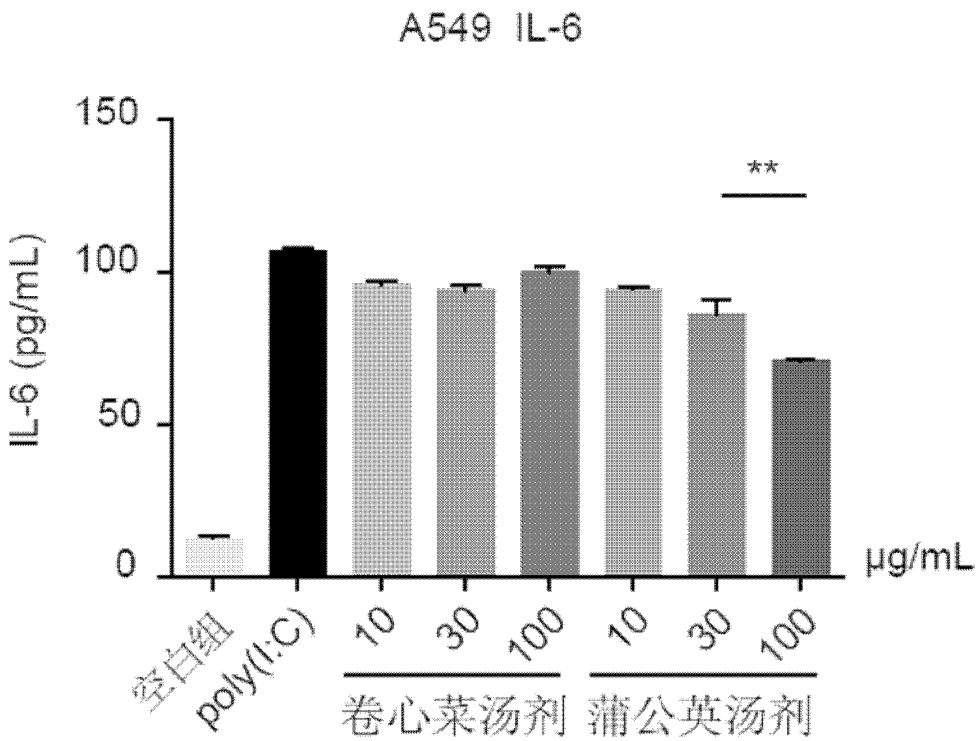

A549 IL-6
IL-6 (pg/mL)
150
100
50
0
**
μg/mL
空白组
poly(I:C)
10
30
100
10
30
100
卷心菜汤剂
蒲公英汤剂

图 9D

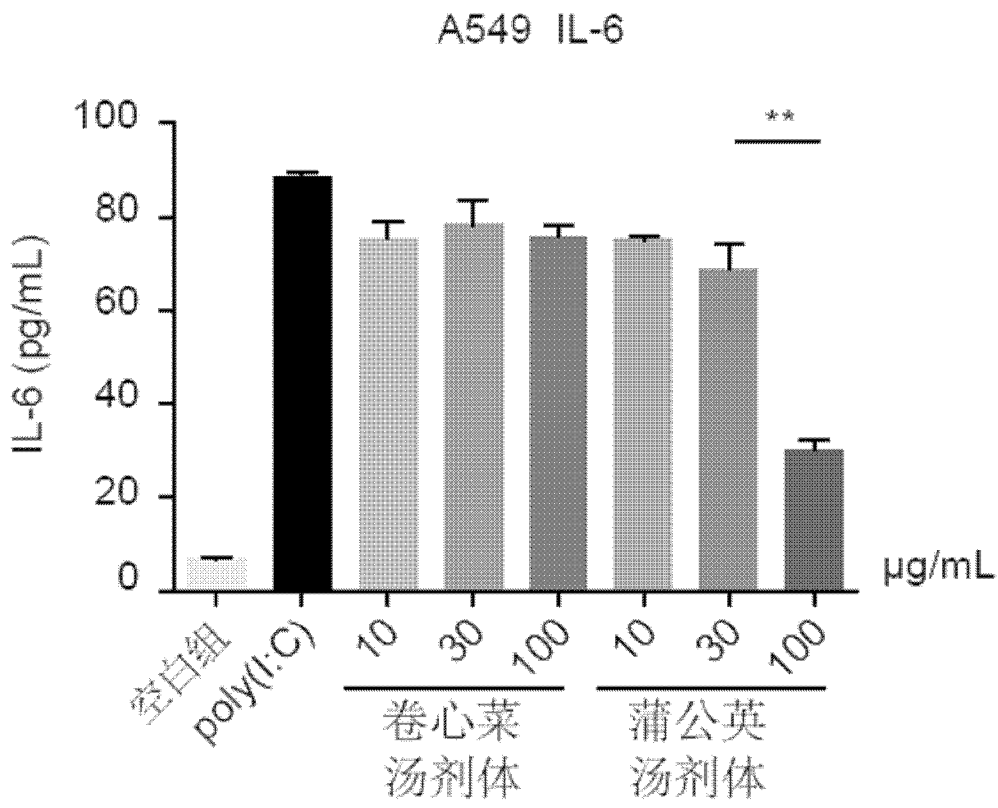

A549 IL-6
IL-6 (pg/mL)
100
80
60
40
20
0
**
μg/mL
空白组
poly(I:C)
10
30
100
10
30
100
卷心菜
汤剂体
蒲公英
汤剂体

图 9E

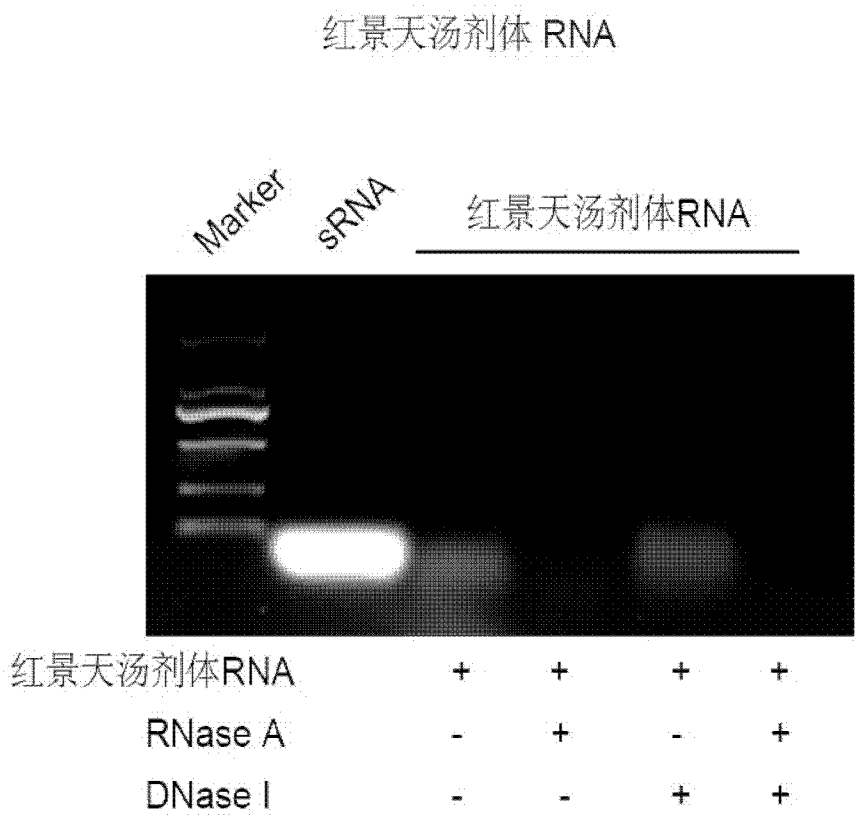

红景天汤剂体 RNA
Marker
sRNA
红景天汤剂体RNA
红景天汤剂体RNA + + + +
RNase A - + - +
DNase I - - + +

图 9F

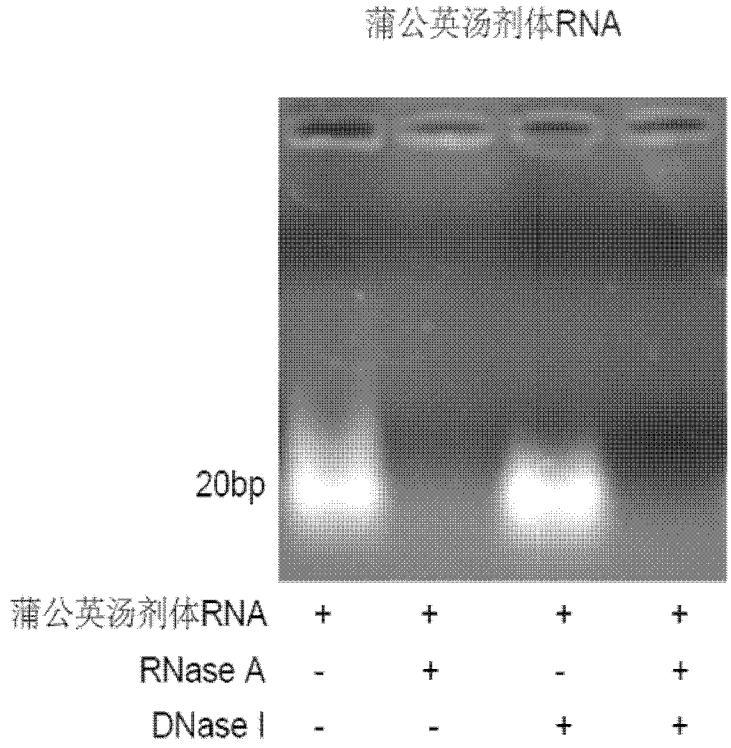

蒲公英汤剂体RNA
20bp
蒲公英汤剂体RNA + + + +
RNase A - + - +
DNase I - - + +

图 9G

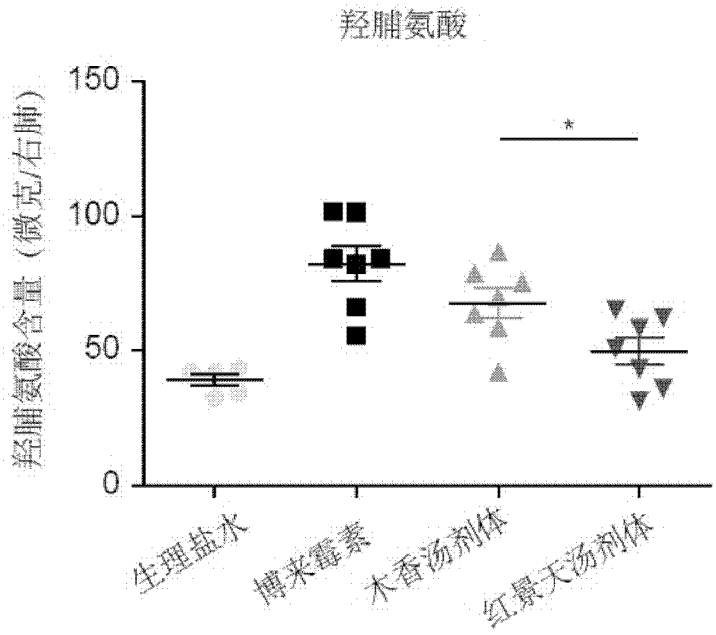

羟脯氨酸
羟脯氨酸含量（微克/右肺）
150
100
50
0
*
生理盐水
博来霉素
木香汤剂体
红景天汤剂体

图 10

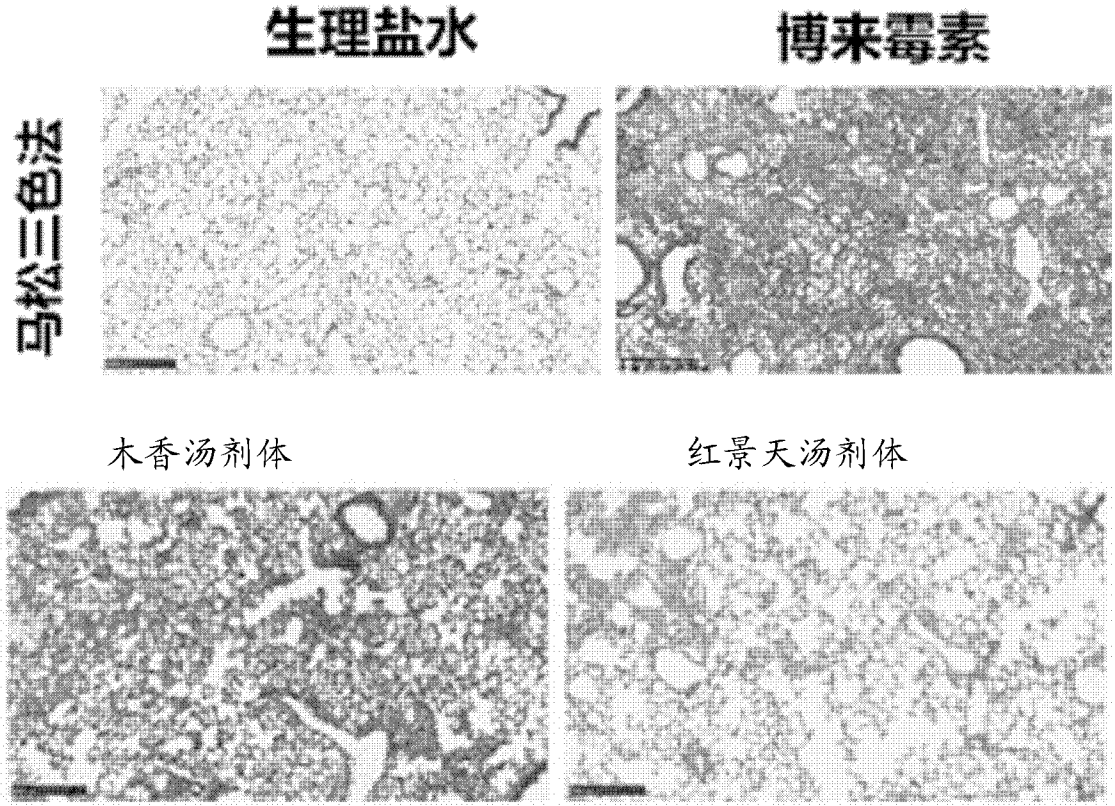

生理盐水
博来霉素
马松三色法
木香汤剂体
红景天汤剂体

图 11

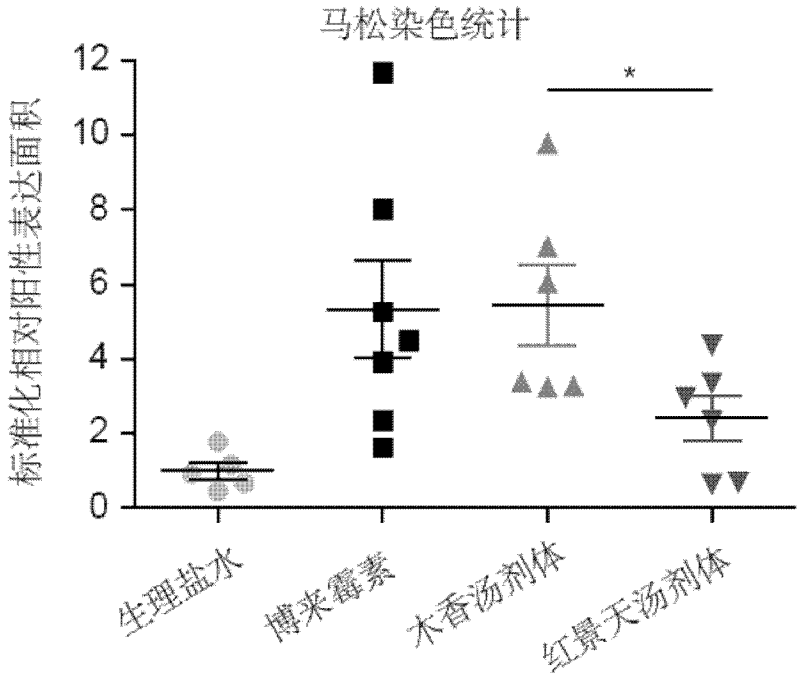

马松染色统计
标准化相对阳性表达面积
12
10
8
6
4
2
0
*
生理盐水
博来霉素
木香汤剂体
红景天汤剂体

图 12

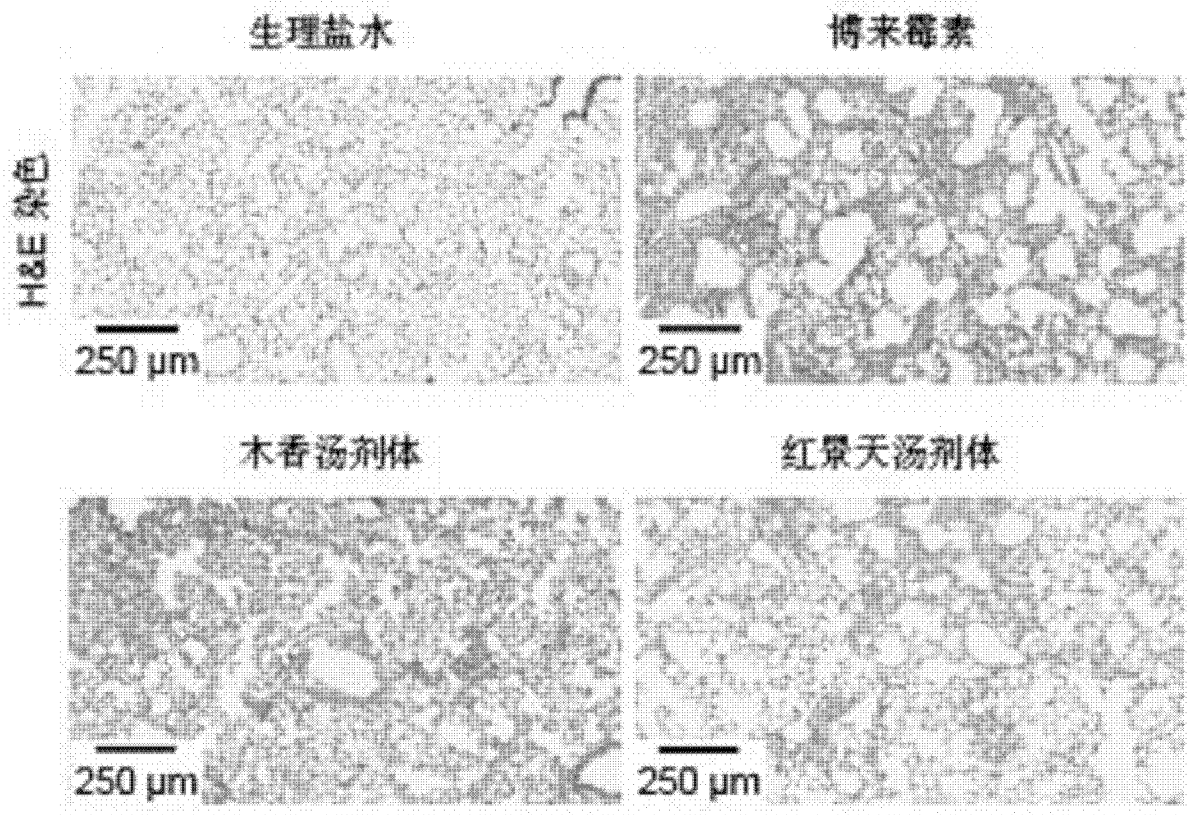

生理盐水
博来霉素
H&E 染色
250 μm
250 μm
木香汤剂体
红景天汤剂体
250 μm
250 μm

图 13

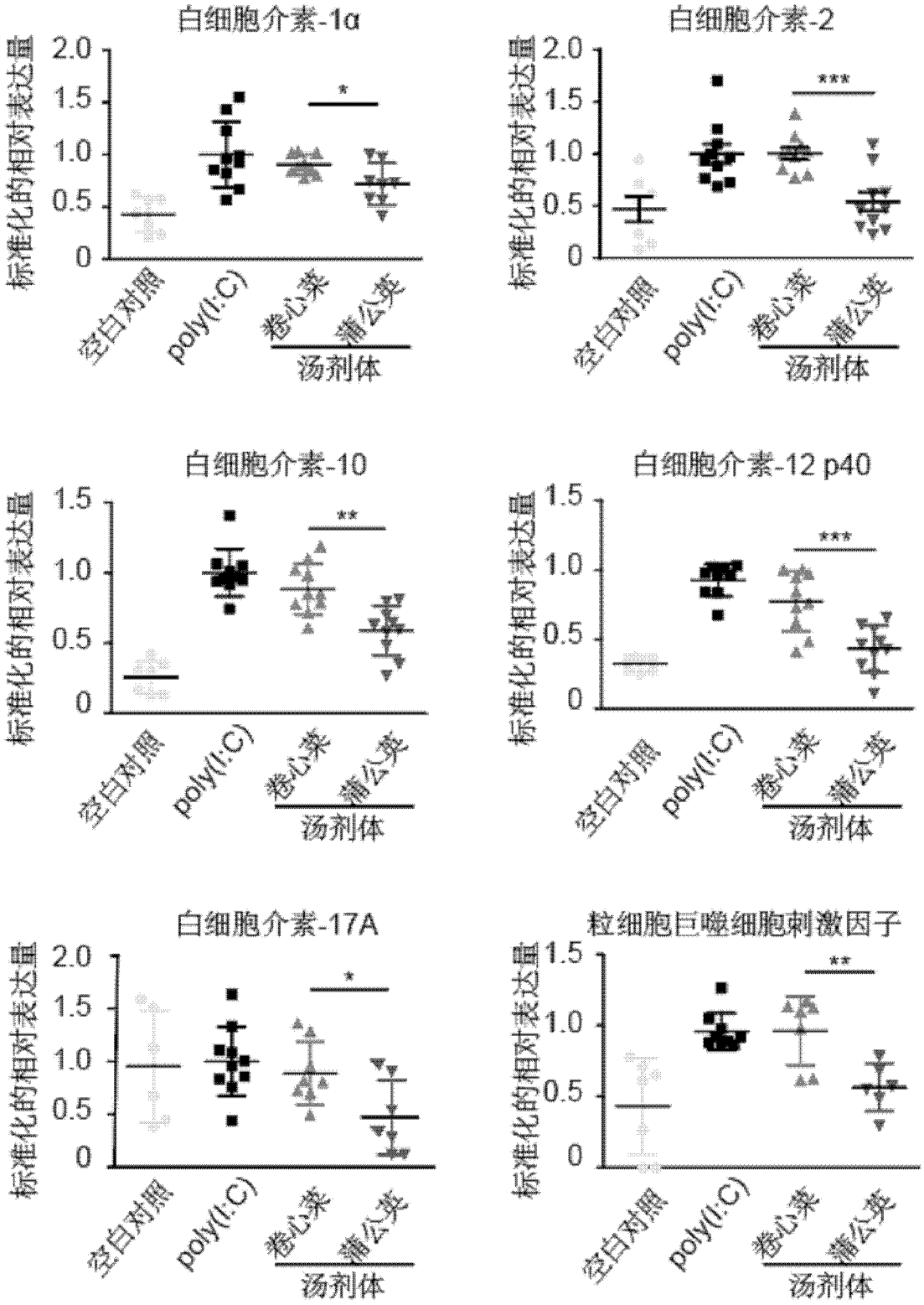

白细胞介素-1α
白细胞介素-2
白细胞介素-10
白细胞介素-12 p40
白细胞介素-17A
粒细胞巨噬细胞刺激因子
标准化的相对表达量
2.0
1.5
1.0
0.5
0
*
**
***
空白对照
poly(I:C)
卷心菜
蒲公英
汤剂体

图 14A

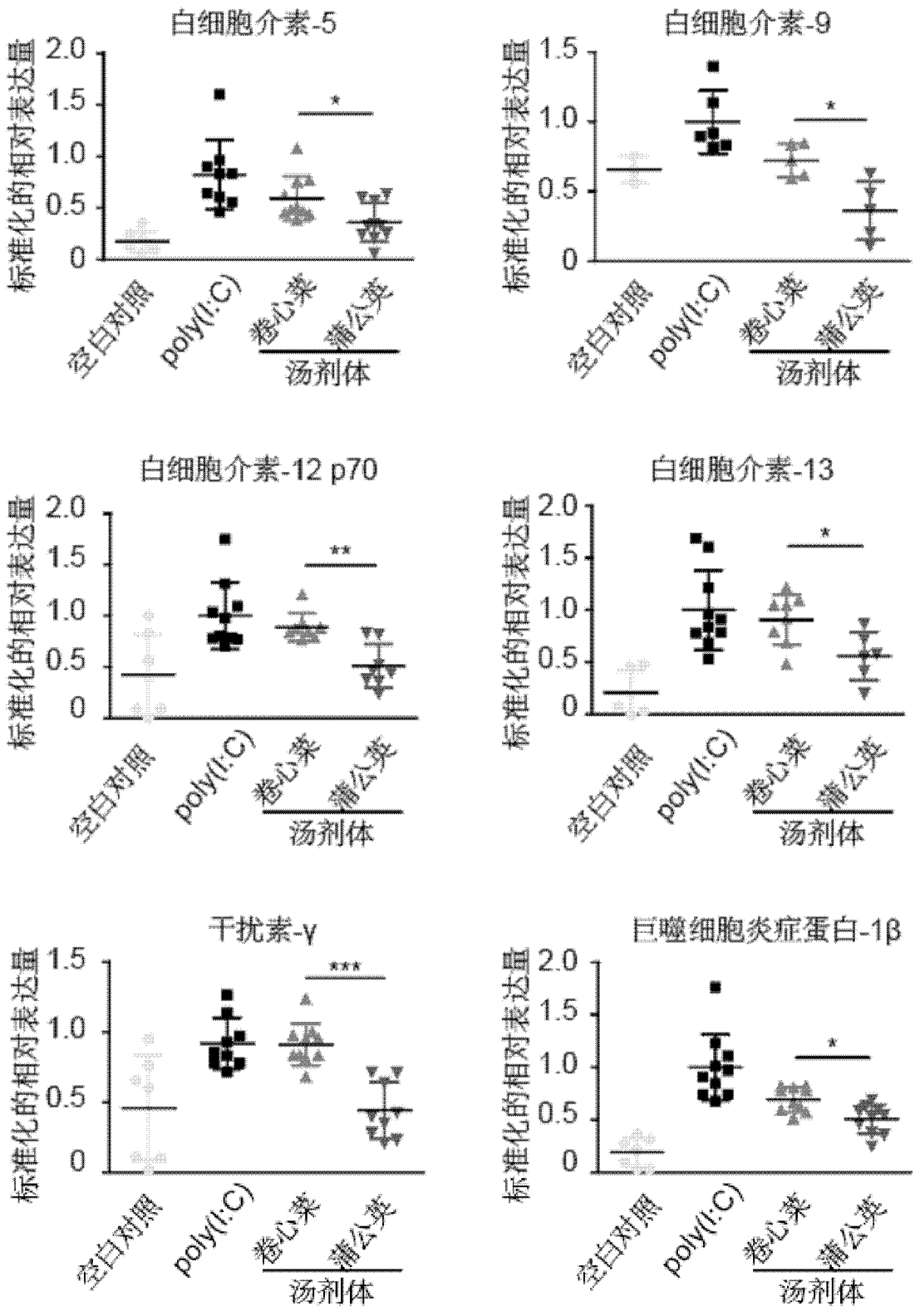

白细胞介素-5
标准化的相对表达量
2.0
1.5
1.0
0.5
0
*
空白对照
poly(I:C)
卷心菜
蒲公英
汤剂体
白细胞介素-9
标准化的相对表达量
1.5
1.0
0.5
0
*
空白对照
poly(I:C)
卷心菜
蒲公英
汤剂体
白细胞介素-12 p70
标准化的相对表达量
2.0
1.5
1.0
0.5
0
**
空白对照
poly(I:C)
卷心菜
蒲公英
汤剂体
白细胞介素-13
标准化的相对表达量
2.0
1.5
1.0
0.5
0
*
空白对照
poly(I:C)
卷心菜
蒲公英
汤剂体
干扰素-γ
标准化的相对表达量
1.5
1.0
0.5
0
***
空白对照
poly(I:C)
卷心菜
蒲公英
汤剂体
巨噬细胞炎症蛋白-1β
标准化的相对表达量
2.0
1.5
1.0
0.5
0
*
空白对照
poly(I:C)
卷心菜
蒲公英
汤剂体

图 14B

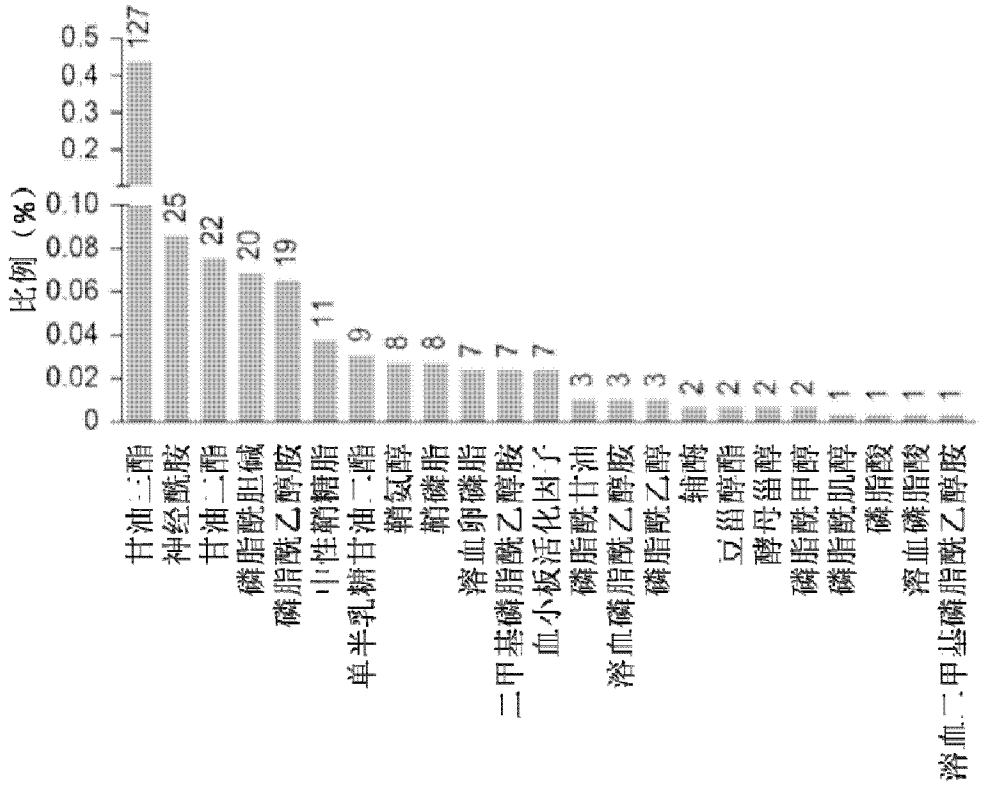

比例（%）
0
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
0.2
0.3
0.4
0.5
127
25
22
20
19
11
9
8
8
7
7
7
3
3
3
2
2
2
1
1
1
1
甘油三酯
神经酰胺
甘油二酯
磷脂酰胆碱
磷脂酰乙醇胺
中性鞘糖脂
单半乳糖甘油二酯
鞘氨醇
鞘磷脂
溶血卵磷脂
二甲基磷脂酰乙醇胺
血小板活化因子
磷脂酰甘油
溶血磷脂酰乙醇胺
磷脂酰乙醇
辅酶
豆甾醇酯
酵母甾醇
磷脂酰甲醇
磷脂酰肌醇
磷脂酸
溶血磷脂酸
溶血二甲基磷脂酰乙醇胺

图 15

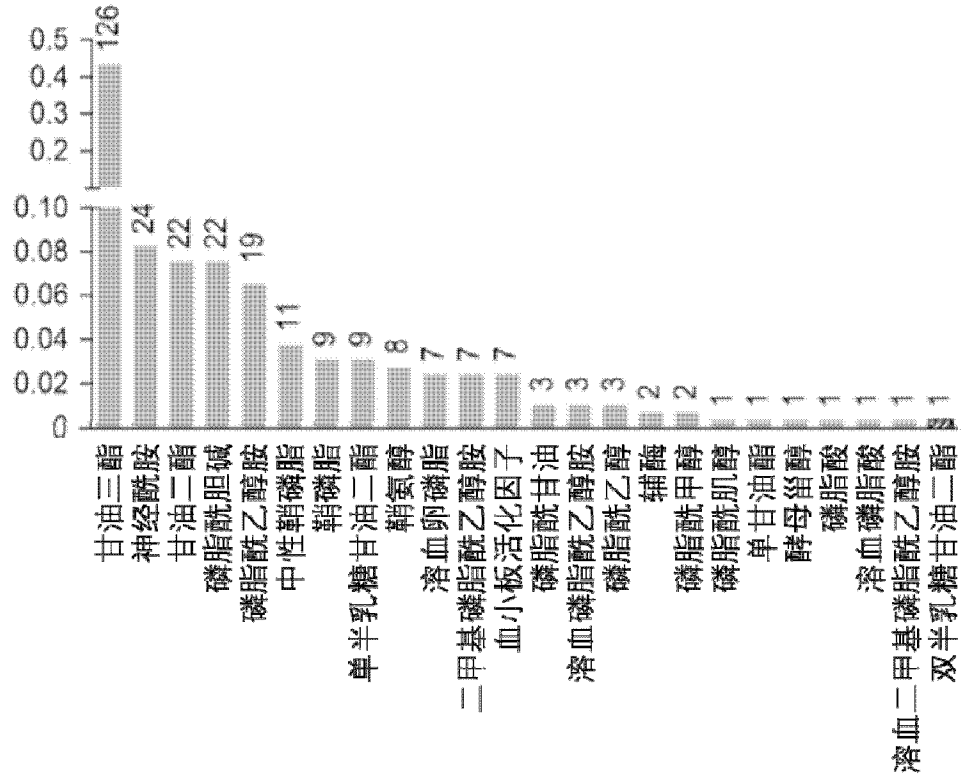

0
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
0.2
0.3
0.4
0.5
126
24
22
22
19
11
9
9
8
7
7
7
3
3
3
2
2
1
1
1
1
1
1
甘油三酯
神经酰胺
甘油二酯
磷脂酰胆碱
磷脂酰乙醇胺
中性鞘磷脂
鞘磷脂
单半乳糖甘油二酯
鞘氨醇
溶血卵磷脂
二甲基磷脂酰乙醇胺
血小板活化因子
磷脂酰甘油
溶血磷脂酰乙醇胺
磷脂酰乙醇
辅酶
磷脂酰甲醇
磷脂酰肌醇
单甘油酯
酵母甾醇
磷脂酸
溶血磷脂酸
溶血二甲基磷脂酰乙醇胺
双半乳糖甘油二酯

图 16

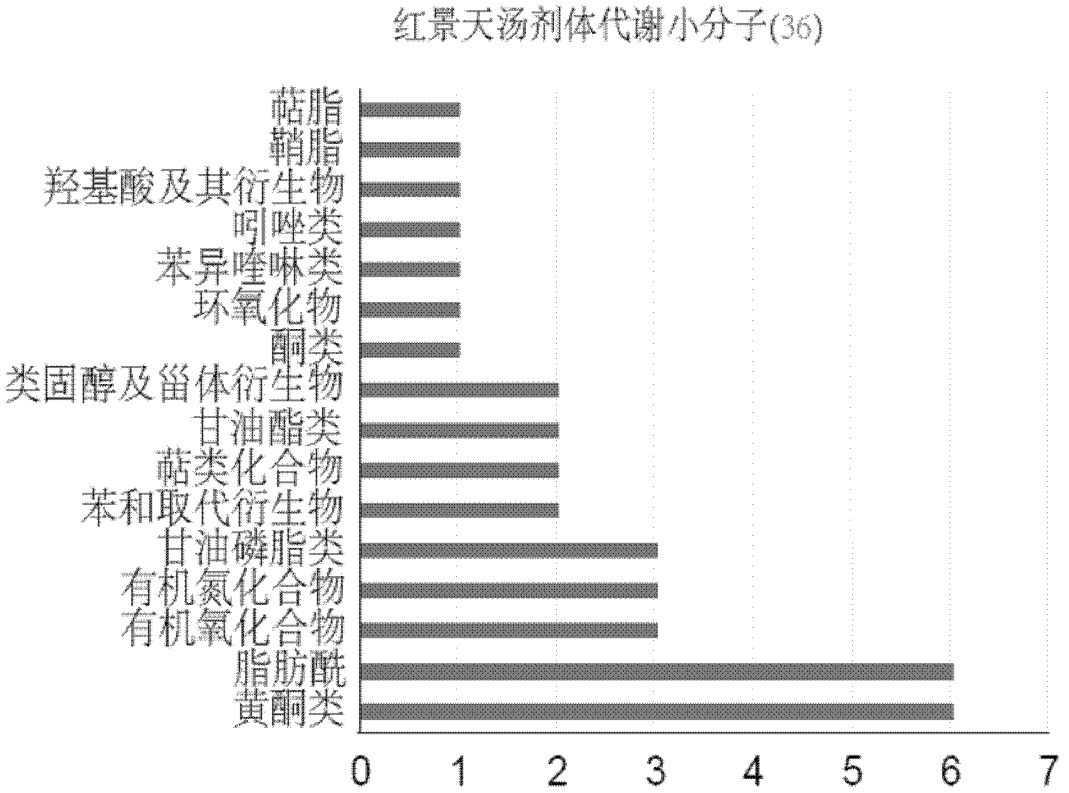

红景天汤剂体代谢小分子(36)
萜脂
鞘脂
羟基酸及其衍生物
吲唑类
苯异噁唑类
环氧化物
酮类
类固醇及甾体衍生物
甘油酯类
萜类化合物
苯和取代衍生物
甘油磷脂类
有机氮化合物
有机氧化合物
脂肪酰
黄酮类
0
1
2
3
4
5
6
7

图 17

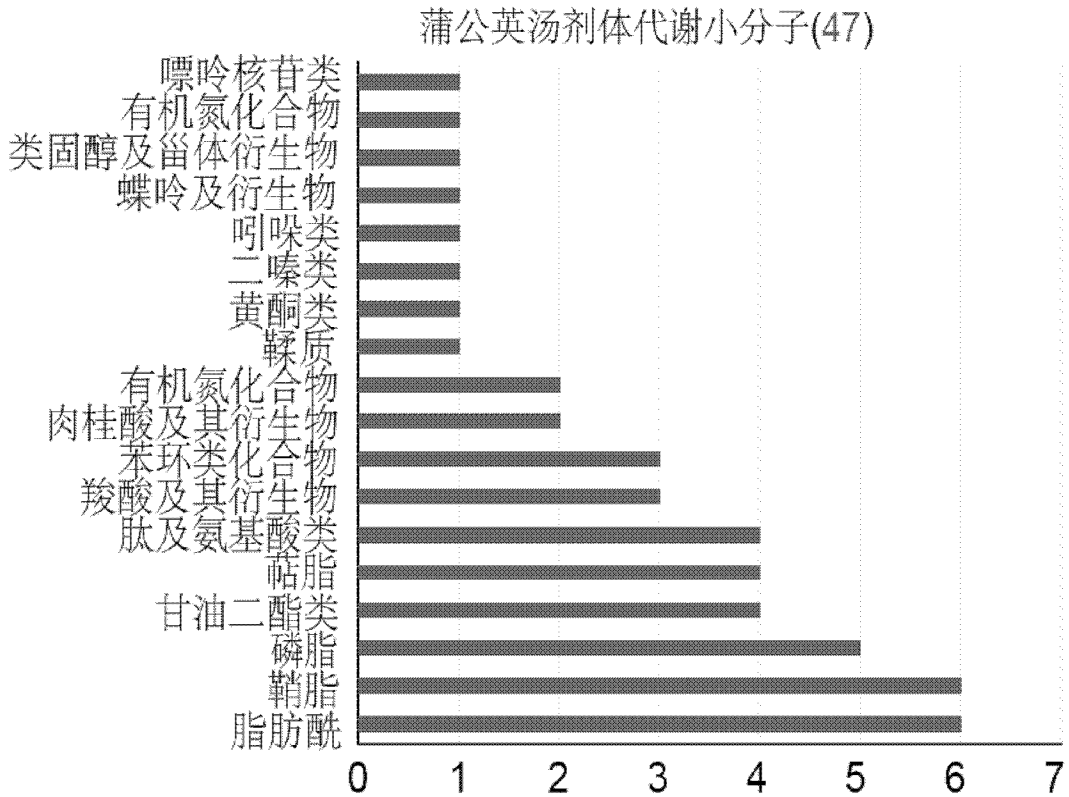

蒲公英汤剂体代谢小分子(47)
嘌呤核苷类
有机氮化合物
类固醇及甾体衍生物
蝶呤及衍生物
吲哚类
二噻类
黄酮类
鞣质
有机氮化合物
肉桂酸及其衍生物
苯环类化合物
羧酸及其衍生物
肽及氨基酸类
萜脂
甘油二酯类
磷脂
鞘脂
脂肪酰
0
1
2
3
4
5
6
7

图 18

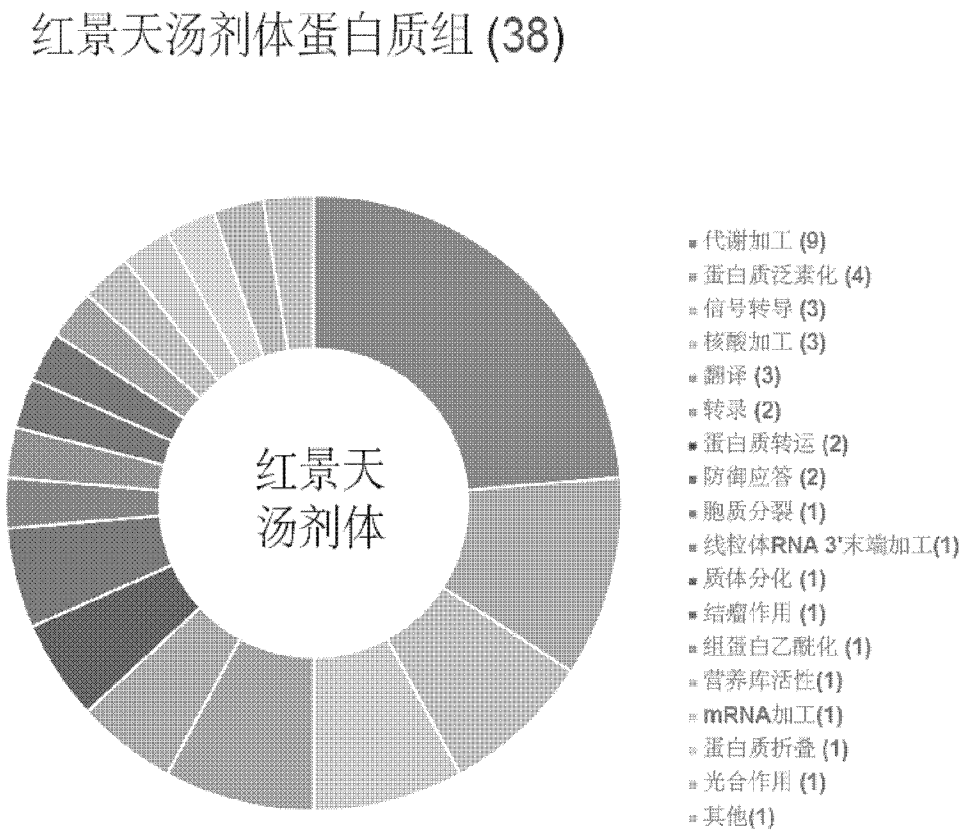

红景天汤剂体蛋白质组 (38)
红景天
汤剂体
代谢加工 (9)
蛋白质泛素化 (4)
信号转导 (3)
核酸加工 (3)
翻译 (3)
转录 (2)
蛋白质转运 (2)
防御应答 (2)
胞质分裂 (1)
线粒体RNA 3'末端加工(1)
质体分化 (1)
结瘤作用 (1)
组蛋白乙酰化 (1)
营养库活性(1)
mRNA加工(1)
蛋白质折叠 (1)
光合作用 (1)
其他(1)

图 19

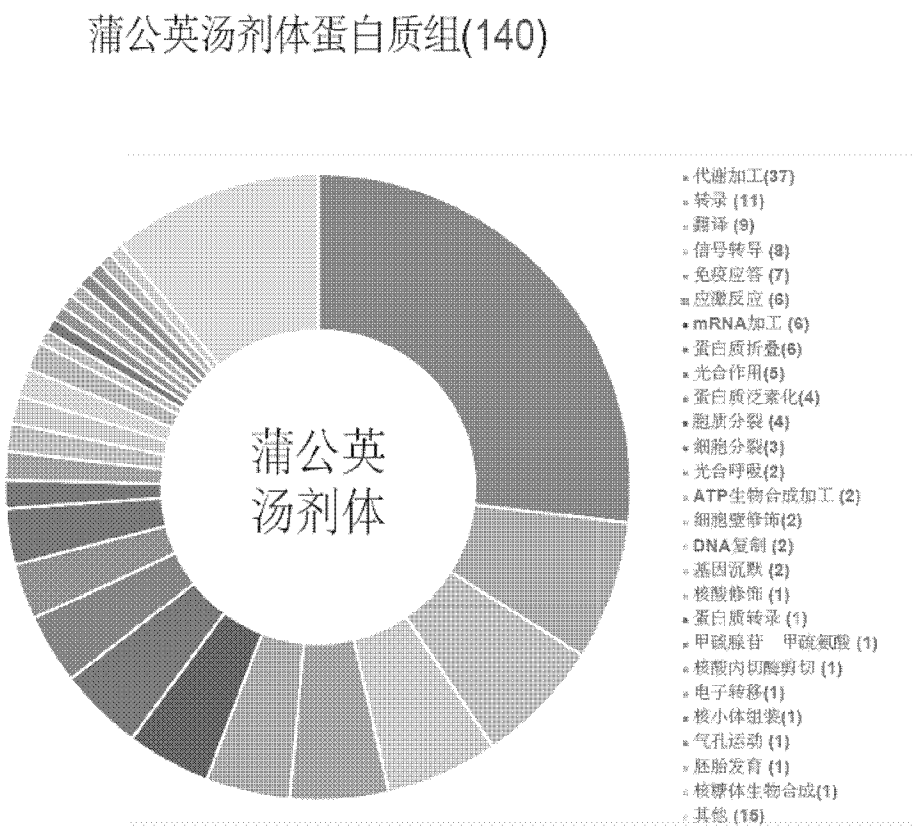

蒲公英汤剂体蛋白质组(140)
蒲公英
汤剂体
代谢加工(37)
转录 (11)
翻译 (9)
信号转导 (8)
免疫应答 (7)
应激反应 (6)
mRNA加工 (6)
蛋白质折叠(6)
光合作用(5)
蛋白质泛素化(4)
胞质分裂 (4)
细胞分裂(3)
光合呼吸(2)
ATP生物合成加工 (2)
细胞壁修饰(2)
DNA复制 (2)
基因沉默 (2)
核酸修饰 (1)
蛋白质转录 (1)
甲硫腺苷 甲硫氨酸 (1)
核酸内切酶剪切 (1)
电子转移(1)
核小体组装(1)
气孔运动 (1)
胚胎发育 (1)
核糖体生物合成(1)
其他 (15)

图 20

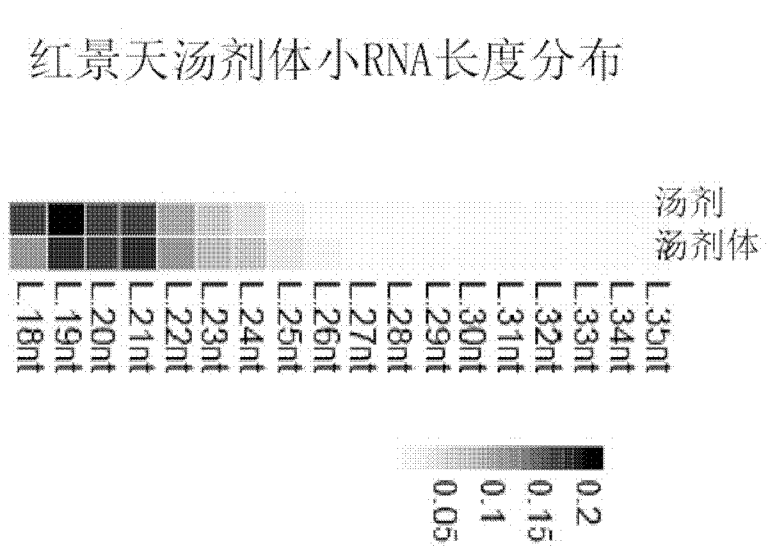

红景天汤剂体小RNA长度分布
汤剂
汤剂体
L.18nt
L.19nt
L.20nt
L.21nt
L.22nt
L.23nt
L.24nt
L.25nt
L.26nt
L.27nt
L.28nt
L.29nt
L.30nt
L.31nt
L.32nt
L.33nt
L.34nt
L.35nt
0.05
0.1
0.15
0.2

图 21

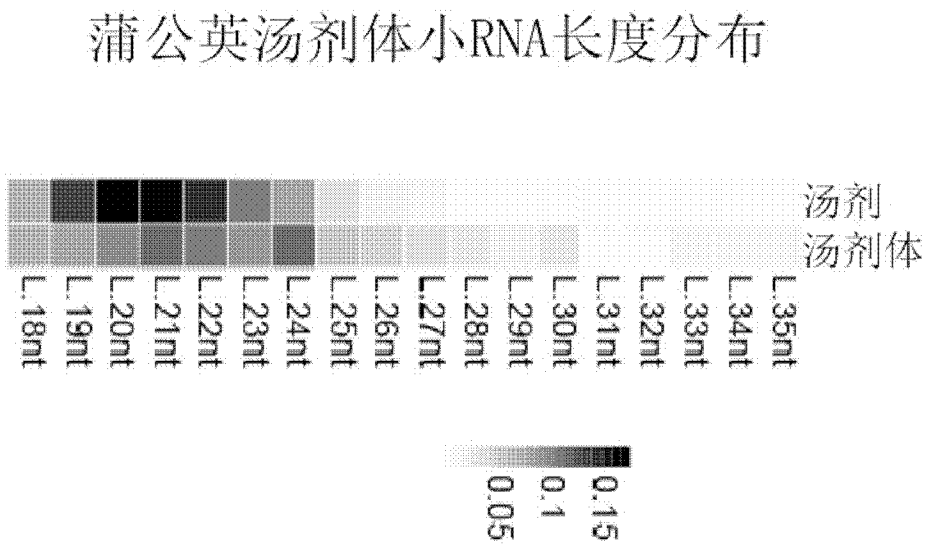

蒲公英汤剂体小RNA长度分布
汤剂
汤剂体
L.18nt
L.19nt
L.20nt
L.21nt
L.22nt
L.23nt
L.24nt
L.25nt
L.26nt
L.27nt
L.28nt
L.29nt
L.30nt
L.31nt
L.32nt
L.33nt
L.34nt
L.35nt
0.05
0.1
0.15

图 22

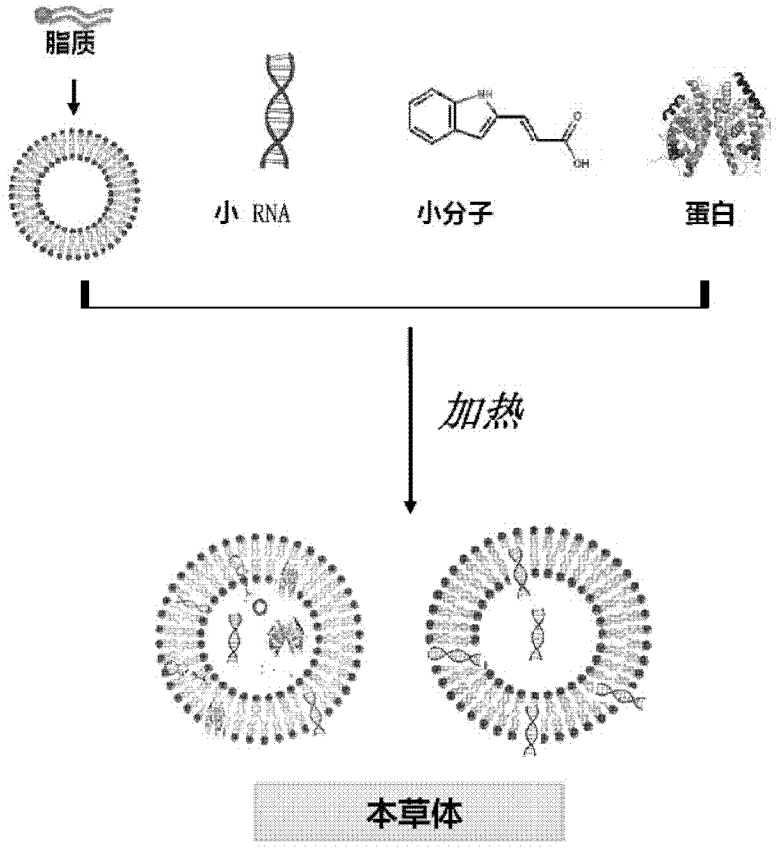


图 23

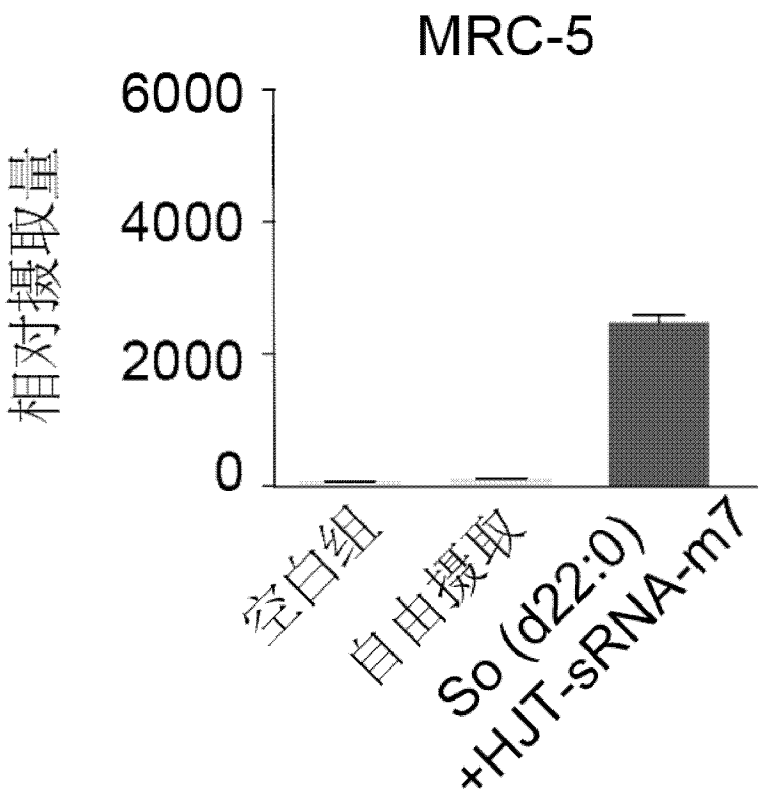


图 24

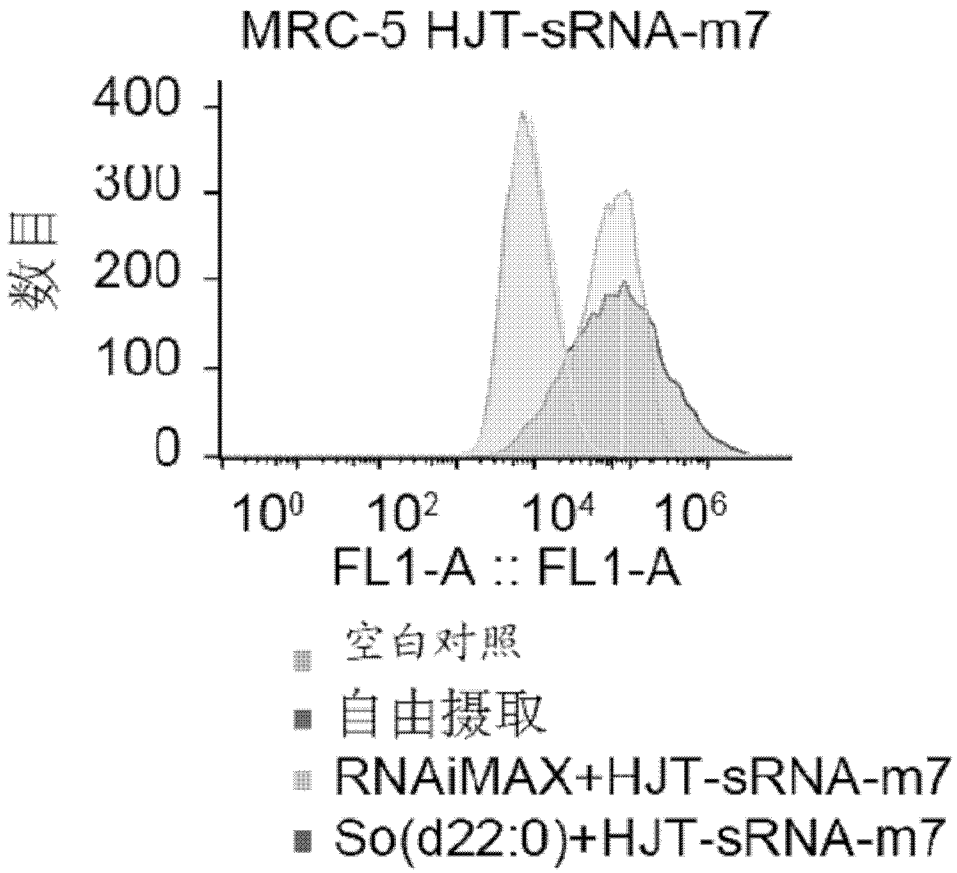

MRC-5 HJT-sRNA-m7
400
300
200
100
0
数目
10^0
10^2
10^4
10^6
FL1-A :: FL1-A
空白对照
自由摄取
RNAiMAX+HJT-sRNA-m7
So(d22:0)+HJT-sRNA-m7

图 25

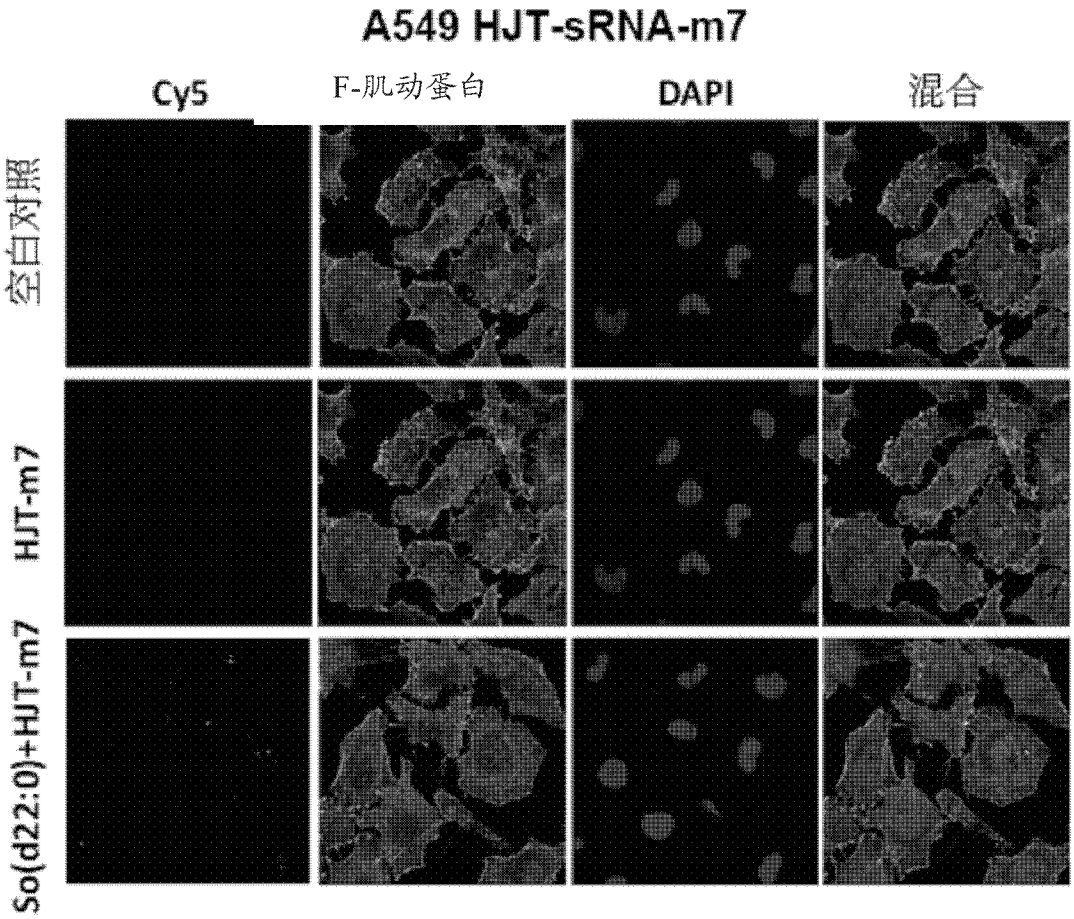

A549 HJT-sRNA-m7
Cy5
F-肌动蛋白
DAPI
混合
空白对照
HJT-m7
So(d22:0)+HJT-m7

图 26

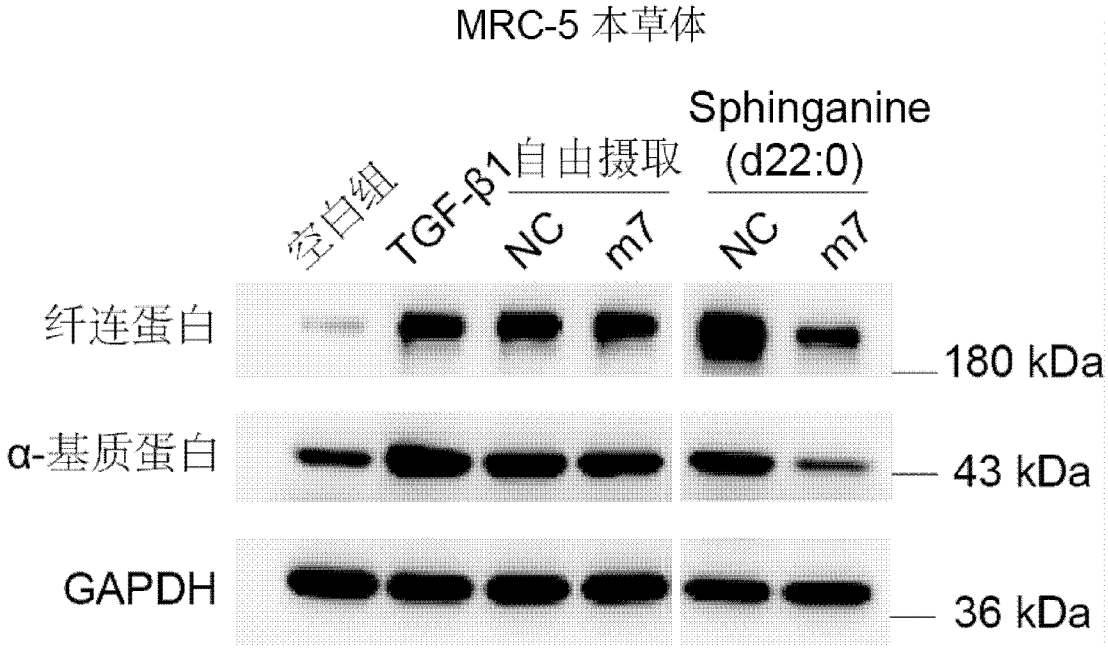

MRC-5 本草体
Sphinganine
(d22:0)
空白组
TGF-β1
自由摄取
NC
m7
NC
m7
纤连蛋白
180 kDa
α-基质蛋白
43 kDa
GAPDH
36 kDa

图 27

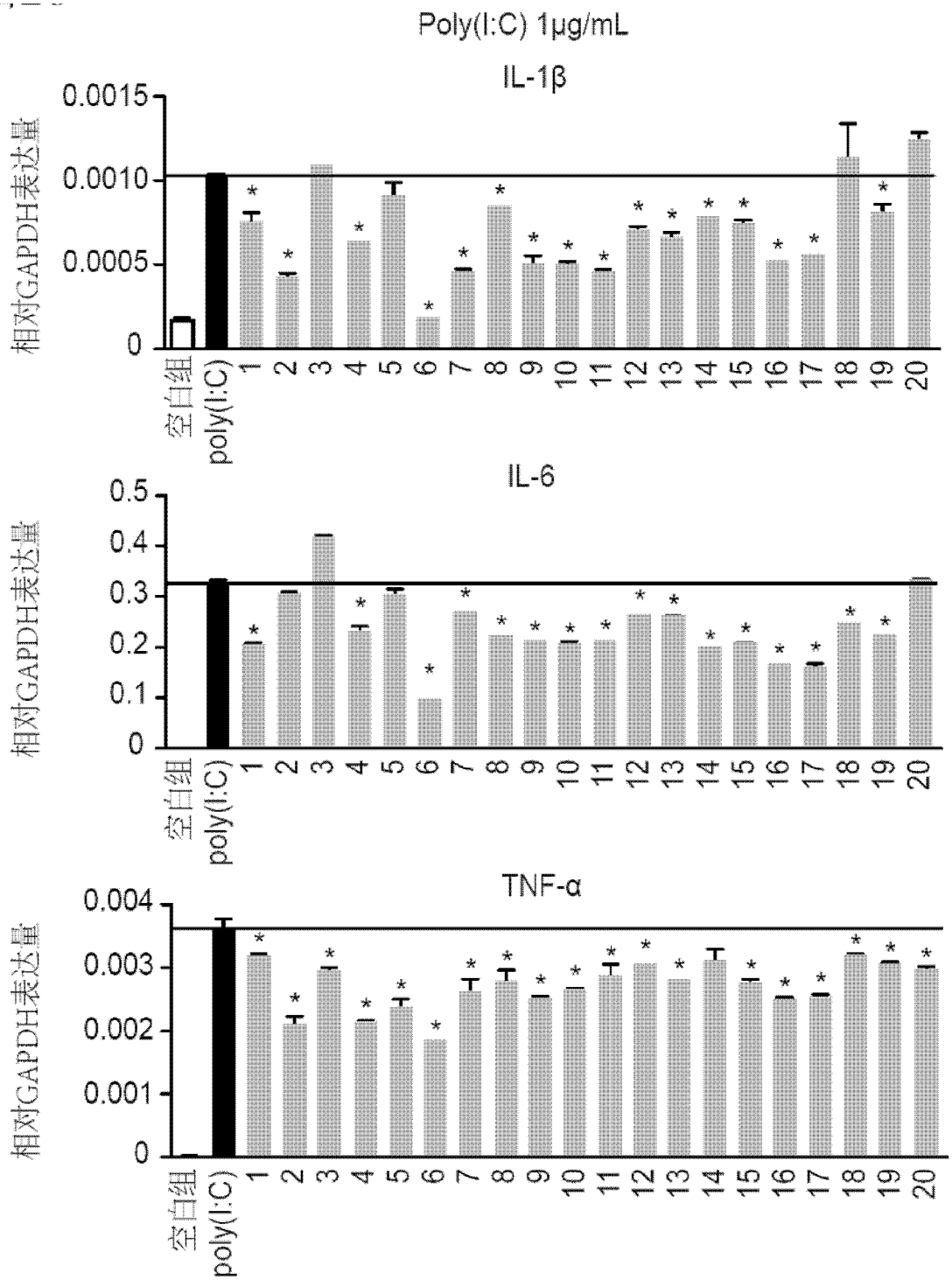

Poly(I:C) 1μg/mL
IL-1β
相对GAPDH表达量
0.0015
0.0010
0.0005
0
空白组
poly(I:C)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
IL-6
相对GAPDH表达量
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
空白组
poly(I:C)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
TNF-α
相对GAPDH表达量
0.004
0.003
0.002
0.001
0
空白组
poly(I:C)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

图 28

A549 poly I:C (1 微克/毫升)

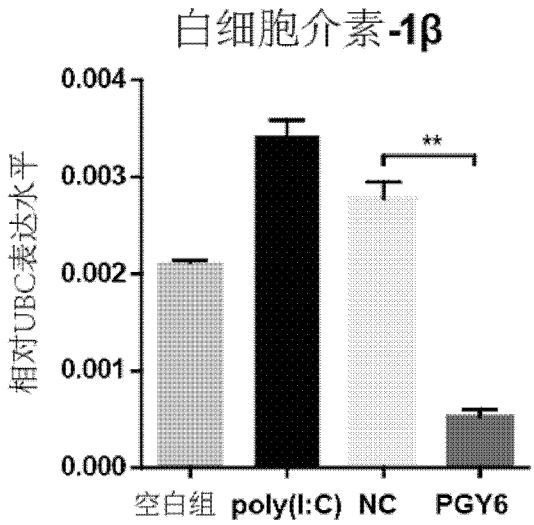


图 29A

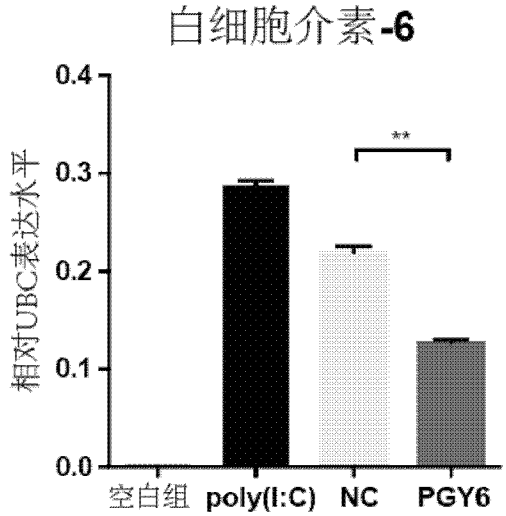


图 29B

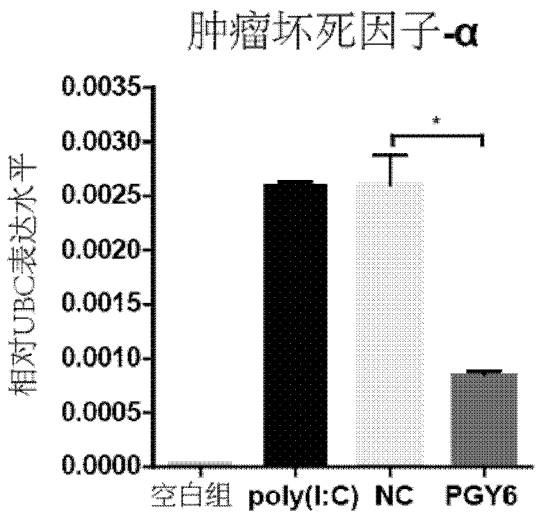


图 29C

PBMC poly I:C (1 微克/毫升)

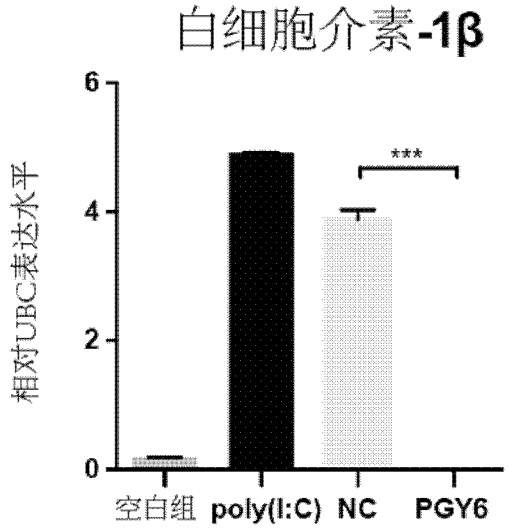


图 30A

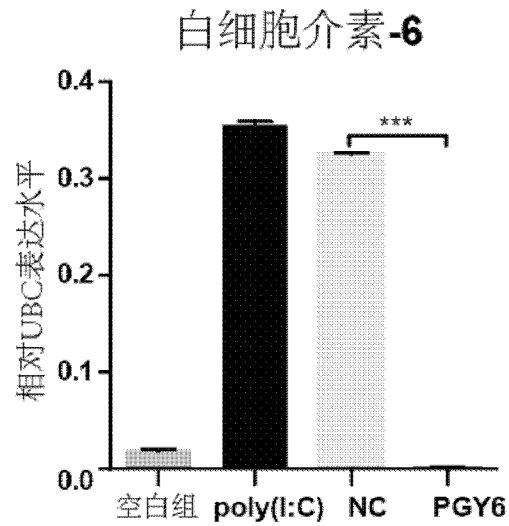

白细胞介素-6
相对UBC表达水平
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
***
空白组
poly(I:C)
NC
PGY6

图 30B

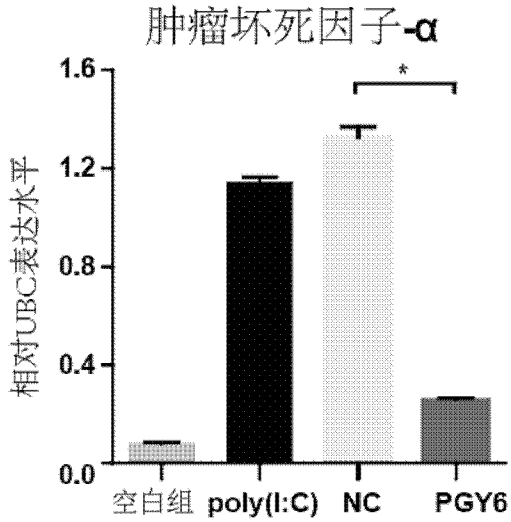

肿瘤坏死因子-α
相对UBC表达水平
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
*
空白组
poly(I:C)
NC
PGY6

图 30C

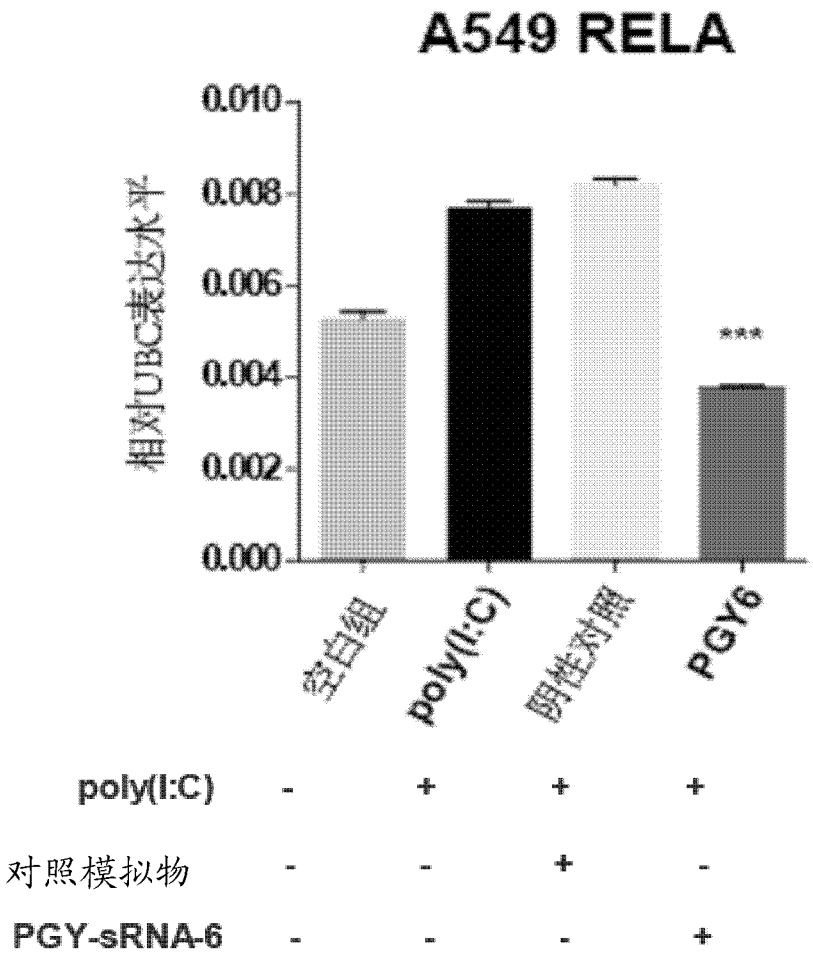

A549 RELA
相对UBC表达水平
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
***
空白组
poly(I:C)
阴性对照
PGY6
poly(I:C) - + + +
对照模拟物 - - + -
PGY-sRNA-6 - - - +

图 31

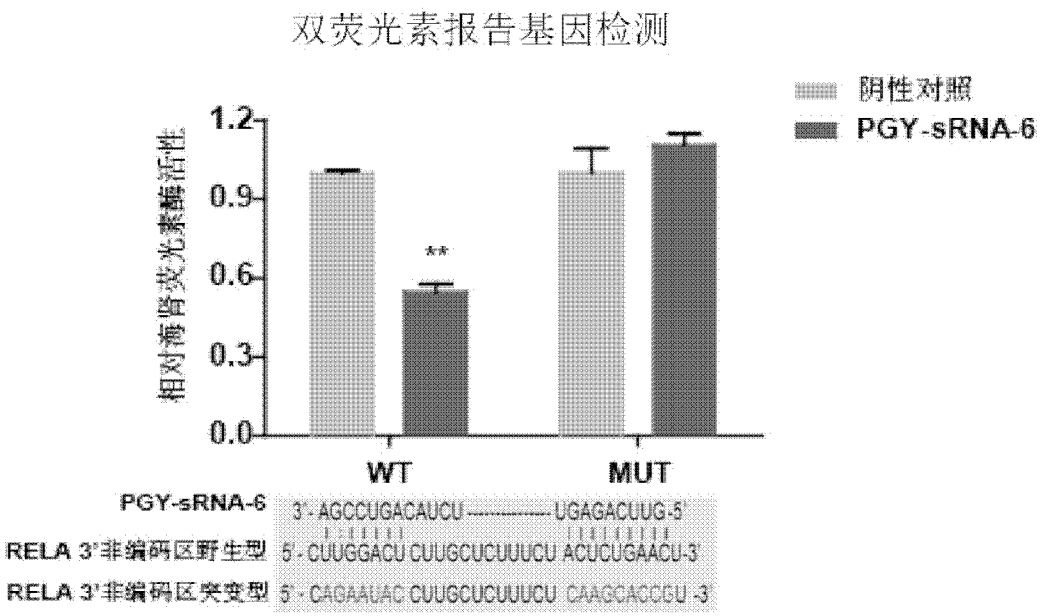

双荧光素报告基因检测
阴性对照
PGY-sRNA-6
相对海肾荧光素酶活性
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
**
WT
MUT
PGY-sRNA-6 3'-AGCCUGACAUCU---------UGAGACUUG-5'
RELA 3'非编码区野生型 5'-CUUGGACU CUUGCUCUUUCU ACUCUGAACU-3'
RELA 3'非编码区突变型 5'-CAGAAUAC CUUGCUCUUUCU CAAGCACCGU-3'

图 32

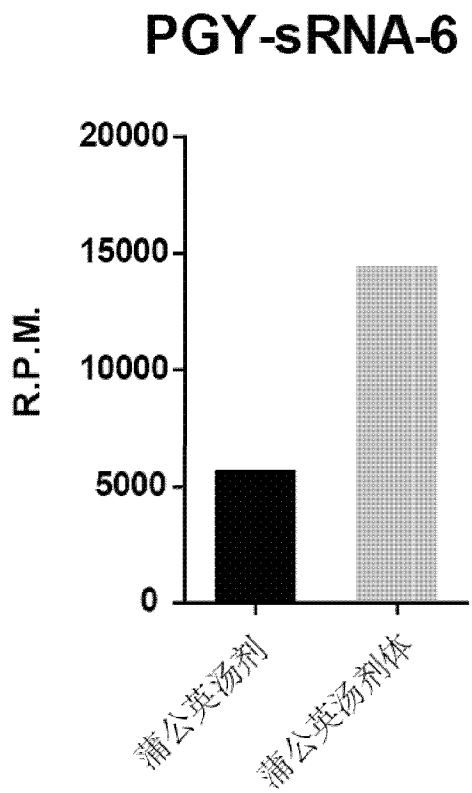

PGY-sRNA-6
20000
15000
10000
5000
0
R.P.M.
蒲公英汤剂
蒲公英汤剂体

图 33

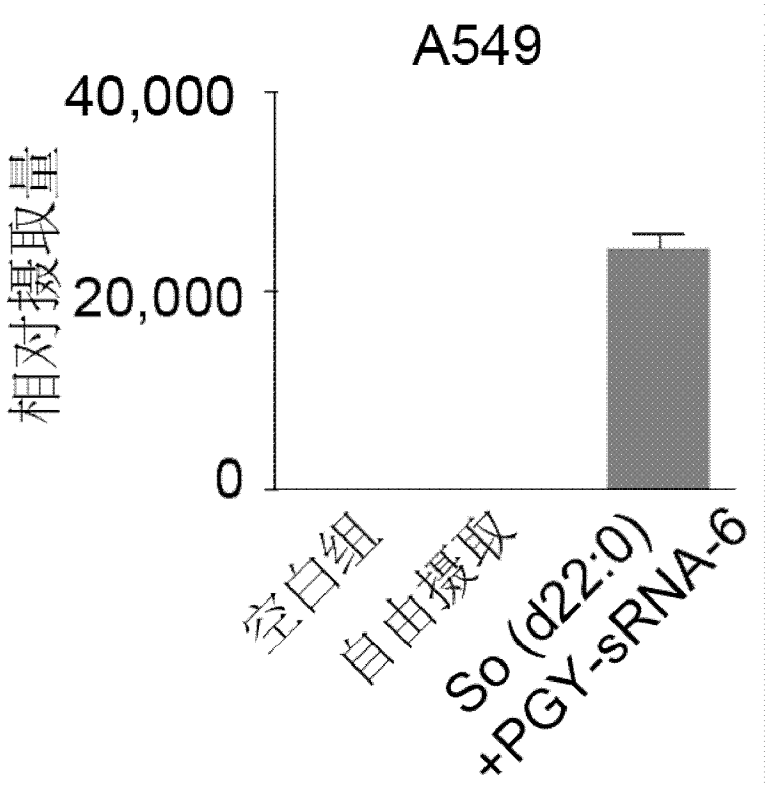

A549
40,000
20,000
0
相对摄取量
空白组
自由摄取
So (d22:0)
+PGY-sRNA-6

图 34

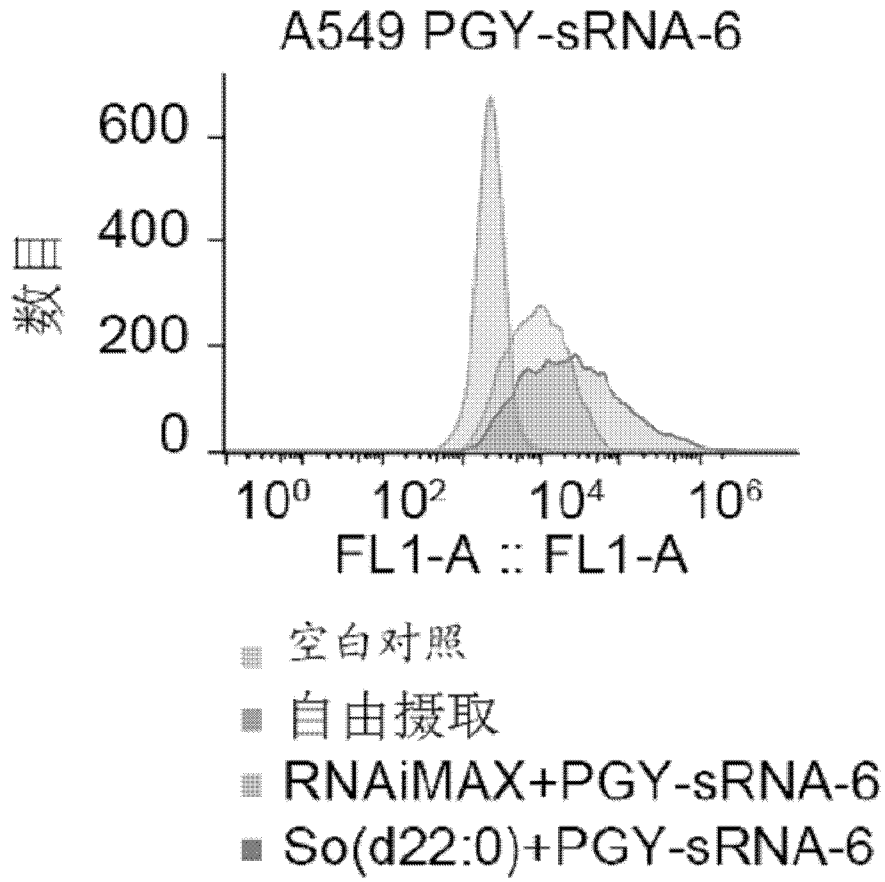

A549 PGY-sRNA-6
600
400
200
0
数目
10^0 10^2 10^4 10^6
FL1-A :: FL1-A
空白对照
自由摄取
RNAiMAX+PGY-sRNA-6
So(d22:0)+PGY-sRNA-6

图 35

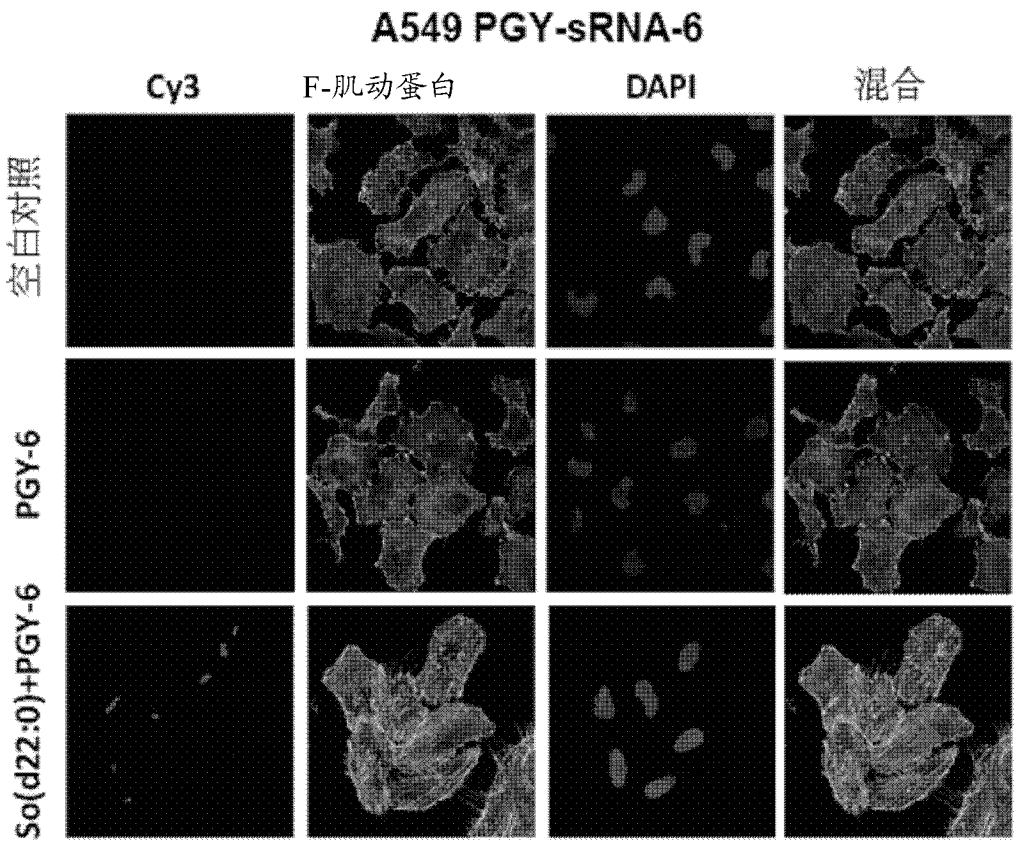


图 36

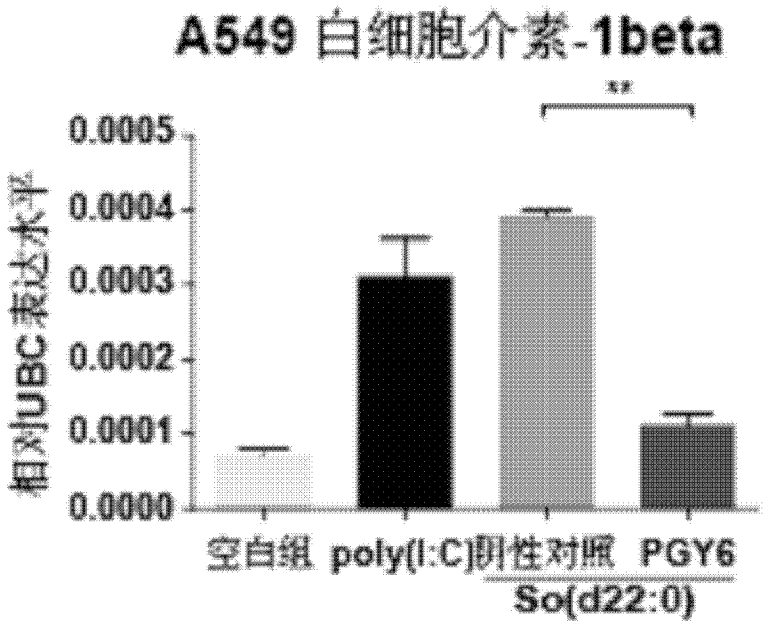

A549 白细胞介素-1beta
**
0.0005
0.0004
0.0003
0.0002
0.0001
0.0000
相对UBC表达水平
空白组
poly(I:C)阳性对照
PGY6
So(d22:0)

图 37A

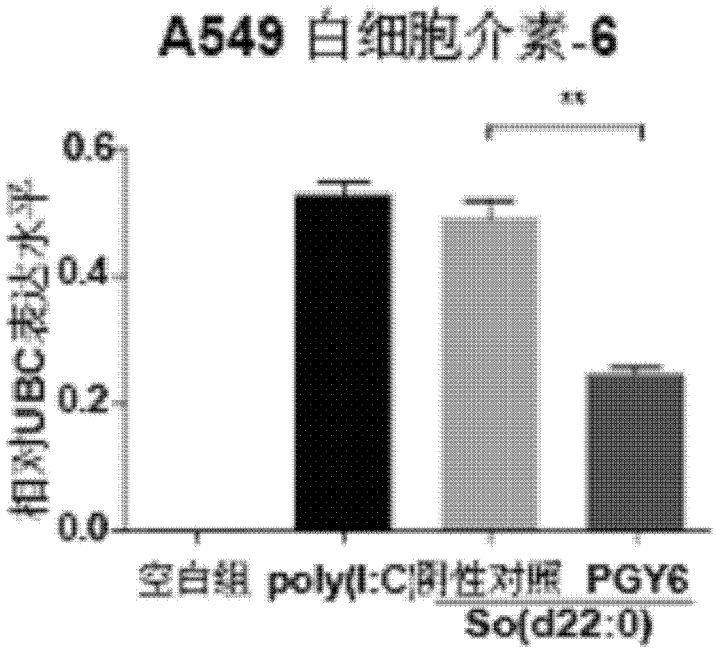

A549 白细胞介素-6
**
0.6
0.4
0.2
0.0
相对UBC表达水平
空白组
poly(I:C)阳性对照
PGY6
So(d22:0)

图 37B

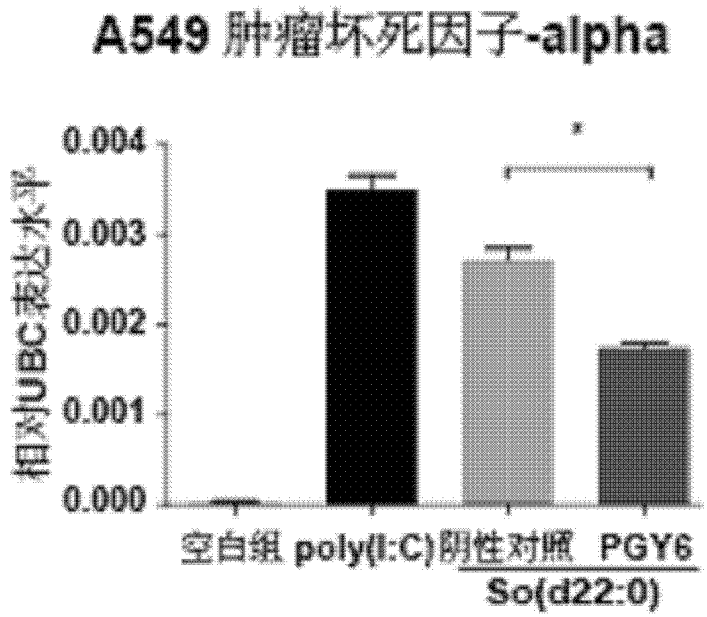

A549 肿瘤坏死因子-alpha
相对UBC表达水平
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
*
空白组
poly(I:C)
阴性对照
PGY6
So(d22:0)

图 37C

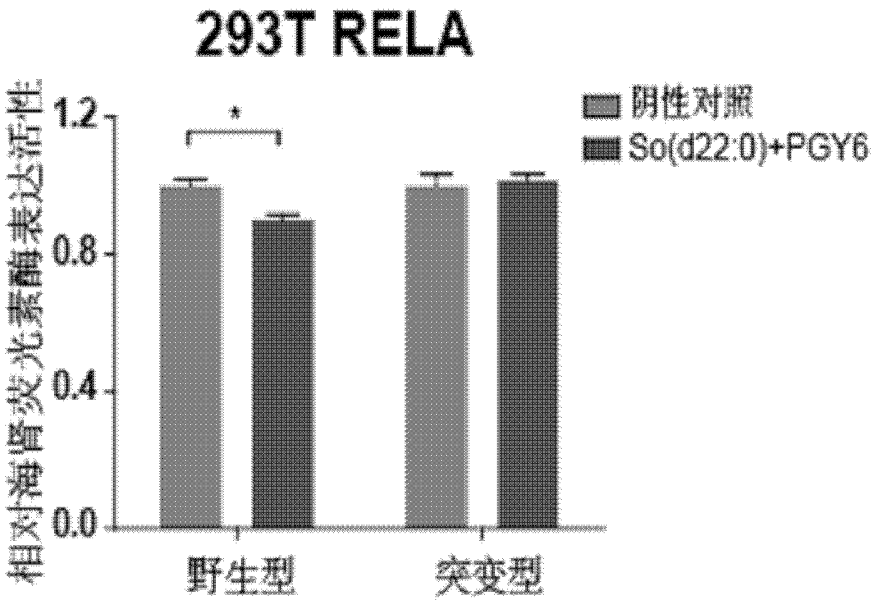

293T RELA
相对海肾荧光素酶表达活性
1.2
0.8
0.4
0.0
*
阴性对照
So(d22:0)+PGY6
野生型
突变型

图 38

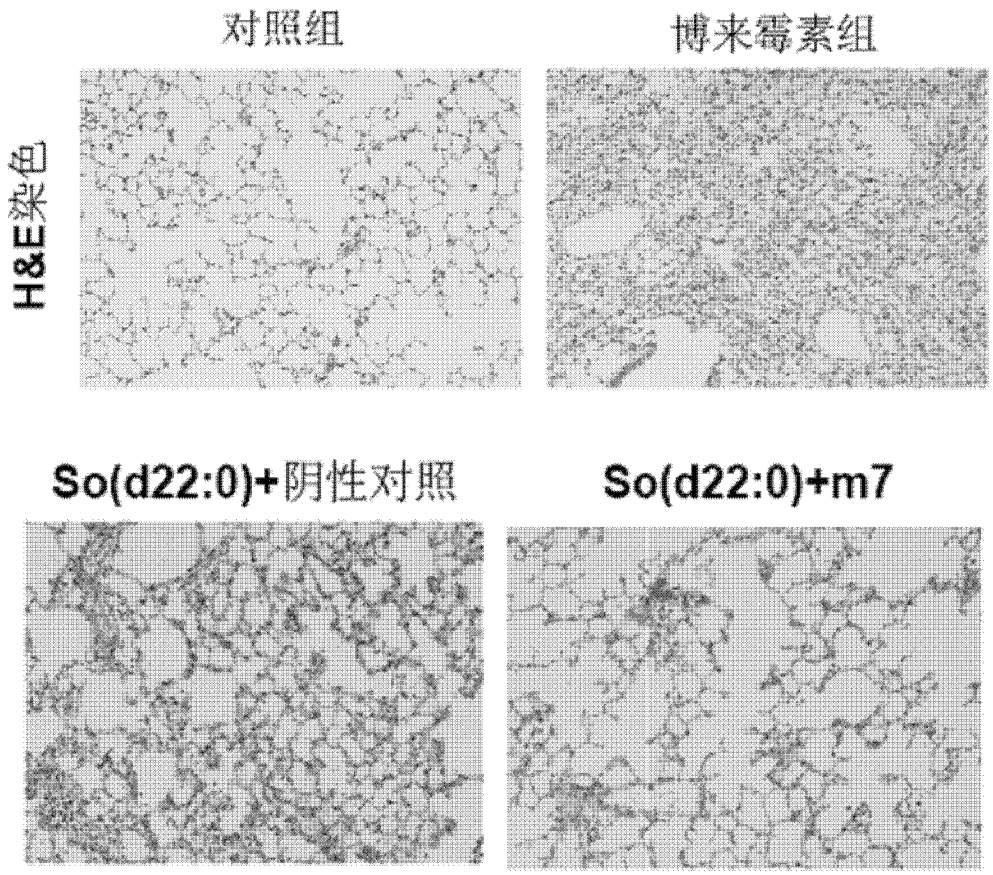


图 39

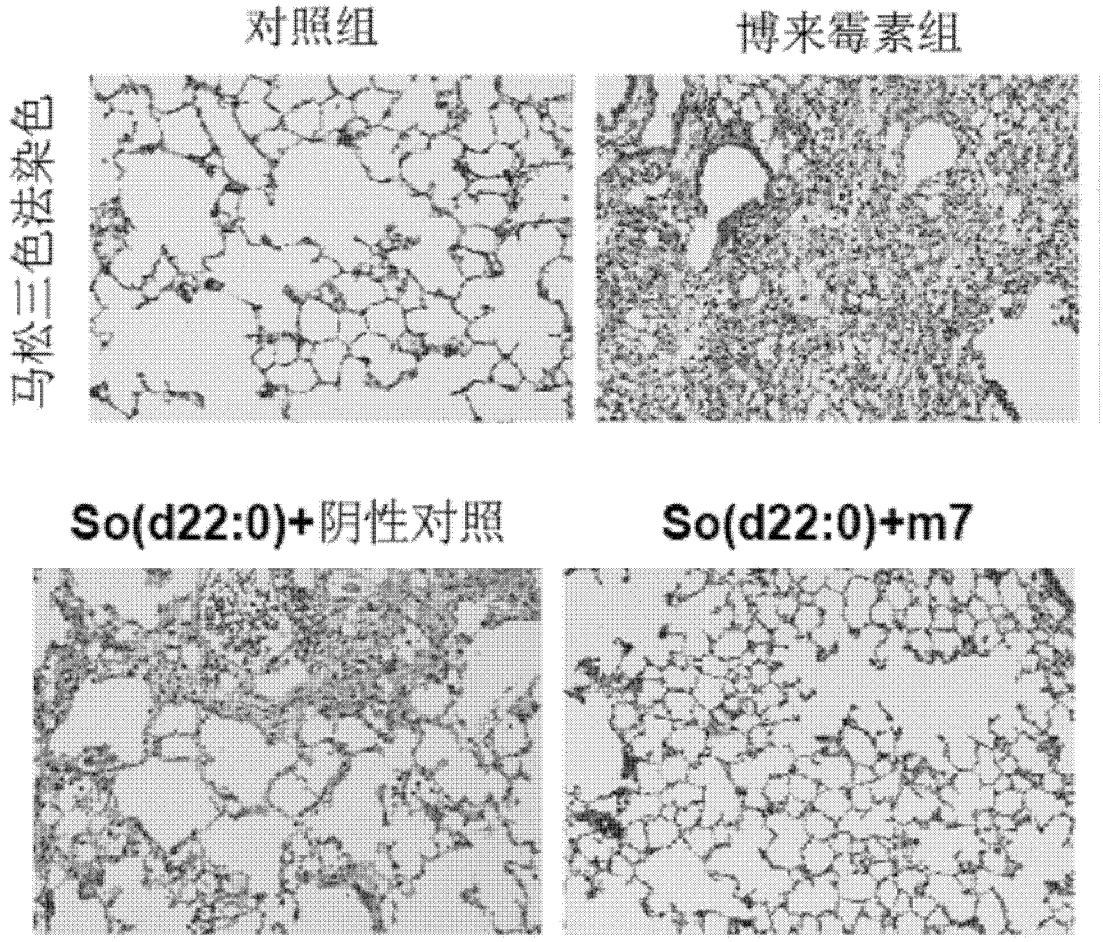


图 40

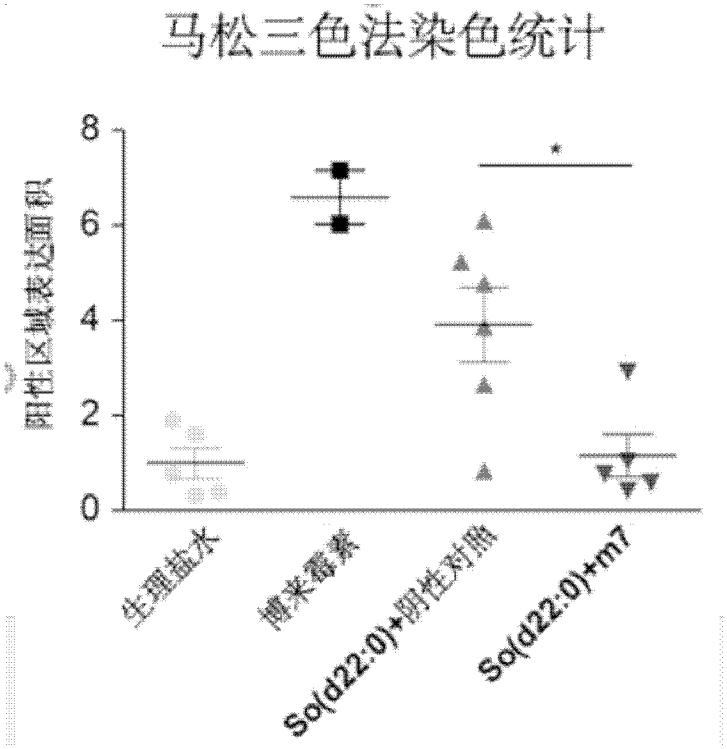


图 41

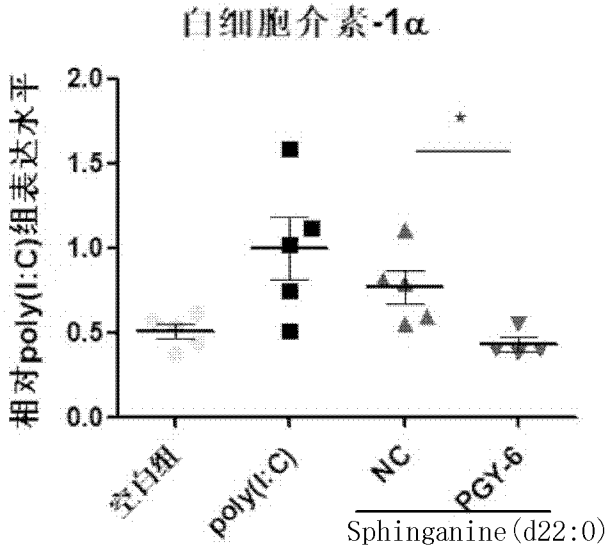

白细胞介素-1α
相对poly(I:C)组表达水平
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
空白组
poly(I:C)
NC
PGY-6
Sphinganine(d22:0)

图 42A

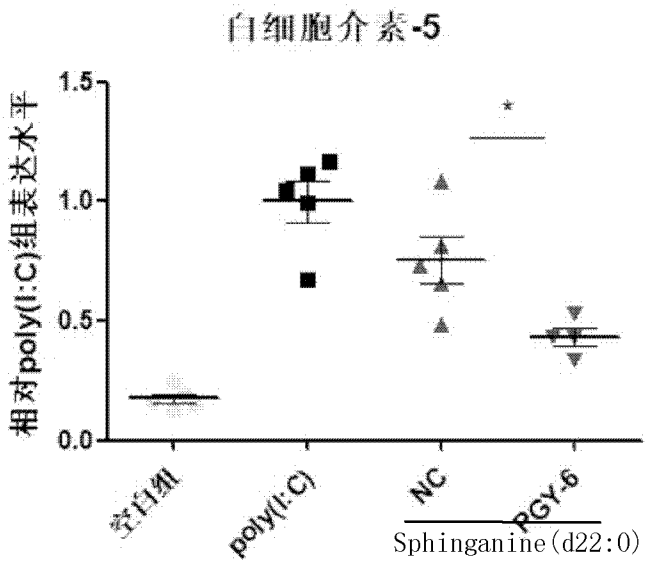

白细胞介素-5
相对poly(I:C)组表达水平
1.5
1.0
0.5
0.0
*
空白组
poly(I:C)
NC
PGY-6
Sphinganine(d22:0)

图 42B

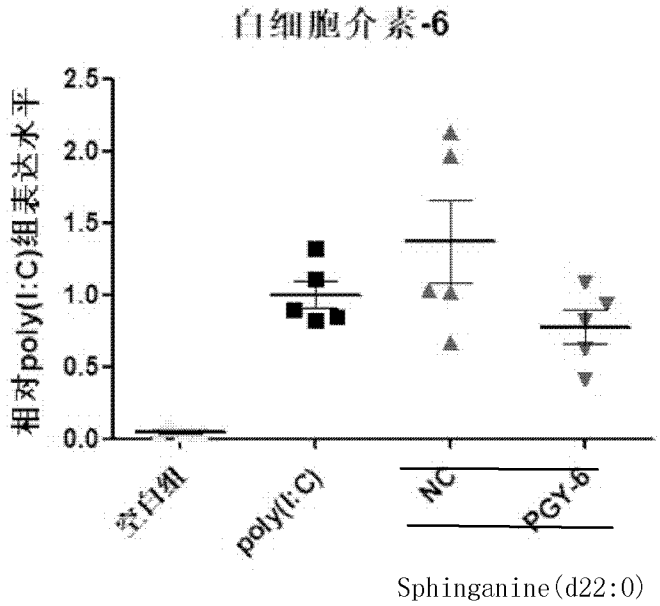

白细胞介素-6
相对poly(I:C)组表达水平
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
空白组
poly(I:C)
NC
PGY-6
Sphinganine(d22:0)

图 42C

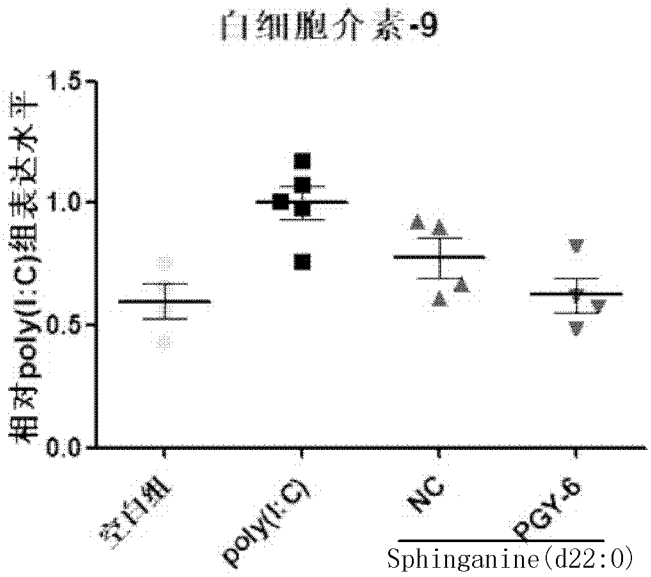

白细胞介素-9
相对poly(I:C)组表达水平
1.5
1.0
0.5
0.0
空白组
poly(I:C)
NC
PGY-6
Sphinganine(d22:0)

图 42D

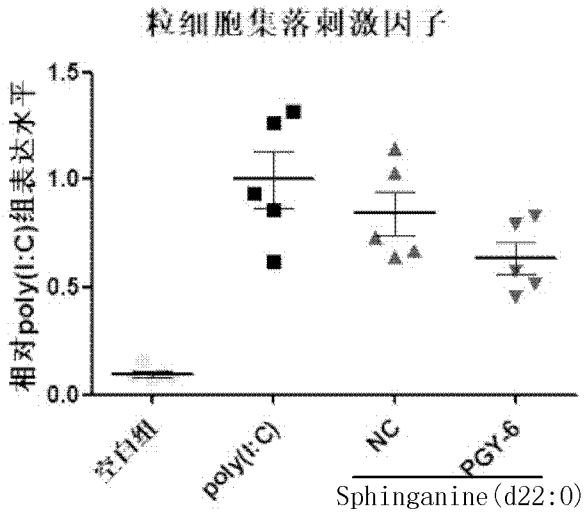

粒细胞集落刺激因子
相对poly(I:C)组表达水平
1.5
1.0
0.5
0.0
空白组
poly(I:C)
NC
PGY-6
Sphinganine(d22:0)

图 42E

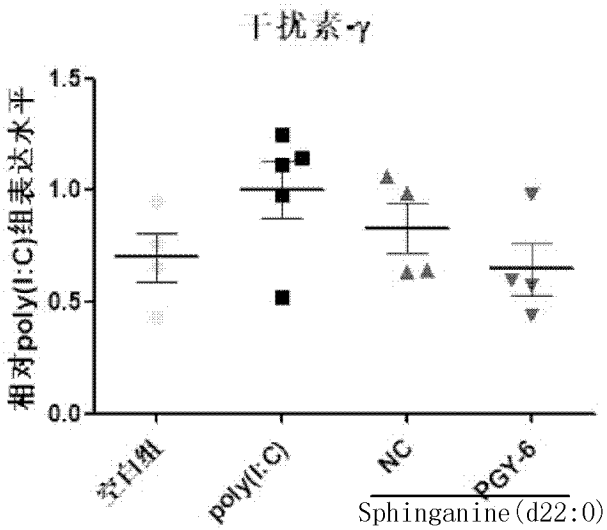

干扰素-γ
相对poly(I:C)组表达水平
1.5
1.0
0.5
0.0
空白组
poly(I:C)
NC
PGY-6
Sphinganine(d22:0)

图 42F

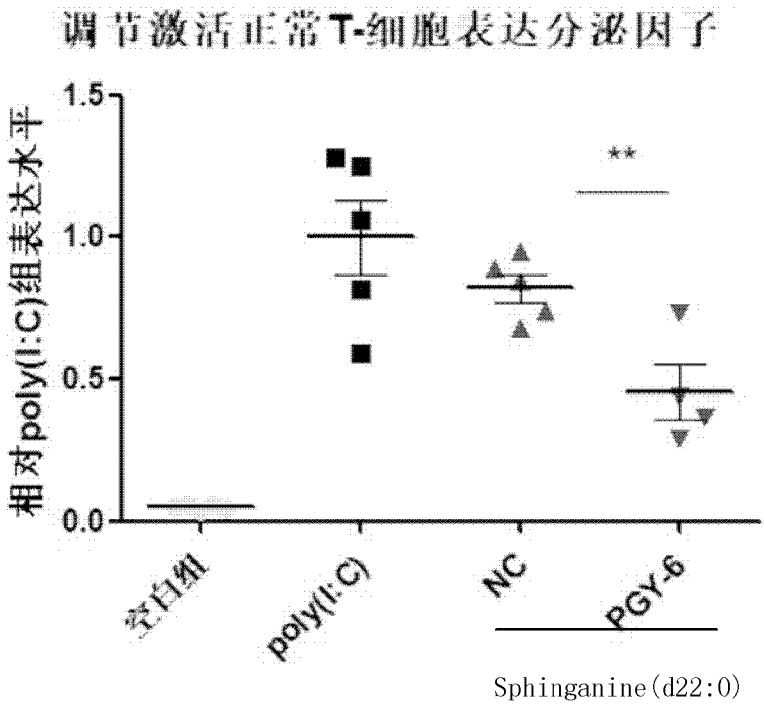
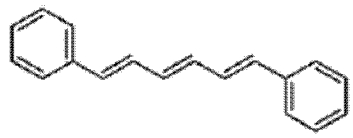

调节激活正常T-细胞表达分泌因子
相对poly(I:C)组表达水平
1.5
1.0
0.5
0.0
**
空白组
poly(I:C)
NC
PGY-6
Sphinganine(d22:0)

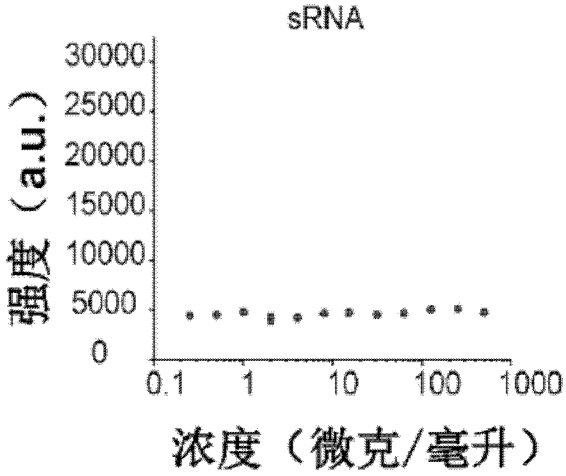
图 42G

1 检测CMC性质（临界胶束浓度）的试剂结构

DPH



2 仅小RNA的CMC值：



3 仅Sphinganine的CMC值：

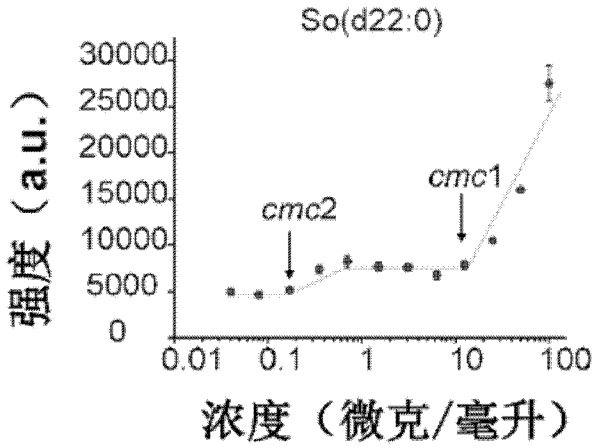


图 43

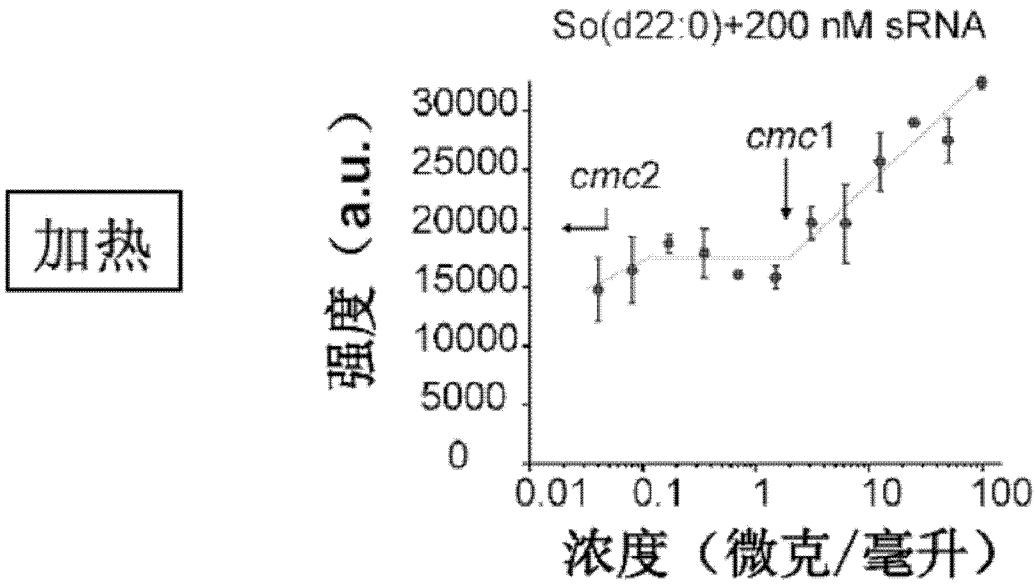

So(d22:0)+200 nM sRNA
加热
强度（a.u.）
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
cmc2
cmc1
0.01
0.1
1
10
100
浓度（微克/毫升）

图 44A

加热

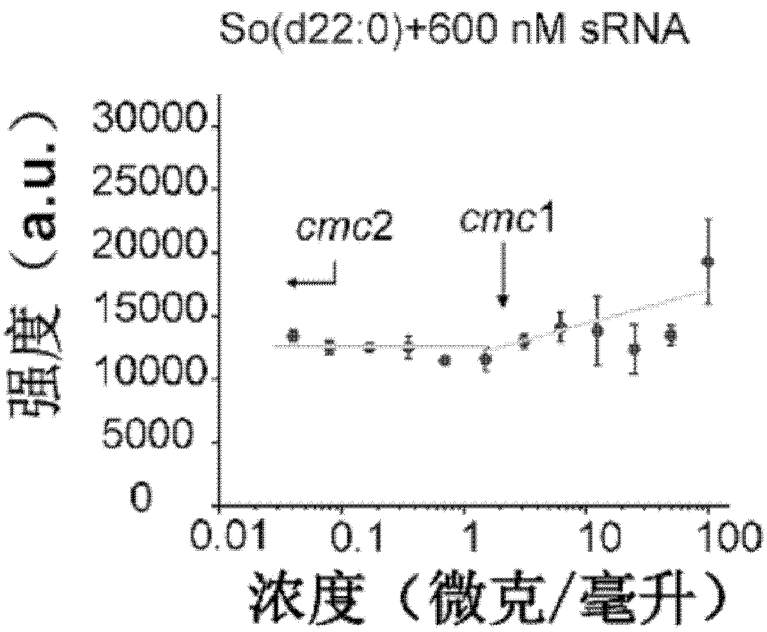

So(d22:0)+600 nM sRNA
强度（a.u.）
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
cmc2
cmc1
0.01
0.1
1
10
100
浓度（微克/毫升）

图 44B

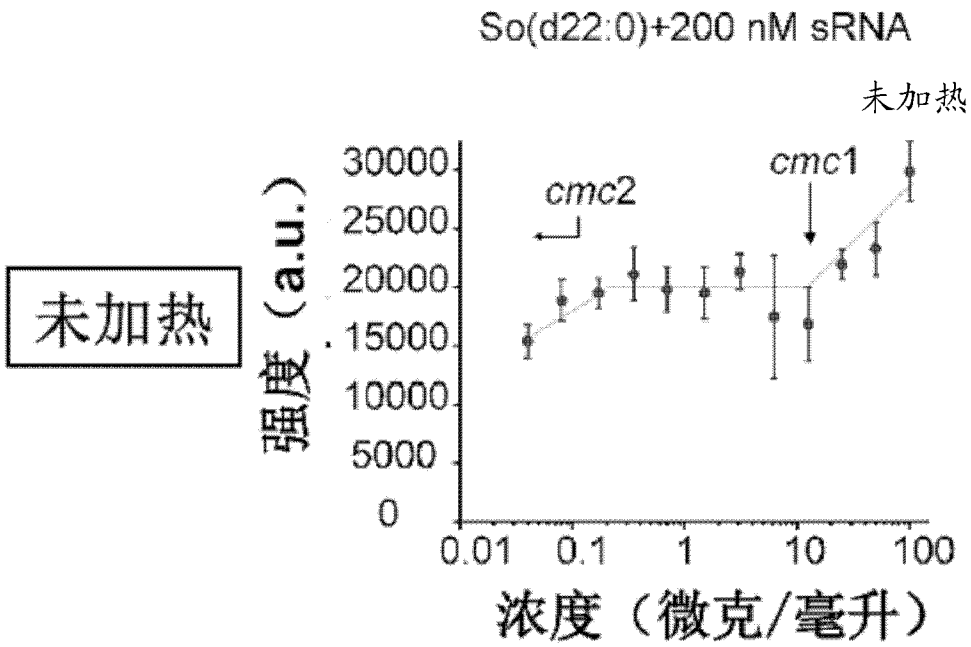

So(d22:0)+200 nM sRNA
未加热
未加热
cmc2
cmc1
强度（a.u.）
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.01
0.1
1
10
100
浓度（微克/毫升）

图 44C

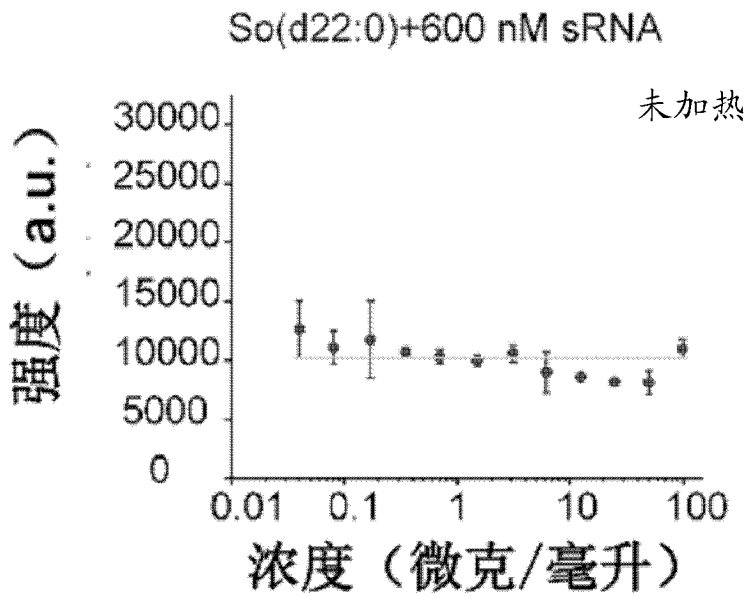

So(d22:0)+600 nM sRNA
未加热
强度（a.u.）
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.01
0.1
1
10
100
浓度（微克/毫升）

图 44D

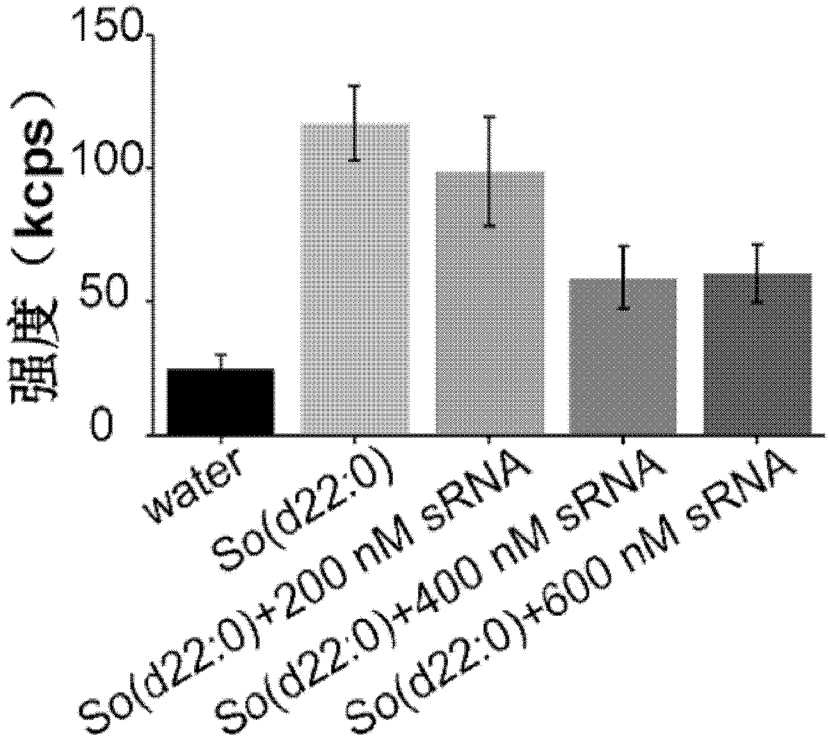

150
100
50
0
强度（kcps）
water
So(d22:0)
So(d22:0)+200 nM sRNA
So(d22:0)+400 nM sRNA
So(d22:0)+600 nM sRNA

图 45

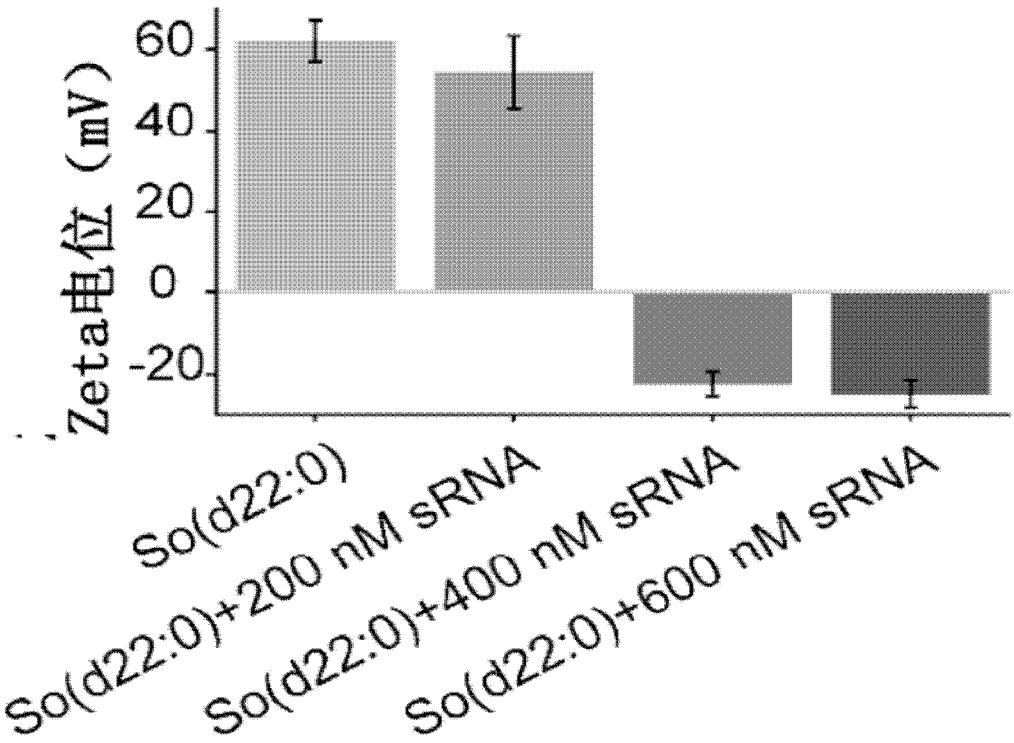

60
40
20
0
-20
Zeta电位（mV）
So(d22:0)
So(d22:0)+200 nM sRNA
So(d22:0)+400 nM sRNA
So(d22:0)+600 nM sRNA

图 46

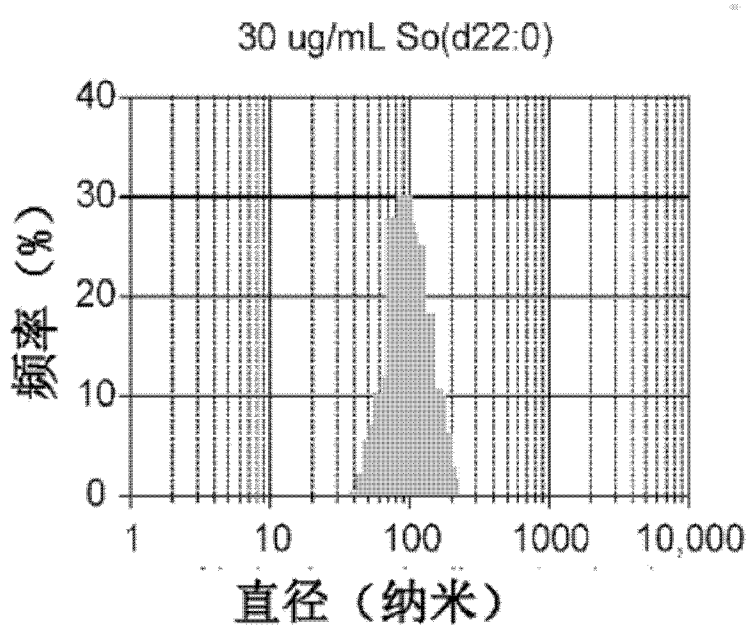

30 ug/mL So(d22:0)
40
30
20
10
0
频率（%）
1
10
100
1000
10,000
直径（纳米）

图 47A

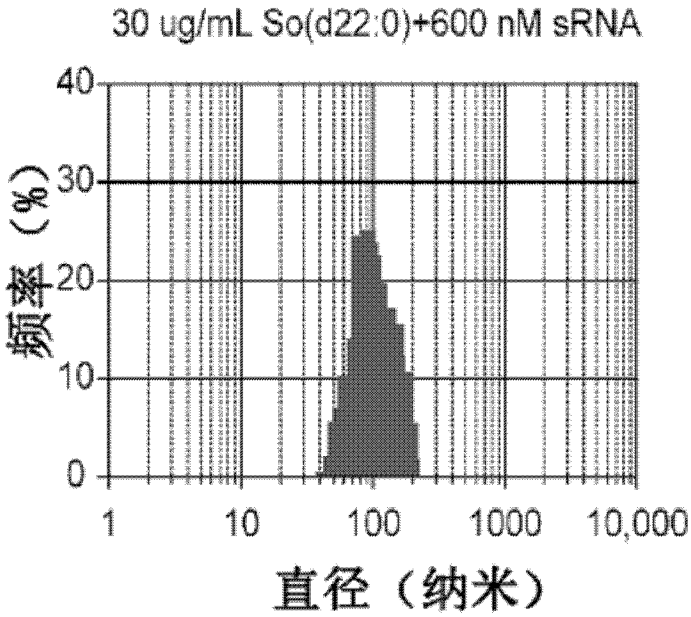
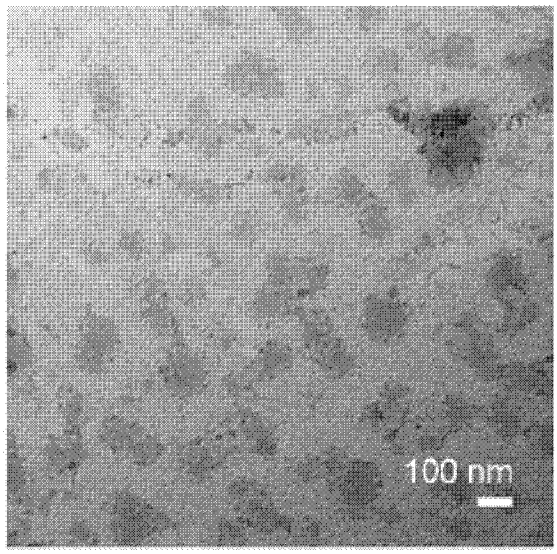
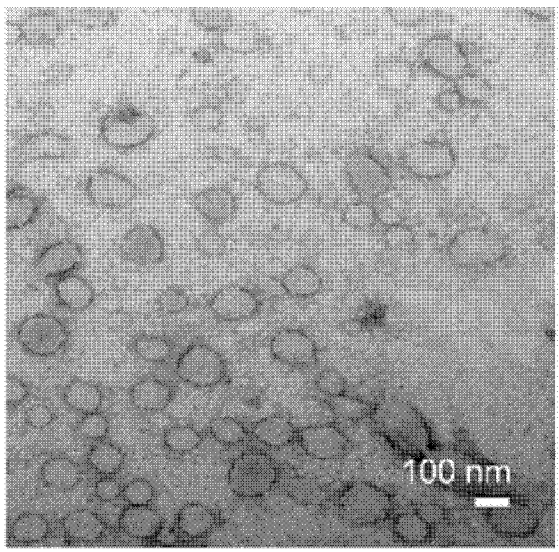

30 ug/mL So(d22:0)+600 nM sRNA
40
30
20
10
0
频率（%）
1
10
100
1000
10,000
直径（纳米）

图 47B



30 ug/mL So(d22:0)

图 47C



30 ug/mL So(d22:0)+600 nM sRNA

图 47D

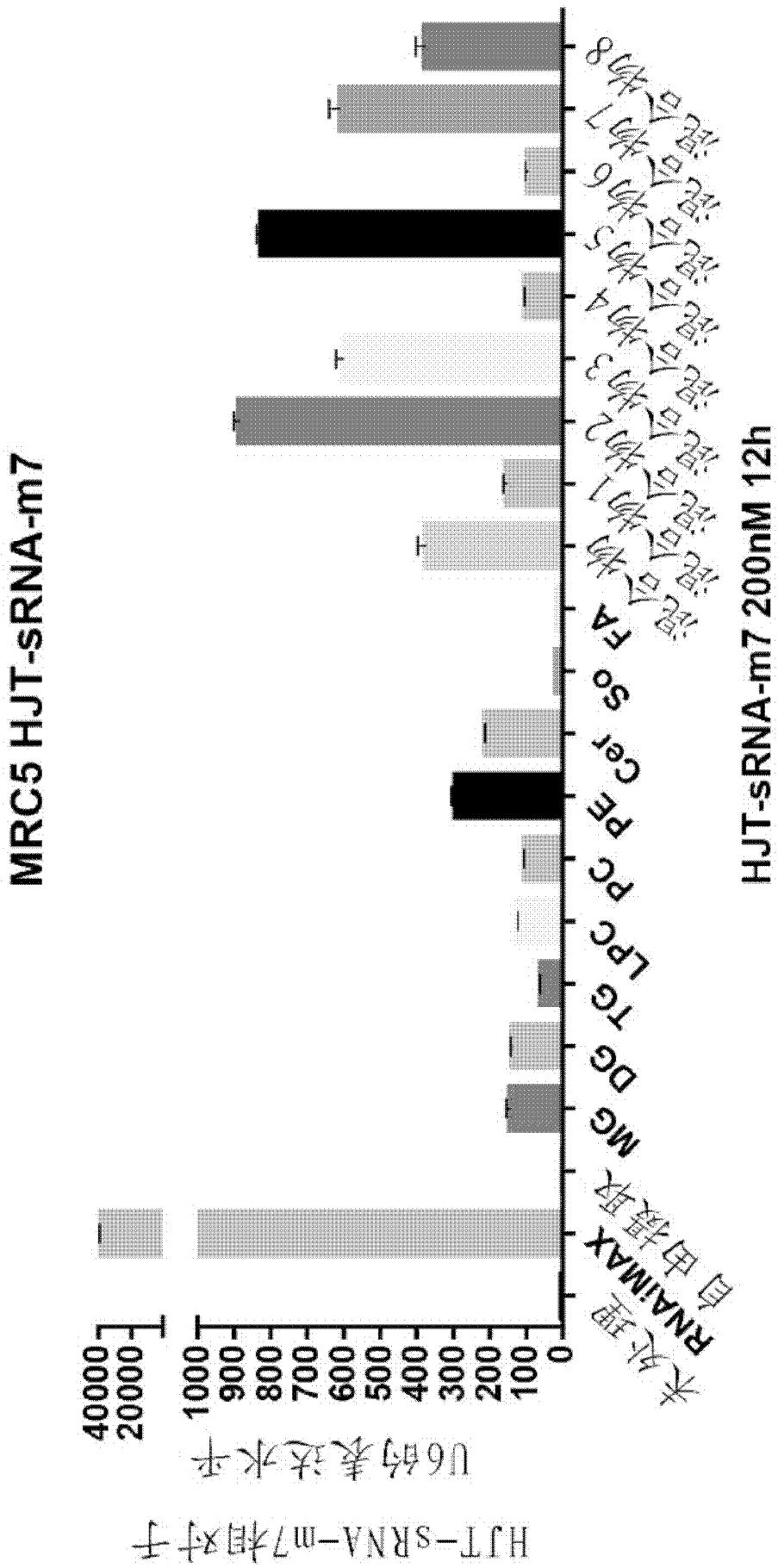

MRC5 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7 200nM 12h
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
40000
20000
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
未处理
RNAiMAX
自由摄取
MG
DG
TG
LPC
PC
PE
Cer
SO
FA
混合物1
混合物2
混合物3
混合物4
混合物5
混合物6
混合物7
混合物8

图 48

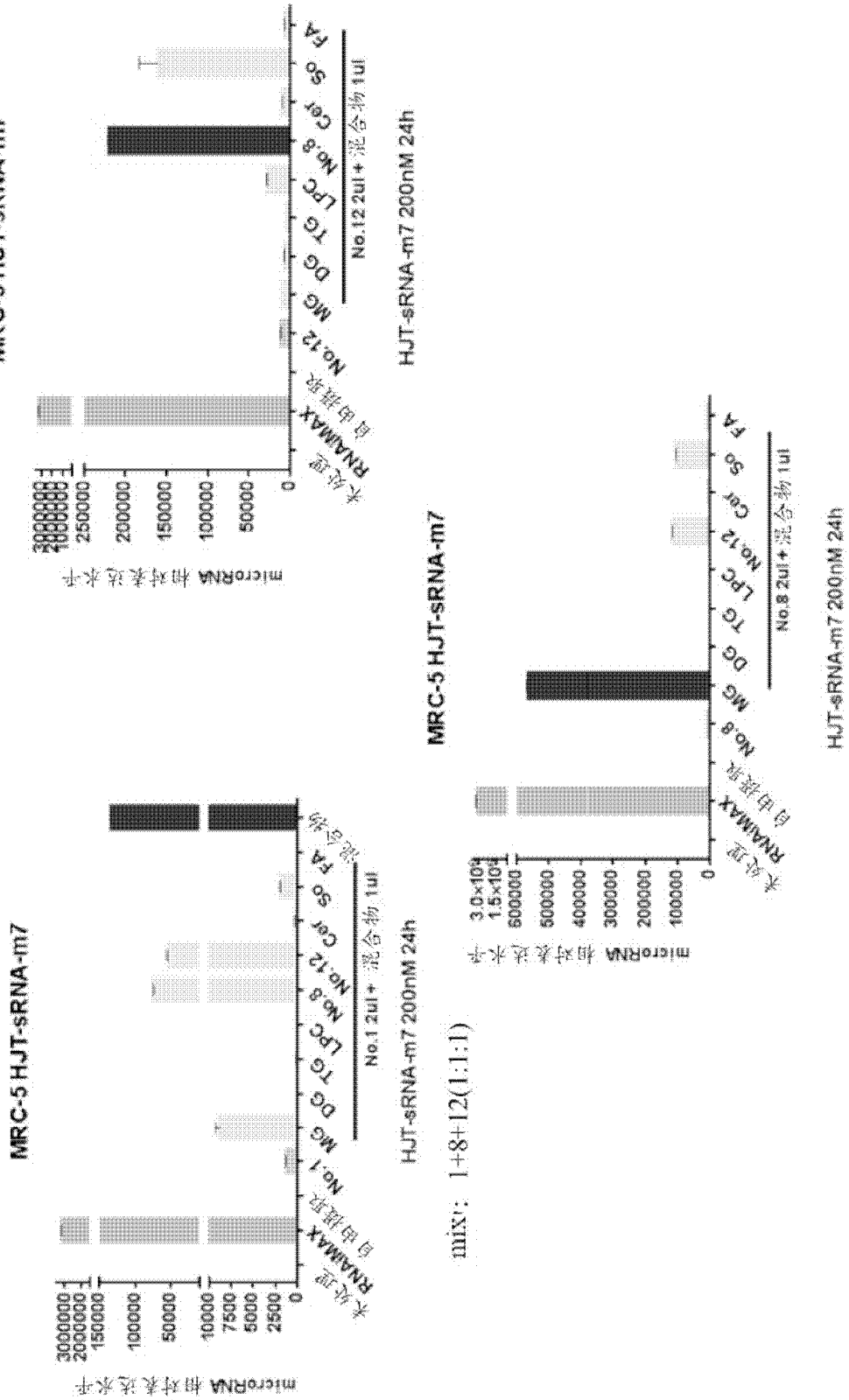

MRC-5 HJT-sRNA-m7
microRNA 相对表达水平
未处理
RNAiMAX
阳性质粒
No.1
MG
DG
TG
LPC
No.8
No.12
Cer
So
FA
混合物
HJT-sRNA-m7 200nM 24h
No.1 2ul+混合物 1ul
No.8 2ul+混合物 1ul
No.12 2ul+混合物 1ul
mix：1+8+12(1:1:1)

图 49A

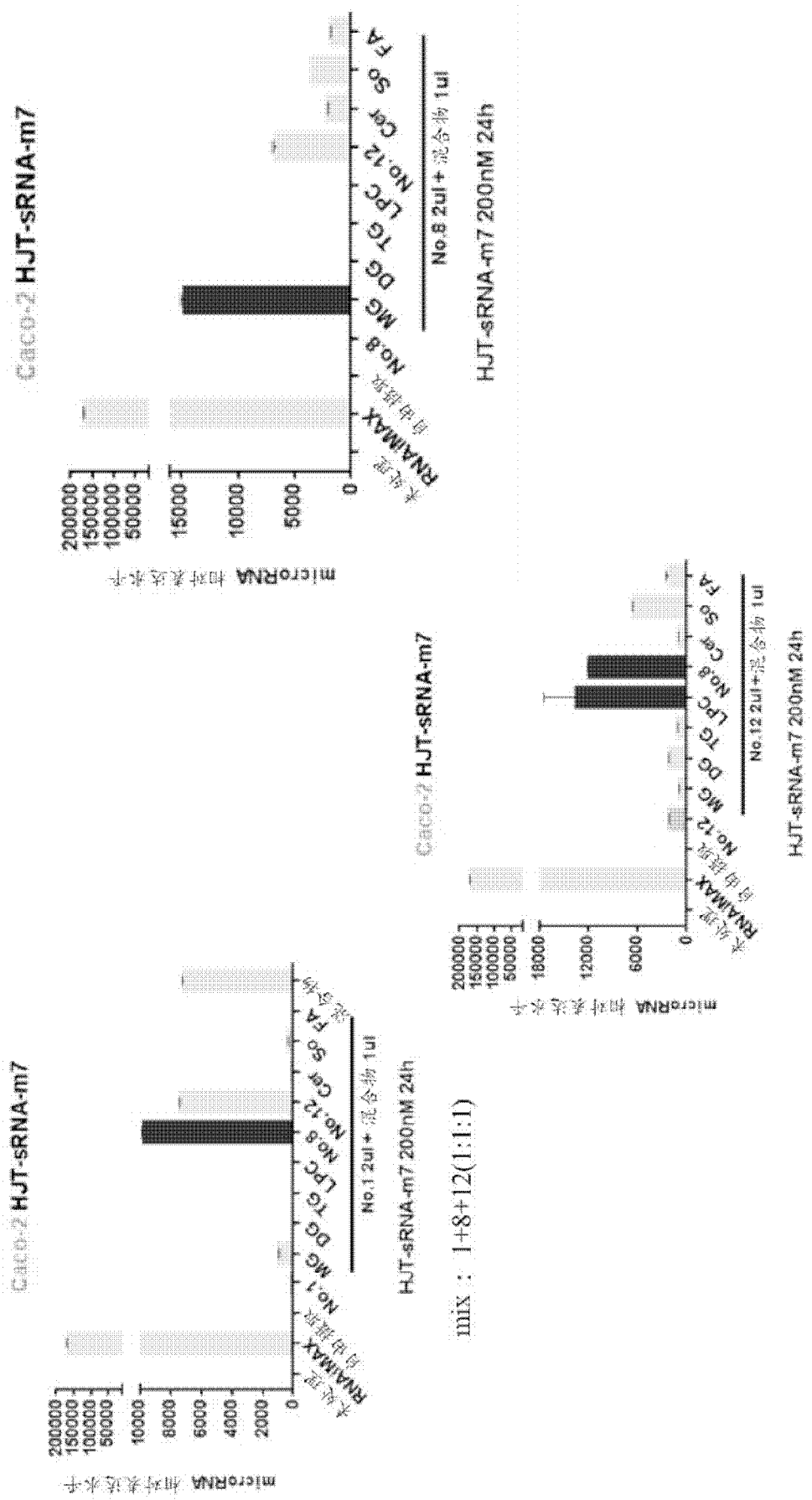

Caco-2 HJT-sRNA-m7
microRNA 相对表达水平
未处理
RNAiMAX 转染试剂
No.1
MG
DG
TG
LPC
No.8
No.12
Cer
So
FA
混合物
No.1 2ul + 混合物 1ul
HJT-sRNA-m7 200nM 24h
mix : 1+8+12(1:1:1)
No.8 2ul + 混合物 1ul
No.12 2ul + 混合物 1ul

图 49B

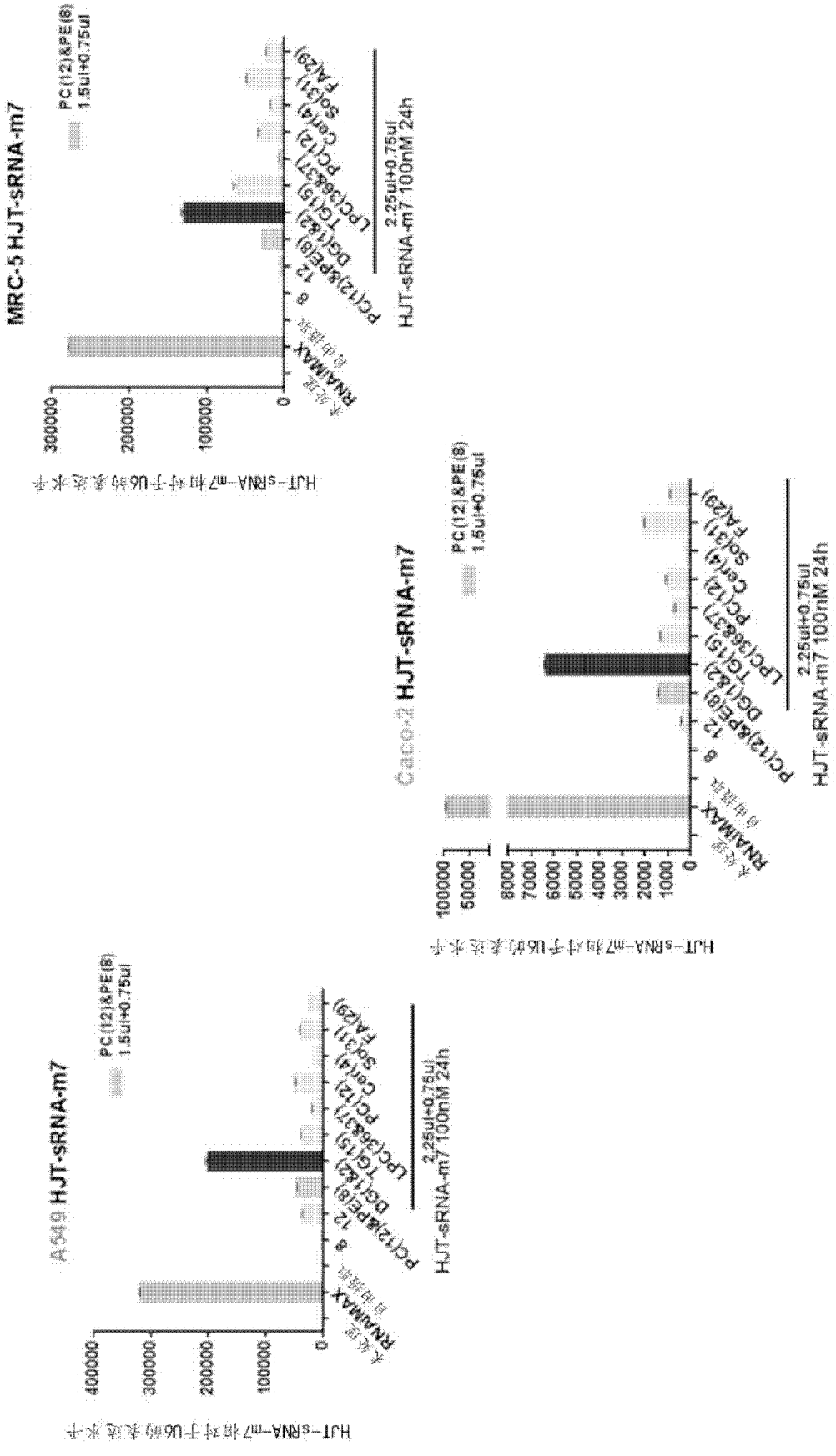

MRC-5 HJT-sRNA-m7
PC(12)&PE(8)
1.5ul+0.75ul
2.25ul+0.75ul
HJT-sRNA-m7 100nM 24h
Caco-2 HJT-sRNA-m7
A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
未处理
RNAiMAX
转染试剂
8
12
PC(12)&PE(8)
DG(18:2)
TG(15)
LPC(36:3)
PC(12)
Cer(4)
Sol(31)
FA(29)

图 50

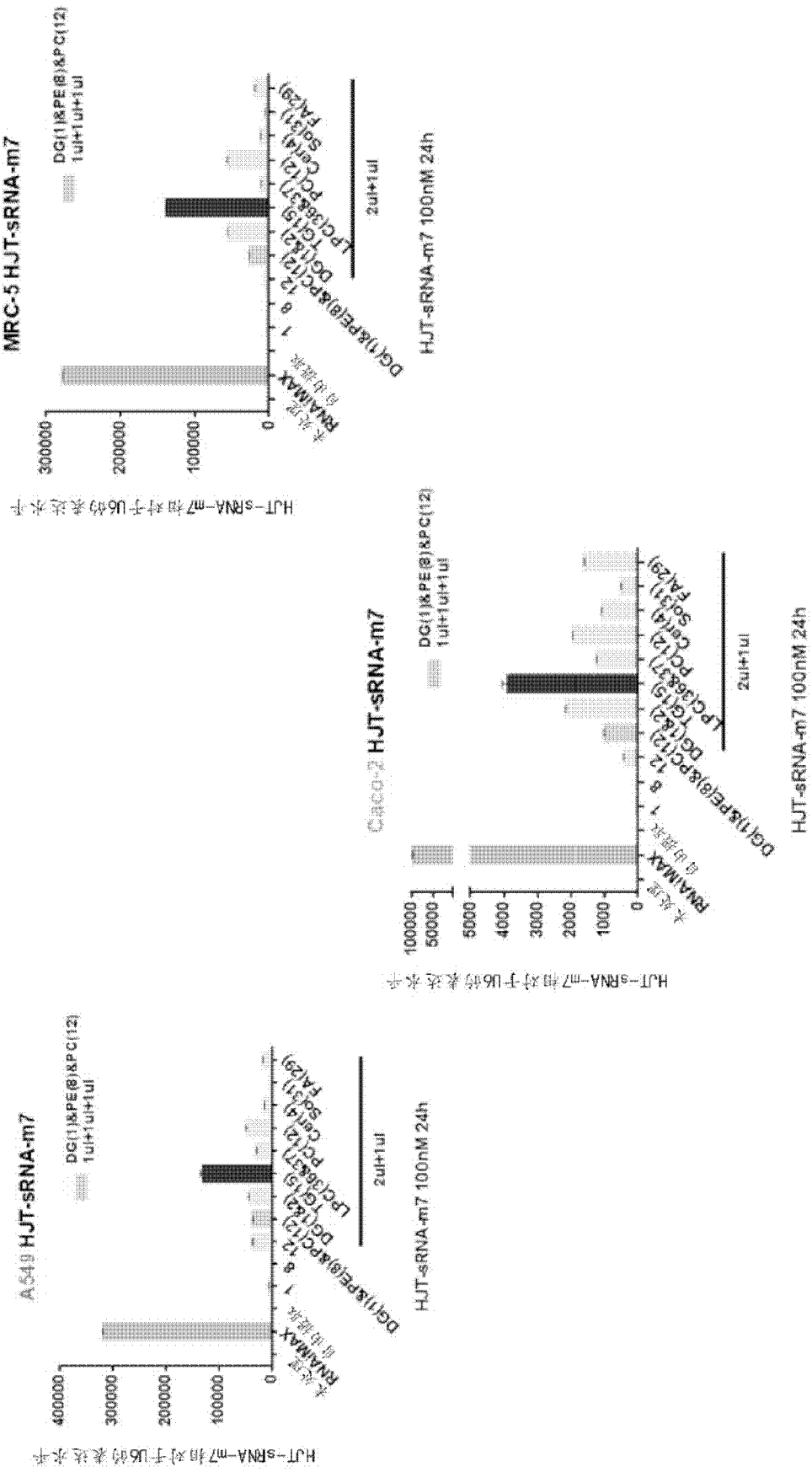

A549 HJT-sRNA-m7
MRC-5 HJT-sRNA-m7
Caco-2 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7 100nM 24h
2ul+1ul
DG(1)&PE(8)&PC(12)
1ul+1ul+1ul
RNAiMAX
DG(1)&PE(8)&PC(12)
DG(18:2)
TG(15)
LPC(18:3)
PC(12)
Cer(4)
Sol(31)
FA(29)

图 51

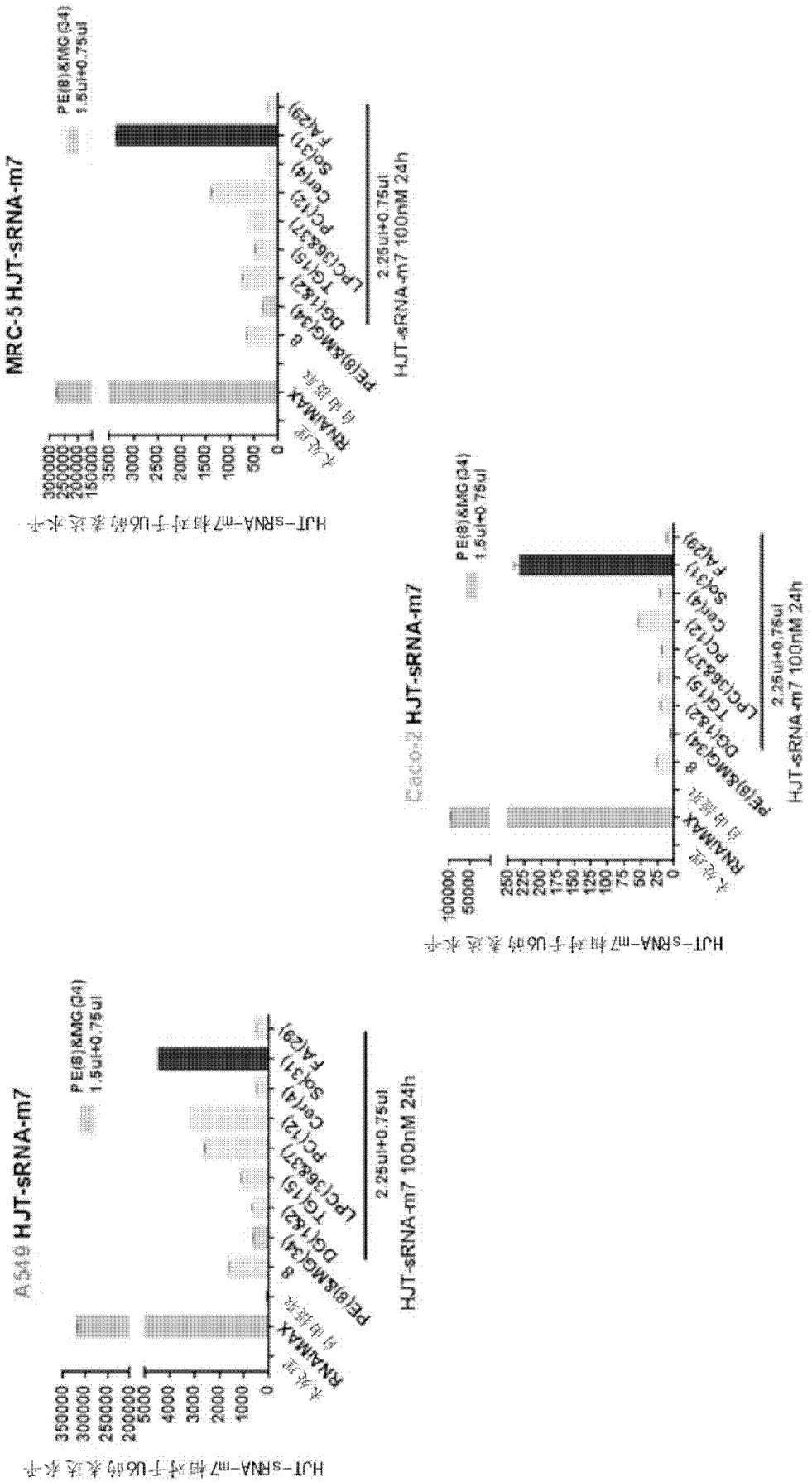

MRC-5 HJT-sRNA-m7
PE(8)&MG(34)
1.5ul+0.75ul
2.25ul+0.75ul
HJT-sRNA-m7 100nM 24h
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
未处理
RNAiMAX
PE(8)&MG(34)
DG(18:2)
TG(16)
LPC(36:3)
PC(12)
Cer(4)
Sol(31)
FA(29)
Caco-2 HJT-sRNA-m7
A549 HJT-sRNA-m7

图 52

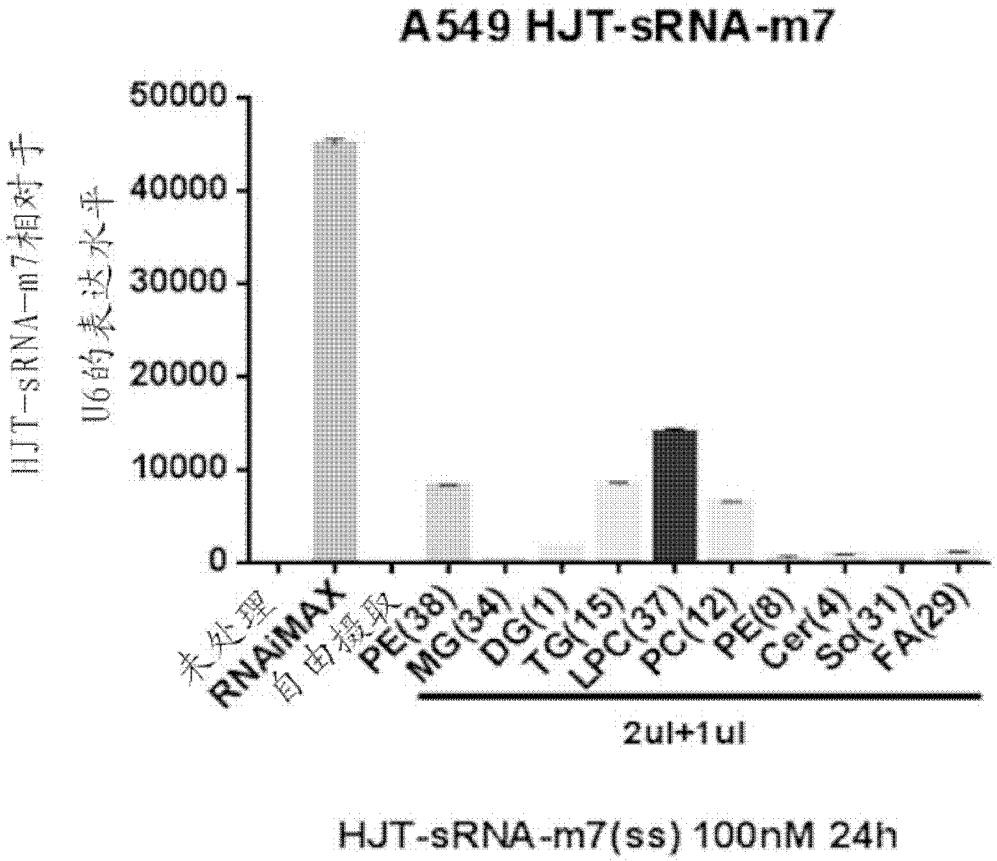

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
50000
40000
30000
20000
10000
0
未处理
RNAiMAX
自由摄取
PE(38)
MG(34)
DG(1)
TG(15)
LPC(37)
PC(12)
PE(8)
Cer(4)
So(31)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

图 53

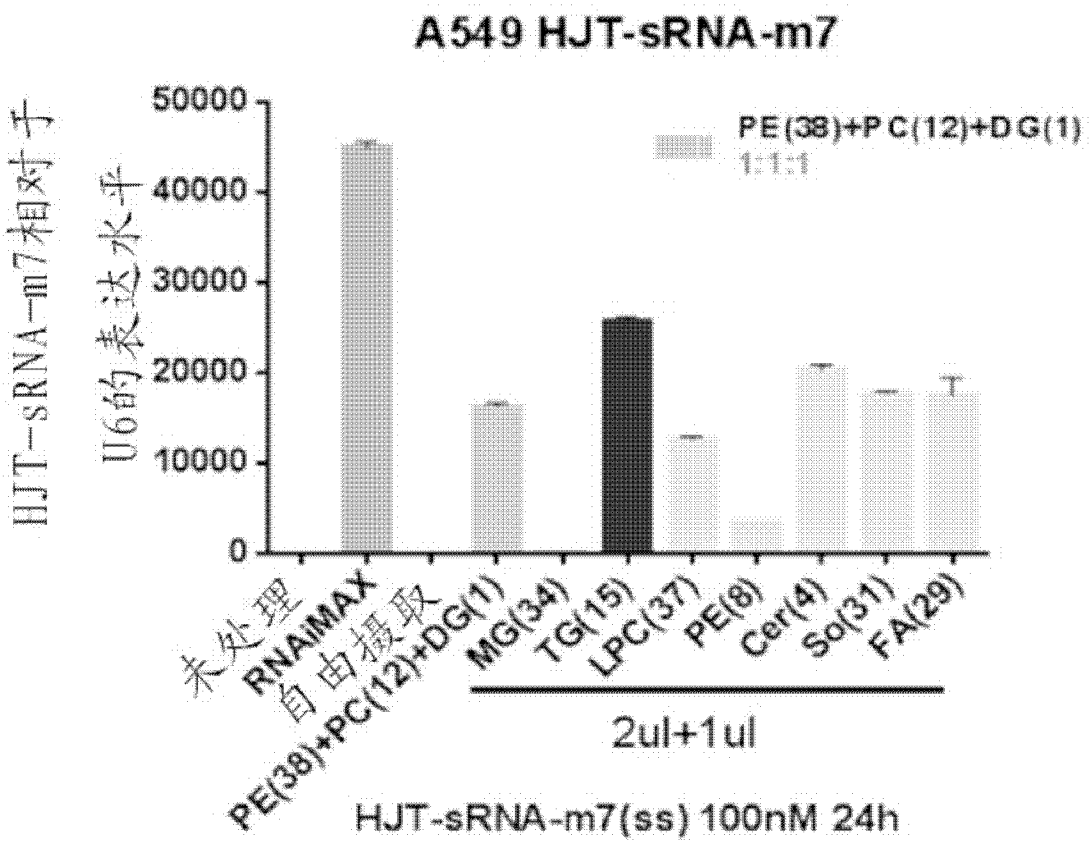

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
50000
40000
30000
20000
10000
0
PE(38)+PC(12)+DG(1)
1:1:1
未处理
RNAiMAX
自由摄取
PE(38)+PC(12)+DG(1)
MG(34)
TG(15)
LPC(37)
PE(8)
Cer(4)
So(31)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

图 54

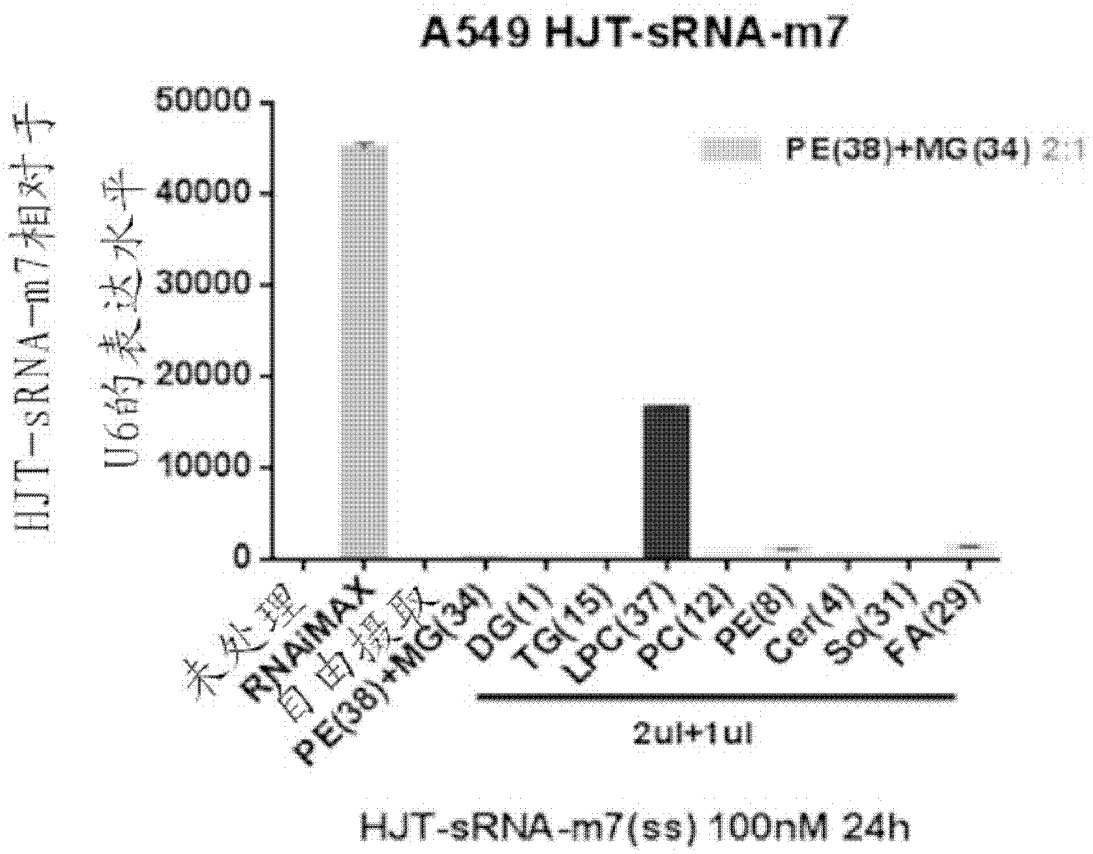

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
50000
40000
30000
20000
10000
0
PE(38)+MG(34) 2:1
未处理
RNAiMAX
自由摄取
PE(38)+MG(34)
DG(1)
TG(15)
LPC(37)
PC(12)
PE(8)
Cer(4)
So(31)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

图 55

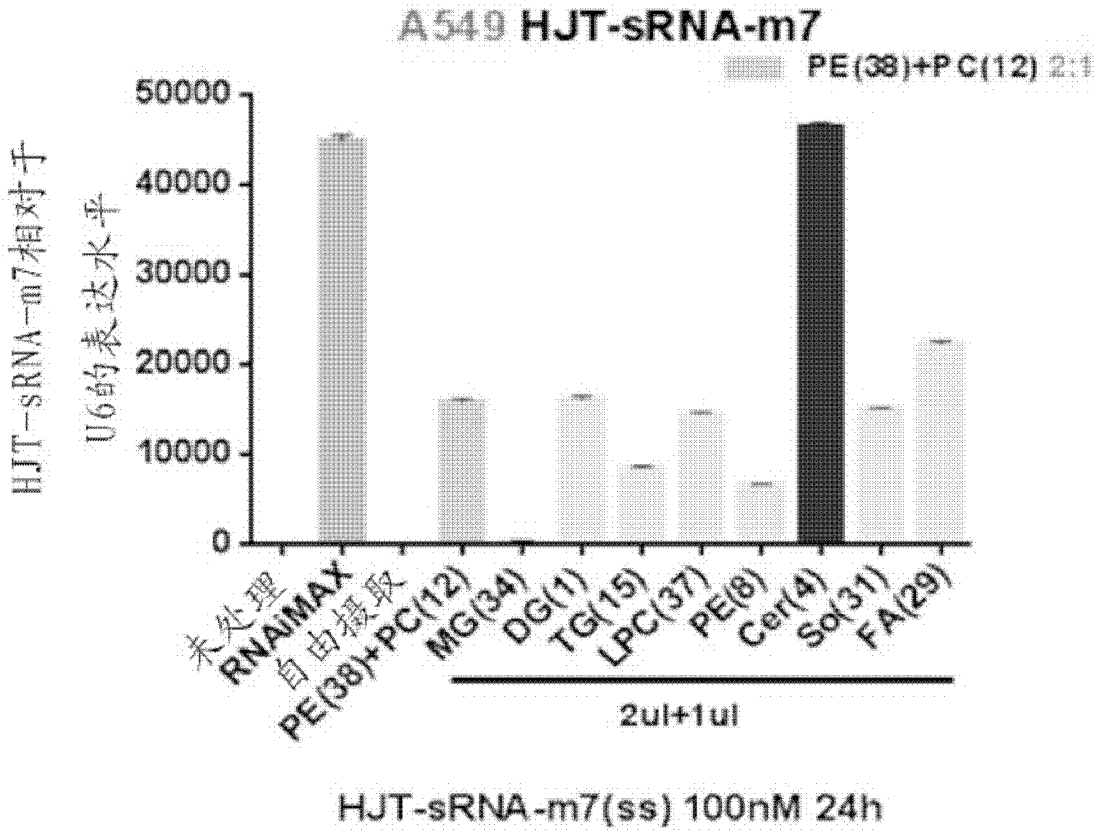

A549 HJT-sRNA-m7
PE(38)+PC(12) 2:1
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
50000
40000
30000
20000
10000
0
未处理
RNAiMAX
自由摄取
PE(38)+PC(12)
MG(34)
DG(1)
TG(15)
LPC(37)
PE(8)
Cer(4)
So(31)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

图 56

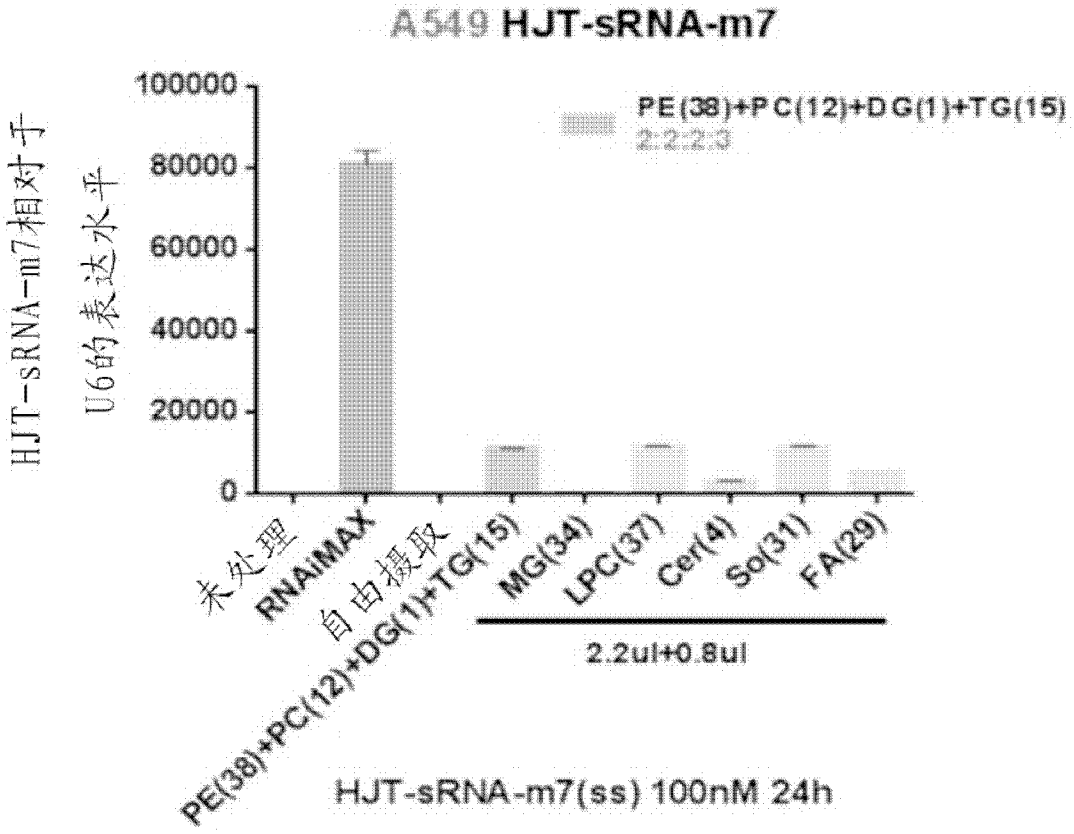

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
100000
80000
60000
40000
20000
0
PE(38)+PC(12)+DG(1)+TG(15)
2:2:2:3
未处理
RNAiMAX
自由摄取
PE(38)+PC(12)+DG(1)+TG(15)
MG(34)
LPC(37)
Cer(4)
So(31)
FA(29)
2.2ul+0.8ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

图 57

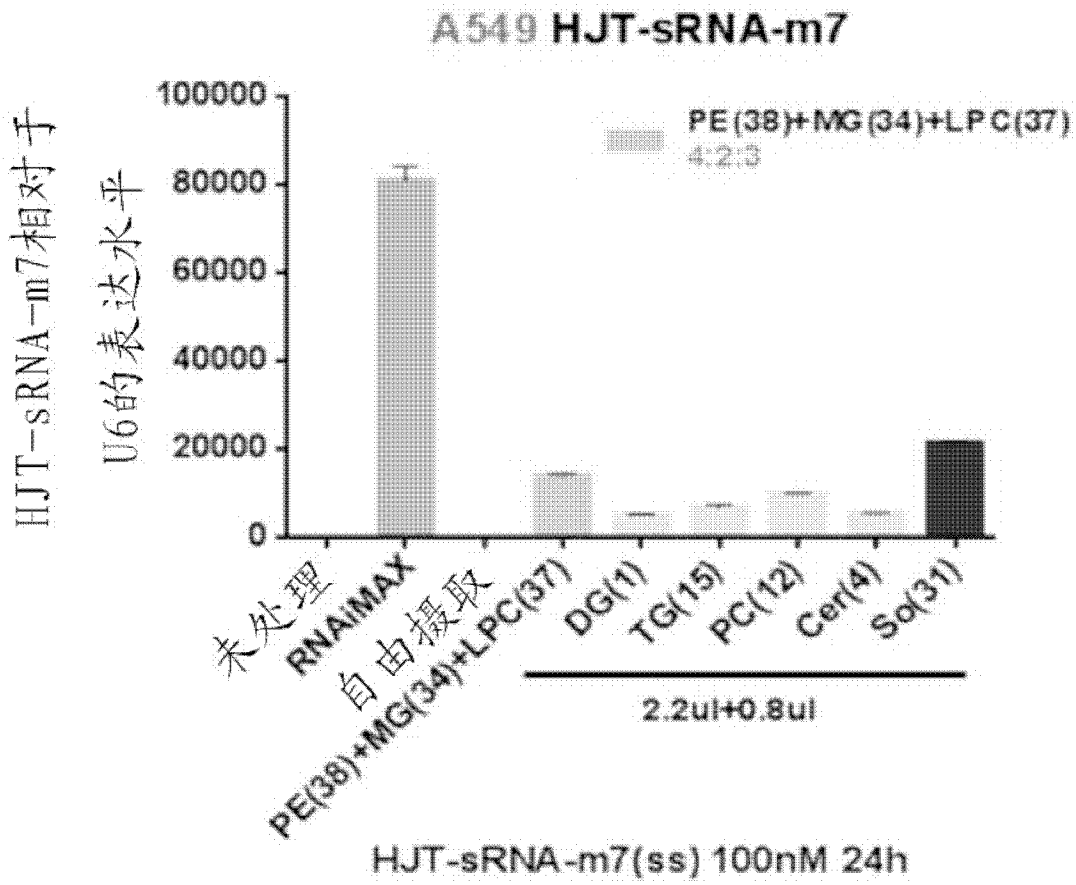

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
100000
80000
60000
40000
20000
0
PE(38)+MG(34)+LPC(37)
4:2:3
未处理
RNAiMAX
自由摄取
PE(38)+MG(34)+LPC(37)
DG(1)
TG(15)
PC(12)
Cer(4)
So(31)
2.2ul+0.8ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

图 58

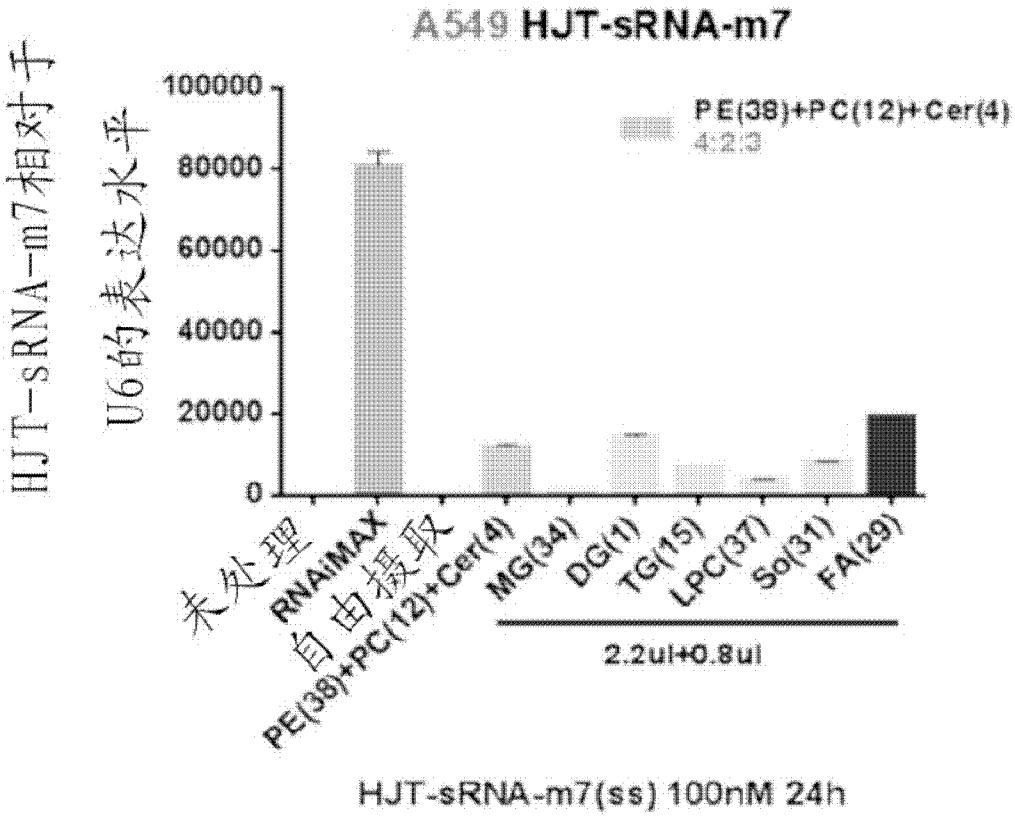

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
100000
80000
60000
40000
20000
0
PE(38)+PC(12)+Cer(4)
4:2:3
未处理
RNAiMAX
自由摄取
PE(38)+PC(12)+Cer(4)
MG(34)
DG(1)
TG(15)
LPC(37)
So(31)
FA(29)
2.2ul+0.8ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

图 59

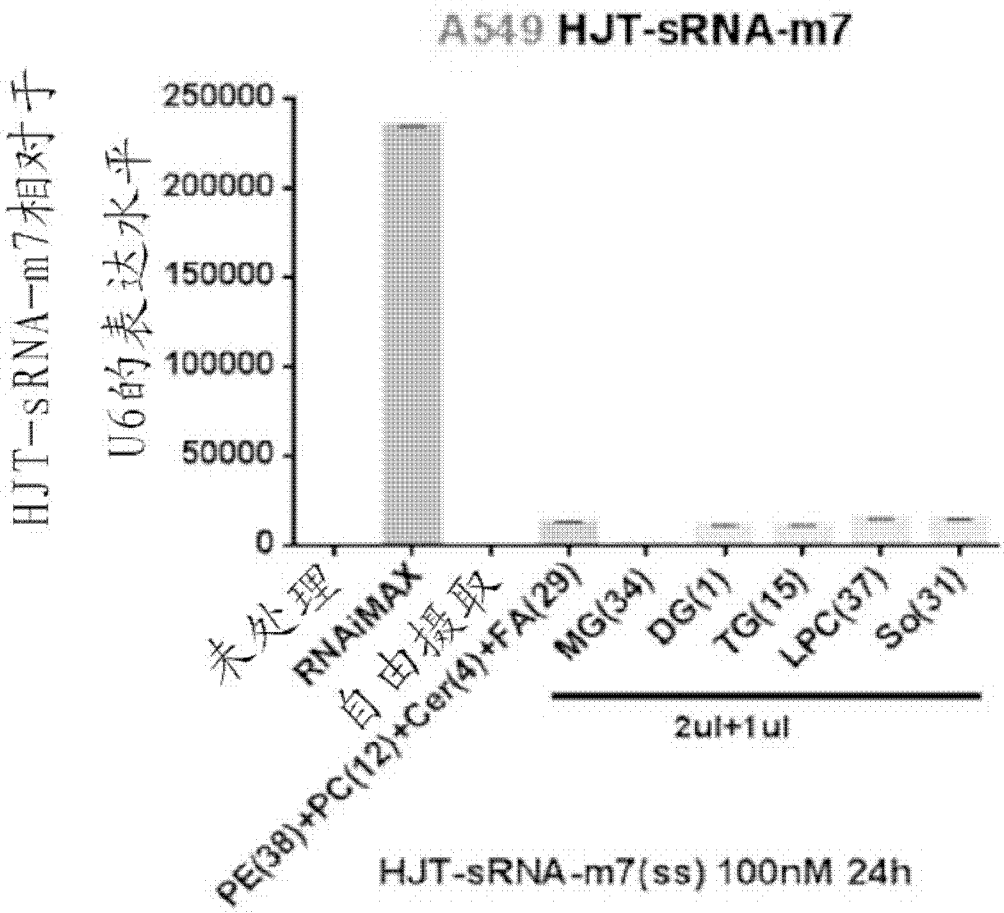

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
250000
200000
150000
100000
50000
0
未处理
RNAiMAX
自由摄取
PE(38)+PC(12)+Cer(4)+FA(29)
MG(34)
DG(1)
TG(15)
LPC(37)
So(31)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

图 60

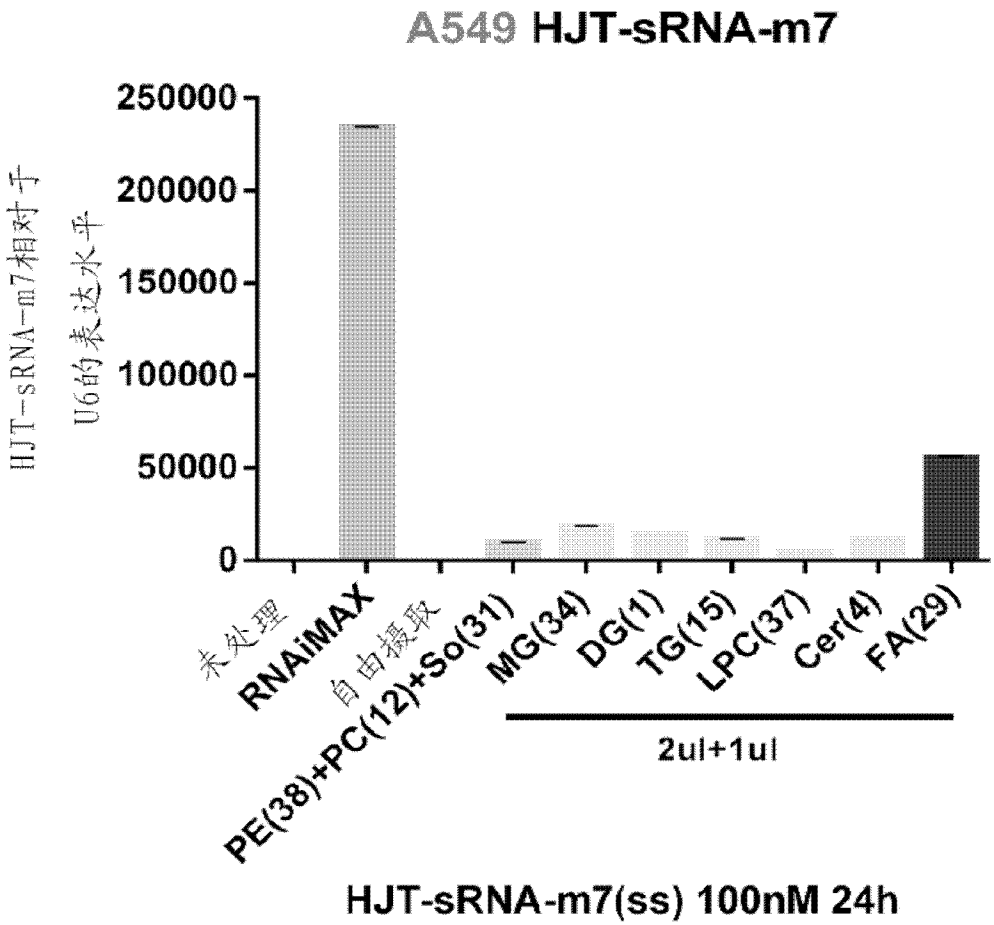

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
250000
200000
150000
100000
50000
0
未处理
RNAiMAX
自由摄取
PE(38)+PC(12)+So(31)
MG(34)
DG(1)
TG(15)
LPC(37)
Cer(4)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

图 61

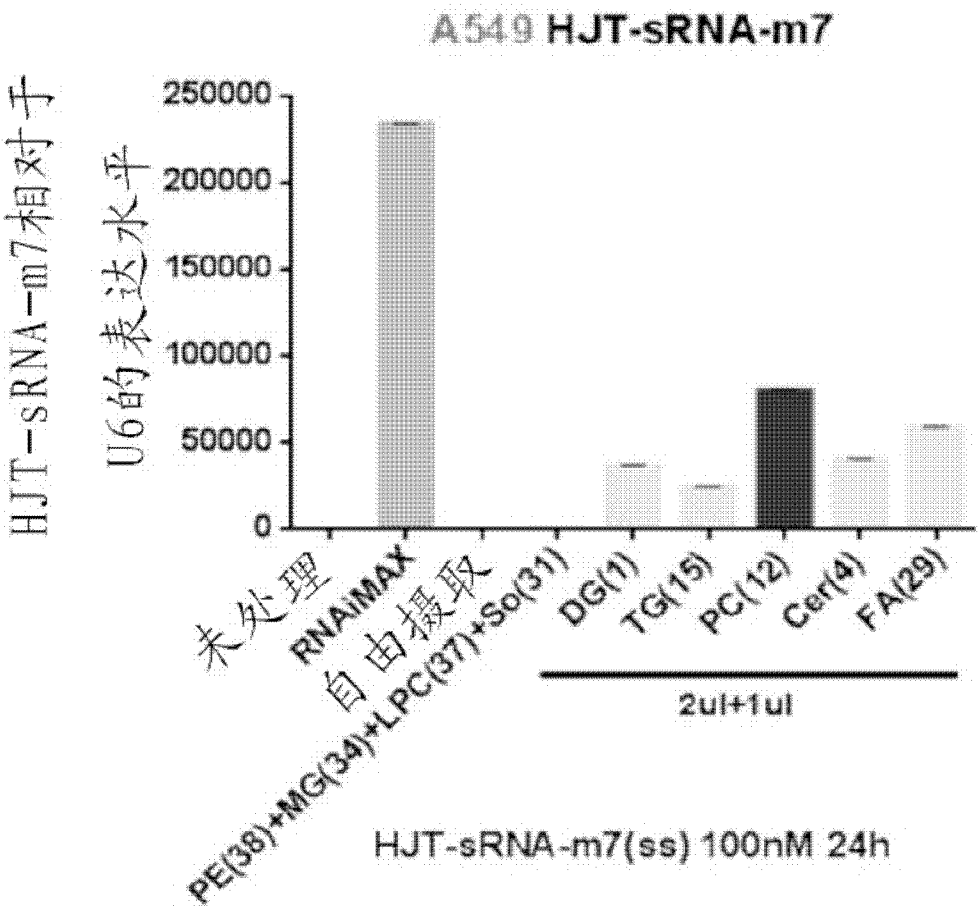

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
250000
200000
150000
100000
50000
0
未处理
RNAiMAX
自由摄取
PE(38)+MG(34)+LPC(37)+So(31)
DG(1)
TG(15)
PC(12)
Cer(4)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

图 62

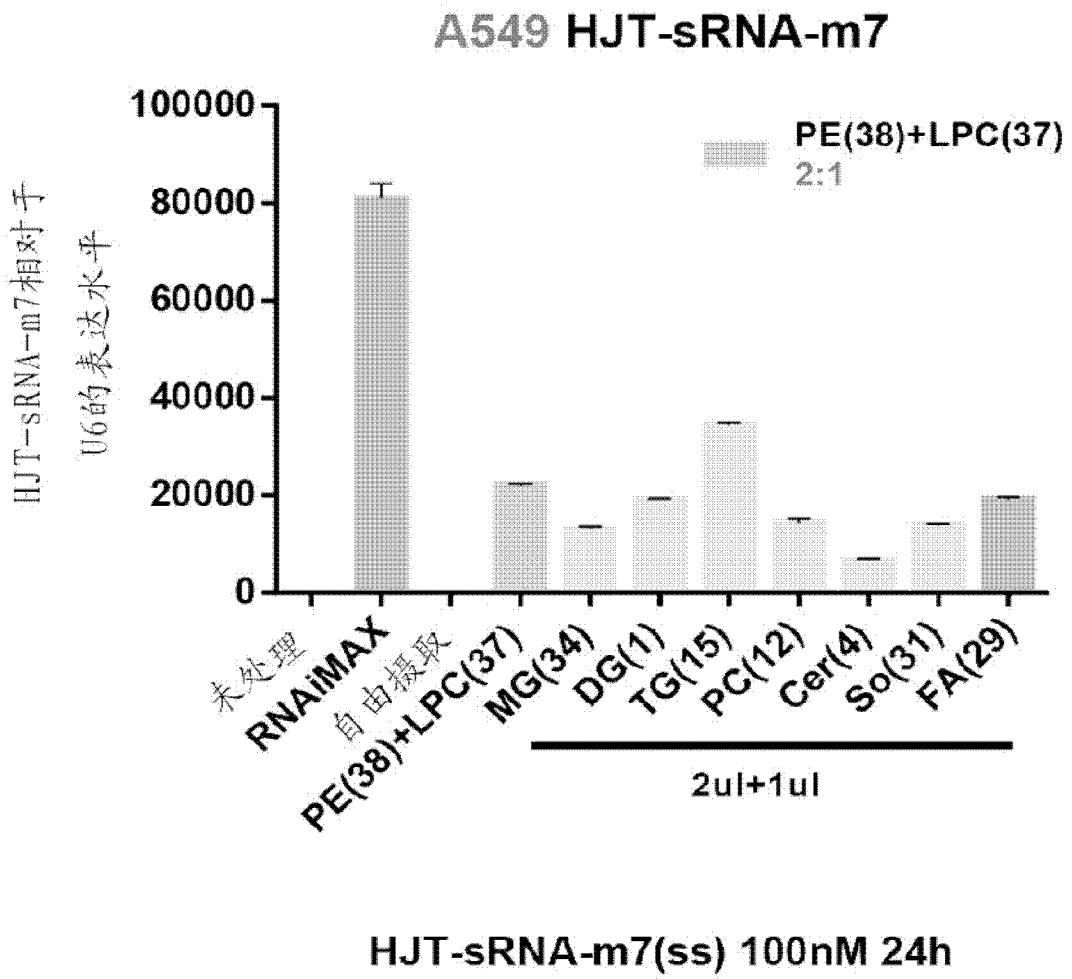

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
100000
80000
60000
40000
20000
0
PE(38)+LPC(37)
2:1
未处理
RNAiMAX
自由摄取
PE(38)+LPC(37)
MG(34)
DG(1)
TG(15)
PC(12)
Cer(4)
So(31)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

图 63

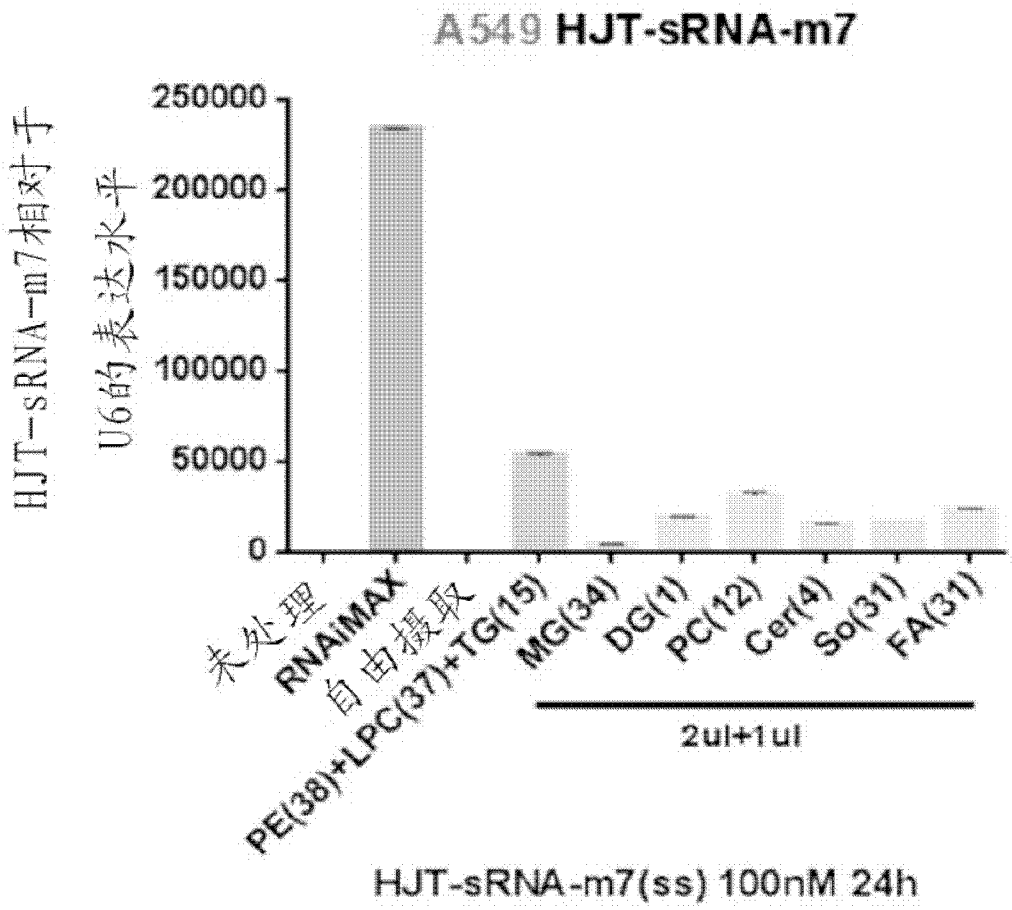

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
250000
200000
150000
100000
50000
0
未处理
RNAiMAX
自由摄取
PE(38)+LPC(37)+TG(15)
MG(34)
DG(1)
PC(12)
Cer(4)
So(31)
FA(31)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ss) 100nM 24h

图 64

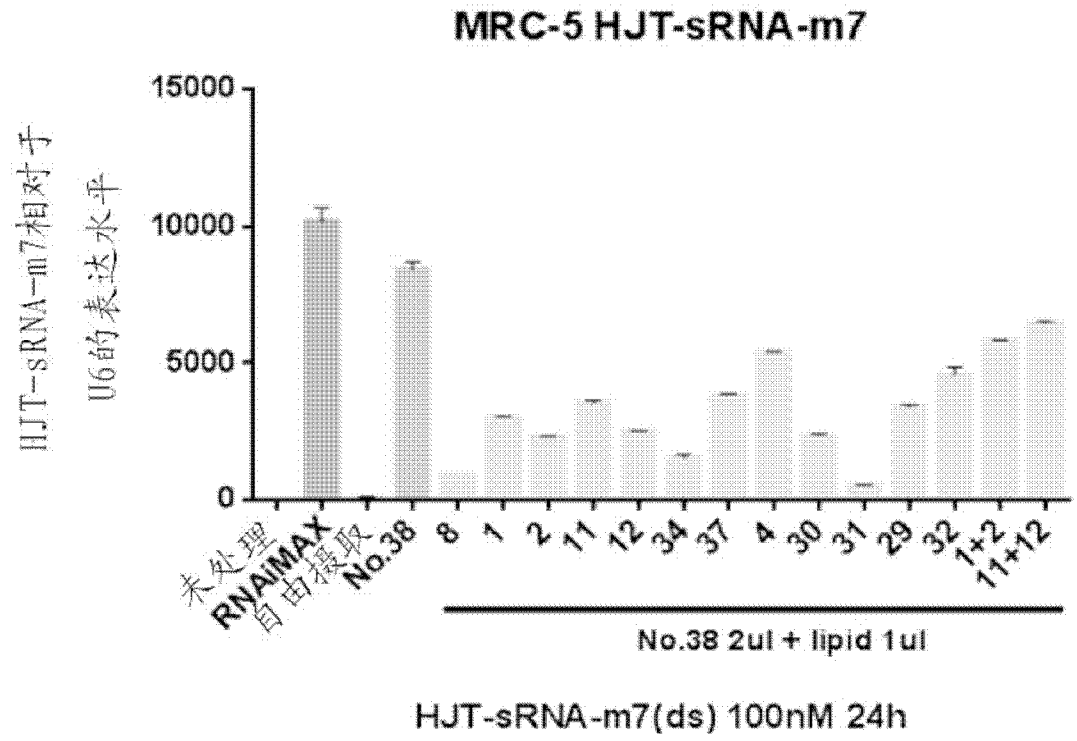

MRC-5 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
15000
10000
5000
0
未处理
RNAiMAX
自由摄取
No.38
8
1
2
11
12
34
37
4
30
31
29
32
1+2
11+12
No.38 2ul + lipid 1ul
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

图 65

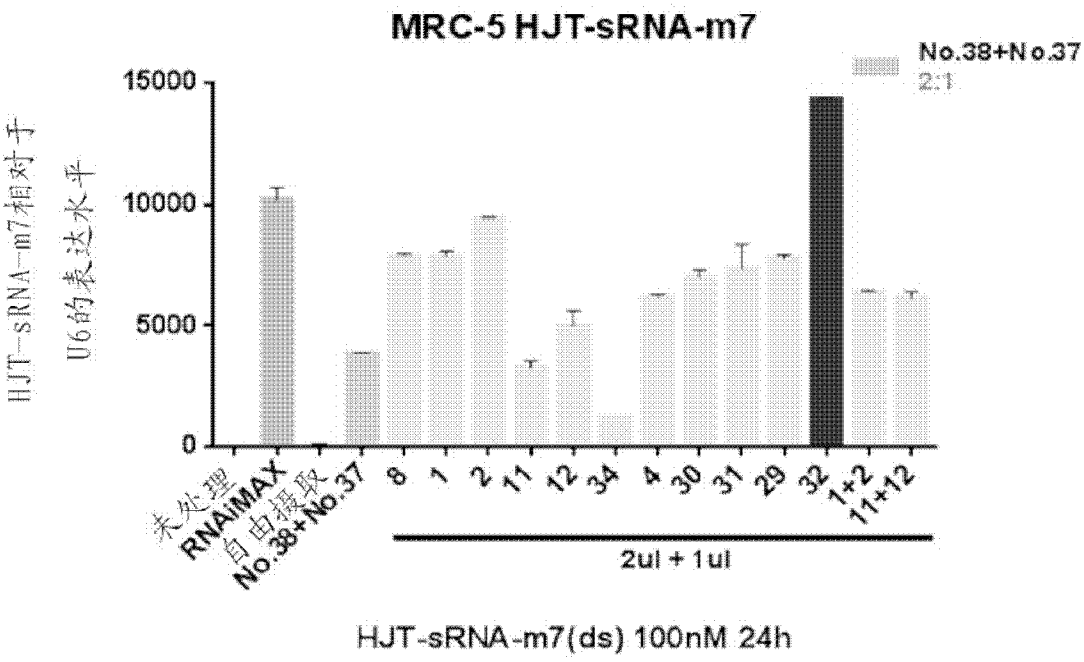

MRC-5 HJT-sRNA-m7
No.38+No.37
2:1
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
15000
10000
5000
0
未处理
RNAiMAX
自由摄取
No.38+No.37
8
1
2
11
12
34
4
30
31
29
32
1+2
11+12
2ul + 1ul
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

图 66

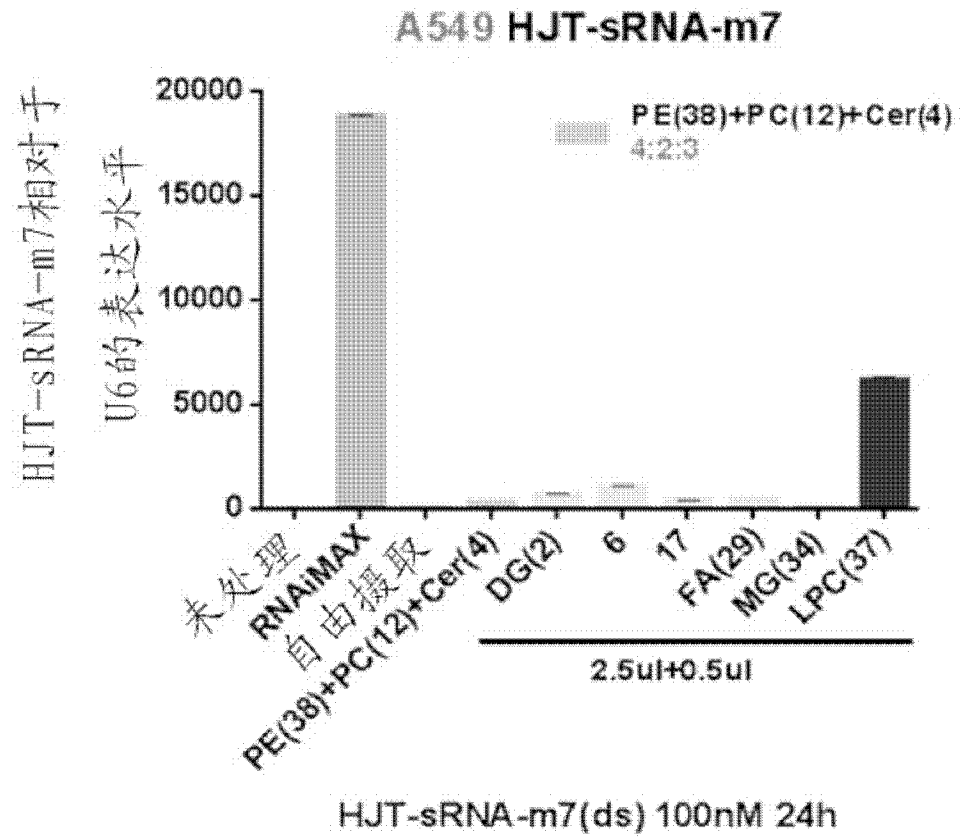

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
20000
15000
10000
5000
0
PE(38)+PC(12)+Cer(4)
4:2:3
未处理
RNAiMAX
自由摄取
PE(38)+PC(12)+Cer(4)
DG(2)
6
17
FA(29)
MG(34)
LPC(37)
2.5ul+0.5ul
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

图 67

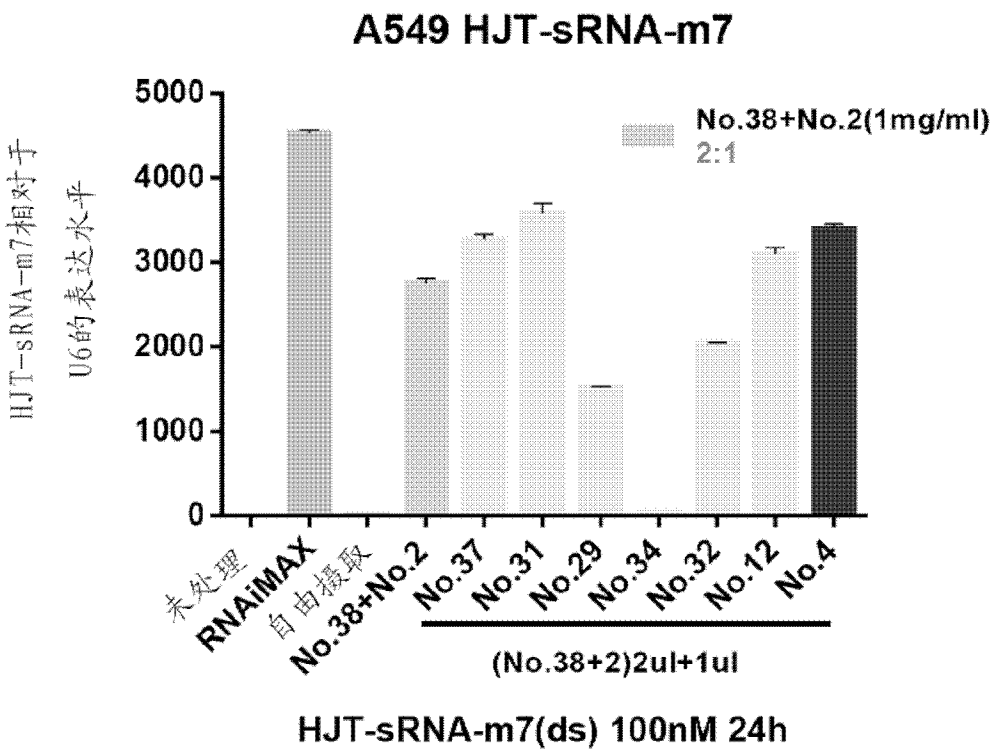

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
5000
4000
3000
2000
1000
0
No.38+No.2(1mg/ml)
2:1
未处理
RNAiMAX
自由摄取
No.38+No.2
No.37
No.31
No.29
No.34
No.32
No.12
No.4
(No.38+2)2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

图 68

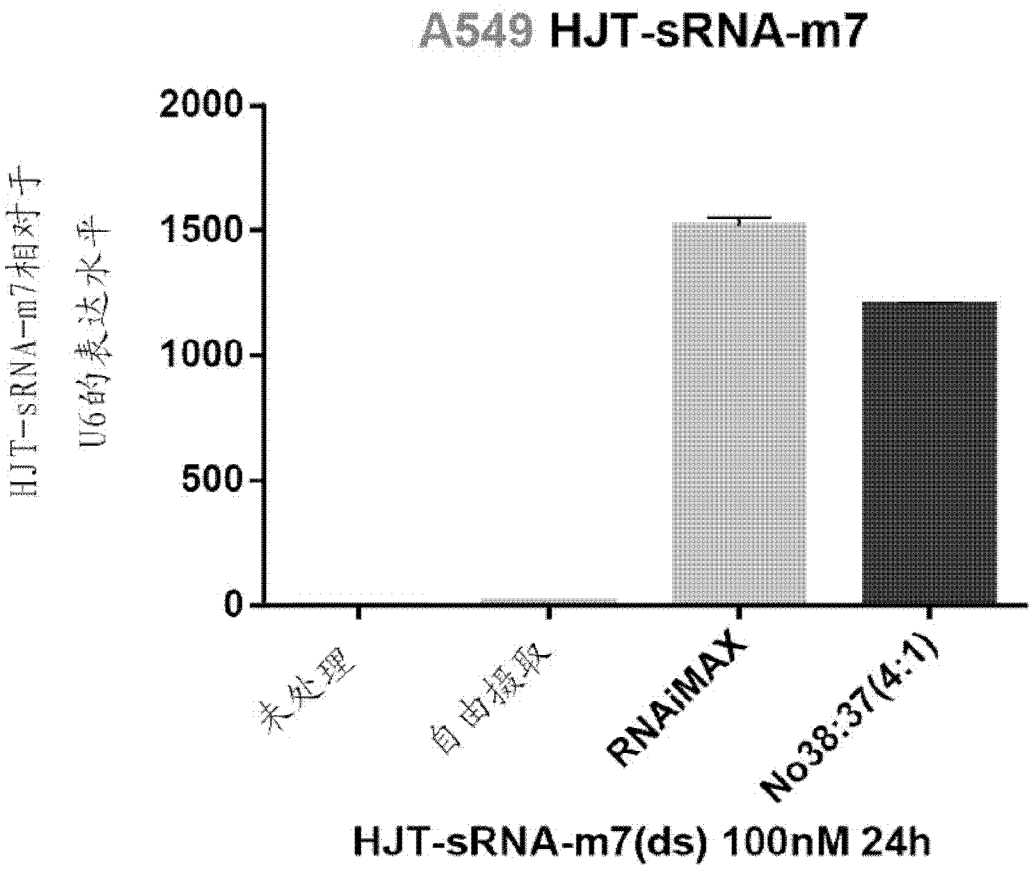

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
2000
1500
1000
500
0
未处理
自由摄取
RNAiMAX
No38:37(4:1)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

图 69

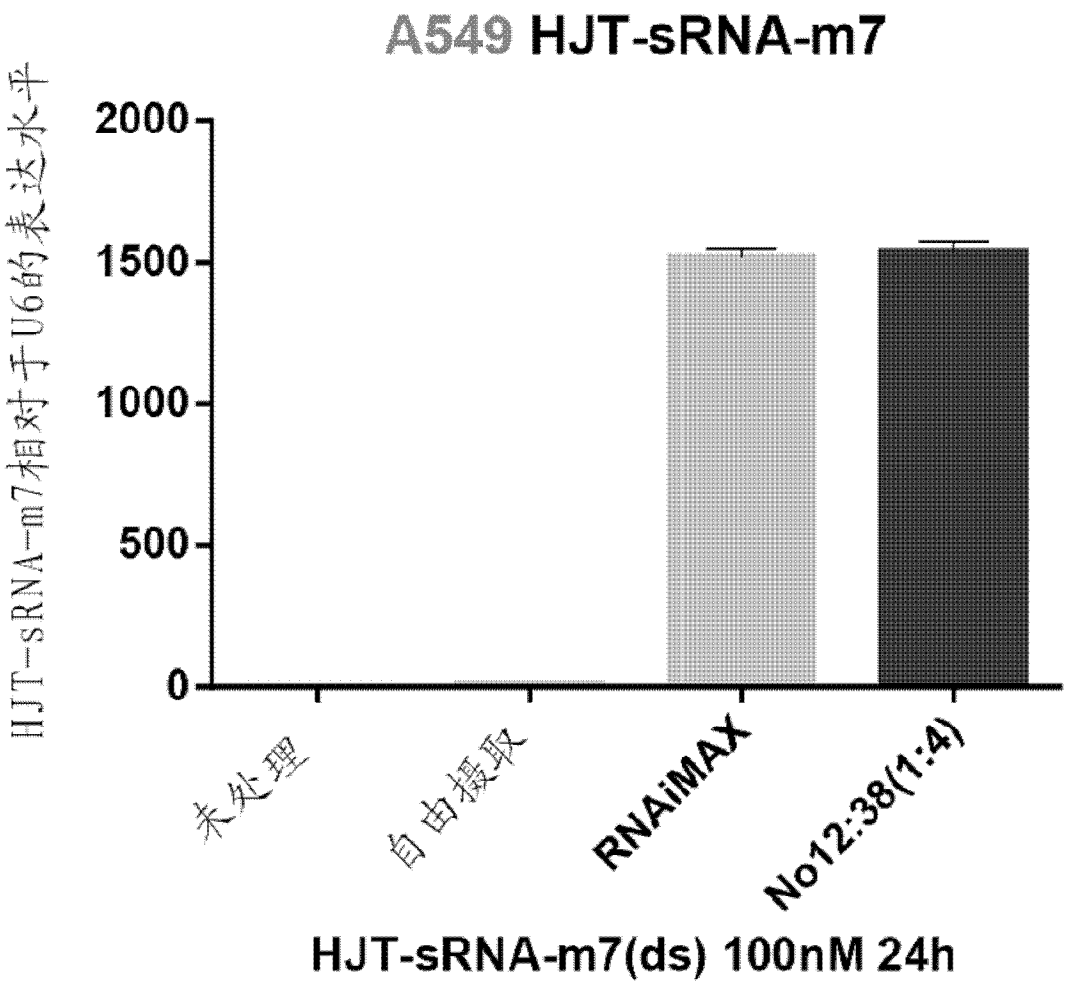

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
2000
1500
1000
500
0
未处理
自由摄取
RNAiMAX
No12:38(1:4)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

图 70

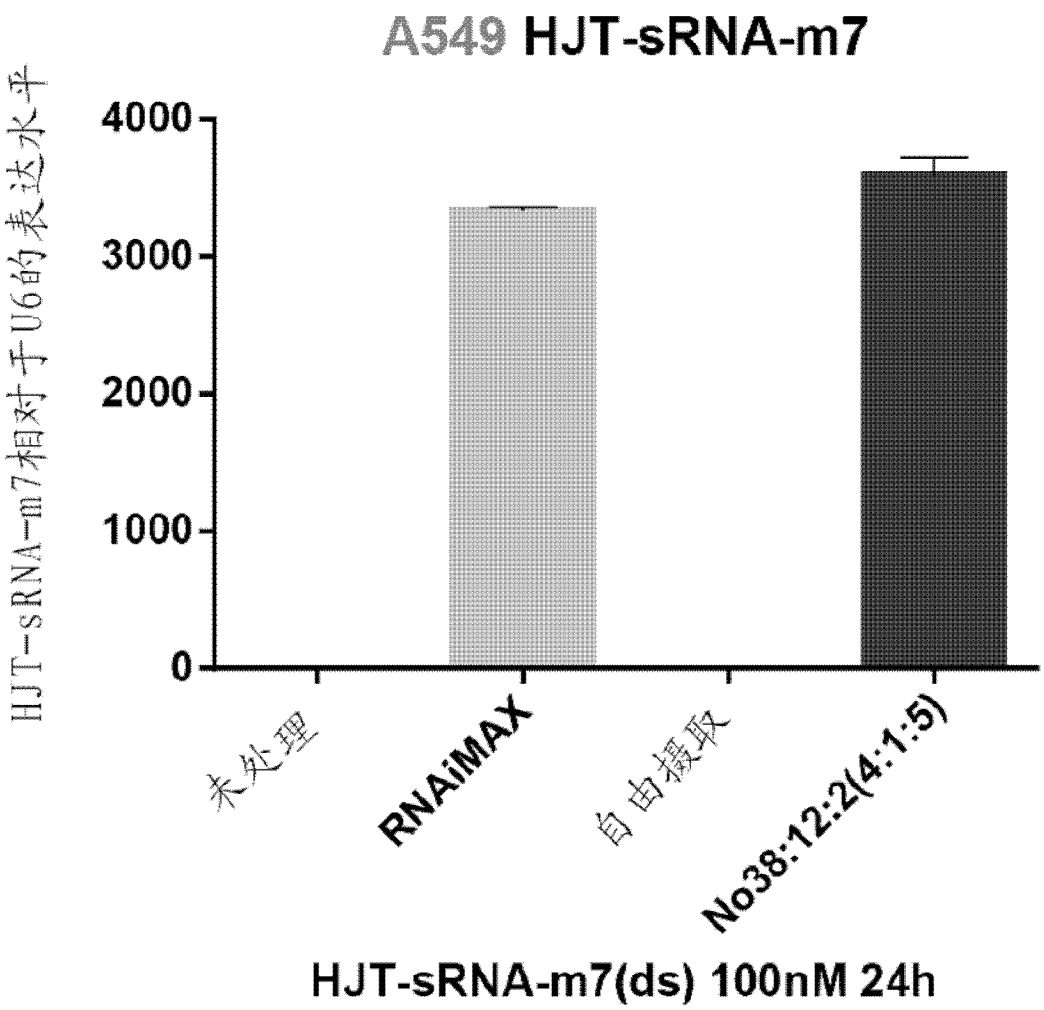

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
4000
3000
2000
1000
0
未处理
RNAiMAX
自由摄取
No38:12:2(4:1:5)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

图 71

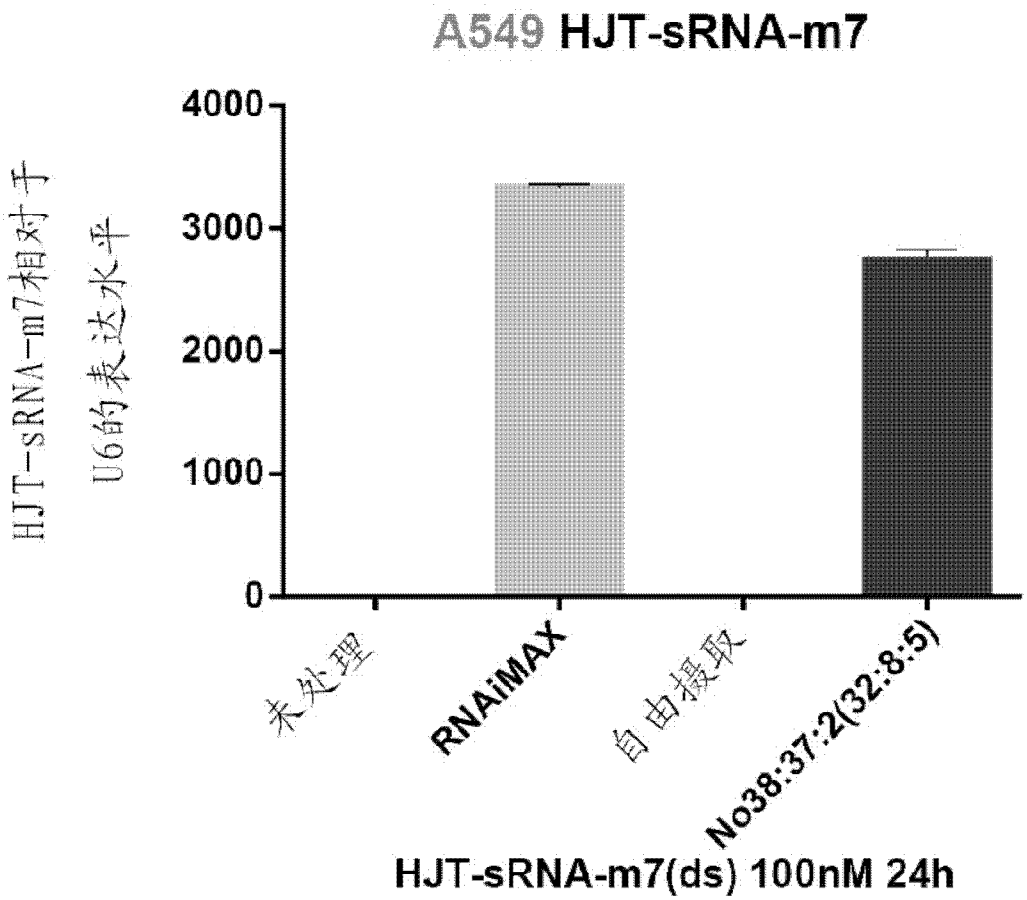

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
4000
3000
2000
1000
0
未处理
RNAiMAX
自由摄取
No38:37:2(32:8:5)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

图 72

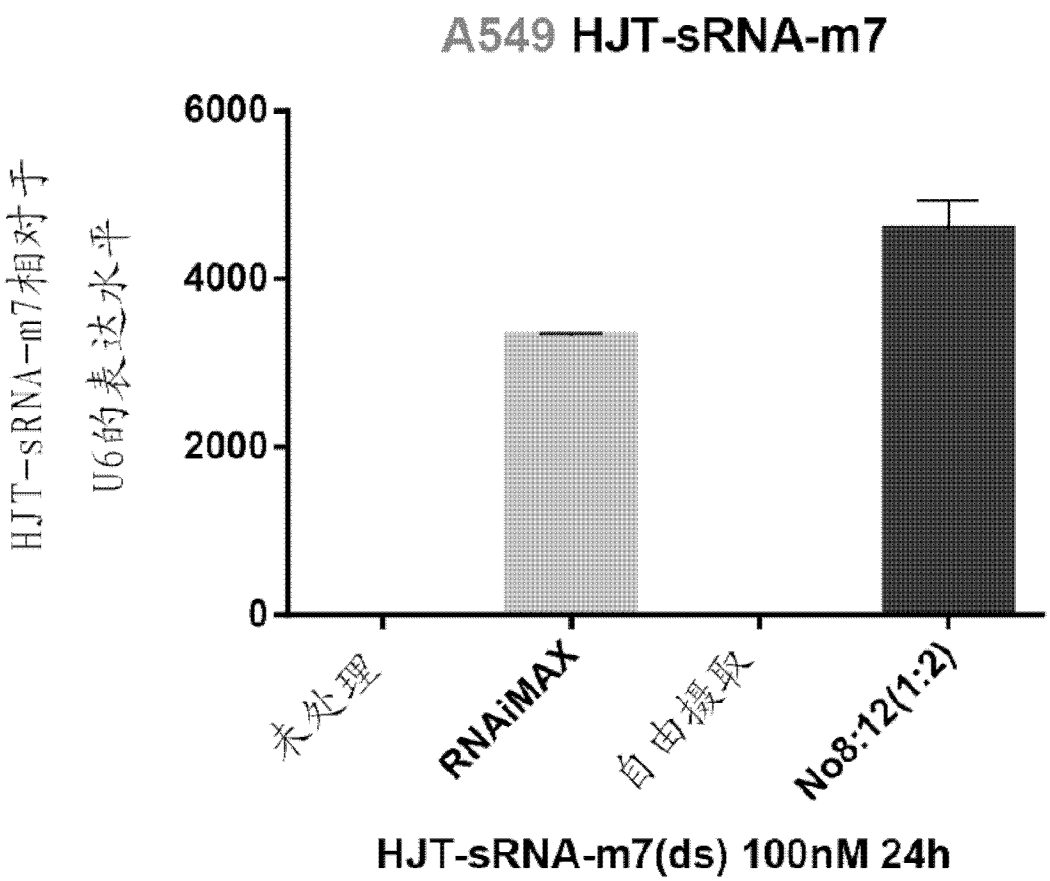

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
6000
4000
2000
0
未处理
RNAiMAX
自由摄取
No8:12(1:2)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

图 73

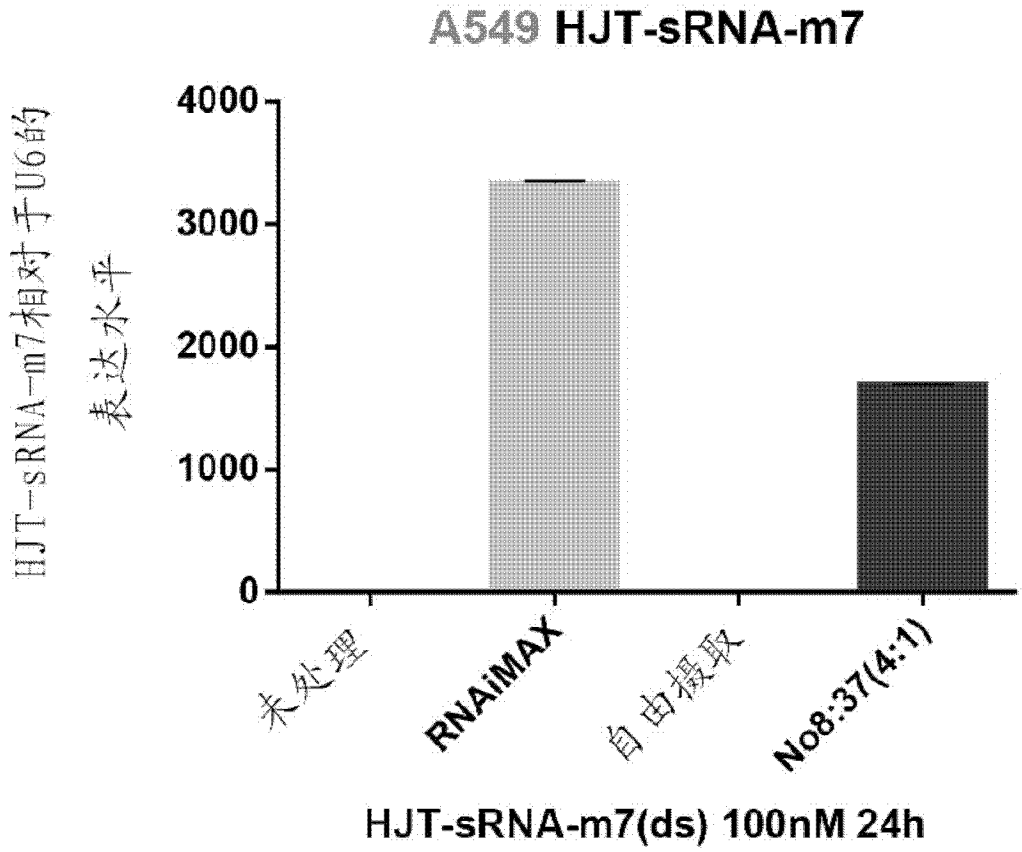

A549 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
4000
3000
2000
1000
0
未处理
RNAiMAX
自由摄取
No8:37(4:1)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

图 74

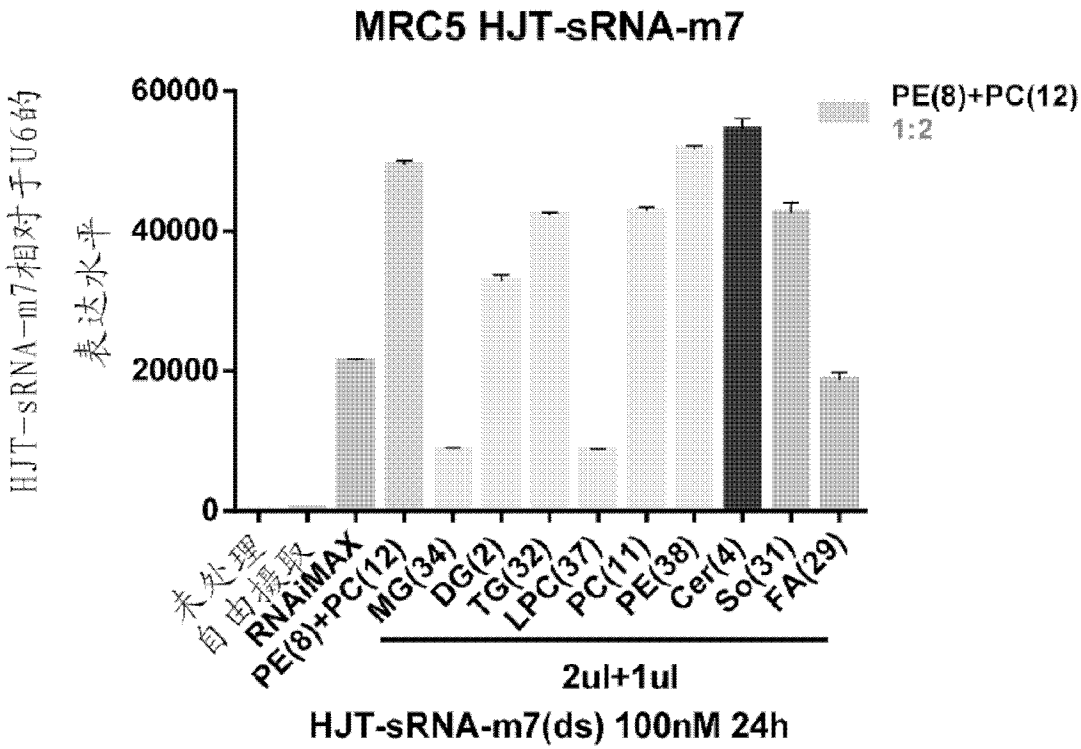

MRC5 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
60000
40000
20000
0
PE(8)+PC(12)
1:2
未处理
自由摄取
RNAiMAX
PE(8)+PC(12)
MG(34)
DG(2)
TG(32)
LPC(37)
PC(11)
PE(38)
Cer(4)
So(31)
FA(29)
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

图 75

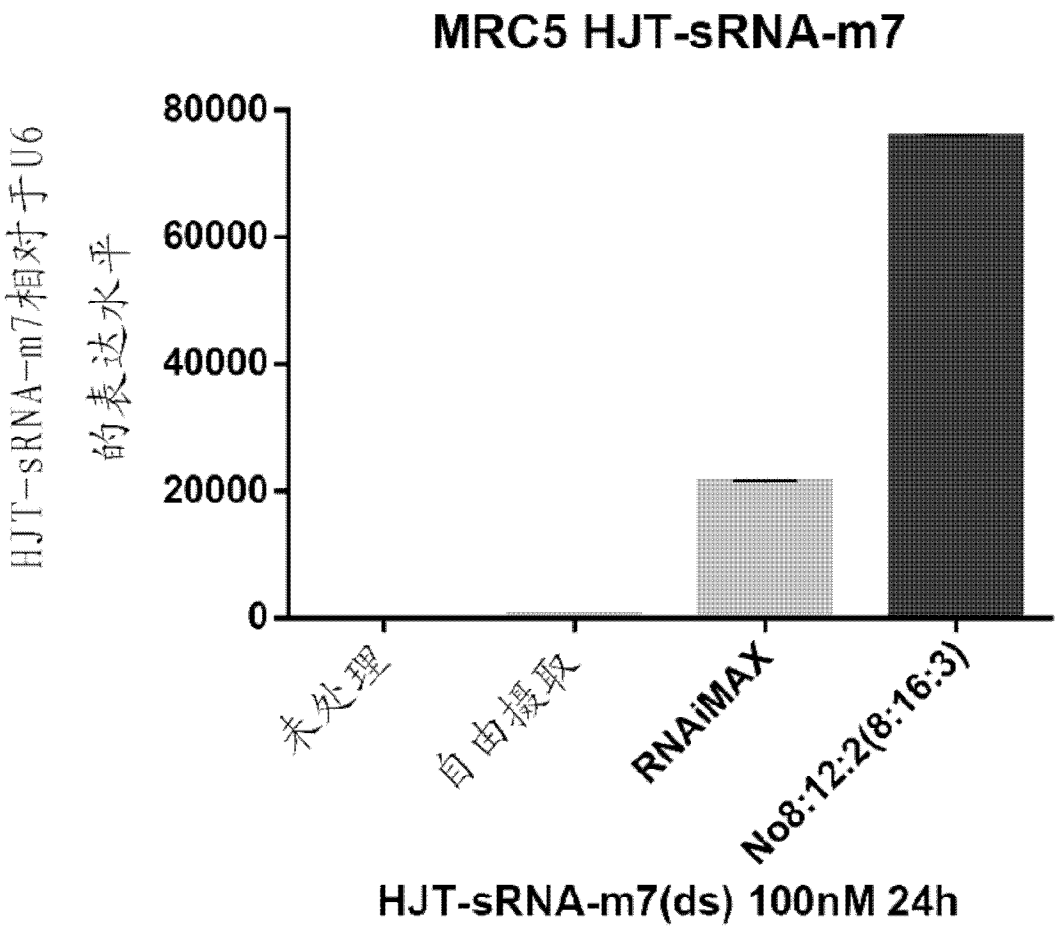

MRC5 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
80000
60000
40000
20000
0
未处理
自由摄取
RNAiMAX
No8:12:2(8:16:3)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 24h

图 76

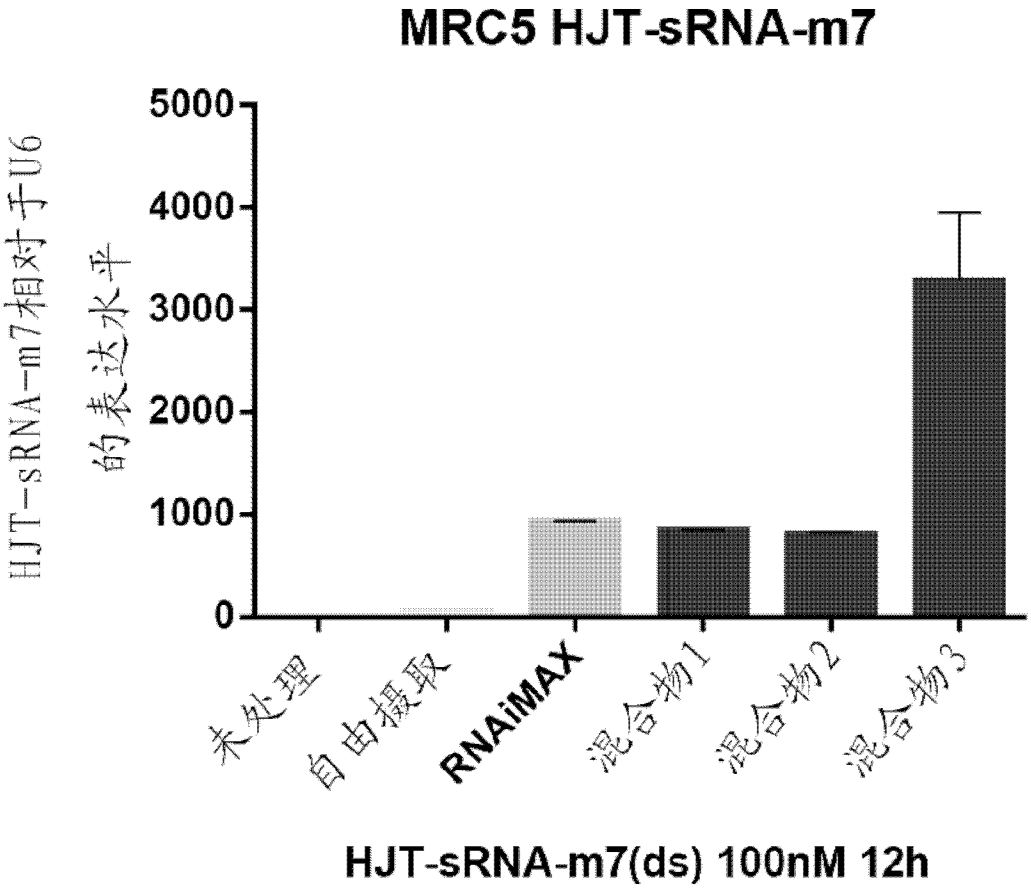

MRC5 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
5000
4000
3000
2000
1000
0
未处理
自由摄取
RNAiMAX
混合物1
混合物2
混合物3
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 12h

图 77

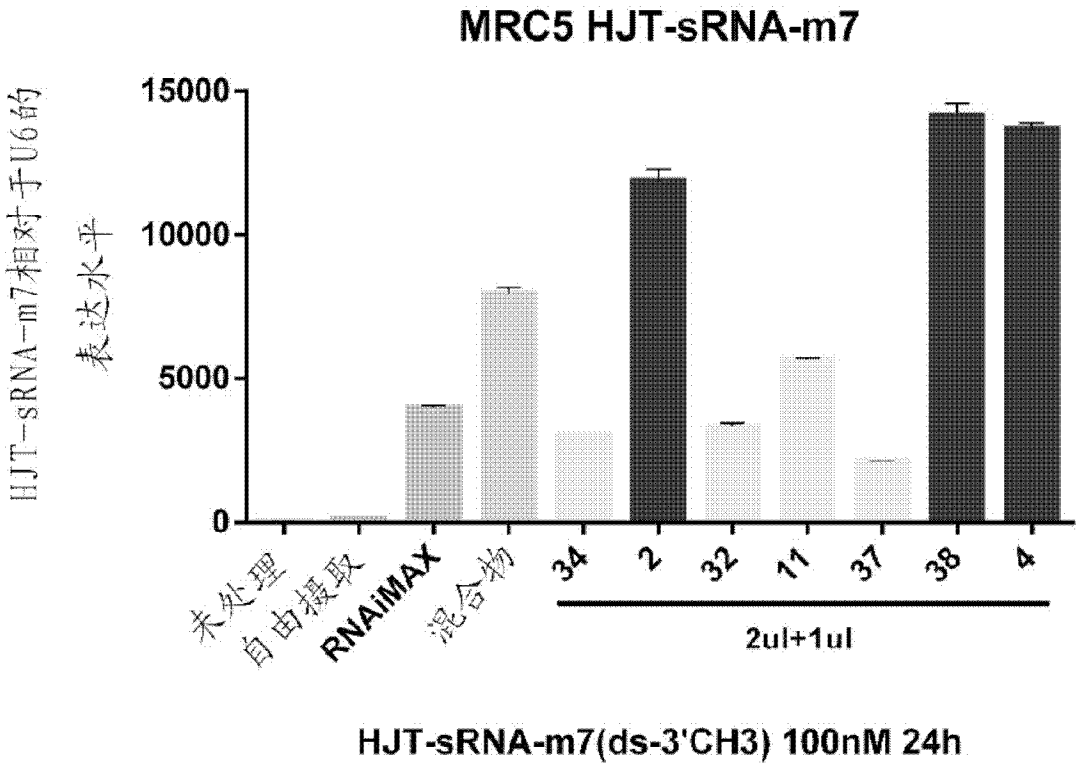

MRC5 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
15000
10000
5000
0
未处理
自由摄取
RNAiMAX
混合物
34
2
32
11
37
38
4
2ul+1ul
HJT-sRNA-m7(ds-3'CH3) 100nM 24h

图 78

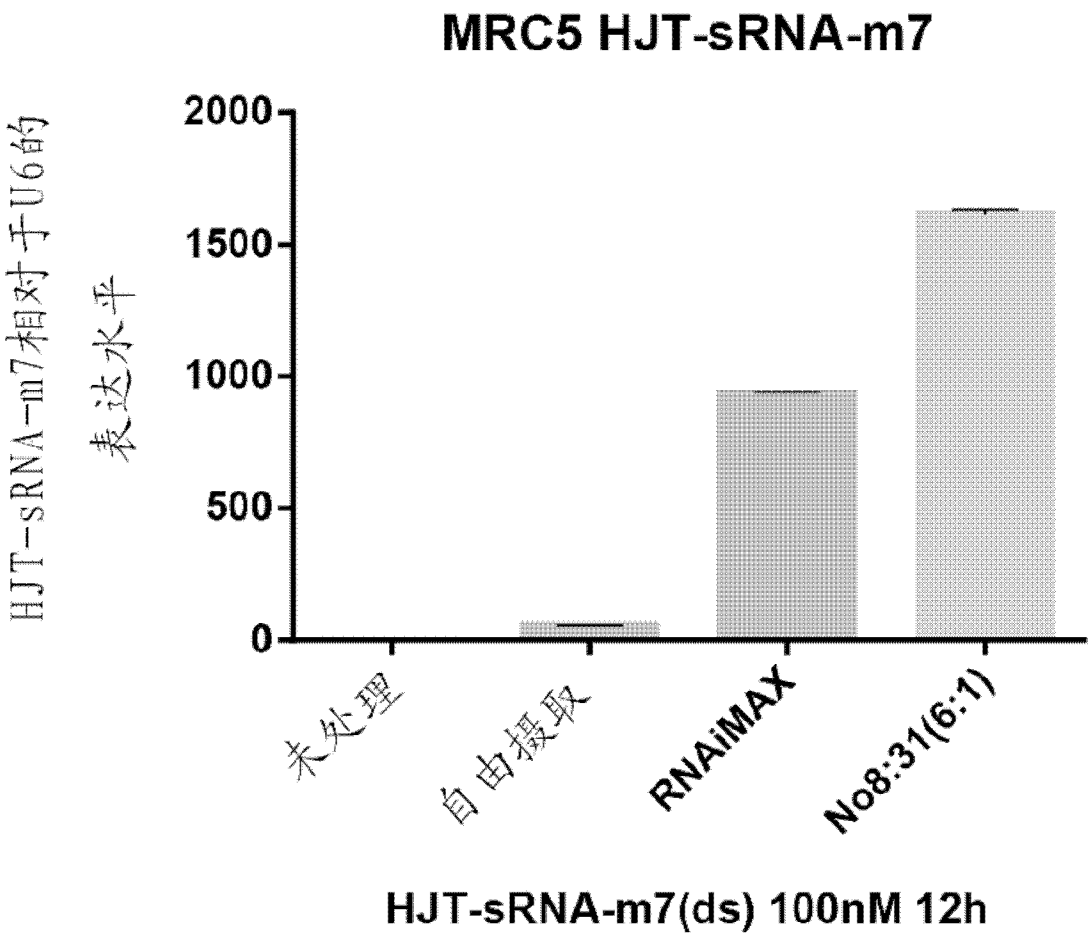

MRC5 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
2000
1500
1000
500
0
未处理
自由摄取
RNAiMAX
No8:31(6:1)
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 12h

图 79

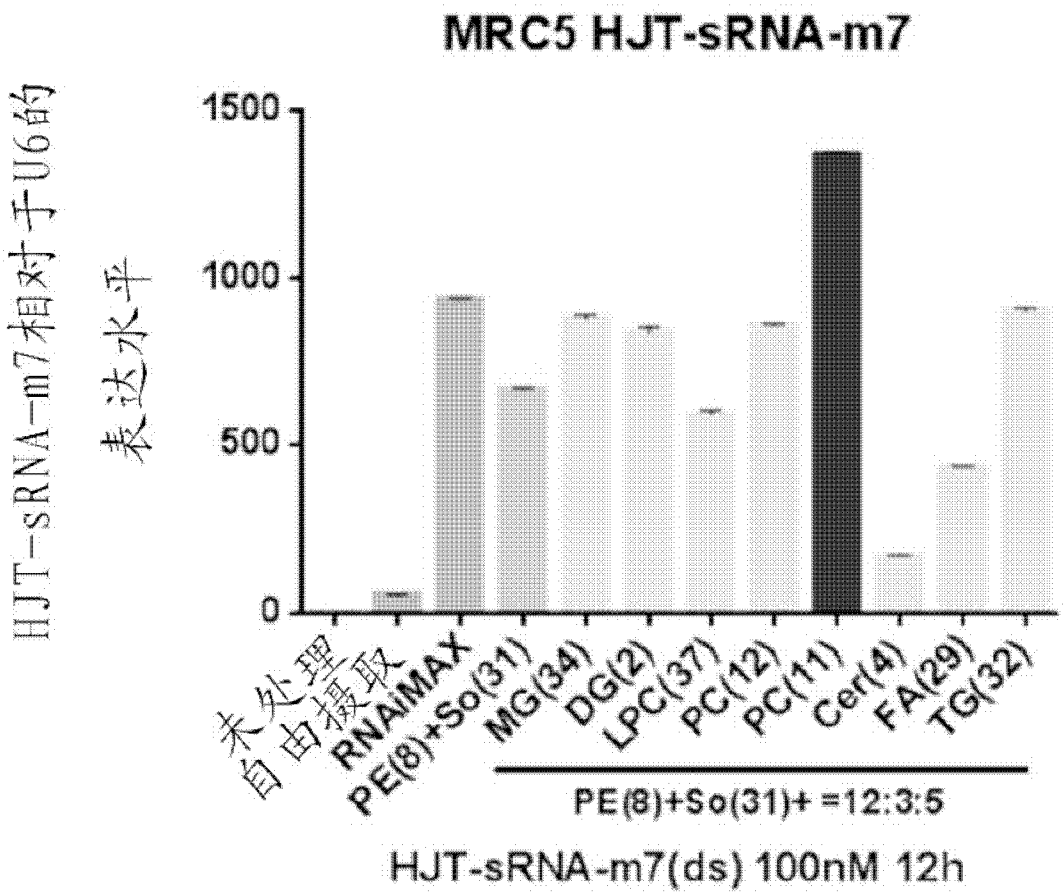

MRC5 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
1500
1000
500
0
未处理
自由摄取
RNAiMAX
PE(8)+So(31)
MG(34)
DG(2)
LPC(37)
PC(12)
PC(11)
Cer(4)
FA(29)
TG(32)
PE(8)+So(31)+ =12:3:5
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 12h

图 80

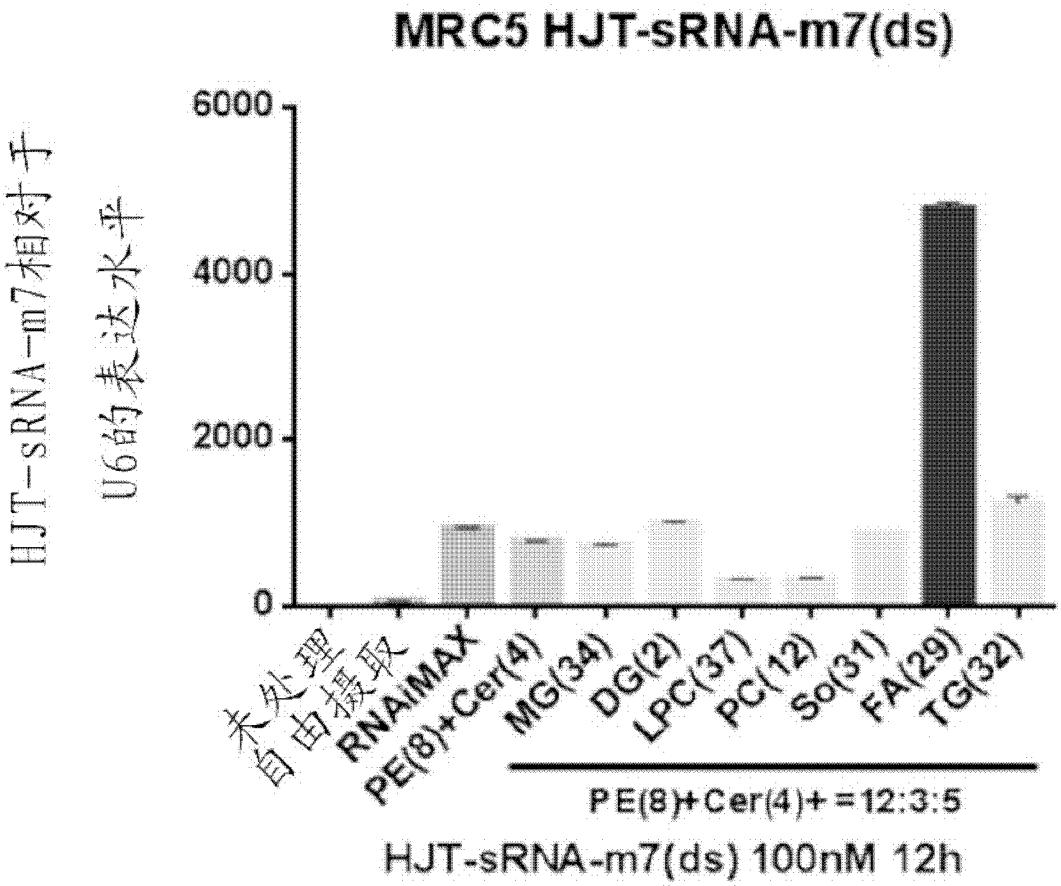

MRC5 HJT-sRNA-m7(ds)
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
6000
4000
2000
0
未处理
自由摄取
RNAiMAX
PE(8)+Cer(4)
MG(34)
DG(2)
LPC(37)
PC(12)
So(31)
FA(29)
TG(32)
PE(8)+Cer(4)+=12:3:5
HJT-sRNA-m7(ds) 100nM 12h

图 81

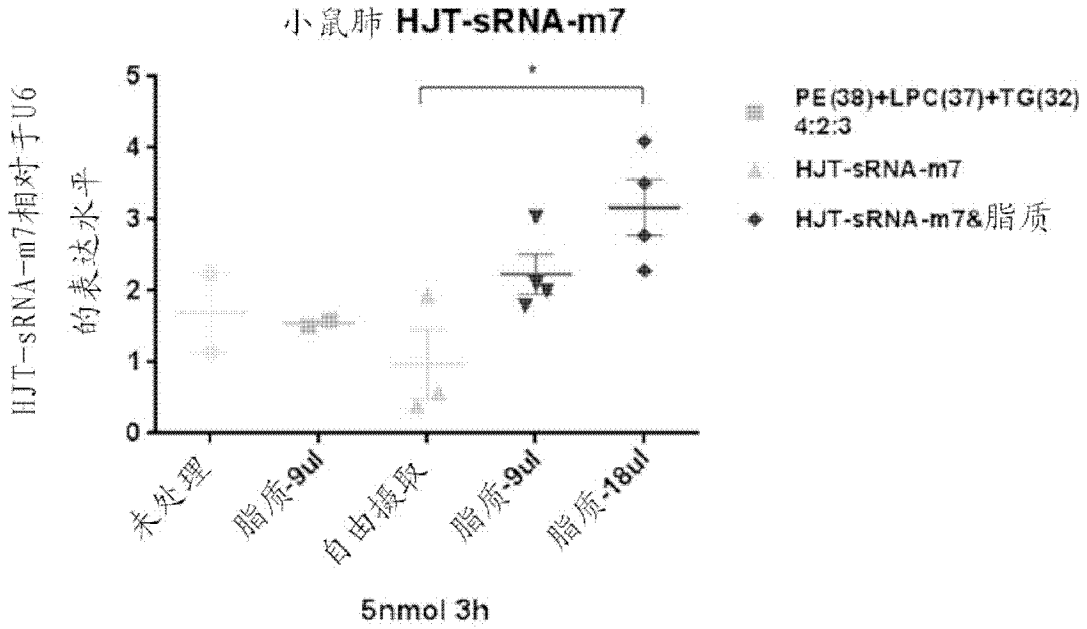

小鼠肺 HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7相对于U6的表达水平
5
4
3
2
1
0
*
PE(38)+LPC(37)+TG(32) 4:2:3
HJT-sRNA-m7
HJT-sRNA-m7&脂质
未处理
脂质-9ul
自由摄取
脂质-9ul
脂质-18ul
5nmol 3h

图 82

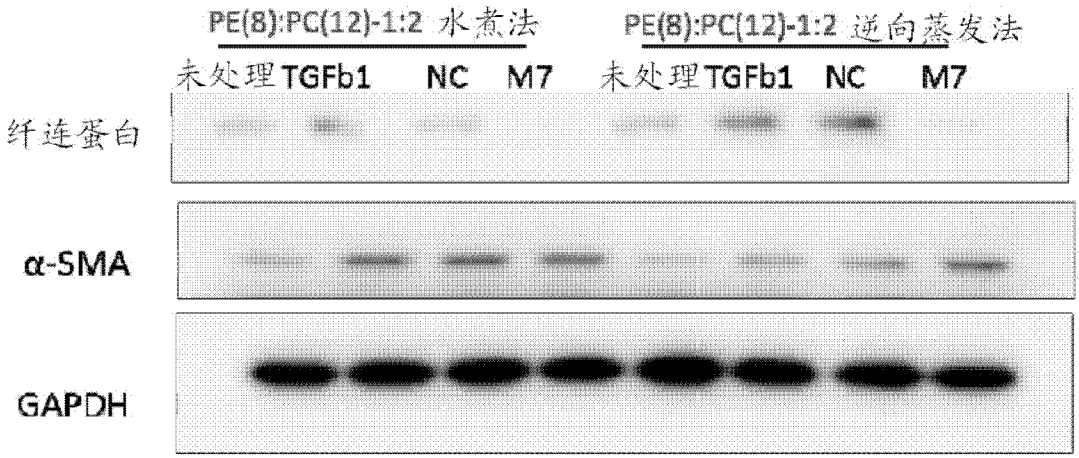

PE(8):PC(12)-1:2 水煮法
PE(8):PC(12)-1:2 逆向蒸发法
未处理 TGFb1 NC M7
未处理 TGFb1 NC M7
纤连蛋白
α-SMA
GAPDH

图 83

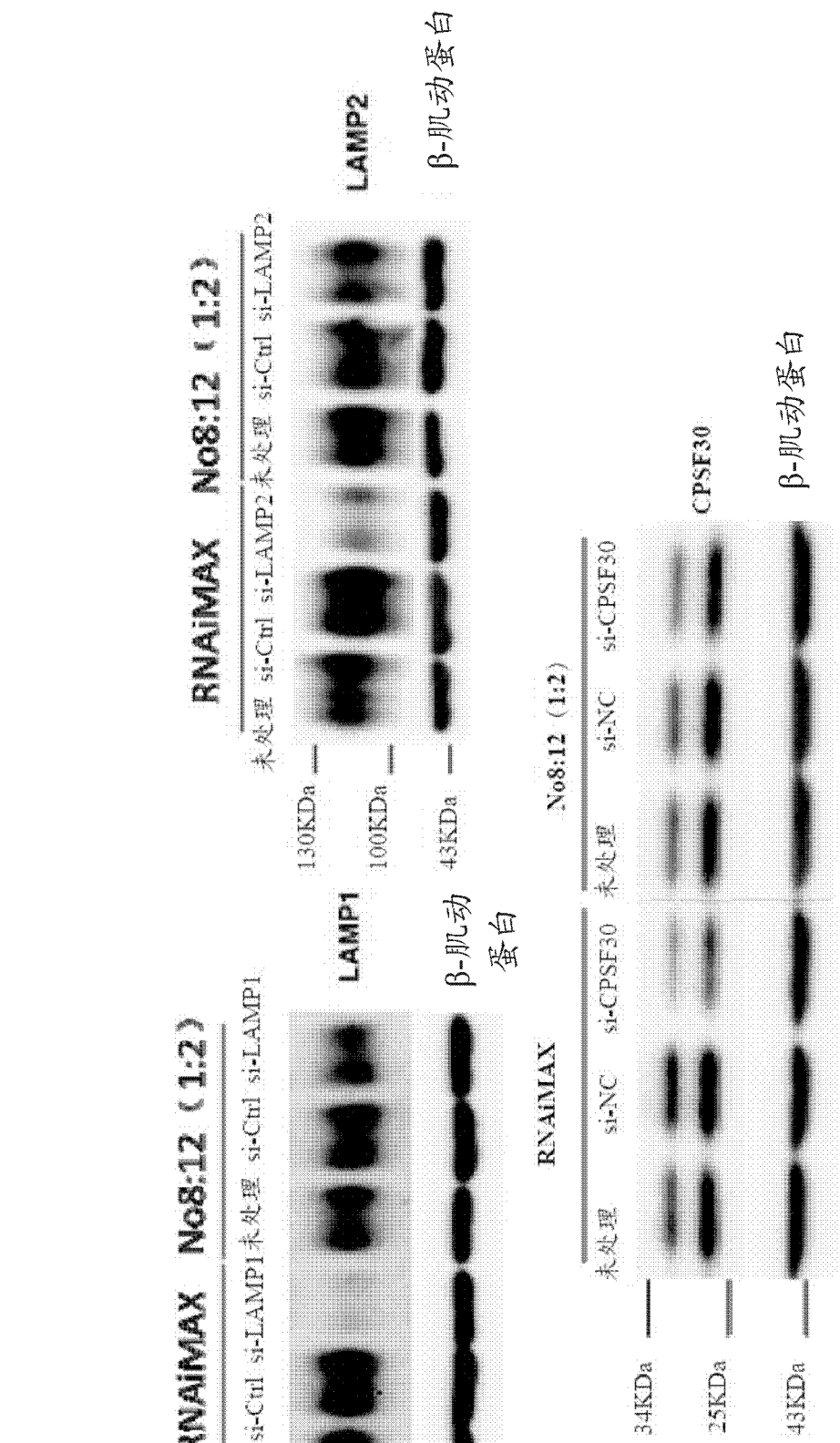

RNAiMAX No8:12（1:2）
未处理 si-Ctrl si-LAMP1
130KDa
100KDa
LAMP1
43KDa
β-肌动蛋白
RNAiMAX No8:12（1:2）
未处理 si-Ctrl si-LAMP2
130KDa
100KDa
LAMP2
43KDa
β-肌动蛋白
RNAiMAX No8:12（1:2）
未处理 si-NC si-CPSF30
34KDa
CPSF30
25KDa
β-肌动蛋白
43KDa
RNAiMAX No8:12（1:2）
未处理 si-NC si-CPSF30

图 84

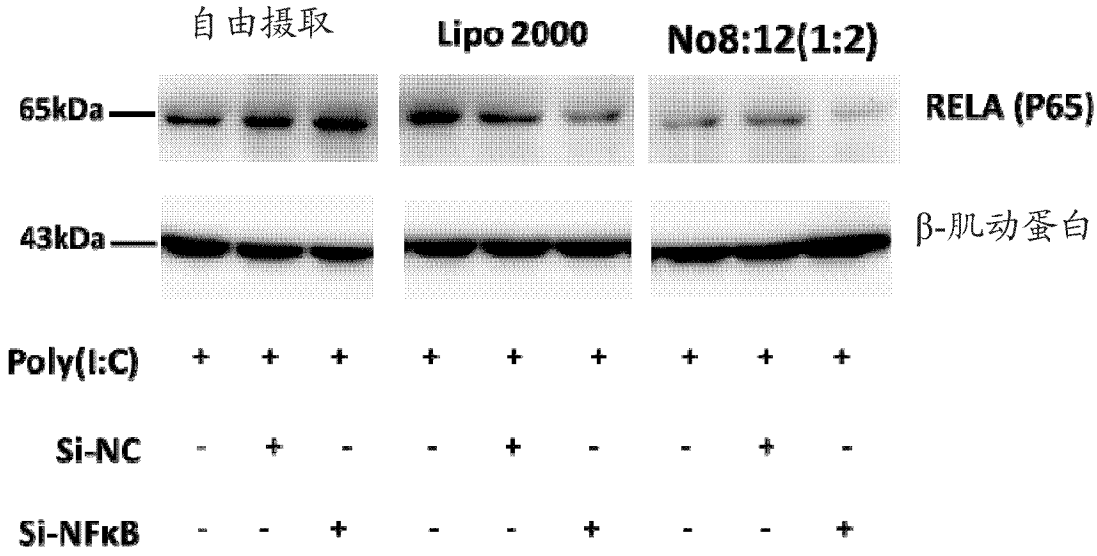
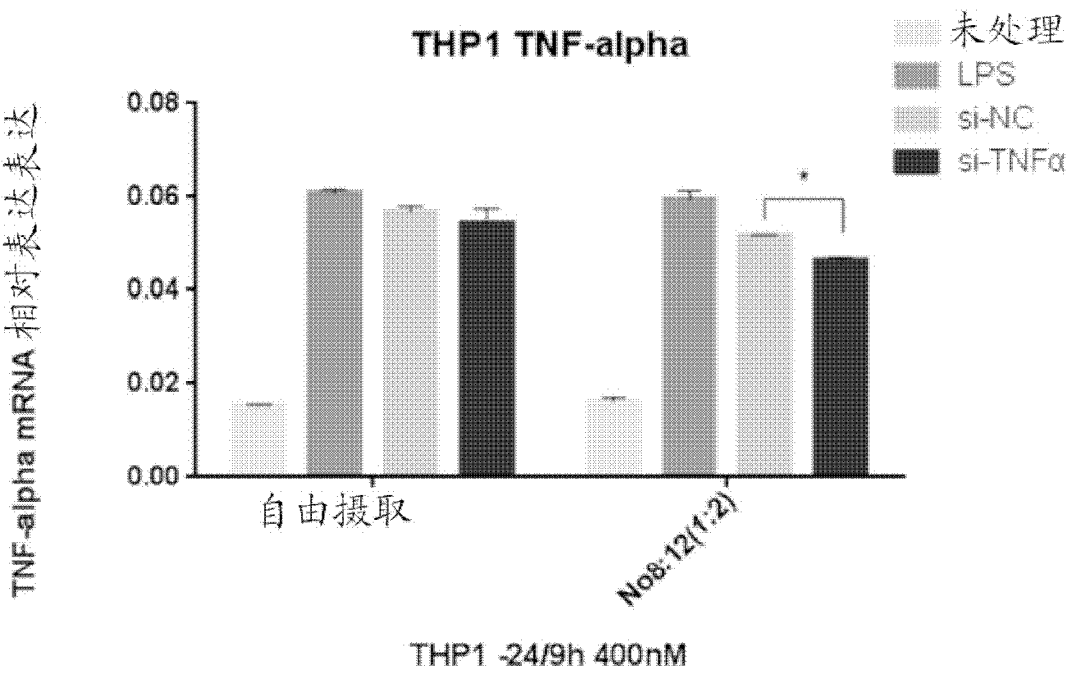

自由摄取
Lipo 2000
No8:12(1:2)
65kDa
RELA (P65)
43kDa
β-肌动蛋白
Poly(I:C) + + + + + + + + +
Si-NC - + - - + - - + -
Si-NFκB - - + - - + - - +

图 85


THP1 TNF-alpha
未处理
LPS
si-NC
si-TNFα
TNF-alpha mRNA 相对表达表达
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
*
自由摄取
No8:12(1:2)
THP1 -24/9h 400nM

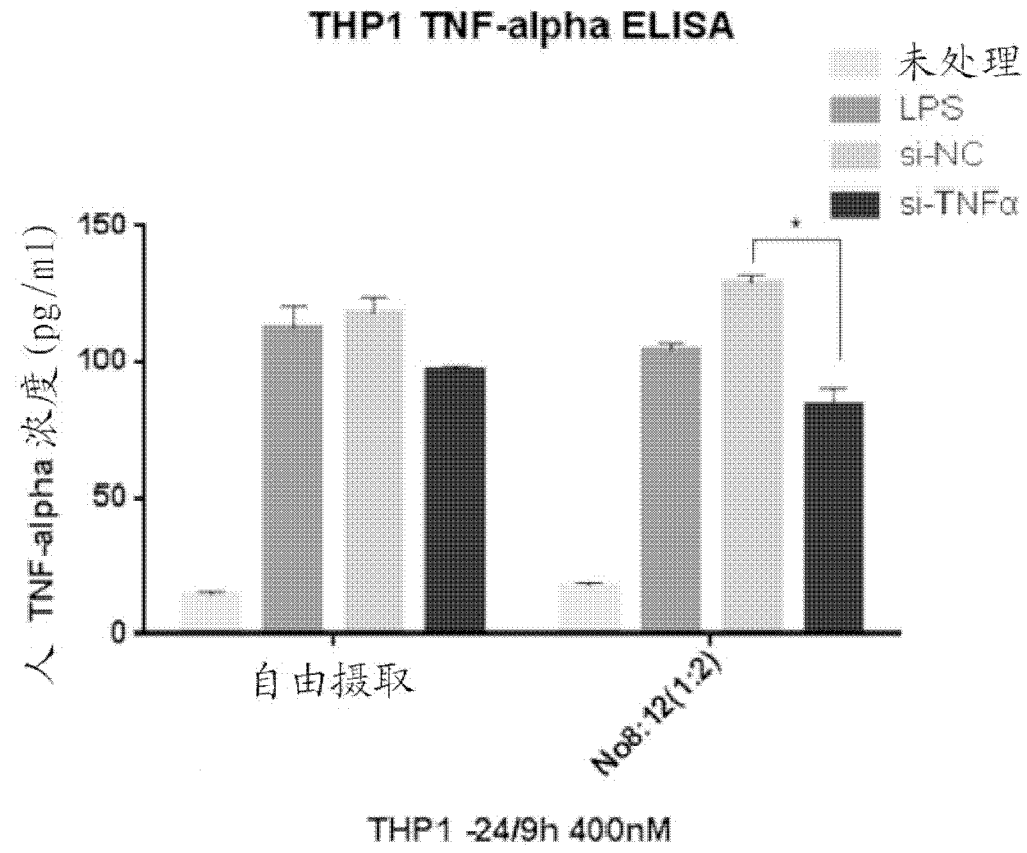

THP1 TNF-alpha ELISA
未处理
LPS
si-NC
si-TNFα
人 TNF-alpha 浓度 (pg/ml)
150
100
50
0
*
自由摄取
No8:12(1:2)
THP1 -24/9h 400nM

图 86

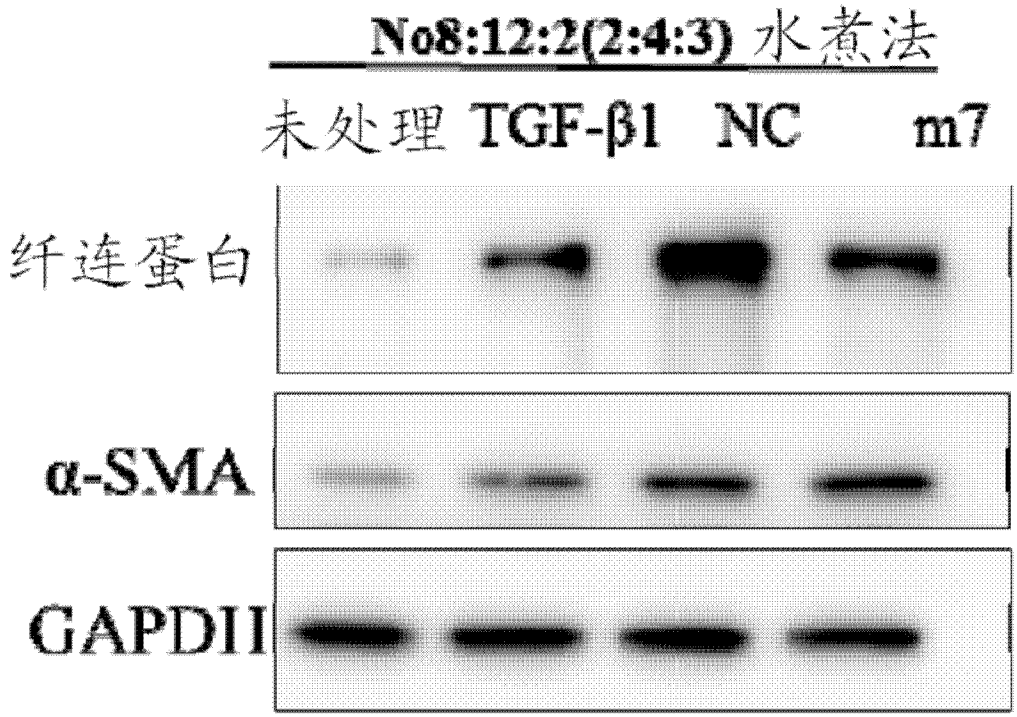

No8:12:2(2:4:3) 水煮法
未处理
TGF-β1
NC
m7
纤连蛋白
α-SMA
GAPDII

图 87

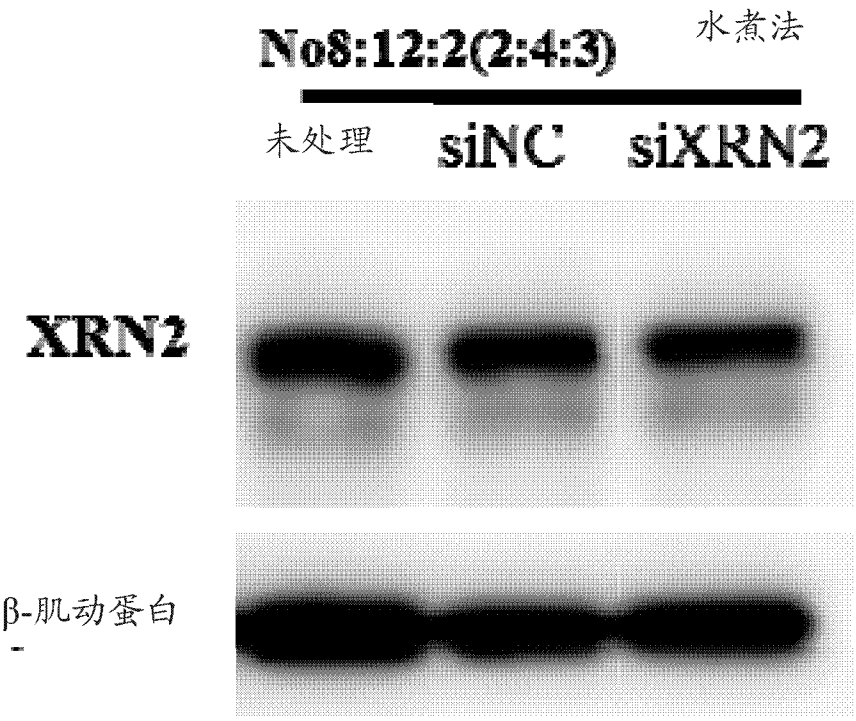

No8:12:2(2:4:3)
水煮法
未处理
siNC
siXRN2
XRN2
β-肌动蛋白

图 88

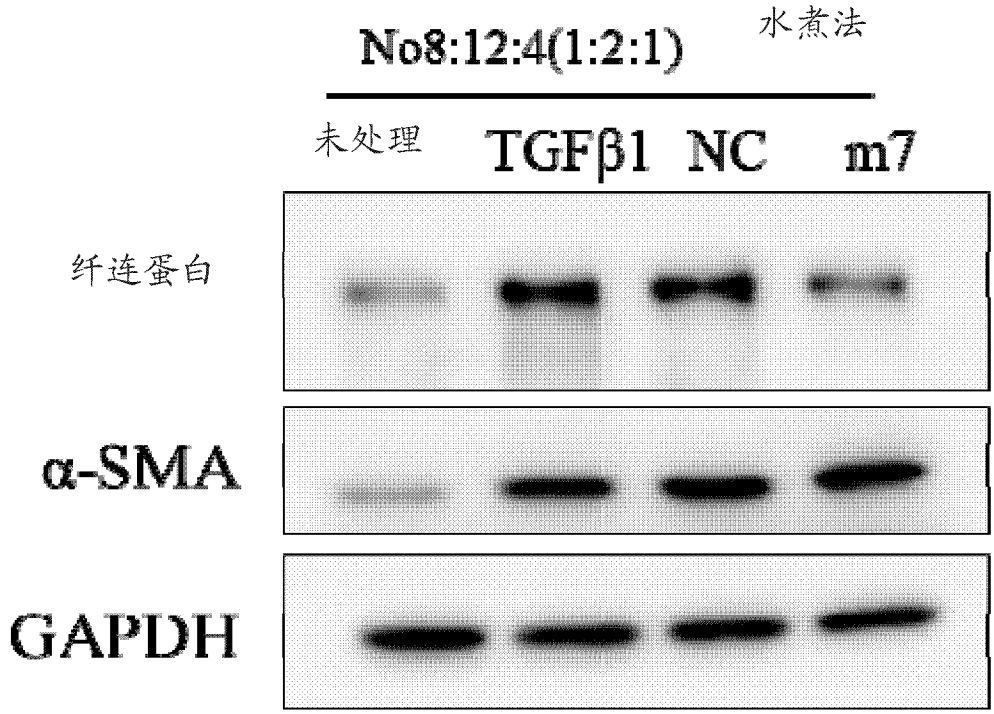

No8:12:4(1:2:1)
水煮法
未处理
TGFβ1
NC
m7
纤连蛋白
α-SMA
GAPDH

图 89

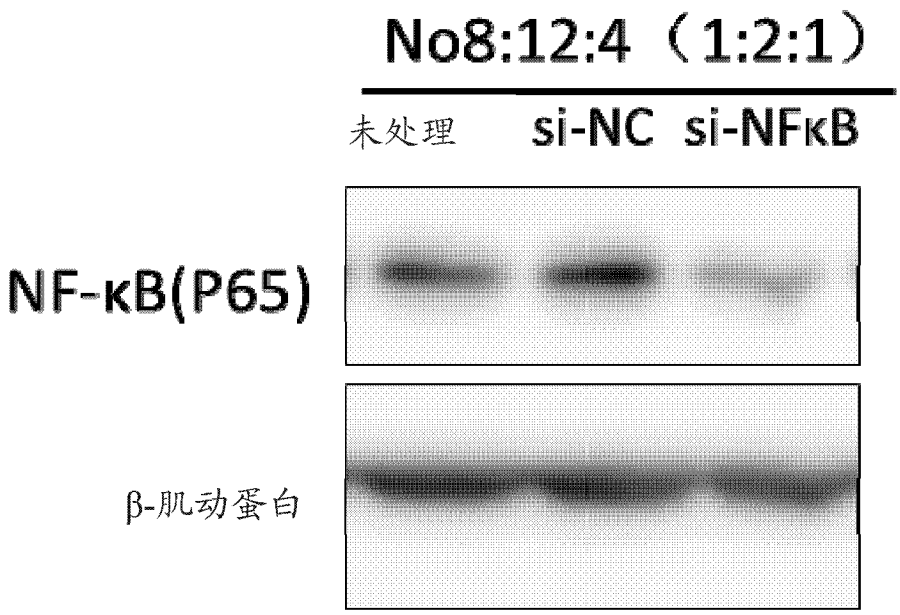

No8:12:4（1:2:1）
未处理
si-NC
si-NFκB
NF-κB(P65)
β-肌动蛋白

图 90

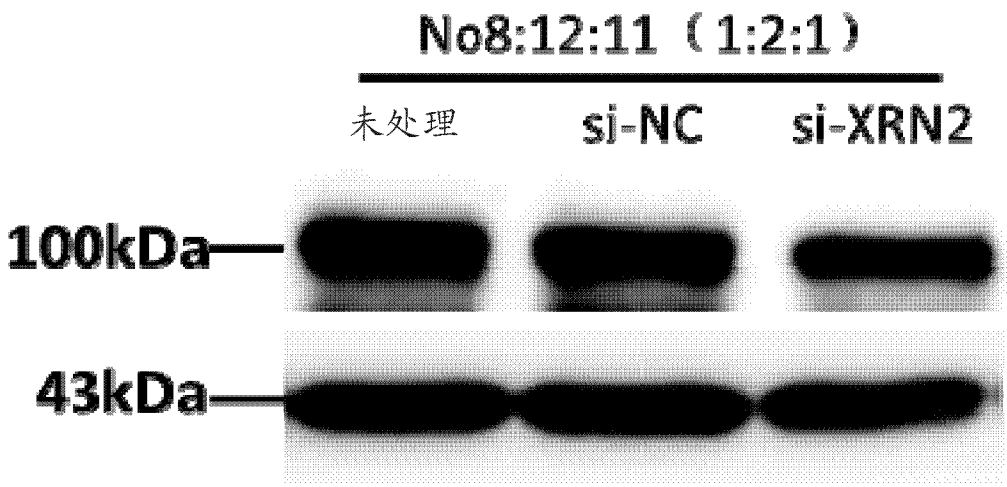

No8:12:11（1:2:1）
未处理
si-NC
si-XRN2
100kDa
43kDa

图 91

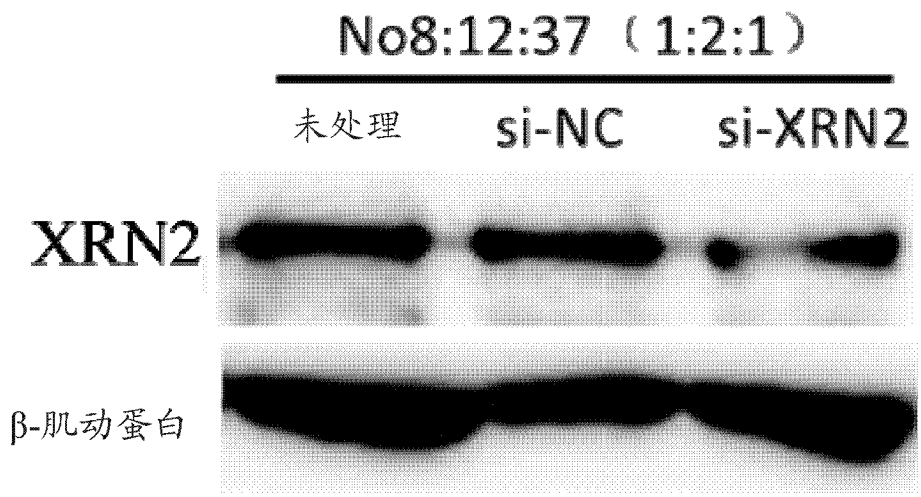

No8:12:37（1:2:1）
未处理
si-NC
si-XRN2
XRN2
β-肌动蛋白

图 92

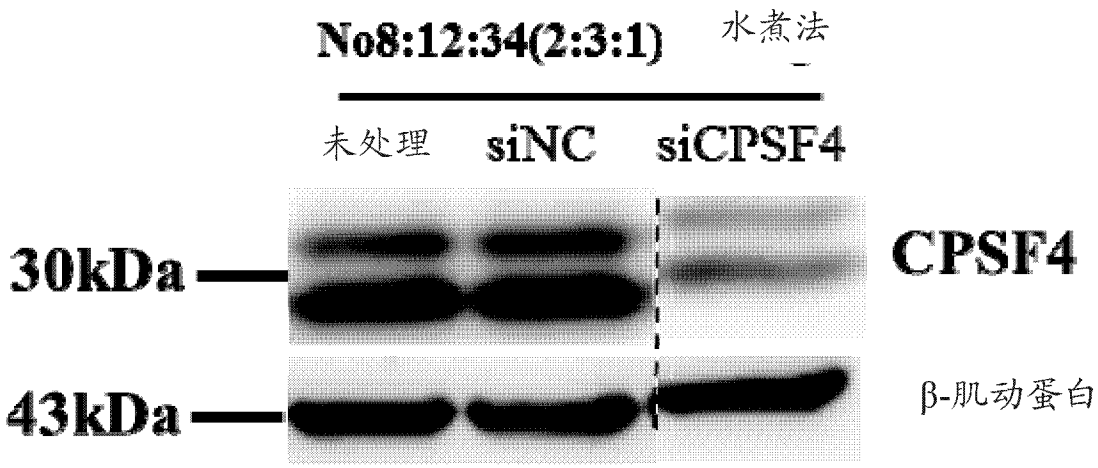

No8:12:34(2:3:1)
水煮法
未处理
siNC
siCPSF4
30kDa
CPSF4
43kDa
β-肌动蛋白

图 93

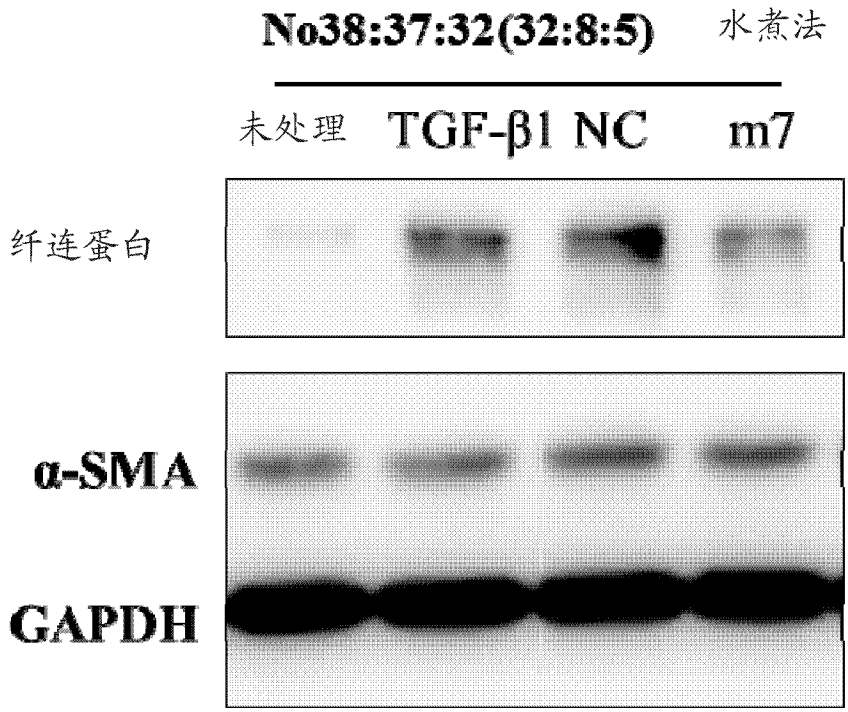

No38:37:32(32:8:5)
水煮法
未处理
TGF-β1
NC
m7
纤连蛋白
α-SMA
GAPDH

图 94

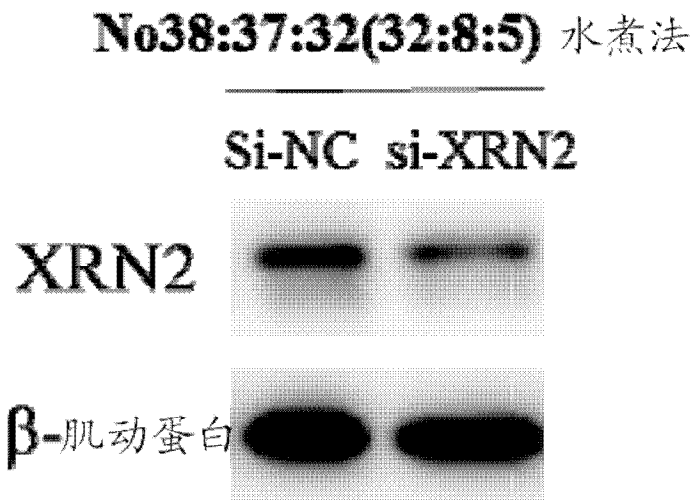

No38:37:32(32:8:5) 水煮法
Si-NC si-XRN2
XRN2
β-肌动蛋白

图 95

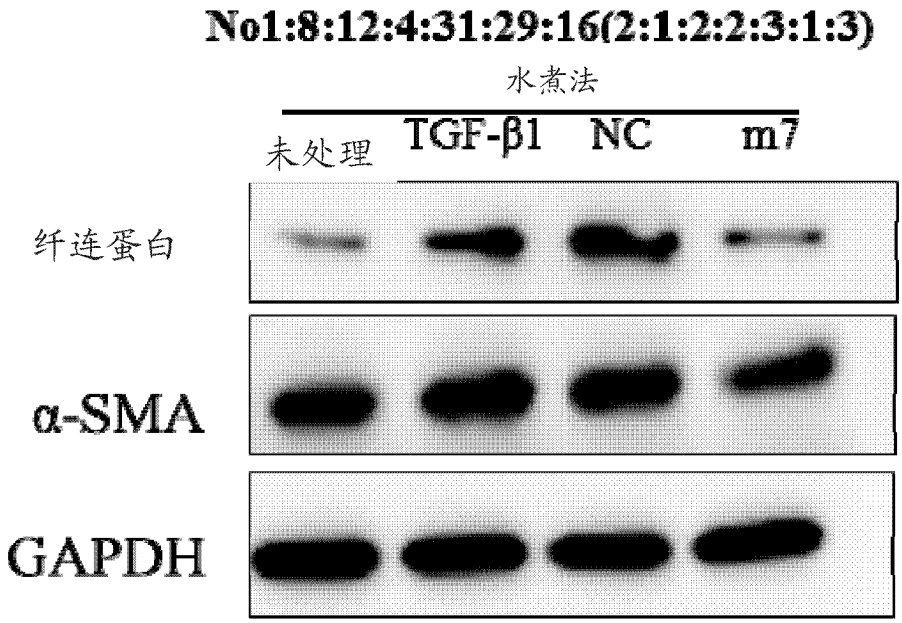

No1:8:12:4:31:29:16(2:1:2:2:3:1:3)
水煮法
未处理 TGF-β1 NC m7
纤连蛋白
α-SMA
GAPDH

图 96

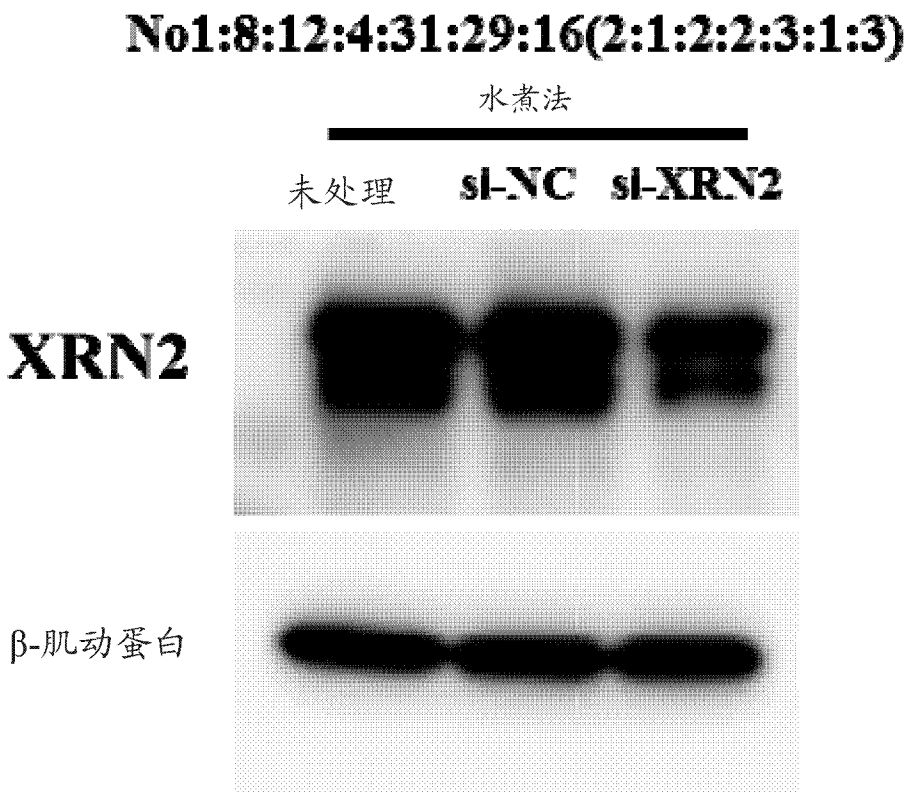

No1:8:12:4:31:29:16(2:1:2:2:3:1:3)
水煮法
未处理
sl-NC
sl-XRN2
XRN2
β-肌动蛋白

图 97

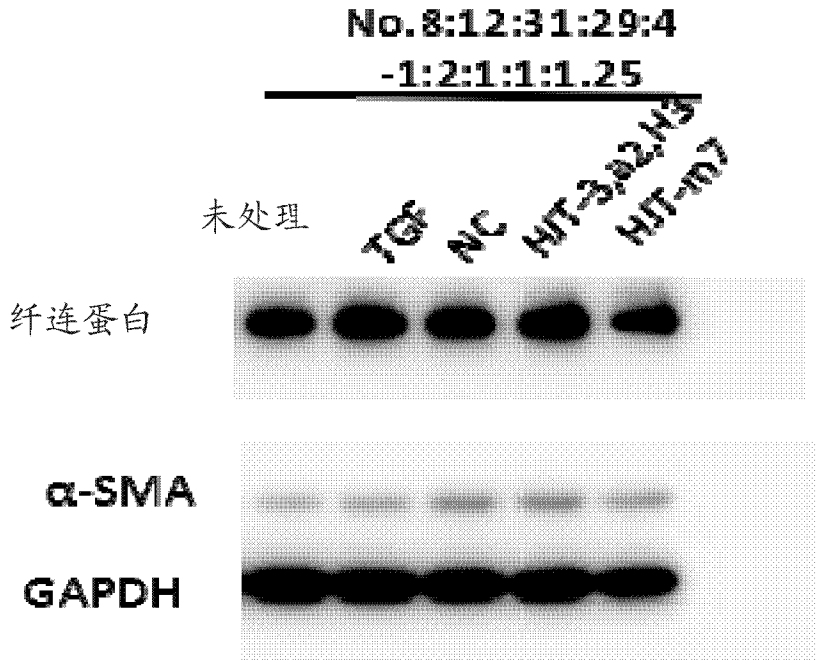

No.8:12:31:29:4
-1:2:1:1:1.25
未处理
TGF
NC
HJT-3,82,H3
HJT-m7
纤连蛋白
α-SMA
GAPDH

图 98

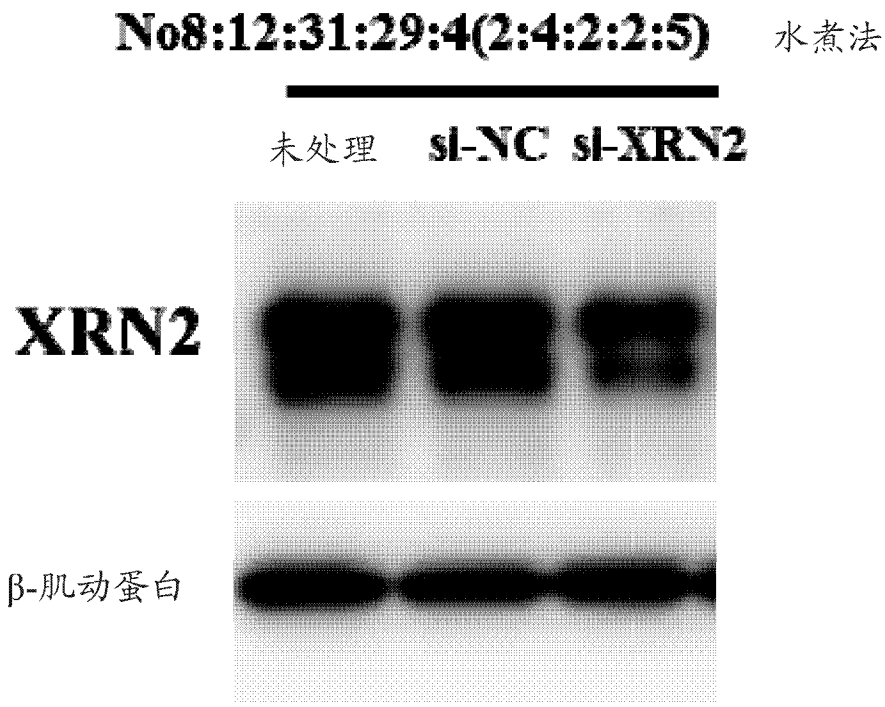

No8:12:31:29:4(2:4:2:2:5)
水煮法
未处理
sl-NC
sl-XRN2
XRN2
β-肌动蛋白

图 99

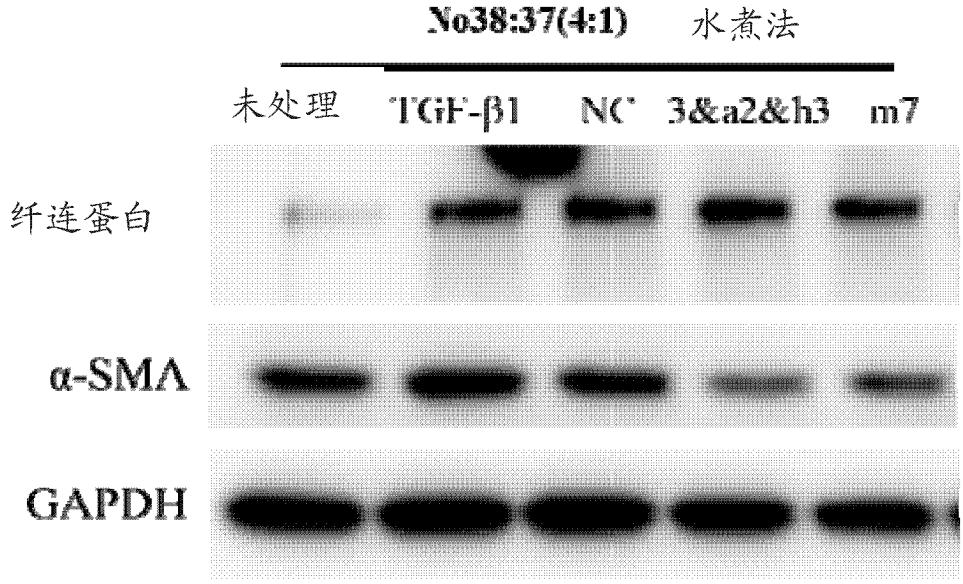

No38:37(4:1)
水煮法
未处理
TGF-β1
NC
3&a2&h3
m7
纤连蛋白
α-SMA
GAPDH

图 100

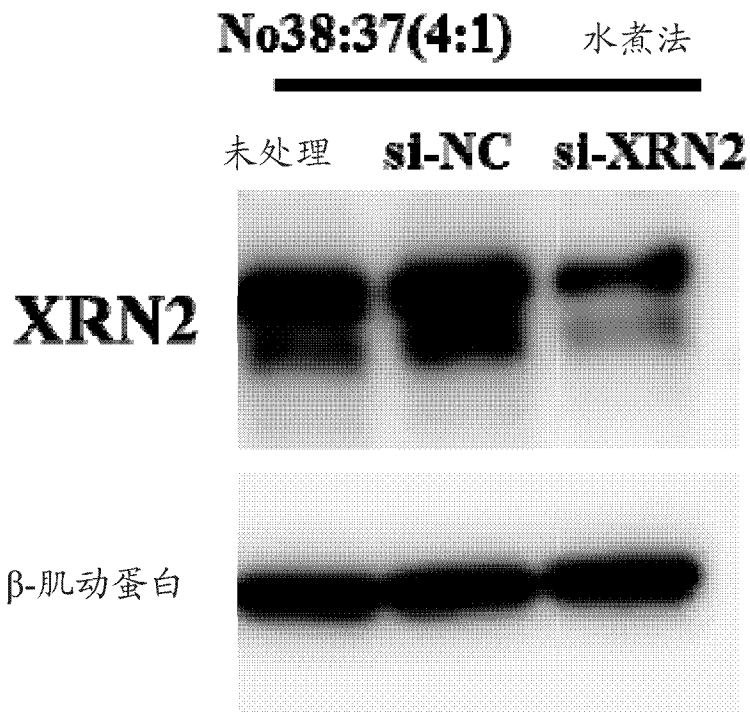

No38:37(4:1)
水煮法
未处理
si-NC
si-XRN2
XRN2
β-肌动蛋白

图 101

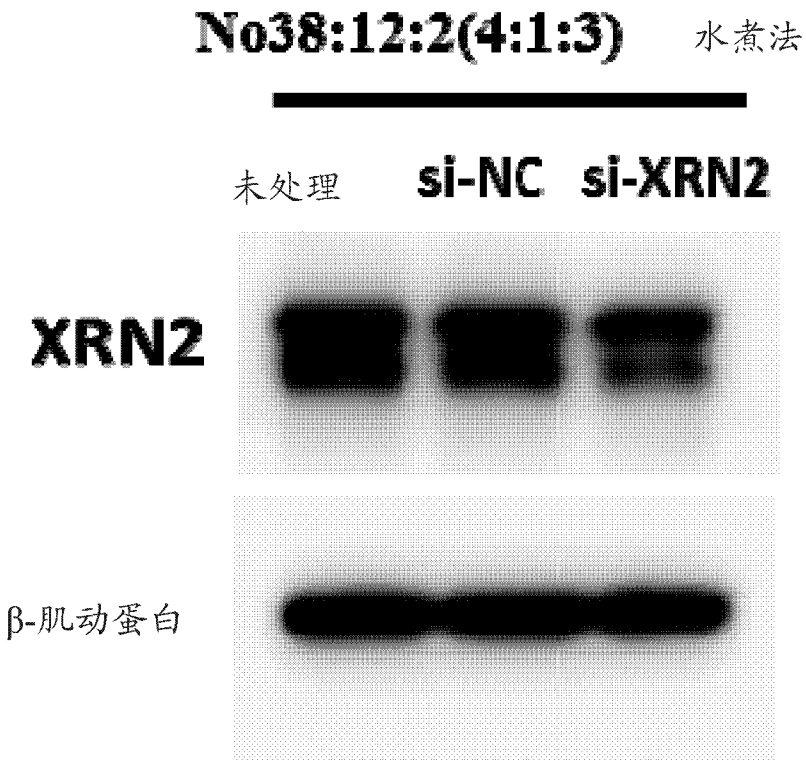

No38:12:2(4:1:3)
水煮法
未处理
si-NC
si-XRN2
XRN2
β-肌动蛋白

图 102

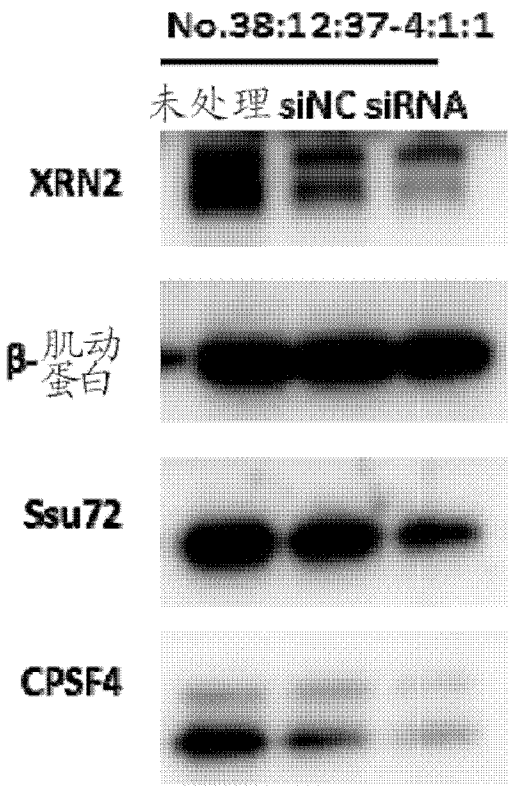

No.38:12:37-4:1:1
未处理 siNC siRNA
XRN2
β-肌动蛋白
Ssu72
CPSF4

图 103

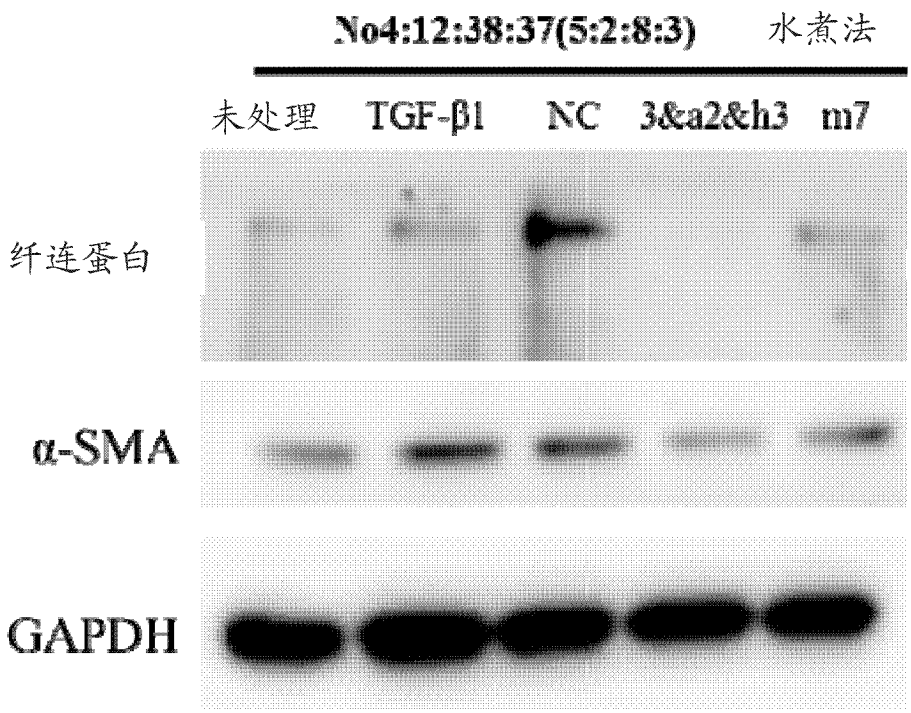

No4:12:38:37(5:2:8:3) 水煮法
未处理 TGF-β1 NC 3&a2&h3 m7
纤连蛋白
α-SMA
GAPDH

图 104

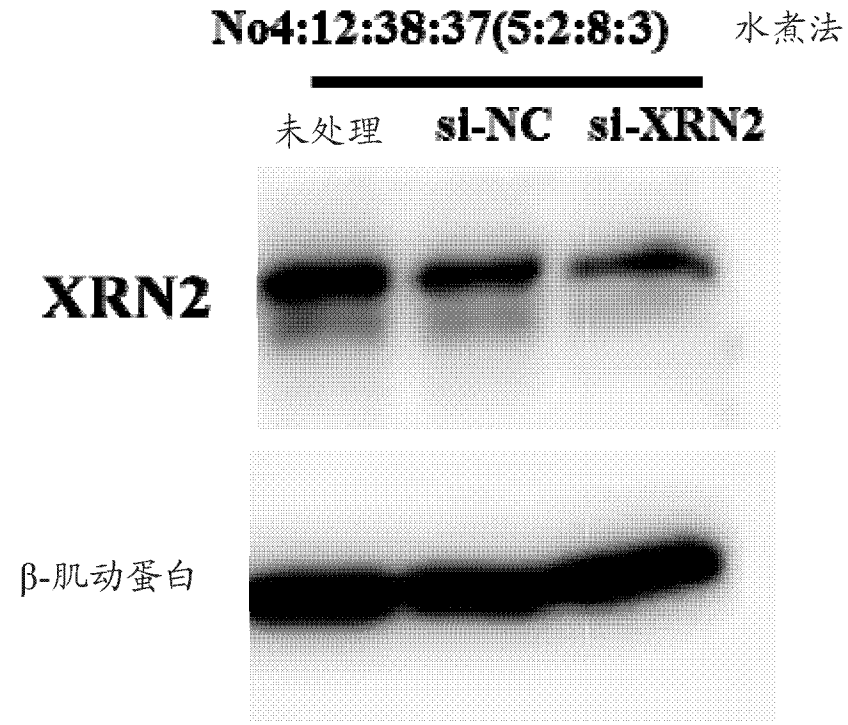

No4:12:38:37(5:2:8:3)
水煮法
未处理
si-NC
si-XRN2
XRN2
β-肌动蛋白

图 105

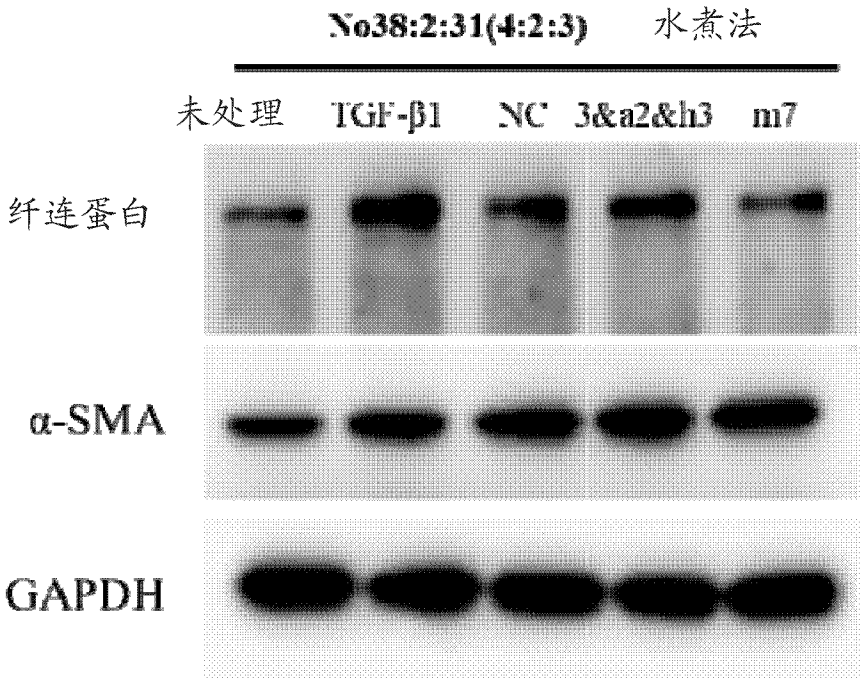

No38:2:31(4:2:3)
水煮法
未处理
TGF-β1
NC
3&a2&h3
m7
纤连蛋白
α-SMA
GAPDH

图 106

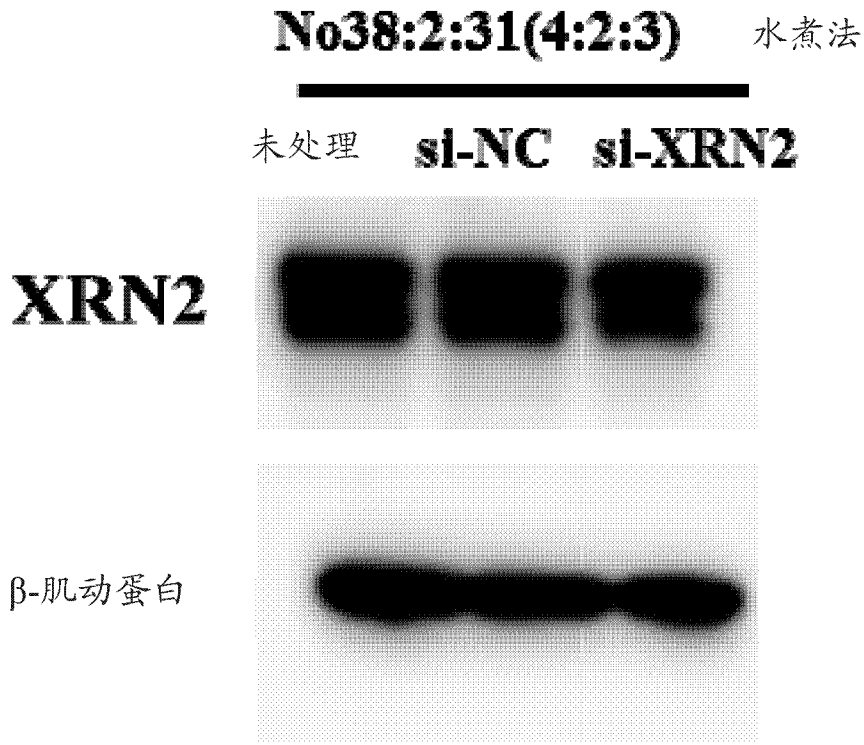


图 107

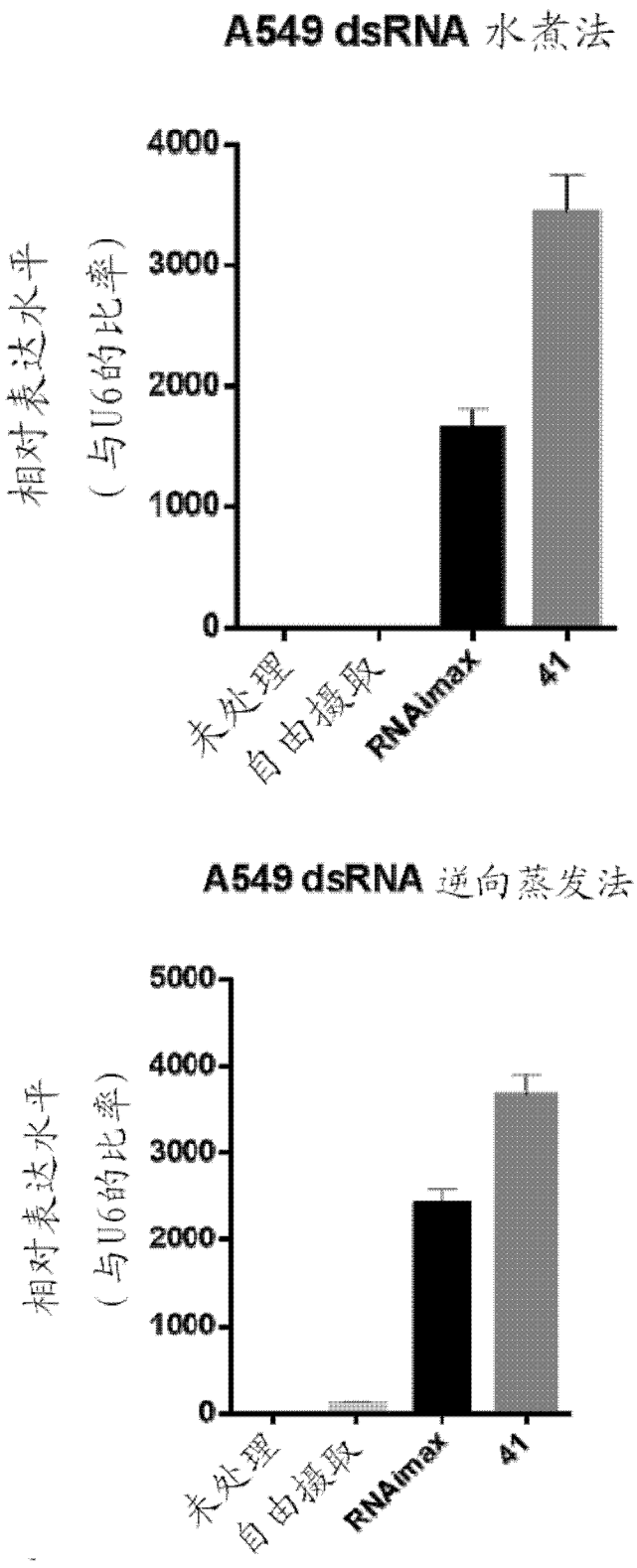
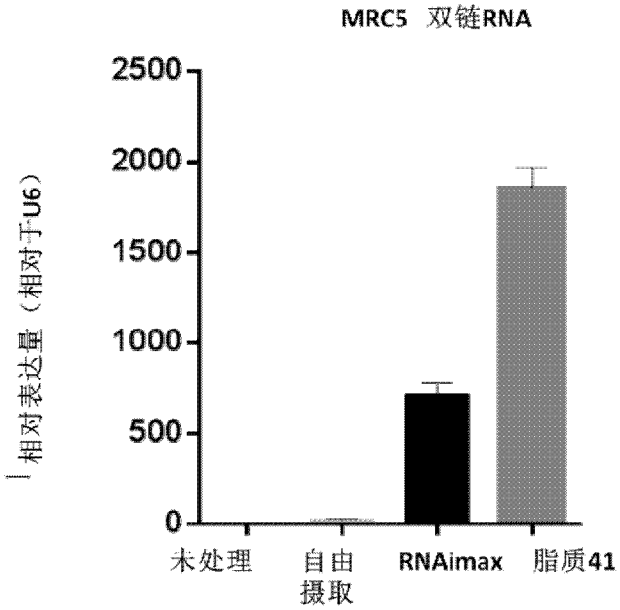

A549 dsRNA 水煮法
相对表达水平
（与U6的比率）
4000
3000
2000
1000
0
未处理
自由摄取
RNAimax
41
A549 dsRNA 逆向蒸发法
相对表达水平
（与U6的比率）
5000
4000
3000
2000
1000
0
未处理
自由摄取
RNAimax
41

图 108



MRC5 dsRNA 逆向蒸发法

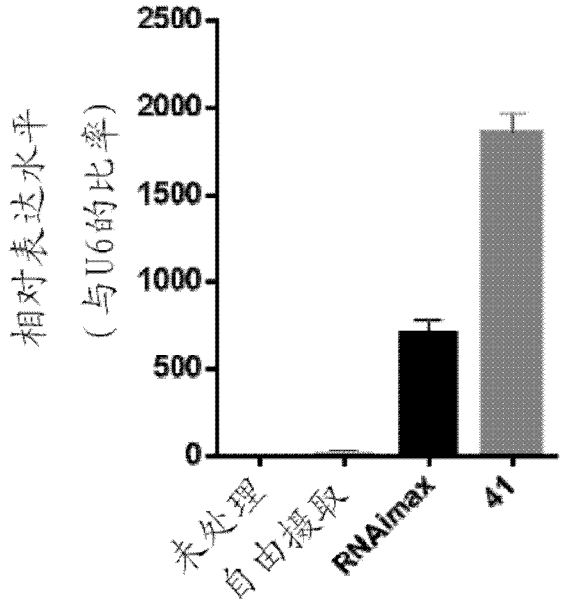
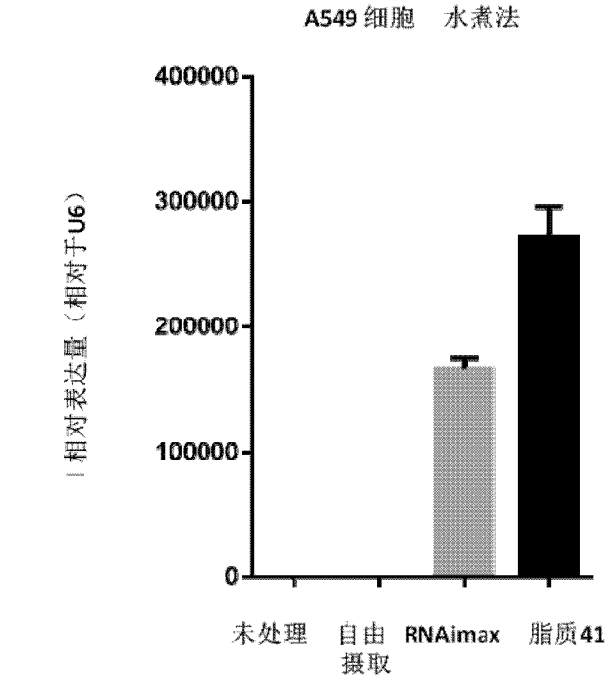


图 109


A549 细胞 水煮法
相对表达量（相对于U6）
400000
300000
200000
100000
0
未处理
自由摄取
RNAimax
脂质41

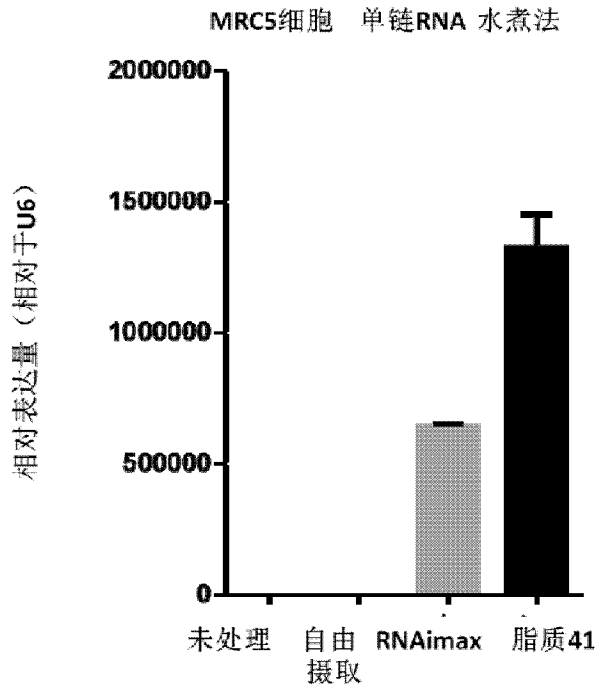

MRC5细胞 单链RNA 水煮法
相对表达量（相对于U6）
2000000
1500000
1000000
500000
0
未处理
自由摄取
RNAimax
脂质41

图 110

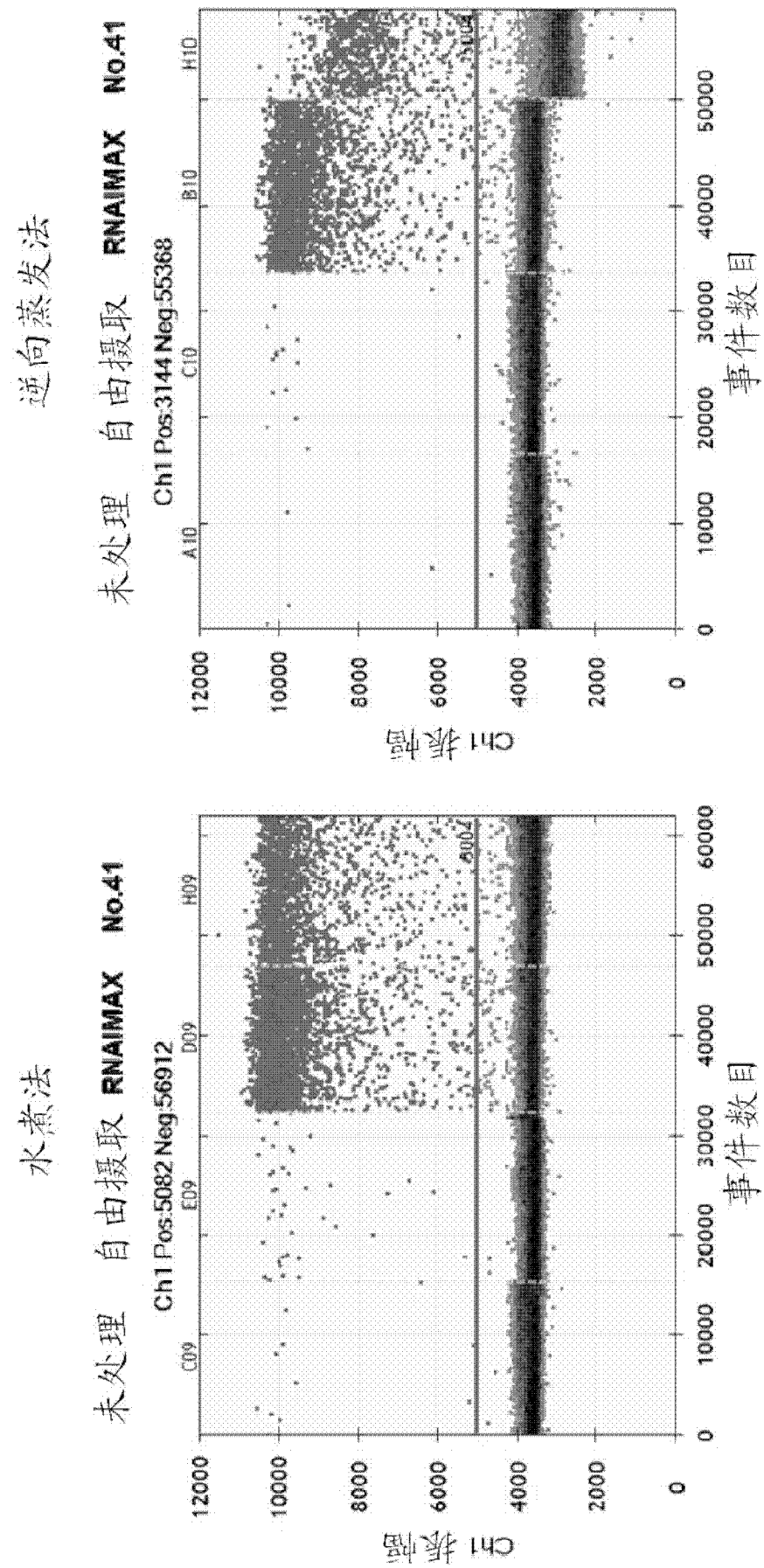

水煮法
未处理 自由摄取 RNAIMAX No.41
Ch1 Pos:5082 Neg:56912
C09
E09
D09
H09
A004
Ch1 荧光
事件数目
逆向蒸发法
未处理 自由摄取 RNAIMAX No.41
Ch1 Pos:3144 Neg:55368
A10
C10
B10
H10
A004
Ch1 荧光
事件数目

图 111

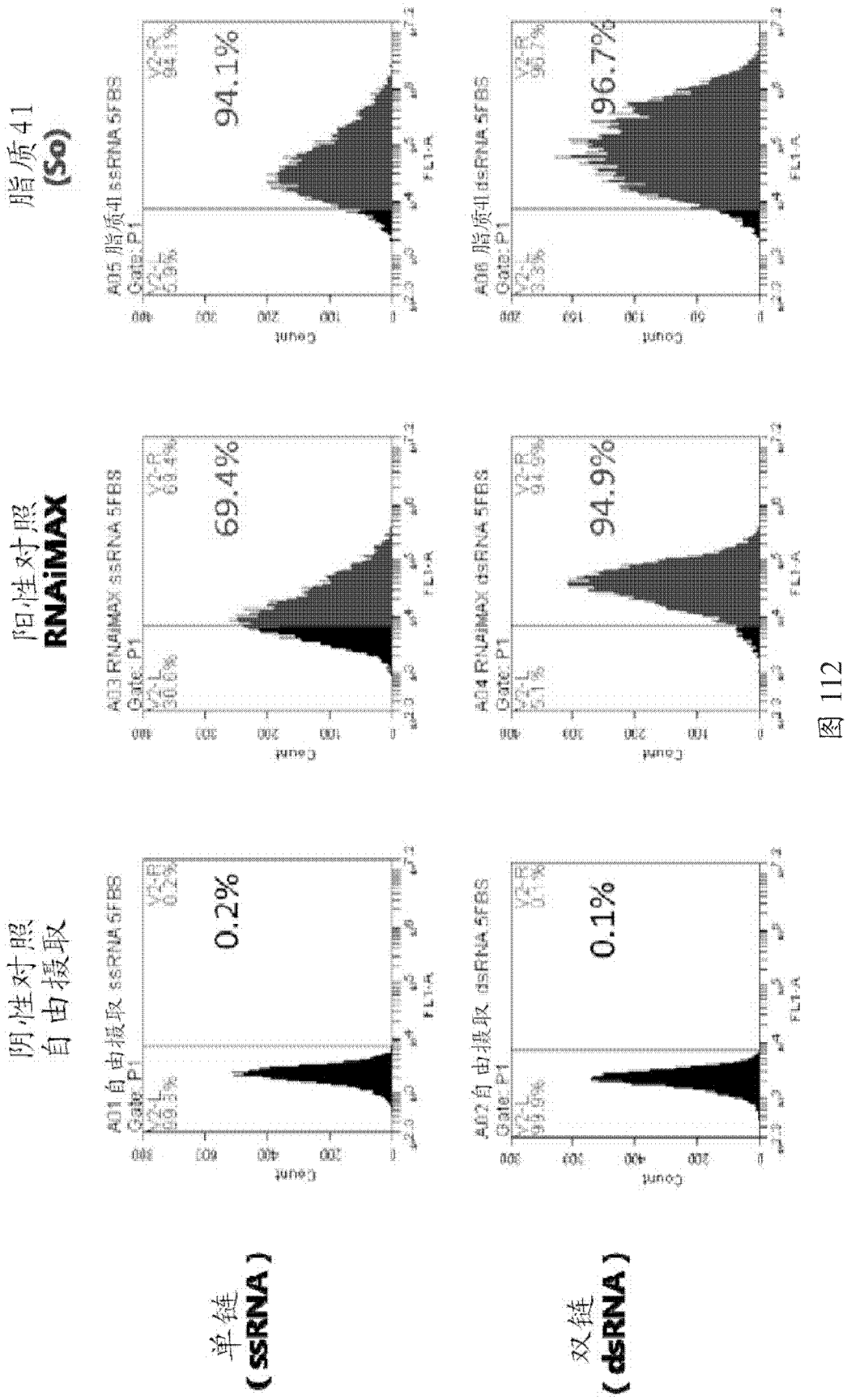

阴性对照
自由摄取
阳性对照
RNAiMAX
脂质41
(So)
单链
(ssRNA)
双链
(dsRNA)
A01自由摄取 ssRNA 5FBS
A02自由摄取 dsRNA 5FBS
A03 RNAiMAX ssRNA 5FBS
A04 RNAiMAX dsRNA 5FBS
A05 脂质41 ssRNA 5FBS
A06 脂质41 dsRNA 5FBS
0.2%
0.1%
69.4%
94.9%
94.1%
96.7%
Count
FL1-A

图 112

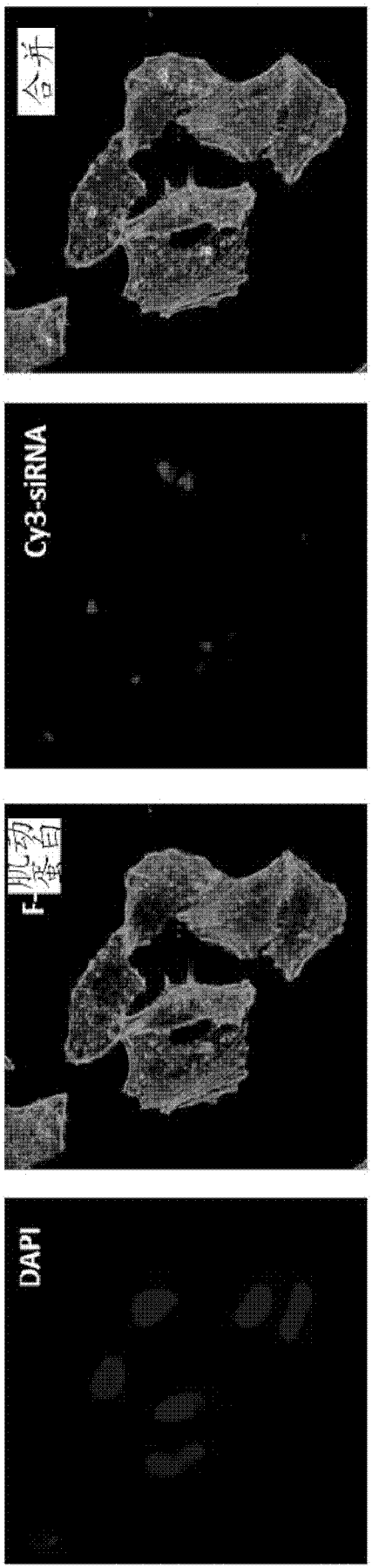


图 113

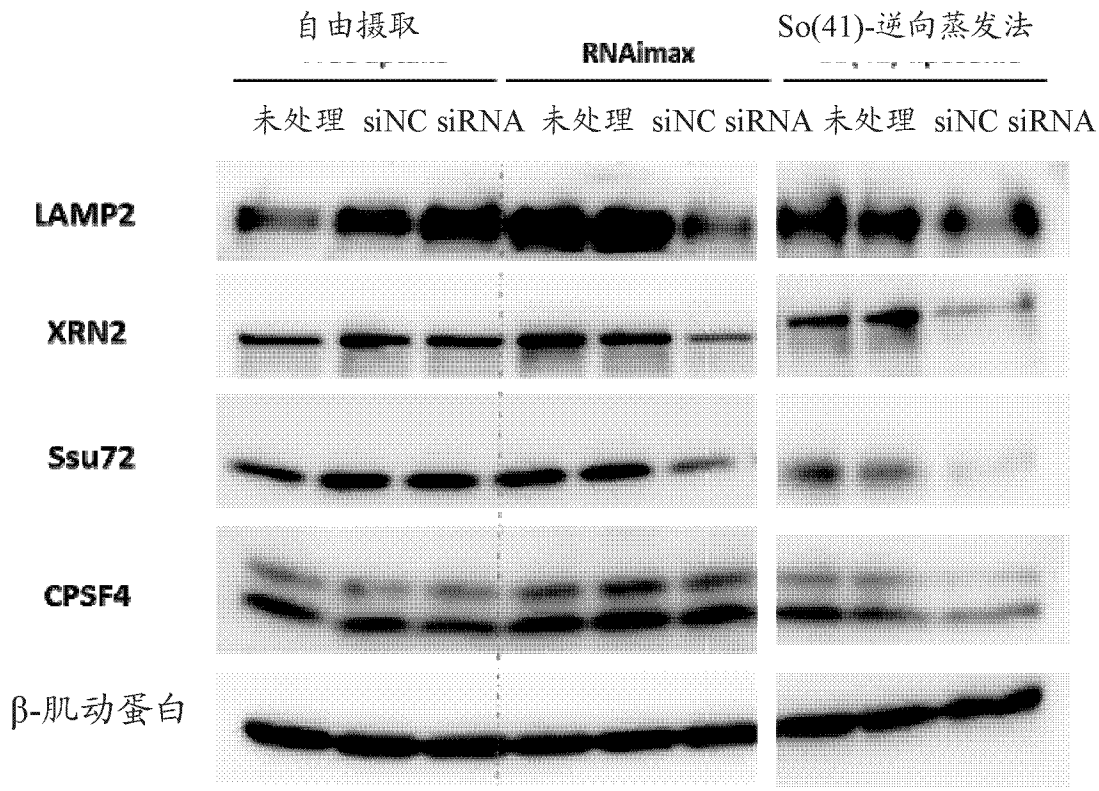

自由摄取
RNAimax
So(41)-逆向蒸发法
未处理 siNC siRNA 未处理 siNC siRNA 未处理 siNC siRNA
LAMP2
XRN2
Ssu72
CPSF4
β-肌动蛋白

图 114

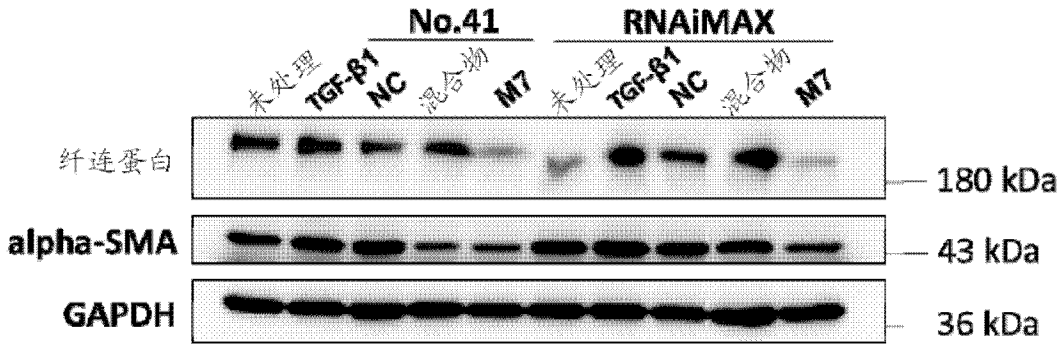

No.41
RNAiMAX
未处理
TGF-β1
NC
混合物
M7
未处理
TGF-β1
NC
混合物
M7
纤连蛋白
alpha-SMA
GAPDH
180 kDa
43 kDa
36 kDa

图 115

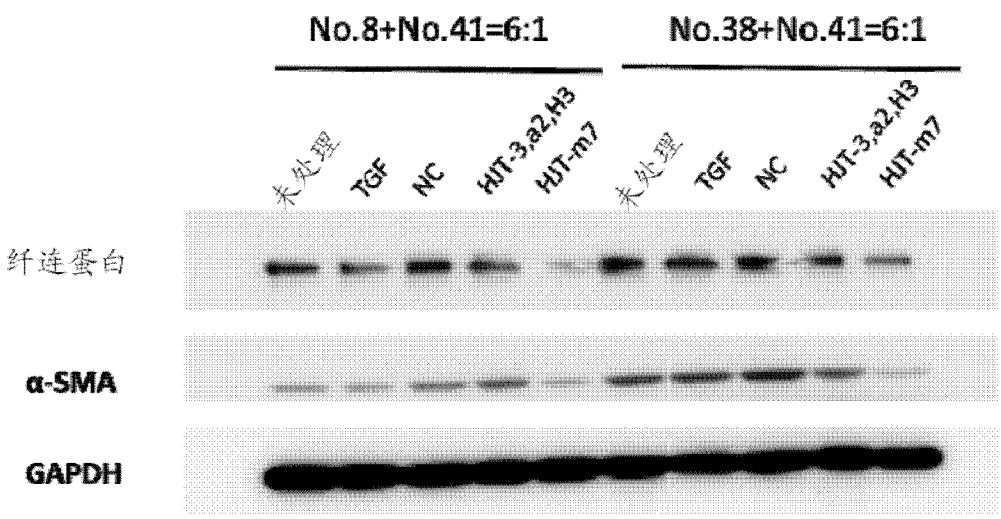

No.8+No.41=6:1
No.38+No.41=6:1
未处理
TGF
NC
HJT-3,a2,H3
HJT-m7
未处理
TGF
NC
HJT-3,a2,H3
HJT-m7
纤连蛋白
α-SMA
GAPDH

图 116

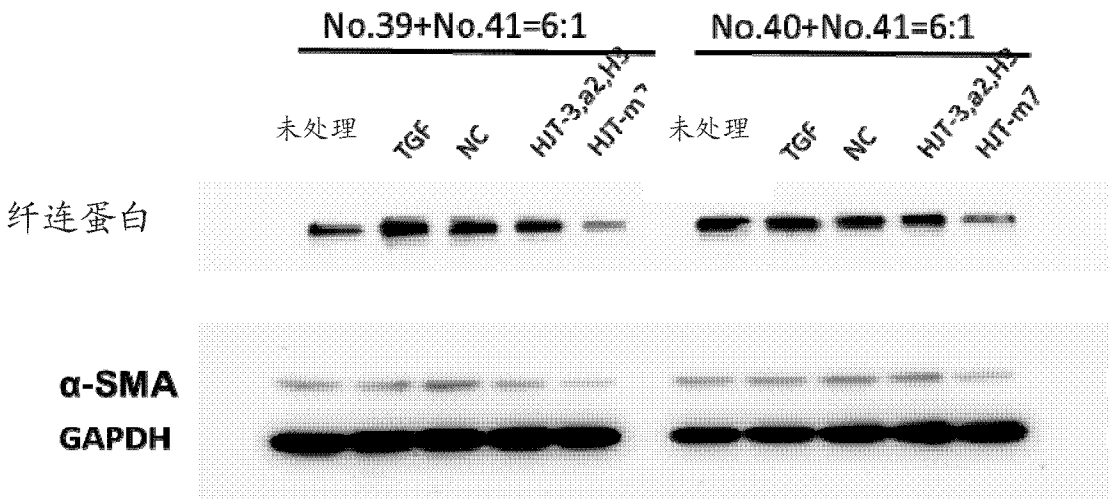

No.39+No.41=6:1
No.40+No.41=6:1
未处理
TGF
NC
HJT-3,a2,H3
HJT-m7
未处理
TGF
NC
HJT-3,a2,H3
HJT-m7
纤连蛋白
α-SMA
GAPDH

图 117

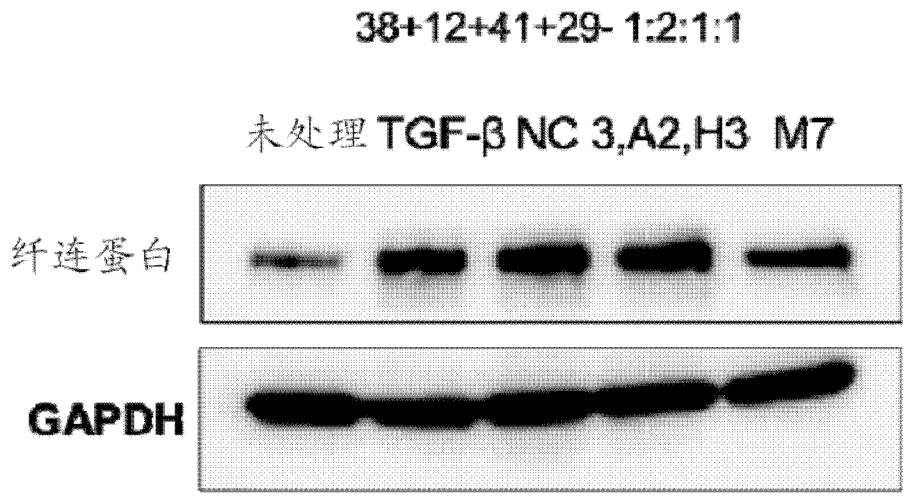
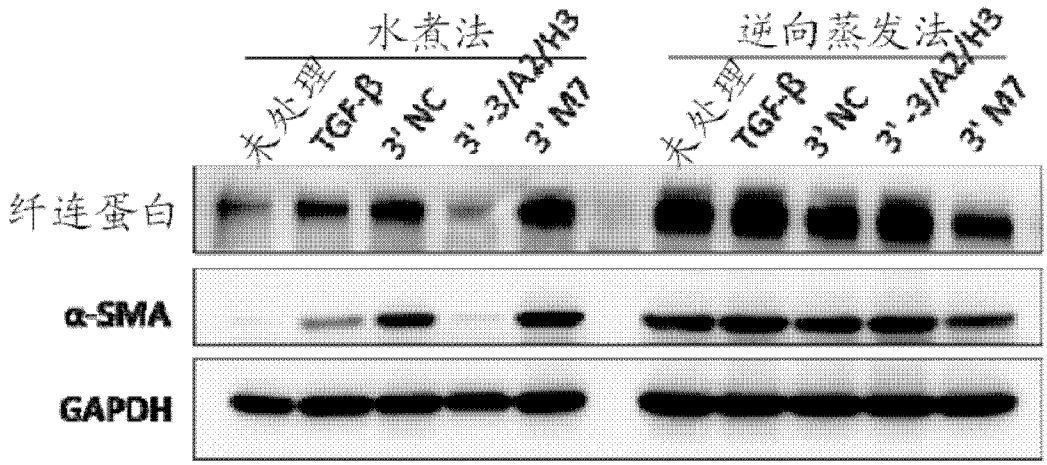


图 118



40(PE)+12(PC)+41(So)=2:4:3

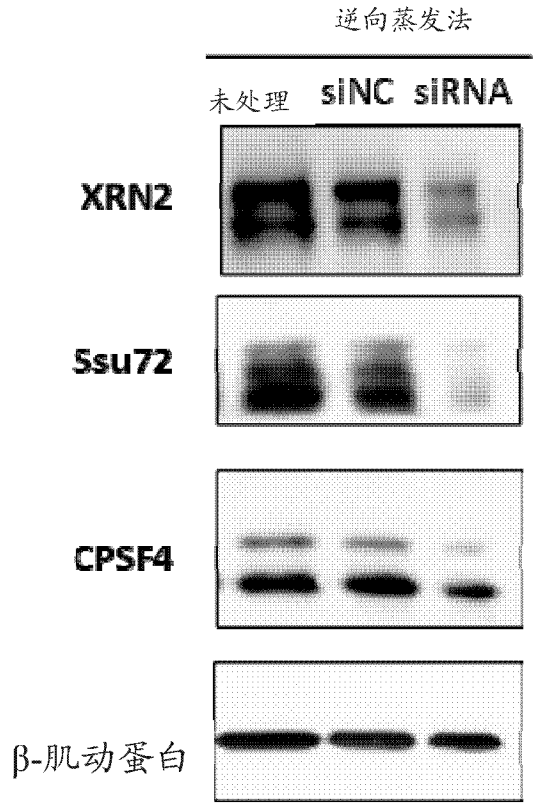


图 119

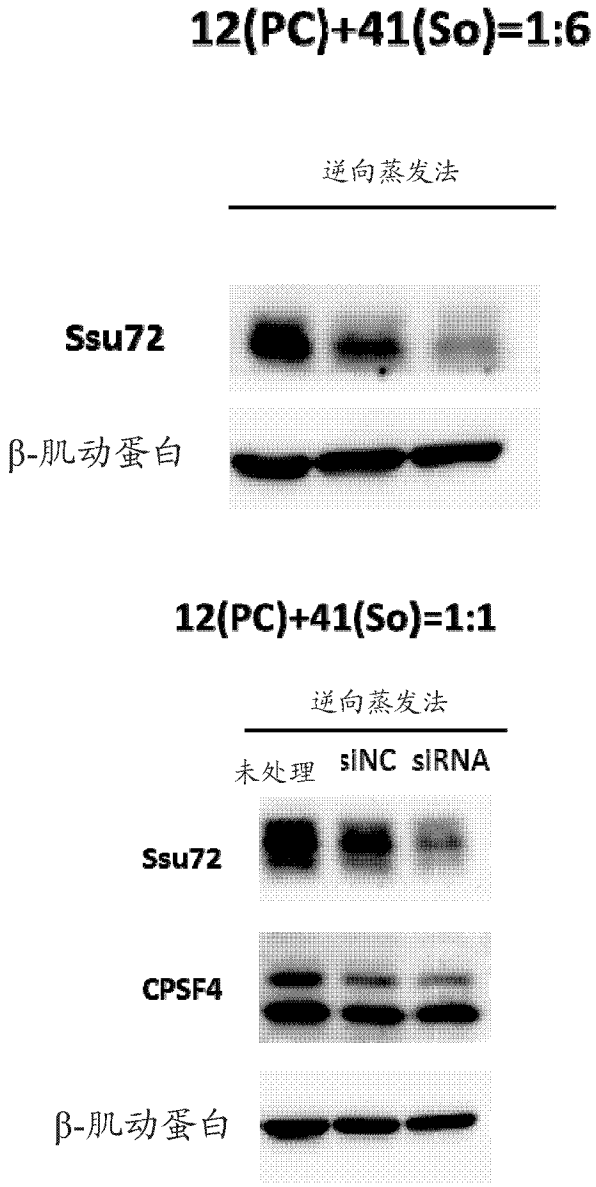

12(PC)+41(So)=1:6
逆向蒸发法
Ssu72
β-肌动蛋白
12(PC)+41(So)=1:1
逆向蒸发法
未处理
siNC
siRNA
Ssu72
CPSF4
β-肌动蛋白

图 120

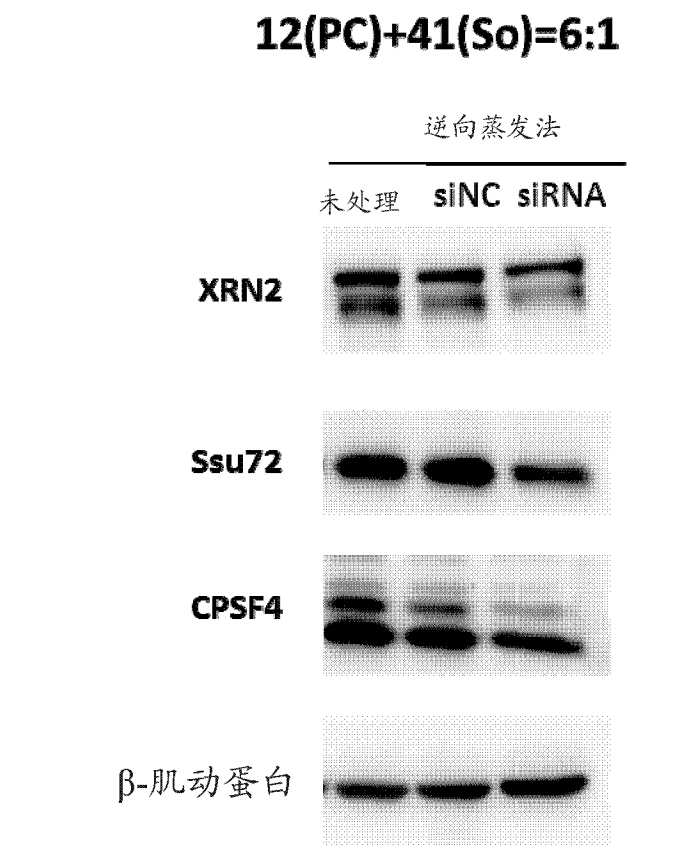

12(PC)+41(So)=6:1
逆向蒸发法
未处理
siNC
siRNA
XRN2
Ssu72
CPSF4
β-肌动蛋白
40(PE)+12(PC)+41(So)=2:2:2
逆向蒸发法
未处理
siNC
siRNA
XRN2
Ssu72
β-肌动蛋白

图 121

4(Cer)+12(PC)+41(So)=1:1:1

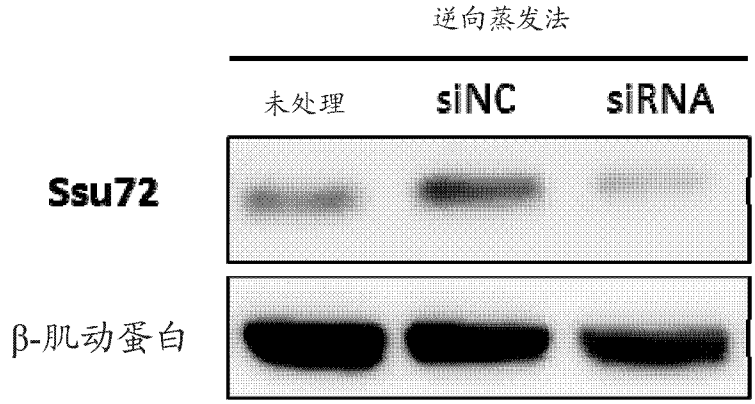


图 122

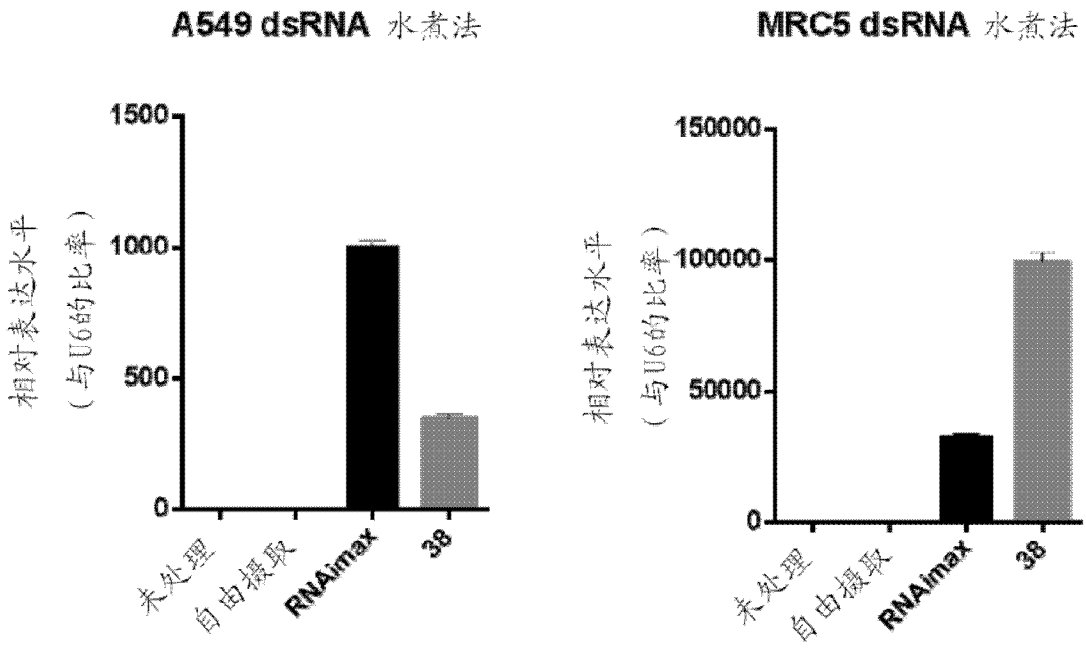
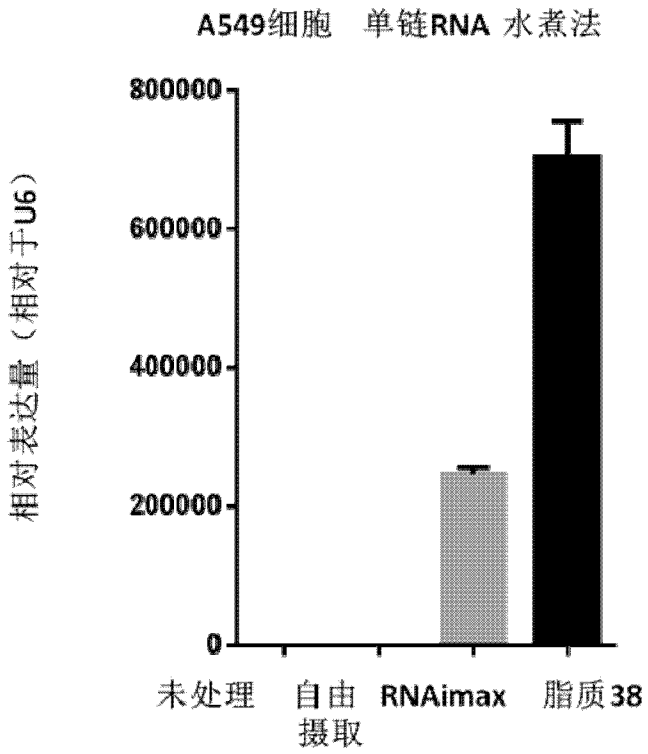


图 123


A549细胞 单链RNA 水煮法
相对表达量（相对于U6）
800000
600000
400000
200000
0
未处理
自由摄取
RNAimax
脂质38

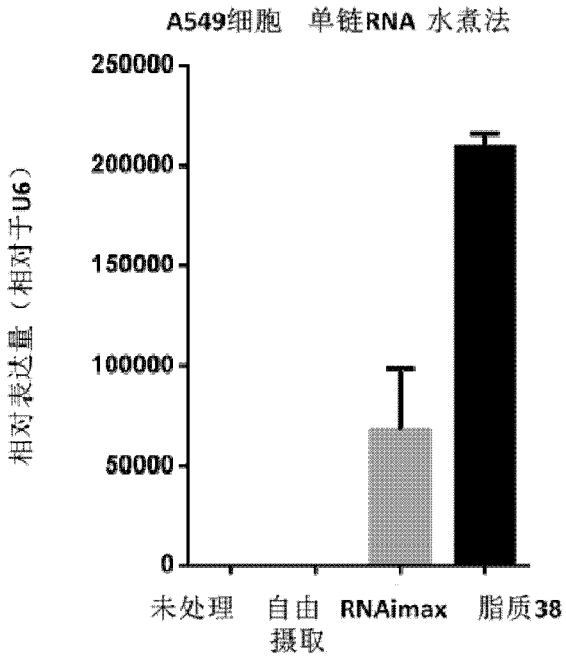

A549细胞 单链RNA 水煮法
相对表达量（相对于U6）
250000
200000
150000
100000
50000
0
未处理
自由摄取
RNAimax
脂质38

图 124

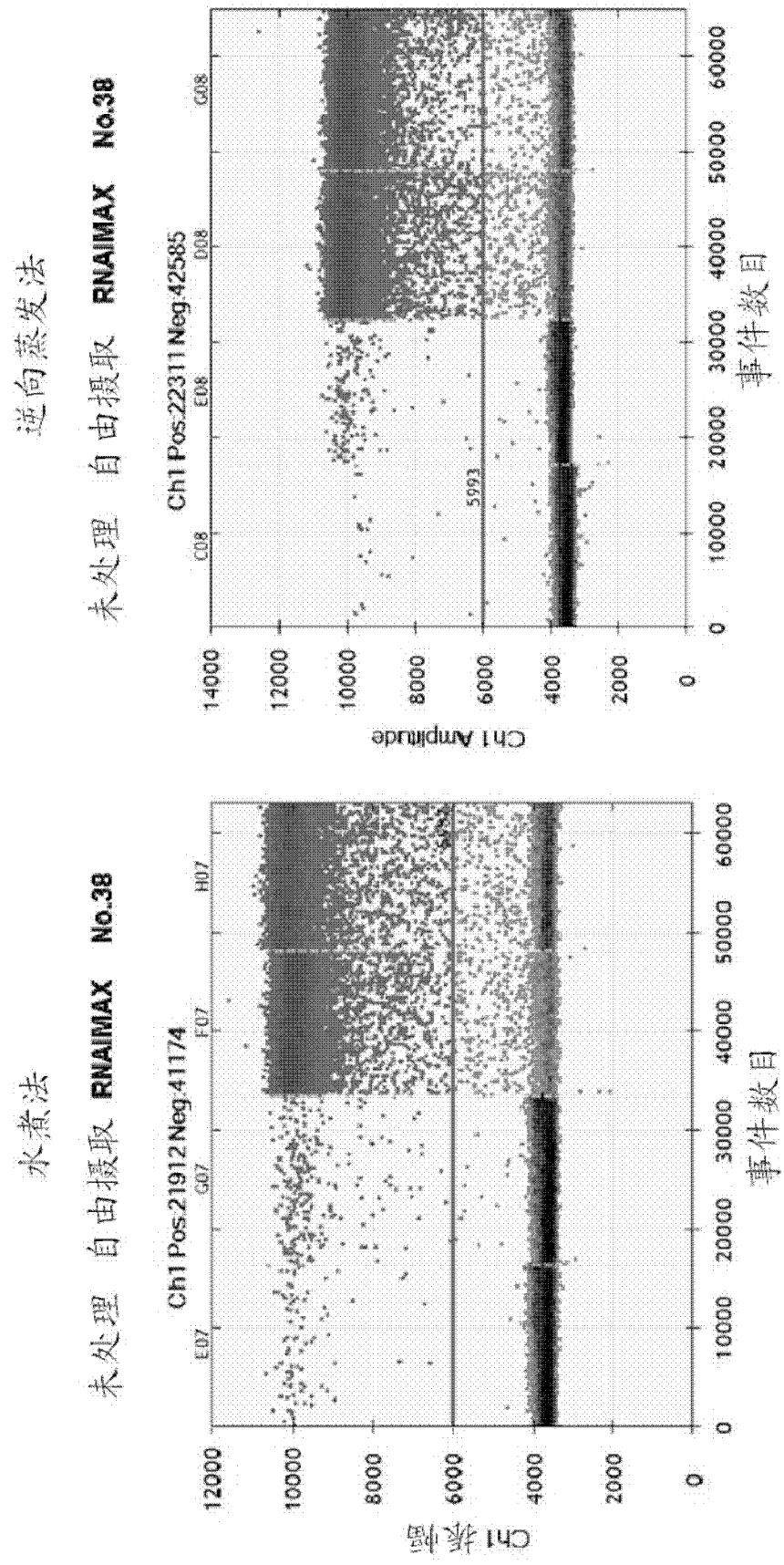

水煮法
未处理 自由摄取 RNAIMAX No.38
Ch1 Pos:21912 Neg:41174
E07
G07
F07
H07
Ch1 荧光
事件数目
逆向蒸发法
未处理 自由摄取 RNAIMAX No.38
Ch1 Pos:22311 Neg:42585
C08
E08
D08
G08
5993
Ch1 Amplitude
事件数目

图 125

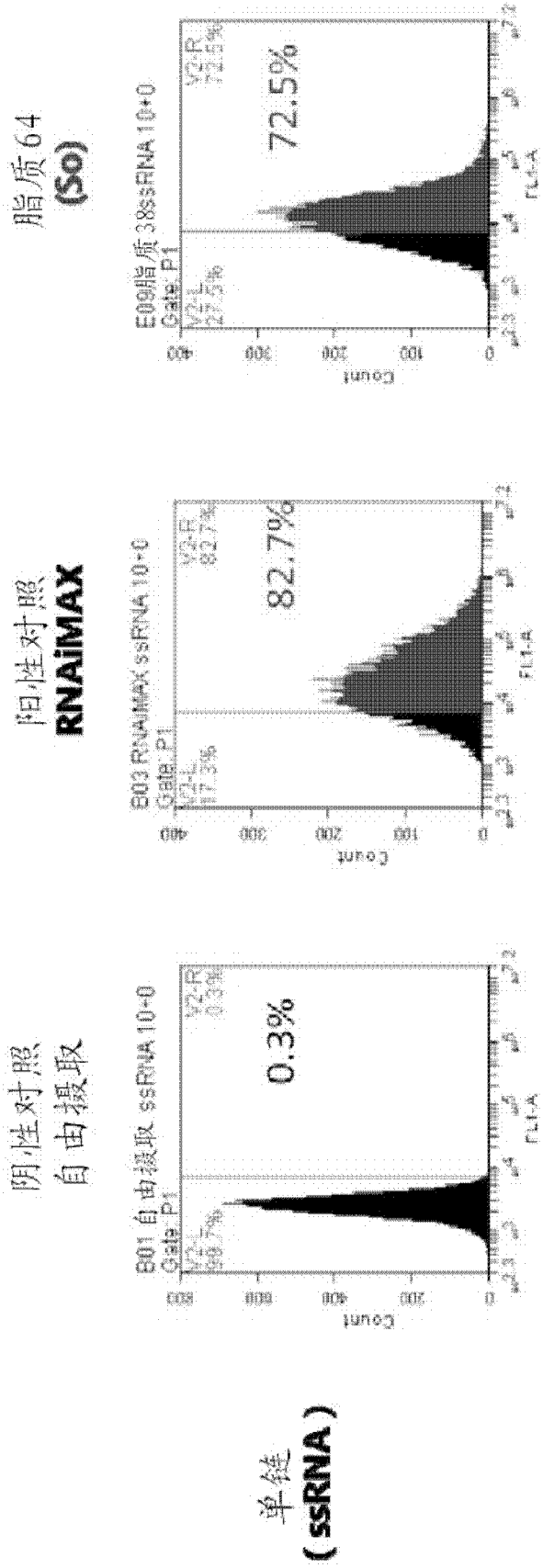

单链
(ssRNA)
阴性对照
自由摄取
B01 自由摄取 ssRNA 10-0
Gate: P1
0.3%
阳性对照
RNAiMAX
B03 RNAiMAX ssRNA 10-0
Gate: P1
82.7%
脂质64
(So)
E09脂质38ssRNA 10-0
Gate: P1
72.5%
Count
FL1-A

图 126

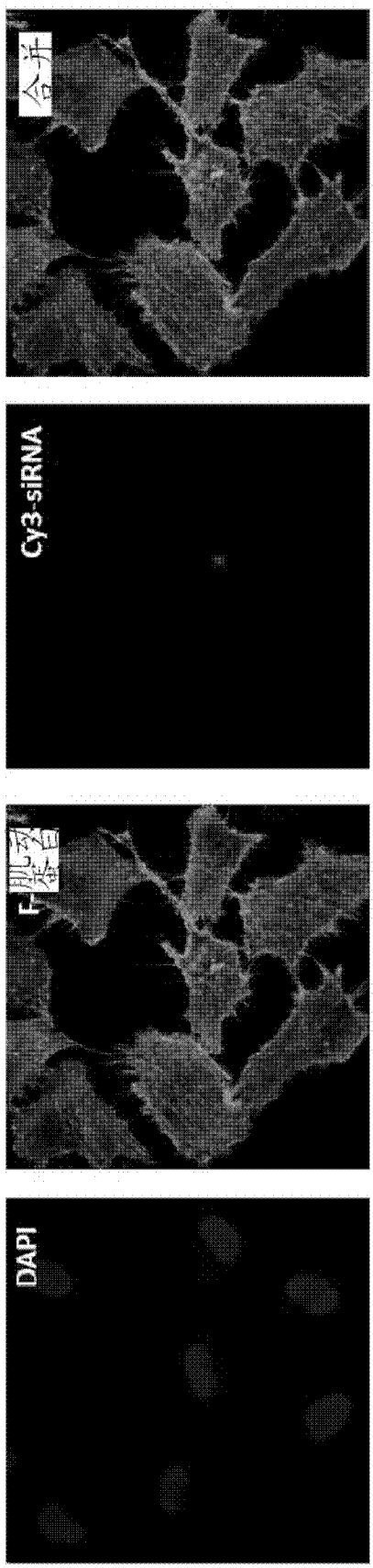


图 127

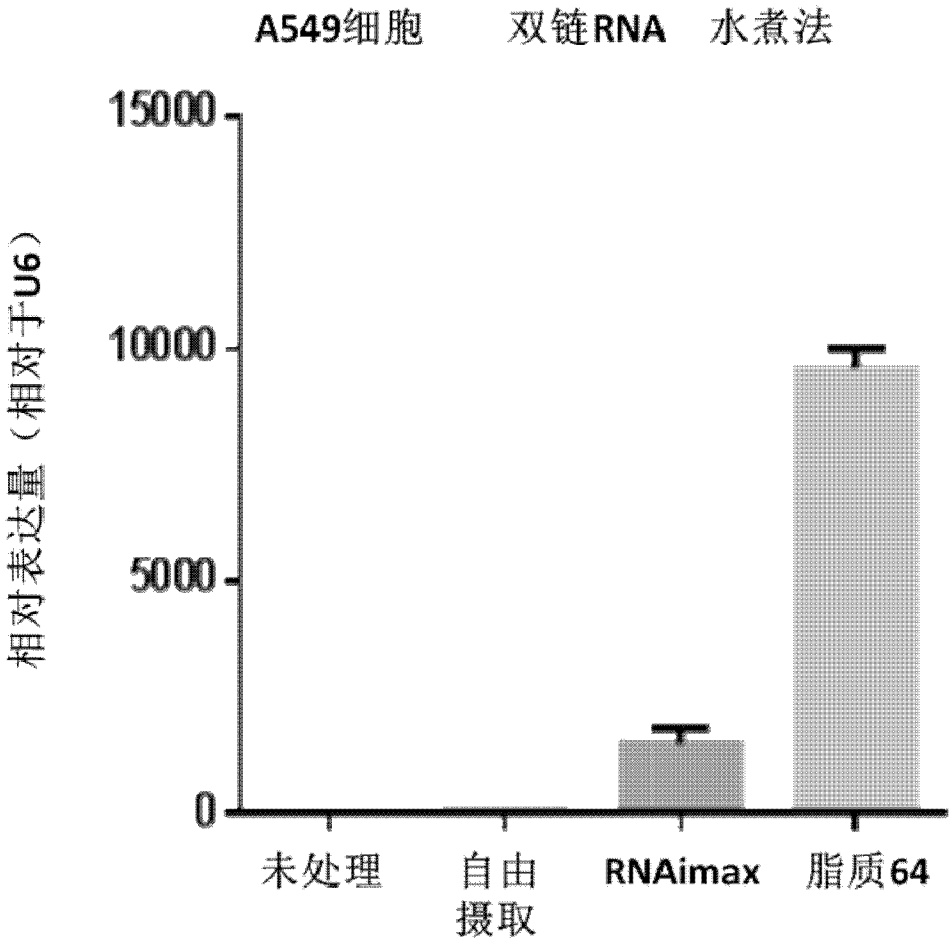

A549细胞 双链RNA 水煮法
15000
10000
5000
0
相对表达量（相对于U6）
未处理
自由摄取
RNAimax
脂质64

图 128

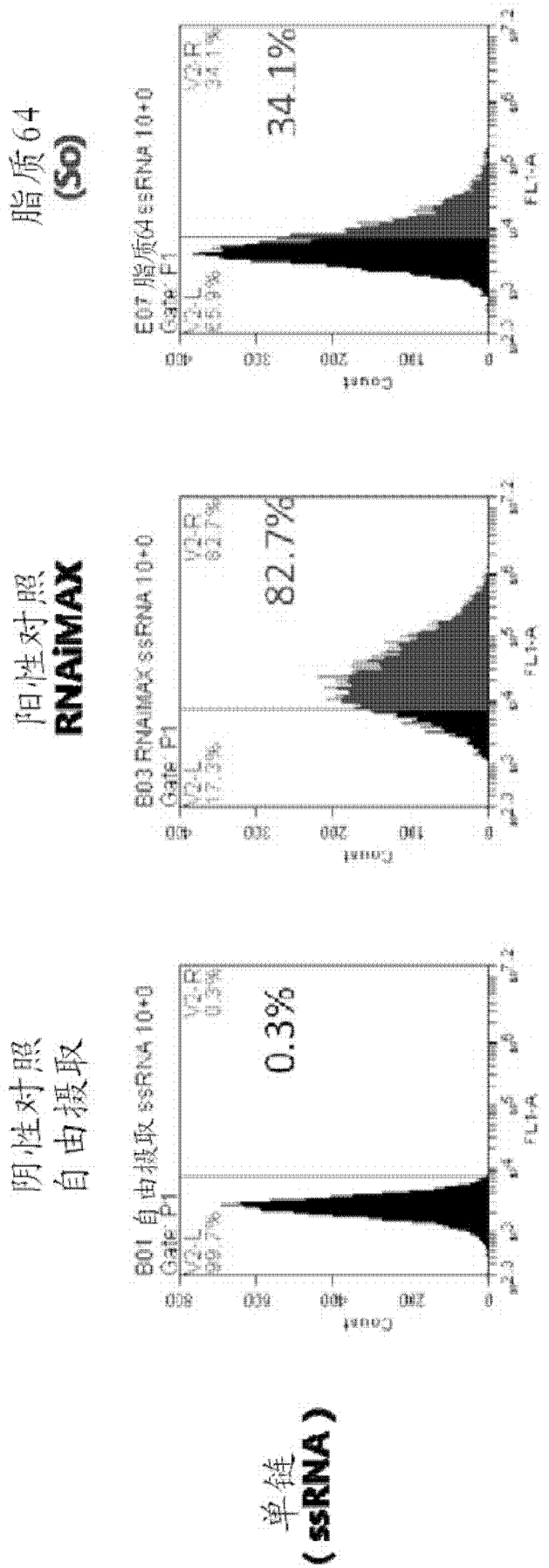

单链
(ssRNA)
阴性对照
自由摄取
E01 自由摄取 ssRNA 10+0
Gate P1
R9 7%
0.3%
阳性对照
RNAiMAX
E03 RNAiMAX ssRNA 10+0
Gate P1
R7 17.3%
82.7%
脂质64
(So)
E07 脂质64 ssRNA 10+0
Gate P1
R6 9%
34.1%
Count
FL1-A

图 129

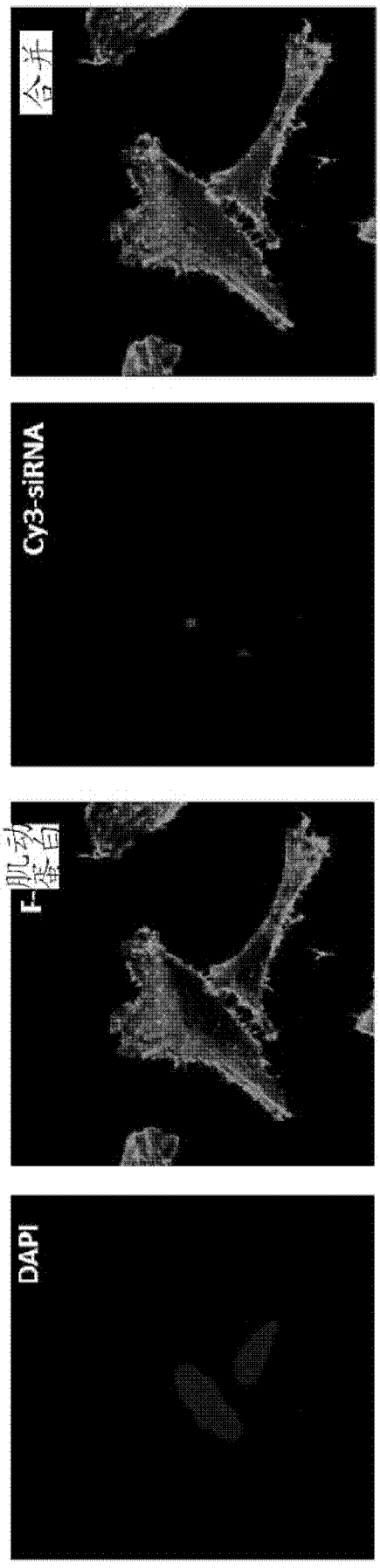


图 130

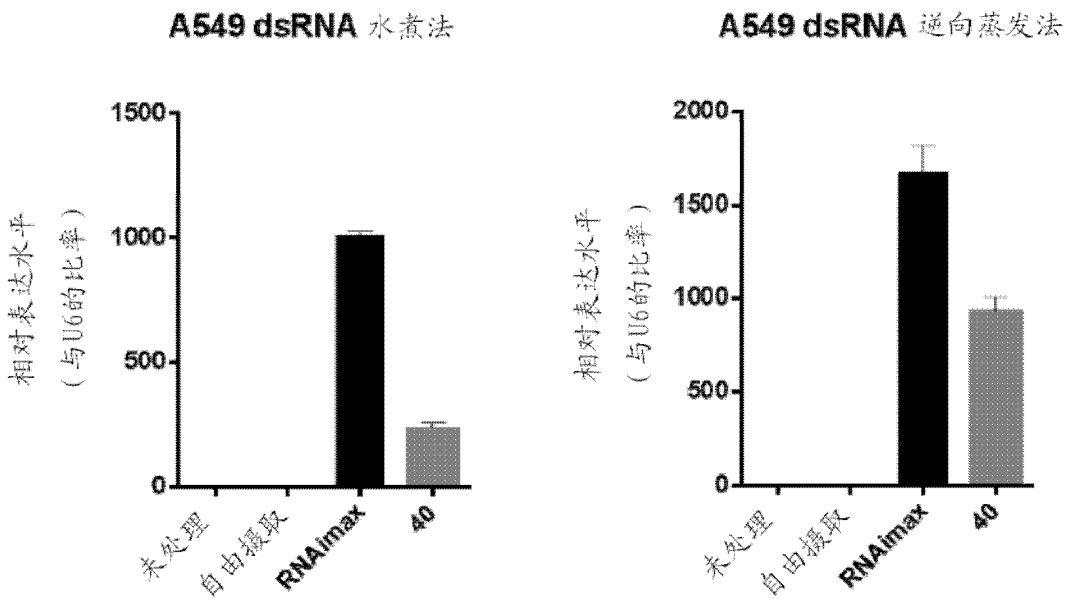

A549 dsRNA 水煮法
相对表达水平
（与U6的比率）
1500
1000
500
0
未处理
自由摄取
RNAimax
40
A549 dsRNA 逆向蒸发法
相对表达水平
（与U6的比率）
2000
1500
1000
500
0
未处理
自由摄取
RNAimax
40

图 131

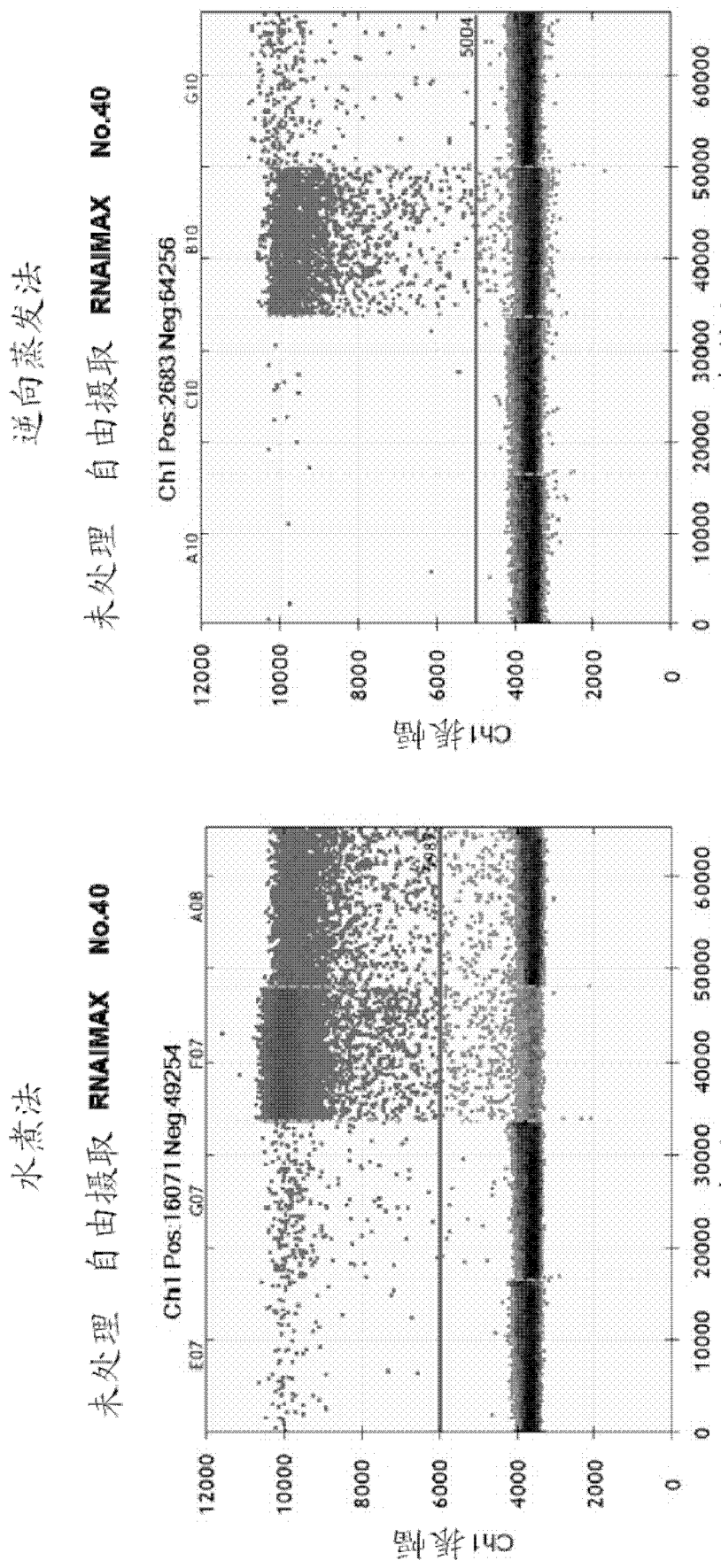

逆向蒸发法
未处理 自由摄取 RNAIMAX No.40
Ch1 Pos:2683 Neg:64256
5004
Ch1 荧光
事件数目
水煮法
未处理 自由摄取 RNAIMAX No.40
Ch1 Pos:16071 Neg:49254
5008
Ch1 荧光
事件数目

图 132

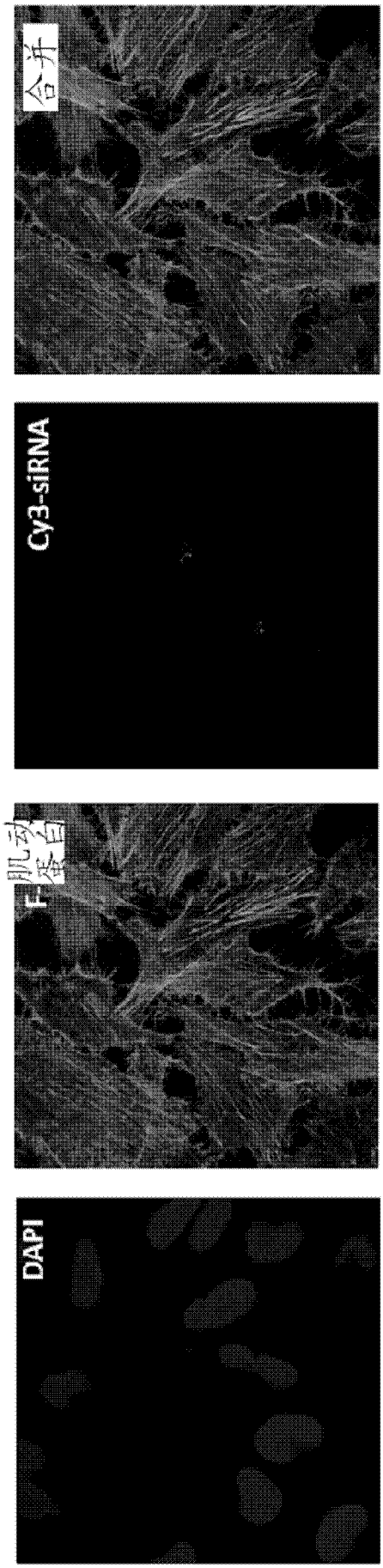


图 133

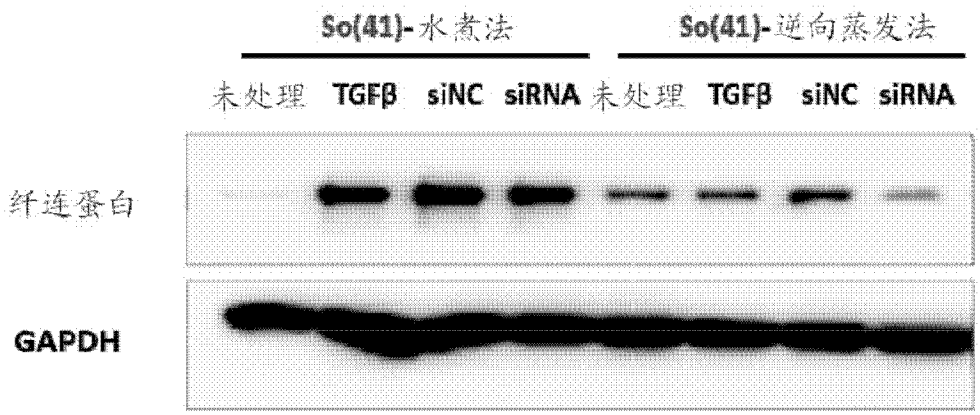

So(41)-水煮法
So(41)-逆向蒸发法
未处理
TGFβ
siNC
siRNA
未处理
TGFβ
siNC
siRNA
纤连蛋白
GAPDH

图 134

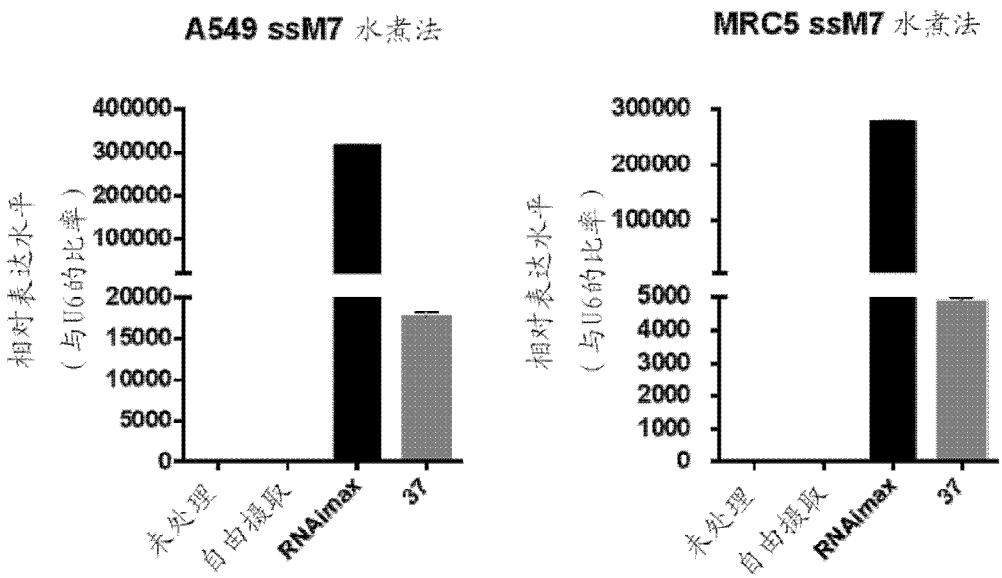

A549 ssM7 水煮法
MRC5 ssM7 水煮法
相对表达水平
（与U6的比率）
400000
300000
200000
100000
20000
15000
10000
5000
0
300000
200000
100000
5000
4000
3000
2000
1000
0
未处理
自由摄取
RNAimax
37

图 135

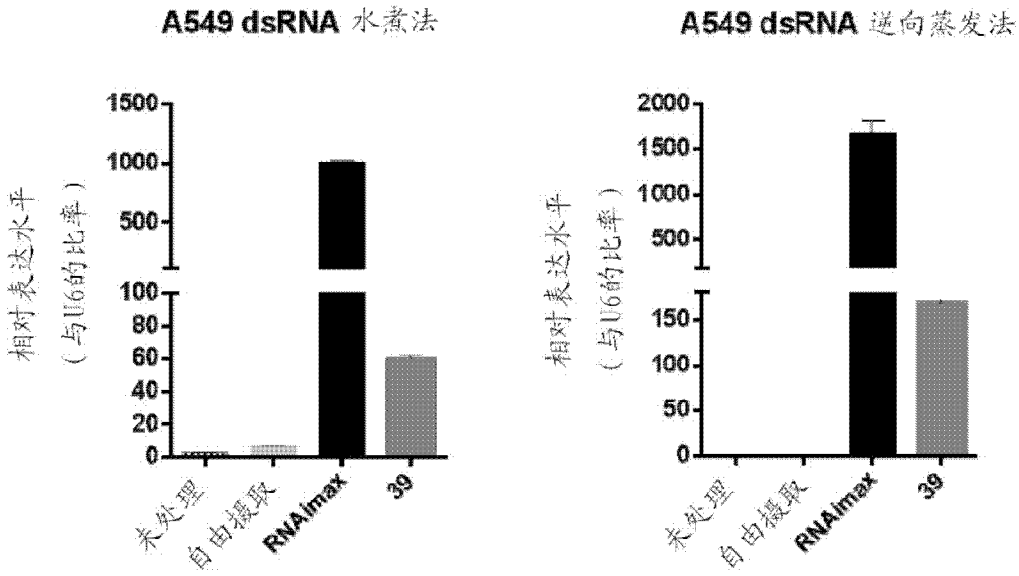

A549 dsRNA 水煮法
A549 dsRNA 逆向蒸发法
相对表达水平
（与U6的比率）
1500
1000
500
100
80
60
40
20
0
2000
150
50
未处理
自由摄取
RNAimax
39

图 136

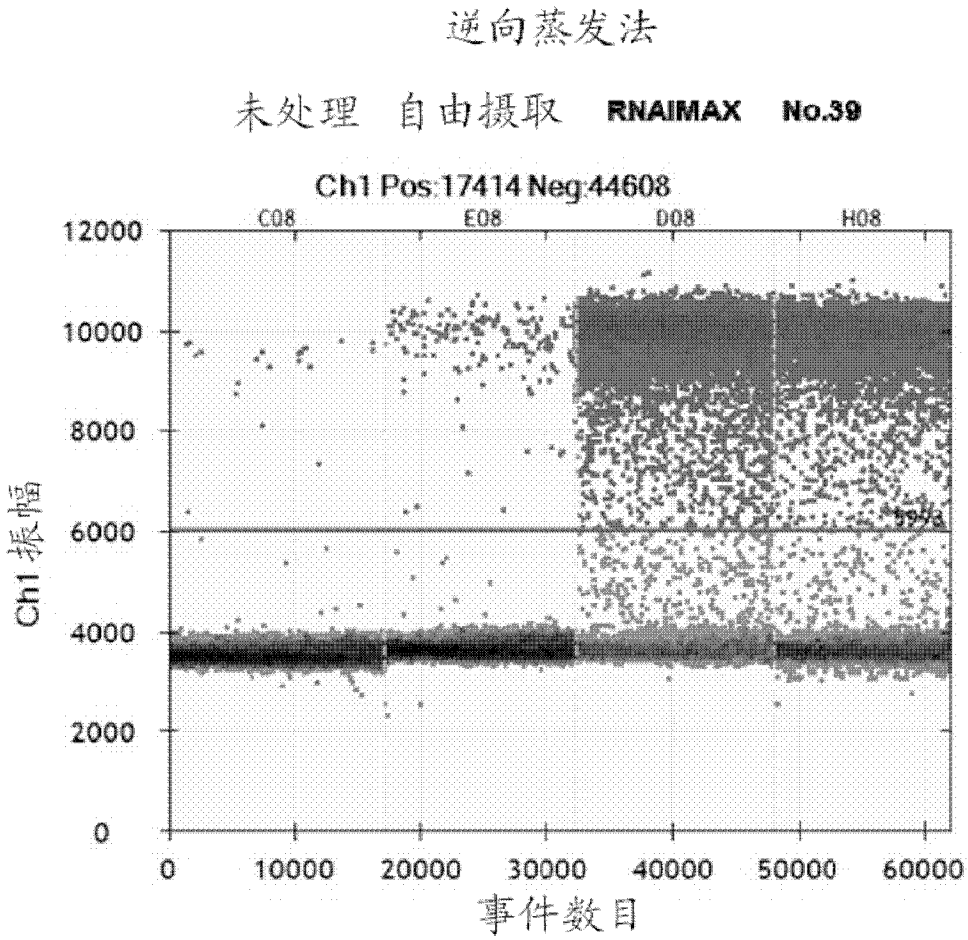

逆向蒸发法
未处理 自由摄取 RNAIMAX No.39
Ch1 Pos:17414 Neg:44608
C08
E08
D08
H08
Ch1 振幅
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
10000
20000
30000
40000
50000
60000
事件数目

图 137

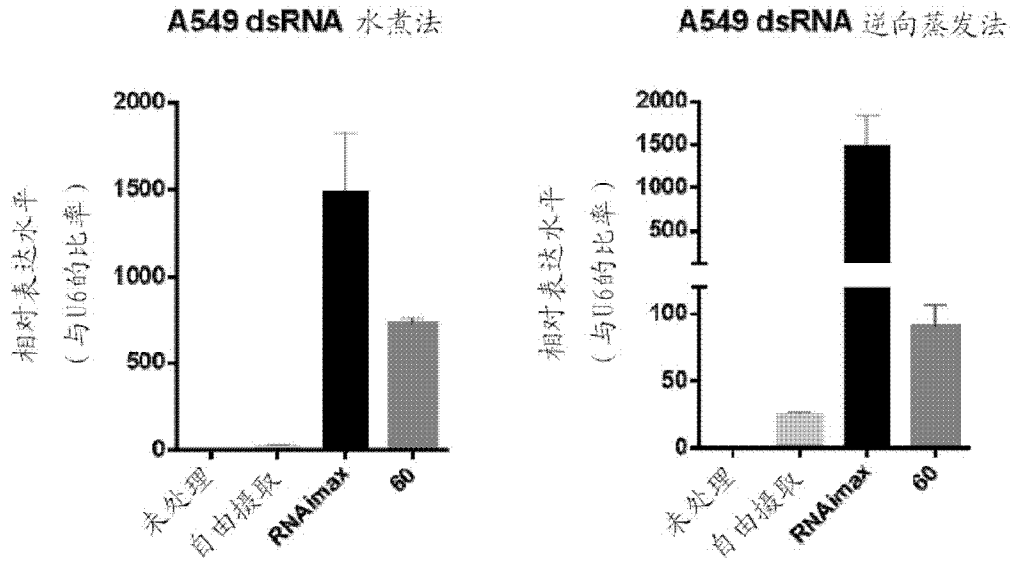

A549 dsRNA 水煮法
相对表达水平
（与U6的比率）
2000
1500
1000
500
0
未处理
自由摄取
RNAimax
60
A549 dsRNA 逆向蒸发法
相对表达水平
（与U6的比率）
2000
1500
1000
500
100
50
0
未处理
自由摄取
RNAimax
60

图 138

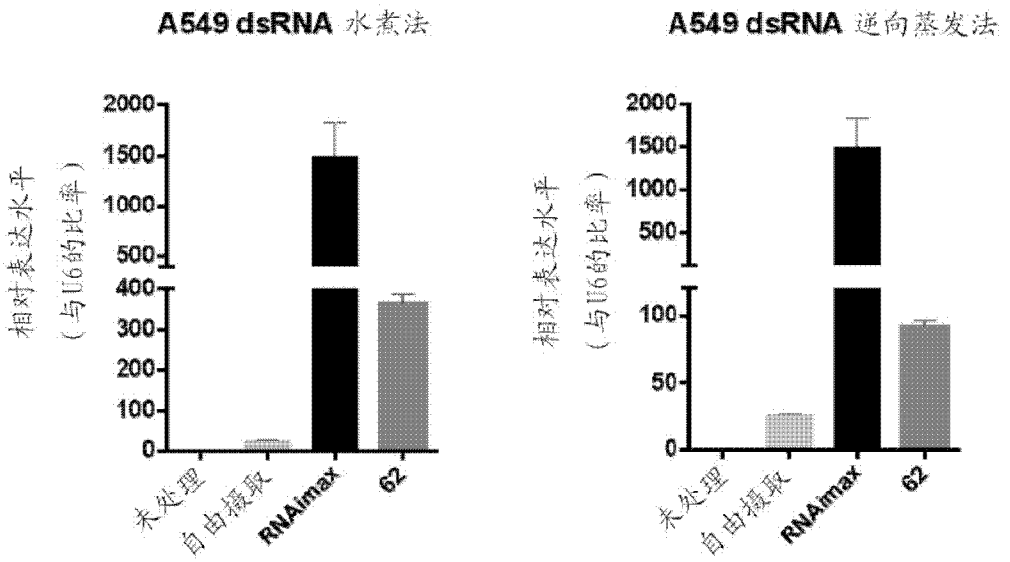

A549 dsRNA 水煮法
A549 dsRNA 逆向蒸发法
相对表达水平
（与U6的比率）
2000
1500
1000
500
400
300
200
100
0
50
未处理
自由摄取
RNAimax
62

图 139

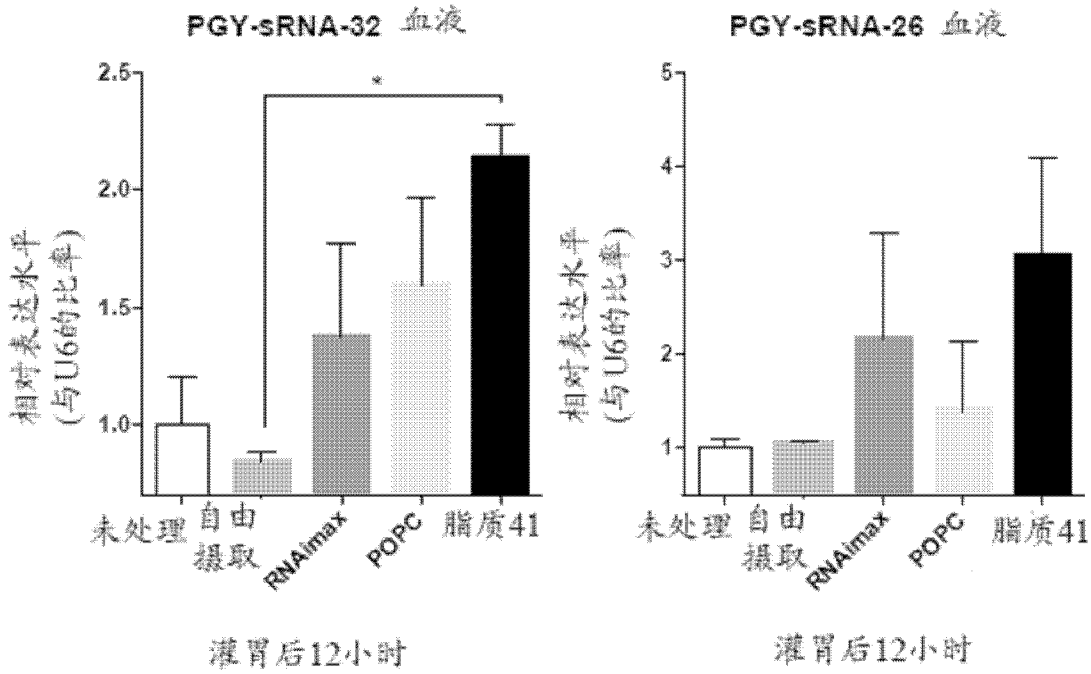

PGY-sRNA-32 血液
PGY-sRNA-26 血液
相对表达水平
(与U6的比率)
2.5
2.0
1.5
1.0
5
4
3
2
1
*
未处理
自由摄取
RNAimax
POPC
脂质41
灌胃后12小时

图 140

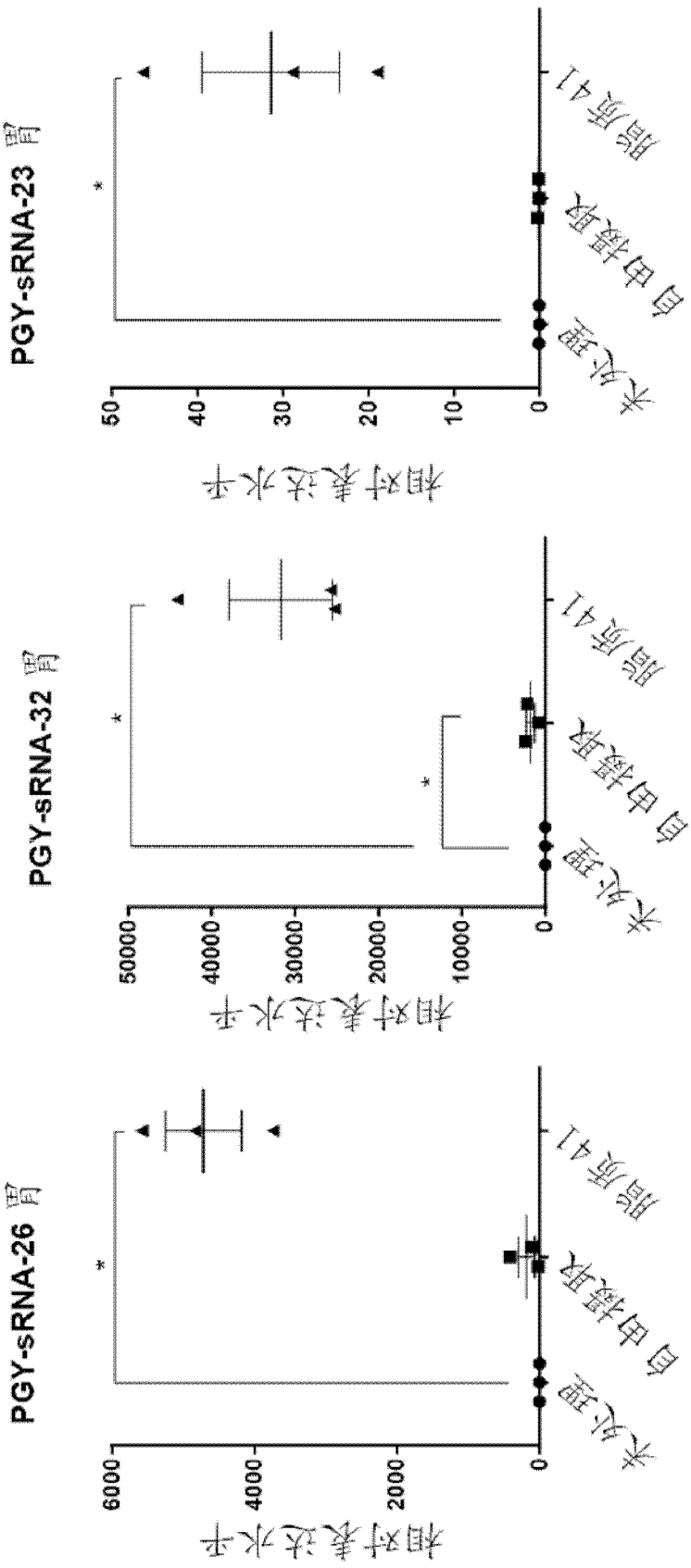

PGY-sRNA-26 胃
PGY-sRNA-32 胃
PGY-sRNA-23 胃
相对表达水平
6000
4000
2000
0
50000
40000
30000
20000
10000
50
40
30
20
10
*
未处理
自由摄取
限饲41

图 141

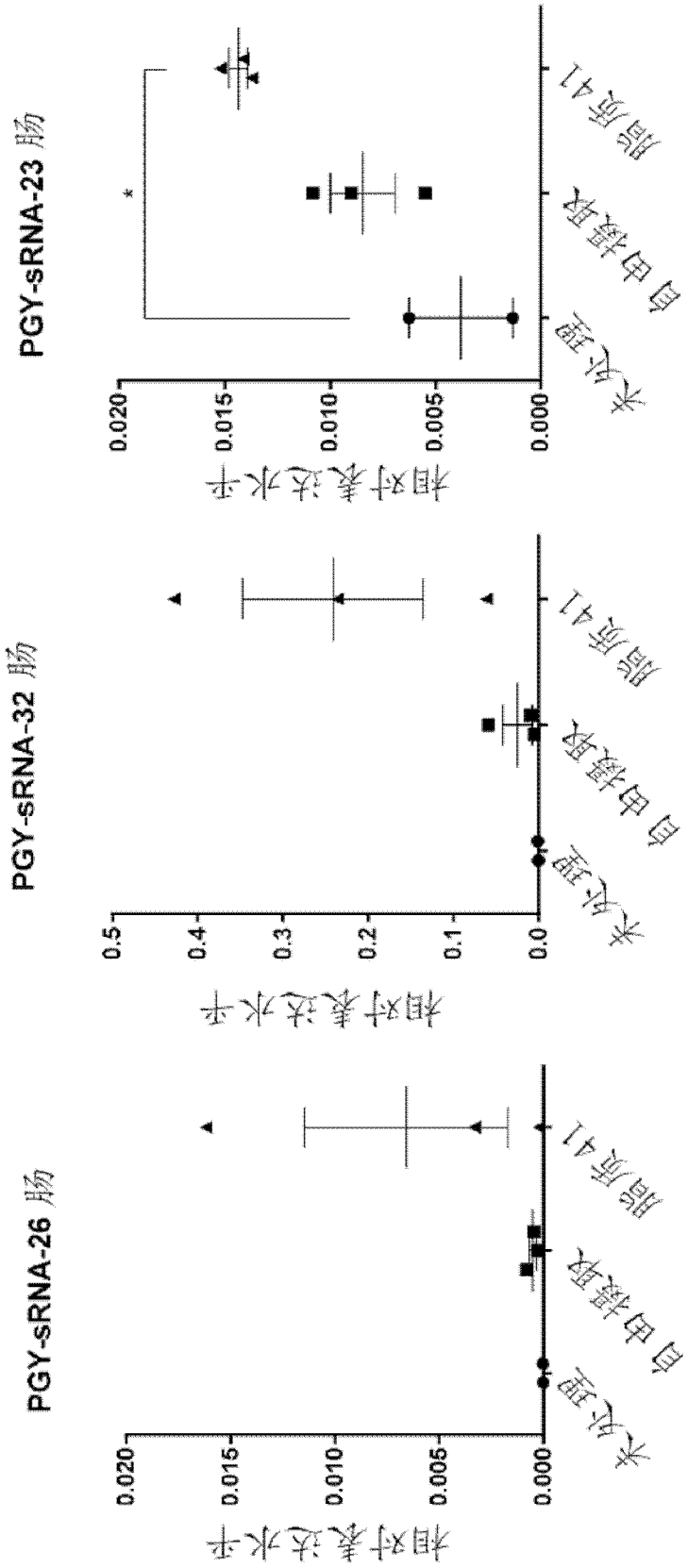

PGY-sRNA-26 肠
PGY-sRNA-32 肠
PGY-sRNA-23 肠
相对表达水平
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
未处理
自由摄取
禁食4小时

图 142

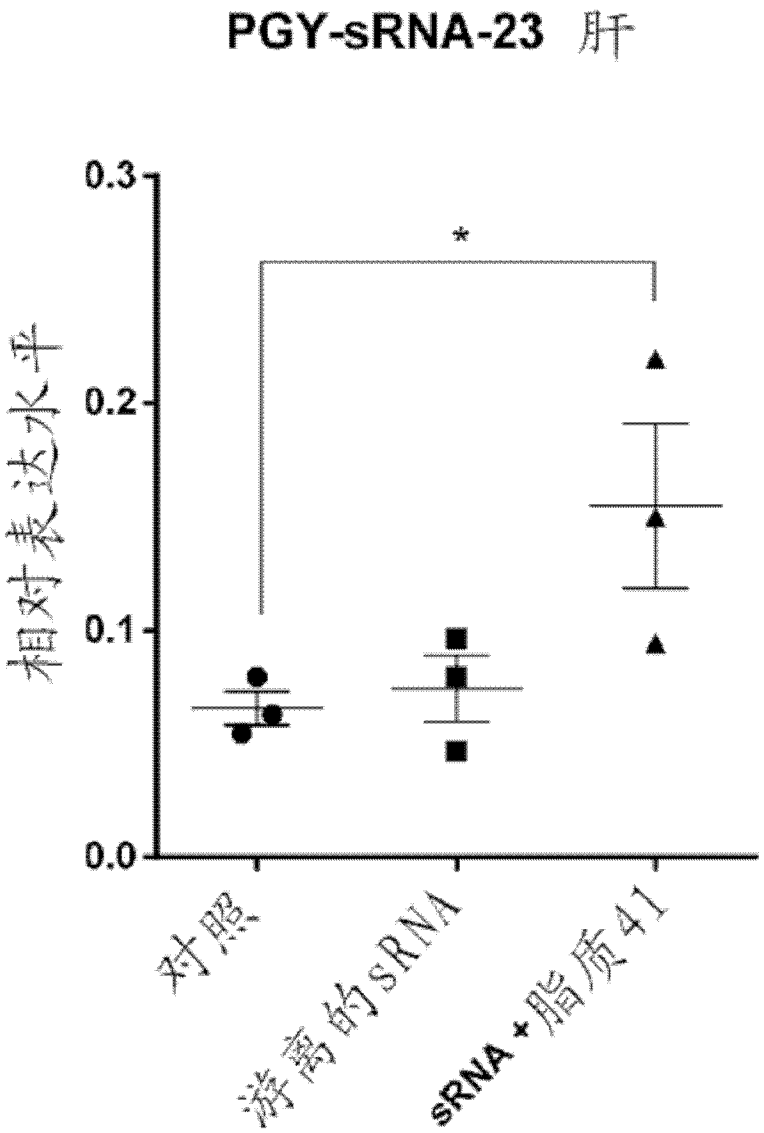


图 143

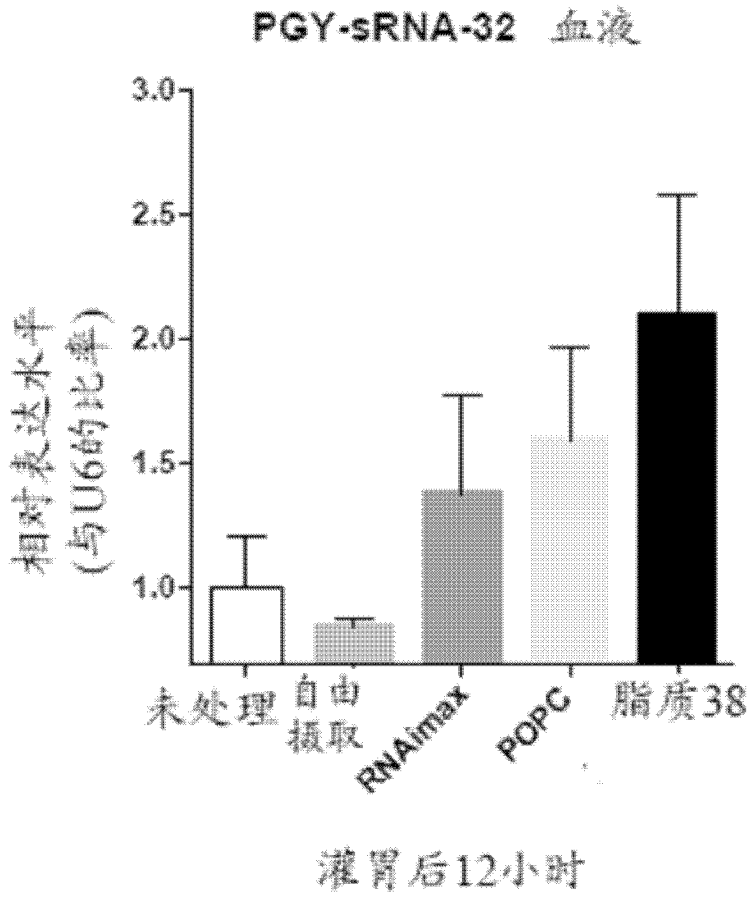

PGY-sRNA-32 血液
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
相对表达水平
(与U6的比率)
未处理
自由摄取
RNAimax
POPC
脂质38
灌胃后12小时

图 144

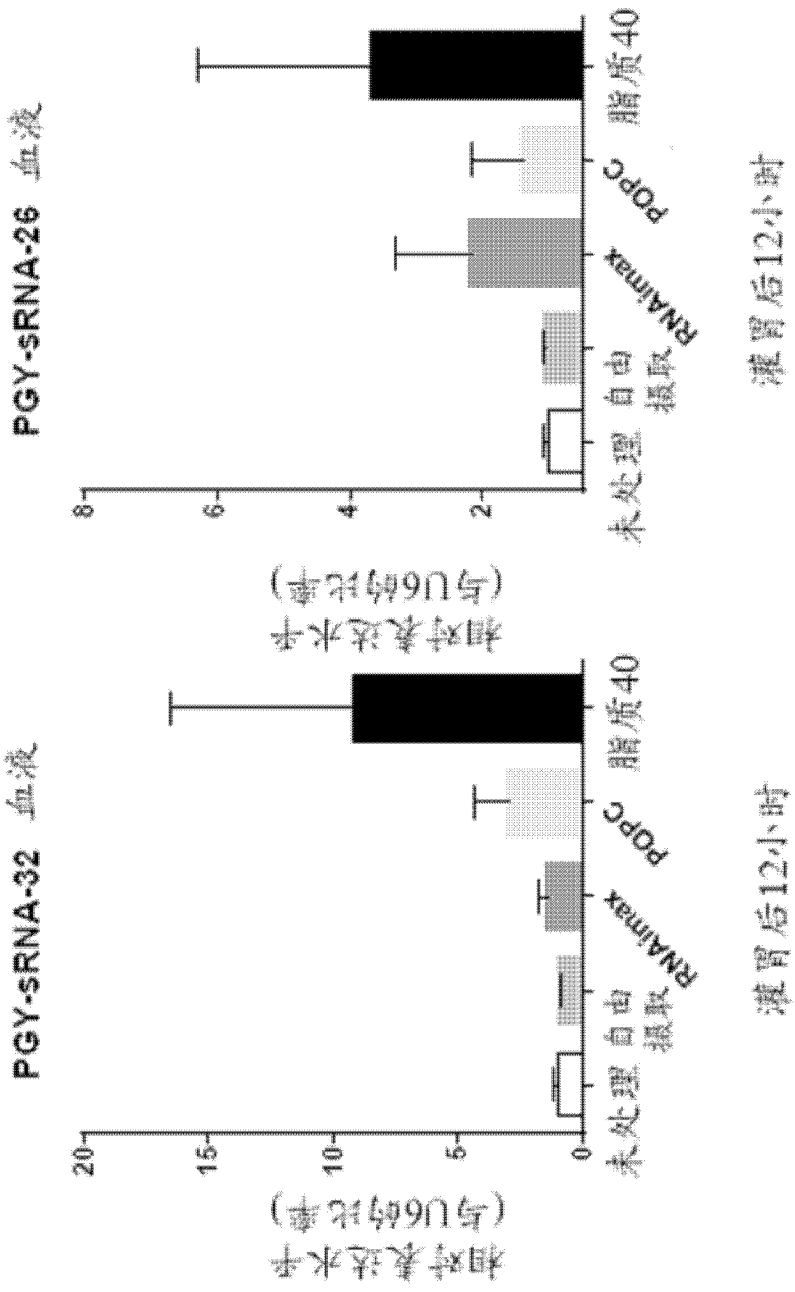

PGY-sRNA-32 血液
相对表达水平
(与U6的比率)
20
15
10
5
0
未处理
自由摄取
RNAimax
POPC
脂质40
PGY-sRNA-26 血液
相对表达水平
(与U6的比率)
8
6
4
2
未处理
自由摄取
RNAimax
POPC
脂质40
灌胃后12小时
灌胃后12小时

图 145

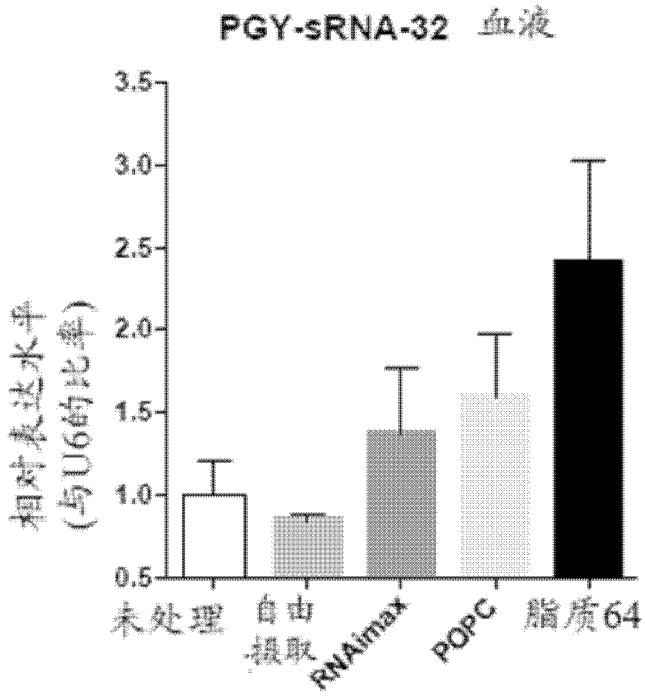

PGY-sRNA-32 血液
相对表达水平
(与U6的比率)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
未处理
自由
摄取
RNAimax
POPC
脂质64
灌胃后12小时

图 146

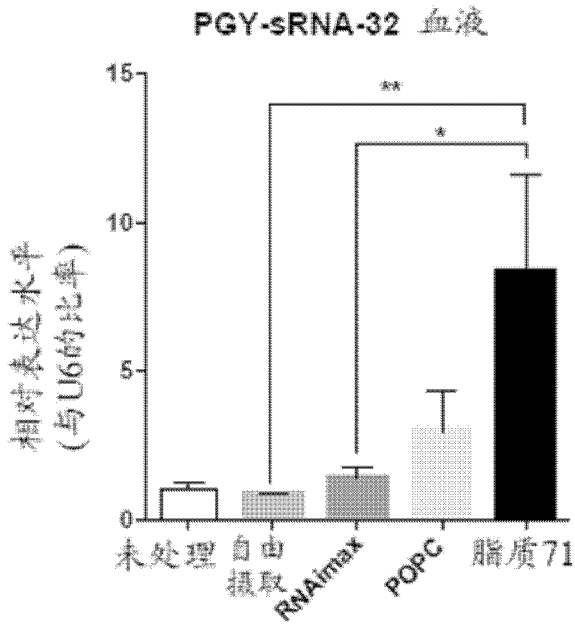

PGY-sRNA-32 血液
相对表达水平
(与U6的比率)
15
10
5
0
**
*
未处理
自由
摄取
RNAimax
POPC
脂质71

图 147

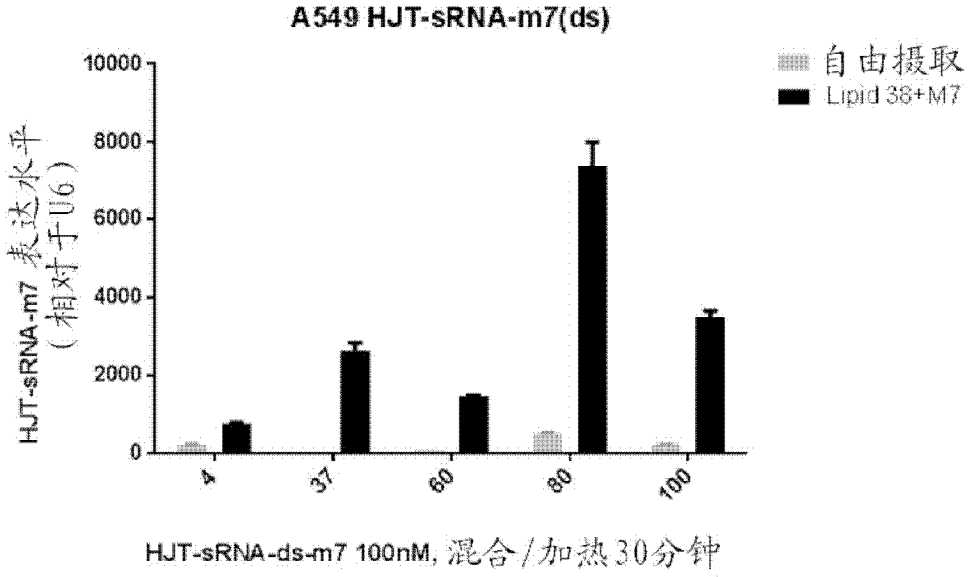


图 148

空白 0.1%

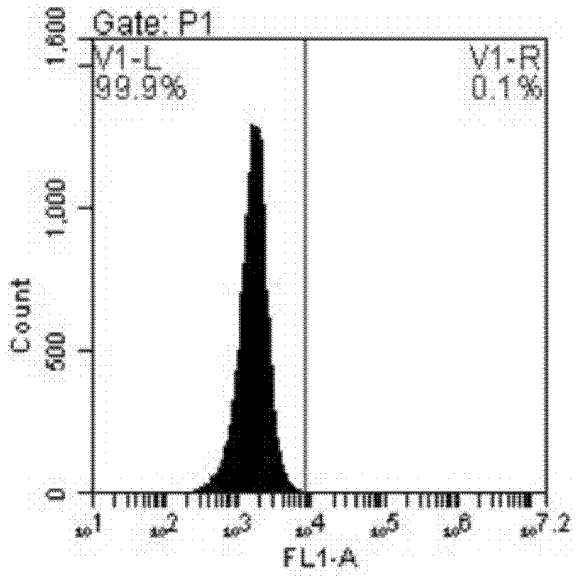


图 149A

GFP 3.6%

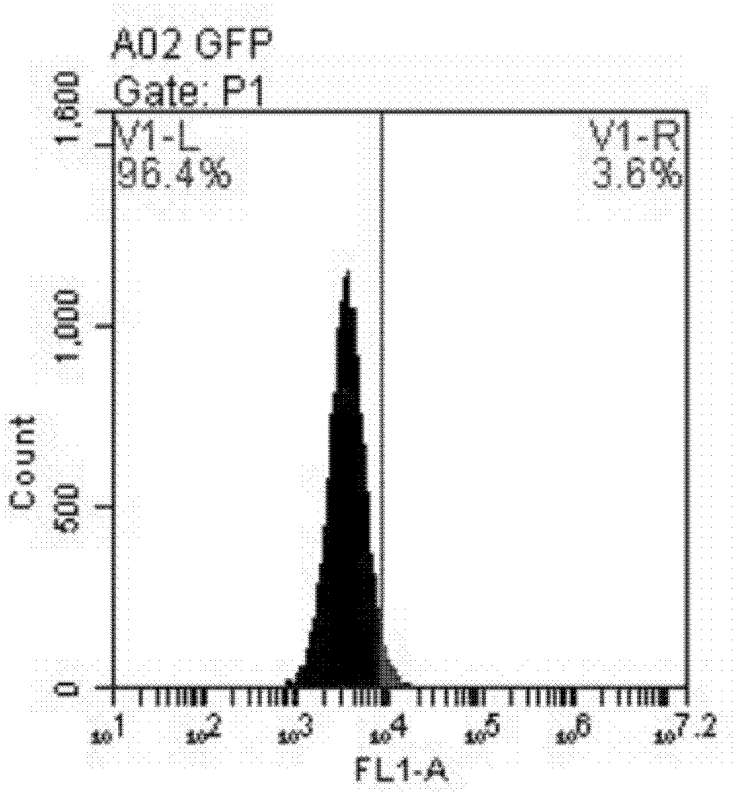


图 149B

10ug/mL 7.2%

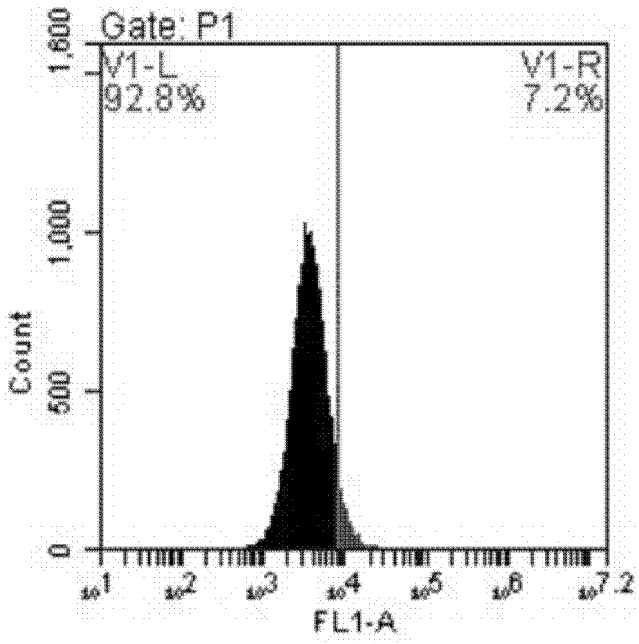


图 149C

30ug/mL 9.1%

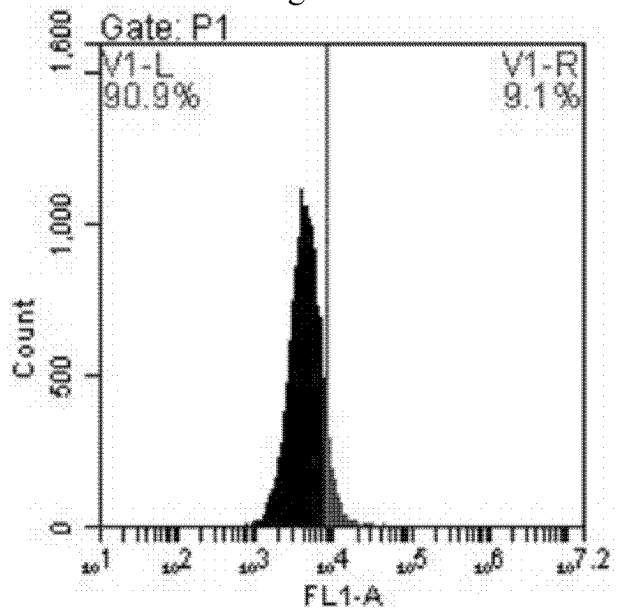


图 149D

空白 0.1%

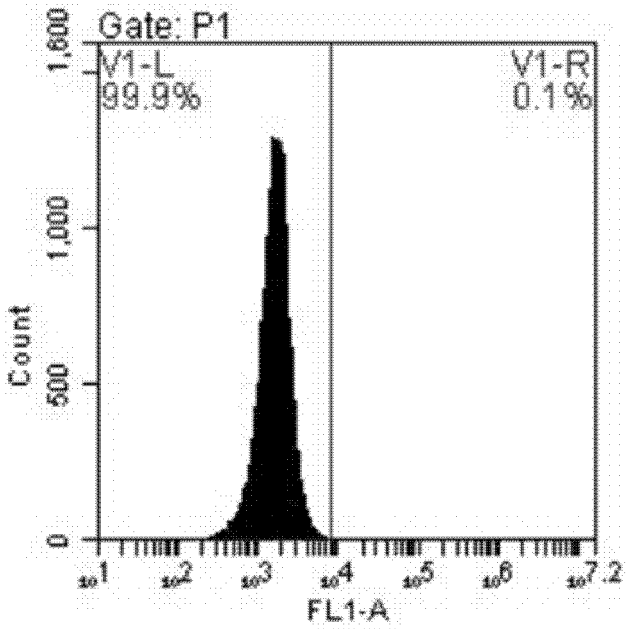


图 150A

GFP 3.6%

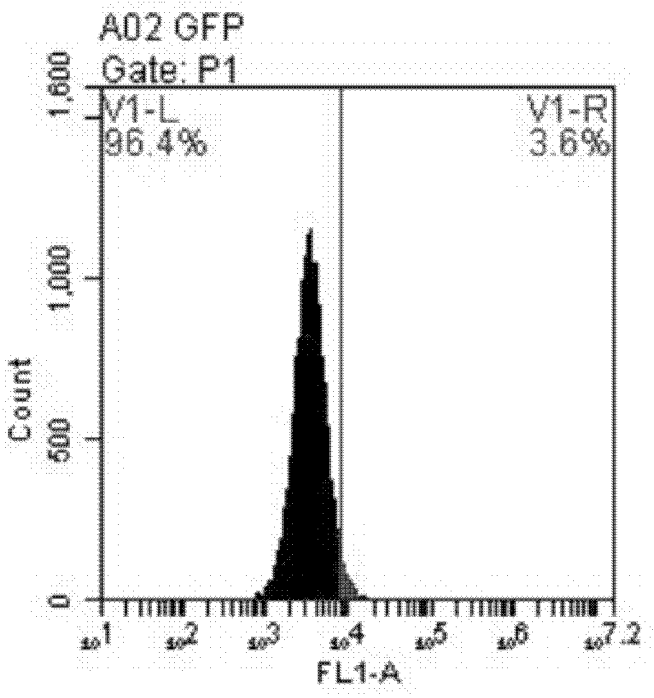


图 150B

10ug/mL GFP 23.4%

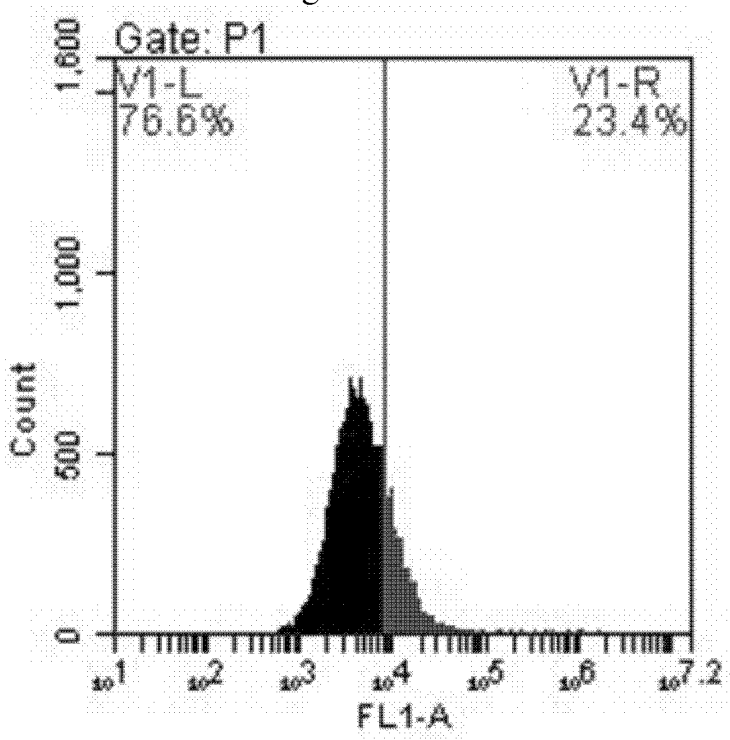


图 150C

30ug/mL 26.6%

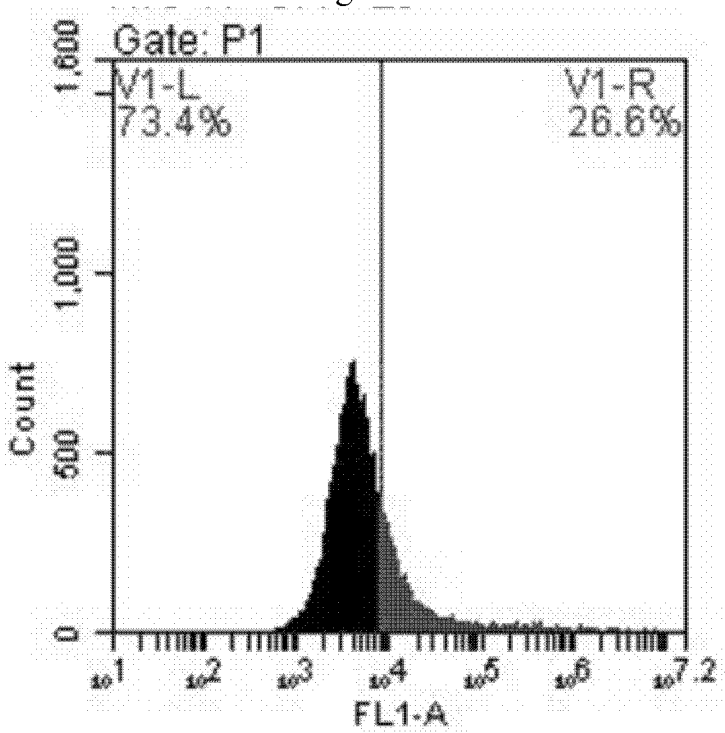


图 150D

空白组 0.1%

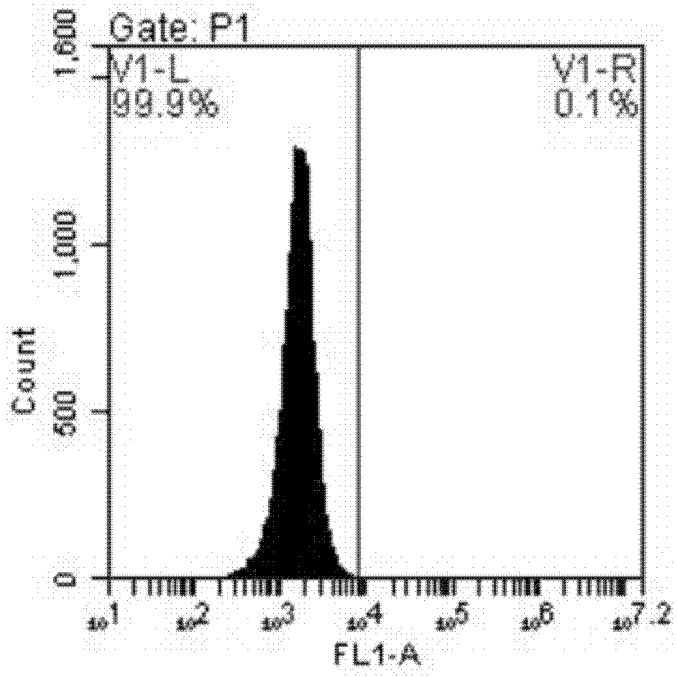


图 150E

GFP 3.6%

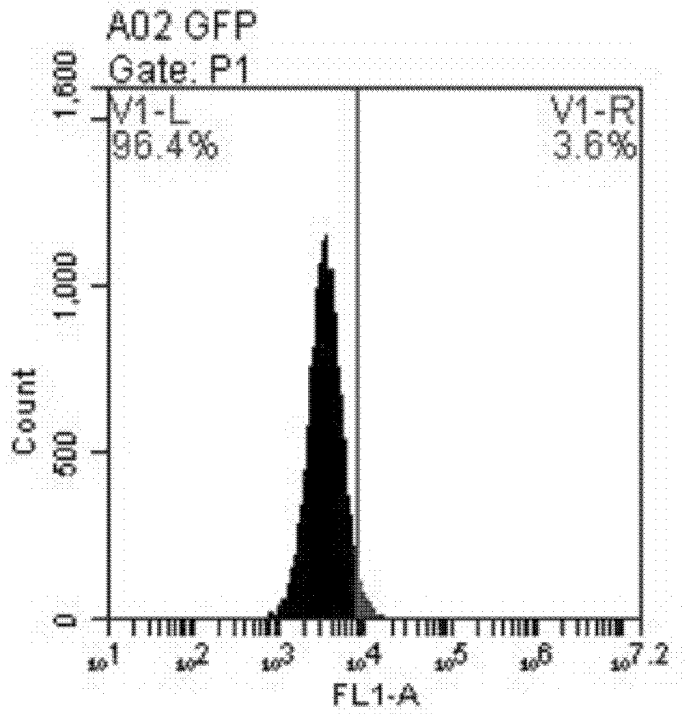


图 150F

10ug/mL 5.5%

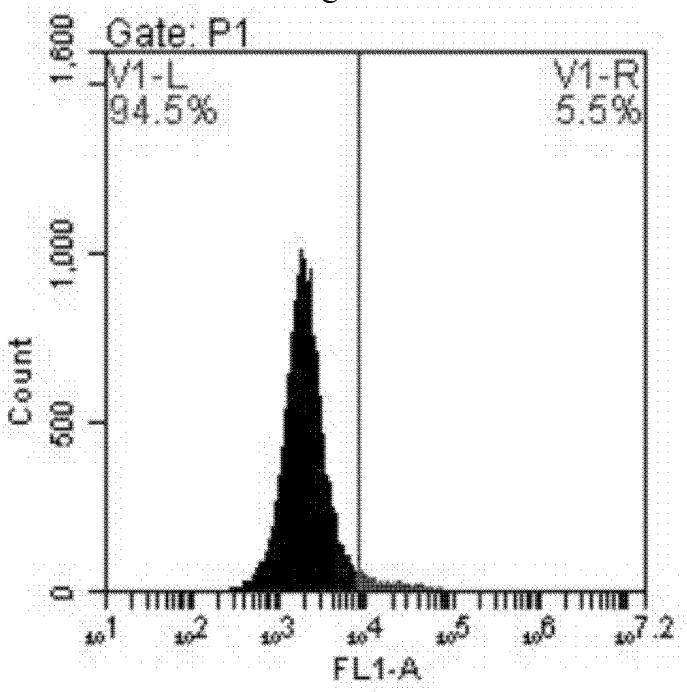


图 150G

30ug/mL 9.5%

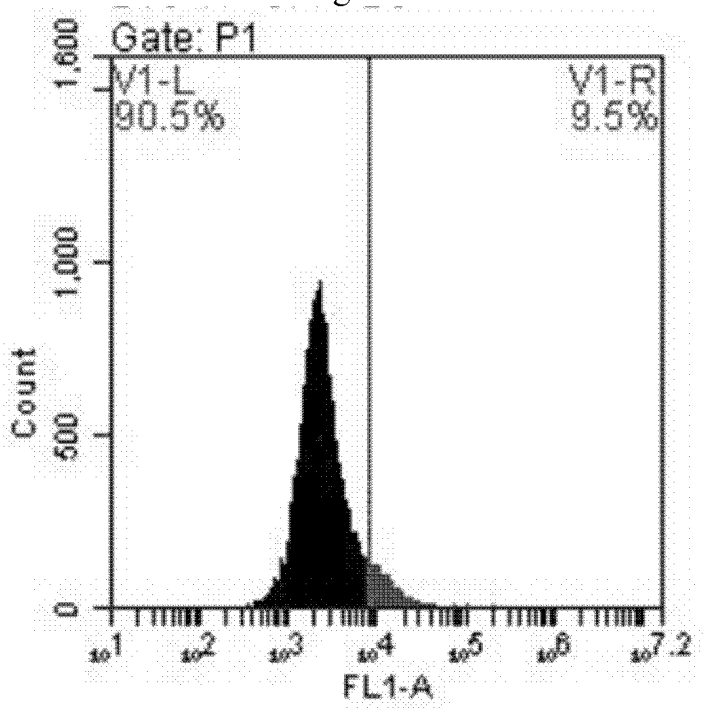


图 150H

空白 0.1%

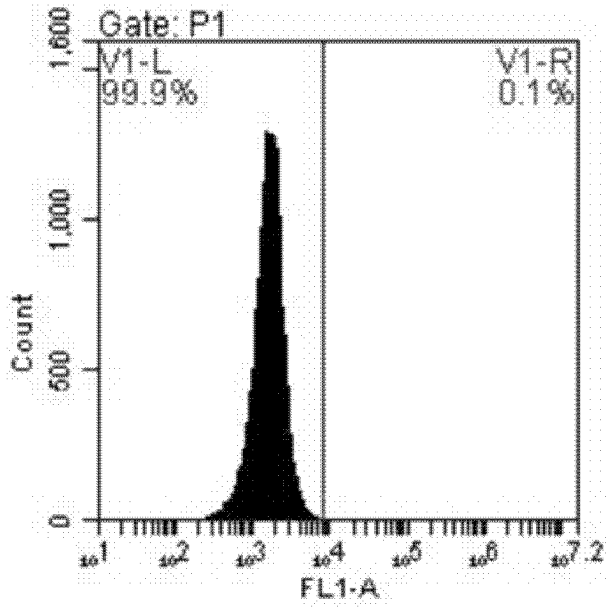


图 151A

GFP 3.6%

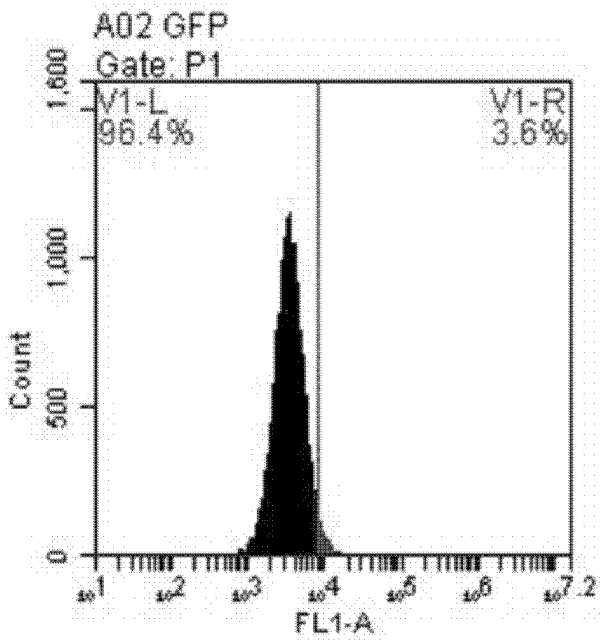


图 151B

10ug/mL 7.1%

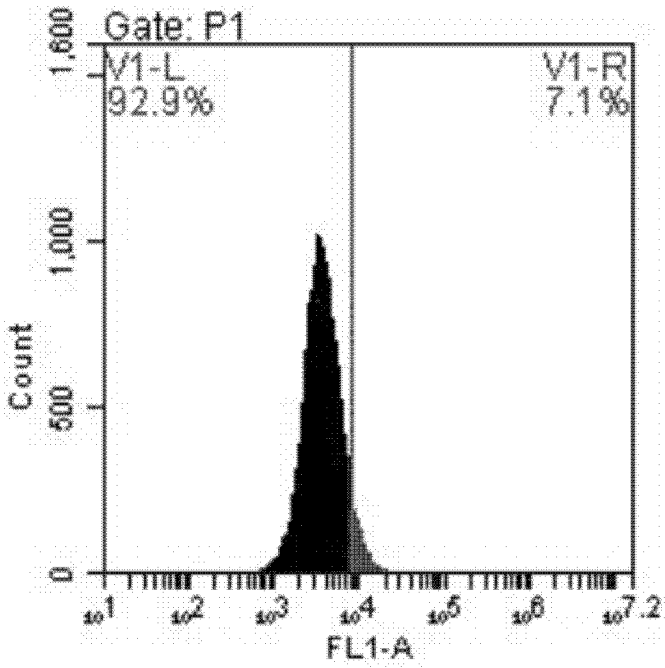


图 151C

30ug/mL 9.1%

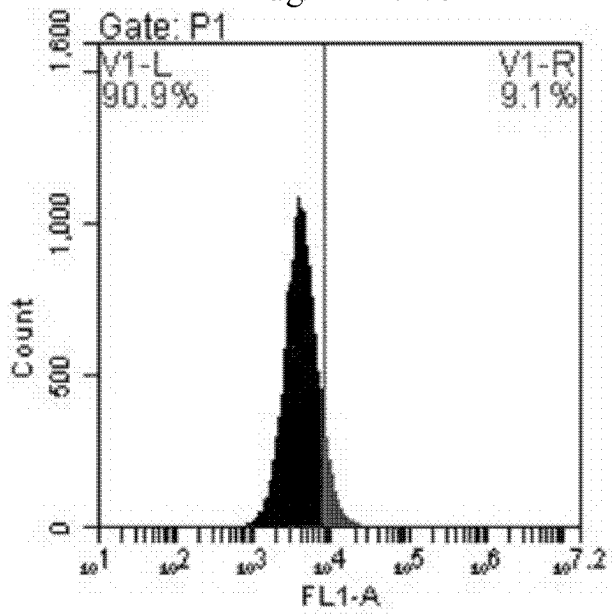


图 151D

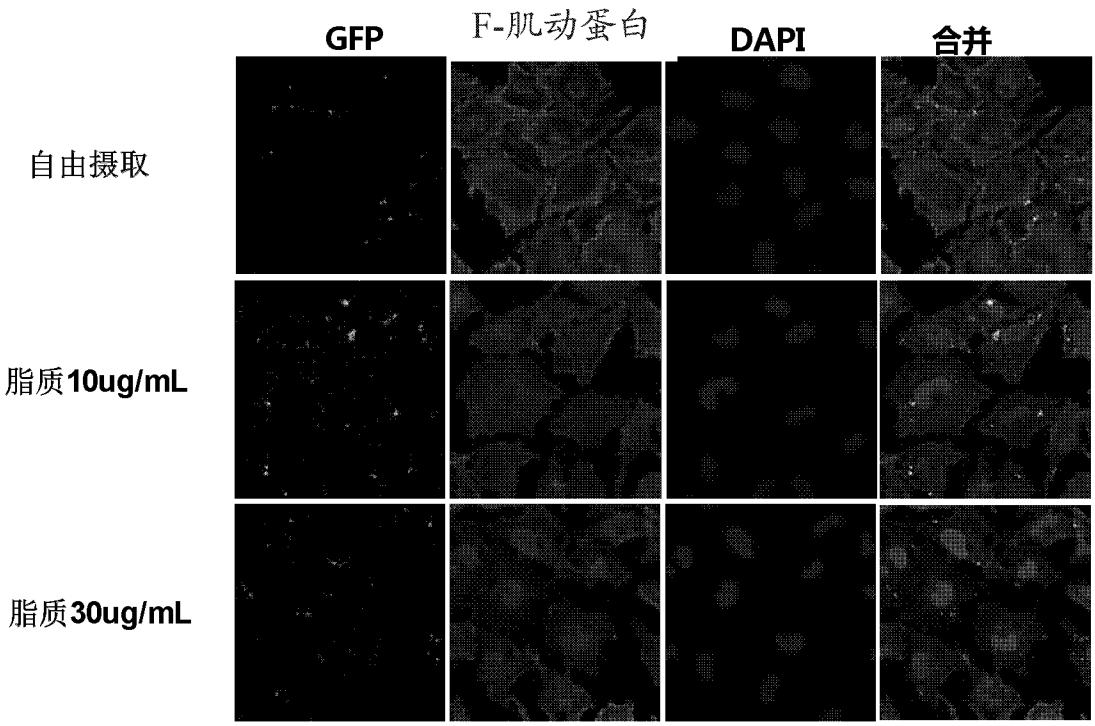


图 152

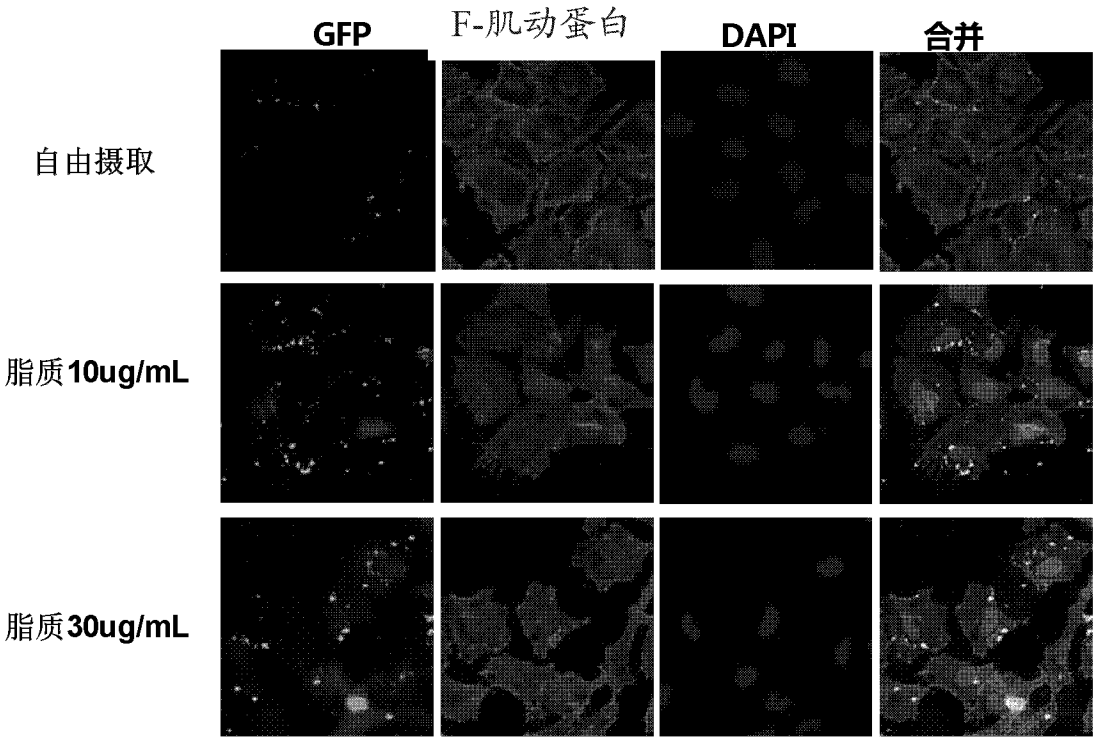


图 153

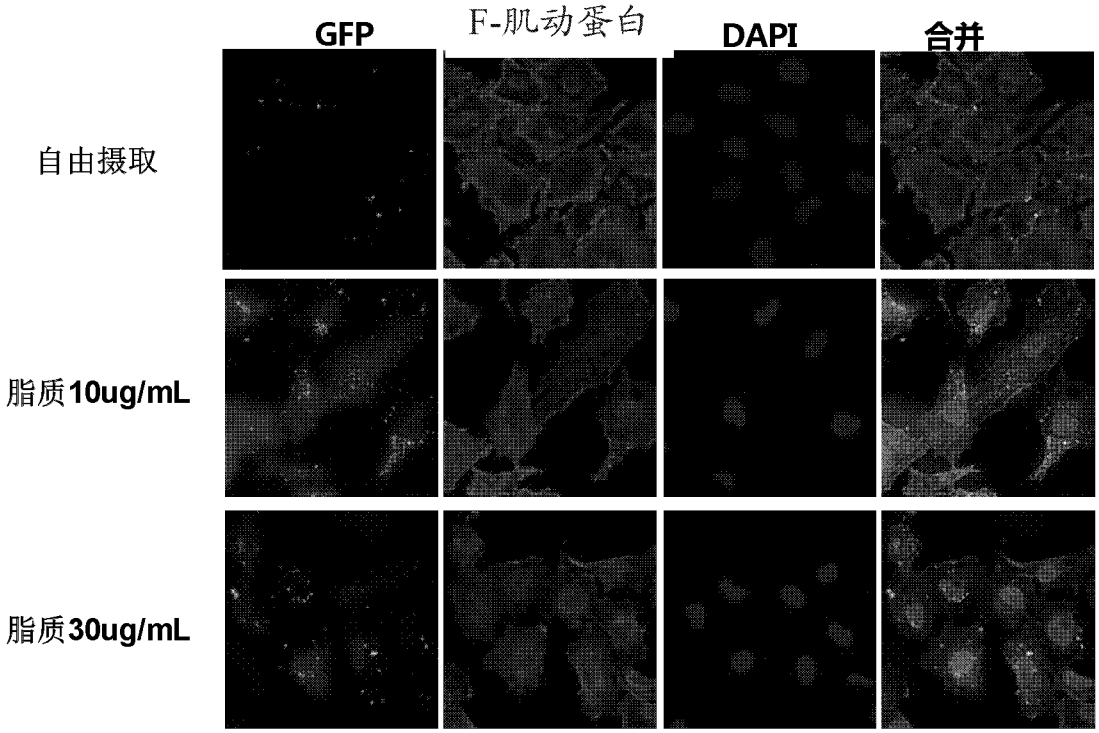


图 154

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/077004

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i; C07C 219/00(2006.01)i; C07C 229/00(2006.01)i; C07C 233/00(2006.01)i; C07F 9/09(2006.01)i; A61P 1/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, C07C, C07F, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED, 百度学术搜索, BAIDU SCHOLAR SEARCH: 递送, 细胞, 脂质, 核酸, 核苷酸, DNA, RNA, 纳米颗粒, 蛋白, 加热, 小RNA, Sphinganine, 本草体, 汤剂体, 蒲公英, 红景天, delive, cell, lipid, nucleic acid, nucleotide, nanoparticle, protein, heat, sRNA, dandelion, rhodiola root

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1897918 A (ALZA CORPORATION) 17 January 2007 (2007-01-17) claims 1-12 and 58-67	9
Y	CN 107530399 A (MASSACHUSETTS EYE AND EAR INFIRMARY) 02 January 2018 (2018-01-02) claims 1-2	23-25
PX	WO 2018177383 A1 (INSTITUTE OF BASIC MEDICAL SCIENCES CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 04 October 2018 (2018-10-04) description, pages 1, 5-6, 17-20, 33, 36, 41, 89 and 97	1-8, 10-22
PY	WO 2018177383 A1 (INSTITUTE OF BASIC MEDICAL SCIENCES CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 04 October 2018 (2018-10-04) description, pages 1, 5-6, 17-20, 33, 36, 41, 89 and 97	23-25
A	CN 105534908 A (XUZHOU MEDICAL COLLEGE) 04 May 2016 (2016-05-04) see entire document	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 April 2019	**24 May 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R, China **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/077004

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **4,19**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 4 and 19 relate to methods for treatment of the human or animal body by therapy, which fall within the cases set out in PCT Rule 39.1(iv). Nevertheless, a search is still carried out on the basis of the technical subject matter of a use of said compound in the preparation of a corresponding drug.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

[1] Invention 1: claims 1-4, 7 (in part) and 20-25 (in part) relate to a method for preparing a herbal body, a herbal body prepared by using the method, and the use of the herbal body;

[2] invention 2: claims 5, 6, 7 (in part) and 20-25 (in part) relate to a method helpful in delivery of nucleic acids;

[3] invention 3: claim 8 relates to a method for facilitating nucleic acid and lipid to form the herbal body;

[4] invention 4: claim 9 relates to a method for delivering protein to a cell via lipid; and

[5] invention 5: claims 10-19 relate to a method for preparing a decoction from herbals.

[6] The five inventions are not linked through a general inventive concept, and lack unity of invention under PCT Rule 13.1, and the reasoning therefor is as follows:

[7] firstly, inventions 1-3, invention 4 and invention 5 do not share a same or corresponding technical feature, and fall within different inventive concepts; and

[8] secondly, the same technical feature between claims 1-3 is carrying out heating treatment on the nucleic acid and lipid after mixing; however, the prior art in the art discloses the above-mentioned feature (see CN 105534908 A, date of publication: 04 May 2016, specifically disclosing: a lipidosome which entraps a nucleic acid drug and has a capability related to anoxia and a radiosensitivity function, comprising a lipidosome and a nucleic acid; the preparation method comprising: dissolving lipid molecules, cholesterin, polyethylene glycol phospholipid and DOPC lipid molecules into an organic solvent to obtain the lipidosome, adding a citric acid buffer solution, then adding the nucleic acid drug, and heating in a water bath at 37-70°C, so as to obtain the functional lipidosome for entrapping the nucleic acid drug (see claims 1-6)); and therefore, the same technical feature is not a specific technical feature, and inventions 1-3 do not same a corresponding specific technical feature.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/077004

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

1. ☑ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/077004

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	1897918	A	17 January 2007	EP	2116230	A3	29 September 2010
				IL	175606	A	30 April 2014
				WO	2005048952	A2	02 June 2005
				NO	20062867	A	17 August 2006
				AU	2004291162	A1	15 June 2006
				KR	20060123160		01 December 2006
				NZ	547079	A	27 March 2009
				EP	2116230	A2	11 November 2009
				EP	1689363	A2	16 August 2006
				ZA	200604967	A	28 November 2007
				US	7731947	B2	08 June 2010
				JP	4824574	B2	30 November 2011
				US	2005112188	A1	26 May 2005
				MX	2006005565	A1	01 September 2006
				IN	200601279	P2	27 April 2007
				TW	200534863	A	01 November 2005
				EP	1689363	A4	01 July 2009
				AU	2004291162	B2	30 July 2009
				JP	2007527869	A	04 October 2007
CN	107530399	A	02 January 2018	EP	3204032	A4	10 October 2018
				EP	3204032	A2	16 August 2017
				WO	2016057061	A2	14 April 2016
				US	2017326254	A1	16 November 2017
				CA	2964234	A1	14 April 2016
WO	2018177383	A1	04 October 2018		None		
CN	105534908	A	04 May 2016	CN	105534908	B	14 December 2018

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/077004

A. 主题的分类

A61K 48/00(2006.01)i；C07C 219/00(2006.01)i；C07C 229/00(2006.01)i；C07C 233/00(2006.01)i；C07F 9/09(2006.01)i；A61P 1/04(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K，C07C，C07F，A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNABS, CPRSABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED, 百度学术搜索:递送，细胞，脂质，核酸，核苷酸，DNA，RNA，纳米颗粒，蛋白，加热，小RNA，Sphinganine，本草体，汤剂体，蒲公英，红景天，delive，cell，lipid，nucleic acid，nucleotide，nanoparticle，protein，heat，sRNA，dandelion，rhodiola root

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 1897918 A (阿尔萨公司) 2007年 1月 17日 (2007-01-17) 权利要求1-12、58-67	9
Y	CN 107530399 A (马萨诸塞眼科耳科诊所) 2018年 1月 2日 (2018-01-02) 权利要求1-2	23-25
PX	WO 2018177383 A1 (INSTITUTE OF BASIC MEDICAL SCIENCES CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 2018年 10月 4日 (2018-10-04) 说明书第1、5-6、17-20、33、36、41、89、97页	1-8，10-22
PY	WO 2018177383 A1 (INSTITUTE OF BASIC MEDICAL SCIENCES CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 2018年 10月 4日 (2018-10-04) 说明书第1、5-6、17-20、33、36、41、89、97页	23-25
A	CN 105534908 A (徐州医学院) 2016年 5月 4日 (2016-05-04) 参见全文	1-25

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 4月 29日	2019年 5月 24日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 苏林 电话号码 62411030

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/077004

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☑ 权利要求： 4,19
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求4和19涉及属于专利合作条约实施细则39.1(iv)规定情形的通过治疗对人体或动物体进行处置的方法。尽管如此，仍基于所述组合物在制备相应药物中的用途的技术主题进行了检索。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏　缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

[1] 发明1、权利要求1-4、7（部分的）、20-25（部分的），涉及制备本草体的方法、利用所述方法制备的本草体及其用途；

[2] 发明2、权利要求5-6、7（部分的）、20-25（部分的），涉及有助于核酸递送的方法；

[3] 发明3、权利要求8，涉及促进核酸与脂质形成本草体的方法；

[4] 发明4、权利要求9，涉及脂质递送蛋白质至细胞的方法；

[5] 发明5、权利要求10-19，涉及从植物制备汤剂体的方法。

[6] 这5项发明之间没有通过一个总的发明构思关联，不符合PCT细则13.1定义的发明单一性的要求，理由如下：

[7] 首先，发明1-3、发明4与发明5之间没有相同或相应的技术特征，属于不同的发明构思；

[8] 其次，发明1-3之间相同的技术特征是将脂质与核酸混合后进行加热处理，但本领域现有技术已经公开了上述技术特征（参见：CN105534908A，公开日：2016年5月4日，具体公开了：一种包载核酸药物的具缺氧相应能力和放疗增敏功能脂质体，包括脂质体和核酸药物，制备方法包括将脂质分子、胆固醇、聚乙二醇磷脂和DOPC脂质分子溶解于有机溶剂中制成脂质体，加入柠檬酸缓冲溶液，再加入核酸药物，在37-70℃的温度下水浴加热，制得包载核酸药物的功能脂质体（参见权利要求1-6）），因此上述相同的技术特征不是特定技术特征，并且发明1-3之间也没有相应的特定技术特征。

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/077004

第III栏　缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

1. ☑ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/077004

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	1897918	A	2007年 1月 17日	EP	2116230	A3	2010年 9月 29日
				IL	175606	A	2014年 4月 30日
				WO	2005048952	A2	2005年 6月 2日
				NO	20062867	A	2006年 8月 17日
				AU	2004291162	A1	2006年 6月 15日
				KR	20060123160		2006年 12月 1日
				NZ	547079	A	2009年 3月 27日
				EP	2116230	A2	2009年 11月 11日
				EP	1689363	A2	2006年 8月 16日
				ZA	200604967	A	2007年 11月 28日
				US	7731947	B2	2010年 6月 8日
				JP	4824574	B2	2011年 11月 30日
				US	2005112188	A1	2005年 5月 26日
				MX	2006005565	A1	2006年 9月 1日
				IN	200601279	P2	2007年 4月 27日
				TW	200534863	A	2005年 11月 1日
				EP	1689363	A4	2009年 7月 1日
				AU	2004291162	B2	2009年 7月 30日
				JP	2007527869	A	2007年 10月 4日
CN	107530399	A	2018年 1月 2日	EP	3204032	A4	2018年 10月 10日
				EP	3204032	A2	2017年 8月 16日
				WO	2016057061	A2	2016年 4月 14日
				US	2017326254	A1	2017年 11月 16日
				CA	2964234	A1	2016年 4月 14日
WO	2018177383	A1	2018年 10月 4日		无		
CN	105534908	A	2016年 5月 4日	CN	105534908	B	2018年 12月 14日