

文章编号: 1004-0374(2010)07-0616-07

RNA 干扰体内导入技术研究进展

姚燕丹, 宋尔卫*

(中山大学附属第二医院乳腺外科肿瘤中心, 广州 510120)

摘要: RNA干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种发展迅速并具有广阔应用前景的基因控制技术, 它能特异性地沉默内源或外源性靶基因, 已成为基因治疗的有效手段。然而, 利用 RNA 干扰技术进行体内基因沉默的主要障碍是如何实现 siRNA 和 miRNA 的体内安全高效输送导入。该文结合国内外进展和本课题组在 RNA 干扰方面的研究成果, 对 RNA 干扰体内导入技术作一综述。

关键词: RNA 干扰; siRNA; miRNA; 基因治疗; 技术

中图分类号: Q52; R730.59 **文献标识码:** A

Delivery technology of RNA interference *in vivo*

YAO Yan-dan, SONG Er-wei*

(Breast Tumor Center, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: RNA interference (RNAi) is a rapidly developing technique and has the prospect of genetic manipulation techniques. It can silence specific endogenous or exogenous target gene, and has become an effective means of gene therapy. However, how to achieve the efficient delivery of RNA interference *in vivo* is still a major obstacle. Here, together with study abroad and our group's achievements, we summarized the delivery techniques of RNA interference *in vivo*.

Key words: RNAi; siRNA; miRNA; gene therapy; technique

RNA干扰 (RNA interference, RNAi) 能特异性地沉默内源或外源性靶基因, 是一种发展迅速并具有广阔应用前景的基因控制技术^[1]。自 2001 年 Tuschl 等发现 siRNA 能在哺乳动物细胞内高效沉默目标基因的表达后, 生命科学领域掀起了对 siRNA 的基础和应用研究的热潮。有关小分子 RNA 的研究不仅多次入选 Science 杂志一年一度的十大科技突破, 而且作为其代表的 RNA 干扰技术的发现者还于 2006 年获得诺贝尔生理或医学奖。RNA 干扰包括应用 siRNA 或 miRNA 进行基因控制, 这项技术不仅可应用于基础研究, 还有望成为攻克肿瘤、艾滋病、遗传性疾病或神经系统疾病等疾病的新武器。

siRNA (short interference RNA) 是双链 RNA 分子进入细胞之后被称为 Dicer 的 RNase III 类酶剪切而产生的 21~23 nt 大小的双链小 RNA 分子^[2]。siRNA 在疾病中的应用范围很广, 其主要适应症是恶性肿瘤和病毒感染性疾病的治疗研究。RNA 干扰的作用机

制是通过 dsRNA (双链 RNA) 经外界进入细胞或合成后由核内通过转运蛋白运输到胞浆中, 被 Dicer 酶识别并加工成 21~23 nt 长度的短双链 RNA, 反义链 RNA 使特定靶基因的 mRNA 降解, 从而抑制靶基因的表达并产生相应的生物学效应。与其他抑制基因表达的方法相比, siRNA 技术应用于治疗恶性肿瘤等重大疾病的优点在于特异性高、效能强, 几乎所有的基因都能被沉默, 而且简便和相对安全, 所以很多科学家都致力于应用 siRNA 治疗疾病的研究。我们率先在整体动物疾病模型中研究 siRNA, 证实了 siRNA 在小鼠肝炎中的治疗潜能。

收稿日期: 2010-04-01

基金项目: 国家自然科学基金杰出青年科学基金 (30525022); 国家重点基础研究发展计划 ("973" 项目) (2010CB912800, 2009CB521706)

* 通讯作者: E-mail: songerwei02@yahoo.com.cn; songew@mail.sysu.edu.cn

miRNA 参与基因转录后水平调控, 在肿瘤发生、发展、转归中起着重要作用, 成为肿瘤生物治疗领域一个新亮点^[3-5]。miRNA 介导的 RNA 干扰的作用机制是内源性的 miRNA 被 RNase III 酶 Droscha 识别并加工为一个长度为 70 nt 呈长发夹结构的前体 miRNA, 接着前体 miRNA 被 Dicer 酶识别并加工成长度为 21~23 nt 的短双链 RNA, 其中反义链 miRNA 与目标 mRNA 形成不完全互补结合降解靶基因的 mRNA, 从而抑制靶基因的表达。miRNA 通过调控癌基因或(和)抑癌基因的表达参与肿瘤细胞增殖、分化、凋亡、迁移、血管生成和蛋白裂解等生物程序的调控, 与癌细胞的恶性表型密切相关。因此, 利用病毒或脂质体载体系统输送具有抑癌基因作用的 miRNA, 可用于治疗某些特定的肿瘤。在国内我们率先研究发现 miRNA-let-7 对乳腺癌干细胞的调控作用, 进一步对 let-7 进行干预研究证实了这种调控作用, 研究结果证明了 miRNA 治疗癌症的巨大潜能^[6]。

虽然, 利用 siRNA 和 miRNA 进行 RNAi 有巨大的治疗潜能。然而, RNA 干扰技术实现体内基因沉默的主要障碍是如何获得高效安全的输送体系将目标基因的 siRNA 或 miRNA 输送到体内。目前研究中常用到的输送体系, 如病毒载体、高压静脉注射等方法在实际临床应用中受到明显的限制, 很难广泛应用^[7, 8]。另外一些方法将 siRNA 直接送到靶部位如皮肤^[9]、眼睛^[10]、肺^[11]或中枢神经系统^[12], 具有一定应用潜能, 但与系统全身给药仍有一定的差距。近年来, 进入临床试验的 siRNAs 新药都直接采用局部给药, 从而避免了体内输送给药所面临的复杂问题。然而, 为了应用 RNAi 治疗癌症和其他疾病, 采用全身导入给药施行 RNAi 非常必要。最佳的体内全身系统输送给药体系必须具备以下要素^[13, 14]: (1) 输送体系必须具有良好的生物相容性、生物可降解性和没有免疫源性; (2) 输送体系可以有效地把 siRNA 或 miRNA 输送到靶细胞或组织内, 并保护有活性的 siRNA 或 miRNA 逃避血清核酸酶的攻击; (3) 输送体系能把 siRNA 或 miRNA 富集到靶细胞或组织中, 避免肝脏和肾脏的清除; (4) 该输送体系和 siRNA 或 miRNA 通过内吞进入细胞后, 可以释放 siRNA 或 miRNA 到胞浆中, 从而产生 RNA 干扰后效应。下面具体介绍 RNAi 的体内输送体系。

1 siRNA 体内输送体系

1.1 基于脂质的 siRNA 体内输送体系

基于脂质的输送体系一般由脂质体、微粒、乳

剂和固态的脂质纳米粒组成。目前已有多个基于脂质的输送体系被开发应用于 siRNA 的体内输送。对基于脂质的 siRNA 体内输送体系来说, 脂质混合物、siRNA 与脂质的比例、颗粒大小以及制作工艺都必须经过优化。在诸多合成的 siRNA 输送体系当中, 脂质载体是最吸引人的运载工具之一。这是由于该输送体系具有以下优点: 简单的利用所带的阳离子就能结合运载带负电荷的 siRNA; 具有较高的转染效率; 能增强药物代谢动力学; 这个体系的毒性和免疫源性较低。而且, 阳离子脂质体还具有能保护 siRNA 不被核酸酶降解, 减少肾脏对 siRNA 的清除等优点。自从 1980 年首次应用阳离子脂质体 DOTMA 输送质粒 DNA 进入哺乳动物细胞后, 其他阳离子脂质体的研究不断涌现^[15]。在 2000 年之前, 大多数基于脂质体的体内输送体系都用于输送质粒 DNA 进入细胞或组织中^[16]。直到 siRNA 作为潜在新药到来之后, 阳离子脂质体从主要用于输送 DNA, 转而应用于输送 siRNA。众所周知, 阳离子脂质体的结构决定阳离子脂质体输送体系的转染效率和毒性。不同长度的烃链影响阳离子脂质体的细胞毒性^[17]。

尽管大多数基于脂质的 siRNA 输送体系以脂质体为主要组分, 但是还有其他基于脂质的体系被成功开发应用于 siRNA 的输送。阳离子固态脂质纳米粒就是其中的一种, 它由胆固醇酯、甘油三酯、胆固醇、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 和 3-[N (N', N' 二甲基胺乙基) 胺基甲酰基] 胆固醇组成, 并与 siRNA 和聚乙二醇 (siRNA-PEG) 通过静电作用形成可逆性结合^[18]。Kim 等^[18]报道利用固态脂质纳米粒输送 siRNA 能有效地抑制靶基因的表达和保持一定的血液稳定性, 并且细胞毒性较低。Morrissey 等^[19]将核苷酸脂质纳米粒 (SNALPs) 应用于鼠、豚鼠和非人类的灵长类动物等动物体内 siRNA 输送研究评估。SNALP 由包含有阳离子和致融脂质的双层脂质组成, 这种脂质能通过内吞作用进入胞内, 并可由内涵体释放出 siRNA^[20]。SNALPs 的表面包裹连接中性亲水的聚乙烯乙二醇, 这种结构在合成过程中在外部对颗粒起稳定作用。在鼠乙型肝炎疾病模型, 首次应用 SNALPs 携带针对乙型肝炎病毒特异的 siRNA, 结果显示可以有效地抑制乙型肝炎病毒的复制。尽管基于阳离子脂质体的输送系统已经证明 siRNA 作为人类治疗药物的潜能, 但是仍有很多问题亟待解决。迄今为止, 很多研究都着眼于 siRNA 的应用, 而很少探讨载体或 siRNA 可能存在

的毒性。有几项研究发现体内给予脂质和 siRNA 后, 实验鼠没有发生不确定的干扰素反应^[21, 22], 但仍需进一步研究基于阳离子脂质体和脂质输送体系的生物安全性, 包括从结构上不断优化基于脂质的输送体系, 使这类输送体系可以预见的毒性降到最低。

1.2 纳米材料介导的 siRNA 体内输送体系

基于纳米材料的输送体系已经广泛应用于输送 DNA, 近年来开始应用于输送 siRNA, 应用最多的是聚合物输送体系。自 1990 年阳离子聚合物应用于输送质粒 DNA 以来, 已经积累了较多的经验。与基于脂质的输送体系类似, 聚合物输送体系通常包含有一个带阳离子的核心部分。虽然 siRNA 在相对分子质量、投料比、稳定性和作用方式等方面与质粒 DNA 都有明显的差别, 但是由于两者都是核苷酸, 在体内输送的很多方面有共同的特性。因此, 聚合物介导的 DNA 体内输送体系为 siRNA 体内输送治疗体系的发展提供许多有益的参考信息^[23]。通常阳离子聚合物分为人工合成和天然高分子。人工合成的聚合物包括分支和线性的 PEI、PLL 和环糊精多聚阳离子; 天然阳离子聚合物有壳聚糖、去端肽胶原和阳离子多肽。基于阳离子聚合物的优越性在于 siRNA 和聚合物复合物的结构简单, 不像阳离子脂质体那样需要多个操作步骤, 阳离子聚合物通常只需与带负电荷的 siRNA 简单混合就能形成复合物。作为一种广泛应用的阳离子聚合物, PEI 有比较宽的相对分子质量范围和多个质子化的氨基, 故而在生理 pH 条件下可以形成比较高的电荷密度。PEI 和核苷酸复合物通过 PEI 上带正电荷的氨基和 DNA 或 RNA 上带负电荷的磷酸基之间的静电作用而获得^[24]。PEI 优于其他聚合物之处在于其转染效率

较高。由于 PEI 的“质子海绵效应”特性, 可以在低 pH 值的内涵体内起缓冲作用, 并释放出核苷酸到胞浆^[25]。尽管 PEI 作为体内输送载体具有以上的优势, 但其存在细胞毒性。Fischer 等^[26]研究发现 PEI 在很多细胞系中可以通过类似细胞坏死和凋亡等机制诱导细胞死亡, 而且这种细胞毒性可以随着 PEI 相对分子质量的增大和分支的增多而增大。研究显示在 PEI 与 siRNA 通过静电作用复合后去除游离的 PEI 可以降低其毒性。

为了减少 PEI 相对分子质量较大所带来的细胞毒性和提高其对核酸酶的耐受性, 不同长度的 PEG 被引入 PEI 反应中合成嵌段共聚物^[27]。用 PEI 和 PEG 合成生物可降解阳离子聚合物用于输送 siRNA (图 1), 并通过提高 PEG 的亲水性以降低共聚物的细胞毒性, 提高弱水溶性的 PEI 和 siRNA 复合物的水溶性, 再通过伯胺反应将可降解键引入 PEI 使聚合物能自降解, 该聚合物有较好的输送能力。PEG 可以形成一个防护层以减少体内环境中的降解酶或蛋白对可降解键结构的降解。王均研究组用 PEG、PEI 和 PPEEA 合成生物可降解阳离子聚合物用于输送 siRNA, 该共聚物能成功地与 siRNA 结合形成复合物(图 1), 而且该共聚物与细胞的生物相容性相当好, 并将聚合物 siRNA 复合物成功输送到目标细胞发挥沉默基因表达并产生相应的生物学效应^[28]。Kim 等^[29]利用一种能与 siRNA 起静电作用的阳离子聚合物 PEI、对立体结构起稳定作用的 PEG 以及有靶向血管内皮细胞作用的 RGD 多肽三种主要嵌段合成共聚物, 并用这种纳米材料进行治疗研究。以每只鼠 40 μg 的量将 VEGF 受体特异的 siRNA 与 PEG-PEI-RGD 聚合物复合后通过鼠尾静脉给药。研究结果显示, PEG-PEI-RGD 聚合物介导的 VEGF siRNA

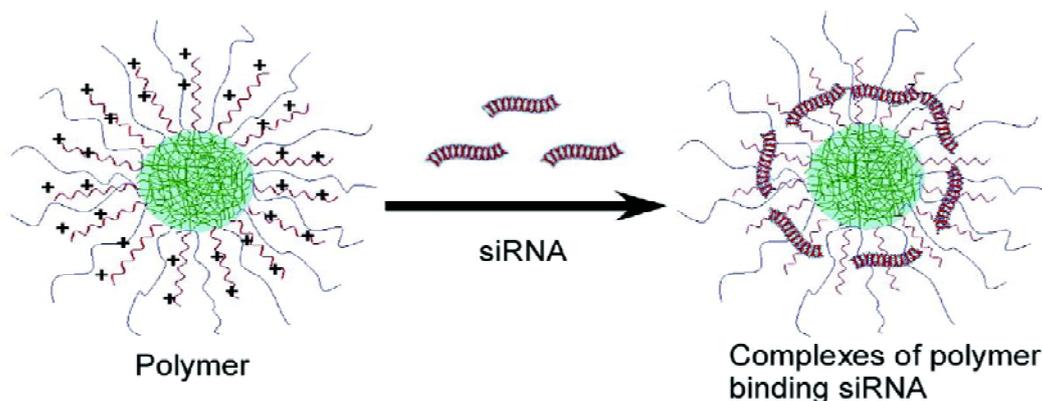


图1 阳离子聚合物与 siRNA 简单混合后形成聚合物 siRNA 复合物

全身给药治疗可以抑制病毒诱导的血管形成和疱疹性角膜炎引起的损伤。众多的体内输送的成功例子说明聚合物介导的 siRNA 体内输送体系就如基于脂质的输送体系一样充满希望。

1.3 siRNA的键合输送体系

在非病毒载体介导的 siRNA 输送体系中, 阳离子脂质和纳米材料扮演重要的角色, 并取得了巨大的成功。在这些阳离子输送体系中, 输送载体与带负电荷的 siRNA 通过静电作用复合。尽管这些输送系统已经取得巨大的进步, 但这些体系还必须解决包括免疫反应、脱靶效应和颗粒大小控制等问题, 科学家们仍需继续探索其他 siRNA 导入方法^[30]。另一个体内输送策略是把 siRNA 直接连接到可以靶向的部分或能增强细胞内吞作用的特殊载体^[31]。由于这种输送体系中只有 siRNA 具有治疗作用, siRNA 与功能肽、亲脂分子、PEG 和配体等多种材料连接, 以增强输送效果。有几个研究发现 siRNA 以键合结合的方式与细胞穿膜肽(CPPs)连接, 可以增强体外细胞 siRNA 的药物输送。与 TAT 肽的连接可以促使 siRNA 内吞到细胞内, 并产生 RNA 干扰效应^[32]。CPPs 这种穿膜输送肽主要是通过与 siRNA 的巯基连接形成二硫键, 这个键在胞浆中易受破坏。在多个哺乳动物细胞系的研究证实, CPP 连接输送 siRNA 对目标基因的表达起明显的 RNA 干扰效应。由于阳离子肽与阴离子的 siRNA 连接后使肽趋向中性, 可能会在一定程度上削弱 CPPs 肽的穿膜效率。由于这种材料存在影响细胞膜和免疫源性等细胞毒性, 而且已有报道证实 CPP 行 siRNA 体内输送可以诱导机体产生免疫应答, 所以 CPP 用于 siRNA 体内输送的安全性仍需进一步的研究。

另一个比较有应用前景的亲脂的 siRNAs 体内输

送载体是胆固醇结合物。经鼠尾静脉注射给予胆固醇和 ApoB siRNA 的结合物可以抑制肝脏和空肠目标靶基因 ApoB 超过 50% 的蛋白表达, 同时也减少 ApoB 的血清蛋白水平。在药物代谢动力学研究发现放射标记的胆固醇 siRNA 结合物的半衰期为 95 min, 而游离的 siRNAs 的半衰期为 6 min。半衰期延长的原因可能是由于胆固醇与 siRNA 的这种结合促进 siRNA 与血清蛋白如白蛋白等的结合。在这个研究中需给予 50 mg/kg 的高剂量 siRNA, 必须继续研究进一步优化改良体内的最低有效剂量, 使给药方案能适合临床应用需要^[32]。

1.4 受体介导的 RNAi 体内输送体系

通过细胞表面特异的受体可以选择性地导入 siRNA 或 miRNA 等基因物质, 这些受体种类很多, 其中一个例子是存在于部分乳腺癌细胞或卵巢癌细胞表面的 Her2 受体。因为 Her2 受体只大量表达于癌细胞表面, 在正常组织细胞中表达甚少, 这也是癌细胞具有恶性表型的机制, 所以可以作为靶向导入的目标。另外, Her2 受体与配基或抗体结合后, 可通过细胞内吞作用循环到细胞内。研究证明, Her2 受体/抗体复合物被吞入细胞后, 复合体会被分离, 如果复合体同时结合了化疗药物或基因物质, 这些物质将会被吸收并释放到胞浆中。因此, Her2 抗体或配基携带的抗癌药物只攻击 Her2 高表达的癌细胞, 并能顺利把药物带入细胞内^[33]。

我们通过靶向 Her2 乳腺癌单链片段抗体融合蛋白证明了这种导入方法的细胞专一性, 也证明了这种导入方法可以广泛的应用于靶向其他细胞表面受体(图2)^[34]。由于单链片段抗体融合蛋白不是通过形成共价键的形式与 siRNA 结合, 所以可以用同一个融合蛋白导入多个不同的 siRNA。所有这些结果都

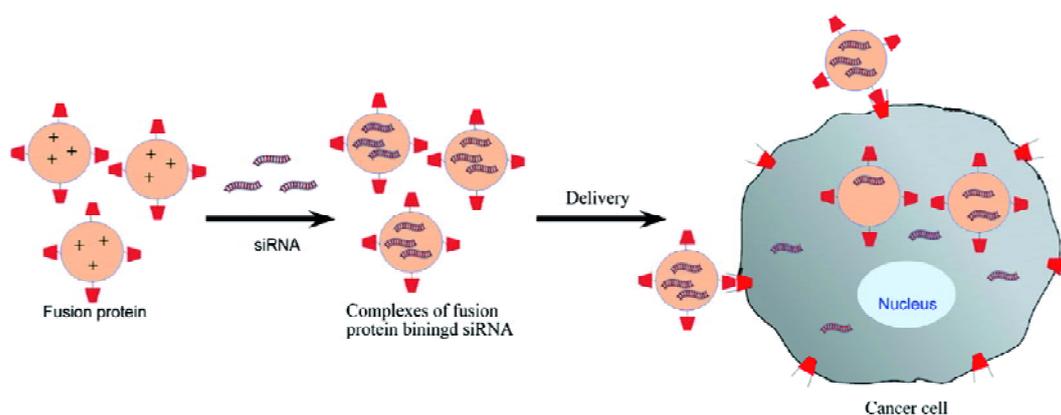


图2 融合蛋白与 siRNA 形成复合物并将 siRNA 靶向导入受体阳性的肿瘤细胞

证明了 siRNA 可以通过这个输送体系导入全身系统, 并且可以只靶向表达特殊表面蛋白的细胞。细胞专一性靶点既可减少起治疗效果所需要的 siRNA 量, 也可减少 siRNA 的潜在毒性。这些例子大概是目前开发以 siRNA 为基础的药物首次采用的全身导入策略, 其他用来导入 DNA 质粒进行基因治疗的方法, 如脂质体和免疫脂质体等适合导入质粒编码的 siRNA 前体——shRNA, 也可导入 siRNA 或 siRNA 前体。在一项肺癌肝转移的研究中, 反复注射含有直接针对 *bcl-2* 基因 siRNA 的脂质体(每次 10 mg/kg, 共给药 10 次), 可以抑制肿瘤生长。与此相似, 近来有研究利用包含有靶向细胞表面分子 siRNA 的纳米微粒进行全身导入, 研究出又一种新的 siRNA 导入方法。杨安钢研究组也成功构建并表达人抗 HBsAg 单链片段抗体融合蛋白用于 siRNA 的靶向输送, 体内外研究均证实这种融合蛋白能够结合并输送 siRNAs 和 siRNA 表达质粒到达 HBsAg 阳性细胞, 并有效抑制 HBV 基因的表达和病毒复制^[35]。

近年来, 另一个受体介导的核苷酸适配体输送体系在 siRNA 得到应用。该适配体是近年来发展起来的一类新型靶向识别分子, 由于其具有相对分子质量较小, 可化学合成、稳定性好、生物安全性高等优点, 受到了人们的广泛关注。最近, 核苷酸适配体输送体系在靶向 T 细胞的 siRNA 体内输送研究在动物模型中也得到证实^[36]。研究将一个由 CD7 特异的单链片段抗体和含有 9 个精氨酸的阳离子寡核苷酸短肽的结合物(scFvCD7-9R)应用于靶向输送 T 细胞的特异 siRNA 到人源化鼠。这种抗体结合物能够把抗病毒的 siRNAs 靶向输送到幼稚 T 细胞, 并抑制受感染鼠 HIV 病毒的复制。还有 Bunka 和 Stockley^[37]应用适配体和 siRNA 组成的嵌合体进行 siRNA 的靶向输送, 利用的是适配体与膜抗原的结合反应。有研究使用能够特异结合前列腺特异的膜抗原蛋白(PSMA) 的嵌合体进行靶向输送, 并随后经内吞到细胞内。研究发现嵌合体 RNA 能特异结合到 PSMA 的细胞, 而不结合到其他细胞。在体内 siRNA 输送研究中, 这种适配体和 siRNA 的嵌合体介导的 RNA 干扰可以安全的输送到体内, 并沉默目标基因的表达。

因为适配体能选择性结合到相应的蛋白和受体, 并且具有比较低的免疫源性, 其替代抗体的潜能有广阔的应用前景。然而, 这一嵌合体中核苷酸的稳定性应进一步提高以便于应用到体内输送治疗。还有, 适配体连接 siRNA 后不是以自然状态存在, 可

能在细胞内生物学过程和 RNA 干扰效应方面与自然状态的 siRNA 有所区别。仔细设计出稳定而有效的适配体和 siRNA 复合物将是未来发展的必要条件。

2 miRNA 的体内输送体系

miRNA 是基因表达的小分子 RNA, 与细胞发生发展分化增殖和凋亡等生物学过程密切相关。利用 miRNA 行 RNAi 的治疗策略是基于 miRNA 表达的高低变化明显影响细胞的生物学行为^[3]。miRNA 的导入方法大致上与 siRNA 的体内导入方法相似。适合 siRNA 体内输送的体系是否可以简单地套用到 miRNA 的体内输送, 仍需相关研究进一步验证。最近, 有研究用腺相关病毒导入 miRNA 的替代疗法治疗肝癌。该研究表明, 肝癌(HCC)细胞 miR-26A 的表达水平较正常细胞低。miR-26A 表达量的增加, 可通过调节 cyclins D2 和 E2 进而诱导细胞周期阻滞。通过腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)导入 miR-26A 到鼠肝癌模型体内可以抑制肝癌的增殖, 诱导肝细胞凋亡, 从而阻止肝癌恶化, 而且该方法没有明显的毒性^[38]。研究提示对于这种在正常组织中表达较高而在细胞病理状态下表达降低的 miRNA, miRNA 替代疗法是一种较好的治疗策略, 而且腺病毒这种导入方法没有明显的毒性。从更为技术性的角度看, 该研究报道的改良重组腺相关病毒载体(recombinant adeno-associated virus, rAAV)使 miRNA 的输送效率大大增加。rAAV 载体是目前惟一没有引起人类宿主任何病理反应的载体, 具有低免疫原性以及长期稳定表达携带的外源基因等特点, 已经成为神经系统疾病的新型基因治疗工具。就像其他 DNA 病毒, 腺相关病毒不会整合到基因组, 因此较少引起插入突变等风险。仍需进行更深入的研究进一步优化 miRNA 的输送系统, 尤其是要努力提高其在人体使用的安全性和有效性。

miRNA 参与基因转录后水平调控, 在肿瘤发生、发展、转归中起着重要作用, 成为肿瘤生物治疗领域一个新亮点。毫无疑问, 基于 miRNA 的体内输送策略和靶向调控治疗将是一个充满希望和挑战的研究领域。

3 RNA 干扰体内导入应用前景

从 RNA 干扰技术的发明到今年短短的 10 年时间里, RNA 干扰在疾病治疗方面取得了飞速的发展和令人瞩目的成就。最近几年国内外学者在包括 siRNA 和 miRNA 药物在内的核酸药物的研究和输送

方面取得了丰富的研究积累。我们在国际上最早自整体动物疾病模型中证实小干扰 RNA 的治疗效果后^[39], 还利用融合鱼精蛋白的单链片段抗体高效输送 siRNA^[34]。王均等在国际上率先开展利用生物相容性 PEG、PEI 和 PPEEA 组成高分子胶束纳米材料输送 siRNA 的研究^[28], 并发展了同时输送小干扰 RNA 和小分子化疗药物的高分子胶束纳米粒和高分子纳米凝胶载体系统, 在细胞和动物实验中初步证明了其协同作用。我们在癌症治疗的基因靶标及肿瘤干细胞的调控方面也有新的突破性的发现, 发现 miRNA-let-7 对乳腺癌干细胞具有调控作用^[6], 进一步地研究显示, 采用核酸药物载体, 导入 miRNA 分子可以调控癌干细胞的功能, 显示 miRNA 在癌症等重大疾病治疗中具有重要应用前景。这些研究为 RNA 干扰技术的临床应用奠定了良好的基础。这项技术迅速在临床上推广, 目前迫切需要解决的问题仍然是其给药载体和给药方式, 特别是适合全身系统给药的载体体系, 能将 RNAi 药物准确送入特定组织和细胞, 并发挥高效功能。

[参 考 文 献]

- [1] 宋尔卫. RNA 干扰的生物学原理与应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005
- [2] 宋尔卫. 小分子 RNA 的基础研究与临床应用[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2007
- [3] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(4): 259-69
- [4] Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, et al. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol*, 1998, 72(10): 8150-7
- [5] Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, et al. Transduction of human CD34⁺ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science*, 1999, 283(5402): 682-6
- [6] Yu FY, Yao HR, Zhu PC, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, 2007, 131(6): 1109-23
- [7] Hommel JD, Sears RM, Georgescu D, et al. Local gene knock-down in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med*, 2003, 9(12): 539-44
- [8] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, 409(1818): 363-6
- [9] Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*, 2004, 18(5): 504-11
- [10] Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, et al. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis*, 2003, 9(31): 210-16
- [11] Lingor P, Koeberle P, Kugler S, et al. Down-regulation of apoptosis mediators by RNAi inhibits axotomy-induced retinal ganglion cell death *in vivo*. *Brain*, 2005, 128(3): 550-8
- [12] Xia H, Mao Q, Eliason SL, et al. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med*, 2004, 10(8): 816-20
- [13] Juliano R, Alam MR, Dixit V, et al. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(12): 4158-71
- [14] Aigner A. Nonviral *in vivo* delivery of therapeutic small interfering RNAs. *Curr Opin Mol Ther*, 2007, 9(4): 345-2
- [15] Felgner PL, Holm M, Chan H. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*, 1989, 337(6205): 387-8
- [16] Kim HS, Song IH, Kim JC, et al. *In vitro* and *in vivo* gene transferring characteristics of novel cationic lipids, DMKD (*O, O*-dimyristyl-N-lysyl aspartate) and DMKE (*O, O*-dimyristyl-N-lysyl glutamate). *J Control Release*, 2006, 115(2): 234-41
- [17] Akinc A, Zumbuehl A, Goldberg M, et al. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(5): 561-9
- [18] Kim HR, Kim IK, Bae KH, et al. Cationic solid lipid nanoparticles reconstituted from low density lipoprotein components for delivery of siRNA. *Mol Pharm*, 2008, 5(4): 622-31
- [19] Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, et al. Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(8): 1002-7
- [20] Geisbert TW, Hensley LE, Kagan E, et al. Postexposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference. *J Infect Dis*, 2006, 193(12): 1650-7
- [21] Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, et al. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med*, 2005, 11(3): 263-70
- [22] Ma Z, Li J, He F, et al. Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(3): 755-9
- [23] Gary DJ, Puri N, Won YY. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *J Control Release*, 2007, 121(1-2): 64-73
- [24] Grayson AC, Doody AM, Putnam D, et al. Biophysical and structural characterization of polyethyleneimine-mediated siRNA delivery *in vitro*. *Pharm Res*, 2006, 23(8): 1868-76
- [25] Boussif O, Zanta MA, Behr JP. Optimized galenics improve *in vitro* gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther*, 1996, 3(12): 1074-80
- [26] Fischer D, von Harpe A, Kunath K, et al. Copolymers of ethyleneimine and-(2-hydroxyethyl)-ethyleneimine as tools to study effects of polymer structure on physicochemical and biological properties of DNA complexes. *Bioconjug Chem*, 2002, 13(5): 1124-33
- [27] Ahn CH, Chae SY, Bae YH, et al. Biodegradable poly(ethyleneimine) for plasmid DNA delivery. *J Control Release*,

- 2002, 80(1-3): 273-82
- [28] Sun TM, Du JZ, Yan LF, et al. Self-assembled biodegradable micellar nanoparticles of amphiphilic and cationic block copolymer for siRNA delivery. *Biomaterials*, 2008, 29(32): 4348-55
- [29] Kim B, Tang Q, Biswas PS, et al. Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes: therapeutic strategy for herpetic stromal keratitis. *Am J Pathol*, 2004, 165(6): 2177-85
- [30] Fougères AD, Vornlocher HP, Maraganore J, et al. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(6): 443-53
- [31] Chiu YL, Ali A, Chu CY, et al. Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells. *Chem Biol*, 2004, 11(8): 1165-75
- [32] Moschos SA, Jones SW, Perry MM, et al. Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT (48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. *Bioconjug Chem*, 2007, 18(5): 1450-9
- [33] Mamot C, Drummond DC, Greiser U, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted immunoliposomes mediate specific and efficient drug delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing tumor cells. *Cancer Res*, 2003, 63: 3154-61
- [34] Song E, Zhu P, Lee SK, et al. Antibody-mediated *in vivo* delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(6): 709-17
- [35] Wen WH, Liu JY, Qin WJ, et al. Targeted inhibition of HBV gene expression by single chain antibody mediated small interfering RNA delivery. *Hepatology*, 2007, 46(1): 84-94
- [36] Kumar P, Ban HS, Kim SS, et al. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. *Cell*, 2008, 134(4): 1-10
- [37] Bunka DH, Stockley PG. Aptamers come of age—at last. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4: 588-96
- [38] Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*, 2009, 137(6): 1005-17
- [39] Song E, Lee SK, Wang J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*, 2003, 9(3): 347-51