文章编号：1004-0374(2012)01-0089-06

碳纳米管作为siRNA转运载体的研究进展

刘　亮[1]，胡道德[1]*，陈文娟[1]，任吉存[2]
(1 上海交通大学附属第一人民医院，上海 200080；2 上海交通大学化学化工学院，上海 200240)

摘　要：随着人们对 RNA 干扰分子机理的研究愈加深入，siRNA 作为一种新的基因治疗药物极有可能为人类攻克癌症等难以治愈的疾病带来希望。然而，目前在 RNA 干扰应用中遇到的最大挑战就是如何有效地将 siRNA 导入靶细胞且不致引起严重的细胞毒性。碳纳米管在药物传递和基因传递等生物医学领域的潜在应用受到广泛关注；但要实现碳纳米管在基因治疗领域的应用，碳纳米管的功能化是关键，也是近几年来研究的重点。综述近年来碳纳米管作为 siRNA 转运载体在基因治疗领域的研究进展。

关键词：碳纳米管；siRNA；RNA 干扰；基因治疗
中图分类号：R318.08；R730.59；TB383　　　**文献标志码**：A

Recent advances in the study of the carbon nanotubes for small interfering RNA delivery

LIU Liang[1], HU Dao-De[1]*, CHEN Wen-Juan[1], REN Ji-Cun[2]
(1 Department of Clinical Pharmacology, Shanghai First People's Hospital, Medical College, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China; 2 College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: With increasing knowledge on the molecular mechanisms of endogenous RNA interference, small interfering RNAs (siRNAs), as innovative nucleic acid medicines, bring great hopes to cure some incurable diseases such as cancers. However, the main issue in RNA interference is to deliver siRNAs into the targeted cells without eliciting toxicity. Carbon nanotubes are expected to solve the aforementioned issue in the field of gene therapy especially in the application of RNA interference, which may be a revolutionary advancement in the area of biomedicine. However, the lack of surface functional groups greatly limits its application. So functionalization is needed. In recent years, much progress has been made in this area. In this review, we summarize the recent development of carbon nanotubes for small interfering RNA delivery in the area of gene therapy.

Key words: carbon nanotubes; small interfering RNA; RNA interference; gene therapy

RNA 干扰是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象。目前的研究已经初步阐明了 RNA 干扰的作用机制。首先，双链 RNA 进入胞浆后在 Dicer 酶的作用下加工裂解成 21~23 个核苷酸的双链小片段干扰 RNA (small interfering RNA，siRNA)。然后 siRNA 与 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA induced silencing complex , RISC) 结合形成 RISC/siRNA 复合物。在这个过程中或之后，解链酶在 ATP 供能的情况下将 siRNA 解链，有义链从复合物中离开被降解。随后，siRNA 的反义链引导 RISC 与 mRNA 分子互补结合，并降解 mRNA，最终导致特定基因表达的抑制 [1-2]。

虽然 siRNA 可由进入胞浆后的双链 RNA 裂解而得到，但人工合成的 siRNA 进入细胞后同样也可

收稿日期：2011-08-06；修回日期：2011-09-21
基金项目：上海市科委纳米技术专项基金(1052nm04000)
*通信作者：E-mail：shanghaiyao@sina.com

以发挥 RNA 干扰效应。将特定序列的 siRNA 导入哺乳动物细胞可以特异性剔除或关闭特定基因的表达，并能达到长期抑制靶基因的效果[3]。目前 RNA 干扰技术已被广泛用于探索基因功能和传染性疾病及恶性肿瘤的基因治疗领域；但 siRNA 存在着体内稳定性差、难以穿过脂双层构筑的细胞膜等问题[4]。因此，设计合理的运载 siRNA 进入胞浆的载药系统便成为当今国内外研究的热点。

Juliano 等[5]总结了目前 siRNA 在 RNA 干扰应用中所面临的困难。首先，siRNA 在机体生理环境下容易被核酸酶降解。与 DNA 不同，RNA 核糖 2' 位置存在羟基而非稳定的氢原子，RNA 更容易被核酸酶破坏分子结构而失活。其次，siRNA 分子相对较小，在发挥生理作用之前容易经肾脏快速排泄掉。最后，siRNA 难以穿透细胞膜进入胞浆，即使被吞噬也难以从内颗粒中释放出来。病毒、阳离子脂质体等是一些常用的转运 siRNA 进入胞浆的载体，但是在基因治疗和 RNA 干扰应用中仍然存在着一定的不足，例如病毒载体具有转染效率高的优点，但可能引发细胞发生突变及免疫反应[6]；脂质体对原代细胞、免疫细胞转染效率低[7]；采用化学基团对 siRNA 修饰的方法降低了 RNA 干扰效应等[8]。作为一种优异的纳米材料，碳纳米管在药物传递和基因传递等生物医学领域的应用受到广泛关注[9]。

1 碳纳米管的特点及应用

碳纳米管属于碳同素异形体的富勒烯家族，是由一系列碳原子经 sp^2 杂化形成的同轴中空管状结构。碳纳米管按石墨烯片的层数可分为：单壁碳纳米管 (single-walled nanotubes, SWNTs) 和多壁碳纳米管 (multi-walled nanotubes, MWNTs)。SWNTs 由单层六棱形碳环结构卷曲而成，直径为 0.4~2 nm，而 MWNTs 由数层到数十层不等同心卷曲的石墨片构成，直径为 2~100 nm[9]。碳纳米管具有奇异的物理化学性能，如独特的金属或半导体导电性[10-11]、极高的机械强度[12]和导热能力[13]以及较强的微波吸收能力[14]等，一经发现即受到物理、化学和材料科学界以及高新技术产业部门的极大重视。

近年来，碳纳米管在医学、分子生物学等领域的研究也日益增多[15-17]，表现出了独特的优势。首先，碳纳米管与配体 (生物大分子、有机小分子、表面活性剂等) 的连结简单易行。碳纳米管的原子都位于表面，具有非常大的比表面积 (理论上 SWNTs 比表面积可以达到 1 300 m^2/g)，使得碳纳米管与配体的作用更加充分。碳纳米管管壁存在高度离域化的大 π 键，因此具有共轭 π 键的分子更容易与其外壁形成 π-π 非共价键结合[18]；碳纳米管具有柔性的一维纳米结构，可以弯曲增加对配体的亲和力[17]。其次，碳纳米管具有非凡的进入细胞的能力，即使是对于原代细胞、免疫细胞甚至病毒。再次，碳纳米管具有较强且稳定的拉曼光谱信号以及在近红外光区能产生较强的荧光信号的性质，因此可以通过监测碳纳米管的拉曼光谱和荧光信号，追踪被碳纳米管携带的药物的体内代谢过程[9]。

2 碳纳米管的功能化及复合siRNA

虽然碳纳米管在医学、分子生物学等领域的应用有着巨大优势，但碳纳米管在绝大多数溶剂中的分散性不好、细胞毒性较高，而且表面缺少官能团大大限制了它的应用。因此，必须首先对碳纳米管进行改性与化学基团连接，即碳纳米管的功能化[9,19]。碳纳米管的功能化不仅可以提高碳纳米管的分散性、降低细胞毒性，而且是碳纳米管与 siRNA 相互作用组装碳纳米管 /siRNA 复合物的关键。功能化的碳纳米管应满足以下条件：具有高生物相容性、可降解性、低细胞毒性；具有较高的运载 siRNA 进入靶细胞的能力，并能保护 siRNA 免受核酶的降解；运载 siRNA 进入细胞后应较容易释放游离 siRNA，从而使 siRNA 与内生的 RISC 作用，发挥 RNA 干扰效应；全身用药时应具有一定的组织靶向性，避免被肝肾等器官快速清除[5,20]。

共价功能化和非共价功能化是制备功能化碳纳米管的两种常用方法[19]。共价功能化主要是通过酸处理后在碳纳米管端口与缺陷位置引入羧酸基团，再通过其他化学反应在碳纳米管表面接上其他所需基团，典型的方法有 1,3- 偶极环加成反应、酰胺化反应、酯化反应等。非共价功能化主要是利用表面活性剂或聚合物等分子的疏水部分与碳纳米管的疏水管壁相互作用进行复合，而表面活性剂或聚合物的亲水部分与溶剂作用，阻止碳纳米管的团聚，使其稳定分散于溶剂中。

功能化后的碳纳米管与 siRNA 形成复合物主要通过两种途径：非共价吸附和共价结合。下面将根据碳纳米管复合 siRNA 方式的不同对此分类介绍。

2.1 非共价吸附

非共价吸附是制备碳纳米管 /siRNA 复合物的常用方法，研究也最为广泛。静电作用、范德华力、

疏水相互作用都可以促使核酸缠绕或吸附于碳纳米管表面。

2.1.1　静电吸附

由于 siRNA 有负电性，带有正电的碳纳米管就能够通过静电作用吸附 siRNA。目前文献报道的使碳纳米管带正电的方法主要是在碳纳米管上引入氨基基团。一方面，氨基容易被质子化而带正电荷；另一方面，氨基作为一种极性基团的引入，可以提高碳纳米管在溶剂中的分散性。

Zhang 等 [21] 对 SWNTs 用氨基基团修饰，制得 SWNTs-CONH-$(CH_2)_6NH_3^+$，然后将其通过静电相互作用吸附复合 siRNA 以下调癌基因 mTERT 的表达。SWNTs/siRNA 复合物通过抑制癌基因 mTERT 的表达对三种小鼠癌细胞株的生长都起到了抑制作用，并且将复合物注入荷瘤小鼠后，不仅肿瘤的生长受到抑制，而且肿瘤的重量也显著降低。Yang 等 [22] 用同样方法对 SWNTs 进行处理，将 SWNTs 氨基化后与 SOCS1 siRNA 复合进行肿瘤免疫治疗。将 SWNTs/siRNA 复合物静脉注入荷瘤小鼠瘤内后，复合物可优先被树突状细胞、巨噬细胞等摄取而沉默细胞中的 SOCS1 基因，激发机体的免疫系统，从而控制和杀伤肿瘤细胞。Wang 等 [23] 也对 SWNTs 进行氨基化修饰，制得 SWNTs-CONH $(CH_2)_{12}CH_3$，然后将其在室温下与 Cyclin A2 siRNA 孵育，成功转染人慢性髓系白血病细胞 K562，并有效下调了癌基因的表达。Podesta 等 [24] 通过 1,3- 偶极环加成反应对 MWNTs 氨基化处理并复合 siTOX siRNA 以下调癌基因的表达，他们用人肺癌细胞 Calu 6 制备荷瘤小鼠模型，实验组瘤内注射 MWNTs/siRNA 复合物，对照组瘤内注射脂质体 DOTAP/siRNA 复合物，发现实验组小鼠的肿瘤生长得到有效抑制，且小鼠存活期得到明显延长。这也是首次在体内实验中把碳纳米管与阳离子脂质体两种转运 siRNA 载体的转运效率进行对比，并发现碳纳米管 /siRNA 复合物在延长荷瘤小鼠的生存期方面较脂质体 /siRNA 复合物更有效。他们认为这可能与碳纳米管携带 siRNA 采取了更温和的方式进入肿瘤细胞有关。以上这些研究都是用带有氨基的单链烷基链共价修饰碳纳米管，这些探索试验证明，碳纳米管加上氨基基团通过静电吸附作用复合 siRNA 是可行的。

基于 Podesta 等 [24] 成功对 MWNTs 进行氨基化修饰，并取得了理想的体内试验结果，Herrero 等 [25] 设想如果继续增加 MWNTs 上氨基数目，是否可以增强功能化的碳纳米管运载 siRNA 的效率，为此他们构建了树枝状大分子修饰的 MWNTs 作为 siRNA 的转运载体，即首先把聚乙二胺树枝状聚合物共价连接于 MWNTs 上，得到第一代树枝状聚合物修饰的 MWNTs (G1)。聚乙二胺树枝状聚合物存在较多氨基基团，可以增加 MWNTs 在水中的分散性。然后，他们继续提高聚合物上氨基数目得到第二代树枝状聚合物修饰的 MWNTs (G2)。研究发现与带有氨基的单链烷基链修饰的 MWNTs 相比，树枝状聚合物修饰的 MWNTs 复合 siRNA 进入 HeLa 细胞发挥 RNA 干扰效应的能力更强，并且 G2 转运 siNRA 的能力强于 G1。这说明提高碳纳米管上氨基的数目，可以提高碳纳米管运载 siRNA 的效率。这也提示我们选用合适的带有氨基基团的聚合物对碳纳米管修饰，对于提高 RNA 干扰效应是很有前途的应用。

聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 是一种新型阳离子多聚物基因载体，具有较强的核酸结合能力、细胞黏合能力和缓冲能力，因其“质子海绵”效应，无需溶酶体溶解肽的辅助作用，即可将内吞的核酸释放到细胞质中 [26-27]。Foillard 等 [28] 构建了 PEI (M_r = 600) 共价修饰的碳纳米管以复合 siRNA 并转染人脑胶质瘤细胞 U87luc，发现可以沉默靶基因的表达，沉默效率与脂质体相当，且远高于单独使用 PEI。而 Varkouhi 等 [29] 同样采用 PEI (M_r 2.5 × 10^4) 修饰的碳纳米管复合 siRNA，并转染人肺癌细胞 H1299，发现碳纳米管 /siRNA 复合物只能达到 20% 的靶基因沉默效率，而单独使用 PEI 可以达到 20%~30%，且细胞活性试验发现 PEI 修饰的碳纳米管的毒性较高，也就是说 PEI 对碳纳米管的修饰对于提高 RNA 干扰效应并没有起到积极作用。相似的方法得出相反的结论可能与使用不同相对分子质量的 PEI 有关，因为低相对分子质量的 PEI 毒性较低 [30]。另外转染细胞的不同也难以将两者进行简单比较。但是，这也提示我们在用 PEI 对碳纳米管修饰时选择适合的 PEI，对改性后的碳纳米管的运载能力和细胞毒性或许有重要影响。

值得一提的是 McCarroll 等 [31] 合成了一种由赖氨酸和脂类聚合的树枝状大分子材料 TOL7，构建了 TOL7 修饰的 SWNTs。一方面，TOL7 含有脂链可以通过疏水作用缠绕在碳纳米管侧壁上，而且脂链的缠绕提高了碳纳米管对细胞膜脂质双层的亲和性；另一方面，TOL7 亲水端带正电的赖氨酸可以吸附带负电的 siRNA，并提高碳纳米管的水分散性。体外细胞试验证明，TOL7 可以复合 Apo B siRNA，并能携带其进入小鼠肝细胞 FL83B 沉默靶

基因的表达，沉默效率与脂质体相当，而且细胞活性试验发现 TOL7 修饰的碳纳米管细胞毒性低。将 TOL7 修饰的碳纳米管与 siRNA 复合后经尾静脉注入小鼠体内，发现当用药量为 0.96 mg/kg 时，即可下调肝脏中靶基因的表达。研究也发现功能化的碳纳米管细胞毒性小，且没有引起机体明显的免疫反应。这是首次用脂质和氨基酸的聚合物对碳纳米管进行修饰，并且取得了理想的治疗效果。

2.1.2 疏水作用力吸附

siRNA 的碱基可以通过疏水作用力吸附于碳纳米管上，而亲水的核糖和磷酸基团向外朝向水中，因此在这种复合方式中，siRNA 对于碳纳米管既是修饰基团，又是被转运者 [19,32]。Bartholomeusz 等 [32] 采用这种方式复合 siRNA，直接将碳纳米管与 siRNA 进行简单的超声混合后制得碳纳米管 /siRNA 复合物，4℃条件下保存 30 d 后复合物在水中仍均匀分散，且维持 siRNA 的生理活性。通过给荷人胰腺癌小鼠注射碳纳米管 /HIF-1α siRNA 复合物，可以有效地干扰癌基因的表达并抑制小鼠肿瘤的生长。Ladeira 等 [33] 用羧基化的碳纳米管复合 InsP3R-Ⅱ siRNA，转染相较于肿瘤细胞更难转染的心肌细胞，可以达到 96% 的基因沉默效率，而这对于常规的转染试剂如脂质体是难以达到的。给碳纳米管加入羧基基团有三个作用 ：减少细胞毒性，增强复合后 siRNA 的稳定性，提高对 siRNA 的转载能力。与其他功能化修饰使碳纳米管带正电荷而通过静电吸附作用复合 siRNA 的方式相比，羧基化修饰的碳纳米管转染效率可能更高，这可能与其携带 siRNA 进入细胞后更容易释放游离的 siRNA 有关。

2.2 共价结合

共价结合是 siRNA 分子通过共价键连接于碳纳米管两端或是碳纳米管表面的修饰基团上。Kam 等 [34] 构建了一种基于 SWNTs 的 siRNA 运载系统。他们对 SWNTs 用末端带有氨基的聚乙烯二醇化的磷脂分子 (PL-PEG-NH_2) 修饰。PL-PEG-NH_2 通过范德华力和疏水作用力将 PL 上的疏水性烷基链吸附于 SWNTs 侧壁上，而亲水性的 PEG 外伸向水中以提高 SWNTs 的水溶性，末端氨基则通过二硫键与硫醇基修饰的 siRNA 连接。这种方法构建的复合物被靶细胞吞噬进入内涵体或溶酶体后，二硫键被破坏，释放出游离的 siRNA，转染 HeLa 细胞发现这种复合 siRNA 的方式具有较高的靶基因沉默效率，且基因沉默效率高于使用脂质体作为转染试剂。Liu 等 [7] 采用同样方法复合 CD4 siRNA、CXCR4 siRNA 并转染常规方法难以转染的 T 细胞和人外周血单核细胞，研究发现其基因沉默效率远高于使用脂质体。这种高运载效率与碳纳米管具有较高的比表面积可以复合大量的 siRNA 并高效运载其进入细胞，以及进入内涵体或溶酶体后，二硫键被破坏后可较易释放出游离 siRNA 有关。针对 T 细胞和 MAGI 细胞的细胞增殖试验以及细胞毒性试验也发现这种功能化碳纳米管的方法对细胞正常增殖影响小、细胞毒性低，而脂质体 lipofectamine2000 在高浓度时对 MAGI 细胞有轻微毒性 [35]。

3 碳纳米管的毒性

近年来，随着碳纳米管在生物医学领域的研究愈加深入，其生物安全性也逐渐受到人们的重视。在体外细胞试验中，研究发现碳纳米管对多种细胞都有细胞毒性，比如 ：Shvedova 等 [36] 发现 SWNTs 可致人角蛋白细胞内自由基增加，过氧化物聚集 ；Monteiro-Riviere 等 [37] 发现 MWNTs 可致人角蛋白细胞内促炎细胞因子白介素 -8 表达增加 ；Bottini 等 [38] 发现 MWNTs 在高浓度下可显著降低细胞活性并导致凋亡 ；Cui 等 [39] 发现 SWNTs 可以刺激 HEK293 细胞，下调与细胞黏附功能相关的基因和蛋白，导致细胞黏附能力降低。同时，SWNTs 可上调与细胞凋亡相关的基因 P16、Rb、P53，并使细胞停滞于 G_1 期，最终导致细胞凋亡等。动物试验中也观察到碳纳米管的毒性作用，如给小鼠气管内注入碳纳米管可致上皮样肉芽肿、间质性炎症以及致纤维化 [40-41] 等。但目前人们对碳纳米管的毒性研究结果不尽一致且存在广泛争议 [9,19]。一方面碳纳米管本身，如碳纳米管的种类、所含杂质、碳纳米管的长度等不同 ；另一方面功能化碳纳米管方式、功能化程度不同。此外，对于碳纳米管细胞毒性的研究尚缺少完备精确的评价标准。比如，碳纳米管的细胞水平和体内水平的毒性评价中使用的细胞株不同、受试动物的类型种别不同也是毒理性研究结果多样性的重要因素。尽管如此，目前研究倾向于认为提高碳纳米管在水中的分散性、稳定性可以降低碳纳米管的细胞毒性，提高其生物相容性 [7,42-46]。因此，碳纳米管的功能化方式便显得更为重要。

4 结语

RNA 干扰作为一种新的基因治疗方法近年来获得迅速发展，在很大程度上是因为其作为细胞内

源性基因表达调节物质的低毒性和特异性。由于碳纳米管具有极大的比表面积、狭长的管状结构等特性，有望开发出基于碳纳米管的基因治疗载体，解决目前在基因治疗领域尤其是RNA干扰应用中的难题。要实现碳纳米管在基因治疗领域的应用，碳纳米管的功能化是关键。

近年来人们已开发出多种功能化碳纳米管方法复合siRNA，并实现了靶基因的沉默，但是碳纳米管作为siRNA载体的研究目前多停留在细胞试验或动物试验阶段，离临床应用仍有很大距离。开发一种运载效率高、细胞毒性低的功能化碳纳米管的方法仍将是一件具有挑战性的工作。相信通过研究人员的不懈努力，一定会逐步解决碳纳米管在基因治疗领域应用中遇到的难题。

[参　考　文　献]

[1] Doi N, Zenno S, Ueda R, et al. Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. Curr Biol, 2003, 13(1): 41-6

[2] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. Nature, 2000, 404(6775): 293-6

[3] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature, 2001, 411(6836): 494-8

[4] Oh YK, Park TG. siRNA delivery systems for cancer treatment. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(10): 850-62

[5] 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

[6] Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. Gene Ther, 2004, Suppl 1: S10-7

[7] Liu Z, Winters M, Holodniy M, et al. siRNA delivery into human T cells and primary cells with carbon-nanotube transporters. Angew Chem Int Ed Engl, 2007, 46(12): 2023-7

[8] Hall AH, Wan J, Shaughnessy EE, et al. RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure-activity relationships. Nucleic Acids Res, 2004, 32(20): 5991-6000

[9] Cheung W, Pontoriero F, Taratula O, et al. DNA and carbon nanotubes as medicine. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62(6): 633-49

[10] Dai HJ, Javey A, Pop E, et al. Electrical transport properties and field-effect transistors of carbon nanotubes. NANO: Brief Report Rev, 2006, 1(1): 1-4

[11] Zhou X, Park JY, Huang S, et al. Band structure, phonon scattering, and the performance limit of single-walled carbon nanotube transistors. Phys Rev Lett, 2005, 95(14): 146805

[12] Kis A, Zettl A. Nanomechanics of carbon nanotubes. Philos Transact A Math Phys Eng Sci, 2008, 366(1870): 1591-611

[13] Kim P, Shi L, Majumdar A, et al. Thermal transport measurements of individual multiwalled nanotubes. Phys Rev Lett, 2001, 87(21): 215502

[14] Gui XC, Wang KL, Wei JQ, et al. Microwave absorbing properties and magnetic properties of different carbon nanotubes. Sci Chn: Ser E, 2009, 52(1): 227-31

[15] Chen RJ, Bangsaruntip S, Drouvalakis KA, et al. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(9): 4984-9

[16] Cherukuri P, Bachilo SM, Litovsky SH, et al. Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells. J Am Chem Soc, 2004, 126(48): 15638-9

[17] Liu Z, Tabakman S, Welsher K, et al. Carbon nanotubes in biology and medicine: *In vitro* and *in vivo* detection, imaging and drug delivery. Nano Res, 2009, 2(2): 85-120

[18] Liu Z, Sun X, Nakayama-Ratchford N, et al. Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery. ACS Nano, 2007, 1(1): 50-6

[19] Zhang Y, Bai Y, Yan B. Functionalized carbon nanotubes for potential medicinal applications. Drug Discov Today, 2010, 15(11-12): 428-35

[20] Aigner A. Nonviral *in vivo* delivery of therapeutic small interfering RNAs. Curr Opin Mol Ther, 2007, 9(4): 345-52

[21] Zhang Z, Yang X, Zhang Y, et al. Delivery of telomerase reverse transcriptase small interfering RNA in complex with positively charged single-walled carbon nanotubes suppresses tumor growth. Clin Cancer Res, 2006, 12(16): 4933-9

[22] Yang R, Yang X, Zhang Z, et al. Single-walled carbon nanotubes-mediated *in vivo* and *in vitro* delivery of siRNA into antigen-presenting cells. Gene Ther, 2006, 13(24): 1714-23

[23] Wang X, Ren J, Qu X. Targeted RNA interference of cyclin A2 mediated by functionalized single-walled carbon nanotubes induces proliferation arrest and apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells. Chem Med Chem, 2008, 3(6): 940-5

[24] Podesta JE, Al-Jamal KT, Herrero MA , et al. Antitumor activity and prolonged survival by carbon-nanotube-mediated therapeutic siRNA silencing in a human lung xenograft model. Small, 2009, 5(10): 1176-85

[25] Herrero MA, Toma FM, Al-Jamal KT, et al. Synthesis and characterization of a carbon nanotube-dendron series for efficient siRNA delivery. J Am Chem Soc, 2009, 131(28): 9843-8

[26] Grayson AC, Doody AM, Putnam D. Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery *in vitro*. Pharm Res, 2006, 23(8): 1868-76

[27] 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

[28] Foillard S, Zuber G, Doris E. Polyethylenimine-carbon nanotube nanohybrids for siRNA-mediated gene silencing at cellular level. Nanoscale, 2011, 3(4):1461-4

[29] Varkouhi AK, Foillard S, Lammers T, et al. siRNA delivery with functionalized carbon nanotubes. Int J Pharm, 2011, 416(2):419-25

[30] Zhang L, Hu CH, Cheng SX, et al. PEI grafted hyperbranched polymers with polyglycerol as a core for gene delivery. Colloids Surf B: Biointerfaces, 2010, 76(2): 427-33

[31] McCarroll J, Baigude H, Yang CS, et al. Nanotubes functionalized with lipids and natural amino acid dendrimers: a new strategy to create nanomaterials for delivering systemic RNAi. Bioconjug Chem, 2010, 21(1):56-63

[32] Bartholomeusz G, Cherukuri P, Kingston J, et al. *In vivo* therapeutic silencing of hypoxia-inducible factor 1 α (hif-1α) using single-walled carbon nanotubes noncovalently coated with siRNA. Nano Res, 2009, 2(4): 279-91

[33] Ladeira MS, Andrade VA, Gomes ER, et al. Highly efficient siRNA delivery system into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes. Nanotechnology, 2010, 21(38): 385101

[34] Kam NW, Liu Z, Dai H. Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing. J Am Chem Soc, 2005, 127(36): 12492-3

[35] Spagnou S, Miller AD, Keller M. Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. Biochemistry, 2004, 43(42): 13348-56

[36] Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, et al. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. J Toxicol Environ Health A, 2003, 66(20): 1909-26

[37] Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, et al. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. Toxicol Lett, 2005, 155(3): 377-84

[38] Bottini M, Bruckner S, Nika K, et al. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. Toxicol Lett, 2006, 160(2): 121-6

[39] Cui D, Tian F, Ozkan CS, et al. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. Toxicol Lett, 2005, 155(1): 73-85

[40] Lam CW, James JT, McCluskey R, et al. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. Toxicol Sci, 2004, 77(1): 126-34

[41] Muller J, Huaux F, Moreau N, et al. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 207(3): 221-31

[42] Sayes CM, Liang F, Hudson JL, et al. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity *in vitro*. Toxicol Lett, 2006, 161(2): 135-42

[43] Chen X, Tam UC, Czlapinski JL, et al. Interfacing carbon nanotubes with living cells. J Am Chem Soc, 2006, 128(19): 6292-3

[44] Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, et al. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. Nano Lett, 2006, 6(7): 1522-8

[45] Zhou H, Mu Q, Gao N, et al. A nano-combinatorial library strategy for the discovery of nanotubes with reduced protein-binding, cytotoxicity, and immune response. Nano Lett, 2008, 8(3): 859-65

[46] Bumcrot D, Manoharan M, Koteliansky V, et al. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. Nat Chem Biol, 2006, 2(12):711-9