

DOI: 10.13376/j.cbls/2014057

文章编号: 1004-0374(2014)04-0392-08

## 介导siRNA传递的非病毒载体及其研究进展

李泽豪<sup>1</sup>, 任小元<sup>1</sup>, 王世兵<sup>1</sup>, 孔祥东<sup>1,2\*</sup>

(1 浙江理工大学生命科学院生物材料研究所, 杭州 310018; 2 浙江理工大学材料与纺织学院, 教育部先进纺织材料和制备技术重点实验室, 杭州 310018)

**摘要:** RNA 干扰 (RNAi) 是一种疾病治疗的新途径, 其中小干扰 RNA (siRNA) 可破坏 mRNA 的完整性, 抑制疾病相关基因的表达, 而开发安全有效的 siRNA 传递载体仍面临巨大挑战。相较于病毒载体系统, 非病毒载体系统安全性高、负载量大、生物相容性好, 更适用于疾病治疗。综述了可用于 siRNA 传递的一些非病毒载体 (包括脂质体、细胞穿膜肽、水凝胶、树枝状大分子、磷酸钙、碳纳米管等), 阐述了载体与 siRNA 的结合, 靶向疾病组织或细胞并诱导特异基因沉默的机制、瓶颈问题等。

**关键词:** siRNA; 非病毒载体; 基因治疗

**中图分类号:** Q74; R945 **文献标志码:** A

## Research advances in non-viral-based siRNA delivery systems

LI Ze-Hao<sup>1</sup>, REN Xiao-Yuan<sup>1</sup>, WANG Shi-Bing<sup>1</sup>, KONG Xiang-Dong<sup>1,2\*</sup>

(1 Institute of Biomaterials, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;  
2 Key Laboratory of Advanced Textile Materials and Manufacturing Technology of Ministry of Education, College of Materials and Textile, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** RNA interference (RNAi) is a new mechanism triggered by small interfering RNA (siRNA), which represents a promising gene therapy strategy by destroying the integrity of the complementary mRNA in the cytoplasm, causing sequence-specific posttranscriptional gene silencing. Systemic siRNA therapy is hampered by inefficient delivery of its carrier. Compared with viral-based delivery systems, non-viral-based delivery systems are safer, and have higher load, greater cellular compatibility, so they are more suitable for clinical application. In general, the non-viral carriers include cation lipid-based carriers, cation cell-penetrating peptides, dendrimers, cation polymers, inorganic nanomaterials. This review describes the recent types and advantage in siRNA delivery using non-viral-based siRNA delivery systems.

**Key words:** siRNA; non-viral carriers; gene therapy

RNA 干扰 (RNAi) 可引起转录后基因沉默<sup>[1]</sup>, 是一种用于疾病治疗的新途径。1998 年, Fire 等<sup>[2]</sup>首次发现短双链 RNA (dsRNA) 可诱导秀丽隐杆线虫基因沉默; 2001 年, Elbashir 等<sup>[3]</sup>在哺乳动物细胞中也发现了 RNAi 现象。dsRNA 由 21~23 个核苷酸组成, 又称之为小干扰 RNA (siRNA), 可通过碱基互补配对原则, 与相应的信使 RNA (mRNA) 结合, 破坏 mRNA 的翻译功能, 达到基因沉默目的<sup>[4]</sup>。但是研究发现, siRNA 相对分子质量较大 (约  $1.3 \times 10^4$ ), 且带有高负电荷, 难以穿过细胞膜实现特定基因沉默。另一方面, siRNA 进入细胞后, 易被胞

内酶降解<sup>[5]</sup>, 降低基因沉默功能。为介导 siRNA 进入细胞质, Hagstrom 等<sup>[6]</sup>在小鼠肢体远端静脉注射大量裸 siRNA, 瞬间用止血带捆绑此肢体, 使 siRNA 扩散到组织中, 发现有特异基因沉默性能。

收稿日期: 2013-08-31; 修回日期: 2013-10-12

基金项目: 浙江理工大学 521 人才培养计划; 浙江省自然科学基金项目 (Y207217); 国家自然科学基金项目 (51272236, 51002139, 51172207)

\*通信作者: E-mail: kongxiangdong@gmail.com; Tel: 0571-86843196

然而, 这种方法需要大量 siRNA, 且会对肢体造成伤害。Golzio 等<sup>[7-8]</sup>使用电介导 siRNA 进入小鼠肿瘤, 发现有基因沉默效果, 并且没有对组织造成伤害, 但是 siRNA 的介导量低、沉默效率低。不借助载体介导 siRNA 的胞内传递, 存在 siRNA 用量大、沉默效率低、肢体伤害大等缺陷, 因此, 载体介导 siRNA 技术是目前研究的主要方向。

siRNA 和 siRNA 载体是实施基因沉默的两大因素, 其中载体的安全性和有效性是实现基因沉默并用于疾病治疗的成败关键<sup>[1-2]</sup>。载体系统可分为两大类: 病毒载体系统和非病毒载体系统。病毒载体系统主要是改良某些病毒以除去病原性, 并保留其转染细胞, 将外源遗传物质转入宿主细胞的能力。病毒型载体具有高转染效率, 但存在严重的机体免疫反应、潜在的体内病毒复制、生产成本高、不能反复应用、应用范围窄、不能携带多重基因或大片段基因等缺点, 而非病毒载体因高负载率、结构稳定、低细胞毒性、无免疫原性、便于保存等优势受到了高度关注<sup>[1,5]</sup>。

siRNA 的载体系统分为两大类: 病毒载体系统有腺病毒、慢病毒、逆转录病毒等; 非病毒载体的种类有很多, 大致可分为阳离子脂质体<sup>[9-11]</sup>、阳离子细胞穿膜肽<sup>[12-14]</sup>、树枝状大分子(树枝状环糊精<sup>[15]</sup>、碳硅烷树枝状大分子<sup>[16]</sup>等)、阳离子聚合物(PEI<sup>[17]</sup>、水凝胶<sup>[18]</sup>、壳聚糖<sup>[19]</sup>等)和纳米无机材料(磷酸钙<sup>[20]</sup>、石墨烯<sup>[21]</sup>、碳纳米管<sup>[22]</sup>、纳米金<sup>[23]</sup>、碳酸钙<sup>[24]</sup>等)。阳离子脂质体是最早研究的非病毒载体, 具有高效的转染效率, 但对细胞毒性较大; 阳离子细胞穿膜肽是由氨基酸组成的多肽, 可携带药物穿透细胞膜, 进入细胞质; 树枝状大分子具有多分枝, 更便于化学改性和功能化, 应用范围广泛; 阳离子聚合物包含范围广, 涉及物质多, 是非病毒载体中种类最多的一类载体; 纳米无机材料应用于 siRNA 的传递在近些年受到广泛关注, 这得益于它具有高负载率、良好的生物相容性和生物降解性。siRNA 非病毒载体是当前的研究热点之一, 目前对 siRNA 载体的研究报道已有很多, 但是对各类非病毒载体的详细分类和描述依旧缺乏, 本文就目前研究报道过的各类非病毒载体进行综述, 并就其发展趋势进行综合分析。

## 1 用于siRNA传递的非病毒载体及其分类

### 2.1 阳离子脂质体

阳离子脂质体载体是人工合成的脂双层分子,

由阳离子头部、连接键和疏水烃尾等 3 部分组成<sup>[25]</sup>, 它通过带正电荷的阳离子头部与带负电荷的 siRNA 相互结合, 将 siRNA 封装于脂双层分子中, 运输到细胞内, 保护 siRNA 免受核酸酶的降解, 实现与靶向 mRNA 结合<sup>[26]</sup>, 如 Basha 等<sup>[9]</sup>合成的 4 种阳离子脂质纳米颗粒 DLinDAP、DLinDMA、DLinK-DMA 和 DLinKC2-DMA。他们用这 4 种脂质纳米颗粒负载抑制磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 表达的 siRNA 靶向抗原呈递细胞, 分析比较了 siRNA 在主骨髓巨噬细胞和树突细胞中的摄取、传递和基因沉默性能, 认为脂质纳米颗粒负载 siRNA 是治疗免疫相关疾病的潜在工具。Santel 等<sup>[10]</sup>将阳离子脂质 AtuFECT01、中性 DPhyPE 和 DSPE-PEG 以摩尔比 50/49/1 混合, 得到一种新型脂质体, 通过显微操作将 siRNA<sub>CD31</sub>-脂质体传递到肿瘤内皮细胞, 靶向血小板-内皮细胞黏附分子 CD31 mRNA, 可抑制肿瘤的生长。为保护 siRNA 免于血清酶的降解, Kim 等<sup>[11]</sup>以阳离子 bPEI ( $M_r = 1.8 \times 10^3$ )、疏水脂质和胆固醇甲酰氯合成一种水溶性脂质体, 可负载 siRNA<sub>VEGF</sub> 安全穿过血管, 靶向人前列腺癌 PC-3 细胞, 抑制 VEGF 的合成, 减缓肿瘤的生长。

阳离子脂质体的表面结构不稳定, 会与负载的 siRNA 发生交联或融合, 破坏 siRNA 完整性, 减弱沉默效率。Rothdiener 等<sup>[27]</sup>以 PEG 包裹脂质体, 稳定脂质体的表面结构, 再以 PEI 修饰, 负载 siRNA 靶向 CD33- 阳性肿瘤细胞, 发现 siRNA 保持完整, 可减少白血病集落生长(白血病自我更新的特征)。Matsui 等<sup>[28]</sup>使用硅化合物通过溶胶过程使含季铵脂质表面硬化, 得到一种表面稳定、具有病毒尺寸的陶瓷脂质体, 这种脂质体与 siRNA 不发生融合和交联, 保证了 siRNA 的结构完整性, 可沉默外源性和内源性基因。为进一步增加 siRNA 的转染效率, Pierrat 等<sup>[29]</sup>用非离子型表面活性剂 Triton X-100 (TX100) 共价连接 1,2- 二油酰基磷脂酰胆碱 (DOPC) 的磷酸基团, 合成一种具有层状结构的阳离子脂质体 TX100-DOPC, 它提高了对 siRNA 的负载能力, 并且 TX100 对磷脂的活化可增强细胞对 TX100-DOPC 的亲和能力, 提升 siRNA 的转染效率。

### 2.2 阳离子细胞穿膜肽

阳离子细胞穿膜肽是一类由氨基酸组成的可穿透细胞膜的小分子多肽, 它能够携带药物穿透细胞膜, 到达细胞质<sup>[30]</sup>。阳离子细胞穿膜肽的种类很多, 包括 Arg-Gly-Asp (RGD) 肽、线粒体穿透肽、嵌合

肽等,一般都含有大量带正电荷的精氨酸、赖氨酸、组氨酸残基<sup>[31]</sup>,可与带负电荷的 siRNA 高效结合。Wang 等<sup>[32-33]</sup>用包含组氨酸残基的多肽载体负载靶向转录因子 HIF-1 $\alpha$  的 siRNA 进行小鼠腹腔注射,沉默 HIF-1 $\alpha$  基因表达,显著抑制小鼠肿瘤增长。为提高穿膜肽对 siRNA 的传递效率,Leng 等<sup>[34]</sup>以组氨酸和赖氨酸多肽载体负载 siRNA <sub>$\beta$ -gal</sub>,发现载体复杂度是影响 siRNA 传递的重要因素,因此,他们合成一种八终端分枝和单一组氨酸游离的高复杂度多肽载体,增加对 siRNA 的负载量,显著提升 siRNA 的传递效率。

阳离子细胞穿膜肽是一种小分子阳性物质,可快速穿透细胞膜,但会对磷脂双分子层造成损害,产生细胞毒性。Jafari 等<sup>[12]</sup>合成一种两亲性氨基酸配对肽 C6 作为 Cy3 标记的 siRNA 传递载体,两亲特性可保护磷脂双层的结构完整性,实现低毒性和高 siRNA 胞内转染效率。作为外源物质,穿膜肽进入胞内会引起免疫原性,对细胞的正常生长造成影响。Won 等<sup>[35]</sup>制备一种环境敏感载体,利用 siRNA/聚-(寡核苷酸-D-精氨酸)聚合物在胞质中的解凝聚,在体内外可增强 siRNA<sub>VEGF</sub> 的传递效率,沉默 VEGF 表达,抑制肿瘤的生长,并且聚-(寡核苷酸-D-精氨酸)在胞质中可迅速降解,有效减少细胞毒性和免疫原性。Ryu 等<sup>[13]</sup>在水溶液中合成一种精氨酸-缬氨酸多肽(RV 肽),该多肽以疏水性缬氨酸为核心、阳离子精氨酸为外壳,组装成纳米胶粒,与 siRNA<sub>VEGF</sub> 形成稳定复合物,并能保护细胞膜完整性,显著减少癌细胞内 VEGF 的增加。Tanaka 等<sup>[36]</sup>合成一种硬脂酰肽(STR),包含 Cys、Arg、His 残基,通过 Cys 完成二硫化物交联,结构稳定,且对细胞无毒副作用,可与 siRNA<sub>VEGF</sub> 高效结合,抑制癌细胞内 VEGF 的表达,具有显著抑癌作用。

siRNA 的瘤内运输要求载体具有靶向功能,对穿膜肽进行修饰可实现载体/siRNA 的靶向选择性。Liu 等<sup>[14]</sup>使用复乳法合成聚乙二醇单甲醚-聚(D,L 丙交酯-co-乙交酯)-聚 L-赖氨酸(mPEG-PLGA-b-PLL)镶嵌复合物纳米颗粒(NPs),它可与荧光标记的 siRNA 高效结合,小鼠静脉注射后,通过荧光图像观察发现 siRNA 在体内可实现肿瘤部位富集;Schiffelers 等<sup>[37-38]</sup>以 PEI 和 PEG 修饰 Arg-Gly-Asp(RGD)肽配体,用来传递抑制血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2)表达的 siRNA,发现此复合物可被肿瘤组织高效选择性摄取,沉默 VEGFR2 表达,抑

制肿瘤血管发生和肿瘤生长。

## 2.3 树枝状大分子

树枝状大分子是一种高度分化、有结构空腔、具有多种表面基团、可高效吸附药物的纳米高分子载体。在多种非病毒载体中,树枝状载体以其独特的分子结构和多价位表面结构引起人们的关注<sup>[39]</sup>,其中对树枝状环糊精(CDE)和碳硅烷树枝状大分子(CBD)的研究最具代表性。

### 2.3.1 树枝状环糊精

环糊精(CDE)是一类由  $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖单元组成的“锥筒”状低聚糖,筒内壁因葡萄糖分子上 3-C、5-C 位上的氢原子和成苷的氧原子结构而呈疏水性,筒外壁因 2-C、3-C、6-C 位上的羟基结构而呈亲水性,故 CDE 具有两亲性<sup>[40]</sup>。树枝状环糊精以环糊精为核心,树枝状聚合物为外壳,既具有树枝状聚合物较小的体积,又具有环糊精的内腔,可封装药物进行靶向运输。Tsutsumi 等<sup>[15,41]</sup>使用聚酰胺-胺型树枝状高分子聚合物(PAMAM)缀合  $\alpha$ -环糊精( $\alpha$ -CDE)作为荧光素酶基因 siRNA 载体,发现此复合物可与 siRNA 紧密结合,阻止 siRNA 在血清中的降解,进入细胞后只分布于细胞质中,表现出高效的 RNAi 性能。为提高 siRNA 的转染效率和  $\alpha$ -CDE 靶向特异性,Arima 等<sup>[42]</sup>用叶酸对  $\alpha$ -CDE 进行不同程度的修饰,制备了叶酸-PEG- $\alpha$ -CDEs 复合物,用它负载 siRNA 靶向叶酸受体过表达的癌细胞,发现该复合物通过内吞作用进入细胞内,转染效率得到提高;通过静脉注射和瘤内注射,复合物会在肿瘤组织部位富集,并且不产生干扰素和炎症反应。

家族性淀粉多样神经病(FAP)与甲状腺运载蛋白(TTR)相关,FAP 常由淀粉样蛋白 TTR(ATTR)引起,而 ATTR 主要在肝细胞中表达。为治疗 FAP,Hayashi 等<sup>[43]</sup>合成一种乳糖酰化  $\alpha$ -环糊精树枝状大分子(Lac- $\alpha$ -CDE),作为 siRNA 载体靶向特异肝细胞 TTR 基因,结果发现 TTR 表达显著受到抑制,并且 siRNA 复合物可保护细胞膜结构完整性,不产生细胞毒性,对机体无损害,有可能对 FAP 的治疗提供帮助。

### 2.3.2 碳硅烷树枝状大分子

碳硅烷树枝状大分子(CBD)是一种阳离子树枝状大分子,在水中具有稳定的碳-硅分支结构和缓慢水解的氧-硅分支结构,它的双重结构性能可用来介导 siRNA 的传输<sup>[16,44]</sup>。以碳硅烷树枝状大分子作为 siRNA 载体的研究主要集中在艾滋病毒



(HIV) 上, 如 Ionov 等<sup>[16]</sup>开展了树枝状大分子载体负载 siRNA 治疗艾滋病的研究, 他们利用大单层囊泡 (LUV) 阳离子碳硅烷树枝状大分子 (CBD) 和抗 HIV siRNA 复合物的电荷依赖作用, 高效负载 siRNA 进行特定基因沉默, 获得良好的初期效果。Weber 等<sup>[44]</sup>合成的端氨基碳硅烷树枝状聚合物 (CBS) 可通过静电相互作用结合 siRNA, 保护 siRNA 免受核糖核酸酶的降解。CBS/siRNA 聚合物对外周血单核细胞 (PBMC) 和淋巴细胞系 SupT1 转染结果表明, 它可沉默 GAPDH 的表达, 并且减少 HIV 在 SupT1 和 PBMC 中复制, 为 HIV 治疗提供可能。

## 2.4 阳离子聚合物

阳离子聚合物载体包含的范围最广, 利用它作为载体开展 RNAi 研究的报道最多, 在此主要介绍聚乙烯亚胺 (PEI)、水凝胶、壳聚糖等。

### 2.4.1 聚乙烯亚胺

聚乙烯亚胺 (PEI) 是一种水溶性高分子聚合物, 呈黏稠状, 有吸湿性, 在水溶液中显阳性, 可通过静电吸附与 siRNA 高效结合, 进入细胞质, 发挥基因沉默功能。Mimi 等<sup>[17]</sup>合成一种明胶核心和 PEI 外壳的两性纳米凝胶颗粒, 在水溶液中稳定且带正电荷, 在 N/P 比低至 5:1 时可完全吸附 siRNA, 保护 siRNA 免受酶促降解, 可抑制人精氨酸琥珀酸合成酶 1 的基因表达达 70%。Endres 等<sup>[45]</sup>合成聚乙二醇 (PEG)- 聚 ( $\epsilon$ -己内酯)-PEI 颗粒, 该颗粒尺寸小、电荷分布均匀、胶体稳定性好, 提高了 siRNA 保护作用 and 转染效率。Chen 等<sup>[46]</sup>用疏水聚 ( $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸盐) (PBLG) 合成超分支聚乙烯亚胺 (PEI-PBLG) 复合物, 可高效负载 siRNA 转染细胞, 沉默荧光素酶基因表达。Goyal 等<sup>[47]</sup>用 1,4-丁二醇缩水甘油醚 (BDE) PEI 交联合成线性 PEI 球形纳米颗粒 (LPN), 以 GFP 标记的 LPN/siRNA 在小鼠脾脏中有高效表达。Kang 等<sup>[48]</sup>使用支链淀粉包裹 PEI/siRNA 混合物, 通过尾部静脉注射进入小鼠体内, 发现支链淀粉的加入可有效减轻 PEI 对细胞和组织的毒副作用, 降低小鼠死亡率, 增加转染效率。Zintchenko 等<sup>[49]</sup>通过丙烯酸乙酯-伯胺的乙酰化作用, 对分枝状 PEI 进行修饰, 制备了一系列无毒衍生物, 具有高效的 siRNA 靶向基因沉默效率。

### 2.4.2 水凝胶

水凝胶是一种以水为分散介质的交联聚合物, 为一种高分子网状结构, 在水中保持稳定、体内生物相容性好、可降解性高。对水凝胶进行表面阳离子修饰, 可作为 siRNA 的运输载体, 如 Nuhn 等<sup>[18]</sup>

在极性非质子溶剂中, 以全氟苯基甲基丙烯酸作为活酯单元, 聚合三乙二醇-甲基醚甲基丙烯酸酯, 合成一种共价稳定的纳米水凝胶颗粒, 此颗粒可与带荧光 siRNA 紧密结合, 穿透细胞膜, 进入细胞内。Gary 等<sup>[50]</sup>使用镶嵌聚合物 PEG- 聚 (n-丙烯酸丁酯)-聚 [2-(二甲胺基) 乙基丙烯酸甲酯] (PEG-PnBA-PDMAEMA) 组成水凝胶载体, 负载 siRNA<sub>GAPDH</sub>, 在体外高效沉默肿瘤细胞中 GAPDH 的表达, 在体内使 siRNA 在肿瘤部位得到有效富集。Mao 等<sup>[51]</sup>使用单甲氧聚乙二醇-聚 (c-己内酯) 和聚 (2-氨基乙烯磷酸) 自组装成凝胶束纳米粒子 (MNPs), 这是一种两性亲离子镶嵌聚合物, 可高效负载靶向酸性酰胺酶基因表达的 siRNA, 在体内、外实现肿瘤细胞的生长抑制。Polo 样激酶 1 (plk1) 可调节卵巢癌细胞周期, 并且在很多癌细胞中的表达上调。Benoit 等<sup>[52]</sup>以甲基丙烯酸二甲胺乙酯 (pDMAEMA)、甲基丙烯酸丁酯 (pDdB) 共镶嵌聚合阳离子胶束为核心, 以苯乙烯-马来酸酐无规共聚物 (pSMA) 为外壳, 合成 pH- 应答水凝胶聚合物, 吸附 siRNA 形成三元复合物, 传递 siRNA 沉默 plk1 表达, 显著抑制肿瘤生长。

### 2.4.3 壳聚糖

壳聚糖是甲壳素脱乙酰化的产物, 是一种富含游离氨基的多糖, 具有良好的生物相容性和生物降解性。水溶性壳聚糖在水溶液中显阳性, 可吸附并介导 siRNA 的运输传递, 如 Luo 等<sup>[19]</sup>耦合沙丁胺醇 (一种  $\beta_2$ -肾上腺素活性剂) 到壳聚糖上, 负载 GFP-siRNA 靶向含有特异性  $\beta_2$  肾上腺受体的肺细胞, 提升 siRNA 的特异靶向性, 在体内外显著增强基因沉默效率。Raviña 等<sup>[53]</sup>制备了玻璃酸 (HA)、壳聚糖-g-PEG (CS-g-PEG) 纳米颗粒, 高效负载 siRNA 进入细胞内, 以低毒性实现转录因子 Snail 1 的基因表达沉默。

## 2.5 纳米无机材料

### 2.5.1 磷酸钙

磷酸钙 (CaP) 是骨骼、牙齿中的主要成分之一, 具有优异的生物相容性和生物降解性<sup>[54]</sup>, 以 CaP 作为 siRNA 的胞内传输载体, 可保护细胞膜结构完整性, 并且 CaP 在胞内可迅速降解, 不产生细胞毒性和免疫原性。Zhang 等<sup>[20]</sup>合成一种表面带正电荷的 CaP 纳米颗粒, 它具有优异的物理化学和生物特性, 通过静电吸附作用负载 siRNA 穿透细胞膜, 显著抑制基因表达。但是磷酸钙纳米颗粒自身的表面正电位低, 对 siRNA 的负载量小, 沉默效率低下。

对磷酸钙纳米颗粒进行表面阳离子修饰,增大 siRNA 负载量,提升 siRNA 转染效率是众多研究的重点,如 Klesing 等<sup>[55]</sup>制备了一种功能磷酸钙——羟基磷灰石 (HAP) 纳米棒,用 PEI 进行表面阳离子修饰,提高了 siRNA 负载量,显著提升转染效率,且对细胞无毒性作用。Kakizawa 等<sup>[56]</sup>通过自关联组装合成聚乙二醇-聚天冬氨酸-磷酸钙 (PEG-PAA-CaP),它具有优异的胶体稳定性,对 siRNA 的包封率高达 100%,在胞内的降解速度缓慢,可有效完成 siRNA 缓释。Zhang 等<sup>[57]</sup>在 CaP 合成反应体系中加入  $Mg^{2+}$ ,钙离子和镁离子的交换使原子结构扭曲,减缓颗粒的生长速度,可提高 siRNA-CaP 的转染和沉默效率。Gu 等<sup>[58]</sup>和 Yang 等<sup>[59]</sup>将 HAP 携带 *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸受体 2B 亚基-siRNA<sub>NR2B</sub> (NR2B-siRNA<sub>NR2B</sub>) 注射到小鼠蛛网膜下腔中,降低福尔马林引起的强直期疼痛反应,减少 NR2B 蛋白在脊髓的表达量,有效减少小鼠痛苦。Stat3 对肿瘤的生长不可或缺,Liang 等<sup>[60]</sup>用  $CaCl_2$  修饰的 HAP 携带 si-Stat3 注射到小鼠肿瘤中,发现 Stat3 表达量和肿瘤的生长明显受到抑制。

### 2.5.2 石墨烯

石墨烯是一种由碳原子构成的单层片状结构的新材料,只有一个碳原子的厚度,是已知材料中最薄的,有优异的物化、电子、光学特性。利用石墨烯的特性,对石墨烯进行表面阳离子修饰,作为 siRNA 运输载体,有很大的发展前景。Yin 等<sup>[21]</sup>用 PEI 和 PEG 修饰的石墨烯氧化物 (GO-PEI-PEG) 携带 si-Stat3,靶向小鼠恶性黑色素瘤,可下调 Stat3 水平,肿瘤生长衰退、重量减少。Feng 等<sup>[61]</sup>通过 PEI、PEG 连接氧化石墨烯,得到一种超小尺寸、生理稳定、双功能化纳米氧化石墨烯 (NGO-PEG-PEI),其具有优异的转染性能和低毒性;在低功率 NIR 激光辐射下,发现 NGO-PEG-PEI-siRNA 的细胞膜穿透率增加,siRNA 的胞内摄取率得到提升,且不对细胞膜造成实质伤害。Yang 等<sup>[62]</sup>使用 PEG 和叶酸修饰石墨烯 (GO),负载人端粒酶逆转录酶 (hTERT) siRNA 转染 HeLa 细胞,可抑制 hTERT mRNA 和蛋白的表达。乳腺癌的多药抗性 (MDR) 与 MicroRNA-21 (miR-21) 的过表达有关。Zhi 等<sup>[63]</sup>合成一种氧化石墨烯纳米复合物,介导阿霉素 (ADR) 和 miR-21-siRNA (anti-miR-21) 靶向乳腺癌细胞,发现氧化石墨烯复合载体可明显抑制 miR-21 的表达,增强阿霉素在抗药细胞中的摄取,对耐药细胞产生更大的杀伤作用。

### 2.5.3 碳纳米管

碳纳米管 (CNTs) 是一种由六边形碳环结构单元组成的层状中空结构纳米材料,通过对碳纳米管改性或功能化,可用来负载 siRNA 穿过细胞质膜,实现基因的内化表达。Podesta 等<sup>[64]</sup>用功能化碳纳米管携带 siRNA<sub>FOX</sub>,注入人肺癌移植模型体内,发现可以诱发瘤块的广泛坏死,抑制肿瘤的生长。Ladeira 等<sup>[22]</sup>将 siRNA 负载到一种羧基化单臂碳纳米管 (SWCNTs) 中,这种 SWCNT-siRNA 无特异免疫毒性、转染效率高、转染范围广,在神经细胞、心肌细胞和肝癌细胞中都展现出优异的转染性能。Foillard 等<sup>[65]</sup>用低相对分子质量 PEI 对碳纳米管 (CNTs) 改性,负载 siRNA 进行胞内转染,发现 PEI-CNTs 携带 siRNA 的转染效率要高于脂质体载体。Herrero 等<sup>[66]</sup>合成一种树突状功能性多层碳纳米管 (MWNT),表面带有多正电荷四烷基铵盐,可高效结合 siRNA,提升转染效率。Al-Jamal 等<sup>[67]</sup>使用功能化碳纳米管 (f-CNT) 携带 Caspase-3 siRNA (siCas 3) 抑制 Caspase-3 基因的表达,结果发现神经损伤降低,组织伤害减少,这有可能成为治疗中风的新途径。胰岛素介导的信号级联放大作用可促进骨骼肌对葡萄糖的摄取,而经典瞬时受体电位 3 (TRPC3) 通道调节成人骨骼肌中胰岛素对葡萄糖的摄取。Lanner 等<sup>[68]</sup>使用 siRNA 耦合碳纳米管抑制 TRPC3 通道,发现葡萄糖的摄取量减少了 70%。

### 2.5.4 纳米金(胶体金)

纳米金是指金的纳米尺度,具有高电子密度和介电特性,能与多种生物大分子结合,且不影响其生物活性。通过对纳米金进行化学修饰或改性,可作为 siRNA 传递载体。Lee 等<sup>[69]</sup>用伯胺对金纳米颗粒进行化学修饰,与带负电荷的 siRNA-PEG 结合,在前列腺癌细胞中可有效内化,增强 siRNA 的胞内摄取,显著抑制细胞内外源基因 GFP 的表达。Kong 等<sup>[23]</sup>合成一种表面带高阳离子电荷的球形金纳米颗粒,通过静电吸附作用其可与 siRNA 形成稳定纳米尺寸的聚电解质复合物,有高效的胞内摄取率和 GFP 基因沉默效率。金纳米颗粒是多相颗粒,用作 siRNA 的传递载体时难以确定 siRNA 传递过程中纳米金的活性成分,而通过层层自组装技术可获得表型相对均一的金纳米颗粒,以其作为 siRNA 的传输载体具有重要意义<sup>[70]</sup>。Guo 等<sup>[71]</sup>首次通过层层自组装技术制备了具有电荷翻转功能的金纳米颗粒,它在胞外可与细胞膜高效结合,进入细胞质,通过电荷翻转功能释放核纤层蛋白 A/C-siRNA 到细



胞质中,可高效沉默核纤层蛋白A/C的表达。纳米金的多相性造成颗粒表面结构不稳定,易于团聚和沉降。Davis等<sup>[72]</sup>以PEI作为还原剂和稳定剂,修饰金纳米颗粒,稳定其表面结构,使其具有优异的扩散性能,负载siRNA靶向plk1,能显著抑制基因表达,增强癌细胞凋亡。

### 2.5.5 碳酸钙

碳酸钙在人体生长发育中发挥着重要作用,具有良好的生物相容性和生物降解性<sup>[73]</sup>。以碳酸钙作为siRNA载体有可能开拓siRNA非病毒载体的新篇章,如Wei等<sup>[24]</sup>制备一种无定形碳酸钙(ACC)混合纳米微球,以CaIP6活化,合成ACC/CaIP6纳米复合颗粒(NPACC/CaIP6),负载siRNA靶向致癌基因*AIB1*,在体外具有高效转染效率,在体内可减缓肿瘤生长,下调PI3K/Akt信号通路。

## 3 结论与展望

近年来, RNAi 技术快速发展, siRNA 的特定基因沉默功能为慢性疾病、遗传性疾病的有效治疗带来新的希望,然而, siRNA 的高效传递和安全输送仍处于摸索阶段。非病毒载体具有高负载率、结构稳定、低细胞毒性、无免疫原性、便于保存等优点,在一定程度上可取代病毒载体作为 siRNA 运载工具。对各类非病毒载体的优缺点进行比较发现:阳离子脂质体转染效率相对较高,毒副作用较大;阳离子细胞穿膜肽生物降解性好,负载率尚有不足;树枝状大分子负载量大,转染效率仍旧不高;阳离子聚合物载体种类繁多,以 PEI 为例,负载量大、转染效率较高、毒性大;纳米无机材料负载量大、毒性低、生物相容性好,但是转染效率有待提高。

近些年,对纳米无机材料的研究越来越多,文献数量所占比重越来越大,这与它的高载量和安全性密切相关;对脂质体的研究趋于平缓;对多肽、树枝状大分子和聚合物的研究从未间断。在这些报道中,对载体的交叉研究受到广泛关注,如脂质与聚合物交叉<sup>[27]</sup>、聚合物与纳米无机材料交叉<sup>[21,55,72]</sup>、树枝状大分子与聚合物交叉<sup>[15,41]</sup>、无机纳米材料-多肽-聚合物交叉<sup>[56]</sup>等,所得到的复合载体集中有各类载体优点,性能更加优越,为 siRNA 的传递和 RNAi 治疗提供更大的可能。从中可得出结论,交叉研究是未来 siRNA 载体研究的总趋势。但是,非病毒载体目前仍存在不足——转染效率低下,因此,致力于提升非病毒载体的转染效率仍是未来工作的重点。

## [参 考 文 献]

- [1] Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*, 2009, 457(7228): 426-33
- [2] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-11
- [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] Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 2002, 110(5): 563-74
- [5] De Fougères A, 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
- [6] Hagstrom JE, Hegge J, Zhang G, et al. A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Mol Ther*, 2004, 10(2): 386-98
- [7] Golzio M, Mazzolini L, Ledoux A, et al. *In vivo* gene silencing in solid tumors by targeted electrically mediated siRNA delivery. *Gene Ther*, 2007, 14(9): 752-9
- [8] Golzio M, Mazzolini L, Moller P, et al. Inhibition of gene expression in mice muscle by *in vivo* electrically mediated siRNA delivery. *Gene Ther*, 2004, 12(3): 246-51
- [9] Basha G, Novobrantseva TI, Rosin N, et al. Influence of cationic lipid composition on gene silencing properties of lipid nanoparticle formulations of siRNA in antigen-presenting cells. *Mol Ther*, 2011, 19(12): 2186-200
- [10] Santel A, Aleku M, Keil O, et al. RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy. *Gene Ther*, 2006, 13(18): 1360-70
- [11] Kim WJ, Chang CW, Lee M, et al. Efficient siRNA delivery using water soluble lipopolymer for anti-angiogenic gene therapy. *J Control Release*, 2007, 118(3): 357-63
- [12] Jafari M, Xu W, Naahidi S, et al. A new amphipathic, amino-acid-pairing (AAP) peptide as siRNA delivery carrier: physicochemical characterization and *in vitro* uptake. *J Phys Chem B*, 2012, 116(44): 13183-91
- [13] Ryu DW, Kim HA, Ryu JH, et al. Amphiphilic peptides with arginine and valine residues as siRNA carriers. *J Cell Biochem*, 2012, 113(2): 619-28
- [14] Liu P, Yu H, Sun Y, et al. A mPEG-PLGA-*b*-PLL copolymer carrier for adriamycin and siRNA delivery. *Biomaterials*, 2012, 33(17): 4403-12
- [15] Tsutsumi T, Hirayama F, Uekama K, et al. Evaluation of polyamidoamine dendrimer/ $\alpha$ -cyclodextrin conjugate (generation 3, G3) as a novel carrier for small interfering RNA (siRNA). *J Control Release*, 2007, 119(3): 349-59
- [16] Ionov M, Garaiova Z, Waczulikova I, et al. siRNA carriers based on carbosilane dendrimers affect zeta potential and size of phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1818(9): 2209-16

- [17] Mimi H, Ho KM, Siu YS, et al. Polyethyleneimine-based core-shell nanogels: a promising siRNA carrier for argininosuccinat synthetase mRNA knockdown in HeLa cells. *J Control Release*, 2012, 158(1): 123-30
- [18] Nuhn L, Hirsch M, Krieg B, et al. Cationic nanohydrogel particles as potential siRNA carriers for cellular delivery. *ACS Nano*, 2012, 6(3): 2198-214
- [19] Luo Y, Zhai X, Ma C, et al. An inhalable  $\beta_2$ -adrenoceptor ligand-directed guanidinylated chitosan carrier for targeted delivery of siRNA to lung. *J Control Release*, 2012, 162(1): 28-36
- [20] Zhang M, Lin W, Lin B, et al. Facile preparation of calcium phosphate nanoparticles for siRNA delivery: effect of synthesis conditions on physicochemical and biological properties. *J Nanosci Nanotechnol*, 2012, 12(12): 9029-36
- [21] Yin D, Li Y, Lin H, et al. Functional graphene oxide as a plasmid-based Stat3 siRNA carrier inhibits mouse malignant melanoma growth *in vivo*. *Nanotechnology*, 2013, 24(10): 105102
- [22] Ladeira M, Andrade V, Gomes E, et al. Highly efficient siRNA delivery system into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes. *Nanotechnology*, 2010, 21(38): 385101
- [23] Kong WH, Bae KH, Jo SD, et al. Cationic lipid-coated gold nanoparticles as efficient and non-cytotoxic intracellular siRNA delivery vehicles. *Pharm Res*, 2012, 29(2): 362-74
- [24] Wei J, Cheang T, Tang B, et al. The inhibition of human bladder cancer growth by calcium carbonate/CaIP6 nanocomposite particles delivering AIB1 siRNA. *Biomaterials*, 2013, 34(4): 1246-54
- [25] 张阳德, 蔡素娜, 廖允军. 阳离子脂质体及其在基因转移和基因治疗中的应用. *中国现代医学杂志*, 2001, 11(7): 28-30
- [26] 王燕. 新型脂质体作为中药靶向载体在肿瘤治疗中的作用. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(10): 212-5
- [27] Rothdiener M, Müller D, Castro PG, et al. Targeted delivery of SiRNA to CD33-positive tumor cells with liposomal carrier systems. *J Control Release*, 2010, 144(2): 251-8
- [28] Matsui K, Sasaki Y, Komatsu T, et al. RNAi gene silencing using cerasome as a viral-size siRNA-carrier free from fusion and cross-linking. *Bioorgan Med Chem Lett*, 2007, 17(14): 3935-8
- [29] Pierrat P, Creusat G, Laverny G, et al. A cationic phospholipid-detergent conjugate as a new efficient carrier for siRNA delivery. *Chemistry*, 2012, 18(13): 3835-9
- [30] 施伟杰, 毕丽伟, 许瑞安. 联合细胞穿膜肽的肿瘤靶向载体. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(1): 104-8
- [31] 周华华. 细胞穿膜肽的研究进展与前景展望. *西部医学*, 2012, 24(7): 1410-2
- [32] Wang XL, Xu R, Wu X, et al. Targeted systemic delivery of a therapeutic siRNA with a multifunctional carrier controls tumor proliferation in mice. *Mol Pharm*, 2009, 6(3): 738-46
- [33] Wang XL, Nguyen T, Gillespie D, et al. A multifunctional and reversibly polymerizable carrier for efficient siRNA delivery. *Biomaterials*, 2008, 29(1): 15-22
- [34] Leng Q, Scaria P, Zhu J, et al. Highly branched HK peptides are effective carriers of siRNA. *J Gene Med*, 2005, 7(7): 977-86
- [35] Won YW, Yoon SM, Lee KM, et al. Poly(oligo-D-arginine) with internal disulfide linkages as a cytoplasm-sensitive carrier for siRNA delivery. *Mol Ther*, 2010, 19(2): 372-80
- [36] Tanaka K, Kanazawa T, Ogawa T, et al. Disulfide crosslinked stearyl carrier peptides containing arginine and histidine enhance siRNA uptake and gene silencing. *Int J Pharm*, 2010, 398(1): 219-24
- [37] Schiffelers RM, Ansari A, Xu J, et al. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(19): e149
- [38] Schiffelers RM, Mixson AJ, Ansari AM, et al. Transporting silence: design of carriers for siRNA to angiogenic endothelium. *J Control Release*, 2005, 109(1): 5-14
- [39] Mehrabadi FS, Fischer W, Haag R. Dendritic and lipid-based carriers for gene/siRNA delivery (a review). *Curr Opin Solid State Mater Sci*, 2012, 16(6): 310-22
- [40] 周应学, 范晓东, 任杰, 等. 环糊精-药物复合纳米粒子的制备及其控制释放研究进展. *材料导报*, 2010, 24(3): 136-40
- [41] Tsutsumi T, Arima H, Hirayama F, et al. Potential use of dendrimer/ $\alpha$ -cyclodextrin conjugate as a novel carrier for small interfering RNA (siRNA). *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2006, 56(1-2): 81-4
- [42] Arima H, Yoshimatsu A, Ikeda H, et al. Folate-peg-appended dendrimer conjugate with  $\alpha$ -cyclodextrin as a novel cancer cell-selective siRNA delivery carrier. *Mol Pharm*, 2012, 9(9): 2591-604
- [43] Hayashi Y, Mori Y, Yamashita S, et al. Potential use of lactosylated dendrimer (G3)/ $\alpha$ -cyclodextrin conjugates as hepatocyte-specific sirna carriers for the treatment of familial amyloidotic polyneuropathy. *Mol Pharm*, 2012, 9(6): 1645-53
- [44] Weber N, Ortega P, Clemente MI, et al. Characterization of carbosilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes. *J Control Release*, 2008, 132(1): 55-64
- [45] Endres T, Zheng M, Beck-Broichsitter M, et al. Optimising the self-assembly of siRNA loaded PEG-PCL-IPEI nanocarriers employing different preparation techniques. *J Control Release*, 2012, 160(3):583-91
- [46] Chen J, Tian H, Guo Z, et al. A highly efficient siRNA carrier of PBLG modified hyperbranched PEI. *Macromol Biosci*, 2009, 9(12): 1247-53
- [47] Goyal R, Tripathi SK, Tyagi S, et al. Linear PEI nanoparticles: efficient pDNA/siRNA carriers *in vitro* and *in vivo*. *Nanomedicine*, 2012, 8(2): 167-75
- [48] Kang JH, Tachibana Y, Kamata W, et al. Liver-targeted siRNA delivery by polyethylenimine (PEI)-pullulan carrier. *Bioorgan Med Chem*, 2010, 18(11): 3946-50
- [49] Zintchenko A, Philipp A, Dehshahri A, et al. Simple

- modifications of branched PEI lead to highly efficient siRNA carriers with low toxicity. *Bioconjug Chem*, 2008, 19(7): 1448-55
- [50] Gary DJ, Lee H, Sharma R, et al. Influence of nano-carrier architecture on in vitro siRNA delivery performance and in vivo biodistribution: polyplexes vs micelleplexes. *ACS Nano*, 2011, 5(5): 3493-505
- [51] Mao CQ, Du JZ, Sun TM, et al. A biodegradable amphiphilic and cationic triblock copolymer for the delivery of siRNA targeting the acid ceramidase gene for cancer therapy. *Biomaterials*, 2011, 32(11): 3124-33
- [52] Benoit DS, Henry SM, Shubin AD, et al. pH-responsive polymeric siRNA carriers sensitize multidrug resistant ovarian cancer cells to doxorubicin via knockdown of polo-like kinase 1. *Mol Pharm*, 2010, 7(2): 442-455
- [53] Raviña M, Cubillo E, Olmeda D, et al. Hyaluronic acid/chitosan-g-poly (ethylene glycol) nanoparticles for gene therapy: an application for pDNA and siRNA delivery. *Pharm Res*, 2010, 27(12): 2544-55
- [54] 须苏菊, 孔祥东, 赵瑞波, 等. 新型基因治疗载体——纳米羟基磷灰石. *材料科学*, 2013, 3: 11-5
- [55] Klesing J, Chernousova S, Epple M. Freeze-dried cationic calcium phosphate nanorods as versatile carriers of nucleic acids (DNA, siRNA). *J Mater Chem*, 2012, 22(1): 199-204
- [56] Kakizawa Y, Furukawa S, Kataoka K. Block copolymer-coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery. *J Control Release*, 2004, 97(2): 345-56
- [57] Zhang M, Ishii A, Nishiyama N, et al. PEGylated calcium phosphate nanocomposites as smart environment-sensitive carriers for siRNA delivery. *Adv Mater*, 2009, 21(34): 3520-5
- [58] Gu YH, Yan XB, Huang D, et al. NR2B-siRNA mediated by hydroxyapatite nanoparticles relieves for malin-induced pain of mice. *Adv Mater Res*, 2012, 343-344: 926-32
- [59] Yang H, Huang D, Zhu SH, et al. Preparation and application of hydroxyapatite (HA) nanoparticles/NR2B-siRNA complex. *Trans Nonferrous Met Soc Chn*, 2008, 18(4): 913-8
- [60] Liang ZW, Guo BF, Li Y, et al. Plasmid-based Stat3 siRNA delivered by hydroxyapatite nanoparticles suppresses mouse prostate tumour growth *in vivo*. *Asian J Androl*, 2011, 13(3): 481-6
- [61] Feng L, Yang X, Shi X, et al. Polyethylene glycol and polyethylenimine dual-functionalized nano-graphene oxide for photothermally enhanced gene delivery. *Small*, 2013, 9(11): 1989-97
- [62] Yang X, Niu G, Cao X, et al. The preparation of functionalized graphene oxide for targeted intracellular delivery of siRNA. *J Mater Chem*, 2012, 22(14): 6649-54
- [63] Zhi F, Dong H, Jia X, et al. Functionalized graphene oxide mediated adriamycin delivery and miR-21 gene silencing to overcome tumor multidrug resistance *in vitro*. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60034
- [64] 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
- [65] Foillard S, Zuber G, Doris E. Polyethylenimine-carbon nanotube nanohybrids for siRNA-mediated gene silencing at cellular level. *Nanoscale*, 2011, 3(4): 1461-4
- [66] 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
- [67] Al-Jamal KT, Gherardini L, Bardi G, et al. Functional motor recovery from brain ischemic insult by carbon nanotube-mediated siRNA silencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(27): 10952-7
- [68] Lanner JT, Bruton JD, Assefaw-Redda Y, et al. Knockdown of TRPC3 with siRNA coupled to carbon nanotubes results in decreased insulin-mediated glucose uptake in adult skeletal muscle cells. *FASEB J*, 2009, 23(6): 1728-38
- [69] Lee SH, Bae KH, Kim SH, et al. Amine-functionalized gold nanoparticles as non-cytotoxic and efficient intracellular siRNA delivery carriers. *Int J Pharm*, 2008, 364(1): 94-101
- [70] Elbakry A, Zaky A, Liebl R, et al. Layer-by-layer assembled gold nanoparticles for siRNA delivery. *Nano Letters*, 2009, 9(5): 2059-64
- [71] Guo S, Huang Y, Jiang Q, et al. Enhanced gene delivery and siRNA silencing by gold nanoparticles coated with charge-reversal polyelectrolyte. *ACS Nano*, 2010, 4(9): 5505-11
- [72] Song WJ, Du JZ, Sun TM, et al. Gold nanoparticles capped with polyethylenimine for enhanced siRNA delivery. *Small*, 2010, 6(2): 239-46
- [73] Kong X, Xu S, Wang X, et al. Calcium carbonate micro-particles used as a gene vector for delivering p53 gene into cancer cells. *J Biomed Mater Res A*, 2012, 100(9): 2312-8