

· 综 述 ·

用于肿瘤治疗的小分子干扰 RNA 非病毒载体研究进展

王 欢¹, 马志强², 杨 峰² (1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 第二军医大学药学院无机化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 近年来,小分子干扰 RNA (siRNA)作为 RNA 干扰 (RNAi)技术的效应分子,已被广泛用于恶性肿瘤的基因治疗领域。欲获得理想的治疗效果,其关键因素是寻找一种安全、高效、稳定、可控的基因载体。非病毒载体具有低毒、低免疫原性、制备简单、目的基因容量大、外源基因随机整合率低且携带基因大小类型不受限制等突出优势,已经成为目前 siRNA 载体的研究热点。在以往学者的研究基础上,从药剂学的角度,笔者对这些载体在 siRNA 传递系统中的研究现状做回顾性总结。

[关键词] RNA 干扰;小分子干扰 RNA;肿瘤;基因治疗;非病毒载体

[中图分类号] R737.2;Q78

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2015)06-0498-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.06.005

Current status of non-viral siRNA vectors for therapy of cancers

WANG Huan¹, MA Zhiqiang², YANG Feng² (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. Department of Inorganic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] In the recent years, siRNA has been widely used as effector molecule in the field of gene therapy for cancer. In order to achieve ideal treatment effect, the key factor is to find safe, efficient, stable and controllable gene vectors. The commonly used vectors include viral and non-viral vectors. The non-viral gene vector has superiority of low toxicity, bare immunogenicity, simple to manufacture and high capacity which have been taken as the highlight of the research of carrier of gene drugs. Based on the study of the previous researchers, this study reviewed the prevalence study of the former carriers in the delivery system of siRNA from the point of pharmaceutics.

[Key words] RNAi; siRNA; tumor; gene therapy; non-viral vector

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术是指在进化过程中高度保守的由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 诱发的同源 mRNA 高效特异性降解的现象。利用 RNAi 技术可通过外源性或内源性 dsRNA 诱导内源靶基因的 mRNA 降解, 特异性地抑制靶基因表达^[1]。近年来, 该技术已被广泛应用于肿瘤基因治疗、基因功能探索及传染性疾病预防等领域。肿瘤的发生与基因异常有着密切联系, RNAi 技术也被认为是未来肿瘤基因治疗最有可能取得突破性进展的方向之一。但同时由于 siRNA 在生物体内极易被核酸酶降解、肾小球存在的滤过清除效应, 以及 siRNA 的负电性及尺寸原因, 很难跨越同样表现为负电性的细胞膜^[2]。因此, 如

何使 siRNA 准确到达靶组织和细胞是目前应用 RNAi 面临的巨大挑战, 也是近年来药剂学领域的研究热点。

常见的 siRNA 载体分为病毒载体和非病毒载体两大类。病毒载体常见的有: 小鼠逆转录病毒 (murine retroviruses)、慢病毒 (lentiviruses) 和腺相关病毒 (adeno-associated virus) 载体等, 具有较高的转染效率, 但同时存在大规模制备困难、包载容量小、特异性差和生物安全性等问题, 限制了其应用。相对而言, 非病毒载体具有低毒、低免疫原性、制备简单、目的基因容量大、外源基因随机整合率低且携带基因大小类型不受限制等突出优势, 是目前公认的优良 siRNA 载体。已得到广泛研究的 siRNA 非病毒载体包括: 阳离子脂质体及脂质复合物、阳离子聚合物、阳离子多肽和无机纳米粒等。本文从药剂学的角度对上述 siRNA 非病毒载体的研究现状进行综述, 并简单介绍其在肿瘤治疗领域的初步应用。

[作者简介] 王 欢, 硕士研究生, 研究方向: 药物缓控释给药系统。E-mail: wang568855641@163.com

[通讯作者] 杨 峰, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 药物缓控释给药系统。E-mail: yangfeng1008@126.com

1 阳离子脂质体及脂质类似物

阳离子脂质体(cationic liposome)凭借其制备简单、可重复转染、免疫原性低和可降解等特点,已成为应用最为广泛的一类非病毒基因载体。阳离子脂质体通常是由带正电的磷脂和中性的辅助脂类组成。带正电的磷脂结构通常分为阳离子头部、骨架链、连接键和疏水尾部4个部分。亲水头部主要由含氮杂环类、季胺类、聚氨酯类和胍盐类等组成,氮杂环类阳离子头部比直线型伯胺和聚胺的转染效率高且细胞毒性低^[3]。骨架链主要以丙三醇或者氨基酸结构作为“Y”关节连接疏水部分与阳离子头基,影响 siRNA 的释放与内涵体的逃离。连接键常为酰胺键、氨基甲酸酯键等化学性质稳定且可降解的基团。疏水尾部长度主要影响脂质的相转变温度、转染效率和细胞毒性。研究表明,相对较长的脂肪碳链其相转变温度高、硬度大,基因转染效率也差^[4]。Han 等^[5]以胆固醇衍生物作为阳离子脂质的疏水尾部,构建了血清增强型的 siRNA 传递系统,增加了在靶位的生物分布。Maslov 等^[6]合成了以精胺为头部,胆固醇为尾部,氨基甲酸为连接键,6个亚甲基为骨架的 Gemini 型两亲性阳离子脂质,在体外具有较好的转染效果。常见的辅助脂类包括:二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、磷脂酰胆碱(PC)、胆固醇(Chol)等,能够起到稳定脂质双分子层,降低阳离子脂质毒性的作用。

2 阳离子多聚物

2.1 聚乙烯亚胺

聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)是目前运用最为广泛的阳离子多聚物,也是基因递送中的“金标准”载体材料,在生理条件下显正电性,可与核酸链上负电性的磷酸根静电结合并包裹,高度压缩核酸形成复合物。重复的乙二胺结构单元使其具有强大的缓冲能力和“质子海绵”效应,在低 pH 值的内涵体环境中,氨基质子化,复合物内的排斥作用增强,孔径增大。大量捕获质子的同时引起 Cl⁻内流,导致溶酶体肿胀破裂,从而将内吞的基因药物释放到细胞质中。

但是 PEI 具有的较强细胞毒性限制了其应用,目前常通过化学修饰等方法改善其性能。例如,在 PEI 上接枝 PEG 链可显著降低复合物的表面电荷,保护 siRNA 免受酶解。Kim 等^[7]合成了 PEI-g-PEG-RGD/siRNA 复合物,在 20% 胎牛血清中能够保持结构稳定、完整 6 h 以上,这有利于复合物经历长时间的血液循环到达肿瘤组织,增加氮/磷比(N/

P)值,使复合物表面正电性增加,利于肿瘤细胞的摄取。Malek 等^[8]也考察了 PEI-PEG/siRNA 复合物在小鼠体内的药动学参数和组织分布,结果显示,较高 N/P 值的复合物在肺中会引起红细胞聚集和溶血现象,最适宜的 N/P 值在 9~30 之间。Xia 等^[9]利用含二硫键的 PEI(ss-PEI)实现了 hTERT siRNA 的选择性细胞内释放,降低了 hTERT mRNA 及 hTERT 蛋白的表达水平,降低了端粒酶的活性,抑制了 HepG2 细胞的生长,显著诱导细胞凋亡,同时 ss-PEI 表现出很低的体外细胞毒性。

2.2 树状聚合物

聚酰胺-胺树状大分子(poly-amidoamine dendrimer, PAMAM)表面众多的正电氨基基团能有效绑定并压缩核酸,防止 siRNA 酶解,在酸性条件下释放 siRNA。PAMAM 具有大量的端基官能团,通过对端基官能团的改性^[10]可以得到具有不同性能的树状大分子。近年来,研究者们常将 PAMAM 载有 siRNA 后,再利用胶束等包裹 PAMAM-siRNA 复合物,最后与化疗药物形成共载药系统,达到药物的协同治疗目的。Biswas 等^[11]首先合成了 G(4)-D-PEG-(2K)-DOPE 三嵌段共聚物,加载 siRNA 后再以 PEG-PE 胶束包裹,结果显示,提高了细胞对 siRNA 的摄取和阿霉素的包封率,这种化疗药物与 siRNA 的共载物为治疗多药耐药性肿瘤提供了性质优良的载体。Perez 等^[12]用泊洛沙姆等包裹载有 siRNA 的 PAMAM 复合物制备出原位凝胶,利用鼻-脑通道传递,越过血-脑屏障,有望用于脑胶质瘤的治疗。

2.3 聚赖氨酸

聚赖氨酸(polylysine, PLL)是碱性氨基酸赖氨酸的聚合物,也是在基因载体中被研究较早的聚合物之一。PLL 侧链上的伯胺质子化后,成为结合核酸的位点,具有极好的核酸浓缩能力和较好的生物相容性和可降解性。目前常将其用 PEG、聚乙二醇单甲醚(MPEG)等亲水性修饰,或与聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)形成 PEG-PLGA-PLL 三嵌段共聚物,达到共载化疗药物与 siRNA 的目的^[13]。Ambardekar 等^[14]制备了胆固醇修饰的 siRNA 与 PEG-PLL 的复合物(Chol-siRNA-PEG-PLL),有效防止了 siRNA 的酶解并增强了对 mRNA 的抑制效率。Christie 等^[15]合成了多功能的 PEG-PLL 共聚物,通过连接环状 RGD 肽(cRGD),增加其在肿瘤组织的聚集和肿瘤细胞的摄取,提高了基因沉默能力。

3 天然高分子材料

3.1 壳聚糖

Mumper^[16]于 1995 年首次将壳聚糖

(chitosan, CS) 用作非病毒基因载体。壳聚糖是天然的碱性多糖,具有良好的生物相容性、可降解性和独特的跨膜转运能力,但同时由于其溶解性较差,导致转染效率低,单独使用时效果不显著。目前,常用作载体的是壳聚糖的改性衍生物,如季铵化的壳聚糖、羧甲基壳聚糖、PEG 化的壳聚糖、壳聚糖-g-聚乙烯亚胺、十二烷基化壳聚糖等。Zhou 等^[17]设计出一种可作为蛋白激酶底物的短肽,与壳聚糖偶联,进入细胞后,可被蛋白激酶磷酸化,使得短肽-CS 所包裹的 siRNA 释放,提高了 CS/siRNA 的转染效率。Pezzoli 等^[18]合成了 7 个接枝率不同的壳聚糖-g-聚乙烯亚胺共聚物,结果发现 N/P=30 的 Chi-g-bPEI 转染效率与 PEI 相当,但细胞毒性较低。

3.2 环糊精 环糊精(cyclodextrin, CD)是直链淀粉在芽孢杆菌产生的环糊精葡萄糖基转移酶作用下生成的一系列环状低聚糖的总称。2009 年, Davis 等^[19]首次报道了环糊精包载 siRNA 后制成靶向纳米粒的临床前研究。Hu 等^[20]研发载雷公藤甲素与 siRNA 的 PEI-CD 的传递系统,结果显示,雷公藤甲素的结合率可达 10%, siRNA 也在 N/P=5 时被成功压缩,复合物粒径约 300 nm, Zeta 电位约 +8 mV, 体外实验也显示出良好的抑制肿瘤生长与转移的作用。Boe 等^[21]利用光化学内化技术(photochemical internalization, PCI)调节 siRNA-环糊精聚合物的基因表达, PCR 实验结果显示,基因沉默效率为 80%~90%,且在逃离内涵体 5 h 后,实现了最大的基因沉默效果。

4 细胞穿膜肽

细胞穿膜肽(cell-penetrating peptides, CPP)是一类具有很强细胞膜穿透能力的多肽,常见的有如 TAT、MPG、PEP-1、聚精氨酸等,能促进细胞摄取蛋白质、多肽、核酸片段等分子而不损坏细胞结构。大多数 CPP-核酸复合体都是通过共价键结合,其中最常用的是二硫键,其他较稳定的连接键有:酰胺键、噻唑烷、肟和胍键等。

人类免疫缺陷病毒(HIV-1)的反式激活蛋白(trans-activator transcription, TAT)能高效、快速地跨膜转运与其融合表达的载体并使之进入细胞,对细胞无损伤。Fang 等^[22]合成了对血管内皮细胞因子受体 1(VEGFR-1)具有高亲和力的六氨基酸肽 A1 的 TAT-A1 肽,并成功将 siRNA 转染入人 HepG2 细胞。Choi 等^[23]在小鼠体内实验中发现,低分子量的鱼精蛋白可有效传递 siRNA 并定位于肿瘤,且抑制了血管内皮生长因子(VEGF)的表达。

近年来发现的 iRGD 的多肽(CRGDK/RGPDC)在具有整合素受体 $\alpha_v\beta_3$ 靶向功能的同时,还可与肿瘤细胞表面的 NRP-1 受体相互作用,介导细胞膜穿透效应,加速药物传递,进入肿瘤细胞,是极具运用前景的一类靶向穿膜肽^[24]。

5 无机纳米粒

无机纳米材料制备简单,具有良好的生物相容性和可降解性,稳定性好,作为基因载体,能包裹、浓缩、保护核酸免受核酸酶的降解,并可介导目的基因在靶细胞内表达。目前研究较多的无机载体主要有:羟基磷灰石纳米颗粒(hydroxyapatite nanoparticles, HAP)、介孔二氧化硅纳米颗粒(mesoporous silica nanoparticles, MSN)、磁性氧化铁颗粒和金纳米颗粒等。HAP 是人和动物骨骼及牙齿的主要成分,分子式为 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 具有极好的生物相容性,可结合、保护 siRNA 实现透膜表达。Liang 等^[25]用 HAP 传递针对 STAT3 的 siRNA,可阻断 STAT3 信号通路,小鼠前列腺肿瘤组织中的 STAT3 及其下游基因 Bcl-2、VEGF 和细胞周期蛋白的表达都被显著抑制。MSN 是一类有序排列的介孔结构,属粒径在纳米尺度的无机非金属材料,具有很高的比表面积和孔容。同时,其表面具有大量的硅醇基,可用于进一步的化学修饰。例如, Li 等^[26]合成了 PEI 与融合肽修饰的磁性 MSN(M-MSN_siRNA@PEI-KALA),体外抑制 A549 细胞效果良好。此外,该复合物对 VEGF 具有较好的 RNA 干扰作用,瘤内注射也可抑制新生肿瘤血管的生成。

6 总结与展望

siRNA 药物易于合成与实现生产,应用前景十分诱人。目前 RNAi 技术已成功应用于慢性粒细胞白血病、老年性黄斑病变、呼吸道病毒感染和急性肾功能衰竭等疾病的治疗研究。但是,目前用于肿瘤治疗的 siRNA 药物多还处于临床试验阶段,距离产品真正上市还有一定距离。

随着对基因表达机制及体内过程认识的不断深入,人们也认识到存在阻碍 RNAi 发展的种种问题,提升治疗效果的关键还是需要性质优良的载体“护送”基因治疗药物到达靶标。材料科学的发展突飞猛进,新型安全有效的材料不断地被发现或合成。阳离子聚合物、融合多肽、无机纳米粒等作为载体的优势也在逐渐体现。如何利用这些材料开发安全有效、稳定可控、靶向智能的传递系统仍将是今后的研

究热点。除此之外,基于 RNA 治疗的生物体内机制,时效-量效关系,合适的给药剂型和剂量,载体在亚细胞的阻碍,避免脱靶效应等问题仍需进一步研究与解决。

【参考文献】

- [1] David S, Pitard B, Benoit JP, *et al.* Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery [J]. *Pharmacol Res*, 2010, 62 (2): 100-114.
- [2] Tiemann K, Rossi JJ. RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects [J]. *EMBO Mol Med*, 2009, 1 (3): 142-151.
- [3] Liu W, Chen JM. Progress in studies of the structure-activity relationship of cationic lipid-mediated gene delivery [J]. *Chin J New Drug*, 2011, 20(20): 1975-1980.
- [4] Yang ST, Zaitseva E, Chernomordik LV, *et al.* Cell-penetrating peptide induces leaky fusion of liposomes containing late endosome-specific anionic lipid [J]. *Biophys J*, 2010, 99 (8): 2525-2533.
- [5] Han SE, Kang H, Shim GY, *et al.* Novel cationic cholesterol derivative-based liposomes for serum-enhanced delivery of siRNA [J]. *Int J Pharm*, 2008, 353(1-2): 260-269.
- [6] Maslov MA, Kabilova TO, Petukhov IA, *et al.* Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA [J]. *J Control Release*, 2012, 160(2): 182-193.
- [7] Kim J, Kim SW, W Kim WJ. PEI-g-PEG-RGD/small interference RNA polyplex-mediated silencing of vascular endothelial growth factor receptor and its potential as an anti-angiogenic tumor therapeutic strategy [J]. *Oligonucleotides*, 2011, 21(2): 101-107.
- [8] Malek A, Czubayko F, Aigner A. PEG grafting of polyethylenimine (PEI) exerts different effects on DNA transfection and siRNA-induced gene targeting efficacy [J]. *J Drug Target*, 2008, 16(2): 124-139.
- [9] Xia W, Wang P, Lin C, *et al.* Bioreducible polyethylenimine-delivered siRNA targeting human telomerase reverse transcriptase inhibits HepG2 cell growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Control Release*, 2012, 157(3): 427-436.
- [10] Yu T, Liu X, Bolcato-Bellemin AL, *et al.* An amphiphilic dendrimer for effective delivery of small interfering RNA and gene silencing *in vitro* and *in vivo* [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(34): 8478-8484.
- [11] Biswas S, Deshpande PP, Navarro GS, *et al.* Lipid modified triblock PAMAM-based nanocarriers for siRNA drug co-delivery [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(4): 1289-12301.
- [12] Perez AP, Mundina-Weilenmann C, Romero EL, *et al.* Increased brain radioactivity by intranasal P-labeled siRNA dendriplexes within *in situ*-forming mucoadhesive gels [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 1373-1385.
- [13] Liu P, Yu H, Sun Y, *et al.* A mPEG-PLGA-b-PLL copolymer carrier for adriamycin and siRNA delivery [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(17): 4403-4412.
- [14] Ambardekar VV, Wakaskar RR, Sharma B, *et al.* The efficacy of nuclease-resistant Chol-siRNA in primary breast tumors following complexation with PLL-PEG (5K) [J]. *Biomaterials*, 2013, 4839-4848.
- [15] Christie RJ, Matsumoto Y, Miyata K, *et al.* Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection [J]. *ACS Nano*, 2012, 6(6): 5174-5189.
- [16] Mumper RJ, Wang J, Claspel JM, *et al.* Novel polymeric condensing carriers for gene delivery [J]. *Symp Controlled Rel*, 1995, 22: 178.
- [17] Zhou SM, Kong FQ, Sun B, *et al.* Phosphorylatable short peptide conjugated low molecular weight chitosan for efficient siRNA delivery and target gene silencing [J]. *Chin J Biochem Molecul Biol*, 2011, 27(10): 980-986.
- [18] Pezzoli D, Olimpieri F, Malloggi C, *et al.* Chitosan-graft-branched polyethylenimine copolymers: influence of degree of grafting on transfection behavior [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34711.
- [19] Davis ME. The first targeted delivery of siRNA in humans *via* a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic [J]. *Mol Pharm*, 2009, 6(3): 659-668.
- [20] Hu T.N, Wang QW, Jin X, *et al.* Anticancer effect of trip-tolide-polyethylenimine-cyclodextrin *in vitro* [J]. *J Zhejiang Univ (Med Sci)*, 2012, 41(6): 610-619.
- [21] Boe SL, Longva AS, Hovig E. Cyclodextrin-containing polymer delivery system for light-directed siRNA gene silencing [J]. *Oligonucleotides*, 2010, 20(4): 175-182.
- [22] Fang B, Jiang L, Zhang M, *et al.* A novel cell-penetrating peptide TAT-A1 delivers siRNA into tumor cells selectively [J]. *Biochimie*, 2013, 95(2): 251-257.
- [23] Choi YS, Lee JY, Suh JS, *et al.* The systemic delivery of siRNAs by a cell penetrating peptide, low molecular weight protamine [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(6): 1429-1443.
- [24] Alberici L, Roth L, Sugahara KN, *et al.* De novo design of a tumor-penetrating peptide [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(2): 804-812.
- [25] Lin D, Cheng Q, Jiang Q, *et al.* Intracellular cleavable poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate) functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient siRNA delivery *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nanoscale*, 2013, 5, 4291-4301.
- [26] Li X, Chen Y, Wang M, *et al.* A mesoporous silica nanoparticle-PEI-fusogenic peptide system for siRNA delivery in cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(4): 1391-1401.

【收稿日期】 2014-02-21 【修回日期】 2015-03-05
【本文编辑】 李睿旻