

壳聚糖衍生物作为 siRNA 纳米递送系统材料的研究进展

熊峰¹, 苏峰^{2,3}, 曹俊如⁴, 储晓琴¹, 何广卫^{1,2*} (1.安徽中医药大学, 合肥 230012; 2.合肥医工医药股份有限公司, 合肥 230088; 3.中国药科大学, 南京 211198; 4.安徽医科大学, 合肥 230032)

摘要: 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 在治疗疾病方面具有高效性、特异性、瞬时性等优良特性, 是目前药物研发关注的焦点。但裸露的 siRNA 稳定性差、细胞摄取率低, 难以发挥其基因沉默作用, 因此需要一种优质的递送系统将其递送至靶细胞中, 使其发挥作用。大部分纳米递送系统因毒性、载药问题不利于 siRNA 的转运, 而壳聚糖衍生物具有较高的水溶性、安全性、稳定性, 已受到广泛关注。本文综述了壳聚糖衍生物应用于 siRNA 纳米递送系统的研究进展, 为正在进行纳米递送系统研究的科研工作者提供参考。

关键词: siRNA; 递送系统; 基因沉默; 壳聚糖衍生物

中图分类号: R941 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)13-1889-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222602

引用本文: 熊峰, 苏峰, 曹俊如, 等. 壳聚糖衍生物作为 siRNA 纳米递送系统材料的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(13): 1889-1896.

Research Progress of Chitosan Derivatives as Materials for siRNA Nano-delivery Systems

XIONG Feng¹, SU Feng^{2,3}, CAO Junru⁴, CHU Xiaoqin¹, HE Guangwei^{1,2*} (1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Hefei Industrial Pharmaceutical Institute Co., Ltd., Hefei 230088, China; 3. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 4. Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

ABSTRACT: Small interfering RNA (siRNA) has been the focus of attention in the field of drug development for its excellent properties such as efficiency, specificity and transient nature in treating diseases. However, the poor stability and low cellular uptake of naked siRNAs make it difficult for them to exert their gene silencing effects, a high-quality drug delivery system is needed to deliver them to target cells where they can function. Many nano delivery systems are no longer suitable for siRNA transport due to toxicity and drug loading problems, chitosan derivatives are beginning to receive widespread attention because of their high water solubility, safety and stability. This paper reviewed the research progress of chitosan derivatives as siRNA nano-delivery systems and provided a reference for researchers who are interested in the development of nano-delivery systems.

KEYWORDS: siRNA; delivery system; gene silencing; chitosan derivatives

小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 是一种含有特定长度 (21~23 bp) 和特定序列的双链 RNA, 并由 Fire 等^[1]发现具有强大的 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 作用。与普通药物相比, 极少量 siRNA 的反义链能够直接在细胞质中通过碱基互补配对原则识别致病基因的 mRNA 序列, 并抑制其表达相应的致病蛋白, 因此具有高度特异性和高效性^[2-3]; siRNA 药物的开发过程既简单又快速, 可以根据生物信息学并参照 mRNA 或 cDNA 的靶点选择候选序列^[4], 然后通过体内转录和体外制备的方法筛选所需 siRNA^[5]。然而, 未被修饰的 siRNA 自身存在一定的局限性。siRNA 中的磷酸二酯键易被 RNA 酶 (ribonuclease, RNase) 水解, 在体内不稳定^[6]; siRNA 在发挥基因沉默作

用时, 可能会发生脱靶效应, 下调无关基因的表达, 造成严重的不良反应^[7]; 此外, 未修饰的 siRNA 可能导致 Toll 样受体 3 (Toll-like receptor 3, TLR3) 的激活, 并对血液和淋巴系统产生不利影响^[8], 采用化学修饰的方法可以很好地解决这些问题, 可用于局部给药^[9]。siRNA 的体积较小, 体内给药后易在肾脏中积累并清除^[10], 因此, 想要采用全身给药的方法到达靶细胞内发挥作用, 仅仅通过简单的化学修饰是不可行的。而且 siRNA 是一种亲水性且带有负电荷的分子, 无法穿过疏水性、负电荷的细胞膜^[11]; 即使到达细胞内, 也很难逃逸内涵体和溶酶体^[12]。从 siRNA 发现到多款 siRNA 药物的成功上市, 证明了纳米递送系统对 siRNA 在体内的稳定传递和药效的发挥至关重要^[13-15]。

作者简介: 熊峰, 男, 硕士生 E-mail: 2744959543@qq.com
hgwhipi@hotmail.com

*通信作者: 何广卫, 男, 博士, 主任药师, 硕导 E-mail:

理想的 siRNA 纳米载体应该具备以下几个条件:

①与 siRNA 能够有效地结合,以防止酶的降解,增加体内循环的稳定;②具有一定的生物相容性和生物可降解性;③与载体的结合应该有助于避免 siRNA 被单核吞噬细胞系统清除,并增强细胞内的摄取;④进入细胞后能够逃逸内涵体和溶酶体,并能持续不断地释放 siRNA。

随着科研人员的深入研究,使得更多 siRNA 纳米载体材料可供选择。由于 siRNA 呈现电负性,阳离子纳米载体最先受到研究者的关注。聚乙烯亚胺^[16]、树状大分子^[17]、聚-2-二甲氨基甲基丙烯酸酯^[18]、传统脂质材料^[19]、聚-L-赖氨酸^[20]等含有大量的氨基基团,不仅可以有效地压缩核酸,增加 siRNA 的稳定性,还可以响应内涵体和溶酶体的酸性环境,促进 siRNA 在细胞中的有效释放,有利于药效的发挥。但随着载体的深入研究,科研人员发现这类载体具有一定的细胞毒性,临床应用受到限制^[21]。细胞^[22]、外泌体^[23]、多肽偶联物^[24]毒性较低,安全性较好,但这类载体的稳定性较差,具有较高的载药难度以及高昂的研发费用。当今学者更加关注毒性更低、具有生产潜力的纳米材料,比如线性聚乙烯亚胺^[25]、聚烯丙基胺盐酸盐^[26-27]、壳聚糖等^[28]。

壳聚糖是一种可再生的天然碱性多糖,由甲壳素完全或部分脱乙酰化获得,来源广泛,毒性低,具有良好的生物相容性和生物降解性^[29]。因其安全性较高,被 FDA 批准应用于食品和药品中^[30]。壳聚糖作为自然界中唯一一种带正电荷多糖,可以与 siRNA 发生静电结合,并实现良好的包封,避免了核酸酶的降解^[31]。由于 siRNA 与壳聚糖的作用特点,使得 siRNA 在体内能够持续不断地释放,提高了治疗效果,避免了 siRNA 只能发挥短期药效的尴尬局面^[32]。

目前对壳聚糖衍生物的报道越来越多,本文主要描述了近些年壳聚糖衍生物作为 siRNA 纳米递送系统的研究进展。

1 壳聚糖衍生化目的

尽管壳聚糖作为 siRNA 纳米载体有很大优势,但是也存在一些缺点。由于壳聚糖自身含有许多的羟基,分子间和分子内存在大量氢键,使得壳聚糖的水溶性变得极差,因此在一定程度上限制了它与 siRNA 的相互作用,见图 1。此外,壳聚糖的转染效率低下,可能存在潜在的毒性,迫使壳聚糖不得不进行衍生化处理。壳聚糖丰富的氨基和羟基赋予了自身改性的潜力。然而,并非所有的基团均可用于化学改性。C3-OH 属于仲羟基,不能自由转动,空间位阻大,不易发生反应。C6-OH 和 C2-NH₂ 的化学性质活泼,因此可以利用壳聚糖分子中的这些基团,进行化学改性,克服壳聚糖原有缺点^[29,33]。

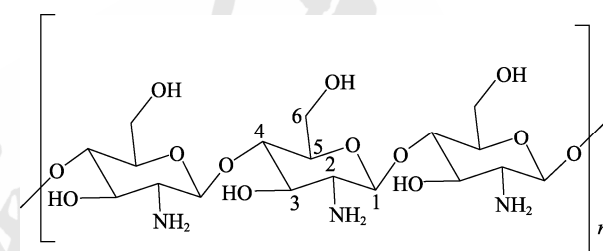


图 1 壳聚糖结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the structure of chitosan

2 提高水溶性策略

壳聚糖的酰化^[34]、羧化^[35]、酯化^[36]、醚化^[37]、季铵化^[38]均是增加溶解度的方法,季铵化壳聚糖在 siRNA 递送方面最常用。

三甲基壳聚糖(*N,N,N*-trimethyl chitosan, TMC)是一种部分季铵化衍生物,在中性环境中带有大量的正电荷,改善了壳聚糖的水溶性和对 siRNA 的络合能力^[39]。TMC 的合成过程也非常简单,即通过壳聚糖部分 C2-NH₂ 基团与碘甲烷之间的甲基化反应合成 TMC^[40],剩余的氨基和羟基可以使用聚乙二醇、多肽、糖类等修饰,增加 TMC 的靶向性,见图 2。目前已经有很多研究者采用 TMC 作为 siRNA 递送纳米系统载体开展研究。

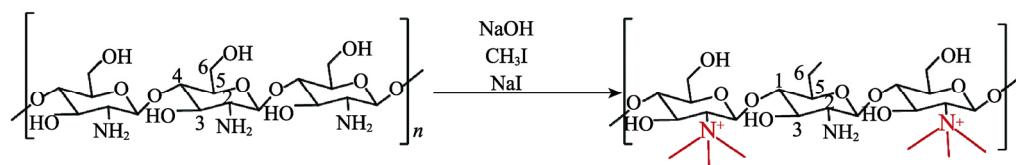


图 2 三甲基化壳聚糖形成示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the formation of trimethylated chitosan

狂犬病病毒蛋白(rabies virus glycoprotein, RVG)衍生多肽可以与神经细胞上的烟碱型乙酰胆碱受体特异性结合,从而穿透血脑屏障选择性地进入神经细胞,因此可以作为脑靶向配体^[41]。Gao等^[42]用RVG修饰TMC并负载siRNA用于阿尔茨海默病的治疗。他们将PEG与TMC结合,形成TMC-PEG复合物,增加载体的体循环时间和空间自由度。RVG的接枝过程分为2种,一种是直接接枝在PEG的表面,后与siRNA络合,形成纳米复合物(siRNA/TMC-RVG complexes linked RVG peptide prior to loading siRNA, TRs)。另一种是siRNA先与TMC-PEG络合之后,RVG再与PEG接枝,形成纳米复合物(siRNA/TMC-RVG complexes loaded with siRNA prior to linking RVG peptide, TsR)。实验结果表明,在N/P比均为24/1的条件下,TRs的粒径为(135±7)nm,TRs的粒径为(207±2)nm,这表明在与RVG多肽连接之前通过负载siRNA可以获得更小的复合体。除此之外,TRs还表现为更好的血清稳定性和可忽略不计的细胞毒性。 γ -B型氨基丁酸受体(γ -aminobutyric acid type B receptor, GABA_B)在肺部高度表达^[43],巴氯芬(baclofen, Bac)作为GABA_B配体,可以用作肺部靶向。Ni等^[44]曾构建Bac功能化的TMC聚合物载体(Bac-TMC),完成siRNA向肺部递送。与未修饰的载体相比,Bac-TMC显著增加靶细胞的摄取能力以及肺癌细胞基因沉默和细胞凋亡效率。除了肺癌之外,TMC在其他肿瘤领域的应用也相继报道。Nikkhoo等^[45]采用了羧甲基葡聚糖(carboxymethyl dextran, CMD)偶联TMC纳米粒,并同时递送siRNA和BV6化疗药物,用于治疗乳腺癌、结直肠癌和黑色素瘤。CMD的使用进一步增加了TMC的溶解度与稳定性,同时降低了TMC的毒性,证明了CMD-TMC作为siRNA纳米递送系统中载体的巨大优势。

TMC能够以短暂和可逆的方式开放肠上皮细胞间的紧密连接,从而通过细胞旁吸收增加上皮细胞的通透性,因此在口服方面的应用也极为广泛^[46]。Zhang等^[47]先后将半乳糖、半胱氨酸与TMC偶联,合成了半乳糖化三甲基壳聚糖-半胱氨酸复合物(galactosylated trimethyl chitosanecysteine, GTC)。GTC在三聚磷酸盐(tripolyphosphate, TPP)或透明质酸(hyaluronic acid, HA)交联作用下制备

了负载Map4k4 siRNA GTC纳米粒,并通过口服途径治疗由TNF- α 引起的溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)。半乳糖的使用提高了靶向目的细胞的能力,半胱氨酸的偶联可以增强载体在胃肠道的黏附能力,从而增加细胞的摄取与基因的转染效率。体外TNF- α 基因敲除试验表明,GTC负载Map4k4 siRNA纳米粒可以抑制脂多糖刺激的Raw 264.7细胞中TNF- α 的表达,治疗效果优于Lipofectamine2000负载的Map4k4 siRNA。Han等^[48]采用静电络合法制备了负载VEGF siRNA和pDNA GTC纳米粒,用于口服治疗肝癌的目的,同时探究半乳糖的不同接枝密度对肠道吸收、细胞摄取、抗肿瘤活性的影响;实验结果表明半乳糖的接枝密度为25.2% GTC的肠道转运能力低于接枝密度为6.8%和17.3%,接枝密度为6.8%的GTC的靶细胞摄取能力要远低于其他2组,接枝密度为17.3%的GTC纳米粒的基因沉默效率最高。研究表明^[49],甘露糖接枝的TMC-半胱氨酸复合物(mannose-modified trimethyl chitosan-cysteine, MTC)能够克服各种细胞屏障,对口服siRNA治疗慢性炎症具有很大优势。He等^[50]通过调整交联剂的种类和数量,使得MTC络合的siRNA具有不同的释放特性,那么较高siRNA释放率的MTC纳米粒更适合在短时间内发挥基因沉默能力,对急性炎症有明显的治疗效果,相反,具有缓释效果的MTC纳米粒更加适合慢性炎症的治疗。

3 提高转染效率策略

作为siRNA纳米递送载体,壳聚糖与其他阳离子相比具有公认的低转染效率,很难使siRNA获得较好的沉默效率,因此受到一定限制。当今的研究者们试图通过接枝其他阳离子片段或者引入疏水基团改变壳聚糖的电荷密度、分子量和缓冲能力,从而提高壳聚糖纳米颗粒的转染效率。

3.1 壳聚糖-聚乙烯亚胺(chitosan-polyethylenimine, CS-PEI)偶联物

PEI具有高效的质子缓冲能力,但因毒性较大,导致无法应用于临床^[51]。将壳聚糖与PEI偶联,在解决PEI毒性的同时,增加了壳聚糖的转染效率^[52]。

Zhao等^[53]设计了一种由壳聚糖、PEI、HA组成的新型聚合物纳米递送系统,用于传递AQP2-siRNA治疗子宫内膜病变。其中,HA作为CD44受体配体,不仅能够显著增加纳米颗粒在病

变部位的积累,还能屏蔽 PEI 的表面电荷,降低其毒性,增加 siRNA 在血液中的稳定性;PEI 具有高的转染效率,和壳聚糖联用时解决其低转染缺点。Yan 等^[54]以 CS-PEI、甘草次酸(glycyrrhetic acid, GA)、4-肼基苯甲酸(4-hydrazinobenzoic, HBA)为原料制备了一种 pH 响应型胶束,用于阿霉素(doxorubicin, DOX)和 Bcl2 siRNA 的共传递。其中 HBA 通过 pH 敏感接枝在 CS-PEI 上,生成 DOX 前药聚合物;GA 能够特异性识别肝癌表现的特异性 GA 受体,将其修饰在该纳米载体的表面有利于提高载体的主动靶向能力。实验结果表明,GA-CS-PEI-HBA-DOX@siRNA 纳米胶束在血液中的循环时间增加,提高了药物在肿瘤细胞的摄取率。肝癌细胞内的酸性环境可通过触发糖苷键断裂,有效地促进 DOX 和 siRNA 的靶向释放。更重要的是,该纳米递送系统可以有效地整合 siRNA 和化疗疗法,并在体外和体内增强对肿瘤的抑制。

3.2 二乙氨基乙基(diethylaminoethyl, DEAE)-壳聚糖偶联物

DEAE 是一种带有叔氨基团的有机化合物,该类化合物往往具有更加强大的质子缓冲能力^[55]。已经有研究表明将 DEAE 接枝到壳聚糖结构上,见图 3,可以使壳聚糖获得更高的胶体稳定性以及更好的缓冲能力,胶体稳定性和缓冲能力的提高可能有利于细胞质中的摄取过程和核酸的传递,提高转染效率^[56]。

De Souza 等^[57]制备了相对分子质量在 25~230 kDa 二乙氨基乙基壳聚糖(diethylaminoethyl chitosan, DEAE-CS)衍生物,并且发现 DEAE₁₅-CS 的相对分子质量在 130~230 kDa(取代度为 15%)时,可获得低电荷比(N/P: 2~3)和低分散系数(0.15~0.2)的纳米颗粒。与未被修饰的壳聚糖相比,DEAE₁₅-CS 表现出更高的缓冲能力,而且所有衍生物制备的纳米颗粒对不同细胞系(HeLa、MG-63、OV-3)均表现出 80%~90%的沉默效率。siRNA-TNF- α 干扰实验表明,该纳米颗粒完全抑

制 RAW 264.7 巨噬细胞 TNF- α mRNA 的表达水平,具有体内应用潜力。Shi 等^[58]将叶酸(folic acid, FA)通过 PEG 接枝在 DEAE₁₅-CS 表面,并负载 TNF α -siRNA 用于类风湿关节炎的治疗。实验结果表明,FA-PEG-DEAE₁₅-CS 保护 siRNA 免受核酸酶破坏,FA 与细胞表面受体结合使载体能够主动进入靶细胞的能力,纳米颗粒不会改变细胞活力,并显著减少炎症以及关节软骨破坏和骨丢失,因此 FA-PEG-DEAE₁₅-CS 是一种安全有效的 siRNA 递送系统,其潜在的临床应用价值需进一步研究。Martins 等^[59]通过控制壳聚糖的乙酰化度以及 DEAE 的取代度,从而改善了 siRNA 纳米颗粒的胶体稳定性和实现 siRNA 的高效缩合;通过罗丹明标记载体的共聚焦显微镜观察发现,该纳米颗粒表现出低毒和有效的细胞摄取,是良好的 siRNA 纳米载体。

3.3 细胞穿膜肽(cell penetrating peptides, CPP)-壳聚糖偶联物

CPP 是一类长为 5~30 氨基酸的多肽家族,可以通过能量依赖或能量不依赖机制穿过组织和细胞膜,具有高效的入胞效率,并且相对无毒^[60]。科学家根据其理化性质分为阳离子多肽、两亲多肽和疏水多肽,其中作为首次发现的 TAT 阳离子多肽已经得到广泛的研究^[61]。现如今通过 TAT 修饰壳聚糖衍生物增加 siRNA 转染效率方面的研究也被逐渐报道出来。

Bastaki 等^[62]将 TMC、硫代壳聚糖(thiolated chitosan, TC)纳米颗粒与 HA、TAT 肽结合设计成一种新型纳米递送系统(TAT-HA-TMC-TC),并同时携带 PD-L1/STAT3 siRNA 用于乳腺癌和黑色素瘤的治疗。实验结果表明该纳米载体负载的 siRNA 在 24 h 内具有较高的血清稳定性,共聚焦显微成像及流式细胞术表明了 TAT-HA 修饰的纳米载体几乎全部进入肿瘤细胞,并且有 75%的细胞被转染。MTT 试验显示了该纳米载体具有低毒、高安全特性,由此推测该纳米载体具有良好的 siRNA 递送能力。

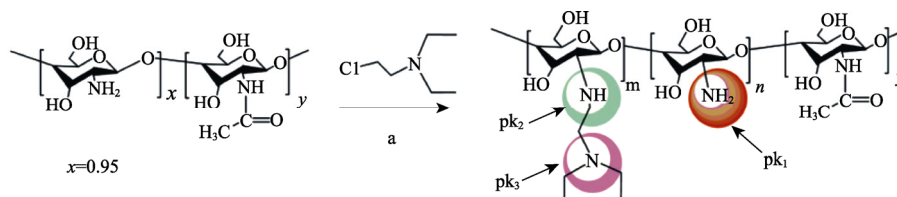


图 3 DEAE-CS 的合成过程

Fig. 3 Synthesis process of DEAE-CS

多肽偶联虽然在很大程度上提高了壳聚糖的转染效率,但仍不能与 PEI、DEAE 相比^[56,63]。

4 降低毒性策略

聚合物-脂质杂化载体结合了脂质材料和聚合物的优点,创建了一种纳米级、生物相容、高效的基因输送系统^[64],其中,壳聚糖成酯后解决壳聚糖阳离子纳米载体可能带来的细胞毒性,增加疏水性药物的溶解度和生物利用度,已经用作不同药物(siRNA、水飞蓟素、蛋白、肝素)的递送系统^[65-68]。壳聚糖-脂质杂化载体的合成过程有3种不同策略:①通过壳聚糖聚合物在预制的脂质纳米颗粒上的简单吸附来构建^[69];②直接将壳聚糖共价结合到脂质的表面,实现杂化脂质的自组装^[70]。③先将壳聚糖进行疏水基团的修饰,然后插入到脂质的表面,或者进行亲水基团的接枝将复合物包封在脂质材料内部^[71]。目前用于 siRNA 递送的杂化载体属于第3种策略。

Tezgel 等^[72]先将壳聚糖中的 C2-NH₂ 通过不同数量的十二烷基的修饰,形成不同相对分子质量和不同 C12 取代度的两亲性壳聚糖,再与卵磷脂、DOPE、DOTAP 等不同脂质材料采用一步超声法制备成壳聚糖脂质纳米粒(chitosan lipid nanoparticles, CS-LNPs), siRNA 通过静电结合作用吸附在 CS-LNPs 的表面,见图4。实验结果表明,摩尔质量为 15 000 g·mol⁻¹、C12 取代度为 2%的壳聚糖具有高效的基因沉默能力与细胞毒性。Saeed 等^[73]采用了邻苯二甲酸酯进行壳聚糖的疏水改性,成功合成壳聚糖-邻苯二甲酸酯(chitosan-phthalate, CSP)两亲性聚合物,并与卵磷脂(lecithin, LC)、TPP 制备出新型纳米粒。实验结果表明纳米粒子为椭圆形,大小约为 180 nm,具有新颖的双层壳层结构,在生理 pH 和血清溶液中具有稳定的稳定性。四甲基偶氮唑盐比色法和共聚焦荧光显微镜显示 CSP-LC-TPP 纳米粒具有低细胞毒性、高细胞摄取、

高效的内涵体逃逸等优点,并在 MDA-MB-453 肿瘤细胞中发现,它们对目的蛋白的沉默达到 44%,明显优于商业脂质体转染剂(沉默效率: 30%)。2022 年, Cao 等^[74]受 LNPs 的启发,提出了一种高安全性、稳定性、siRNA 可控释放的新型纳米载体系统。首先采用甲基丙烯酸酯基团对壳聚糖进行修饰,形成壳聚糖-甲基丙烯酸酯复合物(chitosan-methacrylate, CMA),使其具有水溶性和紫外光交联特性,然后 siRNA 与 CMA 混合,并将其用于脂质薄膜(Eggpc 或 DOTPA)的水化,接着经过挤出与超速离心,在紫外光的交联下得到一种壳聚糖的核/壳结构纳米凝胶(nanolipogel, NLG),见图5。体外释放试验证明,未交联的 NLG 在第5天时释放出 50% siRNA,而交联的 NLG 在第28天时才释放 32%,细胞毒性显示了当脂质材料浓度在 0.031 25 ~ 0.5 mmol·L⁻¹ 时不会对细胞产生任何毒性,并且表现出较高内涵体逃逸效率。

5 总结与展望

siRNA 是一种新型、高效、特异性强、易合成的药物,特别适合肿瘤、脑部疾病的治疗,但由于稳定性较差、易降解、逃逸迟缓等众多缺点,无法通过全身给药达到治疗疾病目的。现阶段研究表明,纳米递送系统对 siRNA 在体内进行有效的传递至关重要。一些毒性大、稳定性差、成药潜力低的纳米材料已经不具备递送 siRNA 的资格。壳聚糖虽然在安全性得到保证,但是水溶性差、转染效率低。不过壳聚糖的活性基团可被各种材料修饰,使其具有较高溶解度、低细胞毒性、高转染效率、高稳定性等优良特性。目前壳聚糖衍生物作为 siRNA 纳米载体材料,已经在阿尔茨海默病、肝癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、慢性肠炎、类风湿关节炎等不同疾病领域得到广泛的应用,因此我们相信在不远的将来,该纳米载体材料一定会应用于临床。

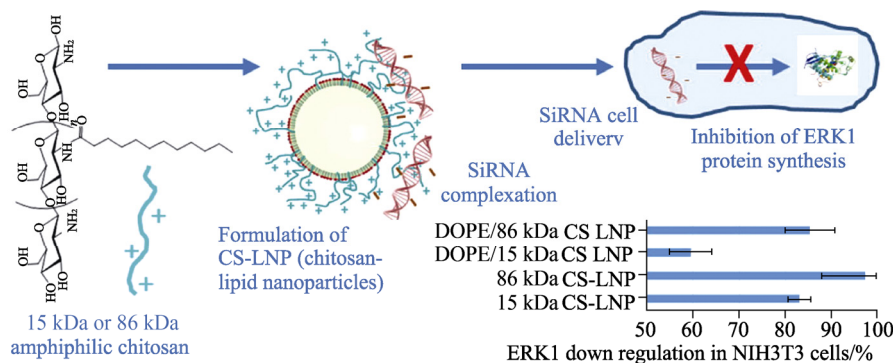


图4 CS-LNP 的形成过程^[68]

Fig. 4 Formation process of the CS-LNP^[68]

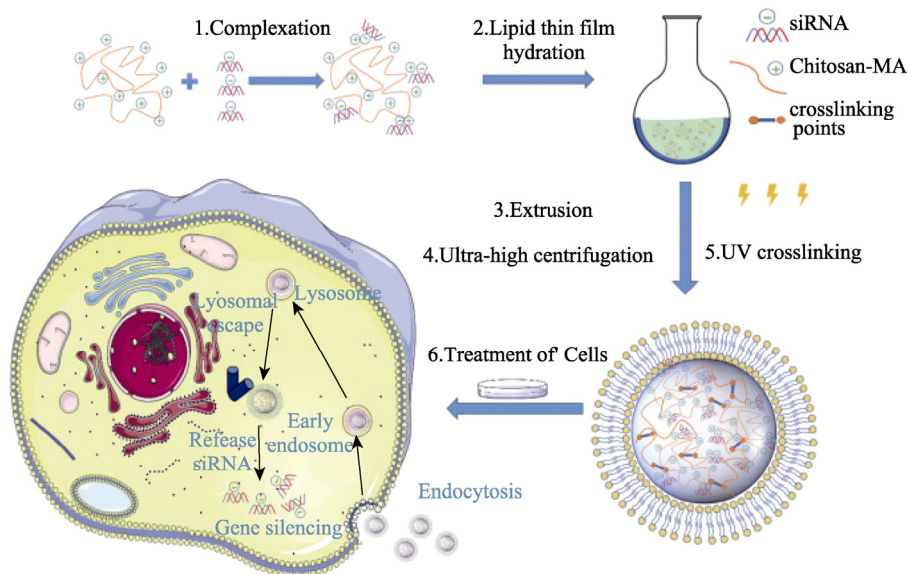


图 5 NLG 形成过程^[70]

Fig. 5 Formation process of the NLG^[70]

REFERENCES

- [1] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.
- [2] ZHENG M, TAO W, ZOU Y, et al. Nanotechnology-based strategies for siRNA brain delivery for disease therapy[J]. Trends Biotechnol, 2018, 36(5): 562-575.
- [3] CHEN L, QIN J, ZHU Y Y. The progress of RNA interference research in the field of medicine[J]. Pharm Biotechnol(药物生物技术), 2009, 16(1): 83-89.
- [4] FAKHR E, ZARE F, TEIMOORI-TOOLABI L. Precise and efficient siRNA design: A key point in competent gene silencing[J]. Cancer Gene Ther, 2016, 23(4): 73-82.
- [5] YUAN C L, JIN X L. Research progress on principle and application of RNA interference[J]. Med J West China(西部医学), 2009, 21(4): 664-666.
- [6] HU B, ZHONG L P, WENG Y H, et al. Therapeutic siRNA: State of the art[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 101.
- [7] NEUMEIER J, MEISTER G. siRNA specificity: RNAi mechanisms and strategies to reduce off-target effects[J]. Front Plant Sci, 2020(11): 526455.
- [8] CHO W G, ALBUQUERQUE R J, KLEINMAN M E, et al. Small interfering RNA-induced TLR3 activation inhibits blood and lymphatic vessel growth[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(17): 7137-7142.
- [9] DONG Y Z, SIEGWART D J, ANDERSON D G. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2019(144): 133-147.
- [10] FISCHER T, TSCHERNIG T, DREWS F, et al. siRNA delivery to macrophages using aspherical, nanostructured microparticles as delivery system for pulmonary administration[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2021(158): 284-293.
- [11] AIGNER A, KÖGEL D. Nanoparticle/siRNA-based therapy strategies in glioma: Which nanoparticles, which siRNAs?[J]. Nanomedicine (Lond), 2018, 13(1): 89-103.
- [12] WANG C R, WANG X X, DU L L, et al. Harnessing pH-sensitive polycation vehicles for the efficient siRNA delivery[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13(2): 2218-2229.
- [13] SAW P E, SONG E W. siRNA therapeutics: A clinical reality[J]. Sci China Life Sci, 2020, 63(4): 485-500.
- [14] ZHANG M M, BAHAL R, RASMUSSEN T P, et al. The growth of siRNA-based therapeutics: Updated clinical studies[J]. Biochem Pharmacol, 2021(189): 114432.
- [15] AIMO A, CASTIGLIONE V, RAPEZZI C, et al. RNA-targeting and gene editing therapies for transthyretin amyloidosis[J]. Nat Rev Cardiol, 2022, 19(10): 655-667.
- [16] CURTIS K A, MILLER D, MILLARD P, et al. Unusual salt and pH induced changes in polyethylenimine solutions[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0158147.
- [17] MARSON D, LAURINI E, AULIC S, et al. Evolution from covalent to self-assembled PAMAM-based dendrimers as nanovectors for siRNA delivery in cancer by coupled in silico-experimental studies. part I: Covalent siRNA nanocarriers[J]. Pharmaceutics, 2019, 11(7): 351.
- [18] WANG X Y, LIOW S S, WU Q Q, et al. Codelivery for paclitaxel and Bcl-2 conversion gene by PHB-PDMAEMA amphiphilic cationic copolymer for effective drug resistant cancer therapy[J]. Macromol Biosci, 2017, 17(11): 1700186.
- [19] YONEZAWA S, KOIDE H, ASAI T. Recent advances in siRNA delivery mediated by lipid-based nanoparticles[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2020(154/155): 64-78.
- [20] LIU D Z, CHENG Y, CAI R Q, et al. The enhancement of siPLK1 penetration across BBB and its anti glioblastoma activity *in vivo* by magnet and transferrin co-modified nanoparticle[J]. Nanomed-Nanotechnol Biol Med, 2018, 14(3): 991-1003.
- [21] GUO P. Dual functionalized amino poly (glycerol methacrylate) with guanidine and schiff-base linked imidazole for gene delivery[D]. Tianjin: Tianjin University of

Technology, 2016.

- [22] LI C, ZHAO Z H, LUO Y F, et al. Macrophage-disguised Manganese dioxide nanoparticles for neuroprotection by reducing oxidative stress and modulating inflammatory microenvironment in acute ischemic stroke[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(20): e2101526.
- [23] SHANDILYA S, RANI P, ONTERU S K, et al. Natural ligand-receptor mediated loading of siRNA in milk derived exosomes[J]. *J Biotechnol*, 2020(318): 1-9.
- [24] SINGH C S B, EYFORD B A, ABRAHAM T, et al. Discovery of a highly conserved peptide in the iron transporter melanotransferrin that traverses an intact blood brain barrier and localizes in neural cells[J]. *Front Neurosci*, 2021(15): 596976.
- [25] KARIMOV M, SCHULZ M, KAHL T, et al. Tyrosine-modified linear PEIs for highly efficacious and biocompatible siRNA delivery *in vitro* and *in vivo*[J]. *Nanomedicine*, 2021(36): 102403.
- [26] SILVIO D D, MARTÍNEZ-MORO M, SALVADOR C, et al. Self-assembly of poly(allylamine)/siRNA nanoparticles, their intracellular fate and siRNA delivery[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2019(557): 757-766.
- [27] XIONG F, SU F, LU S N, et al. Preparation process of poly(allylamine) hydrochloride nanoparticles and preliminary evaluation of pharmaceuticals[J/OL]. *Cent South Pharm(中南药学)*, 2022, 20(12): 2804-2812.
- [28] ZHANG L L, LI Q P, CHEN J X, et al. Enhanced antitumor efficacy of glutathione-responsive chitosan based nanoparticles through co-delivery of chemotherapeutics, genes, and immune agents[J]. *Carbohydr Polym*, 2021(270): 118384.
- [29] WANG W Q, MENG Q Y, LI Q, et al. Chitosan derivatives and their application in biomedicine[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2): 487.
- [30] BOROUMAND H, BADIE F, MAZAHARI S, et al. Chitosan-based nanoparticles against viral infections[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021(11): 643953.
- [31] LIANG Y, LIU W S, HAN B Q, et al. Fabrication and characters of a corneal endothelial cells scaffold based on chitosan[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2011, 22(1): 175-183.
- [32] SUN Y, DING W H, LI B Y, et al. Research progress in miRNA/siRNA delivery by chitosan and its derivatives[J]. *Chemistry(化学通报)*, 2022, 85(2): 186-191.
- [33] RAZMI F A, NGADI N, WONG S, et al. Kinetics, thermodynamics, isotherm and regeneration analysis of chitosan modified pandan adsorbent[J]. *J Clean Prod*, 2019(231): 98-109.
- [34] NANDA B, MANJAPPA A S, CHUTTANI K, et al. Acylated chitosan anchored paclitaxel loaded liposomes: Pharmacokinetic and biodistribution study in Ehrlich ascites tumor bearing mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019(122): 367-379.
- [35] MOHAMMADI E, DARAEI H, GHANBARI R, et al. Synthesis of carboxylated chitosan modified with ferromagnetic nanoparticles for adsorptive removal of fluoride, nitrate, and phosphate anions from aqueous solutions[J]. *J Mol Liq*, 2019(273): 116-124.
- [36] YANG Y, XING R E, LIU S, et al. Immunostimulatory effects of sulfated chitosans on RAW 264.7 mouse macrophages via the activation of PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018(108): 1310-1321.
- [37] BAKSHI P S, SELVAKUMAR D, KADIRVELU K, et al. Chitosan as an environment friendly biomaterial - a review on recent modifications and applications[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020(150): 1072-1083.
- [38] WEI L J, MI Y Q, ZHANG J J, et al. Evaluation of quaternary ammonium chitosan derivatives differing in the length of alkyl side-chain: Synthesis and antifungal activity[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019(129): 1127-1132.
- [39] YIN L C, DING J Y, HE C B, et al. Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(29): 5691-5700.
- [40] SNYMAN D, HAMMAN J H, KOTZE J S, et al. The relationship between the absolute molecular weight and the degree of quaternisation of *N*-trimethyl chitosan chloride[J]. *Carbohydr Polym*, 2002, 50(2): 145-150.
- [41] HAN Y, CHU X Y, CUI L, et al. Neuronal mitochondria-targeted therapy for Alzheimer's disease by systemic delivery of resveratrol using dual-modified novel biomimetic nanosystems[J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 502-518.
- [42] GAO Y K, WANG Z Y, ZHANG J H, et al. RVG-peptide-linked trimethylated chitosan for delivery of siRNA to the brain[J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(3): 1010-1018.
- [43] KIM T J, LEE S T, SHIN J W, et al. Clinical manifestations and outcomes of the treatment of patients with GABAB encephalitis[J]. *J Neuroimmunol*, 2014, 270(1-2): 45-50.
- [44] NI S H, LIU Y, TANG Y, et al. GABA_B receptor ligand-directed trimethyl chitosan/tripolyphosphate nanoparticles and their pMDI formulation for survivin siRNA pulmonary delivery[J]. *Carbohydr Polym*, 2018(179): 135-144.
- [45] NIKKHOO A, ROSTAMI N, FARHADI S, et al. Codelivery of STAT3 siRNA and BV6 by carboxymethyl dextran trimethyl chitosan nanoparticles suppresses cancer cell progression[J]. *Int J Pharm*, 2020(581): 119236.
- [46] SONAJE K, LIN K J, TSENG M T, et al. Effects of chitosan-nanoparticle-mediated tight junction opening on the oral absorption of endotoxins[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(33): 8712-8721.
- [47] ZHANG J, TANG C, YIN C H. Galactosylated trimethyl chitosan-cysteine nanoparticles loaded with Map4k4 siRNA for targeting activated macrophages[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(14): 3667-3677.
- [48] HAN L, TANG C, YIN C H. Oral delivery of shRNA and siRNA via multifunctional polymeric nanoparticles for synergistic cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(15): 4589-4600.
- [49] HE C B, YIN L C, SONG Y D, et al. Optimization of multifunctional chitosan-siRNA nanoparticles for oral delivery applications, targeting TNF- α silencing in rats[J]. *Acta Biomater*, 2015(17): 98-106.
- [50] HE C B, YUE H M, XU L, et al. siRNA release kinetics from polymeric nanoparticles correlate with RNAi efficiency and inflammation therapy via oral delivery[J]. *Acta Biomater*,

- 2020(103): 213-222.
- [51] XUE L, YAN Y F, KOS P, et al. PEI fluorination reduces toxicity and promotes liver-targeted siRNA delivery[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2021, 11(1): 255-260.
 - [52] ZHANG W, PAN S, WEN Y, et al. Synthesis of poly(ethylene glycol)-g-chitosan-g-poly(ethylene imine) co-polymer and *in vitro* study of its suitability as a gene-delivery vector[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2010, 21(6/7): 741-758.
 - [53] ZHAO M D, CHENG J L, YAN J J, et al. Hyaluronic acid reagent functional chitosan-PEI conjugate with AQP2-siRNA suppressed endometriotic lesion formation[J]. *Int J Nanomedicine*, 2016(11): 1323-1336.
 - [54] YAN T S, ZHU S Y, HUI W X, et al. Chitosan based pH-responsive polymeric prodrug vector for enhanced tumor targeted co-delivery of doxorubicin and siRNA[J]. *Carbohydr Polym*, 2020(250): 116781.
 - [55] WYTRWAL M, LEDUC C, SARNA M, et al. Gene delivery efficiency and intracellular trafficking of novel poly (allylamine) derivatives[J]. *Int J Pharm*, 2015, 478(1): 372-382.
 - [56] DE PAULA PANSANI OLIVEIRA F, DALLA PICOLA I P, SHI Q, et al. Synthesis and evaluation of diethylethylamine-chitosan for gene delivery: Composition effects on the *in vitro* transfection efficiency[J]. *Nanotechnology*, 2013, 24(5): 055101.
 - [57] DE SOUZA R H F V, PICOLA I P D, SHI Q, et al. Diethylaminoethyl- chitosan as an efficient carrier for siRNA delivery: Improving the condensation process and the nanoparticles properties[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018(119): 186-197.
 - [58] SHI Q, RONDON-CAVANZO E P, DALLA PICOLA I P, et al. *In vivo* therapeutic efficacy of TNF α silencing by folate-PEG-chitosan-DEAE/siRNA nanoparticles in arthritic mice[J]. *Int J Nanomedicine*, 2018(13): 387-402.
 - [59] MARTINS G O, SEGALLA PETRÔNIO M, FURUYAMA LIMA A M, et al. Amphipathic chitosans improve the physicochemical properties of siRNA-chitosan nanoparticles at physiological conditions[J]. *Carbohydr Polym*, 2019(216): 332-342.
 - [60] DOS SANTOS RODRIGUES B, LAKKADWALA S, KANEKIYO T, et al. Development and screening of brain-targeted lipid-based nanoparticles with enhanced cell penetration and gene delivery properties[J]. *Int J Nanomedicine*, 2019(14): 6497-6517.
 - [61] XIE Y Y, WANG S J, YUAN Q, et al. Advances in the research and application of cell penetrating peptides[J]. *Chin J Biotechnol*, 2019, 35(7): 1162-1173.
 - [62] BASTAKI S, ARAVINDHAN S, AHMADPOUR SAHEB N, et al. Codelivery of STAT3 and PD-L1 siRNA by hyaluronate-TAT trimethyl/thiolated chitosan nanoparticles suppresses cancer progression in tumor-bearing mice[J]. *Life Sci*, 2021(266): 118847.
 - [63] SUN B, ZHAO R L, KONG F Q, et al. Phosphorylatable short peptide conjugation for facilitating transfection efficacy of CS/DNA complex[J]. *Int J Pharm*, 2010, 397(1/2): 206-210.
 - [64] TARIQ I, PINNAPIREDDY S R, DUSE, et al. Lipodendriplexes: A promising nanocarrier for enhanced gene delivery with minimal cytotoxicity[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019(135): 72-82.
 - [65] EL-SAYED N S, SHARMA M, ALIABADI H M, et al. Synthesis, characterization, and *in vitro* cytotoxicity of fatty acyl-CGKRK-chitosan oligosaccharides conjugates for siRNA delivery[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 112: 694-702.
 - [66] LIANG J, LIU Y, LIU J G, et al. Chitosan-functionalized lipid-polymer hybrid nanoparticles for oral delivery of silymarin and enhanced lipid-lowering effect in NAFLD[J]. *J Nanobiotechnology*, 2018, 16(1): 64.
 - [67] DONG W, WANG X H, LIU C, et al. Chitosan based polymer-lipid hybrid nanoparticles for oral delivery of enoxaparin[J]. *Int J Pharm*, 2018, 547(1/2): 499-505.
 - [68] SARMENTO B, MAZZAGLIA D, BONFERONI M C, et al. Effect of chitosan coating in overcoming the phagocytosis of insulin loaded solid lipid nanoparticles by mononuclear phagocyte system[J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 84(3): 919-925.
 - [69] BUGNICOURT L, LADAVIÈRE C. A close collaboration of chitosan with lipid colloidal carriers for drug delivery applications[J]. *J Control Release*, 2017(256): 121-140.
 - [70] DANHIER F, MESSAOUDI K, LEMAIRE L, et al. Combined anti-Galectin-1 and anti-EGFR siRNA-loaded chitosan-lipid nanocapsules decrease temozolomide resistance in glioblastoma: *in vivo* evaluation[J]. *Int J Pharm*, 2015, 481(1/2): 154-161.
 - [71] LEPELTIER E, LORETZ B, DESMAËLE D, et al. Squalenoylation of chitosan: A platform for drug delivery?[J]. *Biomacromolecules*, 2015, 16(9): 2930-2939.
 - [72] TEZGEL Ö, SZARPAK-JANKOWSKA A, ARNOULD A, et al. Chitosan-lipid nanoparticles(CS-LNPs): Application to siRNA delivery[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2018(510): 45-56.
 - [73] SAEED R M, ABDULLAH M, AHRAM M, et al. Novel ellipsoid chitosan-phthalate lecithin nanoparticles for siRNA delivery[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021(9): 695371.
 - [74] CAO Y, TAN Y F, WONG Y S, et al. Designing siRNA/chitosan-methacrylate complex nanolipogel for prolonged gene silencing effects[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 3527.

收稿日期: 2022-07-22

(本文责编: 曹粤锋)