

siRNA 体内递送的研究现状

赵云春¹, 张丽², 郑彩虹^{3*} (1.浙江工业大学药学院, 杭州 310014; 2.浙江大学医学院, 杭州 310006; 3.浙江大学医学院附属妇产科医院, 杭州 310006)

摘要: RNAi 是用来沉默特定基因的一个强有力的研究工具, 并为基因治疗策略带来新希望。目前已经用于治疗肿瘤、乙型肝炎、老年性黄斑变性等疾病。RNAi 的效应分子为小分子干扰 RNA(siRNA), 然而裸 siRNA 自身具有电负性、分子量大、极性、半衰期短, 以及容易被内源酶降解和肾小球滤过等缺陷, 使其临床应用受到极大的限制。如何通过对 siRNA 进行化学修饰和载体构建, 包括运用病毒性载体和非病毒性载体, 以提高 siRNA 的体内稳定性, 成为当前的研究重点。本文对 siRNA 结构的化学修饰、siRNA 的载体递送以及临床试验等研究现状予以综述。

关键词: RNAi; siRNA; 体内递送; 载体; 临床试验

中图分类号: R963

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)12-1366-08

Current Status of siRNA Delivery

ZHAO Yunchun¹, ZHANG Li², ZHENG Caihong^{3*} (1.College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2.School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; 3.Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: RNAi is a powerful research tool used to silence specific genes. It brings a new hope for gene therapy strategy. At present, it is used to treat a variety of diseases as tumour, hepatitis B, exudative age-related macular degeneration and so on. RNAi's effector molecule is small interference RNA (siRNA). However, because of its negative charge, large molecule weight, strong polarity, short plasma half-life, readily degraded by serum endonucleases and efficiently removed by glomerular filtration, the clinical application of naked siRNA is greatly limited. Both the chemical modification of siRNA and carriers of siRNA including viral vectors and non-viral vectors can improve the stability of siRNA *in vivo*. Here, with the latest developments of the chemical modification of siRNA, carriers of siRNA delivery, clinical research of siRNA are summarized in this review.

KEY WORDS: RNAi; siRNA; *in vivo* delivery; vector; clinic trial

自 10 多年前 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术发现以来, RNAi 已经成为细胞遗传的关键调节器和阐明机体生长、发病机制和衰老的有力工具。RNAi 包括一系列短的双链或单链寡核苷酸, 通过特殊的通道引发基因沉默^[1]。这种沉默机制最初是在 1998 年, 美国科学家安德鲁法尔和克雷梅洛在研究线虫发育缺陷时发现的, 这 2 位科学家也因此获得了 2006 年的诺贝尔生理学 and 医学奖^[2]。2001 年, Tuschl 小组发现了人工合成的 siRNA 可诱导哺乳动物体内的 RNAi 现象。它的发生过程主要是 dsRNA 首先被核酸内切酶切割成长为 20~25 nt 的小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA), siRNA 与相关的蛋白质结合成 RNA

诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC), RISC 通过 siRNA 的引导识别并降解靶基因的 mRNA (messenger RNA, mRNA), 使特定蛋白的表达受到抑制, 进而特异性导致基因沉默^[3]。RNAi 成功的关键在于是否能将 siRNA 完整地转染入靶细胞, 与靶基因 mRNA 结合, 其中 siRNA 在体内的稳定性具有重要意义。研究表明: 通过对 siRNA 结构进行化学修饰和对 siRNA 骨架进行载体修饰是提高 siRNA 体内传递稳定性的 2 个重要途径。

1 siRNA 体内递送的障碍

siRNA 发挥作用时具有高度的序列特异性和很强的靶向性。RNAi 具有级联放大效应, 极少量

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173000)

作者简介: 赵云春, 女, 硕士生 Tel: 15858178673
(0571)87037005 E-mail: chzheng@zju.edu.cn

E-mail: ycZHAO0204@126.com

*通信作者: 郑彩虹, 女, 博士, 主任药师

Tel:

的双链核糖核酸(double-stranded RNA, dsRNA)便可降解比自身浓度大得多的 mRNA, 同时在不同细胞间可以长距离传递和维持^[2], 但体内注射 siRNA 后, 复合物必须经过全身循环系统, 尽可能避免肾脏肾小球的滤过, 吞噬细胞的吞噬, 血清蛋白吸附和内源性核酸酶的降解, 以及网状内皮系统(RES)的滞留才能到达靶细胞。siRNA 在血清中的稳定性较差, 容易被核酸酶 RNase 降解。静脉注射 siRNA 后, siRNA 通过血液循环分布到各大器官, 同时经历消除。siRNA 经血管进入组织间质(外渗), 然后横跨间质到达靶细胞, 到达靶细胞后通过内吞摄取。在此过程中, siRNA 被内涵体启动的内吞小囊泡包埋, 必须从内涵体逃逸, 释放到细胞质中, 并加载至 RISC 方能发挥作用^[3]。siRNA 的外渗和穿透能力取决于靶组织的物理结构, 而它的胞内摄取量还与 siRNA 与载体的表面性质有关。将 siRNA 传递到靶部位的最大障碍是内涵体对 siRNA 和载体的包埋和溶酶体对 siRNA 和载体的降解^[4]。

2 siRNA 的化学稳定性及其结构的修饰

siRNA 在体内发挥治疗作用的关键在于转染的有效性, 并且取决于 siRNA 在血清中的稳定性。双链 siRNA 的稳定性比单链强, 但是在血清 RNase 的作用下, 双链 siRNA 在数小时后也会被降解殆尽。对 siRNA 双链分子进行某些化学基团的修饰, 可以在保持 RNAi 活性不变的前提下, 提高 siRNA 的稳定性、细胞的穿透性、靶基因的沉默效应, 并改善其药动学特性^[5]。研究表明: 在进行修饰时, 正义链比反义链耐受, 末端区域比中间区域耐受^[4]。目前理想的 siRNA 化学修饰主要包括骨架修饰、糖修饰、核酸碱基修饰、5'或 3'末端修饰等^[6]。

2.1 骨架修饰

硫代磷酸酯(P=S)骨架修饰已被广泛用于修饰反义 DNA 寡核苷酸链来增强其稳定性。虽然 P=S 骨架修饰的 siRNA 几乎没有增强抵抗核酸酶降解的能力, 但仍保留了沉默基因的作用, 并且 siRNA 的摄取量也得到提升^[7]。当用 P=O 部分或完全取代 P=S 时, 观察到有细胞毒性的出现^[8]。另有研究表明, siRNA 的硼烷磷酸酯(P=B)骨架修饰能显著增强对核酸酶的抵抗力, 并且对双链的正义链或末端进行 P=B 骨架修饰后, 不会抑制 siRNA 的

沉默活性^[9]。

2.2 糖修饰

常见的 siRNA 糖修饰主要包括 2'-F, 2'-O-甲基, 2'-胺, 2'-脱氧和锁状核酸(LAN)修饰, 这些修饰均能显著提高 siRNA 在血清中的稳定性^[6]。与仅可以通过化学合成掺入的其他 2'修饰相比, 2'-F 可以通过体内转录掺入。用 2'-F-核苷酸取代所有嘧啶的长双链 RNA, 保留了被重组 dicer 酶剪切成短双链 siRNA 的能力^[6]。体内研究表明^[10]: 2'-F-嘧啶 siRNA 双链抑制了小鼠靶基因的沉默, 与没有修饰的 siRNA 相比, 延长了血浆中的消除半衰期, 但这种延长的半衰期并不能增强 siRNA 的效能。用 2'-O-甲基修饰双链 siRNA 会消除 siRNA 的活性, 而仅仅在正义链修饰则不会。目前, 用 2'-O-甲基修饰正义链的末端常用于市售双链 siRNA。锁状核酸通过 2'-O 和 4'-C 之间的亚甲基桥联而成, 它不影响 RNA 分子的立体结构, 并能增强寡核苷酸的稳定性^[11]。此外, 2'-O-(2-甲氧基乙基)和 4'-硫也作为替代方案进行了研究。

2.3 核酸碱基修饰

由于 siRNA 是通过与靶向的 mRNA 碱基互补配对形成氢键而发挥 RNAi 的作用, 因而可以通过对碱基的修饰而达到增强 siRNA 对靶 mRNA 的效应。siRNA 的核酸碱基修饰包括 5-溴尿嘧啶残基, 5-碘尿嘧啶残基, 4-硫尿嘧啶残基, N-3-甲基-尿嘧啶残基, 5-(3-氨酰基)-尿嘧啶残基, 次黄嘌呤核苷残基和 2,6-二氨基嘌呤残基修饰^[12]。对秀丽隐杆线虫的研究发现, 用 4-硫尿嘧啶残基和 5-溴尿嘧啶残基修饰的 siRNA 保留活性, 而用 5-(3-氨酰基)-尿嘧啶残基修饰后 siRNA 活性被消除。另一发现是: siRNA 双链的核酸碱基修饰在正义链和末端的耐受性比反义链和中间区域的耐受性要好^[13]。

2.4 末端修饰

通过 siRNA 的末端修饰, 与配体如胆固醇、叶酸、生物素或荧光分子形成共轭, 可使 siRNA 药效学特性加强或使其引入特殊的功能。研究表明正义链的 5'端和 3'端的修饰均具有良好的耐受性, 并能保留 siRNA 的功能^[14]。siRNA 的正义链与胆固醇或叶酸基团共轭使 siRNA 在具有药物属性的同时可以被选择性地递送到肝、空肠癌细胞中。

对于反义链, 5'-磷酸基团对 siRNA 双链的 RNAi 活性至关重要。5'-磷酸基团的引入可以是通

过化学合成,也可以是通过内源性蛋白激酶的磷酸化。阻断功能性反义链末端 5'-羟基会消除 siRNA 的基因沉默活性,然而只要有 5'-磷酸二酯存在,进行的化学修饰就具有耐受性。一般对反义链上 3'-末端修饰,如 3'-生物素修饰具有良好的耐受性,但用 3'-2-羟基乙基-磷酸修饰会导致基因沉默功能的消失^[14]。

化学合成的 siRNA 双链通常有 2 个脱氧核苷酸悬突在其 3'-末端,和由 dicer 酶剪切而成的 3'-悬突的 siRNA 双链类似。这种 3'-悬突增强了 siRNA 双链的稳定性和 siRNA 装载到 RISC 复合物引发基因沉默的有效性^[12]。此外,在一项对不同长度的 siRNA 双链激活没有 3'末端悬突的干扰素系统的研究中,发现 3'-悬突的存在还能增强免疫反应^[15]。

3 siRNA 的载体递送

裸 siRNA 自身带负电,分子量大,极性强,很难穿过细胞膜、血管内皮,容易在脾脏滞留,在生物体内容易被核酸酶降解,半衰期短,转染效率低,甚至会产生强烈的炎症反应等。因此,siRNA 的体内稳定性对其疗效的发挥至关重要。利用各种载体的协助,将 siRNA 通过不同的手段高效地递送到靶细胞是当前研究的重点。

3.1 病毒载体递送

基因编码的发夹结构,包括短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA)和小分子 RNA (microRNA, miRNA),被插入到病毒载体,内源性表达 RNA,在宿主细胞的胞质中被加工成 siRNA^[16]。这种方法的优点在于单次给药后可以获得干扰 RNA 的长期表达,这是理想的慢性疾病如艾滋病感染的治疗方法^[17]。病毒介导的 RNAi 在“难转染细胞”中研究较多,如用于治疗多种神经系统疾病,包括亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏症、肌萎缩性(脊髓)侧索硬化症和朊病毒症等。

腺病毒载体已被广泛应用于 siRNA 的递送,为中等大小、具有核衣壳和线性双链 DNA 基因组的无包膜病毒^[16]。这些病毒一般市售用于 RNAi 技术。然而,由于其具有较大的肝毒性和免疫反应上的风险^[18],以及降低基因载体的稳定性限制了这些病毒载体的应用。此类载体多用于局部注射,如 shRNA 腺病毒载体局部注射在治疗肿瘤方面取得了较好的效果。腺相关病毒(adenovirus

associated virus, AAV)是具有单链 DNA 的小分子病毒,较腺病毒细胞毒性低,对人类无致病性,并具有感染分裂和非分裂细胞的能力^[19]。shRNA 借助于 AAV 载体的递送用于肿瘤治疗,无论是动物模型还是临床应用均有研究。和腺病毒载体相似,也采用局部定向注射,遗传信息的表达是瞬时完成的^[16]。

逆转录病毒是单链 RNA 病毒,它可以与宿主基因融合而达到持久的表达,早期在临床上用于基因的递送。早期的逆转录病毒载体不具有感染非分裂细胞的能力,在临床研究中曾引起严重的 X 染色体相关免疫缺陷综合症^[20]。对此类病毒载体的安全性关注刺激了可替代的策略探究。最近的一项研究显示^[21]:在 T-细胞系中通过使用逆转录病毒递送 shRNA,可成功抑制 HIV-1。慢病毒,是逆转录病毒的一个亚类,它有 2 个单链 RNA 基因组,包埋在一个衣壳中,能够感染分裂和非分裂细胞,转染效率也大大增加。慢病毒对非分裂细胞具有更好的靶向性,特别适用于神经元细胞。局部注射带有慢病毒载体的 shRNA 到大脑中具有成功调控达到特定靶位的能力。当前临床试验上用慢病毒作为载体递送 shRNA 到造血干细胞,此时的体外转染细胞被浸润到 HIV 阳性患者中^[22]。不久后,昆虫杆状病毒系统被应用到 RNAi 上,因其不能在哺乳动物细胞内复制而提供了一个更安全的病毒载体替代品。有报道指出由杆状病毒递送的 shRNA 可以靶向病毒感染,如流行性感 A、B 和 HCV。但由于 RNA 病毒载体具有很高突变性,目的基因存在突变倾向,同时病毒融合到基因组中可能导致其他变异,因此慢病毒载体的应用也受到极大的限制^[23]。

3.2 非病毒载体递送

对 siRNA 结构的化学修饰,可以在一定程度上提高药物的稳定性,但是可能会影响其活性并且制备成本颇高;使用病毒载体会出现一些不良反应,有潜在的免疫原性和致癌性等问题,因此非病毒载体已成为越来越受欢迎的替代品。非病毒 siRNA 载体通常将带正电荷的载体(例如,阳离子细胞穿透肽,阳离子聚合物和树突状聚合物,阳离子脂质)与 siRNA 结合;小分子(例如,胆固醇,胆汁酸和血脂)与 siRNA 结合,聚合物抗体和 siRNA 形成共轭物;以及将 siRNA 以纳米颗粒形

式包埋。siRNA 经非病毒载体修饰后,在不影响 RNAi 效率的前提下,提高了 siRNA 的稳定性^[24]。siRNA 载体系统的选择依赖于 siRNA 的性质、靶细胞类型以及体内的传递途径。

3.2.1 阳离子脂质体及基于脂质载体 基于脂质的 siRNA 传递系统包括脂质体、胶束、微乳、固体脂质纳米粒等。脂质体是具有类脂质双分子层的球状囊泡结构,包含主体成分(如脂类,固醇),具有生物相容性和生物可降解性。

目前,以阳离子脂质体作为传递 siRNA 的主要载体。大量的阳离子脂质体,例如 1,2-二油酰基-3-三甲基氨基丙烷(DOTAP)和 *N*-[1-(2,3-二油基氧)丙基]-*N*, *N*, *N*-三甲基氯化铵已被广泛研究。阳离子脂质体包括阳离子头部、亲脂尾部和连接器。阳离子头部包括季铵盐脂、硫辛酰胺、组合硫辛酰胺和季铵盐脂、咪基盐脂。亲脂尾部通常由饱和或不饱和烷基链的(12~18 个碳长度)或胆固醇组成。连接器通常是醚、酯、酰胺、或氨基甲酸酯类。阳离子头部的结构、尾部的碳链长度和连接器的性质影响 siRNA 载体转染效率和毒性。亲水头部越小,烷基链越长越有利于脂质体的胞内逃逸,并提高 siRNA 载体的转染效率^[25]。阳离子脂质与阴离子的 siRNA 混合后自发形成混合多室结构复合物,这种脂质体复合物的形成保护了 siRNA 免受降解,通过内吞作用促进细胞内吸收,增加 siRNA 从内涵体/溶酶体的释放,从而促进 siRNA 在细胞的积累。脂质和 siRNA 的比例,可以优化产生正电位,促进脂质体复合物与细胞膜的相互作用和随后的细胞内化。

基于脂质的载体已经被成功运用到运载 siRNA 到血管内皮细胞、RES 器官(如肝脏)、实体肿瘤的靶部位。Yang 等^[26]用复乳溶剂蒸发技术,将 siRNA 包封成聚乙二醇-聚乳酸(PEG-PLA)脂质体纳米粒,装载量达到 90%以上。制备的脂质体纳米粒保留了其完整性,可以很好地被癌细胞内化并且迅速逃逸,得到显著的基因敲除效果。用此种 siRNA 脂质体纳米粒递送到 HepG2 荧光素酶细胞中,使细胞中荧光素酶的表达下调,抑制了 polo-like 激酶 1(PLK1)的表达。此外载有 siRNA 的纳米粒靶向 PLK1 基因引起人肝癌细胞株 HPG2 和乳腺癌细胞 MDA-MB-435s 的凋亡。在小鼠肝癌细胞中,全身注射此种 siRNA 后显著地抑制了荧

光素酶的表达和肿瘤的生长。Kim 等^[27]使用包含一种新的聚-*L*-精氨酸共轭聚乙二醇(PLR-PEG)脂质体递送 siRNA。他们用一种绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)siRNA 作为模型进行阳离子脂质体介导的 siRNA 递送。结果表明用 PLR-PEG 形成的阳离子脂质体可以提高在人肝癌细胞系 H4II-E 和 HPG2 细胞中 siRNA 的递送效率,降低细胞毒性,有效地下调 GFP 蛋白基因的表达。

尽管以上研究结果表明脂质体作为 siRNA 载体具有可行性,脂质体给药系统仍存在着转染效率低、脱靶效应和药物毒性等问题,从而限制了其在体内的广泛应用。

3.2.2 聚合物 线型或树突状阳离子聚合物是高效的 DNA 转染试剂。带正电的聚合物通过静电相互作用与带负电荷的 DNA 磷酸盐形成复合物。这个过程使 DNA 压缩并保护其免受核酸酶的降解。复合物的属性(如大小、表面电荷以及结构)取决于带正电荷的阳离子聚合物与带负电荷的 siRNA 的磷酸基团间比例。

3.2.2.1 天然聚合物 含环糊精(cyclodextrin, CD)的阳离子聚合物和树突状聚合物作为基因载体已得到越来越多的关注。CD 是由 6(α -CD), 7(β -CD), 或 8(γ -CD), *D*-(+)-葡萄糖单元通过 α -1,4 连接组成的环状低聚糖。CD 及其衍生物在药物制剂中用来提高小分子药物、蛋白质或多肽的溶解度、溶出速率和生物利用度。与不含 CD 的聚合物相比,含 CD 的阳离子聚合物可以减少细胞毒性,并且更易与 PEG 聚合。此外,Guo 等^[28]用庚-胍基- β -CD 和庚-PEG 的偶联物,用茴香酰胺封闭远端的 PEG 作为运送 siRNA 的载体,递送到小鼠前列腺肿瘤模型中,体外用荧光素酶标记,发现此种 siRNA 制剂可以明显杀灭肿瘤细胞,同时血管内皮生长因子中 mRNA 的表达明显下降,而不增加毒性。

siRNA 与胆固醇形成共轭物,可以提高 siRNA 的稳定性,细胞内化作用和特定细胞的主动靶向传递。胆固醇与 siRNA 正义链的 3'-末端通过吡咯烷酮联动共价结合。其共轭物表现出更大的稳定性。Han 等^[29]用一种新型的阳离子胆固醇衍生物胆固醇氧丙烷-1-胺(cholesteryloxypropan-1-amine, COPA)作为载体制备 siRNA 脂质体以提高 siRNA 在不同的肿瘤细胞株如 Hepal-6, A549 和 Hela 细

胞中的递送, 以 GFP 作为标记, 结果表明 COPA-siRNA 脂质体使血清中 GFP 的表达显著减少, Hepal-6 细胞显著凋亡。

3.2.2.2 合成聚合物 各种合成聚合物, 如聚-L-赖氨酸、聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)、聚乳酸羟乙醇酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]、聚烷基脲基丙烯酸酯等已被广泛研究。下面主要讨论 PEI 和 PLGA。

PEI 被广泛用于 DNA、siRNA、寡核苷酸等的体内外转运。高电荷密度阳离子聚合物呈现“质子海绵”的属性, 它刺激 DNA 逃离内涵体, 保护寡核苷酸免遭降解。PEI 吸引并维持大量的质子涌入, 导致内涵体的渗透、肿胀和破裂, 使 DNA 在胞质中释放, 阻止 DNA 被运转到溶酶体而被进一步降解。

PEI 分子量大小及分子结构可以影响其转染效率和毒性。一般地, 其分支结构具有更高的转染效率, 较高的分子量则导致较大的毒性。低分子量 PEI 与 siRNA 形成的非共价络合物使 siRNA 更稳定, 并增加了其胞内递送效率。此外, PEI 的水解纯度对转染效率和特异性也有较大影响。Beyerle 等^[30]发现用高亲水性的 PEG 修饰 PEI 可以减少 PEI 的促炎反应。他们用 6 种不同的 PEG 修饰 PEI 制成 siRNA 纳米粒, 由气管滴入到小鼠的肺中进行毒性评价, 发现疏水性的 PEG 修饰引起严重的上皮屏障通透性增加并伴有急性炎症反应; 而用高亲水性的 PEG 修饰没有消磨巨噬细胞和破坏上皮/内皮屏障, 引起较少的炎症反应, 仅为轻微的氧化应激反应。

PLGA 是一种广受关注的具有生物可降解性和生物相容性的共聚物, 它比阳离子脂质体和阳离子聚合物具有更低的毒性。PLGA 纳米囊包埋 DNA、反义寡核苷酸和 siRNA 后不仅可以提高它们的稳定性, 还可实现持续释放。最近的研究通常对 PLGA 进行修饰, 使之带正电荷, 以增加细胞的吸收。例如, PLGA 纳米粒表面涂层壳聚糖, 以提高反义寡核苷酸、siRNA 在培养细胞中的内化量^[31]; 在 PLGA 纳米粒中加入 PEI, 以提高 siRNA 的装载和活性, 在培养细胞中比单用 PEI 具有更好的基因沉默活性^[32]。

树突状聚合物是高度分支的合成大分子, 它已广泛用于小分子药物和生物大分子的载体。表

面带正电的树突状聚合物用来传递基因、反义寡核苷酸和 siRNA。树突状聚合物形成的核-壳纳米结构使其可以通过内部包埋、表面吸附和化学共轭来载药。树突状聚合物的生物相容性与它的结构、分子大小和表面电荷有关; 细胞毒性和免疫原性与其表面电荷相关。在 Caco-2 细胞中, 阳离子聚酰胺(PAMAM)端氨基表面比阴离子 PAMAM 端羧酸表面有更强的细胞毒性。PEG 可被用来改善树突状聚合物的表面特性。聚丙烯亚胺(PPI)是高度分支的末端连有高密度氨基的树突状聚合物。对 PPI 树突状聚合物的外部用伯胺基, 内部用叔胺基修饰, 可以改善树突状聚合物介导的 DNA 酶的细胞内吸收。Taratula 等^[33]用 PPI 树突状聚合物制备了 siRNA 纳米粒。siRNA 包被二硫交联剂并涂布 PEG 来增加 siRNA 在血液中抵御恶劣环境的横向和空间的稳定性。他们将一种合成的促黄体激素释放激素类似物共轭到 PEG 远端, 直接将 siRNA 递送到癌细胞。

以上研究证明了 siRNA 的层层修饰增强了其在血液的稳定性, 增加了在靶细胞的摄取量和基因沉默的效率, 减少了不良反应的发生。

3.2.3 阳离子肽 阳离子细胞穿透肽(CPP)是一类能够穿透生物膜的短肽, 被用于引导大分子, 包括蛋白质、肽类、反义寡核苷酸、质粒 DNA 等进入细胞内。除了利用传统的内吞途径, CPP 介导的 siRNA 传递系统也可能穿过细胞膜直接进入细胞。

CPP 和 siRNA 通过二硫键形成共价交联。在细胞内胞质中微量谷胱甘肽触发下使二硫键裂解, 将 siRNA 释放到细胞质。连有 CPP 的载体使 siRNA 被细胞迅速高效吸收, 使原代培养的哺乳动物海马和交感神经中的靶基因在几小时内被敲除, 并且在转染时无细胞毒性^[34]。

CPP 和 siRNA 也可以通过静电相互作用形成带正电的非共价复合物。这种方法的主要优点是它不需要化学修饰 siRNA, 反过来又保留 siRNA 的活性, 减少了纯化程序。Simeoni 等^[35]证实了 N 甲基化嘌呤 DNA 糖基化酶(N-methylpurine-DNA glycosylase, MPG)多肽-siRNA 复合物可以有效地抑制基因的表达。MPG 肽来自于疏水性融合的 HIV-1 的 gp41 蛋白肽域与 SV40 大 T 抗原的亲水性核定位序列, 通过内涵体途径进入细胞核。这

些序列的突变阻止核传递并导致 siRNA 迅速释放进入细胞质。

3.2.4 抗体及适体 siRNA 与抗体的结合或络合增加了 siRNA 的特异性传递,最大限度地减少脱靶效应。Gao 等^[36]通过将脂质体-阳离子-DNA (liposome-polycation-DNA, LPD)和抗表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抗体特异性结合,而后又与 Fab 段结合制备了 TLPD-FCC 来运载 siRNA 到 EGFR 过度表达的乳腺癌细胞。结果表明,和肿瘤特异性抗体结合得到的 TLPD-FCC 与没有肿瘤靶向的 LPD 相比,前者具有更强的肿瘤亲和性和敲除 MAD-MB-231 乳腺癌细胞中 EGFR 过度表达的肿瘤基因的能力。进一步的静脉注射数据显示了 TLPD-FCC/siRNA 具有显著沉默 EGFR 过度表达的乳腺癌细胞。由此说明抗体-siRNA 复合体的治疗潜力。

细胞特异性传递也可以通过连接 siRNA 到 RNA 适体或者形成适体-siRNA 嵌合体。适体是一种在特殊靶向分子上结合寡核苷酸或者多肽形成的。这些嵌合体具有相对较小的分子量,可以提高其在组织间质的运输。适体-siRNA 嵌合体中的适体部分(A10)为前列腺特异膜受体抗原(PSMA,在前列腺癌细胞中过度表达的受体抗原)提供特异性结合,此作用发生在 PSMA 阳性细胞内,而不在 PSMA 阴性细胞。多次瘤内注射 A10-PLK1 嵌合体靶向到促生存基因 PLK1 促进了 PSMA 阳性患者前列腺癌 LNCap 异种移植模型中的肿瘤治疗,但对 PSMA 阴性前列腺癌 PC3 异种移植模型却不起作用^[37]。

4 临床研究

一些 siRNA 治疗已经进入到临床试验阶段,大部分属于局部用药,如玻璃体和鼻腔给药。目前 siRNA 治疗包括湿性老年性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)、实体肿瘤、呼吸系统疾病、肝炎、皮肤病、人类免疫缺陷病毒感染、糖尿病等。

较多临床试验集中在 AMD 的腔内给药。第一例进入临床试验的是 Bevasiranib,它是美国 Acuity 制药公司生产的针对血管内皮生长因子(VEGF)的 siRNA 产品。前期对小鼠进行的临床前研究表明,眼部注射 Bevasiranib 能下调 VEGF 基因的表达,有效减少新生血管数量。当试验进入到治疗 AMD

的 III 期临床试验,治疗糖尿病的 II 期临床试验,由于初步的数据显示效果不佳,这项试验 2009 年被提前终止。美国 Merck-sirna Therapeutics 公司研发了 Sirna-027,它主要针对 VEGF 受体 1 蛋白表面修饰的 siRNA,已结束 II 期临床试验。美国 Quark 制药公司与伦敦 Silence Therapeutics 公司合作,生产了靶向 RTP801 基因(又名 DDIT4 基因,该基因与黄斑变性疾病的进展有关)的 siRNA 产品 RTP801i-14。RTP801i-14 被授权给英国 Prizer 制药公司,进行 I/II A 期临床试验。但是, Kleinman 等认为特异性的 siRNA 药物和非特异性的 siRNA 对照药物都能因为 siRNA 与 Toll 样受体 3(Toll-like receptor 3, TLR3)之间的相互作用而产生这种非特异性的血管生成抑制作用。而且,这种非特异性的效应与细胞对 siRNA 分子的摄取作用无关,同时由于 TLR3 蛋白参与细胞内多条信号通路,使 siRNA 疗法的安全性问题受到质疑^[38]。

美国的 Calando 制药公司随后研发了用于治疗实体瘤的靶向核糖核苷酸还原酶 M2(ribonucleotide reductase M 2, RRM2)亚基的 siRNA, CALAA-01,成为第一项使用受体介导传递方式的 siRNA 临床试验。它由连有转铁蛋白的环糊精颗粒包裹,因而药物只会被表面具有高表达量转铁蛋白受体的肿瘤细胞摄取^[39]。另一种治疗实体肿瘤的靶向蛋白激酶 N3 的 siRNA, Atu027,是一种 siRNA 脂质体复合物。临床研究表明,反复静脉注射 Atu027 导致小鼠、大鼠和灵长类动物体内特异性的 RNAi 介导的蛋白激酶 N3 表达的沉默,在原位鼠前列腺癌和胰腺癌模型中显著抑制肿瘤生长,抑制了淋巴结转移^[40]。

Alnylam 制药公司开发了主要针对呼吸道合胞病毒感染的 siRNA, ALN-RSV01。目前正在进行 II B 期临床试验^[41]。它可以沉默病毒复制过程中必需的病毒核衣壳蛋白编码 N 基因。ALN-RSV01 是第一例进入临床试验的抗病毒 siRNA 产品。

Nucleonics 公司开发了用于治疗慢性乙型肝炎的 siRNA, NUC B1000。NUC B1000 是针对减少恶性肝炎病毒设计的阳离子脂质体制剂,目前已进入 I 期临床。

国际雅-雷二氏综合征协会(The International Pachyonychia Congenita Consortium, IPCC)与美国 TransDerm 公司合作,共同开发治疗先天性厚甲症

的 siRNA 产品 TD101。此产品能够“纠正”患者角蛋白的合成,从而达到治疗这种罕见的皮肤疾病的目的。TD101 是第 1 个用于治疗皮肤疾病的 siRNA 产品。

此外,还有用于治疗眼部神经病变的 QPI-1007,用于急性肾损伤的 QPI-1002,针对伊波拉病毒感染的 TKM-Ebola 等 siRNA 产品也进入临床试验各阶段。世界上大约有 19 家公司正在开发约 85 种的 siRNA 产品。这些令人鼓舞的临床结果使 RNAi 从一种研究工具过渡到了临床评估和未来的应用上。

5 问题及展望

通过 RNA 干扰导致转录后基因沉默技术代表一种新的基因治疗方法。siRNA 结构的修饰研究,载体的发展,例如:聚合物、脂类、共轭物,将会是 siRNA 治疗传递系统的关键。以 PEG 修饰载体或在载体上结合细胞特异性靶向配体可提高 siRNA 治疗的药动学特征,改变生物分布、胞内摄取量、靶向性和转染效率,减少不良反应等。在选择合适的 siRNA 载体时,稳定性、表面电荷、安全性、有效性、易于操作和生产是重要的考虑因素,而评估 siRNA 治疗的有效性还需要考虑它的脱靶效应和先天免疫反应。

REFERENCES

- [1] ELBASHIR S M, HARBORTH J, LENDECKEL W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2011, 411(6836): 494-498.
- [2] 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.
- [3] WANG J, LU Z, WIENTJES M G, et al. Delivery of siRNA therapeutics: Barriers and carriers [J]. *AAPS J*, 2010, 12(4): 492-503.
- [4] COREY D R. Chemical modification: the key to clinical application of RNA interference? [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(12): 3615-3622.
- [5] WU W B. Effects of chemically-modified ribose in siRNA on RNA interference [J]. *Biotechnol Bull(生物技术通报)*, 2009(6): 34-37.
- [6] GUO P, COBAN O, SNEAD N M, et al. Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(6): 650-666.
- [7] OVERHOFF M, SCZAKIEL G. Phosphorothioate-stimulated uptake of short interfering RNA by human cells [J]. *EMBO Rep*, 2005, 6(12): 1176-1181.
- [8] STESSL M, MARCHETTI DESCHMANN M, WINKLER J, et al. A proteomic study reveals unspecific apoptosis induction and reduction of glycolytic enzymes by the phosphorothioate antisense oligonucleotide oblimersen in human melanoma cells [J]. *J Proteomics*, 2009, 72(6): 1019-1030.
- [9] MANOHARAN M. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8(6): 570-579.
- [10] LAYZER J M, MCCAFFREY A P, TANNER A K, et al. *In vivo* activity of nuclease-resistant siRNAs [J]. *RNA*, 2004, 10(5): 766-771.
- [11] ELMEN J, THONBERG H. Locked nucleic acid (LNA)mediated improvements in siRNA stability and functionality [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(1):439-447.
- [12] PARRISH J Z, XUE D. Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in *C. elegans* Mol [J]. *Cell*, 2003(11): 987-996.
- [13] UITEI K, NAITO Y, ZENNO S, et al. Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(7): 2136-2151.
- [14] BUMCROT D, MANOHARAN M, KOTELIANSKY V, et al. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs [J]. *Nat Chem Biol*, 2006, 2(12): 711-719.
- [15] KIM D H, BEHLKE M A, ROSE S D, et al. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(2): 222-226.
- [16] SLIVA K, SCHNIERLE B S. Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA [J]. *Virol J*, 2010(7): 248. Doi: 10.1186/1743-422X-7-248.
- [17] CASTANOTTO D, ROSSI J J. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics [J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 426-433.
- [18] DESCAMPS D, BENIHOUD K. Two key challenges for effective adenovirusmediated liver gene therapy: innate immune responses and hepatocytespecific transduction [J]. *Curr Gene Ther*, 2009, 9(2): 115-127.
- [19] GRIMM D, KAY M A. Therapeutic short hairpin RNA expression in the liver: viral targets and vectors [J]. *Gene Ther*, 2006, 13(6): 563-575.
- [20] HACEIN-BEY-ABINA S, VON KALLE C, SCHMIDT M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(3): 255-256.
- [21] YAMAGISHI M, ISHIDA T, MIYAKE A, et al. Retroviral delivery of promoter-targeted shRNA induces long-term silencing of HIV-1 transcription [J]. *Microbes Infect*, 2009, 11(4): 500-508.
- [22] MORRIS K V, ROSSI J J. Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy [J]. *Gene Ther*, 2006, 13(6): 553-558.
- [23] ALIABADI H M, LANDRY B, SUN C, et al. Supramolecular assemblies in functional siRNA delivery: Where do we stand? [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(8): 2546-2569.
- [24] CASTANOTTO D, ROSSI J J. The promises and pitfalls of RNAinterference-based therapeutics [J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 426-433.
- [25] TSENG Y C, MOZUMDAR S, HUANG L. Lipid-based systemic delivery of siRNA [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(9): 721-731.
- [26] YANG X Z, DOU S, SUN T M, et al. Systemic delivery of siRNA with cationic lipid assisted PEG-PLA nanoparticles for cancer therapy [J]. *J Control Release*, 2011, 156(2): 203-211.
- [27] KIM H K, DAVAA E, MYUNG C S, et al. Enhanced siRNA delivery using cationic liposomes with new polyarginine-conjugated PEG-lipid [J]. *Int J Pharm*, 2010, 392(1/2): 141-147.

- [28] GUO J F, OGIER J R, DESGRANGES S, et al. Anisamide-targeted cyclodextrin nanoparticles for siRNA delivery to prostate tumours in mice [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(31): 7775-7784.
- [29] HAN S E, KANG H, SHIM G Y, et al. Novel cationic cholesterol derivative-based liposomes for serum-enhanced delivery of siRNA [J]. *Int J Pharm*, 2008, 353(1/2): 260-269.
- [30] BEYERLE A, BRAUN A, BANERJEE A, et al. Inflammatory responses to pulmonary application of PEI-based siRNA nanocarriers in mice [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(33): 8694-8701.
- [31] NAFEE N, TAETZ S, SCHNEIDER M, et al. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides [J]. *Nanomedicine*, 2007, 3(3): 173-183.
- [32] KATAS H, CEVHER E, ALPAR H O. Preparation of polyethyleneimine incorporated poly(D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles by spontaneous emulsion diffusion method for small interfering RNA delivery [J]. *Int J Pharm*, 2009, 369(1/2): 144-154.
- [33] TARATULA O, GARBUZENKO O B, KIRKPATRICK P, et al. Surface-engineered targeted PPI dendrimer for efficient intracellular and intratumoral siRNA delivery [J]. *J Control Release*, 2009, 140(3): 284-293.
- [34] DAVIDSON T J, HAREL S, ARBOLEDA V A, et al. Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces microRNA-like effects before mRNA degradation [J]. *Neurosci*, 2004, 24(45): 10040-10046.
- [35] SIMEONI F, MORRIS M C, HEITZ F, et al. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(11): 2717-2724.
- [36] GAO J, LIU W, XIA Y, et al. The promotion of siRNA delivery to breast cancer overexpressing epidermal growth factor receptor through anti-EGFR antibody conjugation by Immunoliposomes [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(13): 3459-3470.
- [37] DASSIE J P, LIU X Y, THOMAS G S, et al. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(9): 839-849.
- [38] KLEINMAN M E, YAMADA K, TAKEDA A, et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3 [J]. *Nature*, 2008, 452(7187): 591-597.
- [39] DAVIS M E, ZUCKERMAN J E, CHOI C H, et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles [J]. *Nature*, 2010, 464(7291): 1067-1070.
- [40] ALEKU M, SCHULZ P, KEIL O, et al. Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(23): 9788-9798.
- [41] DEVINCENZO J, CEHELKY J E, ALVAREZ R, et al. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALNRSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus(RSV) [J]. *Antiviral Res*, 2008, 77(3): 225-231.

收稿日期: 2013-03-25

稀有放线菌产生抗菌药物的多样性

李子强, 贾云宏, 杨殿深(辽宁医学院药学院, 辽宁 锦州 121001)

摘要: 目的 对稀有放线菌产生抗菌药物的结构类型和生物活性作一综述, 提供有关稀有放线菌研究的借鉴资料。方法 查阅近 10 多年来国内外公开发表的有关稀有放线菌产生抗菌药物的相关文献, 对其产生抗菌药物的结构及生物活性进行论述。结果 稀有放线菌产生的抗菌药物具有结构多样及活性独特的特点, 主要有 14 种结构类型。结论 稀有放线菌是新生物活性物质的重要产生菌, 本文为今后稀有放线菌的进一步研究提供了参考。

关键词: 稀有放线菌; 抗菌药物结构多样性; 生物活性

中图分类号: R978.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)12-1373-12

Diversity of Antibiotics from Rare Actinomycetes

LI Ziqiang, JIA Yunhong, YANG Dianshen(Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To summarize the structure types and bioactivities of antibiotics from rare streptomycetes, and provide reference information for further research. **METHODS** Based on the over ten years' research literatures of antibiotics from rare streptomycetes domestic and abroad, chemical constituents and bioactivities were reviewed. **RESULTS** Antibiotics from rare actinomycetes had characteristics of diverse structures and unique bioactivity, constituted mainly by 14 structure types. **CONCLUSIONS** Rare actinomycetes are important producers for novel bioactive compounds. The review can provide the evidence for the further study on the research of rare streptomycetes.

KEY WORDS: rare actinomycetes; the structural diversities of antibiotics; bioactivities

作者简介: 李子强, 男, 硕士, 讲师 Tel: 18841697152 E-mail: lzq19782004@163.com