

## 多功能信封型纳米系统的研究进展

杨丽萍<sup>1#</sup>, 曹丽<sup>2#</sup>, 赵婷<sup>1</sup>, 杜青<sup>1</sup>, 曹德英<sup>1</sup>, 向柏<sup>1\*</sup>, 谢俊霞<sup>3\*</sup>

(1. 河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017; 2. 河北省人民医院药学部, 河北 石家庄 050051;  
3. 河北化工医药职业技术学院制药系, 河北 石家庄 050026)

**摘要:** 基因治疗的关键是将目的基因递送至靶标, 因此安全高效的基因载体尤为重要。多功能信封型纳米系统是一种新型基因载体系统, 具有包封率高、稳定性好、转染率高和易制备等优点, 能够控制核酸物质 (小干扰 RNA、DNA) 在细胞内的输送与分布, 使目的基因在特定地点发挥疗效, 在基因递送方面具有显著优势。此外, 该纳米递送系统在蛋白/多肽类成分的运载方面也显示出巨大的潜力。本文对近年来多功能信封型纳米系统的研究进展进行概述。

**关键词:** 多功能信封型纳米系统; 基因载体; 小干扰 RNA; DNA; 多肽

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 01-0047-07

## The progress of multifunctional envelope-type nano device

YANG Li-ping<sup>1#</sup>, CAO Li<sup>2#</sup>, ZHAO Ting<sup>1</sup>, DU Qing<sup>1</sup>, CAO De-ying<sup>1</sup>, XIANG Bai<sup>1\*</sup>, XIE Jun-xia<sup>3\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Department of Pharmacy, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China;  
3. Department of Pharmaceutical, Hebei Chemical and pharmaceutical College, Shijiazhuang 050026, China)

**Abstract:** The key of gene therapy is to deliver the functional gene to the target tissue in the body. The safe and efficient gene carrier is particularly important in the targeted delivery. Multifunctional envelope-type nano device (MEND), based on concept “Programmed packaging”, is a new type of gene carrier system, with high encapsulation efficiency, favourable stability, high transfection efficiency, easy preparation, etc. MEND is designed to control intracellular trafficking as well as the tissue distribution of encapsulated compounds such as nucleic acids/proteins/peptides, permitting them to function at the appropriate location. In this paper, research progresses in MEND are reviewed in accordance with three types of payloads: the small interfering RNA (siRNA), DNA and proteins/peptides in recent years.

**Key words:** multifunctional envelope-type nano device; gene vector; siRNA; DNA; peptides

基因治疗是将基因导入患者特定的组织甚至细胞内进行适当的表达, 从而达到治疗疾病的目的<sup>[1]</sup>。

与传统的治疗方法相比, 基因治疗能够从根源上修正引起疾病的异常基因, 现已成为医药领域研究的新热点。基因治疗的关键是将目的基因输送至靶细胞, 期间存在许多障碍, 如细胞膜、内涵体膜、核膜等。裸露的基因易被降解, 转染效率低, 因此, 一个理想的基因输送系统, 应该能够保护负载物并具备克服上述生理屏障的功能性基团, 如靶向配体、pH 敏感肽和核定位信号等。目前, 基因递送载体有病毒载体和非病毒载体两大类。病毒载体转染率高, 但存在诱导机体产生免疫反应和致癌性等问题; 非病毒载体是

收稿日期: 2017-07-23; 修回日期: 2017-09-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773666, 81302725); 河北省自然科学基金资助项目 (H2015206356, H2018206251, H2018206046); 河北省高等学校科学技术研究项目 (Z2014155).

<sup>#</sup>共同第一作者.

\*通讯作者 Tel: 86-311-86265591, Fax: 86-311-86266050

E-mail: baixiang@hebm.edu.cn;

Tel: 86-311-85110196, E-mail: xiejx666@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0724

利用非病毒的载体材料的理化性质介导基因的传递, 化学结构可控制, 易于大量制备, 与病毒载体相比, 具有低致瘤性、低免疫原性和低毒性等优点<sup>[2, 3]</sup>。但其转染效率明显低于病毒载体, 因此, 提高非病毒载体的转染效率是学者们关注的重点。2004年 Kogure 等<sup>[4]</sup>提出了“程序包装”的概念, 基于此概念建立了一种新的基因载体系统——多功能信封型纳米系统 (multifunctional envelope-type nano device, MEND)。本文对近年来多功能信封型纳米系统的研究进行简要综述。

## 1 多功能信封型纳米系统

### 1.1 MEND 的概念及制备

MEND 是以压缩的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、DNA 或蛋白质/多肽为核心, 用含有靶向因子和功能配体修饰的脂质体封装的一种类似于信封式外壳的微球, 被形象地称之为多功能信封型纳米系统。理想的 MEND 包括生物大分子压缩物和修饰各种功能基团的信封型脂质结构两部分 (图 1)。以 DNA 为例, MEND 的制备思路为<sup>[4]</sup>: 第一步, 利用多聚阳离子如聚左旋赖氨酸 (poly-L-lysine, PLL) 与 DNA 的静电作用, 室温涡旋将 DNA 压缩, 形成多聚阳离子-DNA 复合物 (DNA/PLL complex, DPC); 第二步, DPC 通过静电及水合作用与脂质体膜亲和; 第三步, 用超声的方法, 将 DPC 包裹于脂质体中。

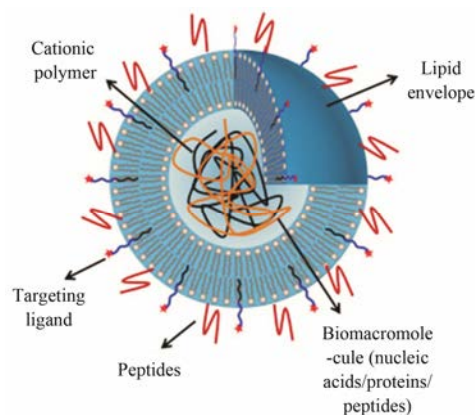


Figure 1 Schematic representation of multifunctional envelope-type nano device (MEND)

### 1.2 MEND 的优势

目前, 常用的基因非病毒载体有脂质体、纳米粒和阳离子多聚物等。这些载体通常借助静电吸附作用实现对核酸等荷负电性生物大分子类物质的包载, 这种装载形式的载药量和载药稳定性往往不甚理想, 显著降低了转染效率。MEND 在制备过程中利用多聚阳离子将生物大分子物质压缩再包裹, 能够双重

保护负载物免受体内酶系统的降解, 提高药物的稳定性; 与传统的非病毒载体相比, 生物大分子预压缩可以有效控制载体大小, 提升装载水平, 同时转染效率也随之提高<sup>[5, 6]</sup>。此外, MEND 可赋予多功能修饰, 如靶向配体、pH 敏感肽和核定位信号等, 用以克服生理屏障, 实现靶标递送。尽管 MEND 具备上述优势也面临一些问题, 如 DNA 不能有效地从压缩物中解压缩, 显著降低了核转录效率; 阳离子压缩材料与 mRNA 之间电荷吸引会抑制翻译过程等<sup>[7]</sup>。

## 2 MEND 的应用

### 2.1 siRNA 的递送

RNA 干扰<sup>[8]</sup> (RNA interference, RNAi) 是指通过外源性或内源性的双链 RNA 在体内诱导靶基因 mRNA 的特异性降解, 从而引发基因沉默的现象。siRNA 作为 RNAi 的效应分子, 已成为人们研究的热点。研究结果证实 MEND 能够很好地克服 siRNA 在体内易被核酸酶降解、半衰期短且转染效率低的缺点, 已被广泛用于载运 siRNA。

**2.1.1 聚乙二醇修饰的 MEND** 许多研究人员将聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 修饰于脂质体表面, 可改善脂质体的稳定性, 降低单核巨噬细胞系统的识别和摄取, 延长脂质体的体内循环时间, 并能通过“增强的渗透与滞留”效应将脂质体被动靶向于肿瘤组织中<sup>[9]</sup>。随着研究的深入, PEG 化脂质体也产生了一些问题, 如 PEG 链抑制靶细胞对脂质体的摄取、阻碍 pH 敏感脂质体细胞内的“内涵体逃逸”及对同一动物体内重复注射 PEG 化脂质体诱发的加速血液清除现象等<sup>[10]</sup>。为了解决这一困境, Hatakeyama 等<sup>[11]</sup>提出在 PEG 与 MEND 中间插入一种对基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 敏感的肽, 制备了 PEG-peptide-DOPE-MEND (PPD-MEND)。在肿瘤细胞周围会分泌大量的 MMP, 当 PPD-MEND 到达肿瘤组织后, PEG 被 MMP 剪切脱离 MEND 表面, 大大提高内化效率。在 Balb/c 裸鼠体内实验中, PPD-MEND 能够引起约 70% 肿瘤细胞产生基因沉默效应, 并没有肝毒性和免疫刺激, 表现出良好的载体性质<sup>[12]</sup>。

**2.1.2 pH 敏感穿膜肽修饰的 MEND** 传统的肺靶向非病毒载体一般使用阳离子脂质或阳离子聚合物<sup>[13, 14]</sup>, 然而阳离子聚合物在肺毛细血管易被短暂的捕获与红细胞聚集形成大团聚体, 造成肺部血管的微梗塞, 从而诱发一系列临床问题。为了解决这一问题, 研究者从流感病毒递送基因的机制中获得启发, 设计出了一种 pH 敏感穿膜肽 GALA (WEAALAEALAEALAE

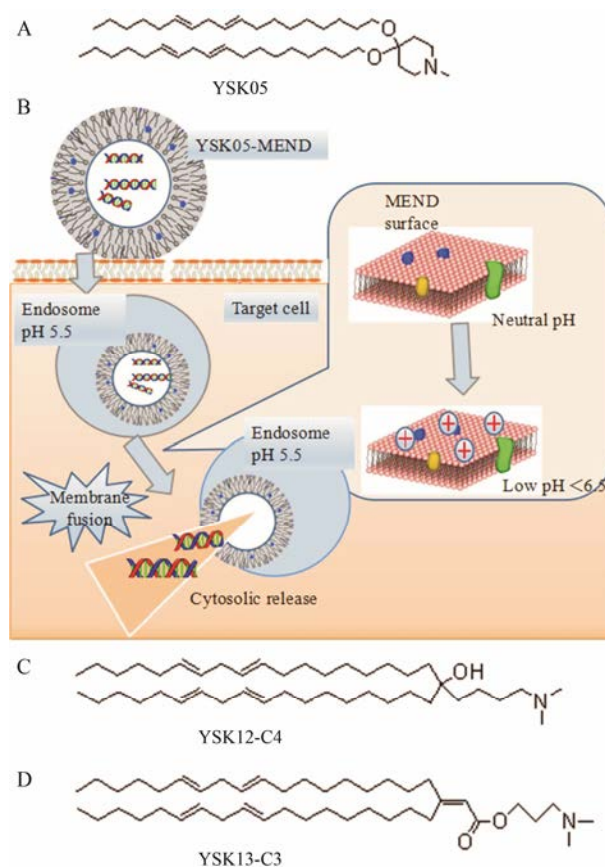
HLAEALAEALAA) 修饰的 MEND<sup>[15]</sup>。通过对比 GALA-MEND 和阳离子脂质体在肺部的激光共聚焦图像得知, 阳离子脂质体在肺部聚集成微米大小的团块, 而 GALA-MEND 则是均匀分散的。通过计算荧光强度的变异系数来量化两种载体的聚集程度, 结果可知, 阳离子脂质体的变异系数随着时间的推移逐渐降低, GALA-MEND 则基本保持不变。有研究报道 GALA-MEND 用包膜水化法 (film coated hydration method) 制备, 2014 年 Kusumoto 等<sup>[16]</sup>发现乙醇注入法 (ethanol dilution method) 可放大比例制备 GALA-MEND, 并能提高 GALA-MEND 载体对肺部的靶向性, 产生更强的基因沉默。因此, GALA 修饰的 MEND 能有效地增强 siRNA 转染效率和基因沉默效果。

**2.1.3 pH 敏感的阳离子脂质修饰的 MEND** YSK05 是一种 pH 敏感的阳离子脂质, 具有良好的膜融合性能<sup>[17]</sup>。YSK05 结构中的亲水部分含有叔胺基团 (图 2A), pKa 为 6.6。在内涵体酸性环境中 YSK05 发生质子化, 促进与带负电的内涵体膜融合 (图 2B)。因此 YSK05 修饰的 MEND 有利于 siRNA 内涵体逃逸进入细胞质中。Polo 样激酶 1 (polo-like kinase1, PLK1) 是一种重要的细胞周期调节分子, PLK1 基因沉默增强人肾癌细胞 OS-RC-2 对多柔比星的敏感性, 采用特异 siRNA 敲除 PLK1 基因的表达, 增强多柔比星对肾癌细胞的疗效<sup>[18]</sup>。Harashima 课题组<sup>[18]</sup>将荷载沉默 PLK1 的 siRNA (si-PLK1) 的 YSK05-MEND, 与多柔比星联合治疗肾细胞癌。实验表明, PLK1 mRNA 的表达量比对照组下降了约 50%, 多柔比星的 IC<sub>50</sub> 下降了 90%。肿瘤抑制实验中, 联合用药组 (多柔比星和 YSK-MEND<sub>si-PLK1</sub> 合用) 能够平稳地抑制肿瘤的生长, 平均肿瘤体积明显小于对照组。

树突状细胞 (dendritic cell, DCs) 是目前功能最强的抗原提呈细胞, 能摄取、加工及呈递抗原, 启动 T 细胞介导的免疫反应, 是目前肿瘤治疗的一种新的途径。研究发现, SOCS1 基因沉默会增强 DCs 抗肿瘤活性<sup>[19]</sup>, 目前只有病毒载体可以有效地实现 SOCS1 基因沉默, 现利用 RNA 干扰调控 DCs 的功能。DCs 的内涵体环境为偏中性, pKa 为 6.6 的 YSK05 不能在内涵体中发生质子化。Warashina 等<sup>[20]</sup>基于 YSK05 的结构, 合成了 pKa 为 8.0 的 YSK12-C4 (图 2C), 将其用于修饰 MEND 制得 YSK12-MEND。YSK12-C4 可以在内涵体中质子化, 与内涵体膜发生融合促进 siRNA 释放到细胞质中。研究表明, anti-SOCS1/YSK12-MEND 可达到 90% 的基因沉默, ED<sub>50</sub> 为 1.5 nmol·L<sup>-1</sup>; 而市售转染试剂 Lipofectamine™ 2000 的基因沉默率不到

60%, ED<sub>50</sub> 为 25 nmol·L<sup>-1</sup>。由此可见, YSK12-MEND 载体的应用是树突状细胞免疫治疗在生物学研究中的一个突破。Nakamura 等<sup>[21]</sup>对 YSK12-MEND 进行稳定性考察, 在 0.5、1、2、6 h 粒径没有发生变化, 粒子之间没有产生聚集。可见, YSK12-MEND 具有较好的稳定性, 有利于细胞摄取与转染。

Yamamoto 等<sup>[22]</sup>对 YSK05 的结构进行了改进, 合成了 YSK13-C3 (图 2D)。将靶向乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的 siRNAmix 包裹于 YSK13-C3-MEND (HBV-siRNAmix/MEND) 中, 用来治疗 HBV。HBV-siRNAmix/MEND 能抑制乙型肝炎病毒表面抗原 (hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)、乙型肝炎病毒 e 抗原 (hepatitis B virus e antigen, HBeAg) 和 HBV DNA 的水平, 而传统的抗乙肝病毒药物恩替卡韦 (entecavir, ETV) 能有效降低 HBV DNA 的水平, 对降低 HBV 抗原的效果不明显。实验显示, 单剂量 HBV-siRNAmix/MEND 降低 HBV DNA 的效果与使用 ETV 7 天的效果相当。此外, ETV 用药 35 天, 不能有效地降低 HBsAg 和 HBeAg 水平。因此, HBV-siRNAmix/MEND 比逆转录酶抑制剂更能有效地治



**Figure 2** Structure of the YSK-lipids and a schematic illustration of the mechanism for the cytosolic delivery of siRNA by the YSK05-MEND

疗 HBV, 有望成为治疗 HBV 的有效手段之一。

**2.1.4 配体修饰的 MEND** 肿瘤内皮细胞 (tumor endothelial cells, TECs) 是组成肿瘤血管的一部分, 由于其基因遗传稳定性, 产生耐药的可能性较小。Sato 等<sup>[23]</sup>选用 TECs 作为治疗肿瘤的新型靶标, 将环状的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 [(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys, RGD), cRGD] 修饰 MEND (RGD-MEND), 其中 cRGD 可以特异性靶向 TECs 中的  $\alpha_v\beta_3$  整合素<sup>[24]</sup>。将荷载 siRNA 的 RGD-MEND 注射入荷瘤鼠体内, 激光共聚焦结果显示, siRNA/cRGD-MEND 特异性聚集在肿瘤内皮细胞。Sakurai 等<sup>[25]</sup>将 cRGD 和 YSK05 共同修饰 MEND, 制备成 cRGD-YSK05-MEND。研究表明, siRNA/cRGD-YSK05-MEND 可特异性靶向 TECs, 显著地使 TEC 中的基因产生沉默, 而其他内皮细胞及组织均未影响, 肿瘤生长显著抑制, 且没有肝毒性, 而传统的脂质体对肝脏有一定程度的损害。

## 2.2 DNA 的递送

成功的 DNA 递送系统要能够有效地进入细胞, 穿过细胞质, 定位到细胞核, 并将药物释放到细胞核内。在此过程中, 要克服细胞膜、内涵体膜和核膜等多重障碍。在非分裂细胞中, 核膜稳定, 外来物质很难进入核内。因此, 如何穿过细胞核的双层膜将是研究面临的最大难题<sup>[26, 27]</sup>。

**2.2.1 细胞穿透肽修饰的 MEND** MEND 具有良好的生物相容性, 能够提高转染效率, 有利于内涵体逃逸。未修饰的 MEND 粒径一般在 300 nm 左右, 电位约 -40 mV。研究表明, DPC 的转染率是裸露的 DNA 的 1000 倍, DNA/MEND 的转染率比 DPC 提高了 10 倍<sup>[4]</sup>。精氨酸八聚体 (R8) 是一种细胞穿透肽, 在生理条件下精氨酸的胍基与细胞表面膜上带负电的磷酸基和硫酸基产生氢键结合, 进而产生细胞内化作用。高密度 R8 修饰的脂质体能够提高药物转染效率, 不易被溶酶体降解<sup>[28]</sup>。Kogure 等<sup>[4]</sup>将细胞穿透肽 R8 修饰 MEND, 制得 R8-MEND, 研究表明, R8-MEND 促进 DNA 细胞内化, 转染效率比未修饰的 MEND 提高了 100 倍, 且没有明显的细胞毒性。

**2.2.2 麦芽三糖修饰的 MEND** 研究证实, 非阳离子型、水溶性的糖分子能够作为核定位信号, 其中麦芽三糖 (maltotriose, malto) 具有良好的核聚集性质<sup>[29-31]</sup>。Akita 等<sup>[32]</sup>利用 Malto 和 GALA 修饰 MEND 制备了 GALA-Malto-MEND。粒径在 220~240 nm 内, 其转染活性是未修饰 MEND 的 100 倍。在与阳离子聚合物及市售转染试剂 jetPEI-Gal (Polyplus-transfection Inc. USA) 的对比研究中, GALA-Malto-MEND 表现

出明显的优越性, 转染活性分别是前者的 20.8 和 15.8 倍且未出现明显的细胞毒性。因此 GALA-Malto-MEND 将是一种高效、安全的基因载体。

**2.2.3 pH 敏感肽修饰的 MEND** KALA (WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALACEA) 是一种 pH 敏感的肽, 从酸性到中性的环境中, 其形态从无规则的线性变成  $\alpha$ -螺旋状, 从而可以诱导载体膜与核膜融合, 完成药物在细胞核的释放<sup>[33]</sup>。基于此肽段, Miura 等<sup>[34]</sup>设计了一种新型的 DNA 载体—KALA-MEND。KALA-MEND 比传统的 R8-MEND 的转染活性提高了 100 倍。于 C57BL/6 (H-2b) 小鼠注射 KALA-MEND, 能够诱发抗原特异性毒性 T 淋巴细胞的活性, 并产生预防性和治疗性的抗肿瘤作用。因此, KALA-MEND 具有双重功能: 基因转染和免疫促进作用。

**2.2.4 四分子层的 MEND** Akita 等<sup>[35]</sup>对 R8-MEND 进行了改进, 设计了四分子层的 MEND (tetra-lamellar MEND, T-MEND)。外层膜为内涵体融合膜, 内层膜为细胞核融合膜。T-MEND 通过阶梯式膜融合方式实现细胞内化, 进入细胞核, 能有效地将 DNA 带入细胞核中。T-MEND 的转染率是 R8-MEND 的 100 倍; 与市售的转染试剂 Lipofectamine 2000 相比, T-MEND 将转染率提高了 10 倍。因此, T-MEND 是一种有效的基因载体, 能够将 DNA 送至细胞核。

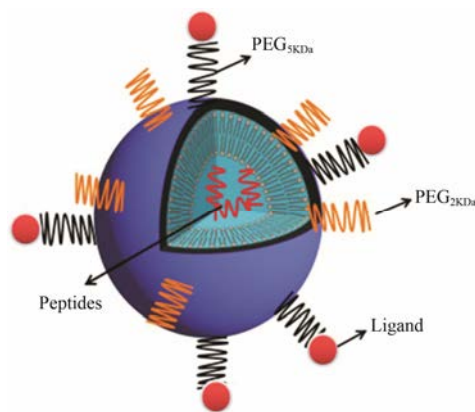
有学者将 KALA 与 R8 同时修饰 T-MEND, 构建了一种 R8/KALA-T-MEND<sup>[36]</sup>。与传统的 R8-T-MEND 相比, R8/KALA-T-MEND 的转染效率提高了 30 倍, 且远远超过市售的转染试剂 (LFN Plus) 10 倍。在体内抗肿瘤实验中, 注射 R8/KALA-T-MEND 组的小鼠肿瘤体积为  $0.5 \times 10^4 \text{ mm}^3$  明显低于对照组的体积 ( $2.6 \times 10^4 \text{ mm}^3$ ), 表现出了良好的抗肿瘤特性。因此 R8/KALA-T-MEND 为 DNA 载体开辟了一个新的方向。

**2.2.5 类脂质材料修饰的 MEND** 研究发现<sup>[7]</sup>, 非病毒载体携带目的基因在细胞内转录和翻译是主要的限速步骤。其中 DNA 不能有效地从阳离子聚合物中解压缩, 靶向染色体能力减弱, 显著降低了核转录效率; 阳离子脂质体复合物与 mRNA 之间电荷吸引会抑制翻译过程。基于这些缺点, 学者们设计了一种装载有 pDNA 的纳米粒 (lipid nano particle, LNP)<sup>[37]</sup>, LNP 在胞浆中呈中性, 避免与 mRNA 电荷吸引, 并可在胞浆内破裂从而释放 pDNA。设计 LNP 关键的分子是一种含有二硫键的可被质子激活的类脂质材料 (SS-cleavable proton-activated lipid-like material, ssPalm)。ssPalm 具有双感应系统, 在胞浆中二硫键发

生断裂, 信封式结构破裂, pDNA 暴露; 在偏酸性细胞器中 (内涵体/溶酶体) 带正电的叔胺会破坏内涵体、溶酶体膜。第一代 ssPalm (ssPalmM) 是以肉豆蔻酸为疏水支架, 其基因表达水平比 MEND<sub>DOTAP</sub> 高, 细胞毒性低<sup>[38]</sup>; 第二代 ssPalm (ssPalmA) 是以脂溶性维生素为疏水性支架, 能强烈地破坏内涵体膜, 有利于目的基因从中逃逸, 以完整的形态到达细胞核边缘<sup>[39]</sup>。因此, ssPalm 可改善非病毒载体的缺点, 提高目的基因的转染效率。

### 2.3 蛋白/多肽的递送

**2.3.1 抑制素受体介导的 MEND 抑制素 (prohibitin)** 是表达于人体白脂肪血管内皮细胞表面的受体, Kolonin 等<sup>[40]</sup>首次发现小环肽 CKGGRAKDC 可特异性结合该蛋白受体。基于这一特点, Harashima 课题组<sup>[41]</sup>设计了一种 KGGRAKD 肽修饰的纳米粒 (prohibitin-targeted nanoparticle, PTNP), 该载体能选择性地被脂肪血管内皮细胞摄取, 与脂肪组织内皮细胞的抑制素特异性结合。但含有靶向配体的 PTNP 容易被肝脏和肾脏的网状内皮系统识别, 致使 PTNP 从血液循环中快速清除。他们引入 PEG 修饰纳米粒表面以增加体内循环时间, 减少在肝脏中的分布水平。研究表明, 当 PEG<sub>2000</sub> 和 PEG<sub>5000</sub> (连接纳米粒和 KGGRAKD) 同时修饰纳米粒表面效果最好 (图 3)。装载促凋亡肽[D(KLAKLAK)<sub>2</sub>]的 PTNP (KLA-PTNP) 可以显著地诱导肥胖小鼠脂肪组织血管内皮细胞凋亡。因此, PTNP 潜力巨大, 为肥胖症的治疗提供了一个新的策略。



**Figure 3** Schematic illustration of prohibitin-targeted nanoparticle (PTNP)

**2.3.2 线粒体靶向的 MEND** 为了治疗线粒体基因组 (mitochondrial deoxyribonucleic acid, mtDNA) 突变与缺陷导致的疾病<sup>[42]</sup>, 需要将活性大分子药物递送至线粒体内。该传递过程必须克服两个障碍, 即如

何穿过细胞膜进入细胞质和穿过线粒体膜进入线粒体。Yamada 等<sup>[43]</sup>成功开发出一种脂质体—MITO-Porter, 该载体可通过膜融合的方式将药物输送至线粒体内。利用绿色荧光蛋白作为模型分子, 通过激光共聚焦显微镜观察证实: MITO-Porter 可以有效地将药物运输至线粒体内。基于这种传统的 MITO-Porter, 研发出了双功能 (dual function, DF)-MITO-Porter<sup>[44, 45]</sup>。DF-MITO-Porter 是由两层信封型脂质膜构成。外层膜称为内涵体融合膜, 能够实现载体与内涵体膜的融合; 内层膜称为线粒体融合膜, 实现载体与线粒体膜的融合。在外层膜的表面修饰有高密度 R8, 能够帮助载体高效地进入细胞。当载体进入细胞后, 载体的外层膜与内涵体膜融合, 载体释放到细胞质中。然后通过 R8 与线粒体的静电作用及内层膜的融合, 将药物释放到线粒体内。激光共聚焦实验显示, 与传统的 MITO-Porter 相比, DF-MITO-Porter 能够更有效地将外源性生物活性大分子递送至线粒体内。进一步研究证实, DF-MITO-Porter 运载 DNase I 蛋白能够显著降低线粒体内 mtDNA 水平。可见, DF-MITO-Porter 作为 mtDNA 的靶向干预载体颇具潜力。

**2.3.3 肿瘤疫苗** 肿瘤免疫治疗是通过激活或调动人体自身免疫系统, 增强机体抗肿瘤免疫力, 杀死细胞和肿瘤组织的抗癌疗法。与传统治疗肿瘤的方法手术、放疗和化疗相比, 肿瘤免疫治疗具有损伤小、不良反应小等优点。外源性抗原进入胞质内被溶酶体降解成短肽片段, 在主要组织相容性复合体-II 的作用下, 被辅助性 T 细胞识别, 启动免疫反应。因此, 将外源性抗原输送至细胞质是肿瘤免疫治疗的关键一步。Miura 等<sup>[46]</sup>用 KALA-MEND 作为载体, 将卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 包裹, 制备肿瘤疫苗 OVA/KALA-MEND, 皮下注射 C57BL/6J 小鼠体内, 产生免疫 7 天后接种肿瘤细胞, 观察肿瘤体积变化。结果显示, OVA/KALA-MEND 能有效抑制肿瘤生长。接种 15 天, 肿瘤完全被抑制; 接种 27 天, 60% 的小鼠肿瘤被抑制。通过检测 OVA 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic lymphocyte, CTL) 效应, 当 OVA 剂量为 13 μg 时, OVA/KALA-MEND 可引发强大的 CTL 效应。因此, KALA-MEND 是一种具有潜力的肿瘤疫苗抗原递送载体。

### 3 展望与结语

多功能信封型纳米系统是基于“程序包装”的概念设计出来的, 由于其独特的结构, 包含了诸多非病毒载体的优点, 如包封率高、转染效率高、低免疫原性和生物相容性好等。10 余年来学者们研究开发了

一系列基于 MEND 的载体, 不仅能够运输 siRNA 和 DNA 等核酸类成分, 还能够携带蛋白质、多肽等生物大分子物质并且通过引入不同的功能性成分能够实现细胞质、细胞核, 甚至线粒体等细胞器定位。如前所述, 在 MEND 载体规模化制备方面, Kusumoto 等<sup>[16]</sup>发现乙醇注入法相比传统的包膜水化法更具优势, 然而为了将 MEND 类似载体的开发研究向临床试验阶段推进, 仍有必要对制备工艺进行全方位的优化和改进。

## References

- [1] Chira S, Jackson CS, Oprea I, et al. Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 30675–30703.
- [2] Kostarelos K, Miller AD. Synthetic, self-assembly ABCD nanoparticles; a structural paradigm for viable synthetic non-viral vectors [J]. *Chem Soc Rev*, 2005, 34: 970–994.
- [3] Mastrobattista E, van der Aa MA, Hennink WE, et al. Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 115–121.
- [4] Kogure K, Moriguchi R, Sasaki K, et al. Development of a non-viral multifunctional envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method [J]. *J Control Release*, 2004, 98: 317–323.
- [5] Nakamura Y, Kogure K, Futaki S, et al. Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nano device for siRNA [J]. *J Control Release*, 2007, 119: 360–367.
- [6] Kamiya H, Akita H, Harashima H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in gene therapy [J]. *Drug Discov Today*, 2003, 8: 990–996.
- [7] Hama S, Akita H, Iida S, et al. Quantitative and mechanism-based investigation of post-nuclear delivery events between adenovirus and lipoplex [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: 1533–1543.
- [8] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391: 806–811.
- [9] Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: a strategy for overcoming the PEG dilemma [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2011, 63: 152–160.
- [10] Zhang D, Xu H, Hu MN, et al. “PEG dilemma” for liposomes and its solving approaches [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 252–260.
- [11] Hatakeyama H, Akita H, Kogure K, et al. Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid [J]. *Gene Ther*, 2007, 14: 68–77.
- [12] Hatakeyama H, Akita H, Ito E, et al. Systemic delivery of siRNA to tumors using a lipid nanoparticle containing a tumor-specific cleavable PEG-lipid [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 4306–4316.
- [13] Yung BC, Li J, Zhang M, et al. Lipid nanoparticles composed of quaternary amine-tertiary amine cationic lipid combination (QTsome) for therapeutic delivery of anti-miR-21 for lung cancer [J]. *Mol Pharm*, 2016, 13: 653–662.
- [14] Rathore R, Chandra Sekhar Jaggarapu MM, Ganguly A, et al. Cationic lipid-conjugated hydrocortisone as selective antitumor agent [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 108: 309–321.
- [15] Kusumoto K, Akita H, Ishitsuka T, et al. Lipid envelope-type nanoparticle incorporating a multifunctional peptide for systemic siRNA delivery to the pulmonary endothelium [J]. *ACS Nano*, 2013, 7: 7534–7541.
- [16] Kusumoto K, Akita H, Santiwarangkool S, et al. Advantages of ethanol dilution method for preparing GALA-modified liposomal siRNA carriers on the *in vivo* gene knockdown efficiency in pulmonary endothelium [J]. *Int J Pharm*, 2014, 473: 144–147.
- [17] Sato Y, Hatakeyama H, Sakurai Y, et al. A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Control Release*, 2012, 163: 267–276.
- [18] Sakurai Y, Hatakeyama H, Akita H, et al. Improvement of doxorubicin efficacy using liposomal anti-polo-like kinase 1 siRNA in human renal cell carcinomas [J]. *Mol Pharm*, 2014, 11: 2713–2719.
- [19] Shen L, Evel-Kabler K, Strube R, et al. Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 1546–1553.
- [20] Warashina S, Nakamura T, Sato Y, et al. A lipid nanoparticle for the efficient delivery of siRNA to dendritic cells [J]. *J Control Release*, 2016, 225: 183–191.
- [21] Nakamura T, Kuroi M, Fujiwara Y, et al. Small-sized, stable lipid nanoparticle for the efficient delivery of siRNA to human immune cell lines [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37849.
- [22] Yamamoto N, Sato Y, Munakata T, et al. Novel pH-sensitive multifunctional envelope-type nanodevice for siRNA-based treatments for chronic HBV infection [J]. *J Hepatol*, 2016, 64: 547–555.
- [23] Sato Y, Sakurai Y, Kajimoto K, et al. Innovative technologies in nanomedicines: from passive targeting to active targeting/ from controlled pharmacokinetics to controlled intracellular

- pharmacokinetics [J]. *Macromol Biosci*, 2017. DOI: 10.1002/mabi.201600179.
- [24] Liu S. Radiolabeled multimeric cyclic RGD peptides as integrin  $\alpha_v\beta_3$  targeted radiotracers for tumor imaging [J]. *Mol Pharm*, 2006, 3: 472–487.
- [25] Sakurai Y, Hatakeyama H, Sato Y, et al. RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGD-modified liposomal-siRNA system [J]. *J Control Release*, 2014, 173: 110–118.
- [26] Brunner S, Sauer T, Carotta S, et al. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus [J]. *Gene Ther*, 2000, 7: 401–407.
- [27] Wilke M, Fortunati E, van den Broek M, et al. Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity [J]. *Gene Ther*, 1996, 3: 1133–1142.
- [28] Fan B, Jin MJ, Huang W, et al. The development of cell-penetrating peptides in drug delivery system [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 264–271.
- [29] Monsigny M, Rondanino C, Duverger E, et al. Glyco-dependent nuclear import of glycoproteins, glycoplexes and glycosylated plasmids [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1673: 94–103.
- [30] Rondanino C, Bousser MT, Monsigny M, et al. Sugar-dependent nuclear import of glycosylated proteins in living cells [J]. *Glycobiology*, 2003, 13: 509–519.
- [31] Niikura K, Sekiguchi S, Nishio T, et al. Oligosaccharide-mediated nuclear transport of nanoparticles [J]. *ChemBioChem*, 2008, 9: 2623–2627.
- [32] Akita H, Masuda T, Nishio T, et al. Improving *in vivo* hepatic transfection activity by controlling intracellular trafficking: the function of GALA and maltotriose [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8: 1436–1442.
- [33] Wyman TB, Nicol F, Zelphati O, et al. Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers [J]. *Biochemistry*, 1997, 36: 3008–3017.
- [34] Miura N, Shaheen SM, Akita H, et al. A KALA-modified lipid nanoparticle containing CpG-free plasmid DNA as a potential DNA vaccine carrier for antigen presentation and as an immune-stimulative adjuvant [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 1317–1331.
- [35] Akita H, Kudo A, Minoura A, et al. Multi-layered nanoparticles for penetrating the endosome and nuclear membrane *via* a step-wise membrane fusion process [J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 2940–2949.
- [36] Shaheen SM, Akita H, Nakamura T, et al. KALA-modified multi-layered nanoparticles as gene carriers for MHC class-I mediated antigen presentation for a DNA vaccine [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 6342–6350.
- [37] Hyodo M, Sakurai Y, Akita H, et al. "Programmed packaging" for gene delivery [J]. *J Control Release*, 2014, 193: 316–323.
- [38] Akita H, Ishiba R, Hatakeyama H, et al. A neutral envelope-type nanoparticle containing pH-responsive and SS-cleavable lipid-like material as a carrier for plasmid DNA [J]. *Adv Healthc Mater*, 2013, 2: 1120–1125.
- [39] Tanaka H, Akita H, Ishiba R, et al. Neutral biodegradable lipid-envelope-type nanoparticle using vitamin A-scaffold for nuclear targeting of plasmid DNA [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 1755–1761.
- [40] Kolonin MG, Saha PK, Chan L, et al. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue [J]. *Nat Med*, 2004, 10: 625–632.
- [41] Kajimoto K, Sato Y, Nakamura T, et al. Multifunctional envelope-type nano device for controlled intracellular trafficking and selective targeting *in vivo* [J]. *J Control Release*, 2014, 190: 593–606.
- [42] Song XT, Evel-Kabler K, Shen L, et al. A20 is an antigen presentation attenuator, and its inhibition overcomes regulatory T cell-mediated suppression [J]. *Nat Med*, 2008, 14: 258–265.
- [43] Yamada Y, Akita H, Kamiya H, et al. MITO-Porter: a liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria *via* membrane fusion [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778: 423–432.
- [44] Yamada Y, Fukuda Y, Harashima H. An analysis of membrane fusion between mitochondrial double membranes and MITO-Porter, mitochondrial fusogenic vesicles [J]. *Mitochondrion*, 2015, 24: 50–55.
- [45] Yamada Y, Harashima H. Targeting the mitochondrial genome *via* a dual function MITO-Porter: evaluation of mtDNA levels and mitochondrial function [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1265: 123–133.
- [46] Miura N, Akita H, Tateshita N, et al. Modifying antigen-encapsulating liposomes with KALA facilitates MHC class I antigen presentation and enhances anti-tumor effects [J]. *Mol Ther*, 2017, 25: 1003–1013.