

反义核酸在抗菌治疗领域的研究进展

李 佳¹, 韩晓璐^{1,2}, 宋世昱³, 林锦涛¹, 唐志强^{1,4}, 王增明¹, 徐 亮^{1*}, 郑爱萍^{1*}

(1. 军事医学研究院国家安全特需药品全国重点实验室, 北京 100850; 2. 中国人民解放军32104部队, 内蒙古阿拉善盟 735400; 3. 重庆医科大学, 重庆 400016; 4. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133002)

摘要: 随着抗生素广泛使用, 耐药菌感染已经成为人类健康重要威胁, 寻找能有效控制耐药菌感染的新型抗菌策略已成为当务之急。区别于以细菌蛋白为靶点的小分子药物, 反义寡核苷酸可以靶向细菌耐药、致病、生长繁殖及生物膜形成等机制相关的基因, 通过调控相关基因表达来抑制或者杀灭细菌, 为抗菌药物的研发提供了全新的思路。为改变反义核酸细菌内递送难题, 已有多种递药系统应用于细菌递送领域, 主要包括细胞穿透肽、脂质纳米颗粒及无机纳米颗粒等, 为反义核酸在抗菌领域的发展提供了崭新动力。本综述围绕近些年小核酸药物的发展现状, 反义核酸抗菌机制、靶点及序列, 以及递送载体等方面进行了总结归纳, 为反义核酸在抗菌感染治疗领域的研究发展提供参考。

关键词: 核酸药物; 反义寡核苷酸; 抗菌; 药物递送; 基因治疗

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)02-0337-11

Progress on antisense oligonucleotide in the field of antibacterial therapy

LI Jia¹, HAN Xiao-lu^{1,2}, SONG Shi-yu³, LIN Jin-tao¹, TANG Zhi-qiang^{1,4}, WANG Zeng-ming¹, XU Liang^{1*}, ZHENG Ai-ping^{1*}

(1. State Key Laboratory of National Security Specially Needed Medicines, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. Troops 32104 of People's Liberation Army of China, Alashanmeng 735400, China; 3. Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 4. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: With the widespread use of antibiotics, drug-resistant bacterial infections have become a significant threat to human health. Finding new antibacterial strategies that can effectively control drug-resistant bacterial infections has become an urgent task. Unlike small molecule drugs that target bacterial proteins, antisense oligonucleotide (ASO) can target genes related to bacterial resistance, pathogenesis, growth, reproduction and biofilm formation. By regulating the expression of these genes, ASO can inhibit or kill bacteria, providing a novel approach for the development of antibacterial drugs. To overcome the challenge of delivering antisense oligonucleotide into bacterial cells, various drug delivery systems have been applied in this field, including cell-penetrating peptides, lipid nanoparticles and inorganic nanoparticles, which have injected new momentum into the development of antisense oligonucleotide in the antibacterial realm. This review summarizes the current development of small nucleic acid drugs, the antibacterial mechanisms, targets, sequences and delivery vectors of antisense oligonucleotide, providing a reference for the research and development of antisense oligonucleotide in the treatment of bacterial infections.

收稿日期: 2024-07-01; 修回日期: 2024-11-20.

基金项目: 军队后勤科研重点项目 (BWS21T015).

*通讯作者 Tel: 13366515305, E-mail: wj24998@163.com;

Tel: 86-10-66931694, E-mail: apzheng@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0607

Key words: nucleic acid drug; antisense oligonucleotide; antibacterial; drug delivery; gene therapy

随着临床耐药等问题频发,传统小分子抗生素研发方法已不能应对日益严峻的耐药菌感染,许多新抗菌策略,如 CRISPR-Cas 疗法、噬菌体疗法、工程毒素及抗菌肽等相继被用于新型抗菌剂。然而,这些新抗菌策略由于存在免疫原性、脱靶等潜在风险,不同程度上限制了相应的临床转化。小核酸药物是以 DNA 或 RNA 为载体或靶点的药物,与现有的以蛋白为靶点的小分子和抗体药物相比,其靶点筛选快、研发成功率高、不易产生耐药,在传统药物“不可成药”靶点问题上具有更好的优势,成为目前国际上重点关注的一类新型生物技术药物。近些年,越来越多原核生物研究中发现,外源核酸通常在大多数细菌质粒及遗传基因中表达,与目标 RNA/DNA 结合,可以参与破坏 DNA 到信使核糖核酸 (messenger RNA, mRNA) 再到蛋白质的信息流。随着化学修饰和递送载体技术的发展,菌内反义核酸递药有望成为逆转细菌耐药性的一种新方法。本文围绕近些年小核酸药物发展现状,反义核酸的抗菌机制及生物学靶点,以及反义核酸递送载体等方面进行了总结归纳,为反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO) 在抗菌治疗领域的发展提供了新的认识。

1 小核酸药物

小核酸药物是以 DNA 或 RNA 为载体或靶点的药物,目前在研的小核酸药物种类很多,包括 ASO、小干扰核糖核酸 (small interfering RNA, siRNA)、微小核糖核酸 (microRNA, miRNA)、核酸适配体 (aptamer) 等,不同的小核酸药物通常具有不同的结构特点和作用机制。其中 ASO、siRNA 和 miRNA 通过碱基互补配对原则靶向 mRNA 或前体 mRNA,通过基因沉默抑制靶蛋白表达,具有包括 RNA 干扰等介导的切割靶标降解、剪接调节、非编码 RNA 抑制、基因激活和程序性基因编辑的功能,在治疗或控制多种疾病上展现了巨大潜力。截至 2023 年底,共 11 款 ASO 药物、6 款 siRNA 药物和 2 款 aptamer 药物获批上市,表 1 对已上市的小核酸的种类、上市公司、上市时间/批准地、适应症、修饰/递送及给药方式信息进行汇总^[1]。目前,获批上市的小核酸药物的适应症基本为罕见遗传病,其中有 12 款药物未使用递送系统,2 款为 aptamer,剩余 10 款均为 ASO。ASO 主要采用裸核酸进行化学修饰后进行给药,这主要是由于 ASO 分子质量小,进入细胞能力较强,特别是 ASO 经过鞘内注射,不需要递送系统就可以进入中枢神经系统。在 7 款使用递送系统的药物

中,6 款使用 GalNAc 共轭连接递送系统,其中 5 款为 siRNA,1 款为 ASO。1 款药物使用脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticles, LNPs) 递送,为 siRNA 药物^[1]。

综上所述,ASO 的开发及应用占据了小核酸药物发展的半壁江山,其应用领域最为广泛,已在严重和罕见遗传疾病、心血管和代谢疾病取得了巨大进展,逐渐向肿瘤、神经疾病及抗感染治疗等领域拓展。在早期研究阶段,ASO 存在靶向性不强、生物活性不足、脱靶毒副作用等诸多短板,而今,一些经化学修饰 ASO (核酸主链、核糖的糖部分和核苷碱基的修饰) 很好地解决了上述问题。随着对 ASO 作用机制的深入研究,以及大规模更具针对性临床试验的开展,制药行业逐渐掀起一股 ASO 研发热。在针对原核细胞的研究中发现,大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)、枯草芽孢杆菌、结核分枝杆菌等菌株中均发现了反义 RNA 的存在,这些小 RNA 分子具有重要的调节功能。此外,在原核生物中也发现了类似于真核生物的 RNAi 现象,即成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关系统介导的适应性免疫机制^[2]。此类研究成果的发现,也推动了反义技术在原核生物中的研究日趋广泛,使得反义核酸在抗菌、抗感染领域走入了新阶段。

2 反义核酸在抗菌领域的应用

2.1 反义核酸的优势及抗菌机制

使用外源性核酸作为抗菌剂的概念于上世纪 90 年代初提出,通过递送外源核酸与细菌遗传物质的碱基互补配对,调控细菌靶基因表达,可以参与到细菌基因编码的信息流中,并影响几种代谢和毒力蛋白质的产生。1997 年,White 等通过设计反义序列抑制 *E. coli* 的 marRAB 操纵子,恢复了 *E. coli* 对诺氟沙星的敏感性,成功提高了诺氟沙星对 *E. coli* 的杀菌活性,首次证明通过设计反义序列可以抑制耐药基因表达^[3]。

与传统抗生素相比,ASO 具有很多优点:①易于设计:理论上,ASO 可以靶向所有病原菌中所有与疾病相关的基因,了解核苷酸序列就可以设计 ASO,从而达到抗菌目的;②精准靶点:ASO 可以靶向其互补的 mRNA,选择性地阻止密切相关基因中单个异构体的表达,优于传统小分子药物;③不易诱发耐药:ASO 不像抗菌肽等其他抗菌药物那样容易诱导细菌耐药。目前,传统抗生素发展跟不上生物变异和耐药速度,一旦发现耐药基因,反义技术可能是抗击超级细菌最后的快速手段。

Table 1 Summary of information on small nucleic acid drugs marketed by the end of 2023. ASO: Antisense oligonucleotide; CMVR: Cytomegalovirus retinitis; HoFH: Homozygous familial hypercholesterolemia; SMA: Spinal muscular atrophy; DMD: Duchenne muscular dystrophy; hATTR: Hereditary transthyretin amyloidosis; FCS: Familial chylomicronemia syndrome; AHP: Acute hepatic porphyrias; pH1: Primary hyperoxaluria type 1; FP: Familial hypercholesterolemia; AMD: Age-related macular degeneration; ALS: Amyotrophic lateral sclerosis; GA: Geographic atrophy; PS: Phosphorothioate; 2'-F: 2'-Fluorine; 2'-O-MOE: 2'-O-Methoxyethyl; PMO: Phosphorodiamidate morpholino oligomers; 2'-O-Me: 2'-O-Methyl; IVI: Intravitreal injection; SC: Subcutaneous injection; IT: Intrathecal injection; IV: Intravenous injection

No.	Drug name/commercial name	Type	Owner	Time-to-market/place of approval	Therapeutic indication	Retouching/delivery	Mode of administration
1	Formivirsen/Vitravene	ASO	Ionis/Novartis	1998, FDA (Delisted)	CMVR	PS	IVI
2	Mipomersen/Kynamro	ASO	Ionis/Kastle Therapeutics	2013, FDA (Delisted)	HOFH	PS, 2'-O-MOE	SC
3	Nusinersen/Spinraza	ASO	Ionis/Biogen	2016, FDA	SMA	PS, 2'-O-MOE	IT
4	Eteplirsen/Exondys 51	ASO	Sarepta Therapeutics	2016, FDA	DMD	PMO	IV
5	Inotersen/Tegsedi	ASO	Ionis	2018, FDA	hATTR	PS, 2'-O-MOE	SC
6	Golodirsen/Vyondys 53	ASO	Sarepta Therapeutics	2019, FDA	DMD	PMO	IV
7	Volanesorsen/Waylivra	ASO	Ionis	2019, EU	FCS	PS, 2'-O-MOE	SC
8	Viltolarsen/Viltepso	ASO	Nippon Shinyaku	2020, FDA	DMD	PMO	IV
9	Casimersen/Amondys 45	ASO	Sarepta Therapeutics	2021, FDA	DMD	PMO	IV
10	Patisiran/Onpattro	siRNA	Alnylam	2018, FDA	hATTR	PS, 2'-F, 2'-O-Me/ LNPs	IV
11	Givosiran/Givlaari	siRNA	Alnylam	2019, FDA	AHP	PS, 2'-F, 2'-O-Me/ GalNAc	SC
12	Lumasiran/Oxlumo	siRNA	Alnylam	2020, FDA	PH1	PS, 2'-F, 2'-O-Me/ GalNAc	SC
13	Inclisiran/Leqvio	siRNA	Alnylam/Novartis	2020, EU 2021, FDA	FP	PS, 2'-F, 2'-O-Me/ GalNAc	SC
14	Pegaptanib/Macugen	Aptamer	Pfizer/Eyeteck,	2004, FDA (Delisted)	AMD	—	IVI
15	Vutrisiran/Amvuttra	siRNA	Alnylam	2022, FDA	hATTR	PS, 2'-F, 2'-O-Me/ GalNAc	SC
16	Eplontersen/Wainua	ASO	Ionis/Astra Zeneca	2023, FDA	hATTR	PS, 2'-O-Me/ GalNAc	SC
17	Tofersen/Qalsody	ASO	Ionis/Biogen	2023, FDA	ALS	PS, 2'-O-Me	IT
18	Nedosiran/Rivfloza	siRNA	Dicerna (Novo Nordisk)/ Alnylam	2023, FDA	PH1	PS, 2'-F, 2'-O-Me/ GalNAc	SC
19	Avacincaptad pegol/Lzervay	Aptamer	Lveric Bio/Archemix	2023, FDA	GA	—	IVI

近几十年研究显示, ASO 抗菌作用机制主要是反义核酸通过专有占位或者剪切依赖机制与细菌的 mRNA 进行互补配对, 干扰其正常翻译表达, 反义核酸抑菌抑制过程与机制如图 1 所示。其中, 专有占位是指反义核酸与靶 mRNA 通过碱基互补配对原理结合后, 形成空间位阻效应, 影响核糖体多肽的延长与成熟, 阻断其翻译; 剪切依赖机制是指反义核酸与 mRNA 结合后激活内源性核糖核酸酶 (ribonuclease, RNase) 等, 降解 mRNA。其主要有 3 种方式, 即由双链 RNA 介导的 mRNA 的降解、由 RNase H 介导的 RNA/DNA 杂交双链中的 RNA 链降解, 以及通过 RNase P 介导的降解作用。

2.2 反义核酸抗菌的生物学靶点

反义核酸抗菌的优点已在生物医学研究领域得到广泛认可, 大量研究表明, 反义核酸在替代传统抗生素抗菌方面具有显著优势。近年来, 越来越多研究者采用反义技术在基因组内筛选致病菌必需基因作为靶点抗菌, 其抗菌、抗感染策略主要集中在细胞侵袭和细菌

生长的抑制剂、生物膜形成的抑制剂、辅助递送抗菌剂、细菌毒素的抑制剂、抗生素增强剂及耐药相关酶的抑制剂开发等方面, 总结及分析反义抗菌靶点、递送载体及抗菌效果见表 2^[4-13]。

2.2.1 抑制细菌生长代谢的必需基因

丝状温度敏感蛋白 Z (filamenting temperature-sensitive mutant Z, FtsZ) 是一种高度保守的细菌管蛋白同源物, 细菌细胞分裂由 FtsZ 介导, 形成一个收缩环, 将 2 个子细胞分开^[14]。ftsZ 基因被认为是新抗菌剂的理想靶点^[15]。针对 ftsZ 基因的反义核酸已被证明对铜绿假单胞菌^[16]、肠球菌^[17]和 *E. coli*^[18]等具有显著的抗菌作用。Meng 等^[15]将靶向 ftsZ mRNA 的锁核酸 (locked nucleic acid, LNA) 与细胞穿透肽 (cell-penetrating peptides, CPPs) 偶联, 生成肽-LNA (peptide-LNA, PLNA)。在上皮细胞培养中, 合成的 PLNA787 抑制了细菌生长, 提高了感染小鼠生存率, 有较好的体内外抑制作用。

肽聚糖 (peptidoglycan, PG) 是组成细菌细胞壁的重要组成部分, PG 包裹在细菌外层, 与细菌菌体分裂、

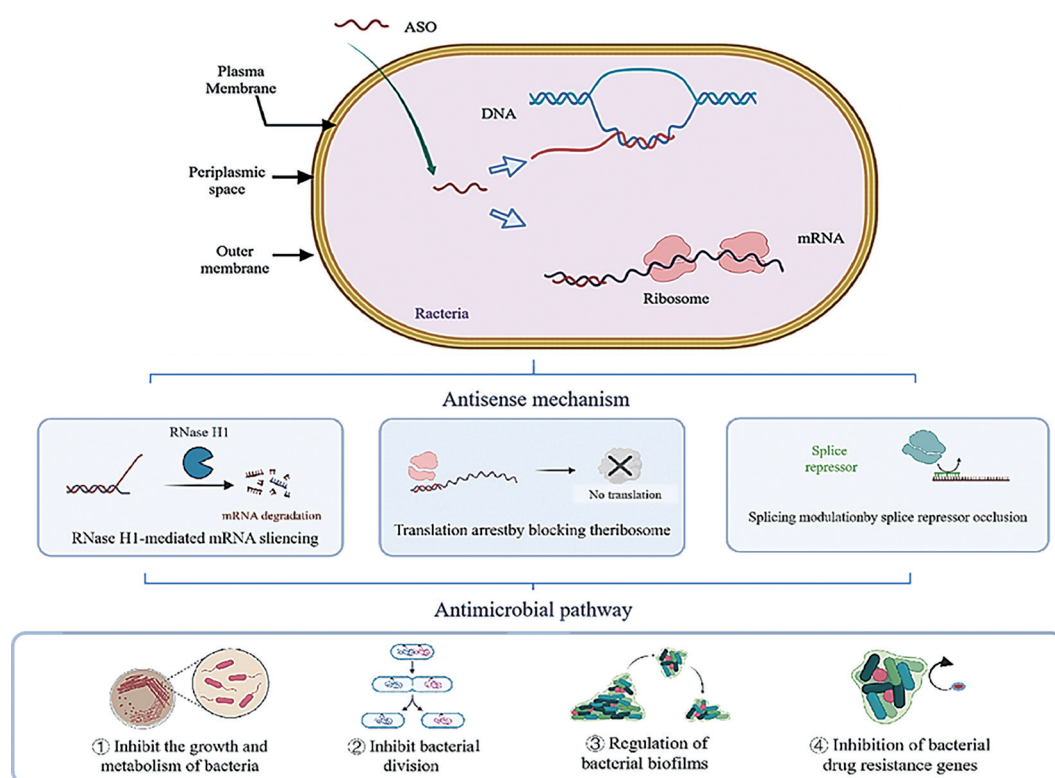


Figure 1 Two mechanisms of designing antisense antimicrobial agents to inhibit gene expression and the antimicrobial pathways of ASO

形态维持和小分子信号识别息息相关^[19]。自青霉素被发现后,阻断PG的合成一直是小分子抗生素抗菌的常见靶点方向,尤其是 β -内酰胺类抗生素。在*S. aureus*中,PG特征性五甘氨酸间肽合成第一步的催化因子是由基因*fmbB*编码的,基因*fmbB*可作为新型抗菌剂的潜在靶标,用于控制新出现的多重耐药金黄色葡萄球菌感染威胁。ASO可阻断FmbB蛋白的合成,消耗细菌中细胞壁组装所需的各种酶。研究发现,对基因起始密码子具有特异性的PNA能通过耗尽细菌FmbB蛋白,在一定浓度下完全抑制细菌体外生长。靶向革兰氏阴性菌(Gram-negative bacteria, GNB) PG合成机制的ASO已在*E. coli*^[18]和铜绿假单胞菌^[16]等细菌中进行了相关研究。

在抗生素开发策略中,针对抑制脂质生物合成是小分子药物相对不常见的抗菌靶点方向^[20]。酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)是细菌脂质延伸的支架^[21],研究者证明基因*acpP*主要编码GNB鲍曼不动杆菌^[22]、*E. coli*^[18]、铜绿假单胞菌^[16]的ACP。Moustafa等^[23]证明了肽偶联PMO可以抑制铜绿假单胞菌中特定必需基因的互补mRNA的翻译,使其停止生长从而达到抗菌目的,为铜绿假单胞菌抗生素耐药性相关的问题提供了新方法。

2.2.2 抗生素抗性基因 细菌抵抗抗生素抑制或杀伤

作用主要来源于耐药基因和靶点的表达,这些基因可编码多种耐药机制,包括抗生素修饰酶、药物外排系统、药物结合位点突变,以及细菌生理变化(如生物膜形成和膜通透性改变)。开发治疗性佐剂、抑制导致抗生素有效性降低的抗性机制,是新型抗生素替代方案。小分子抗生素佐剂已广泛用于恢复 β -内酰胺类抗生素活性,常见的抗生素 β -内酰胺酶抑制剂组合治疗包括阿莫西林-克拉维酸、头孢他啶-阿维巴坦和亚胺培南-曲马巴坦等。抗菌佐剂已经在反义核酸领域进行了探索,即小分子抗生素的功效通过ASO的加入而使细菌恢复对原有抗生素敏感性,协同增效。

*mecA*基因是编码产生青霉素结合蛋白2a的结构基因,由转座子携带并整合至葡萄球菌染色体的*mec*部位。*mec*片段是葡萄球菌染色体上获得的外源片段,为大约30~50 kb的染色体DNA,*mecA*基因对几乎所有 β -14内酰胺类抗生素产生耐药^[24],其在葡萄球菌物种中高度保守,是理想的反义抑制靶点。Meng等^[12]在*mecA* mRNA编码区发现了一个对反义抑制特别敏感的靶序列(854~871 nt),随后,他们通过反义核酸抗生素抑制*mecA* mRNA的表达,使MRSA耐药性降低,为对抗MRSA感染提供了一种有效的抗生素佐剂。

2.2.3 调控细菌的生物膜及细菌毒力 生物膜耐药性

Table 2 Summary and analysis of antisense antibacterial target, delivery carrier and antibacterial efficacy. MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; GP-SiNPs: Glucose polymer-silicon nanoparticles; MIC: Minimum inhibitory concentration; CPPs: Cell-penetrating peptides; PNA: Peptide nucleic acids; ZIF-8: Zeolite imidazole framework-8; 6HB: Six-helical bundle; PEI: Polyethylenimine; AuNPs: Au nanoparticles; MLAuNPs: Multi-layer coated Au nanoparticles; CTX: Cefotaxime

No.	Strain	Target	Mechanism	Delivery carrier	Result	Ref.
1	<i>E. coli</i> , MRSA	<i>acpP</i> mRNA	Inhibition of fatty acid synthesis	GP-SiNPs	100% Kill human-derived resistant bacteria; the uptake efficiency (51.6%) surpassed that of CPPs. The MIC for <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> was reduced to 0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[4]
2	<i>E. coli</i> K12	The start codon region of <i>acpP</i> mRNA	Inhibition of fatty acid synthesis	CPPs	The MIC of anti- <i>acpP</i> peptide-PNAs was reduced to 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[5]
3	<i>S. aureus</i>	<i>fmbB</i> mRNA	Inhibition of peptidoglycan synthesis	CPPs	The growth of <i>S. aureus</i> was effectively inhibited in a dose-dependent using PNAs	[6]
4	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , MRSA	<i>ftsZ</i> genes	Inhibition of the <i>ftsZ</i> gene, thereby inhibiting bacterial division	ZIF-8	Synergistic, broad-spectrum antibacterial; the biofilm removal efficacy reached 88.2%, while the MIC exhibited a reduction to 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	[7]
5	<i>S. aureus</i>	<i>ftsZ</i> genes	Inhibition of the <i>ftsZ</i> gene, thereby inhibiting bacterial division	6HB	ASO and Ag^+ exhibit a synergistic effect in antimicrobial therapy, providing a broad-spectrum antimicrobial activity	[8]
6	<i>S. aureus</i>	<i>yycF</i> mRNA	Regulation negatively of <i>yycF</i> transcription by the two-component system, regulates formation of biofilm	GO	The onset of the log phase was delayed by a duration of 3h; there was an approximate twofold reduction in biofilm formation	[9,10]
7	MRSA, <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>mecA</i> genes	Inhibition of <i>mecA</i> gene expression	AuNPs, PEI, MLAuNPs	The uptake efficiency was observed to be 74%; when combined with oxacillin, a significant reduction of 29% in MRSA was achieved	[11]
8	MRSA	<i>mecA</i> genes	Inhibition of <i>mecA</i> gene expression	Anionic liposome	The expression of penicillin-binding protein 2a is inhibited, thereby enhancing the affinity of antibiotics; combined with oxacillin, the MIC was reduced to 0.13 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	[12]
9	<i>E. coli</i>	β -Lactamase CTX-M-group 1	Inhibition of the expression of β -lactamase CTX-M-group 1	Tetrahedral framework	Reinstatement of cefotaxime susceptibility in strains exhibiting susceptible phenotypes. The MIC of cefotaxime (CTX 16 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was reduced from 35 to 16 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	[13]

主要与细菌生长缓慢和抗菌剂难以扩散有关。YycFG双组分系统普遍存在于细菌中,以适应外部环境刺激和营养变化,是细菌应对外界环境的重要信息传递系统^[9]。其中,表达反应调节子YycG的是一种组氨酸激酶,在一定刺激下可以磷酸化,并将磷酸化基转移到同源反应调节因子YycF^[25]。当YycFG缺失时,*S. aureus*的生存能力被基本抑制。反义核酸可实现*S. aureus*中YycFG的调控,在毒力和生物膜代谢表达调控中发挥重要作用。Wu等^[9,10]利用氧化石墨烯(graphene oxide, GO)作为反义*yycF* RNA的递送载体,使反义*yycF* RNA通过转录后调节和物理切割效应触发强抗菌活性,加速感染的糖尿病伤口的愈合,抗菌效果显著。

3 反义核酸抗菌递送的研究进展

虽然,反义核酸可用于抗菌治疗具有巨大前景,但由于寡核苷酸分子质量高、高亲水性和负电荷等特性,导致皮肤、组织渗透率及细胞摄取低下,特别是在具有药物外排机制的多重耐药性(multi-drug resistance,

MDR)细菌中,细菌对核酸的摄取更加有限。一般来说,由于细菌细胞壁结构特殊,尤其是GNB的外膜,会进一步加大反义核酸进入菌内的难度^[26]。小分子化合物(如抗生素)通过外膜狭窄的 β -桶状蛋白质进入细菌。相关研究表明,只有含有胺的小分子具有两亲性、刚性和球状度低等特性,才能穿过外膜在GNB中聚集。而对于反义核酸来说,不同取代的反义核酸主链都是极性和亲水的,往往分布在细胞外液。此外,除PNA和PMO外,所有ASO药物均带负电,不易与带负电的细菌膜发生相互作用。因此,未经修饰或包裹的核酸无法跨膜运输,改进ASO递送最常用的策略包括化学修饰改善“类药性”、共价或非共价到靶向或穿透细胞的纳米颗粒上。反义核酸在细菌中的表达与在真核细胞中有很大的不同,并且用于哺乳动物细胞的常规载体,如脂质体和阳离子聚合物,对细菌细胞的递送效率低。CPPs是目前用于反义核酸递送的主要方式之一,其递送效率和载药量也受到了限制。如何在整个

抗菌过程中准确追踪或靶向致病菌并实现高效递送, 仍然是抗菌反义核酸开发的一大难题。截至目前, 各种递送载体如图 2 所示, 除 CPPs^[5]、LNPs^[27]外, 一些 DNA 纳米结构^[13]、无机纳米结构和新型递送载体^[28]等均在解决抗菌反义核酸的递送上展开了相关探索。

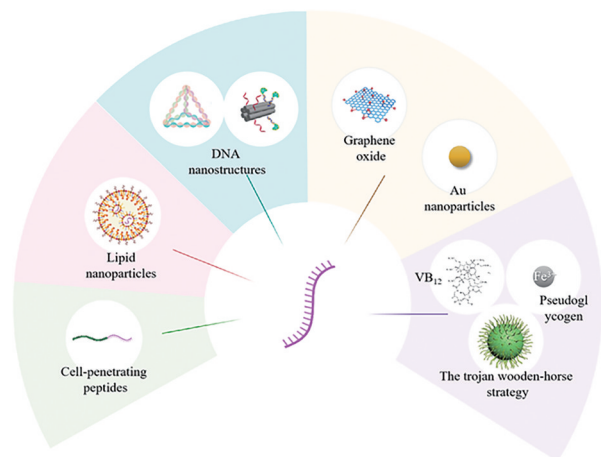


Figure 2 Delivery vectors for ASO in the field of antimicrobial therapy

3.1 细胞穿透肽

CPPs 也称为蛋白质转导域、“特洛伊木马”肽或转导肽等, 是一大类由 10~30 个氨基酸组成的短肽。到目前为止发现的 CPPs 主要包括转录反式激活蛋白、信号转导肽和富含精氨酸序列肽等。在生理 pH 条件下, 精氨酸含有的胍基可与细胞表面膜上带负电荷的磷酸基团和硫酸基团结合形成氢键, 从而产生细胞内化作用^[29]。作为纳米级转运载体, 大多数 CPPs 是无毒的, 这使其成为药物治疗、诊断, 以及蛋白质、核酸等大分子递送研究的新工具^[30]。从目前研究报道可以看出, 反义核酸与 CPPs 共价结合是目前应用最广泛的抗菌治疗方案。

Good 等^[5]首次将反义 PNA 与 CPPs 偶联, 得到了一种新的 PNA-CPPs 偶联物。PNA-CPPs 或 PMO-CPPs 的偶联复合物合成路径上较为容易, 且 PNA 和 PMO 的电中性, 与带负电荷的 ASO 相比, 更容易与 CPPs 偶联。CPPs 中最有效的序列是 KFFKFFKFFK 和 RRRRXXRRXB (X 是 6-氨基己酸, B 是 β -丙氨酸)。已有研究表明, KFFKFFKFFK 成功介导 PMO 和 PNA 进入 *E. coli*、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*)、MRSA 等。在过去的几十年中, ASO-CPPs 偶联物已被证明具有良好的体外抗菌效果, 但其疗效 (体外 10~40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 低于传统抗生素。ASO-CPPs 偶联物的进一步开发和应用还需要克服一些问题, 如 CPPs 耐药诱导, CPPs 在体液和血浆中的降解影

响 ASO-CPPs 偶联物的稳定性, ASO-CPPs 介导的递送系统缺乏细菌特异性, 以及对它们在不同细菌细胞中的摄取机制仍未探明^[31]。

3.2 脂质纳米颗粒

LNPs 通常是由 4 种脂质成分 (可电离的阳离子磷脂、中性辅助磷脂、胆固醇及聚乙二醇修饰的磷脂) 混合形成的直径为 50~150 nm 的均匀球体, 可载荷各种小核酸及 mRNA, 在体内发挥基因沉默作用, 或者翻译成纳米抗体、抗体和抗原发挥治疗作用。其中, 阳离子脂质是 LNPs 逃离内体的关键成分, 并可高效结合带负电的核酸^[32,33], 形成具有极高封装率且中性的 LNPs, 并保护其不被降解。Nature 杂志在其官方发布的“2022 年值得关注的七项技术”中为 LNPs 保留了位置, 与基因编辑和量子计算等前沿技术同列。尤其是当下, LNPs 在有效保护 mRNA 并将其运输到细胞当中发挥着举足轻重的作用, 不仅是抗击新冠疫情的重要武器—mRNA 疫苗的关键成分, 也应用到了医学影像、营养品、农业、化妆品及纳米反应器等其他领域。新一代 LNPs, 包括固体脂质纳米粒、纳米结构脂质载体和阳离子脂质-核酸复合物^[34,35], 表现出更复杂的内部结构和更优秀的物理稳定性^[36]。LNPs 能够控制体内药物递送的靶向位置和时间, 可为多种疾病提供治疗方案^[37,38]。

LNPs 由于递送系统的成熟性和先进性, 作为反义核酸的载体, 已被应用于对抗 MDR 细菌、提高抗生素敏感性的相关研究^[39]。Xue 等^[31]制备了一种新型的阴离子脂质体, 其介导抗青霉素结合蛋白 2a 基因可使 MRSA 在含苯唑西林 (6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 Mueller-Hinton 琼脂培养基中的 *mecA* 表达降低 45%~93%, 并抑制了 MRSA 的生长, 恢复了耐氟喹诺酮 *E. coli* 的抗生素敏感性。此外, 商业化的 Lipofectamine™ 2000 也具有封装 ASO 且抑制细菌繁殖的潜力, 但对哺乳动物细胞显示出明显的抗菌活性的同时, 细胞毒性较大。因此, 人们还需开发能够将 ASO 高效递送到细菌中且低细胞毒性的 LNPs。

3.3 DNA 纳米结构

随着 DNA 纳米技术的快速发展, 一些具有三维稳定纳米结构的 DNA 纳米材料可作为药物载体, 用于递送多种药物和进行基因治疗^[40]。功能核酸是一类功能超出核酸常规遗传作用的核酸, 主要包括天然的核酶 (RNazymes)、核糖开关, 以及体外通过指数富集配体系统进化技术筛选的 aptamers、RNazymes 和脱氧核酶等^[41]。通过 Watson-Crick 碱基配对规则, 成功地设计和合成了一系列具有明确尺寸、形状、表面化学和功能的自组装 DNA 纳米结构^[42]。这类通过互补序列的杂

交精确地组装成各种 DNA 多面体线框笼, 例如四面体 (tetrahedral DNA nanostructure, TDN)、立方体和二十面体等, 被用作各种领域的研究工具, 并且几种不同形状 of DNA 纳米结构在递送 siRNA 和 ASO 到哺乳动物细胞方面已经有了广泛的研究^[43]。

TDN 由于其修饰简单、稳定性高和生物相容性佳, 可作为化疗药物、核酸药物和成像探针的载体^[44], 其连接反义核酸在治疗细菌感染中有了新发展。Readman 等^[13]将可抑制 *E. coli* 中抗 CTX 基因表达的 PNA 加于 TDN 中使其穿透 *E. coli* 的细胞壁, 证明在 TDN 携带 PNA4 ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的条件下, CTX 对 *E. coli* 的 MIC 从 $35 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 降至 $16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。相反, 仅存在 PNA 时未观察到 MIC 的降低。在 Setyawati 等^[45]的另一项研究中, 将放线菌素 D 插于 TDN 中传递杀灭细菌, 在这些纳米结构进入细菌细胞后才观察到足够的细菌死亡, 带有放线菌素 D 的 TDN 杀灭传染性细菌效果优于游离放线菌素 D。这两项研究可以证明 TDN 可以有效穿透细菌细胞壁, 作为细菌内递送反义核酸的载体。

DNA 纳米结构还可以在递送反义核酸的同时, 共递送其他抗菌成分, 实现协同抗菌。Long 等^[8]的研究中, 首次使用 6HB 纳米结构来共递送 ASO 和 Ag^+ 。 Ag^+ -6HB 偶联物对 *E. coli* 和 *S. aureus* 都表现出优异的抗菌效果, 但 ASO-6HB 偶联物可以选择性抑制 *S. aureus*, Ag^+ -6HB-ASO 共偶联物对 *S. aureus* 的抗菌效果增强。从机制而言, Ag^+ -6HB 偶联物通过破坏细胞壁而延缓细菌生长, 而靶向 *S. aureus* 的 *ftsZ* 基因的 ASO 与 6HB 偶联后, 则通过抑制 *ftsZ* 基因的表达而有效地抑制细菌在对数生长期的生长。进一步说明 Ag^+ 在 *S. aureus* 的生长初期具有延迟作用, ASO 在对数期抑制生长。此外, 共递送载体在低浓度下表现出优异的抗菌活性, 对正常哺乳动物细胞没有有害影响, 研究人员推断其选择性可能是由于细菌细胞壁的组成不同引起的。这种由 DNA 纳米结构共同递送的系统为抗菌治疗提供了一个有前景的平台, 不同形态的 DNA 纳米结构被不同细菌细胞摄取效率及穿透细菌细胞壁的机制尚不清楚, 有待进一步研究。

3.4 无机纳米颗粒

3.4.1 氧化石墨烯 GO 作为从氧化石墨上剥离下来的单层材料, 由于在表面及边缘上引入大量含氧基团, 可在水溶液及极性溶剂中稳定存在^[46], 因其具有较大表面积和多功能的化学和生物相容性, 可以有效保护复杂活性材料免受酶降解和生物干扰, 用于靶向递送、基因调控、细胞内检测和成像, 具有高摄取效率、高细胞内稳定性和极低毒性^[47]。GO 本身具有抗菌功能, 其

独特的二维蜂窝状疏水平面结构和其边缘上的羧基和羟基的亲水基团, 可以促进与脂质、蛋白质、DNA 等的生物分子的相互作用, 并诱导细菌死亡而无需细胞内过程^[48]。

Wu 等^[10]构建了一种新型抗菌、促进愈合的甲基丙烯酸酯化透明质酸 (hyaluronic acid methacryloyl, HAMA)/羧甲基壳聚糖 (carboxymethyl chitosan, CMCS) 核壳微针贴片, 以 GO 为载体包载反义 *yycF* 基因, 通过转录后调节和物理切割效应触发强抗菌活性。该微针刺穿生物膜后, 其微针聚合物将部分降解并破坏带负电的细菌细胞壁, GO 和反义 *yycF* 基因会立即分散到生物膜中, 由 GO 的截断效应和反义 *yycF* 基因的转录后调节共同杀死细菌。微针在 *S. aureus* 中释放反义 *yycF*-GO, 控制蛋白 *yycF* 的表达和透明质酸酶的分泌, 促使 HAMA 微针加速降解。同时, GO 本身在一定浓度下具有杀菌效果且不伤害宿主细胞, 这使基因转化效率更高, 抗菌效果增强。

3.4.2 金纳米颗粒 (Au nanoparticles, AuNPs)

AuNPs 是通过 Au (I) 或 Au (III) 还原成 Au (0) 而制备的纳米尺寸颗粒, 因其较大的比表面积来运输药物, 表现出良好的生物相容性^[49]。在过去的几十年中, 具有独特性质的 AuNPs 已被证明是高效的药物递送载体, 不同 ASO 与 AuNPs 的结合已经广泛用于医学研究中。AuNPs 能够不断释放金离子, 这些金离子可以黏附在细胞壁和细胞质膜上, 膜蛋白是金离子的重要靶标, 黏附的离子可以改善细胞质膜通透性并导致细菌包膜的破坏^[50]。经共价或非共价缀合与核酸选择性协同修饰后, 核酸链通过硫醇基团共价连接到 AuNPs 核心上, 递送到其靶标, 可以通过生物内部刺激或外部光激活控制核酸药物的释放产生疗效^[51]。Beha 等^[11]使用多层 AuNPs 作为载体, 包载针对 MRSA 耐药基因的 ASO, 并成功地将 ASO 递送到 MDR 细菌中, 诱导抗性基因沉默, 致使高达 74% 的 *mecA* 基因以高选择性、剂量依赖性方式不表达, 从而恢复其对抗生素的敏感性来抑制细菌生长。研究还发现 AuNPs 本身的物理化学特性, 允许其更容易穿透细菌细胞壁, 与相对被动的真核细胞内吞过程相比更快。也进一步证明 AuNPs 本身也具有抗菌能力, 可影响细菌和人细胞的代谢功能和生长, 可以在细胞中积累并破坏细胞膜, 引起低的抗微生物活性^[52]。

3.5 以“特洛伊木马”策略作为思路的递送载体

早在 20 世纪 80 年代, 科学家就提出应对耐药抗生素的“特洛伊木马”策略, 该策略可简单地认为 GNB 和革兰氏阳性菌 (Gram-positive bacteria, GPB) 都可以强烈且有选择性地“食用”它们的“假冒食品”。利用该特

性可搭便车地将具有抗菌活性物质与铁载体^[53]、维生素B₁₂^[54]、特异性糖原^[55]等通过细菌特异的转运系统将抗菌物质转运到细菌细胞内,从内部将细菌杀死。铁霉素是一种新型抗生素,其母体抗生素与铁载体相连接,并通过铁运输途径主动转运至细菌内。Wang等^[56]提出一种双重“特洛伊木马”策略,儿茶酚可以作为铁载体被铜绿假单胞菌识别并主动摄取,使金属-铁霉素复合物同时通过铁载体受体转运进细胞内,以此达到协同抗菌效果,提高铁霉素抗菌活性。在传递抗菌活性分子方面,“特洛伊木马”递送策略能够将药物分子传递到特定药物或类药物分子的靶定位点,展示出了一定前景。

维生素B₁₂是一种天然的有机金属分子,是哺乳动物代谢中的必需营养辅助因子^[57]。维生素B₁₂不能在人体内合成,因此必须包含在饮食中,靠体内细菌摄取吸收。在微生物学研究发现,大多数需氧细菌需要维生素B₁₂才能生长,在细菌中存在完善的维生素B₁₂摄取机制,这使得维生素B₁₂成为一种易于开发的药物载体候选物^[48]。维生素B₁₂已被用作哺乳动物细胞中的递送载体,为了利用维生素B₁₂天然吸收特性,有研究将该分子修饰并缀合至PNA寡聚物上,在某些位置的缀合显著改变了哺乳动物细胞中维生素B₁₂的结合特性^[58]。所以,如何在PNA转运中成功利用维生素B₁₂的摄取途径,且不影响PNA与其靶标的相互作用

是研究的重点。Równicki等^[28]采用铜催化的1,3-偶极环加成反应合成PNA-维生素B₁₂偶联物,作用于*E. coli*和*S. typhimurium*。研究发现维生素B₁₂可以将PNA转运到*E. coli*内,且比广泛使用的CPPs更有效,在*E. coli*和*S. typhimurium*中的反义抑制效力不同,这主要是由于细胞壁结构和维生素B₁₂摄取机制存在差异。

ABC转运蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC transporter)是一类依靠ATP水解提供能量跨膜转运底物的蛋白质家族,使细菌吸收和代谢 $\alpha(1-4)$ -糖苷键连接的葡萄糖聚合物^[59]。目前,研究者们已经利用细菌特异性ABC转运蛋白成功地将修饰有葡萄糖聚合物(glucose polymer, GP)的纳米颗粒转运到细菌中。Liu等^[4]将反义PNA偶联在GP包裹的荧光硅纳米颗粒上,该纳米颗粒利用细菌特异性ABC转运蛋白途径被多种细菌选择性吞噬,递送示意图如图3所示。研究还进一步证明,ABC糖转运体突变的细菌很难内化该纳米颗粒。ASO进入细菌后,会与靶点序列结合,选择性抑制细菌中的基因表达,有效地杀死细菌。其中,反义PNA由两个连续块组成:Ec108 *acpP*和Sau101 *fmbB*。Ec108 *acpP*内化到*E. coli*细胞内后,与*acpP*转录形成的mRNA的起始密码区相结合,激活内源性RNA酶降解mEc108 *acpP*,抑制脂肪酸的合成。Sau101 *fmbB*内化到*S. aureus*细胞内后,会与*fmbB*转

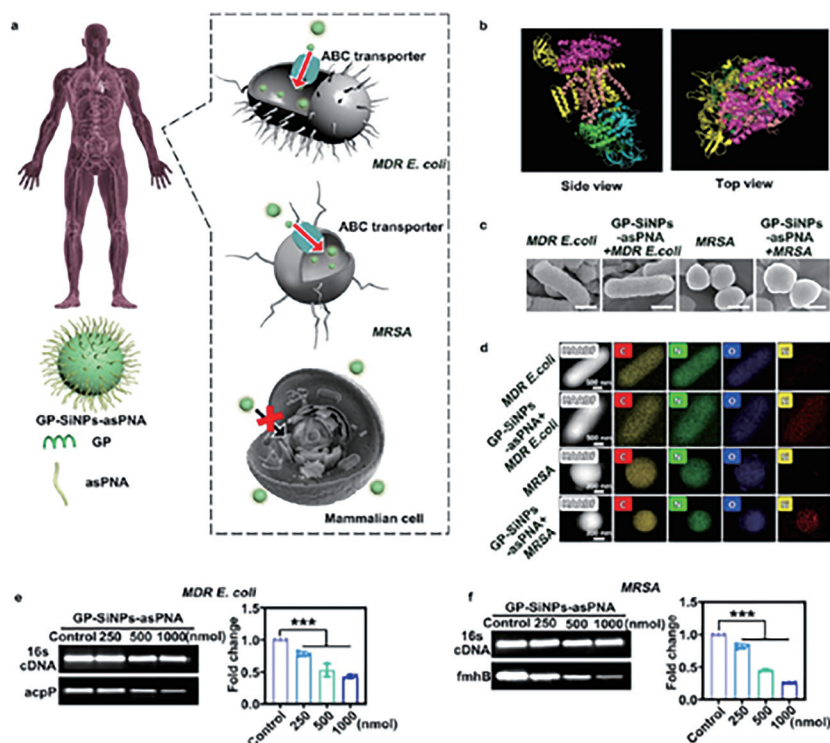


Figure 3 Schematic of the selective delivery of the antisense peptide nucleic acids (asPNA) into bacterial cells^[4]. Adapted from Ref. 4 with permission. Copyright © 2023 Wiley-VCH GmbH, Weinheim

录形成的 mRNA 的起始密码区相结合, 激活内源性 RNA 酶降解 *Sau101 fmhB*, 抑制 PG 的合成。

4 展望与挑战

细菌耐药性问题是治疗细菌感染的主要障碍, 寻找疗效好、毒副作用小的抗菌治疗策略, 从而达到解决细菌耐药性的目的是当前研究热点。反义核酸突破以细菌蛋白为靶点的经典药物研究思路, 以细菌耐药、致病、生长繁殖及生物膜形成等基因为作用靶点, 通过阻断相关基因表达来抑制或者杀灭细菌, 具有特异性强、研发成本低的优点。通过近几十年研究, ASO 对致病菌的必需基因、耐药基因等基因表达的抑制作用已被不同研究广泛证实, 各种递送载体, 如 CPPs、LNPs、DNA 纳米结构、无机纳米结构等, 均在解决抗菌反义核酸的递送上展开了相关探索。本综述围绕近些年小核酸药物的发展现状, 反义抗菌的抗菌机制、靶点及序列, 以及在反义核酸抗菌递送载体等方面进行了总结归纳。

总体来看, 部分策略在有效抗菌、逆转细菌耐药性等方面取得了可喜的成果, 但仍缺乏相关摄取机制的探索及临床试验数据的支撑。在未来工作中, 深入探讨反义靶点与抗菌机制之间的联系, 利用分子生物学等技术探究不同细菌对不同反义核酸载体的摄取机制, 仍有广泛的研究空间。然而, 基于 ASO 的抗菌药物的研究与开发仍然存在很多问题, 如递送系统的优化及耐药性评估等。因此, 仍然需要不断推进反义核酸抗菌的临床研究, 为反义抗菌在临床应用提供充分理论依据和实验数据。

作者贡献: 李佳和韩晓璐具体完成文章撰写; 宋世显完成文献检索和筛选; 林锦涛和唐志强完成文章的修改; 王增明和徐亮确定文章方向及内容组成; 郑爱萍对文章撰写质量进行把关和审核。

利益冲突: 文章内容不涉及相关利益冲突, 未涉及任何厂家及相关经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

References

- [1] An GH. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of GalNAc-conjugated siRNAs [J]. *J Clin Pharmacol*, 2023, 64: 45-57.
- [2] Vale PF, Little TJ. CRISPR-mediated phage resistance and the ghost of coevolution past [J]. *Proc Biol Sci*, 2010, 277: 2097-2103.
- [3] Liao YK, Lan SG, Su AQ, et al. Research progress on reversal of bacterial drug resistance [J]. *Chin J Antibiot (中国抗生素杂志)*, 2023, 48: 32-40.
- [4] Liu MZ, Chu BB, Sun R, et al. Antisense oligonucleotides selectively enter human-derived antibiotic-resistant bacteria through bacterial-specific ATP-binding cassette sugar transporter [J]. *Adv Mater*, 2023, 35: e2300477.
- [5] Good L, Awasthi SK, Dryselius R, et al. Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 360-364.
- [6] Nekhotiaeva N, Awasthi SK, Nielsen PE, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* gene expression and growth using antisense peptide nucleic acids [J]. *Mol Ther*, 2004, 10: 652-659.
- [7] Zhang Y, Lai LG, Liu YJ, et al. Biomaterialized cascade enzyme-encapsulated ZIF-8 nanoparticles combined with antisense oligonucleotides for drug-resistant bacteria treatment [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14: 6453-6464.
- [8] Long QP, Jia B, Shi Y, et al. DNA nanodevice as a co-delivery vehicle of antisense oligonucleotide and silver ions for selective inhibition of bacteria growth [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13: 47987-47995.
- [9] Wu SZ, Liu YJ, Lei L, et al. An antisense *yycF* RNA modulates biofilm organization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and pathogenicity in a rat model of osteomyelitis [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10: 603.
- [10] Wu SZ, Qin BQ, Tang XF, et al. Enzyme-responsive microneedle patch for bacterial infection and accelerated healing of diabetic wounds [J]. *Chem Eng J*, 2023, 466: 143126.
- [11] Beha MJ, Ryu JS, Kim YS, et al. Delivery of antisense oligonucleotides using multi-layer coated gold nanoparticles to methicillin-resistant *S. aureus* for combinatorial treatment [J]. *Mat Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 126: 112167.
- [12] Meng JR, He GH, Wang H, et al. Reversion of antibiotic resistance by inhibiting *mecA* in clinical methicillin-resistant *Staphylococci* by antisense phosphorothioate oligonucleotide [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2015, 68: 158-164.
- [13] Readman JB, Dickson G, Coldham NG. Tetrahedral DNA nanoparticle vector for intracellular delivery of targeted peptide nucleic acid antisense agents to restore antibiotic sensitivity in cefotaxime-resistant *Escherichia coli* [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2017, 27: 176-181.
- [14] Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z, et al. Is the mazEF toxin-antitoxin system responsible for vancomycin resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecalis*? [J]. *GMS Hyg Infect Control*, 2014, 9: Doc05.
- [15] Meng JR, Da F, Ma X, et al. Antisense growth inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by locked nucleic acid conjugated with cell-penetrating peptide as a novel FtsZ inhibitor [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59: 914-922.
- [16] Ghosal A, Nielsen PE. Potent antibacterial antisense peptide-peptide nucleic acid conjugates against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2012, 22: 323-334.
- [17] Mondhe M, Chessher A, Goh S, et al. Species-selective killing of bacteria by antimicrobial peptide-PNAs [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e89082.
- [18] Goh S, Boberek JM, Nakashima N, et al. Concurrent growth

- rate and transcript analyses reveal essential gene stringency in *Escherichia coli* [J]. PLoS One, 2009, 4: e6061.
- [19] Lou J, Hu X, Liang YQ, et al. Peptidoglycan biosynthesis and the regulatory mechanism [J]. Acta Microbiol Sin (微生物学报), 2023, 63: 106-123.
- [20] Wright HT, Reynolds KA. Antibacterial targets in fatty acid biosynthesis [J]. Curr Opin Microbiol, 2007, 10: 447-453.
- [21] Cronan JE, Thomas J. Chapter 17 bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways [J]. Method Enzymol, 2009, 459: 395-433.
- [22] Geller BL, Marshall-Batty K, Schnell FJ, et al. Gene-silencing antisense oligomers inhibit *Acinetobacter* growth *in vitro* and *in vivo* [J]. J Infect Dis, 2013, 208: 1553-1560.
- [23] Moustafa D, Zamora D, Yabe GM, et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by peptide-conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomers [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61: e01938-16.
- [24] Larsen J, Raisen CL, Ba XL, et al. Emergence of methicillin resistance predates the clinical use of antibiotics [J]. Nature, 2022, 602: 135-141.
- [25] Razavi L, Raissi H, Farzad F. Graphene oxide and silicene as 2D platforms for complexation and intracellular delivery of siRNA [J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2024, 95: 105514.
- [26] Good L, Sandberg R, Larsson O, et al. Antisense PNA effects in *Escherichia coli* are limited by the outer-membrane LPS layer [J]. Microbiology (Reading), 2000, 146: 2665-2670.
- [27] Meng JR, Wang H, Hou Z, et al. Novel anion liposome-encapsulated antisense oligonucleotide restores susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rescues mice from lethal sepsis by targeting *mecA* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53: 2871-2878.
- [28] Równicki M, Wojciechowska M, Wierzba AJ, et al. Vitamin B₁₂ as a carrier of peptide nucleic acid (PNA) into bacterial cells [J]. Sci Rep, 2017, 7: 7644.
- [29] 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.
- [30] Qin Y, Wang GX, Liu F. A new macro molecular nano-carrier-recent advances in research and application of cell penetrating peptides [J]. Chin J Cell Biol (中国细胞生物学学报), 2014, 36: 1169-1177.
- [31] Xue XY, Mao XG, Zhou Y, et al. Advances in the delivery of antisense oligonucleotides for combating bacterial infectious diseases [J]. Nanomedicine, 2018, 14: 745-758.
- [32] Ma Y, Zhao WT, Li YD, et al. Structural optimization and additional targets identification of antisense oligonucleotide G3139 encapsulated in a neutral cytidinyl-lipid combined with a cationic lipid *in vitro* and *in vivo* [J]. Biomaterials, 2019, 197: 182-193.
- [33] Guan J, Pan YF, Li HT, et al. Activity and tissue distribution of antisense oligonucleotide CT102 encapsulated with cytidinyl/cationic lipid against hepatocellular carcinoma [J]. Mol Pharm, 2022, 19: 4552-4564.
- [34] Pan YF, Zhu YJ, Ma Y, et al. Design and synthesis of nucleotidyl lipids and their application in the targeted delivery of siG12D for pancreatic cancer therapy [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 172: 116239.
- [35] Zhou XY, Pan YF, Li Z, et al. siRNA packaged with neutral cytidinyl/cationic/PEG lipids for enhanced antitumor efficiency and safety *in vitro* and *in vivo* [J]. ACS Appl Bio Mater, 2020, 3: 6297-6309.
- [36] Tenchov R, Bird R, Curtze AE, et al. Lipid nanoparticles-from liposomes to mRNA vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement [J]. ACS Nano, 2021, 15: 16982-17015.
- [37] Pan YF, Guan J, Gao YJ, et al. Modified ASO conjugates encapsulated with cytidinyl/cationic lipids exhibit more potent and longer-lasting anti-HCC effects [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2023, 32: 807-821.
- [38] Zhou XY, Pan YF, Yu LJ, et al. Feasibility of cRGD conjugation at 5'-antisense strand of siRNA by phosphodiester linkage extension [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 25: 603-612.
- [39] Ghosh R, De M. Liposome-based antibacterial delivery: an emergent approach to combat bacterial infections [J]. ACS Omega, 2023, 8: 35442-35451.
- [40] Ma WJ, Zhan YX, Zhang YX, et al. The biological applications of DNA nanomaterials: current challenges and future directions [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6: 3202-3229.
- [41] Zhao WZ, Li CX, Hu ZJ, et al. Research progress of functional nucleic acid used in pathogenic bacteria detection [J]. Curr Biotechnol (生物技术进展), 2023, 13: 30-38.
- [42] Shen FY, Wang HH, Liu Z, et al. DNA nanostructures: self-adjuvant carriers for highly efficient subunit vaccines [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2024, 63: e202312624.
- [43] Chen YL, Shi SR. Advances and prospects of dynamic DNA nanostructures in biomedical applications [J]. RSC Adv, 2022, 12: 30310-30320.
- [44] Yan JQ, Zhan XH, Zhang ZZ, et al. Tetrahedral DNA nanostructures for effective treatment of cancer: advances and prospects [J]. J Nanobiotechnology, 2021, 19: 412.
- [45] Setyawati MI, Kuttu RV, Tay CY, et al. Novel theranostic DNA nanoscaffolds for the simultaneous detection and killing of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2014, 6: 21822-21831.
- [46] Chen JL. Chemical Functionalization of Graphene Oxide and Graphene-Based Derivatives/Nanocomposites: Preparations and Properties (氧化石墨烯的功能化及其衍生物、复合物的制备与性能研究) [D]. Changchun: Jilin University, 2013.
- [47] Tripathi SK, Goyal R, Gupta KC, et al. Functionalized graphene oxide mediated nucleic acid delivery [J]. Carbon, 2013, 51: 224-235.
- [48] Zheng HZ, Ma RL, Gao M, et al. Antibacterial applications

- of graphene oxides: structure-activity relationships, molecular initiating events and biosafety [J]. *Sci Bull (Beijing)*, 2018, 63: 133-142.
- [49] Wang ZG, Dong JY, Zhao QJJ, et al. Gold nanoparticle-mediated delivery of paclitaxel and nucleic acids for cancer therapy [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22: 4475-4484.
- [50] Liu YL, Wu L. Advances in antibacterial mechanism of gold nanoparticles [J]. *J Biomed (生物医学)*, 2023, 13: 145-150.
- [51] Liu RY, Lu Y. Research progress of nanoparticles in the development of antimicrobial agent dosage forms [J]. *Chin J Antibiot (中国抗生素杂志)*, 2023, 48: 728-735.
- [52] Kafil V, Omid Y. Cytotoxic impacts of linear and branched polyethylenimine nanostructures in A431 cells [J]. *Bioimpacts*, 2011, 1: 23-30.
- [53] Abbasian M, Khayyatlimohammadi M. Ultrasound-assisted synthesis of MIL-88 (Fe) conjugated starch-Fe₃O₄ nanocomposite: a safe antibacterial carrier for controlled release of tetracycline [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 234: 123665.
- [54] Gruber K, Puffer B, Kräutler B. Vitamin B₁₂-derivatives-enzyme cofactors and ligands of proteins and nucleic acids [J]. *Chem Soc Rev*, 2011, 40: 4346-4363.
- [55] Wang YT, Wo EK. Immunological enhancement of chitosan nanoparticles as gene carriers [J]. *Chin J Tissue Eng Res (中国组织工程研究与临床康复)*, 2008, 12: 8835-8838.
- [56] Wang CY, Xia YS, Wang RM, et al. Metallo-sideromycin as a dual functional complex for combating antimicrobial resistance [J]. *Nat Commun*, 2023, 14: 5311.
- [57] Wuerges J, Garau G, Geremia S, et al. Structural basis for mammalian vitamin B₁₂ transport by transcobalamin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 4386-4391.
- [58] Clardy SM, Allis DG, Fairchild TJ, et al. Vitamin B₁₂ in drug delivery: breaking through the barriers to a B₁₂ bioconjugate pharmaceutical [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011, 8: 127-140.
- [59] Qu JZ, Chen TH, Yao MD, et al. ABC transporter and its application in synthetic biology [J]. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)*, 2020, 36: 1754-1766.