专论 Perspectives

siRNA 新型非病毒载体递送策略新进展

陶钰萍[1]，赵珍玉[2]，李又欣[1]，孙考祥[1]，史亚楠[2*]
（1. 烟台大学药学院，山东省高校新型制剂与生物技术药物研究协同创新中心，分子药理和药物评价教育部重点实验室，山东烟台 264005；2. 烟台大学生命科学学院，山东烟台 264005）

摘要：小干扰 RNA（siRNA）是一个靶向治疗和精确医学的代表性治疗工具，可通过序列特异性的 RNA 干扰（RNAi）沉默任何疾病相关基因的表达。然而，它的治疗前景历来受到体内半衰期短、递送困难和安全问题的限制。非病毒载体介导的药物递送已经成为克服这些局限性的一个成功策略，可实现 siRNA 在体内的有效递送，高效沉默靶基因。目前，已有多种药物处于临床试验中，4 种基于 siRNA 的新型疗法已获得美国 FDA 的批准，标志着靶向疗法新时代的开始。该文概述了近年来基于 siRNA 的非病毒载体递送策略的新进展及其应用，并展望了 siRNA 药物研究的未来发展趋势。

关键词：RNA 干扰；siRNA 药物；基因沉默；药物递送；基因治疗
中图分类号：R944.9　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2023)04-0471-10
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.04.001



【专家介绍】孙考祥，2003年在中国药科大学获博士学位，现任烟台大学教授，博士生导师，中国药学会纳米药物专业委员会委员，绿叶制药的项目负责人和产品发明人。主要从事缓控释及靶向制剂的研究与开发。近年来先后主持和完成国家973专项子课题、国家自然科学基金课题、国家重大新药创制专项等多项课题。主持或参与多项注射用长效缓控释复杂制剂的产品开发，多个产品正在美国、欧洲和中国开展临床研究。其中，注射用利培酮微球（瑞欣妥®，Rykindo®）先后在中国和美国获批上市，成为首个505(b)(2)条款获得FDA批准上市的由中国药企自主研发的复杂制剂产品。在*J Control Release*、*Theranostics*、*Acta Pharm Sin B*、*ACS Appl Mater Inter*等期刊发表SCI收录论文76篇，获国内外授权发明专利20项。

Recent Advances in Novel Non-viral Vector Delivery Strategies for siRNA

TAO Yuping[1], ZHAO Zhenyu[2], LI Youxin[1], SUN Kaoxiang[1], SHI Yanan[2]*

(*1. Key Lab. of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation, Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005; 2. College of Life Science, Yantai University, Yantai 264005*)

ABSTRACT: Small interfering RNA (siRNA), a representative therapeutic tool for targeted therapy and precision medicine, can silence the expression of any disease-related gene through sequence-specific RNA interference (RNAi). However, its therapeutic prospects have historically been limited by short half-lives *in vivo*, difficulties in delivery, and safety concerns. Non-viral vector drug delivery has efficiently achieved siRNA delivery *in vivo* and silenced the target gene, becoming a successful strategy to overcome above limitations. Currently, several drugs are already in clinical trials, and four new siRNA-based therapies have been approved recently by the U.S. FDA, marking the beginning of a new era of targeted therapies. This review summarizes the recent development and application of siRNA-based non-viral vector delivery strategies and predicts the future development trend of siRNA drug research.

Key Words: RNA interference; siRNA drug; gene silencing; drug delivery; gene therapy

基因治疗可在核酸水平上干预、治疗基因异常导致的各类疾病，不仅可通过导入治疗基因原位纠正缺失或突变的基因，也可通过抑制内源性基因的异常表达，达到治疗目的[1]。用于基因治疗的核酸类药物包括可编码特定蛋白的质粒 DNA（pDNA）、信使 RNA（mRNA），以及参与调节靶基因表达水平的反义寡核苷酸、短发卡 RNA 和小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）等[2]。其中，基于 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）机制开发的 siRNA 凭借高特异性和高效性引起了广泛关注。

RNAi 机制是指一些具有特殊结构和长度（21 ～ 23 个核苷酸）的短双链 RNA（dsRNA）可特异性地识别并促使 mRNA 水解，阻断基因表达[3]，这些短 dsRNA 即为 siRNA。siRNA 可直接在体外合成再导入细胞，也可由 dsRNA 在胞内通过核酸内切酶（Dicer）切割生成[4]。siRNA 进入胞内后经内体逃逸，被整合到 RNA 诱导沉默复合物（RISC）中，与 Argonaute-2（AGO2）蛋白相互作用，解旋为 2 条单链 —— 引导链和乘客链，乘客链降解，引导链则引导 RISC 识别并切割与其碱基互补配对的 mRNA，使其水解，阻断靶基因的表达[5—6]（图 1）。

由于特殊的 RNAi 机制，siRNA 药物具有独特优势：① siRNA 理论上可靶向任何基因[6]，可针对不同疾病快速设计出相应的 siRNA 药物；② siRNA 只在胞质中发挥转录后基因沉默效果[7]，可避免宿主核基因突变的风险；③ siRNA 具有高效特异性[8]，只需少数几个片段就能在胞内诱导明显的基因沉默；④ siRNA 的效果易被检测，可通过实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）技术检测 mRNA 含量，也可用蛋白质印迹法等方法直接检测蛋白表达量[9]。

然而，siRNA 不仅可被血液中的核酸酶降解，还易被网状内皮系统和肾脏清除，难以在靶细胞中有效积蓄[4—5]；且 siRNA 相对分子质量大（约 13 000）、荷负电，因而不易穿透细胞膜。siRNA 药物入胞后需经内体逃逸才能发挥作用，但 siRNA 逃逸困难、易被内体酶降解。因此，需要合适的载体来有效保护 siRNA，并将其递送至靶点发挥作用。本研究简单介绍了 siRNA 的基本概况，综述了用于 siRNA 递送的非病毒载体的新进展，以期为新型 siRNA 递送载体研究提供文献参考。

收稿日期：2022-08-30

基金项目：山东省自然科学基金面上项目（ZR2021MH395）

作者简介：陶钰萍（1998—），女，硕士研究生，专业方向：药物新制剂。

通信作者：史亚楠（1985—），女，博士，副教授，硕士生导师，从事生物大分子药物递送系统的研究。

E-mail：shiyanan001@163.com

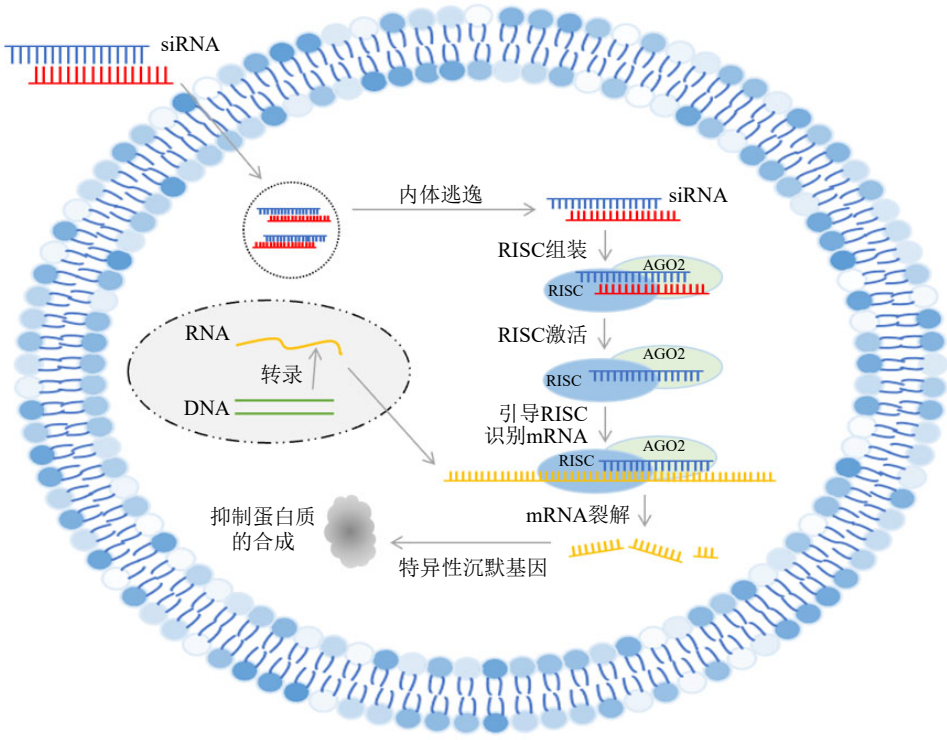


图 1 siRNA 作用机制

Fig.1 Action Mechanism of siRNA

1 siRNA 研究概况

1.1 siRNA 的应用

近年来，研究者们致力于开发基于 siRNA 的新型基因药物用于攻克由基因表达异常导致的疑难杂症。MILLER 等[10]在研究阿尔茨海默病时设计了 siRNA 来靶向突变基因，其目的基因的突变型与野生型序列只有一个错配，结果表明 siRNA 仅选择性地沉默突变基因的表达，而不影响正常野生型基因的转录。siRNA 还可用于抑制病毒感染，siRNA 药物 ARC-520 注射剂能高度特异地靶向乙肝病毒 mRNA，显著减少病毒蛋白（包括乙肝病毒表面抗原等）的表达[11]。此外，siRNA 还可用于恶性肿瘤、家族性遗传病和自身免疫性疾病等[6,12]。

1.2 siRNA 的化学修饰

如前文所述，递送裸 siRNA 有诸多限制，可通过化学修饰 siRNA 提高其在体内的稳定性和利用率。DAR 等[13]开发了专门的化学修饰 siRNA 数据库，包含 4 894 个化学修饰的 siRNA 序列。siRNA 修饰主要包括糖基修饰、主链修饰、末端修饰和碱基修饰[14]。这些化学修饰可提高 siRNA 的核酸酶抗性、延长半衰期以及改善药动学和药效学性质。然而，化学修饰法对提高 siRNA 靶向递送的效果较差[8]。

1.3 siRNA 药物的上市及临床试验情况

2018 年 8 月，经美国 FDA 批准，由美国 Alnylam Pharmaceuticals 公司研发的首个 siRNA 药物 Onpattro 开启了 RNAi 疗法的新纪元[15]。然而，目前仅有 4 个 siRNA 药物上市（表 1）[16]，更多药物尚处于临床试验阶段（表 2）。

2 siRNA 递送策略

siRNA 可被天然或合成载体包裹或结合，从而被有效地递送至特定部位，参与特定组织中的细胞内化，还可避免血清降解和巨噬细胞吞噬[8]。这些载体包括病毒和非病毒载体。然而，使用病毒载体存在安全性问题，如高免疫原性和插入突变风险；此外，低载药容量和高生产成本也限制了其临床应

表 1　FDA 批准的 siRNA 药物

Tab.1　FDA Approved siRNA Drugs

药物	化学修饰方法	递送系统	靶标	适应证	获批年份	公司名称
Onpattro (patisiran)	糖基修饰	脂质纳米粒	转甲状腺素蛋白	转甲状腺素蛋白淀粉样变性	2018	Alnylam
Givlaari (givosiran)	糖基、主链修饰	*N*-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 缀合物	δ-氨基乙酰丙酸合酶1	急性肝卟啉病 (AHP)	2019	Alnylam
Oxlumo (lumasiran)	糖基、主链修饰	GalNAc缀合物	乙醇酸氧化酶	原发性高草酸尿症1型	2020	Alnylam
Leqvio (inclisiran)	糖基、主链修饰	GalNAc缀合物	前蛋白转化酶枯草溶菌素9	成人原发性高胆固醇血症和混合型血脂异常	2021	Novartis

表 2　临床试验中的 siRNA 药物

Tab.2　siRNA Drugs in Clinical Trials

药物	靶标	载体	适应证	临床阶段	NCT号
ALN-VSP02	纺锤体驱动蛋白和血管内皮生长因子	稳定的核酸脂质颗粒	实体瘤	Ⅰ期	NCT01158079
DOPC-encapsulated siRNA	红细胞生成素产生肝细胞受体 2	中性脂质体	晚期恶性实体瘤	Ⅰ期	NCT01591356
Atu027	蛋白激酶 N3	脂质体	胰腺癌	Ⅱ期	NCT01808638
BMS-986263	热休克蛋白 47	脂质纳米粒	慢性肝病	Ⅱ期	NCT04267393
STP705	转化生长因子 β1；环氧合酶 -2	组氨酸-赖氨酸共聚物	瘢痕瘤	Ⅱ期	NCT04844840
ALN-TTRsc02	转甲状腺素蛋白	GalNAc缀合物	转甲状腺素蛋白淀粉样变性伴心肌病	Ⅲ期	NCT04153149
mesenchymal stromal cells-derived exosomes with KRAS G12D siRNA	鼠类肉瘤病毒同源癌基因 (*Kras*)	外泌体	*Kras G12D* 突变的转移性胰腺癌	Ⅰ期	NCT03608631
siG12D-LODER	*Kras*	LODER 聚合物	胰腺癌	Ⅱ期	NCT01676259

用[8,17]。而非病毒载体具有独特的性质，如纳米级尺寸 (10 ～ 1 000 nm)、低毒性和多功能性，可用于 siRNA 递送，防止 siRNA 降解、促进细胞摄取和靶向递送等，以进行有效的基因治疗[16]。

2.1　阳离子脂质

阳离子脂质是较常见的一类非病毒基因递送载体，可通过静电吸附或自组装与 siRNA 形成脂质 / siRNA 复合物，保护 siRNA 并帮助其实现内体逃逸[18]。虽然单一阳离子脂质也可作为核酸载体，但更普遍的是与辅助脂质配合使用，以调节脂质 / 核酸复合物的稳定性。根据功能，可将其分为经典阳离子脂质载体和智能型阳离子脂质载体。

2.1.1　经典阳离子脂质载体

此类载体主要包括阳离子脂质体 (cationic liposomes，CLP) 和阳离子固体脂质纳米粒 (cationic solid lipid nanoparticles，CSLN)。CLP 由阳离子脂质和中性磷脂构建。中性磷脂 [如二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 等] 的加入，既能辅助 CLP 形成，又能降低细胞毒性，提高 siRNA 的转染效率[19]。CSLN 由阳离子脂质与天然的固态脂质混合制备而成，能保护 siRNA 免受核酸酶降解，并显示出较高的细胞摄取效率，也可用作 siRNA 递送载体[20—21]。

2.1.2　智能型阳离子脂质载体

2.1.2.1　环境敏感性载体

近年来，基于脂质的环境敏感性载体备受关注，如氧化还原敏感性、酶敏感性等。这类载体只有到达特定环境部位时才会释放包载的 siRNA，可同时实现靶向递送和控制释放。

氧化还原敏感性载体是基于细胞内外谷胱甘肽 (GSH) 水平差异而设计的。依据这一生理特性，LIU 等[22] 设计了一种氧化还原敏感的 siRNA- 糖脂递送系统，即 CSO-ss-SA/siRNA，可下调 Ras 相关的 C3 肉毒杆菌毒素底物 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1，RAC1)。CSO-ss-SA 是 GSH 敏感的壳聚糖 - 硬脂酸缀合物，其糖脂接枝表面呈正电，可与 siRNA 结合。在 10 mmol/L GSH 中，CSO-ss-SA/siRNA 显示出较强的氧化还原敏感性，发生二硫键断裂、降解，释出 siRNA。研究表明，CSO-ss-SA/siRNA 能有效地将 siRNA 导入肿瘤细胞，使 RAC1 蛋白表达水平降低了 38.2%，肿瘤诱导的侵袭细胞数量减少了 45.2%。

酶敏感性载体通常含有可被酶降解的组分。有

研究[23]报道了一种酶敏感性脂质 mPEG-GLFG-K-$(C16)_2$，并用薄膜法将其与 1,2- 二油酰氧丙基 -*N*,*N*,*N*- 三甲基溴化铵（DOTAP）、DOPE 制备成酶敏感性脂质体，成功包裹了核酸药物。该脂质体与组织蛋白酶 B 混合后，mPEG-GLFG-K-$(C16)_2$ 被降解，诱导内体逃逸和药物释放。

2.1.2.2 靶向修饰性载体

采用一些可与靶细胞结合的分子，如抗体、蛋白及小分子等，对阳离子载体进行修饰，赋予其主动靶向功能，能提高基因药物的治疗效果。

YANG 等[24]用 CD44 抗体修饰载靶向特殊 AT 富集序列结合蛋白 1（SATB1）的 siRNA 脂质体，以构建靶向胃癌起始细胞（CIC 细胞）的递送载体。结果显示，该载体能有效且特异性地靶向 $CD44^+$ CIC 细胞，抑制 SATB1 表达，从而抑制 $CD44^+$ CIC 细胞增殖，并且还降低了胃癌细胞中 $CD44^+$ CIC 细胞的占比和瘤球形成率。

转铁蛋白（Tf）可与细胞表面的 Tf 受体结合，协助血浆糖蛋白运载铁离子至细胞中。WEI 等[25]开发了递送靶向 polo 样激酶 1 的 siRNA 的 Tf 功能化载体（Tf@TBP-CPs-siPLK1），用于治疗脑转移性乳腺癌。该载体表面含有 Tf 结合肽（TBP），使 Tf 能够在 siRNA 装载后进行附着，避免 Tf 对 siRNA 装载的干扰。与无 Tf 修饰制品组相比，Tf@TBP-CPs-siPLK1 在体外细胞内化和内皮细胞单层模型中的转运显著增强，并能显著增加 siRNA 在小鼠脑内原位异种移植瘤中的蓄积量，说明高特异性的 Tf 介导能有效促进制品对血脑屏障的渗透。

2.2 阳离子聚合物（cationic polymer，CP）

基于合成或天然 CP 的核酸递送系统在基因治疗药物开发中受到大量关注。CP 具有较高的正电荷密度，可与带负电荷的 siRNA 有效复合，形成尺寸较小的复合物，具有安全性高、免疫原性低、结构易于修饰等优势[26]。

天然来源 CP 是生物可降解的，主要为蛋白或多糖分子。人工合成 CP 包括聚乙烯亚胺（PEI）、聚酰胺 - 胺（PAMAM）型树枝状聚合物和多聚赖氨酸等。此类 CP 不可生物降解，且具有较强的细胞毒性和肝脏积蓄，其应用受到了严重限制[27]。

2.2.1 PAMAM

PAMAM 可将 siRNA 压缩形成纳米复合物，以防止 siRNA 被核酸酶降解。HU 等[28]结合 pH 敏感性脂质体和 PAMAM 的独特优势，设计了一种“简单但坚固”的多功能载体（siPD-L1@PM/DOX/LPs），包含 pH 敏感性脂质体（LPs）壳和树突状 PAMAM 核，用于程序性死亡受体配体 1（PD-L1）siRNA 和多柔比星（DOX）的共递送。在该载体中，siRNA 不依赖于纳米材料表面的静电作用而聚集，而是被 PAMAM 压缩，然后被完全封装到 LPs 中，从而减少对核酸酶的暴露。siPD-L1@PM/DOX/LPs 在血清中具有良好的稳定性，体外释放行为具有 pH 敏感性。与游离 DOX 和负载 DOX 的 LPs 相比，该共递送系统表现出显著的细胞增殖抑制作用，且能有效地将 siRNA 释放到胞质中，显著降低肿瘤细胞中 PD-L1 的表达。体内成像试验证实其在肿瘤部位出现高积蓄。

2.2.2 壳聚糖（CS）及其衍生物

CS 是唯一含有大量碱性氨基多糖的天然多糖，荷正电，可与荷负电的 siRNA 结合，而存在于 CS 链中的氨基和羟基有利于进行化学修饰，也增强了聚合物 -siRNA 相互作用的可能性[29—30]。

CAO 等[30]构建了一种能持续释放 siRNA 的紫外（UV）交联纳米脂质凝胶（NLG）。壳聚糖 - 甲基丙烯酸盐（CMA）由壳聚糖衍生得到，具水溶性和 UV 交联能力，与 siRNA 形成复合物后被脂质体包封，最后在 UV 作用下交联，形成纳米凝胶核心 / 脂质壳结构。脂质壳能够保护 CMA/siRNA 复合物在生理 pH 条件下不溶解，控制 siRNA 的释放。研究表明，NLG 能通过多种内吞途径进入细胞，促进内体逃逸，并将 siRNA 缓慢释放到细胞质中。转染试验证实，NLG 递送系统在细胞培养中可实现有效转染并提供长达 14 d 的沉默效果。

2.3 无机纳米粒

部分无机纳米粒，如金纳米粒（AuNPs）、氧化铁纳米粒、碳纳米管（CNTs）和二氧化硅纳米粒（SiNPs）等，可通过非共价包埋或共轭作用与

siRNA 结合，用于 siRNA 药物的体内递送。

2.3.1 AuNPs

AuNPs 是一种具有多种生物学功能的新型材料，与生物分子高度相容，可将 siRNA 递送至靶细胞用于基因治疗。RAHME 等 [31] 合成了与带正电的 PEI 连接的 AuNPs，并与靶向叶酸（FA）受体的适配体结合，构建了 AuNPs-PEI-FA。AuNPs-PEI-FA 再通过静电作用与 siRNA 有效结合。流式细胞术结果显示，AuNPs-PEI-FA 可特异性地将 siRNA 递送至靶细胞，然后在细胞内发生内体逃逸。与非靶向制剂相比，AuNPs-PEI-FA-siRNA 组表现出显著的内源性基因沉默效果，说明 AuNPs-PEI-FA 具有靶向递送治疗性 siRNA 的潜力。

2.3.2 氧化铁纳米粒

氧化铁纳米粒作为 siRNA 的递送载体具有尺寸小、比表面积大、无免疫原性等优势，在体内不易降解，多以原型排出，毒性较低，且在外加磁场作用下可定向移动，实现药物的靶向递送。CHEN 等 [32] 成功制备了负载 siRNA 和反义寡核苷酸 AS-ODN 的 Fe_3O_4-MNPs。研究表明，Fe_3O_4-MNPs 可促进肺腺癌细胞对 siRNA 和 AS-ODN 的摄取；在磁场作用下，Fe_3O_4-MNPs 降低了肺腺癌细胞中凋亡抑制因子 5（BIRC5）的表达，并提高了死亡受体 5（DR5）的表达。接受 Fe_3O_4-MNPs 给药的荷瘤小鼠经磁场治疗后，肿瘤抑制效果更好。

2.3.3 CNTs

CNTs 具有微小的管状形状，其碳原子有序排列成具有特殊物理化学性质的蜂窝纳米结构，包括单壁碳纳米管和多壁碳纳米管（MWNT）。CNTs 具有优异的光学、电学特性，以及在靶点释放治疗剂的能力，可用作基因递送载体 [33—34]。

WEN 等 [34] 构建了可共递送索拉非尼（Sf）和表皮生长因子受体（EGFR）siRNA 的 MWNT 体系（MWNT/Sf/siRNA），并研究其对肝癌肿瘤生长的影响。研究表明，MWNT/Sf/siRNA 可增加 Sf 释放、提高 siRNA 稳定性以及增强细胞摄取。此外，MWNT 对人肝癌细胞（HepG2 细胞）的增殖和凋亡几乎没有影响，而 MWNT/Sf/siRNA 却能显著抑制细胞集落的形成并诱导细胞凋亡，且显著抑制 EGFR 蛋白的表达水平。结果表明，MWNT 共同递送 Sf 和 siRNA 在体内和体外均具有协同抗肿瘤作用。

2.3.4 SiNPs

SiNPs 具有非晶体结构、易于表面改性、可耐受生物降解、细胞毒性低、吸收率高、可大规模合成且成本低等优势，已被用于递送 siRNA 治疗多种疾病 [35—36]。

SHAKERAN 等 [36] 先以氨基丙基三乙氧基硅烷（APTES）修饰介孔二氧化硅纳米粒（MSN），再以戊二醛为交联剂共价接枝 CS，APTES 和 CS 提供了富胺的表面涂层，因而可通过静电相互作用负载甲氨蝶呤（MTX）和信号转导及转录激活因子 3（STAT3）siRNA。最终构建的、可共递送 MTX 和 STAT3 siRNA 的功能化 MSN 系统，结合了 2 种抑制作用，协同降低了 STAT3 的表达水平。以人乳腺癌细胞（MCF-7 细胞）为模型的体外研究表明，该体系可有效共递送 2 种药物，抑制细胞的分裂和增殖，并降低了 STAT3 的表达水平。

2.4 siRNA 的缀合物载体

在临床前研究中，siRNA 递送策略已从复杂脂质或含多功能组分的合成载体逐渐转移到可直接靶向递送的 siRNA 缀合物上，包括 GalNAc-siRNA 缀合物和细胞穿透肽（cell penetrating peptides，CPP）缀合 siRNA 等。

2.4.1 GalNAc-siRNA

GalNAc-siRNA 是 GalNAc 以共价形式缀合到 siRNA 正义链的 3' 末端而形成稳定的缀合物。目前获批上市的 siRNA 药物中，有 3 种使用 GalNAc 偶联技术进行 siRNA 递送，givosiran、lumasiran 和 inclisiran[16,37—38]，均在治疗肝脏相关疾病方面具有显著优势。GalNAc 是去唾液酸糖蛋白受体（ASGPR）的高亲和力靶向配体。ASGPR 在肝细胞表面特异性高表达，是一种高效的内吞循环受体，可实现 GalNAc-siRNA 的高效细胞内化 [16]。Givosiran 于 2019 年 11 月被批准上市，用于治疗 AHP[37]，由 3 个 GalNAc 分子与 siRNA 连接在一起形成。与安慰剂治疗组相比，givosiran 可有效降低

AHP 患者尿液中 δ- 氨基乙酰丙酸和胆色素原的水平，同时显著改善患者的每日疼痛评分。

瑞士诺华公司开发的降胆固醇类药物 inclisiran 同样使用了 GalNac 载体技术[38]，可靶向前蛋白转化酶枯草溶菌素 9（PCSK9），降低低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）水平。患者每年仅需注射 2 ～ 3 次即可控制胆固醇水平，耐受性良好，无明显肝脏毒性。Inclisiran 是首个也是目前唯一的 siRNA 类降胆固醇药物，标志着 siRNA 药物研究已向慢性病领域发展。

2.4.2 CPP-siRNA

CPP 是 5 ～ 30 个氨基酸组成的短肽序列，呈正电，具有强大的穿透力，可穿透各种生物屏障，作为 siRNA 递送载体既可提高 siRNA 的入胞效率，又具有靶向性[39]。

YU 等[40] 利用多功能肽（SP-CPP）连接抗体（Ab）和 siRNA 构建了 Ab-SP-CPP-siRNA 系统，其中的多功能肽由 CPP 和对实体瘤中过度表达的酶有特异性反应的底物肽 SP 组成，可靶向肿瘤细胞。SP 被肿瘤细胞表面的酶水解后，CPP-siRNA 就会从系统中释放出来，通过 CPP 的细胞穿透能力进入靶细胞，提高 siRNA 介导的基因沉默效率。蛋白质印迹法分析结果显示，少量 Ab-SP-CPP-siRNA（siRNA 浓度为 100 nmol/L）足以抑制结肠癌细胞中增强绿色荧光蛋白（EGFP）的过度表达。结肠癌模型裸鼠静脉注射 Ab-SP-CPP-siRNA 后，EGFP 表达水平下调了约 66.7%。

2.5 仿生载体

将具有不同特性的生物膜作为功能材料包覆纳米颗粒，或模仿生物膜的结构和功能构建载体，可得到仿生载药系统。这种策略的优势在于兼具合成材料的可定制性和多功能性，以及天然生物材料的功能性和复杂性[16]。

2.5.1 外泌体

外泌体（exosomes，Ex）是由多种细胞分泌的内源性纳米级囊泡，具有类似细胞膜的磷脂双分子层结构，可保护其内部分子免受蛋白酶和核酸酶的酶解，同时具有较强的特异性、低免疫原性及生物相容性。采用 Ex 包载外源 siRNA 等，可实现特异性识别靶细胞及药物高效递送[16,41]。

WANG 等[41] 采用电穿孔法以 Ex 负载硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 -1（SCD-1）的 siRNA（siSCD-1），研究了其对间变性甲状腺癌细胞（ATC 细胞）的影响。结果显示，与阴性对照组相比，经 siSCD-1 处理的 ATC 细胞活力显著降低，凋亡和坏死细胞明显增多。与阴性对照相比，Ex 负载 siSCD-1 组处理的 ATC 细胞中，SCD-1 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低。

2.5.2 RNA 纳米载体

RNA 纳米颗粒（RNPs）由 RNA 为主框架，通过分子间相互作用自下而上组装而成。RNPs 可装载 siRNA，具有橡胶和变形虫样的性质，并且可通过多次拉伸和收缩而增强肿瘤靶向作用和快速肾脏排泄，以降低毒性[42]。

KIM 等[43] 研究了一种将 RNA 自组装成 RNPs 的有效方法，并在 RNA 中嵌入接吻环和 siRNA，以限制 RNPs 的大小在 100 nm 左右，使它们不仅易于被细胞摄取，还可被动在肿瘤部位积蓄。RNPs 能被细胞高效摄取，并下调 siRNA 靶基因的表达水平。当被静脉注射到荷瘤小鼠体内时，RNPs 可在肿瘤中积蓄并发挥作用。

2.5.3 红细胞膜修饰的纳米载体

天然细胞膜包载的纳米颗粒基本上继承了母细胞膜的生物学特性，如自标志和同源靶向。红细胞是一种天然的长循环转运体，其细胞膜本身具有多种天然“自我标志物”，如 CD47 蛋白和聚糖等，用红细胞膜包载纳米颗粒能逃避免疫原性造成的清除、延长纳米粒的循环时间[44—45]。

LV 等[45] 构建了 siRNA 靶向递送系统 NPs@apt，将 siRNA 转染至人非小细胞肺癌细胞（A549 细胞），以抑制肿瘤细胞的免疫逃逸。NPs@apt 的制备过程是先采用转染试剂 Lipofectamine 2000 包裹 siRNA，然后与红细胞膜衍生的纳米泡融合，最后用靶向 AS1411（一种靶向核仁素的核酸适配体）的适配体进一步修饰。研究表明，NPs@apt 的稳定性良好，可保护 siRNA。体外研究表明，在 NPs@

apt 的作用下，siRNA 可被选择性地递送到 A549 细胞，下调靶基因的表达水平、抑制 T 细胞活化和肿瘤细胞生长。

3 总结与展望

由于 siRNA 可靶向各种致病基因，因此它们具有巨大的治疗潜力，基于 RNAi 的基因治疗为难治性和不可治愈的疾病提供了希望。siRNA 药物的成功上市，开启了 siRNA 疗法的新时代。然而，siRNA 不易被细胞摄取，发展合适的递送策略成为 siRNA 疗法的迫切需求。在过去几年中，非病毒载体得到了广泛使用和改进，但仍面临着诸多挑战，如 siRNA 成本效益的局限性、生产的复杂性以及药物载体在体内的有效性和安全性之间的平衡。因此，目前仍需开发高效的递送载体设计策略，特别是要考虑具备内体逃逸、细胞和组织靶向等功能，以及开发新型生物材料。这对于 siRNA 药物从实验室到临床的转化至关重要。此外，减小合成非病毒载体的批次差异并建立 siRNA 递送系统的质量评估标准也是很有必要的。

相信随着新型非病毒载体递送策略的发展，会有越来越多的 siRNA 药物能进入临床。而利用技术进步和非病毒载体的独特功能，设计一种既能实现协同增效治疗又能实时监测患者情况的多功能 siRNA 递送策略同样也是研究方向之一。

致谢：烟台大学青年项目 (SM20B35) 给予支持。

参考文献：

[1] GONCALVES G A R, PAIVA R M A. Gene therapy: advances, challenges and perspectives [J]. *Einstein* (Sao Paulo), 2017, **15**(3): 369-375.

[2] PAN X H, VERONIAINA H, SU N, *et al*. Applications and developments of gene therapy drug delivery systems for genetic diseases [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2021, **16**(6): 687-703.

[3] 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.

[4] RAJA M A G, KATAS H, AMJAD M W. Design, mechanism, delivery and therapeutics of canonical and Dicer-substrate siRNA [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2019, **14**(5): 497-510.

[5] KARA G, CALIN G A, OZPOLAT B. RNAi-based therapeutics and tumor targeted delivery in cancer [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, **182**: 114113.

[6] ALSHAER W, ZUREIGAT H, Al KARAKI A, *et al*. siRNA: mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, **905**: 174178.

[7] HAMMOND S M, BERNSTEIN E, BEACH D, *et al*. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells [J]. *Nature*, 2000, **404**(6775): 293-296.

[8] LAM JK, CHOW MY, ZHANG Y, *et al*. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2015, **4**(9): e252.

[9] ZHOU X Q, CHANG Y Z, ZHU L R, *et al*. LINC00839/miR-144-3p/WTAP(WT1 Associated protein) axis is involved in regulating hepatocellular carcinoma progression [J]. *Bioengineered*, 2021, **12**(2): 10849-10861.

[10] MILLER V M, GOUVION C M, DAVIDSON B L, *et al*. Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(2): 661-668.

[11] SCHLUEP T, LICKLITER J, HAMILTON J, *et al*. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of ARC-520 injection, an RNA interference-based therapeutic for the treatment of chronic hepatitis B virus infection, in healthy volunteers [J]. *Clin Pharmacol Drug Dev*, 2017, **6**(4): 350-362.

[12] 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.

[13] DAR S A, THAKUR A, QURESHI A, *et al*. siRNAmod: a database of experimentally validated chemically modified siRNAs [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 20031.

[14] SELVAM C, MUTISYA D, PRAKASH S, *et al*. Therapeutic potential of chemically modified siRNA: recent trends [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2017, **90**(5): 665-678.

[15] SETTEN R L, ROSSI J J, HAN S P. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, **18**(6): 421-446.

[16] YAN Y, LIU X Y, LU A, *et al*. Non-viral vectors for RNA delivery [J]. *J Control Release*, 2022, **342**: 241-279.

[17] LUNDSTROM K. Are viral vectors any good for RNAi

antiviral therapy?[J]. *Viruses*, 2020, **12**(10): 1189.

[18] PONTI F, CAMPOLUNGO M, MELCHIORI C, *et al*. Cationic lipids for gene delivery: many players, one goal[J]. *Chem Phys Lipids*, 2021, **235**: 105032.

[19] LEE J J, CHO Y J, LEE J W, *et al*. KSP siRNA/paclitaxel-loaded PEGylated cationic liposomes for overcoming resistance to KSP inhibitors: synergistic antitumor effects in drug-resistant ovarian cancer[J]. *J Control Release*, 2020, **321**: 184-197.

[20] JEENGAR M K, KURAKULA M, PATIL P, *et al*. Effect of cationic lipid nanoparticle loaded siRNA with stearylamine against chikungunya virus[J]. *Molecules*, 2022, **27**(4): 1170.

[21] ONER E, KOTMAKCI M, BAIRD A M, *et al*. Development of EphA2 siRNA-loaded lipid nanoparticles and combination with a small-molecule histone demethylase inhibitor in prostate cancer cells and tumor spheroids[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, **19**(1): 71.

[22] LIU X, ZHOU X Q, SHANG X W, *et al*. Inhibition of chemotherapy-related breast tumor EMT by application of redox-sensitive siRNA delivery system CSO-ss-SA/siRNA along with doxorubicin treatment[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2020, **21**(3): 218-233.

[23] SONG S J, CHOI J S. Enzyme-responsive amphiphilic peptide nanoparticles for biocompatible and efficient drug delivery[J]. *Pharmaceutics*, 2022, **14**(1): 143.

[24] YANG F, ZHENG Z, ZHENG L M, *et al*. SATB1 siRNA-encapsulated immunoliposomes conjugated with CD44 antibodies target and eliminate gastric cancer-initiating cells[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, **11**: 6811-6825.

[25] WEI Y H, SUN Y P, WEI J J, *et al*. Selective transferrin coating as a facile strategy to fabricate BBB-permeable and targeted vesicles for potent RNAi therapy of brain metastatic breast cancer *in vivo*[J]. *J Control Release*, 2021, **337**: 521-529.

[26] ZHOU Y W, YU F, ZHANG F R, *et al*. Cyclam-modified PEI for combined VEGF siRNA silencing and CXCR4 inhibition to treat metastatic breast cancer[J]. *Biomacromolecules*, 2018, **19**(2): 392-401.

[27] DIAS A P, DA SILVA SANTOS S, DA SILVA J V, *et al*. Dendrimers in the context of nanomedicine[J]. *Int J Pharm*, 2020, **573**: 118814.

[28] HU Q, YAO J, WANG X, *et al*. Combinational chemoimmunotherapy for breast cancer by codelivery of doxorubicin and PD-L1 siRNA using a PAMAM-incorporated liposomal nanoplatform[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, **14**(7): 8782-8792.

[29] MIELE D, XIA X, CATENACCI L, *et al*. Chitosan oleate coated PLGA nanoparticles as siRNA drug delivery system[J]. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(10): 1716.

[30] 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.

[31] RAHME K, GUO J F, HOLMES J D. Bioconjugated gold nanoparticles enhance siRNA delivery in prostate cancer cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, **1974**: 291-301.

[32] CHEN S Z, HAN F S, HUANG D D, *et al*. Fe_3O_4 magnetic nanoparticle-enhanced radiotherapy for lung adenocarcinoma via delivery of siBIRC5 and AS-ODN[J]. *J Transl Med*, 2021, **19**(1): 337.

[33] ZARE H, AHMADI S, GHASEMI A, *et al*. Carbon nanotubes: smart drug/gene delivery carriers[J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, **16**: 1681-1706.

[34] WEN Z L, FENG Y L, HU Y W, *et al*. Multiwalled carbon nanotubes co-delivering sorafenib and epidermal growth factor receptor siRNA enhanced tumor-suppressing effect on liver cancer[J]. *Aging*(Albany NY), 2021, **13**(2): 1872-1882.

[35] YAZDIMAMAGHANI M, MOOS P J, DOBROVOLSKAIA M A, *et al*. Genotoxicity of amorphous silica nanoparticles: status and prospects[J]. *Nanomedicine*, 2019, **16**: 106-125.

[36] SHAKERAN Z, VARSHOSAZ J, KEYHANFAR M, *et al*. Co-delivery of STAT3 siRNA and methotrexate in breast cancer cells[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2022, **50**(1): 29-39.

[37] SCOTT L J. Givosiran: first approval[J]. *Drugs*, 2020, **80**(3): 335-339.

[38] LAMB Y N. Inclisiran: first approval[J]. *Drugs*, 2021, **81**(3): 389-395.

[39] VAN ASBECK A H, BEYERLE A, MCNEILL H, *et al*. Molecular parameters of siRNA--cell penetrating peptide nanocomplexes for efficient cellular delivery[J]. *ACS Nano*, 2013, **7**(5): 3797-3807.

[40] YU Z L, ZHANG X J, PEI X, *et al*. Antibody-siRNA conjugates(ARCs) using multifunctional peptide as a tumor

enzyme cleavable linker mediated effective intracellular delivery of siRNA [J]. *Int J Pharm*, 2021, **606**: 120940.

[41] WANG M H, YE Y, ZHANG M, *et al*. Exosome-mediated delivery of SCD-1 siRNA promoted the death of anaplastic thyroid carcinoma cells via regulating ROS level [J]. *Clin Transl Oncol*, 2022, **24**(2): 288-296.

[42] BINZEL D W, LI X, BURNS N, *et al*. Thermostability, tunability, and tenacity of RNA as rubbery anionic polymeric materials in nanotechnology and nanomedicine-specific cancer targeting with undetectable toxicity [J]. *Chem Rev*, 2021, **121**(13): 7398-7467.

[43] KIM K R, KIM J, MAO C, *et al*. Kissing loop-mediated fabrication of RNA nanoparticles and their potential as cellular and *in vivo* siRNA delivery platforms [J]. *Biomater Sci*, 2021, **9**(24): 8148-8152.

[44] YU B, XUE X, YIN Z F, *et al*. Engineered cell membrane-derived nanocarriers: the enhanced delivery system for therapeutic applications [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, **10**: 844050.

[45] LV H Y, WANG T F, MA F S, *et al*. Aptamer-functionalized targeted siRNA delivery system for tumor immunotherapy [J]. *Biomed Mater*, 2022, **17**(2): 24108.

