专论 Perspectives

用于胶质母细胞瘤治疗的 siRNA 非病毒递送系统研究进展

江芷萱[1]，贾瑞沂[1]，丁　源[1]，陆伟跃[1,2*]

（1. 复旦大学药学院药剂学系，智能化递药教育部及全军重点实验室（复旦大学），上海 201203；
2. 上海泰禛生物技术有限公司研发部，上海 201314）

摘要：胶质母细胞瘤（GBM）是恶性程度较高的脑部肿瘤，具有高致残率、高复发率的特点。GBM 经常规治疗后易复发，且耐药患者预后情况不佳。小干扰 RNA（siRNA）能通过沉默特定基因、下调蛋白表达而产生疗效，可作为常规治疗的补充，进一步抑制 GBM 的发展进程。文章阐述了 siRNA 递送入脑的困境、siRNA 治疗 GBM 的作用机制，并总结了 5 种用于 GBM 治疗的 siRNA 非病毒递送系统，以期为 siRNA 在 GBM 治疗中的应用研究提供参考。

关键词：胶质母细胞瘤；siRNA；脂质纳米粒；脂质体；聚合物纳米粒；胶束；外泌体；研究进展

中图分类号：R944.9；R979.1^{+}1　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)10-1307-11

引用：江芷萱，贾瑞沂，丁　源，等．用于胶质母细胞瘤治疗的 siRNA 非病毒递送系统研究进展［J］．中国医药工业杂志，2024, 55(10): 1307-1317．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.10.001

Research Progress on Non-viral Delivery Systems of siRNA for Glioblastoma Treatment

JIANG Zhixuan[1], JIA Ruiyi[1], DING Yuan[1], LU Weiyue[1,2*]

(*1. Key Lab. of Smart Drug Delivery (Fudan University), Ministry of Education and PLA, Dept. of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203; 2. Dept. of Research and Development, Shanghai Tayzen PharmLab Co., Ltd., Shanghai 201314*)

ABSTRACT: Glioblastoma (GBM) is a highly malignant brain tumor with high disability and recurrence rate. Conventional treatment for GBM is prone to recurrence, and the prognosis of drug-resistant patients is unfavorable. Small interfering RNA (siRNA) can generate therapeutic effects by silencing specific genes and down-regulating protein expression, and can serve as a supplement to conventional treatment by inhibiting the development process of GBM. This review elaborates on the difficulties of siRNA delivery into the brain and the mechanism of GBM treatment by siRNA. Additionally, it summarizes the application of five non-viral siRNA delivery systems for GBM treatment, in order to provide a reference for the application research of siRNA in GBM treatment.

Key Words: glioblastoma; siRNA; lipid nanoparticle; liposome; polymeric nanoparticle; micelle; exosome; research progress



【专家介绍】陆伟跃，药剂学博士，复旦大学特聘教授，克服递药屏障高端制剂全国重点实验室首任主任，复旦大学药剂学国家重点学科带头人，“973”项目首席科学家，全国优秀博士学位论文指导教师，智能化递药教育部重点实验室和全军重点实验室首任主任，享受国务院政府特殊津贴。兼任中国药学会常务理事、战略发展专家委员会委员、学术工作委员会委员，药剂专业委员会第八届和第九届主任委员、第十届名誉主任委员，纳米药物专业委员会首届副主任委员；国家药品注册审评专家咨询委员会委员；中国医药创新促进会理事、药物研发专业委员会委员；上海市药学会常务理事、药剂专业委员会名誉主任委员；复旦大学学术委员会委员等。

胶质母细胞瘤（glioblastoma，GBM）是中枢神经系统最常见和最难治愈的原发性恶性肿瘤，具有高致残率、高复发率的特征，且发病率和致死率正逐年攀升。GBM 患者生存期短，70％～ 80％的高级别 GBM 患者生存期仅 3 ～ 6 个月，生存期超过 1 年的患者比例低于 10％ [1]。目前，手术切除辅以放化疗是 GBM 的主要治疗手段，但患者生存期的延长仍然有限 [2]。原因在于侵袭性 GBM 难以完全切除，且鲜有化疗药物具备特异性识别肿瘤细胞的能力，易对人体正常组织产生毒性 [3]。此外，因血脑屏障（blood-brain barrier，BBB）的存在，98％以上的小分子和几乎 100％大分子药物均不能入脑发挥作用，因而上市的 GBM 化疗药物种类极少 [4]。替莫唑胺（temozolomide，TMZ）次级代谢产物的抗肿瘤作用疗效好、应用广，能跨越 BBB 入脑，然而容易产生耐药性问题。因此，亟需寻找一种新的治疗方法来改善 GBM 的预后情况 [5—6]。

近年来，随着新型冠状病毒感染的暴发，核酸药物发展迅猛，已成为国内外研究的热点，是目前极具临床应用前景的药物之一 [7]。相比于化疗药物，核酸药物抵达病变部位后可持续对病变部位的蛋白进行调控，长时间发挥药效 [8]。

在核酸药物中，小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）药物因序列短、稳定性高而更具产业化潜力，在肿瘤治疗中的应用广泛。siRNA 可与细胞质中的 RNA 诱导的沉默复合体（RNA-induced silencing complex，RISC）结合，随后 siRNA 中的正义链被降解，反义链指导 RISC 特异性识别并结合靶 mRNA，使靶 mRNA 被剪切，从而使基因沉默和蛋白表达量下调 [9]。在 GBM 的发生和发展过程中，多种基因高表达并伴随功能异常，利用 siRNA 沉默肿瘤细胞内异常高表达的基因，能有效抑制肿瘤的生长、延长患者生存期。这是一种高效、新兴、有广阔应用前景的治疗方法。

本文阐述了 siRNA 递送入脑的困境、siRNA 治疗 GBM 的作用机制，并总结了 5 种用于 GBM 治疗的 siRNA 非病毒递送系统，以期为 siRNA 在治疗 GBM 中的应用研究提供参考。

1　siRNA 递送入脑的困境

1.1　BBB 和血脑肿瘤屏障（blood brain tumor barrier，BBTB）

未修饰的裸 siRNA 在血液循环中的半衰期仅约为 5 min，一部分会被核酶迅速降解，另一部分则被肾脏直接过滤而清除 [10]。不仅如此，随着血液循环被递送到脑部的 siRNA 还需要跨越生理屏障，如 BBB 和 BBTB[11—12]。BBB 是一种高选择性、防止有害物质侵入大脑的生理屏障，能够保证脑的内部环境稳定。早期 GBM 及其胶质瘤细胞浸润区均存在 BBB。随着 GBM 的发展，当肿瘤体积增大到一定程度时，BBB 的功能和完整性被破坏，GBM 部位又形成 BBTB。BBTB 结构类似于 BBB，位于 GBM 组织与脑微血管内皮细胞形成的微血管之间，限制了大多数亲水性分子向 GBM 组织转运。BBTB 的形成对于提供支撑肿瘤细胞生长所需的营养物质至关重要。由于 BBB 和 BBTB 双重生理屏障的存在（图 1A），药物很难进入 GBM 组织发挥治疗作用。

1.2　胞内障碍

siRNA 的负电荷和亲水性使其不易穿透细胞膜，一般需要依赖细胞膜表面受体介导的胞吞作用进入细胞 [13]。当 siRNA 通过胞吞进入细胞后，还需从内涵体逃逸才能发挥作用，但裸 siRNA 往往容易在溶酶体途径中被降解破坏，只有相当少部分（<2％）能从内涵体中逃逸至细胞质中而发挥作用（图 1B）。

2　siRNA 的作用机制

2.1　增强 GBM 细胞对替莫唑胺的敏感性

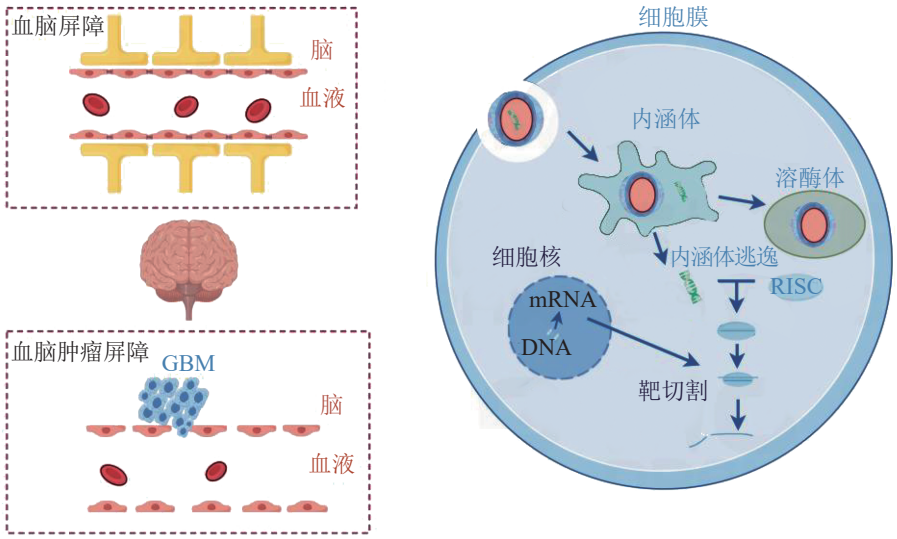
O^6- 甲基鸟嘌呤 -DNA 甲基转移酶（O^6-methyl-guanine-DNA-methyl-transferase，MGMT）是一种 DNA 修复酶，能够修复 TMZ 化疗引起的 DNA 损伤，从而导致 GBM 细胞对 TMZ 产生抵抗。MGMT 的高表达是 GBM 预后不良的重要标志 [14]。有研

收稿日期：2024-02-19

作者简介：江芷萱（2000—），女，硕士研究生，专业方向：药物靶向递送抗肿瘤研究。

通信作者：陆伟跃（1960—），男，教授，博士生导师，从事药物靶向策略及递药系统研究。

E-mail：wylu@shmu.edu.cn



A—BBB 和 BBTB 位置的示意图；B—siRNA 胞内途径的示意图。

图1 siRNA入脑进入细胞质的困境（本图采用Figdraw绘制）

Fig.1 The Dilemma of siRNA Entering the Brain and Cytoplasm (This image was drawn by Figdraw)

究[15—16]使用 siRNA 下调 MGMT 的表达量，能够阻碍 MGMT 对已损伤 GBM 细胞的修复，从而增强 GBM 细胞对 TMZ 的敏感性，增强治疗效果。

2.2 重塑 GBM 微环境而增强固有免疫

由于 BBB 和 BBTB 的存在，脑内曾被认为是免疫豁免区，存在一定的免疫功能缺陷。然而，最新研究[17]表明，免疫细胞可跨越 BBB 在脑中发挥作用。GBM 细胞具有侵袭性，有迁移到 GBM 病灶边缘正常脑组织的倾向，而免疫细胞可精准定位并杀伤 GBM 细胞[18]。这使得免疫治疗成为 GBM 治疗中的重要手段之一。免疫检查点抑制剂，如抗程序性死亡受体 1（programmed death-1，PD-1）单抗，对许多实体瘤有很好的疗效，在 GBM 中也被广泛研究。降低脑内免疫抑制性分子的表达可诱导免疫系统激活，并诱导持续的免疫反应，抑制 GBM 生长。例如，使用 siRNA 下调程序性死亡受体配体 1（programmed death-ligand 1，PD-L1）、CD47 等免疫抑制性分子的表达可改善肿瘤免疫抑制微环境，提高抗肿瘤免疫反应[18—19]。但是，单独使用免疫疗法治疗 GBM 的效果不佳，需要与其他疗法进行协同治疗，以实现更显著的抑瘤作用[20]。

2.3 抑制血管生成

血管生成是 GBM 重要特征，也是 GBM 治疗的重要靶点。血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）是一种非常重要的血管生成影响因子，在 GBM 中高表达[21]。使用 siRNA 抑制 VEGF 表达，也能有效抑制 GBM 血管生成，切断 GBM 细胞的营养供应，从而抑制 GBM 的发展进程。

3 用于递送 siRNA 的非病毒载体

常用的核酸药物载体系统分为病毒载体和非病毒载体。病毒载体可能会因本身的免疫原性和潜在毒性而被限制应用[22]；非病毒载体是 siRNA 的常用递送载体，具有良好的应用前景[23]。

目前，纳米载体递送 siRNA 入脑有 4 种方式，分别是主动靶向分子修饰、短暂无创打开 BBB、外泌体跨越 BBB 及利用具有脑靶向功能的脂质。短暂打开 BBB 可能导致短时间脑内环境失衡，造成一定不良反应；且与主动靶向相比，外界干预方法打开 BBB 的时间有限，并不能持续促进纳米载药系统入脑，导致药物的脑内蓄积量不足、药效不佳。此外，基于细胞分离的外泌体产量较低，而新型脑靶向脂质的研发成本高、耗时长，需要通过合成大量脂质

构建脂质库，并需在动物体内筛选效果最佳的脂质。主动靶向修饰递送 siRNA 具有治疗效果更佳、开发成本更低的优势，因此市场前景更优。

本文总结了 5 类常用于递送 siRNA 的非病毒载体，分别是聚合物纳米粒（polymeric nanoparticles，PNP）、脂质体、脂质纳米粒（lipid nanoparticles，LNP）、胶束和外泌体（图 2），下面分别进行介绍。

3.1　PNP

在非病毒载体中，PNP 因易于合成和具有良好的生物相容性而被广泛研究[24]。大多数 PNP 具有阳离子基团，有助于聚合物包裹荷负电的 siRNA，也有利于其结合细胞膜上荷负电的糖蛋白。PNP 具有丰富可变的化学和物理特性，化学组成、相对分子质量等可根据递送的核酸药物种类而设计[25]。

3.1.1　不可降解 PNP

聚乙烯亚胺（polyethylenimine，PEI）是一种常用的不可降解阳离子聚合物，不仅易与基因复合，还能通过“质子海绵”效应促进纳米载体从溶酶体逃逸[26—27]。纳米粒表面通常需要修饰 PEG 以提高其在血清中的稳定性并降低其细胞毒性[28]。叶酸（folic acid，FA）已被广泛用于介导纳米制剂的主动靶向作用，可通过与肿瘤细胞表面过表达的叶酸受体（folate receptor，FR）相结合来促进纳米药物的靶向递送。PENG 等[29]制备了 FA 修饰的 PEG-PEI- 聚己内酯［poly(ε-caprolactone)，PCL］，得到阳离子聚合物材料 FA-PEG-PEI-PCL，再将疏水性的 TMZ 包封在聚合物纳米粒的脂溶性内核中，通过静电作用将 siRNA BCL-2 与阳离子聚合物中的 PEI 结合，实现了稳定的共负载。此纳米粒通过与 GBM 细胞表面过表达的 FR 结合，以胞吞进入细胞，释放药物。在荷 GBM 的大鼠体内试验中，相较于无靶向修饰的纳米粒处理组，靶向分子修饰的阳离子聚合物纳米粒处理组显示出显著的肿瘤生长抑制作用。但值得注意的是，在血液循环过程中，FA 修饰的脂质体表面会吸附更多的免疫球蛋白 M(IgM)，阻碍 FA 识别 FR，并加速体内补体的激活，从而加速纳米粒的清除，削弱临床应用中药物在体内的药效[30]。因而目前尚无 FA 修饰的纳米递药系统被批准用于临床。

脑肽载体 angiopep-2 可特异性靶向于在 GBM 细胞和脑血管内皮细胞表面表达的低密度脂蛋白受

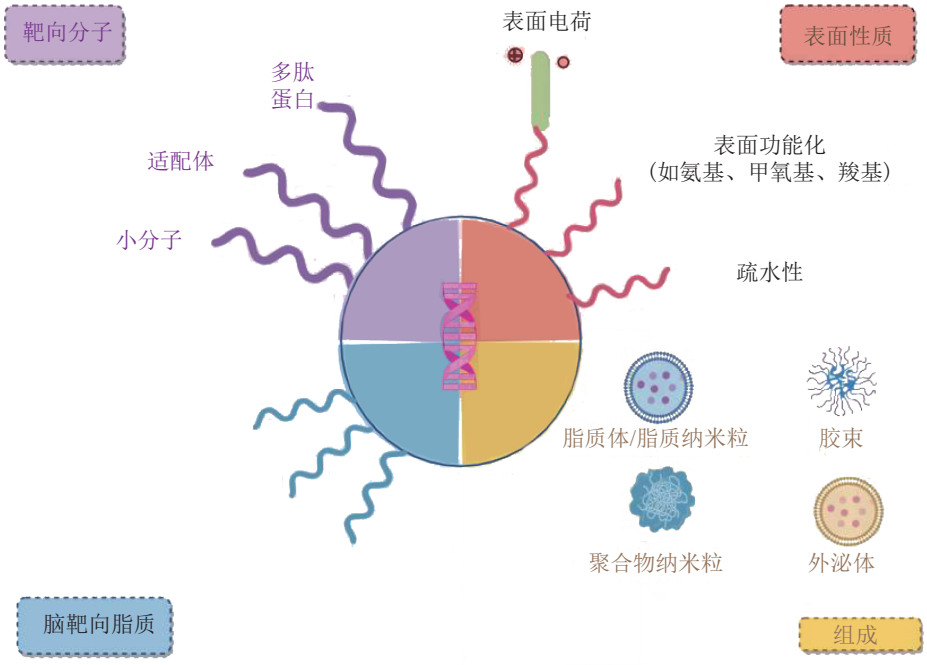


图2　递送siRNA的非病毒载体（本图采用Figdraw绘制）

Fig.2　Non-viral Vectors for Delivering siRNA (The image was drawn by Figdraw)

体相关蛋白 1(low-density lipoprotein receptor-related protein 1，LRP1)。相比于 FA，angiopep-2 不仅能帮助纳米载药系统进入 GBM 细胞，还有助于穿透 BBB。SHI 等[31]合成了含脑肽载体的阳离子聚合物材料 angiopep-2-PEG-PEI-PCL，并通过自组装将 TMZ 和 siRNA 包封于阳离子聚合物中。体内试验结果显示，与单独给予 TMZ 相比，共递送 siRNA 和 TMZ 的聚合物纳米粒有效减轻了 GBM 细胞耐受 TMZ 的情况，显著减小了肿瘤的体积，延长了荷 U87 GBM 裸鼠的生存期。

3.1.2 可降解 PNP

相比于不可降解 PNP，可降解 PNP 具有更高的生物相容性、更低的免疫原性和蓄积毒性，以及缓释特性。根据来源，可将聚合物分为合成聚合物和天然聚合物。合成的可降解聚合物通常是通过二硫键或酯键等生物可逆键将低分子单体组装而成，包括 PLA、聚乙醇酸（polyglycolide acid，PGA）以及 PLGA 等[32—33]。

除了利用传统的受体 - 配体相互作用介导药物入脑外，超声和微泡技术的联合应用为药物跨越 BBB 实现脑部的靶向递送提供了一种新途径[34]。这种方法可暂时、无创地打开 BBB，使药物递送入脑发挥作用。GUO 等[35]以 PLGA、1,2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱（1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine，DPPC）和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 - 甲氧基聚乙二醇（diethyl phosphatidylethanolamine methoxy polyethylene glycol，DSPE-PEG）为原料，利用旋流微孔反应器制备 PLGA PNP(40 nm)，再采用聚焦超声和微泡技术打开 C57 小鼠的 BBB，成功介导该 PNP 入脑。

壳聚糖作为一种天然的阳离子线性多糖，因具有高生物相容性和可修饰性，在基因递送领域有广泛应用[36]。WEN 等[37]将壳聚糖和十八胺作为原料合成了一种二硫键连接的 PEG 化类糖脂共聚物，连接脑肽载体后通过自组装形成阳离子 PNP，并用于共负载亲脂性紫杉醇（paclitaxel，PTX）和 siRNA。该纳米递送系统经静注给药后可被靶向递送至脑部，在 GBM 细胞中高表达的谷胱甘肽作用下发生水解，二硫键断裂而释出 2 种药物，从而达到协同抗肿瘤的效果。

3.2 脂质体

3.2.1 阳离子脂质体

脂质体作为 siRNA 的载体具有制备工艺简单、易产业化、毒性低等优势。脂质体可避免 siRNA 被血液中的核酸酶降解，且能提高膜通透性，促进 siRNA 被细胞摄取。此外，目前已有多种脂质体产品获批上市，相关技术较为成熟，故使用脂质体递送 siRNA 具有较好的产业化前景。常用的阳离子脂质有 2,3- 二油酰基 - 丙基 - 三甲基氯化铵（2,3-dioleoyloxy-propyl-trimethylammonium-chloride，DOTAP）、3β-[*N*-(*N'*,*N'*- 二甲基胺乙基)- 氨基甲酰基] 胆固醇盐酸盐 [3β-[*N*-(*N'*,*N'*-dimethyl-aminoethyl) carbamoyl] cholesterol hydrochloride，DC-CHO] 等[38]。

YUAN 等[39]使用 DOTAP、1, 2- 二油酰基卵磷脂（1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine，DOPC）、胆固醇、$DSPE\text{-}PEG_{2000}$、$DSPE\text{-}PEG_{2000}$-angiopep-2 和高尔基体磷蛋白 3(golgiphosphoprotein-3，GOLPH3) siRNA 为原料，通过溶剂注入法制备阳离子脂质体。体内试验结果显示，与 PBS 处理组相比，单载 siRNA 脂质体处理组虽延长了荷瘤裸鼠的生存期，但体内抑瘤效果并不理想，可能的原因是 siRNA 中的核苷酸未经化学修饰，在体内稳定性较差，易被降解，从而导致效果不佳。

XU 等[40]合成了 DOTAP 阳离子脂质，并在其表面修饰脑肽载体实现主动靶向，用于共负载 TMZ 前药和 siRNA，利用 siRNA 来沉默 MGMT 基因，阻碍 TMZ 给药后的 MGMT 对 DNA 的修复，从而提高 GBM 细胞对 TMZ 的敏感性。该脂质体载药系统在 GBM 细胞中分别释放的 siRNA 和 TMZ 前药可通过协同作用，显著改善临床上 TMZ 的耐药性问题，同时可降低 TMZ 的给药剂量，提高疗效和安全性。

YE 等[41]开发了一种脑肽载体修饰的阳离子脂质体 -PNP 用于共递送表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）的抑制剂吉非替尼（gefitinib，Ge）和 siRNA GOLPH3。该研究使用

DOTAP 阳离子脂质膜包被 PLGA PNP，通过主动靶向作用跨越 BBB 和 BBTB 进入脑组织，在 GBM 组织中释放 Ge 和 siRNA GOLPH3。siRNA GOLPH3 能有效沉默相应基因，降低 EGFR 水平，Ge 也显著抑制了 EGFR 信号转导。该纳米粒促进了 2 种药物在脑内的蓄积，能协同降低 EGFR 的表达，在荷原位 GBM 裸鼠上表现出显著的抗 GBM 效果，是一种安全、有效的神经胶质瘤治疗策略。

有研究[42—43]显示，一氧化氮（NO）不仅可舒张血管，还可破坏 BBB，从而增加 BBB 通透性。抗肿瘤药和 NO 供体的联合给药可同时诱导 BBB 的破坏及增强 GBM 中的药物积累。基于此，HSIEH 等[44]构建了包含磷酸钙和二硝基铁配合物的脂质体，并在表面修饰 C-X-C 趋化因子受体 4（C-X-C chemokine receptor 4，CXCR 4）抑制剂，用于靶向递送 siRNA PD-L1。磷酸钙具有 pH 响应性，能促进 siRNA 的释放和内涵体逃逸；二硝基铁配合物可用于产生 NO，增加 BBB 通透性；CXCR 4 抑制剂可与 GBM 细胞表面过表达的 CXCR 4 结合，促进脂质体进入 GBM 细胞。该脂质体可重塑免疫抑制肿瘤微环境，有效抑制肿瘤生长，有望成为一种安全、有效的 GBM 治疗方法。

在正常生理条件下，只有极少数药物能跨越 BBB 入脑，但通过鼻 - 脑通路可绕过 BBB。这种经鼻给药的方式既不会破坏脑内环境，又能将药物安全递送入脑，患者依从性也好[45]。经鼻给药的纳米递药系统只包载 siRNA 即可实现较好的治疗作用，而静脉给药则通常需要将 siRNA 和化药共递送，二者协同才能发挥较好的 GBM 治疗效果[46]。HU 等[47]将八精氨酸（R8，一种富含碱性氨基酸残基的阳离子多肽）通过静电相互作用与带负电的 siRNA c-Myc 混合，共同包裹在脂质外壳里。脂质外壳则由 DOTAP、1,2- 二油酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰乙醇胺（1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine，DOPE）、DSPE-PEG_{2000}、DSPE-PEG_{3400}-89WP 和胆固醇组成。其中，89WP 是一种穿膜肽，能够帮助脂质体经过鼻 - 脑通路进入脑组织并穿透 GBM 细胞膜，在胞内释放 siRNA 而发挥抗肿瘤效果。

DC-CHO 是制备阳离子脂质体的常用正电荷脂质之一，细胞毒性较 DOTAP 阳离子脂质更小[48]，常搭配辅助脂质 DOPE 来制备阳离子脂质体。SUN 等[49]设计将脑肽载体和 RNA 适配体分别修饰在阳离子脂质体表面，并共负载 siRNA survivin 和紫杉醇。脑肽载体和 RNA 适配体分别与脑毛细血管内皮细胞表面的 LRP-1 受体和 GBM 干细胞表面的 CD133 受体结合，辅助该脂质体递送系统通过受体介导的胞吞作用进入 GBM 细胞。动物试验结果显示，该脂质体递送系统大幅度提高了荷原位 GBM 裸鼠的生存期。

3.2.2　中性脂质体

尽管使用阳离子脂质体递送 siRNA 的研究发展迅猛，但其转染效率不高，且阳离子脂质具有一定毒性，使其应用在一定程度上受限。中性脂质体是良好的阳离子脂质体替代材料。

鱼精蛋白作为一种阳离子多肽，可与核酸类物质结合形成复合物，提高 siRNA 的装载效果[50]。有研究[51]表明，亲环蛋白 A（cyclophilin A，CypA）在许多恶性肿瘤（如肝癌、脑癌和肺癌）中过表达，是肿瘤恶性转化和转移的关键因素。GBM 中过表达的 CypA 通过 Wnt/β-catenin 信号通路参与维持神经胶质瘤细胞的多能性。基于此，SAW 等[52]使鱼精蛋白和 siRNA CypA 形成复合物，并将其包载在 PEG 化的中性脂质体中，又将额外结构域 B（extra domain B，EDB）适配体修饰在该脂质体表面，用于特异地结合 GBM 细胞中过表达的 EDB。结果显示，该 EDB 适配体修饰的中性脂质体在皮下瘤模型中能显著抑制肿瘤生长。

LIU 等[53]制备了表面修饰 2- 脱氧葡萄糖的中性脂质体，并将其用于包裹负载 siRNA PD-L1 和 TMZ 的新型阳离子聚合物聚天冬氨酸（polyaspartic acid，PASP）-PEI_{1800}，得到了复合药物递送体系 TMZ/siPD-L1@GLPN/dsb。2- 脱氧葡萄糖能够结合 BBB 内皮细胞和 GBM 细胞表面过表达的葡萄糖转运体，介导纳米粒跨越 BBB，并高效进入 GBM 细胞中。中性脂质体外膜可以防止 siRNA 和 TMZ 过早在血液循环中泄露。TMZ/siPD-L1@GLPN/dsb 进

入 GBM 细胞后，高表达的谷胱甘肽使聚合物材料中的二硫键断裂，从而在胞浆中释放出 siRNA，降低 PD-L1 的表达水平，进而降低 MGMT 的表达量，解除 GBM 细胞对 TMZ 的抗性。动物试验结果显示，TMZ/siPD-L1@GLPN/dsb 能在 GBM 内大量蓄积，且能显著延长耐 TMZ 的原位 GBM 小鼠生存期。

3.3 LNP

LNP 是一种目前转化前景良好的核酸递送载体，常用于 siRNA 和 mRNA 的递送 [54]。首款 siRNA 药物 Onpattro 在 2018 年经 FDA 批准上市；其采用 LNP 作为载体，通过静脉注射给药，用于阻断甲状腺素运载蛋白的生成，体内安全性和耐受性良好 [55]。2019 年新型冠状病毒感染暴发，以 LNP 为载体的 mRNA 疫苗经 FDA 批准上市，推动 LNP 成为核酸药物递送载体的研究热潮。

LNP 是一种由可电离脂质、辅助脂质、PEG 脂质和胆固醇组成的脂质纳米粒。可电离脂质在酸性条件下带正电，易于负载带负电的核酸药物，可有效避免核酸药物被血液中的核酶降解；在中性条件下则不带电，与阳离子脂质相比，在血液循环过程中的毒性更低、生物相容性更好。此外，LNP 能够促进内涵体逃逸，帮助核酸药物发挥药效。在血循环过程中，LNP 会吸附血浆中的载脂蛋白 E（apolipoprotein E，ApoE），与肝脏中低密度脂蛋白受体结合，从而使粒子具有天然的肝靶向性 [54]。近年来，除了肝靶向应用以外，研究者也致力于实现 LNP 的肝外靶向递送 [56—58]。

目前尚未有将主动靶向分子修饰在 LNP 表面递送 siRNA 入脑的研究报道。但令人惊喜的是，最新研究 [59—60] 成功开发了具有穿透 BBB 能力的脂质材料并用于 LNP 制备，也同时开展了 GBM 基因治疗的尝试。LIU 等 [59] 合成了 12 种氨基头部结构不同的可电离脂质用于递送 siRNA。通过体内外试验筛选出入脑效果较好的可电离脂质 BAMPA 进行 siRNA CD47 和 siRNA PD-L1 的共递送，可同时沉默 2 种基因，产生协同激活固有免疫和适应性免疫应答的作用，增强抗肿瘤免疫反应并杀伤 GBM，显著延长 C57 GBM 模型小鼠的生存期。

精神刺激剂苯丙胺和甲基苯丙胺的亲脂性强，可通过干扰脑内皮细胞的跨细胞途径和细胞旁路途径来提高 BBB 的通透性 [61—62]。基于此，SAHA 等 [63] 以苯丙胺和甲基苯丙胺结构为基础，设计、合成了 3 种不同的阳离子脂质，并通过薄膜 - 水化法制备成 3 种 LNP，结果 3 种制品均可穿透 BBB 且安全性好。不同脂质的 BBB 穿透能力还取决于脂质的亲水 - 疏水平衡，十六烷基脂质（hexadecyl lipid，16-BACL）具有理想的亲水 - 疏水平衡，基于 16-BACL 制备的 LNP 在脑部的蓄积量较高。由 16-BACL 制备的 LNP 可实现紫杉醇和 siRNA PD-L1 的共递送，协同促进 GBM 细胞凋亡，在荷原位 GBM C57 小鼠体内实现了高效、安全的治疗效果。

3.4 胶束

胶束是由两亲性分子自组装形成的纳米聚集体。分子链中的疏水性部分形成胶束的核心，亲水性部分形成胶束的外壳。胶束可用来包载难溶性药物、增强药物的稳定性 [64]。

TANG 等 [65] 将亲水性的脑靶向 T7 肽（HAYPRH，对 GBM 细胞上过表达的转铁蛋白受体具有高亲和力）与胆固醇进行化学偶联，并自组装形成胶束，再与 siRNA 在水溶液中直接混合，实现了对 siRNA Slit2 的包载。作为一种免疫佐剂，T7- 胆固醇可促进树突状细胞成熟，与 siRNA Slit2 结合促进 M2 亚型巨噬细胞向 M1 亚型巨噬细胞极化，增加效应 T 细胞的比例以重塑肿瘤微环境，激发固有免疫反应，进而提高抗肿瘤效果。

3.5 外泌体

外泌体是由细胞分泌的纳米囊泡，具有和细胞膜类似的磷脂双分子层结构 [66]。与合成的纳米载体相比，外泌体具有低免疫原性、高生物相容性和自主跨越 BBB 的优势，在 GBM 治疗中具有天然优势 [67]。

ZHAN 等 [68] 使用超速离心法提取血细胞外泌体，采用电穿孔技术将二甲双胍转入外泌体，然后将 siRNA cPLA2 与胆固醇的复合物锚定到外泌体上，得到化药和 siRNA 的共递送系统。该共递送系统中的 siRNA cPLA2 能够抑制 GBM 细胞中磷脂的代谢，二甲双胍则抑制线粒体代谢，二者协同作用，在体

内外试验中均表现出显著的抑制 GBM 效果。

4　总结与展望

与传统化疗药相比，siRNA 特异性好且具有长效作用，但难以实现靶向性并进入细胞内发挥作用，因而合适的靶向递送载体是 siRNA 起效的关键。近年来，随着材料学的发展和深入研究，越来越多科研工作者聚焦 siRNA 药物载体材料的研究与开发。生物相容性好、靶向效率高的非病毒纳米载体材料是 siRNA 较为理想的递送载体，可为实现 siRNA 药物的靶向递送治疗 GBM 和临床转化注入新动能。本文针对 siRNA 药物脑靶向递送的难题，总结了 5 种递送 siRNA 用于治疗 GBM 的非病毒载体（脂质体、脂质纳米粒、PNP、胶束和外泌体）的处方、入脑方式、应用及其优缺点（表 1）。

尽管非病毒载体在 siRNA 药物的脑靶向递送中已取得巨大进展，但仍有许多亟待解决的问题。例如，鉴于 siRNA 药物的成本较高，很多研究着眼于提高 siRNA 转染效率与促进其内涵体逃逸等方向，以降低 siRNA 的用量、节约成本；目前，大部分载体材料会在肝、脾和肺等组织蓄积而产生毒性，故研发生物相容性高、易降解的载体材料是另一研究热点。此外，核酸药物的递送材料种类多，但并未针对器官、细胞靶向材料得出普适规律，未来可结合人工智能、计算机辅助药物设计等方式筛选并总结共性规律，为核酸药物的新型递送载体设计和开发提供有利依据。

表 1　非病毒载体递送 siRNA 系统治疗 GBM 的基础研究

Tab.1　Basic Researches on the Treatment of GBM with siRNA Non-viral Carriers

入脑方式	制剂种类	靶分子	受体 / 转运体	靶基因	化药	给药方式	制备方法	粒径 /nm	参考文献
鼻 - 脑通路	脂质体	—	—	*MYC*	—	经鼻	薄膜 - 水化法	130	[47]
	胶束	—	—	*SLIT2*	—	经鼻	自组装	56.4	[65]
主动靶向	脂质体	脑肽载体	LRP1	*MGMT*	TMZ	静脉注射	溶剂注入法	61.7	[40]
		脑肽载体	LRP1	*GOLPH3*	—	静脉注射	溶剂注入法	88	[39]
		EDB 适配体	EDB	*CYPA*	—	静脉注射	溶剂注入法	112	[52]
		脑肽载体	LRP1	*GOLPH3*	Ge	静脉注射	溶剂注入法	79.2	[41]
		脑肽载体	LRP1	*SURVIVIN*	PTX	静脉注射	薄膜 - 水化法	135	[49]
	PNP	脑肽载体	LRP1	*PLK1*	TMZ	静脉注射	溶剂注入法	82.2	[31]
		FA	FR	*BCL-2*	TMZ	静脉注射	自组装	68	[29]
		脑肽载体	LRP1	*VEGF*	PTX	静脉注射	溶剂注入法	101.3	[37]
		2-deoxy-glucose	GLUT	*PD-L1*	TMZ	静脉注射	薄膜 - 水化法	112	[53]
超声、微泡技术打开 BBB	脂质体	—	—	*SMO*	—	静脉注射	旋流微孔反应器	40	[35]
脑靶向脂质	LNP	—	—	*PD-L1*、*CD47*	—	静脉注射	溶剂注入法	110	[59]
		—	—	*PD-L1*	PTX	静脉注射	薄膜 - 水化法	177	[63]
外泌体	外泌体	—	—	*CPLA2*	二甲双胍	静脉注射	超速离心法	128.1	[68]

参考文献：

[1] OSTROM Q T, CIOFFI G, WAITE K, *et al*. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2014 - 2018 [J]. *Neuro Oncol*, 2021, **23**(12 Suppl 2): iii1-iii105.

[2] TSENG H M, KUO L T, LIEN H C, *et al*. Prolonged survival of a patient with cervical intramedullary glioblastoma multiforme treated with total resection, radiation therapy, and temozolomide [J]. *Anticancer Drugs*, 2010, **21**(10): 963-967.

[3] WELLER M, VAN DEN BENT M, PREUSSER M, *et al*. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, **18**(3): 170-186.

[4] PARRISH K E, SARKARIA J N, ELMQUIST W F. Improving drug delivery to primary and metastatic brain tumors: strategies to overcome the blood-brain barrier [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2015, **97**(4): 336-346.

[5] ORTIZ R, PERAZZOLI G, CABEZA L, *et al*. Temozolomide: an updated overview of resistance mechanisms, nanotechnology advances and clinical applications [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2021, **19**(4): 513-537.

[6] ROSSO L, BROCK C S, GALLO J M, *et al*. A new model for prediction of drug distribution in tumor and normal tissues: pharmacokinetics of temozolomide in glioma patients [J]. *Cancer Res*, 2009, **69**(1): 120-127.

[7] ROSSI J J, ROSSI D. Oligonucleotides and the COVID-19 pandemic: a perspective [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2020, **30**(3): 129-132.

[8] KULKARNI J A, WITZIGMANN D, THOMSON S B, *et al*. The current landscape of nucleic acid therapeutics [J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, **16**(6): 630-643.

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

[10] DONG Y Z, SIEGWART D J, ANDERSON D G. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, **144**: 133-147.

[11] KUMAR P, WU H Q, MCBRIDE J L, *et al*. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system [J]. *Nature*, 2007, **448**(7149): 39-43.

[12] GANIPINENI L P, DANHIER F, PRÉAT V. Drug delivery challenges and future of chemotherapeutic nanomedicine for glioblastoma treatment [J]. *J Control Release*, 2018, **281**: 42-57.

[13] EBRAHIMI N, MANAVI M S, NAZARI A, *et al*. Nano-scale delivery systems for siRNA delivery in cancer therapy: new era of gene therapy empowered by nanotechnology [J]. *Environ Res*, 2023, **239**(Pt 2): 117263.

[14] BUTLER M, PONGOR L, SU Y T, *et al*. MGMT status as a clinical biomarker in glioblastoma [J]. *Trends Cancer*, 2020, **6**(5): 380-391.

[15] WANG K, KIEVIT F M, CHIARELLI P A, *et al*. siRNA nanoparticle suppresses drug-resistant gene and prolongs survival in an orthotopic glioblastoma xenograft mouse model [J]. *Adv Funct Mater*, 2021, **31**(6): 2007166.

[16] XIE Y D, LU X Y, WANG Z, *et al*. A hypoxia-dissociable siRNA nanoplatform for synergistically enhanced chemoradiotherapy of glioblastoma [J]. *Biomater Sci*, 2022, **10**(23): 6791-6803.

[17] COISNE C, LYCK R, ENGELHARDT B. Live cell imaging techniques to study T cell trafficking across the blood-brain barrier *in vitro* and *in vivo* [J]. *Fluids Barriers CNS*, 2013, **10**(1): 7.

[18] KORTYLEWSKI M, SWIDERSKI P, HERRMANN A, *et al*. *In vivo* delivery of siRNA to immune cells by conjugation to a TLR9 agonist enhances antitumor immune responses [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, **27**(10): 925-932.

[19] LI Y, MENG X, CHEN G, *et al*. Lipid-mediated delivery of CD47 siRNA aids JQ1 in ensuring simultaneous downregulation of PD-L1 and CD47 and improves antitumor immunotherapy efficacy [J]. *Biomater Sci*, 2022, **10**(23): 6755-6767.

[20] AZAMBUJA J H, LUDWIG N, BRAGANHOL E, *et al*. Inhibition of the adenosinergic pathway in cancer rejuvenates innate and adaptive immunity [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(22): 5698.

[21] SEYEDMIRZAEI H, SHOBEIRI P, TURGUT M, *et al*. VEGF levels in patients with glioma: a systematic review and meta-analysis [J]. *Rev Neurosci*, 2020, **32**(2): 191-202.

[22] GOSWAMI R, SUBRAMANIAN G, SILAYEVA L, *et al*. Gene therapy leaves a vicious cycle [J]. *Front Oncol*, 2019, **9**: 297.

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

[24] ZIELIŃSKA A, CARREIRÓ F, OLIVEIRA A M, *et al*. Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology [J]. *Molecules*, 2020, **25**(16): 3731.

[25] HOWARD K A. Delivery of RNA interference therapeutics using polycation-based nanoparticles [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, **61**(9): 710-720.

[26] WILLIFORD J M, WU J, REN Y, *et al*. Recent advances in nanoparticle-mediated siRNA delivery [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2014, **16**: 347-370.

[27] ROY S, ZHU D C, PARAK W J, *et al*. Lysosomal proton buffering of poly(ethylenimine) measured *in situ* by fluorescent pH-sensor microcapsules [J]. *ACS Nano*, 2020, **14**(7): 8012-8023.

[28] HALD ALBERTSEN C, KULKARNI J A, WITZIGMANN D, *et al*. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, **188**: 114416.

[29] PENG Y, HUANG J, XIAO H, *et al*. Codelivery of temozolomide and siRNA with polymeric nanocarrier for effective glioma treatment [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, **13**: 3467-3480.

[30] WANG H, LIN S Q, WANG S L, *et al*. Folic acid enables targeting delivery of lipodiscs by circumventing IgM-mediated opsonization [J]. *Nano Lett*, 2022, **22**(16): 6516-6522.

[31] SHI H, SUN S, XU H Y, *et al*. Combined delivery of temozolomide and siPLK1 using targeted nanoparticles

to enhance temozolomide sensitivity in glioma [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, **15**: 3347-3362.

[32] YAN Y F, ZHU F T, SU H H, *et al*. Construction of degradable and amphiphilic triblock polymer carriers for effective delivery of siRNA [J]. *Macromol Biosci*, 2022, **22**(12): e2200232.

[33] MATTA J, MAALOUF R. Delivery of siRNA therapeutics: PLGA nanoparticles approach [J]. *Front Biosci* (Schol Ed), 2019, **11**(1): 56-74.

[34] SHEN Y Y, PI Z K, YAN F, *et al*. Enhanced delivery of paclitaxel liposomes using focused ultrasound with microbubbles for treating nude mice bearing intracranial glioblastoma xenografts [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, **12**: 5613-5629.

[35] GUO Y T, LEE H Y, FANG Z, *et al*. Single-cell analysis reveals effective siRNA delivery in brain tumors with microbubble-enhanced ultrasound and cationic nanoparticles [J]. *Sci Adv*, 2021, **7**(18): eabf7390.

[36] AL-ABSI M Y, CAPRIFICO A E, CALABRESE G. Chitosan and its structural modifications for siRNA delivery [J]. *Adv Pharm Bull*, 2023, **13**(2): 275-282.

[37] WEN L J, WEN C L, ZHANG F T, *et al*. siRNA and chemotherapeutic molecules entrapped into a redox-responsive platform for targeted synergistic combination therapy of glioma [J]. *Nanomedicine*, 2020, **28**: 102218.

[38] SONG H L, HART S L, DU Z X. Assembly strategy of liposome and polymer systems for siRNA delivery [J]. *Int J Pharm*, 2021, **592**: 120033.

[39] YUAN Z X, ZHAO L, ZHANG Y F, *et al*. Inhibition of glioma growth by a GOLPH3 siRNA-loaded cationic liposomes [J]. *J Neurooncol*, 2018, **140**(2): 249-260.

[40] XU H Y, ZHANG Y K, LI L F, *et al*. The nanoprodrug of polytemozolomide combines with MGMT siRNA to enhance the effect of temozolomide in glioma [J]. *Drug Deliv*, 2023, **30**(1): 1-13.

[41] YE C K, PAN B M, XU H Y, *et al*. Co-delivery of GOLPH3 siRNA and gefitinib by cationic lipid-PLGA nanoparticles improves EGFR-targeted therapy for glioma [J]. *J Mol Med* (Berl), 2019, **97**(11): 1575-1588.

[42] MAYHAN W G. Nitric oxide donor-induced increase in permeability of the blood-brain barrier [J]. *Brain Res*, 2000, **866**(1/2): 101-108.

[43] OLIVERA G C, REN X Y, VODNALA S K, *et al*. Nitric oxide protects against infection-induced neuroinflammation by preserving the stability of the blood-brain barrier [J]. *PLoS Pathog*, 2016, **12**(2): e1005442.

[44] HSIEH H T, HUANG H C, CHUNG C W, *et al*. CXCR4-targeted nitric oxide nanoparticles deliver PD-L1 siRNA for immunotherapy against glioblastoma [J]. *J Control Release*, 2022, **352**: 920-930.

[45] KASHYAP K, SHUKLA R. Drug delivery and targeting to the brain through nasal route: mechanisms, applications and challenges [J]. *Curr Drug Deliv*, 2019, **16**(10): 887-901.

[46] WU D D, SALAH Y A, NGOWI E E, *et al*. Nanotechnology prospects in brain therapeutics concerning gene-targeting and nose-to-brain administration [J]. *iScience*, 2023, **26**(8): 107321.

[47] HU Y, JIANG K, WANG D L, *et al*. Core-shell lipoplexes inducing active macropinocytosis promote intranasal delivery of c-Myc siRNA for treatment of glioblastoma [J]. *Acta Biomater*, 2022, **138**: 478-490.

[48] ZHANG Y, LI H M, SUN J, *et al*. DC-Chol/DOPE cationic liposomes: a comparative study of the influence factors on plasmid pDNA and siRNA gene delivery [J]. *Int J Pharm*, 2010, **390**(2): 198-207.

[49] SUN X Y, CHEN Y, ZHAO H, *et al*. Dual-modified cationic liposomes loaded with paclitaxel and survivin siRNA for targeted imaging and therapy of cancer stem cells in brain glioma [J]. *Drug Deliv*, 2018, **25**(1): 1718-1727.

[50] JARZEBSKA N T, LAUCHLI S, ISELIN C, *et al*. Functional differences between protamine preparations for the transfection of mRNA [J]. *Drug Deliv*, 2020, **27**(1): 1231-1235.

[51] HAN J M, JUNG H J. Cyclophilin A/CD147 interaction: a promising target for anticancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(16): 9341.

[52] SAW P E, ZHANG A, NIE Y, *et al*. Tumor-associated fibronectin targeted liposomal nanoplatform for cyclophilin A siRNA delivery and targeted malignant glioblastoma therapy [J]. *Front Pharmacol*, 2018, **9**: 1194.

[53] LIU D Z, CHENG Y, QIAO S, *et al*. Nano-codelivery of temozolomide and siPD-L1 to reprogram the drug-resistant and immunosuppressive microenvironment in orthotopic glioblastoma [J]. *ACS Nano*, 2022, **16**(5): 7409-7427.

[54] EYGERIS Y, GUPTA M, KIM J, *et al*. Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery [J]. *Acc Chem Res*, 2022, **55**(1): 2-12.

[55] GARBER K. Alnylam launches era of RNAi drugs [J]. *Nat*

Biotechnol, 2018, **36**(9): 777-778.

[56] JOHNSON L T, ZHANG D, ZHOU K J, *et al*. Lipid nanoparticle(LNP) chemistry can endow unique *in vivo* RNA delivery fates within the liver that alter therapeutic outcomes in a cancer model[J]. *Mol Pharm*, 2022, **19**(11): 3973-3986.

[57] DILLIARD S A, CHENG Q, SIEGWART D J. On the mechanism of tissue-specific mRNA delivery by selective organ targeting nanoparticles[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, **118**(52): e2109256118.

[58] ZHANG R, EL-MAYTA R, MURDOCH T J, *et al*. Helper lipid structure influences protein adsorption and delivery of lipid nanoparticles to spleen and liver[J]. *Biomater Sci*, 2021, **9**(4): 1449-1463.

[59] LIU S H, LIU J, LI H S, *et al*. An optimized ionizable cationic lipid for brain tumor-targeted siRNA delivery and glioblastoma immunotherapy[J]. *Biomaterials*, 2022, **287**: 121645.

[60] MA F H, YANG L, SUN Z R, *et al*. Neurotransmitter-derived lipidoids(NT-lipidoids) for enhanced brain delivery through intravenous injection[J]. *Sci Adv*, 2020, **6**(30): eabb4429.

[61] RAKIC L M, ZLOKOVIC B V, DAVSON H, *et al*. Chronic amphetamine intoxication and the blood-brain barrier permeability to inert polar molecules studied in the vascularly perfused guinea pig brain[J]. *J Neurol Sci*, 1989, **94**(1-3): 41-50.

[62] NORTHROP N A, YAMAMOTO B K. Methamphetamine effects on blood-brain barrier structure and function[J]. *Front Neurosci*, 2015, **4**(9): 69.

[63] SAHA S, YAKATI V, SHANKAR G, *et al*. Amphetamine decorated cationic lipid nanoparticles cross the blood-brain barrier: therapeutic promise for combating glioblastoma[J]. *J Mater Chem B*, 2020, **8**(19): 4318-4330.

[64] GHOSH B, BISWAS S. Polymeric micelles in cancer therapy: state of the art[J]. *J Control Release*, 2021, **332**: 127-147.

[65] TANG L, ZHANG R, WANG Y S, *et al*. A simple self-assembly nanomicelle based on brain tumor-targeting peptide-mediated siRNA delivery for glioma immunotherapy via intranasal administration[J]. *Acta Biomater*, 2023, **155**: 521-537.

[66] ZHANG Y, BI J Y, HUANG J Y, *et al*. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, **15**: 6917-6934.

[67] XU M, FENG T, LIU B W, *et al*. Engineered exosomes: desirable target-tracking characteristics for cerebrovascular and neurodegenerative disease therapies[J]. *Theranostics*, 2021, **11**(18): 8926-8944.

[68] ZHAN Q, YI K K, CUI X T, *et al*. Blood exosomes-based targeted delivery of cPLA2 siRNA and metformin to modulate glioblastoma energy metabolism for tailoring personalized therapy[J]. *Neuro Oncol*, 2022, **24**(11): 1871-1883.

