

siRNA 无载体递送研究进展

刘珂瑶¹, 罗应楠¹, 胡一雪², 王东纳¹, 张列峰^{1,2}

(1. 南京师范大学食品与制药工程学院, 江苏 南京 210023)

(2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 作为一种能够特异性靶向基因沉默的重要分子, 具有广阔的应用前景。然而, siRNA 的有效递送一直是其临床应用的关键问题之一。传统的 siRNA 递送系统通常依赖于载体工具的辅助, 但载体存在潜在的降解性、长期毒性和免疫反应等问题, 限制了其在临床中的应用。因此, 无载体递送 siRNA 成为当前研究的热点之一。本综述旨在回顾 siRNA 无载体递送研究的最新进展, 包括其作用机制、递送策略以及递送优势等方面。

[关键词] 小干扰 RNA, 无载体递送, RNA 干扰, 修饰策略, siRNA 偶联物

[中图分类号] R945 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2025)01-0047-09

Study Advance in siRNA Carrier-Free Delivery

Liu Keyao¹, Luo Yingnan¹, Hu Yixue², Wang Dongna¹, ZhangLiefeng^{1,2}

(1. School of Food and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Small interfering RNA (siRNA), as an important molecule capable of specific gene silencing, holds great promise in various applications. However, the effective delivery of siRNA has always been one of the key issues for its clinical application. Traditional siRNA delivery systems often rely on carrier vehicles, but these carriers have potential issues such as degradation, long-term toxicity and immune response, which restrict their clinical use. Therefore, carrier-free delivery of siRNA has become one of the research hotspots. This review aims to summarize the latest advances in siRNA carrier-free delivery research, including mechanism of action, delivery strategies and delivery advantages.

Key words: siRNA, carrier-free delivery, RNA interference, modification strategy, siRNA conjugates

小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 又称为短干扰 RNA、沉默 RNA 或非编码 RNA, 是由双链 RNA (double strand RNA, dsRNA) 切割生成的小片段 RNA。siRNA 以单链形式存在于细胞内, 并与特定的 mRNA 相结合, 诱导其降解^[1]。siRNA 通常由 21~25 个碱基对组成, 其序列与目标 mRNA 序列互补配对, 每条单链 5'端具有磷酸基团, 而 3'端具有一个羟基。此外, 每条单链的 3'端均有 2~3 个突出的非配对的碱基^[2], 结构如图 1 所示。

siRNA 因其特异性沉默靶基因的作用而受到广泛关注, 然而, 裸 siRNA 在细胞内摄取率较低且易被降解。为了发挥其抑制靶基因表达的作用, siRNA 需要载体对其进行保护并高效递送至靶细胞。siRNA 递送载体主要分为病毒载体和非病毒载体: 前者通常使用逆转录病毒、腺病毒等作为递送载体, 具有较高的递送效率, 但免疫反应风险和毒性等问题, 限制了其临床应用。相比之下, 非病毒载体以其低毒性而具有更大的开发潜力^[3], 比如基于脂质体的纳米递送系统和基于聚合物的纳米粒递送系统。据统计^[4], 在已发表的研究和正在进行的临床实验中, 脂质体纳米颗粒的使用率

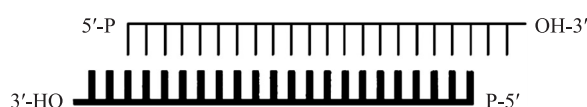


图 1 siRNA 的结构^[2]

Fig. 1 The structure of siRNA^[2]

收稿日期: 2023-10-07.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21877061).

通讯作者: 张列峰, 博士, 副教授, 研究方向: 蛋白质, 核酸药物递送. E-mail: lfzhang@njnu.edu.cn

分别为 91%和 56%. 然而,传统的纳米载体递送系统仍然存在一些不足之处:大部分载体本身是惰性的,载药量往往较低;目前已批准用于临床的载体材料种类非常有限;载体的制备工艺较为复杂,成本较高. 目前, siRNA 纳米递送系统的开发仍面临许多挑战,需要进一步改进载体的设计和制备方法,以提高递送效率.

近年来,无载体递送 siRNA 的优势使其成为一种具有潜力的递送策略. 相较于传统的载体递送系统,无载体递送 siRNA 具有诸多优势,例如简化递送过程、低毒性和免疫原性、高递送效率、灵活的化学修饰和较低的成本等. 随着纳米技术和基因递送领域的不断发展,无载体递送 siRNA 有望在基因治疗和精准医学领域发挥重要作用,为疾病治疗提供新的选择和解决方案.

1 RNAi

1.1 RNAi 的作用机制

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种通过 RNA 分子作用来实现基因沉默或抑制的过程. 它通过序列互补的机制诱导特定的 mRNA 降解,从而阻止其翻译为蛋白质^[5]. 在 RNAi 过程中,许多小片段 RNA 均发挥作用,包括小干扰 RNA、微小 RNA、短发夹 RNA 等^[5]. 其中, siRNA 是实现 RNAi 技术中基因沉默的关键工具,也是当前研究的热点. 在细胞质中,成熟的 siRNA 与核酸内切酶 Dicer 和 TAR RNA 结合蛋白(TAR RNA-binding protein, TRBP)结合,形成 RISC 装载复合物(RISC-loading complex, RLC). 然后, RLC 与 Argonaute(Argo)蛋白家族中的 Argo2 结合,形成 siRNA 诱导沉默复合体(siRNA induced silencing complex, RISC). Argo2 具有剪切活性,可以选择 siRNA 中的反义链并丢弃正义链. siRNA 反义链与特定的 mRNA 序列通常完全互补配对. 在镁离子和 ATP 的作用下, RISC 与靶 mRNA 结合并将其切割和降解,从而抑制或影响靶基因的表达,并降低蛋白的表达水平^[6],这一过程实现了对特定基因的沉默或抑制.

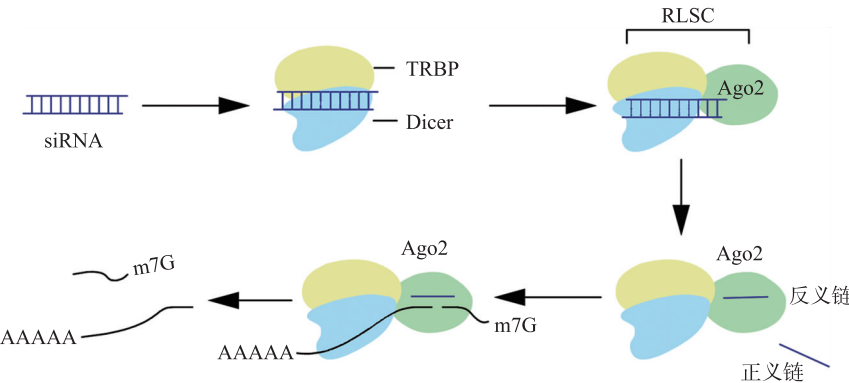


图 2 siRNA 作用机制
Fig. 2 Mechanism of action of siRNA

1.2 基于 RNAi 的 siRNA 药物

siRNA 药物是基于 RNAi 技术的一种新型治疗药物,在基因沉默实验和药物开发中受到广泛研究. 相较于传统的化学药物, siRNA 药物展现出显著优势:首先, siRNA 药物通过精确设计目标基因的序列来实现基因沉默,从而减少脱靶效应,提高特异性^[7];其次,通过设计不同的 siRNA 序列, siRNA 药物可以作用于不同的基因,因此有望用于治疗多种疾病,实现快速的新药设计和扩大治疗范围;此外, siRNA 药物的药效监测方法也更加简化,只需检测目标 mRNA 的含量或目标蛋白的表达水平即可评估治疗效果^[8].

然而, siRNA 药物的应用仍然面临诸多挑战,首要问题便是 siRNA 的有效递送. 由于裸 siRNA 具有高分子量、负电荷和亲水性,难以穿过细胞膜进入细胞,在血液中也容易被核酸酶降解,导致半衰期短^[9]. 此外,裸 siRNA 容易在肾脏中聚集并随尿液排出体外,或被网状内皮系统捕获,无法到达靶细胞,并与靶序列结合发挥作用^[10]. 除此之外, siRNA 可能还会引起体内免疫系统的吞噬反应,导致炎症或其他不良反应. siRNA 的脱靶效应可能导致非靶基因的沉默,带来意想不到的毒性等风险.

总之, siRNA 药物的设计与研发具有巨大潜力,但在体内的递送效率较低等问题已成为 siRNA 药物研发的瓶颈. 因此,研究人员正在积极寻找新的递送策略和技术,以克服这些挑战,推动 siRNA 药物的进一步研发和应用.

2 siRNA 无载体递送系统

近年来,为了克服传统递送系统的毒性缺陷并提高 siRNA 的运载效率,无载体递送系统正式进入人们的视野.将纳米药物递送与自组装技术相结合,在不借助载体材料的情况下,siRNA 之间自组装或与其他药物共组装,形成均匀稳定的纳米粒,这些纳米粒具有自递送能力,即同时作为递送载体和被递送的对象^[11],在提高载药量的同时避免纳米载体的细胞毒性.

2.1 siRNA 的化学修饰

对 siRNA 进行化学修饰,可以提高其在血液中的化学稳定性、增加半衰期、降低免疫效应和脱靶效应^[12]. siRNA 的基本结构单元为核苷酸,因而对 siRNA 的化学修饰本质上是对核苷酸的化学修饰.近年来,修饰核苷酸对 siRNA 活性的影响已被广泛研究^[13-14].

2.1.1 磷酸修饰

裸 siRNA 的核苷酸之间通过 3',5'-磷酸二酯键连接,带有负电荷,容易被血液中的磷酸酶降解^[15].最常见的修饰是将易被水解的磷酸二酯(phosphodiester, PO)替换为硫代磷酸酯(phosphorothioate, PS)^[16],可以显著地稳定 RNA 对核酸酶的降解,但过多的 PS 修饰可能导致毒性增加,一般其数量控制在 5%~50%^[14].除此之外,还可以将硼酸磷酸酯(boric acid phosphate ester, BP)取代 PO,效力更高,但目前缺乏大规模合成的优化方法.引入酰胺键修饰也可以起到保护 siRNA 免受核酸酶的降解作用,但现阶段关于酰胺键对基因沉默效率的影响研究较少.

2.1.2 核糖修饰

最常见的核糖修饰位点为核苷酸的 2'位.这是由于 2'-OH 参与核糖核酸内切酶对 RNA 的切割,但不是 siRNA 活性必需.这些修饰包括 2'-O-Me 和 2'-F,如图 3,均可以提高核酸酶抗性和结合亲和力,延长半衰期,使 siRNA 稳定性增强^[7].

Juan 等^[17]设计了一种靶向基质金属蛋白酶 B (matrix metalloproteinase 13, MMP13)的 siRNA,该序列具有特定的核糖修饰和磷酸二酯连接方式.这条 siRNA 序列是一条 19 个核苷酸的 RNA 链,带有 2'-O-Me 和 2'-F 核糖修饰,这些修饰以"拉链"方式交替出现在 RNA 链的末端.此外,该 siRNA 序列正反义链的 5'和 3'末端的最后两个碱基被替换为通过磷酸二酯连接的 PS.这种拉链方式的修饰可以进一步增强 siRNA 的稳定性.除此之外,还可以引入锁核酸(LNA)修饰,即核糖的 2'-O 与 4'-C 之间形成共价键.将 LNA 插入 siRNA 序列可以增强生物稳定性和靶标结合亲和力,而解锁核酸(UNA)缺少核糖环的 C2-C3 键,无环结构降低了双链的稳定性.因此,在严重修饰的 siRNA (与 LNA、2'-邻甲基等)中,结合 UNA 有助于保留其效力^[18].

2.1.3 碱基修饰

siRNA 与 mRNA 通过碱基互补形成氢键发挥作用,因此对碱基进行修饰会对 siRNA 的性能产生影响.因而,在碱基上的修饰限制较多.一种常见的碱基修饰方法是用 5'-溴尿嘧啶、假尿嘧啶、2'-硫尿嘧啶、5'-碘尿嘧啶取代碱基,可以促进核苷酸之间氢键的形成,一定程度上提高稳定性^[14].例如, Fesler 等构建了靶向 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, BCL-2)的 siRNA,其中用氟尿嘧啶(5-FU)取代正义链和反义链中的所有尿嘧啶残基. BCL-2 是一种重要的抗凋亡基因,在许多不同的癌症中过表达. 5-FU 是一种尿嘧啶类似物,通过与其靶蛋白胸苷酸合成酶及其代谢产物氟脱氧尿核苷单磷酸形成自杀复合物来阻断嘧啶的从头合成^[19]. 5-FU 修饰的靶向 BCL-2 的 siRNA 结合了二者的治疗能力,可以进一步提升治疗效果.此外,氟修饰增加了 siRNA 的亲脂性,使得带负电荷的 siRNA 可以穿过细胞膜.

2.2 siRNA 的偶联自组装

siRNA 的偶联是指直接将 siRNA 与特定配体通过化学键交联、碱基互补配对等方式结合,使用与靶向细胞受体结合的配体,能够更加精确地递送 siRNA 分子,最大程度上减少脱靶效应,并且由于它们的分子尺寸较小,大多数生物偶联物本质上具有较低的免疫原性^[14].

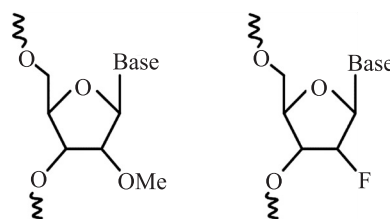


图 3 核苷酸的核糖修饰

Fig. 3 Modification of ribose in nucleotide

2.2.1 脂质-siRNA 偶联物

siRNA 分子具有高度亲水性,难以通过疏水的细胞膜,因而考虑用疏水性分子修饰 siRNA,使其克服脂质双分子层的疏水屏障,进入细胞内部. 在 2004 年, Soutschek 等^[20] 设计了胆固醇偶联的 siRNA,用于靶向载脂蛋白 B mRNA. siRNA 分子中使用了 PS 骨架和 2'-O-Me 修饰的核苷酸,并将末端羟基与胆固醇进行化学偶联. 核糖的甲基化可以提高药物的稳定性,而末端胆固醇的结合则增加 siRNA 的疏水性,延长其在血液中的半衰期,通过脂质运输途径增加肝脏的递送效果. 类似地, Fernandez 等^[21] 创建了鞘氨醇修饰的 siRNA,实验发现其具有良好的基因沉默效果.

据报道^[22],脂质-siRNA 偶联物的细胞摄取是一个两步过程:首先,偶联物与细胞膜快速结合,其中胆固醇插入细胞膜,然后通过内吞作用进入细胞. 影响细胞摄取的主要因素是偶联物与脂蛋白的亲合力,亲脂性较高的化合物,如胆固醇-siRNA 偶联物,倾向于与低密度脂蛋白(LDL)结合,而 LDL 受体在肝细胞中高表达,因而其主要沉积在肝脏中^[23];亲脂性较低的化合物则与高密度脂蛋白(HDL)结合,被递送到肾脏和其他组织中. 偶联物亲和力的相关因素还包括烷基链的长度、配体与 siRNA 之间连接子的长度,如连接子碳原子数较低时细胞摄取也会更低,而连接子碳原子数大于 10 则阻碍了偶联物与脂蛋白的相互作用.

2.2.2 抗体-siRNA 偶联物用于肿瘤靶向 siRNA 递送

抗体-药物偶联物因较高的靶向性已经广泛应用于临床研究,类似地,抗体介导的 siRNA 递送系统,即抗体-siRNA 偶联物(antibody-siRNA-conjugates, ARCs),同样具有巨大的研究潜能. 它可以提高 siRNA 递送的特异性,在维持体内循环稳定的同时尽可能降低脱靶效应^[24]. 目前应用较多的抗体为单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb),特点为只与一个抗原结合. 它包含两个关键部分,分别为抗原结合片段(Fab)和可结晶片段(Fc),前者可以识别并结合抗原,后者与免疫细胞上的各种受体相互作用,并通过新生 Fc 受体影响抗体的血液滞留时间. 单克隆抗体对靶细胞表达的抗原具有高亲和力和特异性,并且半衰期长. Sugo 等^[24]将 siRNA 与 CD71 单克隆抗体的 Fab 片段通过马来酰亚胺连接臂共价结合形成偶联物,开发了一种能靶向肌肉器官的最小尺寸的递送平台. CD71 是铁结合糖蛋白转铁蛋白的受体,可以介导细胞的内存作用,将核酸递送到细胞内. 在正常小鼠模型中,静脉注射后发现偶联物能够在心脏和骨骼肌组织中进行持久的基因沉默效果;在外周动脉疾病小鼠模型中,肌肉注射靶向 *myostatin* 基因的 siRNA-Fab 片段结合物能够显著沉默 *myostatin*.

抗体-siRNA 偶联物到达靶细胞后, siRNA 需要成功地从抗体上释放出来, 以参与基因沉默过程^[25], 这对抗体-siRNA 偶联物的设计和开发提出了挑战. 半胱氨酸和赖氨酸残基通常被用作抗体-siRNA 偶联物的结合位点, 前者的巯基可以与某些官能团(如马来酰亚胺和巯基)的 siRNA 结合, 比如 Sugo 等设计的 siRNA 与 CD71 单克隆抗体的 Fab 片段便是通过马来酰亚胺连接子连接的^[24], 后者的伯胺基团可以作为 siRNA 的直接结合位点. Yu 等^[26]研究开发了一种由细胞穿膜肽(CPP)和在肿瘤中高表达的底物肽(SP)组成的多功能肽, 可以作为连接子实现抗体和 siRNA 的成功偶联, 形成抗体-多功能肽-siRNA 递送系统. 该递送系统通过抗体抗原的高度特异性将 siRNA 递送至肿瘤细胞, 细胞表面的酶水解 SP 并释放 siRNA-CPP, 后者可以通过 CPP 的细胞穿透能力进入靶细胞, 从而促进 siRNA 发挥作用. Wang 等^[27]报道了由 PD-L1 抗体与靶向 PD-L1 mRNA 的 siRNA 通过光切割连接子结合的偶联物, 光敏连接子的化学结构如图 4 所示. 该化合物在光照射下会发生连接子的断裂, 导致 siPD-L1 的特异性释放, 从而发挥作用.

抗体-siRNA 偶联物具有较高的靶向性和特异性,可以提高 siRNA 递送的效果,并减少对非靶向组织的脱靶效应. 这种策略在肿瘤治疗领域具有巨大的研究潜力,并可能成为一种有效的治疗手段. 然而,目前仍需要进一步地研究和发展,以提高抗体-siRNA 偶联物的递送效率和治疗效果.

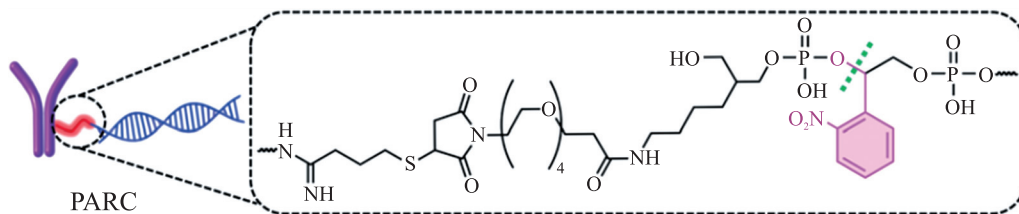


图4 光敏连接子的化学结构^[27]

Fig. 4 The chemical structure of photosensitive connectors^[27]

2.2.3 多肽-siRNA 偶联物

一些多肽可以携带结合物穿过细胞膜,这为 siRNA 的递送提供了新的策略. 肽段由不同的氨基酸组成,具有不同的极性和电荷性质,多肽-siRNA 偶联物的性质也有很大差别^[28]. 目前,已有两种药物被美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市^[29].

在已有的研究中,细胞穿透肽(cell-penetrating peptides, CPPs)以其合成简便性、多功能性而备受关注^[30]. CPPs 由 15~25 个氨基酸组成,是两亲性分子,可以通过共价连接和非共价连接与 siRNA 偶联. CPPs-siRNA 偶联物的基因沉默效率主要与连接子有关,这是由于 CPPs 表现出定位于细胞核的倾向,而 RNAi 途径发生在细胞质中. 因而,当连接子为非裂解性连接物或没有连接子时,偶联物在细胞核内呈现较高的分布;当连接子为二硫键时,在细胞质周围呈现较高的分布,显示更高的沉默效率^[31]. 此外,siRNA 末端肽段的空间位阻、肽段数量、氨基酸的立体化学也对偶联物的沉默效率有一定影响.

CGKRK 是一种众所周知的肿瘤靶向肽,对血管和肿瘤细胞具有显著的特异性. Sharma 等^[32]设计了多种脂肪酰基共轭的 CGKRK 多肽-siRNA 偶联物,发现在肽段:siRNA(重量/重量)为 20:1(N/P \approx 27.3)时,siRNA 完全被保护,不被早期酶降解. 结合肽和肽/siRNA 复合物在所选细胞系中均未表现出明显的细胞毒性.

需要注意的是,虽然多肽-siRNA 偶联物在 siRNA 递送领域具有潜力,但仍然需要进一步的研究和优化,以提高其递送效率和治疗效果,并解决可能出现的安全性和稳定性问题.

2.2.4 核酸适配体-siRNA 结合物用于肿瘤靶向 RNAi 治疗

核酸适配体(aptamer, Apt)是具有三维结构的单链寡核苷酸,对特定的细胞表面具有极高的特异性和亲和力,且尺寸小、化学合成生产成本较低、毒性较低^[33]. 由于核酸适配体和 siRNA 均为核酸,因而该结合物不易被人体识别为外来分子,具有低免疫原性. Zhou 等^[34]发现 gp120 核酸适配体在体外和体内均能递送靶向 LTR-362 的 siRNA 并诱导 *HIV-1* 的基因沉默过程. Jeong 等^[35]研究结合有适配体的 siRNA(Apt-siRNA)与 DNA 通过霍利迪连接组装(霍利迪-Apt-siRNA),可以增强 siRNA 对黏蛋白 1(MUC1)过表达的癌细胞的靶向性,结构如图 5 所示. 相比于 Apt-siRNA,霍利迪-Apt-siRNA 纳米结构对细胞摄取和基因沉默的作用明显更优,表明其可以用于无载体 siRNA 递送系统. 但是,当 siRNA 与适配体结合时,siRNA 的活性通常会降低,因而需要筛选各种构型以确定 siRNA 活性没有显著降低的结合物. Berezhnoy 等^[36]研究证明,siRNA 的热稳定性是其活性的重要参数,具有较低熔点温度的 siRNA 在与 2'-F-嘧啶修饰的适配体的 3'末端结合时不受影响或影响很小.

综上所述,核酸适配体-siRNA 结合物作为一种肿瘤靶向 RNAi 治疗策略具有潜力,但需要进一步研究和优化以提高其递送效率和治疗效果,并解决 siRNA 活性降低的问题.

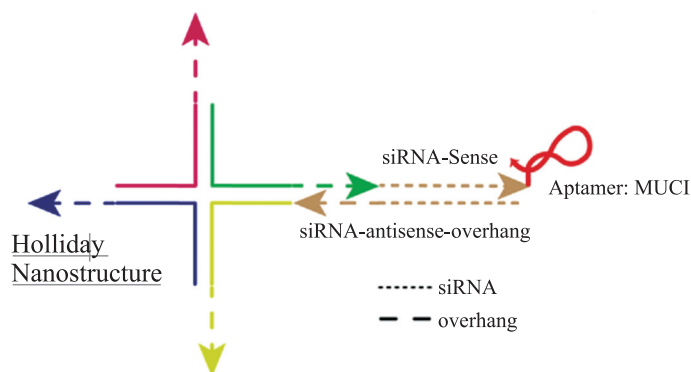


图 5 霍利迪-Apt-siRNA 结构示意图^[35]

Fig. 5 The structure of Holliday-Apt-siRNA^[35]

2.3 siRNA 与其他药物的共组装

单一药物虽然不具有自组装能力,但能与其他药物的结构相互作用,共组装形成双药杂化纳米组装体. Chen 等^[37]开发了一种阿霉素(doxorubicin, DOX)和 siPD-L1 共组装的无载体纳米组装体,命名为 PEG@D:siRNA,结构如图 6 所示. 研究显示^[38],葱环类结构的化疗药物均可以有效负载 siRNA,这是依靠化疗

药物的正电性和蒽环类结构的疏水性相互作用. 因而, 作为蒽环类化疗药物, 阿霉素与 siRNA 通过协同堆叠和静电相互作用可以形成纳米组装体, 该纳米粒子具有明确的结构: 由 DOX 和 siRNA 组成的核心和由聚乙二醇(PEG)组成的外壳. 这是化疗与免疫疗法的联合治疗, 在酸性内体/溶酶体中响应的 DOX 可以诱导肿瘤细胞的免疫原性死亡, 而 siRNA 则有效抑制了 DOX 治疗期间 *PD-L1* 基因表达的上调. 虽然该纳米颗粒的外壳还需要两亲性聚合物(PEG)的帮助, 但与以往的纳米载体递送系统不同, 该体系直接通过化疗药物负载 siRNA, 提高了系统载药量(siRNA 为 4.13%, DOX 为 21.67%).

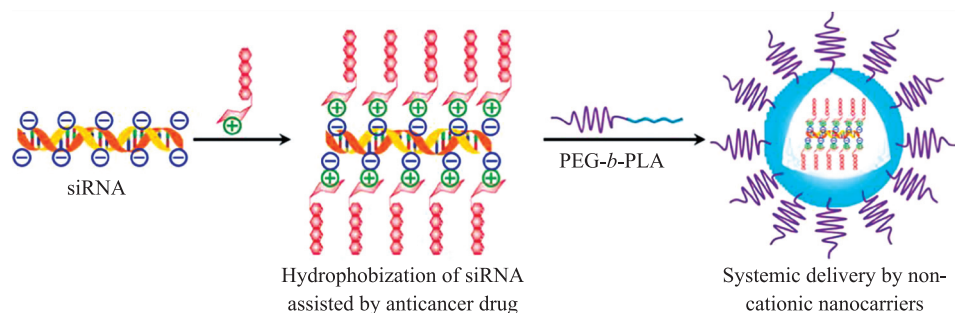


图 6 PEG@D:siRNA 的合成^[37]

Fig. 6 Synthesis of PEG@D:siRNA^[37]

另外, Yang 等^[39]构建了一种两亲性 siRNA-光敏剂偶联物(siPLK1-NB), Polo 样激酶 1 (PLK1) 通常在大多数癌细胞中过表达, 因而选择靶向 PLK1 作为目标基因. siPLK1 包括 POsiPLK1 和 PSsiPLK1 两条链, 通过亲核加成-消除反应将溴化硫取代尼罗蓝(NB-Br)特异性结合至 PSsiPLK1-片段上, 其中 NB-Br 是一种阳离子光敏剂, 具有谷胱甘肽响应特性, 可与硫代磷酸基团偶联. 通过多次亲核加成-消除反应, PSsiPLK1 片段带有正电荷, 而 POsiPLK1 片段保持带负电荷, 从而形成两亲性的 siPLK1-NB. 最后, 通过静电吸引自组装成纳米颗粒(siPLK1-NB NPs). 实验证明, siPLK1-NB NPs 表现出快速有效的肿瘤靶向递送特性.

3 siRNA 无载体递送的优势

3.1 稳定性

在过去的研究中, 保护 siRNA 免受酶降解的策略通常是利用载体封装^[40]. 但带有阳离子的载体可能导致细胞膜表面氧化产生 ROS, 具有细胞毒性的风险, 这为临床应用带来挑战. 因此, 研究开发了 siRNA 核苷酸的化学修饰, 通过对 siRNA 结构与作用机制的探索, 找到活性位点与非活性位点, 通过对相应位点的化学改造增强 siRNA 的稳定性. 在无载体递送中, 通常采用组合的化学修饰^[13], 使 siRNA 在血液中的半衰期增加, 延长作用时间, 达到预期作用效果.

3.2 生物安全性

人体的免疫反应是机体对异己成分或变异成分做出的防御反应, 通常通过蛋白激酶 R、Toll 样受体-3 的激活或 Toll 样受体-7 在树突状细胞中释放促炎细胞因子来启动. 有研究发现, siRNA 和载体结合的特定结构可能导致 IFN- α 和 IFN- β 等细胞因子的释放, 继而在体内触发强烈的免疫反应. 由于无载体递送中使用的配体大多是小分子物质, 其中核酸适配体为 DNA, 不容易被机体识别为外来物质, 从而免受机体的免疫反应或作用较弱, 相比于载体递送更为安全^[41].

3.3 递送效率

siRNA 的递送效率与载药量、细胞摄取和靶向性均有关系^[42]. 在 siRNA 无载体递送中, 通常将 siRNA 与特定配体或药物直接偶联, 这与传统递送系统需要载体的辅助不同, 大大提高了递送颗粒的载药量, 使得在递送相同单位药物时效率提高: 当 siRNA 与脂质偶联时, 偶联物在体内的循环时间增加, 通过改善药物代谢与细胞递送提高递送效率; 当 siRNA 与多肽偶联时, 尤其是目前研究较多的细胞渗透肽, 可以携带 siRNA 通过内吞作用穿过细胞膜, 增加细胞摄取效率; 当 siRNA 与抗体偶联时, 由于抗体抗原的高特异性, 可以大幅度提高其靶向性, 从而提高递送效率.

3.4 简化的递送过程

无载体递送 siRNA 可以简化递送过程, 避免了载体的制备和加载步骤, 这降低了研究和应用 siRNA

的技术门槛,使该过程更加方便和快捷.相较于需要制备复杂载体的方法,无载体递送 siRNA 通常更具经济性,它减少了对昂贵载体材料和制备工艺的需求,有助于降低成本并促进研究和应用的推广.

4 发展与前景

RNA 干扰技术因其高度特异性和高效性,被认为是分子医学领域令人兴奋的重大突破之一.作为 RNA 干扰过程中重要的效应因子,近年来人们对 siRNA 的研究也在不断深入,并开发了一系列 siRNA 药物.随着 2018 年第一款 siRNA 药物 onpattro 的获批上市,siRNA 药物的研发热潮不断高涨.目前全球已上市 siRNA 药物,治疗领域也由罕见病拓展到常见疾病^[43],并在癌症、传染病、代谢性疾病等多个领域显示出潜力.随着对 siRNA 技术的进一步改进,siRNA 药物可能在更多疾病治疗中发挥重要作用.

siRNA 药物研发过程中的首要难题是体内递送,这是由裸 siRNA 自身的负电荷、亲水性、脱靶效应和免疫原性决定的.为了最大限度地发挥 siRNA 在人类疾病治疗中的作用,无载体递送系统以其多种优势进入人们的视野,在不使用阳离子载体或转染试剂的情况下,siRNA 治疗药物的生物稳定性、递送能力和肿瘤部位滞留率均有提高.尽管极具前景,其临床应用依然存在一定局限性:(1) siRNA 的偶联和靶向递送系统依赖于特定配体与靶细胞表面标志物的相互作用,而不同细胞类型可能具有不同的表面标志物,因此需要对靶向配体进行精确的设计,才能确保其和目标细胞的高亲和性和特异性.(2) siRNA 的无载体体系摄入进靶点细胞后需要经过溶酶体逃逸才能发挥基因沉默的作用^[3],因而需要对偶联物结构进行溶酶体逃逸机制的研究,使其顺利从溶酶体释放到细胞质中.(3) 当前研究大多递送至肝脏部位,因而应关注如何同时避免肾脏和网状内皮的清除,扩大影响部位^[6].(4) 将 siRNA 与特定配体结合需要精密的制备过程,这可能增加制备成本和技术难度.

尽管无载体 siRNA 递送研究取得了显著进展,但仍然需要解决一些挑战.例如,如何提高 siRNA 的稳定性,延长其在体内的半衰期,以及如何实现更好的特异性靶向.此外,对无载体 siRNA 递送的安全性和副作用的评估也非常重要,以确保其在临床应用中的可行性和可靠性.

[参考文献]

- [1] 李怀东,李昕泽.小干扰 RNA 研究概况[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(35):116-117.
- [2] 陈忠斌,于乐成,王升启. RNA 干扰作用(RNAi)研究进展[J].中国生物化学与分子生物学报,2002(5):525-528.
- [3] SUBHAN M A, TORCHILIN V. siRNA based drug design, quality, delivery and clinical translation[J]. Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine, 2020, 29(1):102239.
- [4] CORYDON I J, FABIAN-JESSING B K, JAKOBSEN T S, et al. 25 years of maturation: A systematic review of RNAi in the clinic[J]. Molecular therapy-nucleic acids, 2023, 33(3):469-482.
- [5] DAR S A, THAKUR A, QURESHI A, et al. siRNAmoD: A database of experimentally validated chemically modified siRNAs[J]. Scientific reports, 2016, 6(1):20031.
- [6] SETTEN R L, ROSSI J J, HAN S. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics[J]. Nature reviews drug discovery, 2019, 18(6):421-446.
- [7] FRIEDRICH M, AIGNER A. Therapeutic siRNA: State-of-the-art and future perspectives[J]. BioDrugs, 2022, 36(5):549-571.
- [8] 张琼丹,陈朝霞,李芾瑶,等. siRNA 纳米递送系统研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2022,49(6):1018-1035.
- [9] XU C, LI D, CAO Z, et al. Facile hydrophobization of siRNA with anticancer drug for non-cationic nanocarrier-mediated systemic delivery[J]. Nano letters, 2019, 19(4):2688-2693.
- [10] CROOKE S T, BAKER B F, CROOKE R M, et al. Antisense technology: an overview and prospectus[J]. Nature reviews drug discovery, 2021, 20(6):427-453.
- [11] FANG F, WANG S, SONG Y, et al. Continuous spatiotemporal therapy of a full-API nanodrug *via* multi-step tandem endogenous biosynthesis[J]. Nature communications, 2023, 14(1):1660.
- [12] TAI W. Chemical modulation of siRNA lipophilicity for efficient delivery[J]. Journal of controlled release, 2019, 307(15):98-107.
- [13] LEE J W, CHOI J, CHOI Y, et al. Molecularly engineered siRNA conjugates for tumor-targeted RNAi therapy[J]. Journal of controlled release, 2022, 351(18):713-726.

- [14] 李琛,司笑,李金波,等. 小干扰 RNA 药物的化学修饰及递送系统[J]. 化学学报,2023,81(9):1-18.
- [15] SELVAM C, MUTISYA D, PRAKASH S, et al. Therapeutic potential of chemically modified siRNA: Recent trends [J]. Chemical biology & drug design, 2017, 90(5): 665-678.
- [16] MAGUREGUI A, ABE H. Developments in siRNA modification and ligand conjugated delivery to enhance RNA interference ability[J]. ChemBioChem, 2020, 21(13): 1808-1815.
- [17] JUAN M C, MEGAN K, VEERAJ S, et al. Albumin-binding RNAi conjugate for carrier free treatment of arthritis [J]. Biosystems engineering, 2023, 10(5): 542971.
- [18] LAURSEN M B, PAKULA M M, GAO S, et al. Utilization of unlocked nucleic acid(UNA) to enhance siRNA performance *in vitro* and *in vivo* [J]. Molecular biosystems, 2010, 6(5): 862.
- [19] FESLER A, HWANG G R, JU J. Development of novel 5-FU modified siRNA against BCL-2 with enhanced efficacy and vehicle-free cellular uptake [J]. Genes & diseases, 2024, 11(1): 23-25.
- [20] SOUTSCHEK J, AKINC A, BRAMLAGE B, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs [J]. Nature, 2004, 432(7014): 173-178.
- [21] FERNANDEZ C, GIORGEES I, GOSS E, et al. Effective carrier-free gene-silencing activity of sphingosine-modified siRNAs [J]. Organic & biomolecular chemistry, 2023, 21(10): 2107-2117.
- [22] ZHENG Y, TAI W. Insight into the siRNA transmembrane delivery—from cholesterol conjugating to tagging [J]. WIREs nanomedicine and nanobiotechnology, 2020, 12(3): e1606.
- [23] OSBORN M F, COLES A H, BISCANS A, et al. Hydrophobicity drives the systemic distribution of lipid-conjugated siRNAs *via* lipid transport pathways [J]. Nucleic acids research, 2019, 47(3): 1070-1081.
- [24] SUGO T, TERADA M, OIKAWA T, et al. Development of antibody-siRNA conjugate targeted to cardiac and skeletal muscles [J]. Journal of controlled release, 2016, 237(17): 1-13.
- [25] TAI W. Current aspects of siRNA bioconjugate for *in vitro* and *in vivo* delivery [J]. Molecules, 2019, 24(12): 2211.
- [26] YU Z, ZHANG X, PEI X, et al. Antibody-siRNA conjugates (ARCs) using multifunctional peptide as a tumor enzyme cleavable linker mediated effective intracellular delivery of siRNA [J]. International journal of pharmaceutics, 2021, 606(17): 120940.
- [27] WANG X, XIAO X, FENG Y, et al. A photoresponsive antibody-siRNA conjugate for activatable immunogene therapy of cancer [J]. Chemical science, 2022, 13(18): 5345-5352.
- [28] KLABENKOVA K, FOKINA A, STETSENKO D. Chemistry of peptide-oligonucleotide conjugates: A review [J]. Molecules, 2021, 26(17): 5420.
- [29] FU C, YU L, MIAO Y, et al. Peptide-drug conjugates (PDCs): a novel trend of research and development on targeted therapy, hype or hope? [J]. Acta pharmaceutica sinica B, 2023, 13(2): 498-516.
- [30] XIE X, LIN W, LI M, et al. Efficient siRNA delivery using novel cell-penetrating peptide-siRNA conjugate-loaded nanobubbles and ultrasound [J]. Ultrasound in medicine & biology, 2016, 42(6): 1362-1374.
- [31] YANG J, BAE H. Drug conjugates for targeting regulatory T cells in the tumor microenvironment: guided missiles for cancer treatment [J]. Experimental & molecular medicine, 2023, 55(9): 1996-2004.
- [32] SHARMA M, EL-SAYED N S, DO H, et al. Tumor-targeted delivery of siRNA using fatty acyl-CGKRK peptide conjugates [J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 6093.
- [33] SIVAKUMAR P, KIM S, KANG H C, et al. Targeted siRNA delivery using aptamer-siRNA chimeras and aptamer-conjugated nanoparticles [J]. WIREs nanomedicine and nanobiotechnology, 2019, 11(3): e1543.
- [34] ZHOU J, LAZAR D, LI H, et al. Receptor-targeted aptamer-siRNA conjugate-directed transcriptional regulation of HIV-1 [J]. Theranostics, 2018, 8(6): 1575-1590.
- [35] JEONG E H, JEONG H, JANG B, et al. Aptamer-incorporated DNA holliday junction for the targeted delivery of siRNA [J]. Journal of industrial and engineering chemistry, 2017, 56(6): 55-61.
- [36] BEREZHNOY A, BRENNEMAN R, BAJGELMAN M, et al. Thermal stability of siRNA modulates aptamer-conjugated siRNA inhibition [J]. Molecular therapy-nucleic acids, 2012, 1(3): e51.
- [37] CHEN S, LI D, DU X, et al. Carrier-free nanoassembly of doxorubicin prodrug and siRNA for combinationally inducing immunogenic cell death and reversing immunosuppression [J]. Nano today, 2020, 35(5): 100924.
- [38] SAW P E, YAO H, LIN C, et al. Stimuli-responsive polymer-prodrug hybrid nanoplatfrom for multistage siRNA delivery and combination cancer therapy [J]. Nano letters, 2019, 19(9): 5967-5974.
- [39] YANG Y, NING H, XIA T, et al. Electrostatic attractive self-delivery of siRNA and light-induced self-escape for synergistic

- gene therapy[J]. Advanced materials,2023,35(30):2301409.
- [40] WITZIGMANN D,KULKARNI J A,LEUNG J,et al. Lipid nanoparticle technology for therapeutic gene regulation in the liver[J]. Advanced drug delivery reviews,2020,159(7):344–363.
- [41] RANJBAR S,ZHONG X,MANAUTOU J,et al. A holistic analysis of the intrinsic and delivery-mediated toxicity of siRNA therapeutics[J]. Advanced drug delivery reviews,2023,201(10):115052.
- [42] LEE J W,CHOI J,CHOI Y,et al. Molecularly engineered siRNA conjugates for tumor-targeted RNAi therapy[J]. Journal of controlled release,2022,351(21):713–726.
- [43] ZHANG M M,BAHAL R,RASMUSSEN T P,et al. The growth of siRNA-based therapeutics:Updated clinical studies[J]. Biochemical pharmacology,2021,189(13):114432.

[责任编辑:黄 敏]