

siRNA 脂质纳米输送载体的研究进展

董文娟 周银键 梁 伟*

(中国科学院生物物理研究所蛋白质与多肽药物实验室, 北京 100101)

摘要 siRNA 能高效且特异地阻断内源性同源基因的表达即 RNA 干涉(RNAi). RNAi 在临床中的应用需要开发安全有效的输送系统, 脂质纳米输送载体是一种具有发展潜力的 siRNA 输送系统. siRNA-脂质复合物的形成主要通过静电相互作用, 静电作用必须足够强以至于载体在运输过程中不释放 siRNA, 而载体到达治疗部位时, 解聚释放出 siRNA. 载体的粒径应小于 100 nm, 以利于细胞的摄取和透过特定部位的血管开窗. 为了减少网状内皮系统(RES)的摄取和延长载体的循环时间, 载体的表面由聚乙二醇修饰. 本文主要综述了构建 siRNA 输送载体的基本要求.

关键词 siRNA, 脂质, 载体, siRNA 输送载体

学科分类号 R94

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00190

对于由基因紊乱所导致的疾病, 核酸治疗是一种潜在的有效治疗手段. 核酸物质对特定的靶基因具有高度选择性, 从而避免了传统药物引起的非特异性作用和偏靶效应. 因此, 基于核酸的生物医学治疗模式是当今发展最快和挑战性最大的一种新的医学治疗模式. 它的成功将开启人类医学史上新的历程, 将解决目前临床上亟待解决的医学难题. 当前, 170 多种基因治疗的临床试验在世界范围内开展, 其中基于 RNA 的治疗最为活跃. RNA 治疗依据作用机制不同可分为三类: 包括短发夹 RNA (shRNA)、微小 RNA(miRNA)和沉默 RNA(siRNA). ShRNA 属于短发夹表达载体, 在进入细胞核后, 转录为小 RNA 分子, 并与互补的 mRNA 分子结合, 从而抑制相应蛋白的表达. miRNA 和 siRNA 长度较小, 为 21~25 个碱基的核酸分子, 两种 RNA 分子直接在胞质中发挥作用, 使得目标 mRNA 在翻译过程被干扰. miRNA 通过与 mRNA 3'端非翻译区非特异性结合抑制其翻译过程^[1]. 因此, miRNA 可有效地干扰不止一条(通常为 1 000 条)具有相似序列的 mRNA^[2]. 相反, siRNA 通过与互补 mRNA 特异性地结合而降低其蛋白质表达. 由于 miRNA 结合的非特异性, 其在沉默目的基因的应用中具有更低的特异性和更多的脱靶现象. 例如, 2006 年, Alvarez 等^[3]不仅展示了 miRNA 在干扰多靶标时的功效而且指出 miRNA 在不同物种中

也具有非特异性. 从运送角度讲, 对 shRNA 的运送是三类中最具有挑战性的, 由于 shRNA 需要进入细胞核发挥作用, 这也成为 shRNA 在缓慢分裂细胞和非分裂细胞中干扰效率较低的原因. 例如, Mantei 等^[4]和 Shen 等^[5]提出了一种高效率沉默 T 淋巴细胞和树突细胞的方法, 这两种细胞都属于较难转染像 shRNA 这样需要进入细胞核的分子的细胞系. 但是, 由于 siRNA 与 miRNA 相比具有高度特异性, 同时也不像 shRNA 一样需要运送至细胞核中, 这使得 siRNA 成为基于 RNA 疗法中的首选分子.

表 1 列举了几个世界范围内用于临床 I 期和 II 期评价的 siRNA 分子. 其中一些研究较为成熟的分子, 包括 Cand5 和 PF-655, siRNA 分别靶向参与新血管形成的基因, 如 VEGF 和 RTF801. 早期阶段临床研究显示, 一些 siRNA 分子在湿性老年性黄斑变性病人中有良好的耐受性. 另一些 siRNA 分子, 也在广泛的临床应用中进行评价, 其治疗的疾病包括肾衰竭、实体瘤、病毒感染、新血管疾病、糖尿病引起的水肿以及预防肾脏移植后的排斥反应.

* 通讯联系人.

Tel: 010-64889861, E-mail: weixx@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2012-04-17, 接受日期: 2012-04-28

Table 1 Clinical trials worldwide for siRNA therapeutics (www.clinicaltrial.gov)

表 1 世界范围内 siRNA 疗法的临床评价(www.clinicaltrial.gov)

公司	靶标	产品	疾病	给药方式	剂型	目前状态
Alnylam 制药	呼吸道合胞病毒 - N 蛋白	ALN-RSV-01	呼吸道合胞病毒	鼻内	裸 siRNA	II b 期
Alnylam 制药	纺锤体驱动蛋白和血管内皮生长因子	ALN-VSP-01	肝癌	静脉	稳定的核酸 - 脂质颗粒	I 期
Alnylam 制药	转运甲状腺素蛋白	ALN-TTR-01	转运甲状腺素蛋白介导的淀粉样变性	静脉	稳定的核酸 - 脂质颗粒	I 期
Alnylam 制药	亨廷顿舞蹈症相关蛋白	ALN-HTT	亨廷顿舞蹈症	CNS(植入性输注)	-	临床前期
Alnylam 制药	血管内皮生长因子	Cand 5(贝伐西尼钠)	湿性老年性黄斑变性	玻璃体内	-	III 期(完成)
Sirna 医疗	血管内皮生长因子	Sirna-027 (AGB211745)	湿性老年性黄斑变性	玻璃体内	化学修饰的 siRNA	II 期(终止)
Silence 医疗	蛋白激酶 N3	Atu-027	实体瘤晚期	静脉	阳离子脂质体 -DNA 复合物	I 期
Silence 医疗	RTP801	PF-4523655 (RTP801i-14 or REDD14NP)	糖尿病性黄斑水肿	玻璃体内	-	II 期(完成)
Quark 制药	人 p53	Human p53 QPI-1002 (Akli-5 or I5NP)	急性肺损伤	静脉	-	I / II a 期(招募中)
Quark 制药	细胞凋亡蛋白酶 2	QPI-1007	非动脉炎性前部缺血性视神经病变、青光眼	玻璃体内	-	I 期
Calando 制药	核糖核酸酶还原酶 M2 亚基	CALAA-01	实体瘤	静脉	环糊精混合 Cal-101、PEG 和 PEG-Tf	I 期(进行中)
先天性指甲肥厚症项目	先天性指甲肥厚症家系角蛋白	TD101	先天性指甲肥厚症	胫胫注射	-	I 期

1 siRNA 治疗面临的挑战——siRNA 输送

siRNA 治疗面临的问题与 DNA 治疗有相同之处但也存在显著的差异。二者相同之处是：它们在细胞内必须脱掉包被层才能与各自的靶基因结合。差异主要表现为以下三个方面：a. 细胞内作用的位点不同，siRNA 在胞浆而 DNA 在细胞核；b. 稳定性不同，siRNA 易于被酶降解而 DNA 相对比较稳定；c. 分子质量不同(尺度的大小不同)，siRNA 的分子质量约为 13 ku 而双链 DNA 的分子质量是 siRNA 的几百倍。另外，一旦它们被输送至胞内，siRNA 沉默靶基因的效应在分裂的细胞可以持续 3~7 天，在不分裂的细胞可持续 3~4 周^[7]。基于 DNA 的转基因表达可以是短期的，亦可能是永久性的^[9]。

siRNA 治疗面临的主要挑战是如何有效地将 siRNA 输送至胞浆并释放出裸 siRNA，与其靶位结合进而引发目标 mRNA 降解，因此，siRNA 输送载体是 siRNA 治疗成功的关键。理想的 siRNA 输送载体应满足以下要求：a. 有效地保护 siRNA 不被循环系统的酶降解；b. 输送 siRNA 到达靶细胞避免非靶细胞的干扰；c. 能有效地穿过细胞膜并成功实现从内吞体逃逸；d. 释放出足够量的裸 siRNA。

1.1 载体应能输送 siRNA 至靶部位

为了将 siRNA 输送至其靶组织避免非靶组织的非特异性摄取，载体不应与血液和细胞外成分发生非特异相互作用^[8-9]。为达到这一目的，载体的外表面通常被聚乙二醇(PEG)修饰形成水化层^[10]。载体一旦注射进入外周静脉，首先由右心室泵入肺

中, 被肺毛细血管滤过性截留. 如果载体的尺度足够小($< 100\text{ nm}$), 载体可不被肺截留而进入左心室, 然后进入全身循环系统. 鉴于肝、脾存在血窦且血管上有许多较大的开窗, 因此大于 100 nm 的载体可滞留在血窦中, 如需靶向肝细胞, 载体的尺度必须小于 100 nm ^[8-9].

1.2 载体应能输送 siRNA 穿过细胞膜

带负电的 siRNA 不能以自由扩散的方式穿过由脂双层构筑的细胞膜^[10]. 因此, 人们尝试各种促进细胞摄取 siRNA 的方法, 包括: a. siRNA 与配基经化学偶联促进细胞摄取, 如穿膜肽、叶酸等; b. siRNA 包载于纳米颗粒中经内吞途径进入细胞; c. 载体与细胞膜发生融合将所载 siRNA 释放入胞浆等. 研究表明, 约 95% siRNA 与市售的阳离子脂质 DharmaFCT 形成的 siRNA 脂质复合物通过内吞形式进入细胞, 其中约 50% 的内吞是由网络蛋白(clathrin)介导的, 约 20% 的内吞是由胞膜小窝(caveolae)/小窝蛋白(caveolin)介导的^[11].

1.3 siRNA 从内吞体中逃逸

鉴于携带 siRNA 的载体总体上须经内吞途径进入细胞, 如何从内吞体中逃逸而不被降解是最为关键的步骤. 尽管 siRNA 逃逸出内吞体的精确机制并不清楚, 某些载体材料可以成功地帮助 siRNA 从内吞体中逃逸. 一种“质子海绵效应”的假说被提出: 细胞内吞后生成的内吞体酸化, 载体材料上氨基基团(pK_a 在 $5\sim 7$ 之间)被质子化, 导致氯离子等内流. 离子的摄入造成内吞体渗透压升高, 水分子进入内吞体使之膨胀, 最终内吞体破裂, 内容物被释放至胞浆^[12-14].

2 siRNA 脂质纳米输送载体的设计和构筑

类似 DNA, siRNA 的载体由聚合物、多肽和脂类等组分构成. siRNA 输送载体受到 DNA 输送系统的影响^[1]. 但二者又有明显的不同: siRNA 的电荷数和尺度显著少于和小于 DNA; 另外二者的作用靶位一个在胞浆(siRNA), 一个在核内(DNA). 基于上述对 siRNA 输送载体的要求, 脂质纳米载体显示了其特有的应用前景.

2.1 阳离子脂质——构筑 siRNA 输送载体的基本单元

20 年前阳离子脂质已作为载体材料用于 DNA 和 RNA 的输送^[15-16]. 阳离子脂质与带负电的核酸通过静电相互作用形成的复合物称为脂质复合物^[8-9]. 脂质复合物形成的原理是带负电的核酸结合到带正电荷的脂质囊泡上^[17]. 这一过程导致由带正电荷脂双层构成的多层结构的形成: 脂双层的厚度约 3.7 nm , 脂双层间的空间距离约为 2 nm 由带负电的核酸充填^[18-19]. DOTMA 是首次用于 DNA 输送载体的阳离子脂质之一^[15]. DOTMA 单独或与其他脂类合用经水化形成脂质体, 该脂质体可被制成小于 100 nm 的单室囊泡. 针对 siRNA 输送载体的特殊性, 发展了一类称为类脂的分子(lipidoids). 利用类脂分子为载体输送 siRNA 可显著提高 siRNA 对靶基因的沉默效果^[20-21]. 这类分子具有以下特征: a. 分子的头部至少含 2 个胺, 且至少 1 个为仲胺; b. 胺“核”与脂酰基尾间由酰胺键连接; c. 分子中脂酰链多于 2 条; d. 每 1 条脂酰链的碳原子在 $8\sim 12$ 之间. 一个类脂分子的例子是 98N1^[20-21], 见表 2.

Table 2 Some commonly used cationic lipids, their molecular structure and tail configuration

表 2 常用阳离子型脂质的代号, 名称, 化学结构与构型

脂质(简写)			
DOTMA	DOTAP	Transfectam	98N ₁₂₋₅
饱和键: 不饱和键数 18: 1	饱和键: 不饱和键数 18: 1	17: 0	11: 0

(使用 Chemdraw Ultra 11.0.1 绘制, CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA)

2.2 胆固醇——构筑 siRNA 输送载体的基本成分

胆固醇在调节许多细胞膜相关的分子事件中起着重要的作用, 如胞膜的融合、胞饮及 caveolin/caveolae 介导的内吞等^[2]. 与不含胆固醇的载体相比, 含有胆固醇的载体促进了体内 DNA/RNA 的转染效率^[23-25]. 当胆固醇的比值超过总载体材料组成的 25%, 载体在体内的透过性降低、循环时间提高^[26-27], 这是由于胆固醇的掺入增强了载体结构的刚性和稳定性^[22]. 另外, 胆固醇还有保护核酸物质不被 RNA 酶等降解的功能^[23-24]. 胆固醇在 siRNA 输送中所起的重要作用已被实验证明, 去除细胞膜上的胆固醇后, siRNA 不能被细胞摄取^[20]. 胆固醇与 siRNA 偶联促进了细胞摄取 siRNA, 提高了转染效率, 并减少了 siRNA 在血液中的降解^[25]. 研究表明, 胆固醇-siRNA 偶联物与血浆中的高密度脂蛋白(HDLs)或低密度脂蛋白(LDLs)结合, 将 siRNA 靶向输送到肝脏、肾脏等^[28]. 总之, 在 siRNA 输送中, 胆固醇可起到双重作用: a. 介导载体与细胞膜融合或通过内吞的方式进入细胞; b. 胆固醇还可起到一个靶向配基的作用.

2.3 siRNA 输送载体理化特性影响其体内分布和输送效率

大量的研究表明, 脂质的电荷和脂质/RNA 的比率对载体的形状、尺度有显著的影响, 进而影响细胞水平的转运及体内的行为, 并最终影响 siRNA 的生物学效能. 在低脂质/RNA 比率情况下, 形成的脂质复合物小于 200 nm, 稳定性较好, 载体带负电荷; 随着脂质/RNA 比率的提高, 中和过量的负电荷, 脂质复合物的大小约为 700 nm, 稳定性变差; 进一步提高脂质/RNA 比率, 又形成了稳定性好、小于 200 nm 的脂质复合物, 载体带正电荷^[18]. siRNA-脂质复合物的理化特性取决于脂质分子的结构, 不同的脂质分子在相似的脂质/RNA 比率下将自发形成不同形状和大小的纳米粒子^[29]. 为克服体内各种屏障并获得好的体内输送效果, siRNA 输送载体的粒子应小于 100 nm^[30]. 粒径为 150 nm 的带正电荷的脂质体静脉注射后, 前 1 h 主要分布在肺脏, 随后逐渐在肝中富集^[31]. 载体形状使其体内行为和细胞摄取效率有显著差异: 蠕虫状的聚合物胶束与其球形胶束相比, 体内循环时间提高了 10 倍, 促进了肿瘤细胞的摄取^[32].

3 结 论

脂质纳米输送载体是一种具有发展潜力的

siRNA 输送系统, 将在治疗性 siRNA 输送方面起到关键性的作用. 载体的设计必须考虑到分子尺度及介观分子尺度两个方面. 载体构筑的基本单元——脂质必须能够组装成稳定的输送系统, 核酸物质的装载不影响载体的稳定性. siRNA-脂质复合物的形成主要通过静电相互作用, 因此, 脂质的极性头部通常由带正电荷的胺基组成. 静电作用必须足够强以至于载体在运输过程中不释放 siRNA, 而载体到达治疗部位时, 载体需解聚释放出治疗活性物质——siRNA. 载体组装过程中也常常加入中性的脂质分子以降低带正电荷的脂质分子间的排斥增强载体的稳定性. 胆固醇的加入有利于脂双层的稳定并促进细胞对 siRNA 的摄取. 聚乙二醇化磷脂的 PEG 端暴露于脂双层的外围空间, 形成高度水化的保护层, 延长载体的循环时间并减少载体被网状内皮系统(RES)的摄取. 最后, 载体粒子的尺度应小于 100 nm, 以利于细胞的摄取和透过特定部位的血管开窗.

参 考 文 献

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281-297
- [2] Pillai R S, Bhattacharyya S N, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?. *Trends Cell Biol*, 2007, **17**(3): 118-126
- [3] Alvarez J P, Pekker I, Goldshmidt A, *et al.* Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell*, 2006, **18**(5): 1134-1151
- [4] Mantei A, Rutz S, Janke M, *et al.* siRNA stabilization prolongs gene knockdown in primary T lymphocytes. *Eur J Immunol*, 2008, **38**(9): 2616-2625
- [5] Shen L, Evel-Kabler K, Strube R, *et al.* Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. *Nat Biotechnol*, 2004, **22** (12): 1546-1553
- [6] Gary D J, Puri N, Won Y Y. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *J Control Release*, 2007, **121**(1-2): 64-73
- [7] Bartlett D W, Davis M E. Insights into the kinetics of siRNA mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(1): 322-333
- [8] Wolff J A, Rozema D B. Breaking the bonds: non-viral vectors become chemically dynamic. *Mol Ther*, 2008, **16**(1): 8-15
- [9] Torchilin V P, Papisov M I. Why do polyethylene glycol-coated liposomes circulate so long?. *J Liposome Res*, 1994, **4**(1): 725-739
- [10] Avnir Y, Ulmansky R, Wasserman V, *et al.* Amphipathic weak acid glucocorticoid prodrugs remote-loaded into sterically stabilized

- nanoliposomes evaluated in arthritic rats and in a Beagle dog: a novel approach to treating autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum*, 2008, **58**(1): 119–129
- [11] Lu J J, Langer R, Chen J. A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery. *Mol Pharm*, 2009, **6**(3): 763–771
- [12] Marsh M. *Endocytosis*. New York: Oxford University Press, 2001
- [13] Akinc A, Thomas M, Klibanov A M, *et al.* Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med*. 2005, **7**(5): 657–663
- [14] Sonawane N D, Szoka F C Jr, Verkman A S. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem*, 2003, **278**(45): 44826–44831
- [15] Zhang S, Zhao B, Jiang H, *et al.* Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *J Control Release*, 2007, **123**(1): 1–10
- [16] Malone R W, Felgner P L, Verma I M. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(16): 6077–6081
- [17] Weisman S, Hirsch-Lerner D, Barenholz Y, *et al.* Nanostructure of cationic lipid-oligonucleotide complexes. *Biophys J*, 2004, **87**(1): 609–614
- [18] Desigaux L, Sainlos M, Lambert O *et al.* Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(42): 16534–16539
- [19] Bouxsein N F, McAllister C S, Ewert K K, *et al.* Structure and gene silencing activities of monovalent and pentavalent cationic lipid vectors complexed with siRNA. *Biochemistry*, 2007, **46**(16): 4785–4792
- [20] Akinc A, Zumbuehl A, Goldberg M, *et al.* A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(5): 561–569
- [21] Mouritsen O G. *Life as a Matter of Fat. The Emerging Science of Lipidomics*. Berlin: Springer-Verlag. 2005
- [22] Umeda M, Nojima S, Inoue K. Effect of lipid composition on HVJ-mediated fusion of glycoporphin liposomes to erythrocytes. *J Biochem*, 1985, **97**(5): 1301–1310
- [23] Liu Y, Mounkes L C, Liggitt H D *et al.* Factors influencing the efficiency of cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**(2): 167–173
- [24] Liu Y, Liggitt D, Zhong W, *et al.* Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *J Biol Chem*, 1995, **270**(42): 24864–24870
- [25] Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 2004, **432**(7014): 173–178
- [26] Senior J, Gregoriadis G. Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components. *Life Sci*, 1982, **30**(24): 2123–2136
- [27] Mayhew E, Rustum Y M, Szoka F, *et al.* Role of cholesterol in enhancing the antitumor activity of cytosine arabinoside entrapped in liposomes. *Cancer Treat Rep*, 1979, **63**(11–12): 1923–1928
- [28] Wolfrum C, Shi S, Jayaprakash K N, *et al.* Mechanisms and optimization of *in vivo* delivery of lipophilic siRNAs. *Nat Biotechnol*, 2007, **25**(10): 1149–1157
- [29] Schiffelers R M, Mixson A J, Ansari A M, *et al.* Transporting silence: design of carriers for siRNA to angiogenic endothelium. *J Control Release*. 2005, **109**(1–3): 5–14
- [30] Li W, Szoka F C Jr. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm Res*, 2007, **24**(3): 438–449
- [31] Ishiwata H, Suzuki N, Ando S, *et al.* Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes. *J Control Release*, 2000, **69**(1): 139–148
- [32] Park J H, von Maltzahn G, Zhang L, *et al.* Magnetic iron oxide nanoworms for tumor targeting and imaging. *Adv Mater*, 2008, **20**(9): 1630–1635

Lipid-based siRNA Delivery Systems

DONG Wen-Juan, ZHOU Yin-Jian, LIANG Wei*

(Protein & Peptide Pharmaceutical Laboratory, National Laboratory of Biomacromolecules,
Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract RNA interference (RNAi) is a specific gene-silencing mechanism triggered by small interfering RNA (siRNA). The application of RNAi in the clinic requires the development of safe and effective delivery systems. Efforts have been dedicated to the development of lipid-based systems in siRNA deliveries. Many of the lipid-based delivery vehicles' self-assemble with siRNA are through electrostatic interactions with charged amines. Electrostatic interactions must be stable enough to sustain the nucleic payload in the carrier en route, but must allow dissociation, to execute therapeutic activity, at the delivery site. Internalization of lipid-based siRNA delivery systems into cells typically occurs through endocytosis; accordingly, delivery requires materials that can facilitate endosomal escape. The size of the carrier is important as carriers <100 nm in diameter have been reported to have higher accumulation levels in tumours, hepatocytes and inflamed tissue. To reduce RES uptake and increase circulation time, carriers have been modified on the surface with polyethyleneglycol. Herein, we review basic requirements for building lipid-based siRNA delivery systems.

Key words siRNA, lipid, carriers, siRNA delivery systems

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00190

*Corresponding author.

Tel: 86-64889861, E-mail: weixx@sun5.ibp.ac.cn

Received: April 17, 2012 Accepted: April 28, 2012