

细胞穿透肽及其结构改造在 siRNA 传递中的应用*

张洪杰^{1)**} 殷勤伟^{1, 2)}

(¹⁾ 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ²⁾ 北京军区总医院, 北京 100700)

摘要 小 RNA 药物应用于临床的主要技术瓶颈在于如何高效、低毒地将小 RNA 分子传递到它发挥功能的场所。基于细胞穿透肽在小 RNA 透皮给药的临床应用中所取得的进展, 本文系统评述了近年来细胞穿透肽在小 RNA 的体内、体外传递方面的研究动态, 分析了细胞穿透肽的结构改造对肽/小 RNA 复合物转染进入细胞发挥功能的影响, 展望了细胞穿透肽作为小 RNA 的体内药物传递载体的发展方向。

关键词 传递系统, 细胞穿透肽, 小 RNA, 结构修饰, 临床治疗

学科分类号 Q516, R915

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00052

发现于 20 世纪末的 RNA 干扰技术, 经历了 10 余年的快速发展, 不仅深刻改变了基因调控相关的生物学、基础医学的研究^[1-4], 同时也为现代制药业的变革提供了雄厚的技术基础。RNAi 技术被美国《科学》(Science)杂志评为 2001、2002、2003 和 2006 年的年度突破进展。2006 年该技术的发明者 Andrew F 和 Craig C M 被授予诺贝尔医学/生理学奖。目前国际上的各大制药企业都把小 RNA 技术以及小 RNA 药物作为新药研发的制高点并投入巨资给予支持。小 RNA 药物研发涉及多个领域, 与传统的小分子药物相比, 它具有作用机制明确、专一性好等优点, 与蛋白质药物相比, 它具有靶点范围更广的优势。尽管小 RNA 技术及小 RNA 药物研究热点不断, 但至今国际上仍没有一个基于小 RNA 干扰技术的药物上市。小 RNA 药物真正能够进入临床应用的主要技术瓶颈在于如何克服小 RNA 药物传递的困难。近来国内在研究开发小 RNA 美白工业品 Britena(柏尔婷娜)和 Cyidi(西缔)(江苏吉康生物技术有限公司网站 <http://www.gencon.cn>)的过程中, 筛选出高效低毒的多肽转染剂体系并获得成功, 显示出细胞穿透肽(CPPs)体系

在小 RNA 定向传递过程中的独特优势。系统分析 CPPs 的结构和对小 RNA 的传递效率之间的关系, 对于小 RNA 药物的研发和小 RNA 技术的应用具有重要的价值。

笔者以 NCBI 文献库数据为主, 通过主题词 Peptide, siRNA, delivery 搜索, 获得相关文献 754 篇, 剔除综述性文献后, 对每一篇文献根据文献摘要进行筛选, 对于仅从摘要不能断定的, 再参照正文, 剔除和 CPPs 无关的文章, 共获得有效文献 51 篇, 其年代分布自 2003 年至今(图 1), 呈现出不断增长的趋势, 反映出当前 CPPs 及其结构嵌合改造对小 RNA 的体外、体内传递的研究全貌。目前, 对其他小 RNA 传递体系, 如阳离子脂质体、阳离子纳米聚合物、环糊精衍生物等的研究仍然火热, 也有相关的传递体系进入临床实验的报道。相关的研究进展可参考有关综述性文章。

* 国家自然科学基金资助项目(81072558)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64837257, E-mail: hongjiezhang@yahoo.com

收稿日期: 2012-02-02, 接受日期: 2012-03-15

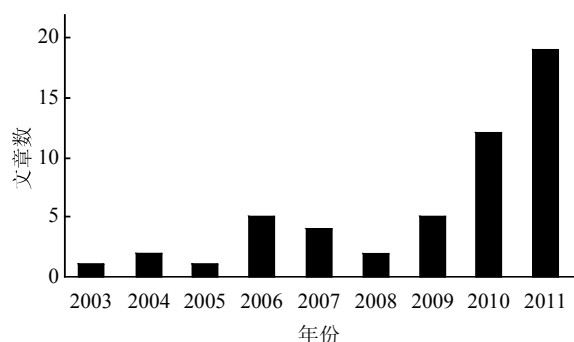


Fig. 1 Research publication numbers of cell penetrating peptides based small RNA transfection annually

图1 近年来细胞穿透肽转运小RNA研究的文章数与年度分布

1 CPPs 的发现及其在药物传递中的应用

20 世纪末人们发现某些蛋白质具有自发跨膜转运进入细胞的功能。对 HIV-1 病毒的 Tat 蛋白以及果蝇的触角足同源异型结构域蛋白的片段研究, 发现了氨基酸残基数为 10 到 16 的多肽片段具有上述跨膜功能, 并将这类肽称之为细胞穿透肽(CPPs)或蛋白质转导结构域(PTDs)。目前发现的 CPPs 数目仍在不断增长, Bolhassani^[5]在其综述中给出了已发现的主要 CPPs 的序列, 但对其细胞穿透功能研究主要集中在 Tat 肽以及触角足肽(penetratin)上。对 CPPs 传递小 RNA 的研究情况也类似, 只有 Tat 肽、MPG 肽和多聚精氨酸肽的研究最为深入。

已经发现的 CPPs 根据其电荷分布的不同可以分为两大类。一类可称之为阳离子 CPPs, 其短肽序列主要含有精氨酸、赖氨酸及组氨酸, 这类肽通过其正电荷与细胞膜上的负离子簇电荷相互作用, 采取一种非受体依赖的方式进入细胞。另一类为两性肽, 该肽同时具有亲脂性和亲水性尾部, 用于介导多肽转运通过细胞膜进入细胞。目前在 CPP 进入细胞的机制方面仍有不同的观点, 要形成一个能够被广泛接受的 CPP 介导的跨膜转运机制仍需要做大量的工作。

2 CPPs 的毒副作用

作为以临床应用为目标的 CPPs 研究, 人们首先关注的是这种阳离子性的多肽是否和聚合赖氨酸以及聚乙烯亚胺一样存在着显著的细胞毒性。最初

研究发现, Tat 肽能够间接导致神经毒性^[6-8], 但是随后几个独立的研究小组分别研究了不同长度的 Tat 肽的体内、体外毒性, 发现具有细胞膜转运特性最小肽结构的 Tat 肽, 即使在极端的条件下(100 mmol/L 的浓度下与细胞孵育 24 h)对 HeLa 细胞也没有可观察到的毒性^[9]。其他类似的研究也发现 Tat 肽对多种细胞显示出低的细胞毒性。使用不同的阳离子多肽, 如 Tat, Antp, Rev 和 VP22 对于 HeLa 或 Jakat 细胞在高达 20~30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下仍没有可观察的毒性。胆固醇类似物修饰的 9 聚精氨酸转染 siRNA 的研究发现在多肽的氮原子数与核酸的磷原子数之比(N/P)为 8~40 的范围内, 多肽对 293T 细胞没有显著可查的细胞毒性。CPPs 的低细胞毒特性为高剂量的小 RNA 转染提供了条件, 相对于病毒转染体系, 不仅具有安全性的优势, 而且能够将靶基因沉默得更加彻底, 在研究开发小 RNA 介导的细胞分化方面更容易获得高的转化率。

人们曾担心作为药物传递载体的多肽在体内会诱发免疫反应, 这会对随后的治疗带来显著的不良反应。然而我们的研究结果^[10]以及其他为数不多的研究^[11-12]表明至少某些 CPPs(如 Tat peptide, penetratin)具有避免诱导免疫反应的能力。CPPs 偶联药物的临床研究也支持这一理念。如 2003 年美国 CellGate 公司开发的多聚精氨酸偶联的环孢素已经进入 II 期临床研究, 日本 Kai Pharmaceuticals 公司开发的蛋白激酶 C-delta 肽抑制剂 -Tat 偶联物, KAI-9803, 于 2007 年进入 II 期临床。这些积极的研究成果表明机体具有对作为药物传递载体 CPPs 进行免疫性调控的可能性。

近年的研究显示出 CPPs 具有将核酸通过共价偶联或非共价结合等方式传递进入细胞的作用, 从而改变细胞/组织的基因表达。在病毒表达载体介导的基因治疗出现致癌性, 基因治疗研究一度遭受重挫之后, 人们对 CPPs 作为基因药物传递载体的研究兴趣剧增。CPPs 介导的小 RNA 治疗再次为基因治疗技术的临床应用提高了信心。

3 CPPs 传递小 RNA 的机制

关于 CPPs 的转运机制, 已经形成了两大基本假说。最先提出的一种假说认为, CPPs, 尤其是 Tat 肽和触角肽(Antennapedia), 能够通过非主动运输的方式通过细胞质膜, 聚合精氨酸、Transportan、MPG 肽以及 Pep-1 也具有这种性质。

另一种观点认为 CPPs 能够直接穿透脂质层。然而, 上述模型难于解释 CPPs 如何能够将颗粒大小为几十纳米到几百纳米的药物复合物传递透过细胞质膜。近年来, 开展了一系列对 CPPs/ 药物复合物转运细胞内定位的活细胞研究, 表明 CPPs/ 药物复合物转运进入细胞是多途径的, 但主要机制已经确定为细胞内吞作用介导的摄入机制。根据这一机制, CPPs, 尤其是具有正电荷数高的肽, 在穿透肽 / 小 RNA 复合物时首先和细胞表面的负电荷基团, 如硫酸乙酰肝素、唾液酸、磷脂酸等结合, 然后再通过脂筏、巨胞饮或依赖网格蛋白等途径进入细胞。区别 CPPs/ 小 RNA 复合物是否采用了细胞内吞机制的实验方法主要有低温、影响肽与细胞膜间静电作用的肝素以及几个和内涵体释放途径相关的抑制剂, 如细胞松弛素 B、巴弗洛霉素 A 和氯喹等对小 RNA 转染的影响。低温和抑制剂的存在能够显著抑制小 RNA 转染细胞的阳性率, 说明小 RNA 主要是通过细胞的胞吞作用机制进入细胞, 反之, 说明存在着其他的转运途径, 如 CPPs/ 小 RNA 复合物的直接转运机制等。文献中经常会遇到对同一穿透肽的研究得到不同的转运途径的报道, 这可能是由于不同的研究组采用的实验条件不同所致。值得指出的是小 RNA 转运进入内涵体 / 溶酶体中并不能发挥其生物功能, 只有再经内涵体 / 溶酶体逃逸进入细胞质之后才能够发挥其生物功能。

然而, 近年发现的新一类 CPPs——两性肽对小 RNA 的转运能够通过直接跨膜为主的传递模式, 将小 RNA 传递到细胞膜内, 为 CPPs 的药物传递机制研究带来新的方向。

两性肽研究最好的一个例子是多肽 CADY 转运小 RNA 的研究^[13-14]。CADY 本身没有二级结构, 但是小 RNA 以及磷脂单分子膜均能诱导 CADY 产生二级结构。膜天平研究显示 CADY 及其与小 RNA 的复合物具有对磷脂膜的结合与渗透作用。直接的证据来自 CADY/siRNA 复合物转染细胞的电镜结果。该结果显示, 在小 RNA 传递过程中没有观察到细胞膜的内吞作用, 但发现了 CADY/siRNA 复合物导致的细胞膜结构紊乱, 并在细胞浆中发现了游离的、不与膜相互作用的小 RNA。CPP 模拟肽的构效关系研究表明, 精氨酸与 6 个缬氨酸组成的精氨酸 - 缬氨酸小肽能与小 RNA 形成稳定的复合物, 并且精氨酸的数目为 3 时效果最好。模拟肽 R3V6 自身在水溶液中就能形

成胶束^[15], 而 R3V6 与小 RNA 的作用是通过静电相互作用并能被肝素竞争性结合而破坏。因此在多肽远远过量的条件下, 肽 - 小 RNA 复合物的疏水基团分布在复合体的外侧, 从而实现疏水基团的插膜效应, 直接转运小 RNA 进入细胞质中发挥生物功能。展示出 CPPs 的结构和功能研究在解决小 RNA 药物传递中的重要作用。

CPPs 转运小 RNA 作用机制的研究对于开发高效、低毒的 CPPs, 解决小 RNA 临床治疗遇到的困难具有重要的意义。小 RNA 诱导的基因沉默是发生在细胞质中的。被运载载体运送到细胞内的小 RNA 只有游离在细胞质中, 才能够被小 RNA 沉默复合体识别, 并与其序列互补的 mRNA 结合, 经 RNA 沉默复合体剪切发挥其小 RNA 的功能。储存于细胞内涵体 / 溶酶体中的小 RNA, 会被溶酶体内的酶降解, 无法发挥其生物功能; 只有通过某种作用使小 RNA 从内涵体中释放出来, 才能够发挥小 RNA 的基因沉默功能。研究小肽的结构以及小肽的修饰, 对于深入认识小肽传递小 RNA 的作用机制, 发展高效的小 RNA 基因药物传递体系具有重要的作用。

4 CPPs 的结构修饰与其小 RNA 传递功能的关系

在已经发表的文献中, 研究最多的 CPPs 结构是多聚精氨酸。短的多聚精氨酸本身传递小 RNA 的能力不够, 通常要有适当的疏水基团, 如 R3V6 肽通过 6 个疏水的缬氨酸使多肽具有疏水 - 亲水两性肽的性质^[15]。除此之外, 就是增加精氨酸肽链的长度, 如文献中报道比较多的七聚、八聚、九聚精氨酸肽, 甚至 12 聚的多聚精氨酸肽也能够将 siRNA 转染进入烟草悬浮细胞, 并发挥其小 RNA 的基因沉默功能。但是, 过长的聚合度会导致比较强的细胞毒性。还有将精氨酸与组氨酸组合形成复合多肽, 通过增强肽 / 小 RNA 复合物从内涵体逃逸的能力, 达到增强多肽对 siRNA 转染活性的目的^[16]。内涵体 / 溶酶体处于偏酸环境下容易破裂。由于组氨酸的等电点比较低($pK_a=6.3$), 富含组氨酸的肽能够缓冲氢离子浓度, 抑制氢离子泵的功能导致内涵体破裂或者发生内涵体的膜融合形成膜孔, 可以提高肽 / 小 RNA 复合物从内涵体逃逸进入细胞质的能力, 从而提高了多肽转染小 RNA 的基因沉默功能。其他研究小组采用类似的策略, 不同的肽结构也达到了类似的目的。例如 endoport 在中

性(pH 7.4)条件下不形成二级结构,但是在酸性条件下(pH 5.0 或 6.0)能够形成 α 螺旋^[17]. 该项工作的研究者采用了两种间接方法验证 endoporter 具有促进小 RNA 的内涵体逃逸功能. 一种分析是比较该肽对生物素化的牛血清白蛋白(b-BSA)的体内降解变化. 正常情况下 b-BSA 通过胞饮作用进入内涵体并进一步转运到溶酶体进行降解. 一旦 b-BSA 从溶酶体释放到细胞质中,降解就会停止. 另一个方法是以 HRP 作为报告探针研究 endoporter 导致的内涵体功能变化. HRP 探针是一项被广泛应用的酶标记技术. 该探针通过细胞膜流动相的内吞作用进入细胞,通过分析不同条件下从内涵体逃逸到细胞质中的酶活性,反映穿透肽促使 HRP 探针从内涵体逃逸的能力变化. 两种方法都支持 endoporter 具有增强小 RNA 的内涵体逃逸功能,并呈现出剂量依赖关系,而抑制剂巴弗洛霉素 A 的存在均能抑制 b-BSA 和 HRP 探针在细胞质中的分布强度. 多聚精氨酸上连接 pH 依赖的融合肽 GALA 后,也具有增强被传递小 RNA 从内涵体逃逸,进而提高小 RNA 传递效率的报道.

对聚合精氨酸进行疏水的硬脂酸共价修饰后,修饰肽对小 RNA 的转染功能更好,同时还有效地提高了多肽分子抗酶解性,提高修饰肽体内传递小 RNA 的能力. 修饰多肽的基团除了硬脂酸外,还有胆固醇,豆蔻酸以及人工设计的双壁或四壁伞型化合物等. 采用可降解的二硫键做为分子间连接链比不可降解的酯键具有更低的毒性. 对 Octa- 八聚精氨酸(R8)的酰基化研究为多肽的疏水性修饰能提高多肽的细胞转运功能提供了一个极好的结构模型^[18]. 研究发现,使用正己酸酰化 R8 时(C6R8),修饰多肽转染进入 HeLa 细胞的效率最高,降低(如正丁酸酰化)或增高(如正癸酸酰化)修饰基团的疏水性都会导致修饰肽运载进入 HeLa 细胞的效率降低,其转运效率分别为 C6R8 的 30%和 45%. 长链羧酸修饰导致 CPPs 的细胞毒性增加. 对聚合精氨酸及其修饰肽转运机制的研究发现,它们遵循相似的细胞转运机制,这包括大胞饮机制或其他 actin 驱动的内吞作用,以及低温下(如 4℃)可能存在的直接跨膜作用和膜电位对多肽的转运作用. 但是研究结果表明,增强 R8 的疏水性能够显著改变多肽和细胞膜的相互作用,导致修饰多肽更多地分布在细胞质中,而不是内涵体中,进而发挥被转运药物的生物功能. 最佳的细胞质分布需要修饰多肽的亲水性和疏水性之间取得微妙的平衡. 过低的疏

水性不能使 CPPs 有效地避免被内涵体化,过大的疏水性又易使修饰肽产生较大的毒性并发生聚合. 这一修饰的直接后果是增大了 CPPs 通过胞饮内吞后从内涵体逃逸的能力或者提高了该肽直接转运进入细胞质的能力. CPPs 疏水性增加使得该肽与两性肽的结构(如 CADDY)更接近,可以认为增强肽与细胞膜的相互作用能力、提高肽直接转运跨膜或者从内涵体逃逸的能力,是开发 CPPs 的一项重要指标. 遗憾的是,至今尚未开展系统的 CPPs 的结构、疏水-亲水指数和细胞转运功能/机制之间的理论研究. 对 CPPs 的结构改造研究尚处于瞎子摸象的阶段.

影响 CPPs/ 小 RNA 复合物体内、外转染效率的另一个因素是转染体系的颗粒大小. 多肽/小 RNA 复合物的粒度越小越有利于细胞对小 RNA 的摄入. 对 DNA 的转染发现,钙离子能够有效压缩 DNA 质粒的颗粒大小,提高 DNA 的转染效率. 对 Tat 肽及其二聚体与小 RNA 相互作用的研究发现^[19],在相同的 N/P 比的条件下(N/P 的比值在 6~33 之间),不含钙与钙离子浓度为 69.2 mmol/L 的条件下,复合物的粒径被压缩到不含钙离子时的 2.6%到 11.6%不等,进而形成粒径为 50 nm 的纳米颗粒,提高多肽对小 RNA 的传递作用,促进小 RNA 的基因沉默功能的实现,并且未发现存在短期体内毒性效果.

对聚合精氨酸结构改造的另一个方向是模仿 PEI 等阳离子聚合物的大分子结构特点,通过引入分子间的二硫键形成聚合肽,如通过二硫键聚合的 9 聚精氨酸^[20],达到高效传递小 RNA 进入细胞质的效果,这与激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)技术所观察到的结果一致. 而细胞内 GSH 维持的还原环境有利于二硫键的还原,促进小 RNA 释放进入细胞质发挥功能. 另外通过 CPPs 结构的重复形成更大的,能采用环境友好的细胞表达技术获得的克隆肽^[21]研究也是改造 CPPs 传递小 RNA 功能的一种方法.

5 CPPs 的靶向修饰

虽然 CPPs 体外能够传递包括小 RNA 在内的多种药物进入多种细胞,但是 CPP 体内运载药物的的问题却非常复杂,原因之一在于 CPP 缺乏对细胞/组织转染的专一性. 研究发现,CPP 能够将所传递的药物传递到身体的各个部位,并和给药的方式(静脉给药和腹腔腔内给药)无关,但口服给药

CPPs 不能将被传递药物运送到体内。Tat- 肽融合的 β - 半乳糖苷酶^[22]经腹腔注射给药后, 能够进入肺、肝、肾以及其他组织中, 甚至包括脑组织中。采用 Tat- 肽偶联的针对 p21 靶蛋白的抗体^[23]治疗移植性乳腺癌时发现, 静脉注射 48 h 后治疗抗体能够分布在实验小鼠的各种组织中, Tat 肽的存在对抗体在肿瘤组织中分布虽有一定的富集作用, 但是效果并不明显, 富集程度仅在 2 倍左右。发展细胞 / 组织靶向的肽融合技术可能是解决 CPPs 体内定向传递药物的一种有效方法。

细胞 / 组织靶向肽是一类能够通过内吞作用特异性地进入某一类细胞的小肽。发生这种细胞选择性的分子基础在于特定细胞中能几乎毫无例外地表达和细胞靶向肽专一结合的受体, 通过小肽和受体的相互作用, 诱导细胞的内吞作用。该策略已经用于多种疾病的临床治疗研究。研究最早、最广泛、深入的细胞靶向肽是 RGD 肽, 它可能是第一个发现的靶向肿瘤的肽。发现细胞靶向肽的方法主要有配体的结构和功能分析技术, 噬菌体展示技术以及化学策略技术等。有关方法可参阅相关的文献。

在 CPPs 传递小 RNA 方面, 细胞靶向肽的主要功能是提高小 RNA 的体内靶向特定组织的能力, 降低小 RNA 药物对正常组织的传递, 改善 CPPs 的小 RNA 传递能力和提高小 RNA 对治疗性靶基因的沉默能力。小 RNA 药物治疗的基本原理就是特异性地沉默病变组织中高表达靶基因的表达。但是这种高表达靶基因的分布是具有组织特异性的。例如 CREB1 基因在肿瘤组织的早期病变中会高表达, 因而有人认为 CREB1 可能是临床治疗肿瘤的一个有效靶基因。但是 CREB1 基因在神经组织中的表达在正常情况下就比较高。如果小 RNA 药物的传递缺乏组织特异性, 必然会造成对正常组织的伤害。

利用 CPPs 融合靶向肽传递小 RNA 进入特定组织的一个著名的例子就是 Kumar 等^[24]设计的 RVG-9dR 特异地将小 RNA 传递进入中枢神经组织发挥功能。与其他组织器官的毛细血管相比, 中枢神经组织的毛细血管缺少一般毛细血管所具有的孔, 或者这些孔既少且小。内皮细胞彼此重叠覆盖, 连接紧密, 能有效地阻止大分子物质从内皮细胞连接处通过。另外, 内皮细胞还被一层连续不断的基底膜包围着, 基底膜之外更有许多星形胶质细胞的血管周足(终足)把脑毛细血管约 85% 的表面包围起来。这就形成了脑毛细血管的多层膜性结构,

构成了脑组织的防护性屏障。药物, 尤其是基因药物体内穿透血脑屏障是药物传递的一个难点。通过立体定向外科给药技术将小 RNA 药物注射到中枢神经组织的缺点在于所注射的小 RNA 药物仅局限于给药部位附近, 不能有效传输到其他的治疗靶组织中。另外该方法对患者的损伤也比较大, 临床上难于推广使用。狂犬病毒糖蛋白(RVG)中的一段长度为 29 个氨基酸残基的多肽(RVG- 肽)具有竞争结合原代神经细胞 AchR 的能力, 静脉注射 RVG- 肽到实验小鼠体内, RVG- 肽能够穿透血脑屏障, 进入脑组织。通过融合九聚精氨酸, 该融合肽具备了结合小 RNA 的能力, 在肽 / 小 RNA 比为 10 : 1 时, 琼脂糖凝胶电泳迁移实验表明小 RNA 和 RVG-9dR 肽形成的复合物停留在电泳的上样孔处, 而 1 : 1 时小 RNA 的电泳迁移距离明显低于游离小 RNA 本身。RVG-9dR/siRNA 复合物能够高效转染进入神经细胞系 Neuro 2a, 但是却不能转染进入 HeLa 细胞, 一种比较容易被商业化核酸转染剂高效转染的细胞系, 表明在该融合肽中, 聚合精氨酸部分的功能主要是提供和小 RNA 结合的结合位点, 而 RVG 肽段的功能则是靶向结合神经细胞的特异表达受体 AchR, 通过受体结合刺激细胞内吞实现对小 RNA 的细胞内传递, 进入细胞质发挥小 RNA 的基因沉默功能。体内实验表明, RVG-9dR/siRNA 复合物通过静脉注射给药 10 h 后就能够从小鼠的脑组织中检测到外源小 RNA 的存在, 但在肝、脾等器官中检测不到外源小 RNA 的存在。对小 RNA 的基因沉默功能研究发现, 在连续 2 天给药, 每天 3 次的处理条件下, 小 RNA 也能够将脑组织中的靶基因(如 SOD1 基因)部分沉默, 其沉默效率在给药 2 天后达到最高, 此后小 RNA 对靶基因的沉默能力逐步减弱。上述研究结果对小 RNA 的体内定向给药研究具有重大的影响。其后, 该研究小组进一步研究了 RVG-9dR 传递系统运载小 RNA 治疗神经炎的可行性^[25]。研究者采用巨嗜细胞 / 小神经胶质细胞为模型, 发现 RVG-9dR 也能够将针对 TNF α 的小 RNA 传递到靶基因组织, 并将 TNF α 基因的表达显著下调。Pulford 等^[26]通过脂质体修饰等技术进一步改进 RVG-9dR 传递系统的体内稳定性。将小 RNA 和阳离子脂质体混合后再加入 RVG-9dR 制备得到的纳米颗粒 LSPC 能够显著提高小 RNA 和肽耐受血清的降解作用。该方法制备的小 RNA 纳米颗粒能够体内、体外均有效地沉默神经细胞中的 PrP 靶基

因, 并显示出比较好的组织选择性.

尽管人们通过各种修饰, 尝试将 CPP 用于肿瘤、神经退行性疾病等的小 RNA 治疗, 并在动物实验方面取得一定的进展, 但是迄今为止, 尚没有基于 CPP 载体的小 RNA 治疗的体内给药的临床应用研究. 这主要是因为药物在体内分布的特异性问题还没有从根本上解决. 我们在思考小 RNA 的体内给药途径问题上, 选取皮肤相关的疾病, 如色斑代谢异常症、银屑病, 通过局部给药, 达到小 RNA 给药的组织专一性, 使得小 RNA 的临床应用得以解决. 近年的研究发现, 有几个小肽具有穿透皮肤组织的能力, 如通过噬菌体展示技术发现 TD1^[27-28]和 space^[25]两个含有二硫键的小肽具有穿透皮肤组织的作用, 且对细胞的毒性均不显著. space 肽和小 RNA 共价偶联后能够将核酸传递到皮下组织. Song 等^[30-31]采用蛋白质的功能肽段筛选技术发现, 分布于 *Vibrio cholerae* 细胞壁 Zot 蛋白的 At1002 肽段具有可逆调节细胞间紧密连接的功能, 并能提高某些药物的传递作用. Uchida 等^[32-33]采用合成的六肽 At1002 以及 Tat- 肽共同与 siRNA 作用, 能够将小 RNA 药物透过模型动物的皮肤. 上述发现为小 RNA 的透皮给药奠定了基础.

作者所在的实验室利用融合肽技术设计、合成了能够有效地把 siRNA 传递透过皮肤的多肽 TD1-R8^[10], 该多肽是由具有透皮功能的多肽 TD1 和具有 siRNA 转染功能的精氨酸寡肽偶联在一起, 通过适当的辅料配伍, 将小 RNA si-MITF 做成霜剂涂于患者皮肤处, 达到将小 RNA 传递进入人体皮肤组织的目的. 荧光共聚焦显示, 绿色荧光标记的 TD1-R8 多肽将红色荧光标记的小 RNA 分子传递透入皮肤, 形成显著的绿色和红色叠加所形成的黄色, 显示出多肽纳米颗粒传递 siRNA 的良好性能. 临床试用的结果表明该小 RNA 及其传递系统能够有效消除病人的色斑. 在对 31 例试用研究的临床观察中, 使用该小 RNA 及多肽传递系统 12 周后有 6 例达到治愈的程度, 占 19.4%, 11 例达到色斑显著变轻, 占 35.5%, 11 例色斑变轻, 只有 3 例没有观察到对色斑的治疗作用, 总有效率达到 90.4%. 在临床试用的所有样本中, 没有发现 siMITF 霜剂导致色斑加重的情况和其他毒副效应, 该 siRNA 霜剂使用 4 周后开始起到使色斑皮肤变白的效果, 并随着该霜剂的进一步使用得到强化. 上述疗效比对照组(使用 10%的抗坏血酸-2-磷酸镁的涂剂作为对照在 25 例临床试用研究中, 有效

率为 20%)要高得多, 显示出 siRNA 技术在临床治疗中的优势.

6 展 望

多方面的研究已经表明, CPP 作为小 RNA 传递的一种新型传递系统, 具有开发成为多种小 RNA 传递辅助药物的潜质. 通过透皮给药方式治疗皮肤性疾病的方法已经获得了临床研究的确认, 对 CPP 作为一种新型、高效的小 RNA 传递辅助药物的开发起到了引领示范作用. 如何使 CPP 成为体内全身给药的治疗性小 RNA 的传递载体, 目前仍然是没有被突破的一个瓶颈问题.

一个理想的小 RNA 体内传递系统需要体内高的组织专一性, 在体内比较适当的稳定性和低毒性. 对 CPP 的结构选择和传递机制的研究, 以及对 CPP 组织专一性修饰等技术的深入研究为开发适合于体内给药的小 RNA 传递系统提供了条件. Crombez 等^[34]构建的两性融合肽 MPG8/PEP3 能够和小 RNA 形成稳定的纳米颗粒, 通过直接机制进入多种原代细胞和肿瘤组织并显示出没有任何毒副作用. 胆固醇能够被定向传递进入肝组织. Hayashi 等^[35]通过 CPP 的脂质体修饰技术, 使八聚精氨酸嵌合到富含胆固醇的脂质体纳米颗粒上, 静脉注射给药, 该纳米颗粒传递的小 RNA 主要分布在肝脏, 并能沉默其靶基因, 如 SR-BI 基因. 叶酸受体在大多数肿瘤组织中高表达, 是治疗肿瘤的一个有效靶点. 叶酸和 CPP 偶联从而提高被传递小 RNA 组织专一性的方法也被用来探索小 RNA 治疗肿瘤的可能性^[36]. 近来一条新的核酸传递途径用于实体瘤治疗的可行性正在被积极研究中. 该思路的核心是使 CPP 在正常组织中不被吸收, 而在呈酸性的实体瘤组织中 CPP 被激活而被高效吸收^[37]. 例如将透肽 TP10-5 中的所有赖氨酸替代成组氨酸后, 在 pH 6.0 的条件下能够进入细胞, 在 pH 7.4 的条件下, 该肽进入细胞的能力远远下降. 相反未改造的 CPPsTP10-5 在这两种环境中进入细胞的能力没有明显的差异. 利用该技术已经成功地将小分子药物 Camptothecin 定向传递进入酸性的实体瘤组织达到定向治疗的效果. 该技术也为小 RNA 体内传递技术的研究提供了新的思路. 此外 CPP 的 PEG 化脂质体有助于 CPP/小 RNA 复合物的稳定, 延长其在体内的存留时间.

总之, 如何克服小 RNA 体内传递的困难, 目

前尚未完全得到解决。然而, 笔者在皮肤疾患的 siRNA 传递体系的经验以及国际上对动物体内小 RNA 传递的研究表明, 通过适当的修饰方法和合适的靶向识别传递系统, 基于 CPPs 的 siRNA 体内给药, 在不远的将来会取得全面的成功。深入开展 siRNA 传递系统的研究, 尤其是特定靶向给药的传递系统研究是今后一个时期 siRNA 药物产业化的主要探索方向。

参 考 文 献

- [1] 汪进业, 蔡 荣, 罗本燕. MicroRNA 与神经系统重大疾病. 生物化学与生物物理进展, 2009, **36**(1): 25-32
Wang J Y, Cai R, Luo B Y. Prog Biochem Biophys, 2009, **36**(1): 25-32
- [2] 陈五军, 尹 凯, 赵国军, 等. MicroRNAs——脂质代谢调控新机制. 生物化学与生物物理进展, 2011, **38**(9): 781-790
Chen W J, Yin G, Zhao G J, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2011, **38**(9): 781-790
- [3] 郭维锐, 殷勤伟. siRNA 诱导的 DNA 甲基化与肿瘤的发生. 生物化学与生物物理进展, 2006, **33**(1): 10-16
Guo W R, Yin Q W. Prog Biochem Biophys, 2006, **33**(1): 10-16
- [4] 姜 琳, 潘淑娟, 葛郁芝, 等. Argonaute 亚族蛋白对人类肿瘤细胞周期的影响. 生物化学与生物物理进展, 2008, **35**(12): 1394-1402
Jiang L, Pan S J, Ge Y Z, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2008, **35**(12): 1394-1402
- [5] Bolhassani A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. Biochim Biophys Acta, 2011, **1816**(2): 232-246
- [6] Schroeder J A, Bitler B G. Anti-cancer therapies that utilize cell penetrating peptides. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2010, **5**(2): 1-10
- [7] King J E, Eugenin E A, Buckner C M, *et al.* HIV tat and neurotoxicity. Microbes Infect, 2006, **8**(5): 1347-1357
- [8] Weeks B S, Lieberman D M, Johnson B, *et al.* Neurotoxicity of the human immunodeficiency virus type 1 tat transactivator to PC12 cells requires the Tat amino acid 49~58 basic domain. J Neurosci Res, 1995, **42**(1): 34-40
- [9] Sabatier J M, Vives E, Mabrouk K, *et al.* Evidence for neurotoxic activity of tat from human immunodeficiency virus type 1. J Virol, 1991, **65**(2): 961-967
- [10] Yi X, Zhao G, Zhang H J, *et al.* MITF-siRNA formulation is a safe and effective therapy for human melasma. Mol Ther, 2011, **19**(2): 362-371
- [11] Akkarawongsa R, Cullinan A E, Zinkel A, *et al.* Corneal toxicity of cell-penetrating peptides that inhibit Herpes simplex virus entry. J Ocular Pharmacol Ther, 2006, **22**(4): 279-289
- [12] Park Y J, Chang L C, Liang J F, *et al.* Nontoxic membrane translocation peptide from protamine, low molecular weight protamine (LMWP), for enhanced intracellular protein delivery: *in vitro* and *in vivo* study. FASEB J, 2005, **19**(11): 1555-1557
- [13] Konate K, Crombez L, Deshayes S, *et al.*, Insight into the cellular uptake mechanism of a secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery. Biochemistry, 2010, **49**(16): 3393-3402
- [14] Rydström A, Deshayes S, Konate K, *et al.* Direct translocation as major cellular uptake for CADY self-assembling peptide-based nanoparticles. PLoS ONE, 2011, **6**(10): e25924. doi:10.1371/journal.pone.0025924
- [15] Ryu D W, Kim H A, Ryu J H, *et al.* Amphiphilic peptides with arginine and valine residues as siRNA carriers. J Cell Biochem, 2012, **113**(2): 619-628
- [16] Tanaka K, Kanazawa T, Ogawa T, *et al.* Disulfide crosslinked stearyl carrier peptides containing arginine and histidine enhance siRNA uptake and gene silencing. Int J Pharm, 2010, **398**(1-2): 219-224
- [17] Bartz R, Fan H, Zhang J, *et al.* Effective siRNA delivery and target mRNA degradation using an amphipathic peptide to facilitate pH-dependent endosomal escape. Biochem J, 2011, **435**(2): 475-487
- [18] Katayama S, Hirose H, Takayama K, *et al.* Acylation of octaarginine: Implication to the use of intracellular delivery vectors. J Control Release, 2011, **149**(1): 29-35
- [19] Baoum A, Ovcharenko D, Berkland C. Calcium condensed cell penetrating peptide complexes offer highly efficient, low toxicity gene silencing. Int J Pharm. 2011, doi:10.1016/j.ijpharm.2011.08.012
- [20] Won Y W, Yoon S M, Lee K M, *et al.* Poly(oligo-D-arginine) with internal disulfide linkages as a cytoplasm-sensitive carrier for siRNA delivery. Mol Ther, 2011, **19**(2): 372-380
- [21] Eguchi A, Meade B R, Chang Y C, *et al.* Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein. Nat Biotechnol, 2009, **27**(6): 567-571
- [22] Schwarze S R, Ho A, Vocero-Akbani A, *et al.* *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. Science, 1999, **285**(5433): 1569-1572
- [23] Hu M, Chen P, Wang J, *et al.* ¹²⁵I-labeled HIV-1 tat peptide radioimmunoconjugates are imported into the nucleus of human breast cancer cells and functionally interact *in vitro* and *in vivo* with the cyclindependent kinase inhibitor, p21(WAF-1/Cip-1). Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2007, **34**(3): 368-377
- [24] Kumar P, Wu H, McBride J L, *et al.* Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. Nature, 2007, **448**(7149): 39-43
- [25] Kim S S, Ye C, Kumar P, *et al.* Targeted delivery of siRNA to macrophages for anti-inflammatory treatment. Mol Ther, 2010, **18**(5): 993-1001
- [26] Pulford B, Reim N, Bell A, *et al.* Liposome-siRNA-peptide complexes cross the blood-brain barrier and significantly decrease PrP on neuronal cells and PrP in infected cell cultures. PLoS One, 2010, **5**(6): e11085. doi:10.1371/journal.pone.0011085
- [27] Chen Y, Shen Y, Guo X, *et al.* Transdermal protein delivery by a coadministered peptide identified *via* phage display. Nat

- Biotechnol, 2006, **24**(4): 455–460
- [28] Lin C M, Huang K, Zeng Y, *et al.* A simple, noninvasive and efficient method for transdermal delivery of siRNA. Arch Dermatol Res, 2011, DOI 10.1007/s00403-011-1181-5
- [29] Hsu T, Mitragotri S. Delivery of siRNA and other macromolecules into skin and cells using a peptide enhancer. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, **108**(38): 15816–15821
- [30] Song K H, Fasano A, Eddington N D. Effect of the six-mer synthetic peptide (AT1002) fragment of zonula occludens toxin on the intestinal absorption of cyclosporin A. Int J Pharm, 2008, **351**(1–2): 8–14
- [31] Song K H, Fasano A, Eddington N D. Enhanced nasal absorption of hydrophilic markers after dosing with AT1002, a tight junction modulator. Eur J Pharm Biopharm, 2008, **69**(1): 231–237
- [32] Uchida T, Kanazawa T, Kawai M, *et al.* Therapeutic effects on atopic dermatitis by anti-RelA short interfering RNA combined with functional peptides Tat and AT1002. J Pharmacol Exp Ther, 2011, **338**(2): 443–450
- [33] Uchida T, Kanazawa T, Takashima Y, *et al.* Development of an efficient transdermal delivery system of small interfering RNA using functional peptides, Tat and AT-1002. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2011, **59**(2): 196–201
- [34] Crombez L, Morris M C, Heitz F, *et al.* A non-covalent peptide-based strategy for *ex vivo* and *in vivo* oligonucleotide delivery. Methods Mol Biol, 2011, **764**: 59–73
- [35] Hayashi Y, Yamauchi J, Khalil I A, *et al.* Cell penetrating peptide-mediated systemic siRNA delivery to the liver. Int J Pharm, 2011, **419**(1–2): 308–313
- [36] Cheng C J, Saltzman W M. Enhanced siRNA delivery into cells by exploiting the synergy between targeting ligands and cell-penetrating peptides. Biomaterials, 2011, **32**(26): 6194–6203
- [37] Zhang W, Song J, Zhang B, *et al.* Design of acid-activated cell penetrating peptide for delivery of active molecules into cancer cells. Bioconjug Chem, 2011, **22**(7): 1410–1415

The Effects of Cell Penetrating Peptides Structure Modification on Their siRNA Delivery Function *in vitro* and *in vivo**

ZHANG Hong-Jie^{1)**}, James Q Yin(YIN Qin-Wei)^{1,2)}

⁽¹⁾ Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ⁽²⁾ Beijing Military General Hospital, Beijing 100700, China)

Abstract The less of high efficient carriers to deliver siRNA drugs into their targeted tissues/cells with less toxicity are the major obstacles of siRNA pharmaceuticals in clinic application. The recent advance of siRNA delivery research based on cell-penetrating peptides (CPPs) in clinic opened the way of siRNA techniques for therapeutic application (Yi *et al.*, Mol Ther (2011)19, 362–371). CPPs are short amphipathic and cationic peptides that are rapidly internalized across cell membranes. They can be used to deliver molecular cargos, such as imaging agents (fluorescent dyes and quantum dots), drugs, liposomes, peptide/protein, oligonucleotide/DNA/RNA, nanoparticles and bacteriophage into cells. The mechanism of cellular uptake and subsequent processing still remains controversial. It is now clear that CPP can mediate intracellular delivery *via* both endocytic and non-endocytic pathways. In this review, we discuss potential functions of CPPs, especially in structure modified CPPs for small RNA delivery *in vitro* and *in vivo*, highlighting their powerful promise for clinical efficacy.

Key words delivery system, cell penetrating peptides, small RNA, structure modification, therapeutic application
DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00052

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81072558).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64837257, E-mail: hongjiezhang@yahoo.com

Received: February 2, 2012 Accepted: March 15, 2012