

# 纳米包被 siRNA 复合体在抗癌治疗中的应用\*

孙茂钢<sup>1</sup>, 邓 雯<sup>1</sup>, 赵厚育<sup>2\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附院 耳鼻咽喉科, 贵州 贵阳 550004)

[关键词] 乙烯亚胺-四氧化三铁; 磁性纳米粒; 基因转染; 鼻咽癌; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 信使 RNA

[中图分类号] R34-33; R739.6 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2016)04-0373-04

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是在研究新小杆线虫双链 RNA(double strand RNA, dsRNA)介导的基因出现表达抑制时首次被发现的,但由于这样的基因沉默是系统性的,当时有假设 RNAi 的效应是由一些稳定的中间媒介所调控的<sup>[1]</sup>,后来才有更进一步的研究发现了这些中间媒介,例如 dicer 酶和 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)<sup>[2]</sup>,RISC 是由一系列蛋白和 siRNA 小分子组成的化合物,其中高度保守的 Argonaute 蛋白 AGO2 是组成 RISC 酶促反应的中心。双链互补的 siRNA 和信使 RNA(message RNA, mRNA)的相互作用构成了 RNAi 的核心内容<sup>[3]</sup>。裸 siRNA 因其物理化学的一些特性限制了其在临床中的应用,近年来人们发现纳米颗粒包被的 siRNA 弥补了裸 siRNA 的不足,且进一步临床试验逐渐展开,本文对纳米包被 siRNA 复合体在抗肿瘤治疗中的应用进展进行报道。

## 1 siRNA 的特点

基因沉默的发生主要通过两个阶段来实现,即转录后基因沉默(Post-transcriptional Gene Silencing, PTGS)和转录基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS)<sup>[1,4]</sup>。PTGS 的机制主要分为两类,直接的序列特异性切割以及 RNA 降解。siRNA 和目的 mRNA 序列的完美互补会引发由 RISC 介导的序列特异性的切割,通过 RNA 降解而引起的转录抑制通常由多种 miRNA 调节,且当 siRNA 和靶 mRNA 的序列并不完全互补时,通过这一机制也可引起基因沉默效应<sup>[5]</sup>。siRNA 可以被转染到细胞中并结

合到 RISC 的发夹结构上而启动 RISC 导致基因沉默的机制,即作为向导帮助识别所要沉默的目标基因序列<sup>[5]</sup>。人工合成的 siRNA 大约有 22 个核苷酸,在其 3'端挂有二核苷酸模拟 dicer 酶切产物,以便更好的与 RISC 结合。人工合成的 siRNA 因其提升了基因沉默的稳定性与沉默效率,加之化学合成 siRNA 过程中可以人为设计从而避免免疫原性以及降低与 mRNA 的错配,使 siRNA 应用到基因治疗中一直被看好<sup>[5-6]</sup>。由于 RNAi 的这些特性,近年来越来越多的用于癌症的基因治疗,例如靶向沉默一些导致细胞无限增殖的基因,如周期蛋白依赖性蛋白激酶(cyclin dependent kinases, CDKs)、胰岛素样生长因子(insulin growth factor, IGF)、血管生成因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和诸多抗凋亡的因子。

## 2 纳米粒及其与 siRNA 结合的优势

纳米粒是直径在 1~100 nm 之间不等的原子或小分子聚合而成<sup>[7]</sup>,纳米粒作为载体最有优势的地方在于其无免疫原性<sup>[8]</sup>。通常纳米颗粒分为:无机纳米颗粒和有机纳米颗粒两大类。但是无机纳米颗粒常常包裹着有机材料,就像上述的为了提升纳米颗粒水溶性而加载的多聚体。另外也有不同于此两类的纳米颗粒的存在,此类纳米颗粒通常是复杂的多种多聚体聚合而成,同时兼有无机纳米颗粒和有机纳米颗粒的特征<sup>[9-10]</sup>。一些纳米颗粒的轭合物,例如 SMANCS(styrene maleic acid neocarcinostatin)在小鼠中发现其具有多种免疫调节的作用,它能刺激巨噬细胞的生成,而巨噬细胞

\*[基金项目]国家自然科学基金地区科学基金项目(NO. 81260353)

\*\*通信作者 E-mail: zhaohouyujia@163.com

网络出版时间:2016-04-20 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160420.1746.004.html>

的增多一方面可使体内干扰素  $\gamma$  的产生增多,另一方面使自然杀伤(natural killer, NK)细胞增多,这两者的升高使体内抗肿瘤免疫机制得到更进一步的活化。纳米颗粒中的一类阴离子聚合物亦有报道称其具有介导干扰素类和多种细胞因子的生成。因其特性,纳米颗粒也可选择性的穿过肿瘤细胞膜进入且在其中聚集。这种选择性赋予了纳米颗粒在体内研究具有独特的优点,在最小程度降低副作用的情况下提高转染的效率,且在转染后通过一定的手段能够定位纳米颗粒从而在体内研究中追踪所转染 siRNA 或传送药物的位置<sup>[11]</sup>。

裸 siRNA 因其物理化学的一些特性限制了其在临床中的应用,siRNA 的大分子量加之其多阴离子的特性使其不易被细胞被动摄取,细胞外的屏障更加大了 siRNA 进入细胞的难度<sup>[9]</sup>,较差的水溶性很大程度的限制了新兴药物在临床上的应用,siRNA 和具有水溶性的纳米颗粒结合以后能够借助其获得相应程度的水溶性。另一方面,许多纳米颗粒的疏水性也可以通过连接一个亲水的多聚体得到解决。这能够改善纳米颗粒的稳定性,从而使 siRNA 的应用可以在小肠和口腔能够被更好的吸收<sup>[11]</sup>。

要将完整的 siRNA 通过静脉注射进入体内而实现沉默靶基因的作用必须借助纳米颗粒等保护 siRNA,使 siRNA 免受血浆核酸酶的降解从而有效及高效的将 siRNA 导入体内。裸 siRNA 在血浆核酸酶的作用下,30 min 即可完全降解,提示将 siRNA 包裹到惰性的纳米颗粒中即可使 siRNA 免受机体血浆核酸酶的作用<sup>[3,12]</sup>。机体的固有免疫系统负责识别和清除就像纳米颗粒这类的进入机体的外来物质。单核巨噬细胞系统(mononuclear phago-cyte system, MPS)包绕在器官如肝、脾、肾的周围,MPS 对纳米颗粒在体内的药物代谢动力学起到了决定性的作用。肝脏就像一个筛子,利用其富集着单核细胞或巨噬细胞的区域过滤血液以及清除细胞碎片、细菌或者就像纳米颗粒这样的外来小分子,肾脏则帮助清除这些肝脏过滤后的物质。要避免肝脏的代谢需要在纳米颗粒上进行一些调整,例如药物蛋白修饰,将聚二乙醇分子 PEG 附着到所治疗的蛋白上(PEGylation),再附着到纳米颗粒上即可降低肝脏对纳米颗粒的识别和过滤同时增加纳米颗粒在体内的半衰期。要避免肾脏的清除需要在纳米颗粒的粒径及电荷上做调整,纳米粒径大于 8 nm 且带有较多阴离子的颗粒比较不容易

从肾脏中排泄<sup>[3,13]</sup>。另外,带有配合基的纳米颗粒能够更好的进行识别,使 siRNA 导入到肿瘤细胞中<sup>[14]</sup>。

作为将 siRNA 导入细胞或体内的载体介质,不管其在细胞层面或是全身系统性的引起不可接受的毒性反应都会被排除作为基因治疗载体的可能性。细胞毒性可以通过染色的实验结果得以鉴别,根据活细胞的数量,染色后可判断载体给细胞带来多少程度的毒性<sup>[15-16]</sup>。过去常用来投递 siRNA 的载体为病毒载体,但是病毒载体可刺激机体对其的免疫反应从而带来一系列细胞毒性,后来人工合成的脂类以及纳米多聚体类载体才被设计用来替代病毒作为将 siRNA 投递到细胞内或者体内的介质。机体可通过生物降解将大分子多聚体类物质分解并排泄,正是由于这种生物降解的能力,带有连杆结构的大分子聚合物可以被分解从而降低其产生的细胞毒性,壳聚糖多聚体纳米颗粒在体内的生物降解就是其中一个例子<sup>[4]</sup>。内吞运动是真核生物中通过质膜变形内陷而将外来物质运入细胞内的过程,外源物质进入细胞内的经典的路径是通过受体配体识别而进入,进入细胞内的物质会被内涵体捕获,继而被溶酶体所分泌的酸性物质进一步降解。溶酶体中的酶一旦释放,siRNA 即会被降解。所以找到一种替代方法,使纳米颗粒进入细胞时避开这种通路是很有必要的,其中一种不同于受体介导的内吞作用为胞饮作用,胞饮虽然为非特异性的,但通过这种途径进入细胞内的纳米颗粒可以避免溶酶体分泌的酸性物质对其的降解<sup>[17-18]</sup>。

### 3 纳米包被 siRNA 复合体在临床实验中的研究进展

I 期临床实验包括初步的临床药理学、人体安全性评价试验及药代动力学试验,为制定给药方案提供依据。包括耐受性试验:初步了解试验药物对人体的安全性情况,观察人体对试验药物的耐受及不良反应。药代动力学试验:了解人体对试验药物的处置,即对试验药物的吸收、分布、代谢、消除等情况。II 期临床实验为治疗作用初步评价阶段,其目的是初步评价药物对目标适应症患者的治疗作用和安全性,也包括为 III 期临床试验研究设计和给药剂量方案的确定提供依据。III 期临床实验为治疗作用确证阶段,其目的是进一步验证药物对目标适应症患者的治疗作用和安全性,评价利益与风险

关系,最终为药物注册申请的审查提供充分的依据。Ⅳ期临床实验是为新药上市后由申请人进行的应用研究阶段,其目的是考察在广泛使用条件下的药物的疗效和不良反应、评价在普通或者特殊人群中使用的利益与风险关系以及改进给药剂量等。作为一种新兴科技,siRNA 以一种空前的速度进入了临床实验的研究中。尽管许多抗肿瘤的新型药物尚不能进入日常临床应用中,还是可以看到一些令人欣慰的新药物的出现,拮抗 bcl2 基因的小片段序列虽然因为可能治疗效率不高未通过美国食品药品监督管理局的批准进入临床实验,但其在治疗慢性淋巴性白血病中仍然是一个十分有前景的治疗备选<sup>[3]</sup>。环式糊精在临床上的应用研究已经到了临床 I ~ II 期实验,CALAA-01 是第一个在人类身上运用纳米颗粒包被 siRNA 系统使用的环式糊精多聚体复合物,I 期临床实验主要应用在实体瘤病人身上,具体来说就是将拮抗核糖核酸还原酶亚单位 M2(RRM2)的 siRNA 包被到纳米颗粒中经静脉注射到病人体内,从而启动内源性 RNAi 机制而使靶基因的 mRNA 水平下降<sup>[19]</sup>。如今,CALAA-01 的 I 期临床实验已经进行到安全性研究及对人体合适剂量的选择<sup>[20]</sup>。

细胞毒性是此类治疗载体在应用到临床之前最重要的评估因素。在小鼠模型中,一些炎症趋化因子如白介素 6、白介素 12 及  $\gamma$  干扰素,以及肝毒性标志物例如天冬氨酸转氨酶及丙氨酸转氨酶被用来衡量纳米颗粒进入机体可能带来的毒性反应。纳米颗粒包被的沉默 GC4 基因的 siRNA 复合体的体内实验中,所测试到机体中白介素 6、白介素 12 及  $\gamma$  干扰素并未有统计意义上的提高,且天冬氨酸转氨酶及丙氨酸转氨酶相比于未处理组来说也未有提高<sup>[21-22]</sup>。为了了解纳米颗粒应用到体内实验的治疗结果,在肺癌小鼠模型上进行了实验,一组为纳米颗粒包被的干扰 siRNA 为实验组,纳米颗粒包被的对照 siRNA 为对照组,连续的静脉注射到小鼠体内。当纳米颗粒包被的干扰 siRNA 持续注射到小鼠体内后,恶性细胞的生长被抑制,观察到小鼠肺中的恶性结节停止了生长,与对照组相比,肿瘤的直径缩小了约 30%。苏木精伊红染色也确定了实验组的小鼠肺中恶性细胞数减少,肿瘤大小比对照组小,且具有统计学意义<sup>[21-22]</sup>。亦有另外的体内实验同样用来验证纳米颗粒包被的 siRNA 在体内的治疗效果,抗凋亡基因 Birc5 是编码凋亡抑制家族中一员 Survivin 的其中一个基因,

将沉默 Birc5 的 siRNA 包被到纳米颗粒中注射到体内,通过 RT-PCR 检测 Survivin 的 mRNA 表达量比对照组低 97.2%,另外,与肿瘤相关的凋亡及细胞坏死都显著低于对照组。静脉注射有机纳米颗粒包被 10mg siRNA 到前列腺肿瘤模型的小鼠中,观察到肿瘤大小减小了约 92%<sup>[3,23]</sup>。将沉默 bcl2 基因家族成员的 siRNA 包被到聚乙烯乙二醇(PEG)纳米颗粒中静脉注射到体内,观察到肺部肿瘤的生长被抑制了 40% ~ 65%<sup>[24]</sup>。静脉注射包被了拮抗血管生成因子 VEGF 的 siRNA 的纳米颗粒后,前列腺的皮下肿瘤体积缩小了 53% ~ 87%<sup>[25]</sup>。

## 4 纳米粒在临床应用中的缺陷

过多的生物积累是限制纳米颗粒作为载体在体内甚至在临床应用中受到限制的因素之一。要减少或避免生物积累需要对其半衰期以及所使用的多聚体的代谢途径有深入了解。纳米颗粒中所使用的基本的多聚体单元需要保证能够被生物降解或者大小要比肾脏分泌阈值( $< 40$  kDa)更小。纳米颗粒中若使用的是疏水性的多聚体,则其通常会通过胆汁分泌而被排泄出体外,当然,也不能忽略这一类的多聚会因为皮下脂肪的存在而长期存留于皮下。因此,在使用纳米颗粒作为载体时,运用哪一种多聚体及用量是值得深思熟虑的<sup>[11]</sup>。

携带抗癌药物或基因小片段的纳米载体在进入体内后,可能如同石棉一般引起机体的间皮瘤,这是因为其所携带的抗癌小片段在有水的情况下,包括血浆以及组织液等,会产生含氧自由基。另外,通过静脉注射进入体内的纳米颗粒因其物理特性及人体解剖特点,会存留在肺中。当然,前述只是为个别例子,仍然有大量可人工合成的安全的多聚体可作为合成纳米颗粒的备选,但无疑,在进一步发展纳米颗粒作为载体在体内的应用时,需要考虑它的最终代谢途径以及纳米颗粒进入机体后所存留的部位<sup>[11,26]</sup>。

## 5 展望

尽管 siRNA 是相对比较新的技术,但已被验证其可以用来作为大批疾病的治疗方案之一;尽管 siRNA 作为治疗方法许多难题已被攻克,但在其可以应用到日常临床治疗方案的路上仍有许多困难

需要被克服。以 siRNA 为基础的治疗能应用到体内,则其转载体所要达到的终极目标是安全性、有效性、可靠性,熟知纳米颗粒的特性及其在机体中的运行代谢方式,无疑可以为推进 siRNA 在体内的应用添砖加瓦。

## 6 参考文献

- [1] Dogini DB, Pascoal VD, Avansini SH, et al. The new world of RNAs[J]. Genet Mol Biol, 2014(Suppl 1):285-293.
- [2] Sen GL, Blau, HM. A brief history of RNAi: the silence of the genes[J]. FASEB, 2006(9):1293-1299.
- [3] Resnier P, Montier T, Mathieu V, et al. A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer[J]. Biomaterials, 2013(27):6429-6443.
- [4] Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics[J]. Nature, 2009(7228):426-433.
- [5] Patil VS, Zhou R, Rana TM. Gene regulation by non-coding RNAs[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2014(1):16-32.
- [6] Pai SI. Prospects of RNA interference therapy for cancer[J]. Gene Ther, 2005(6):464-477.
- [7] Huang C. Role of nanoparticle geometry in endocytosis: laying down to stand up[J]. Nano Lett, 2013(9):4546-4550.
- [8] Uchino K, Ochiya T, Takeshita F. RNAi therapeutics and applications of MicroRNAs in cancer treatment[J]. Jpn J Clin Oncol, 2013(6):596-607.
- [9] Braakhuis HM, Park MV, Gosens I, et al. Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation[J]. Part Fibre Toxicol, 2014(18):1-25.
- [10] Tomalia D. In quest of a systematic framework for unifying and defining nanoscience[J]. J Nanopart Res, 2009(6):1251-1310.
- [11] Greish K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines[J]. J Drug Target, 2007(7-8):457-464.
- [12] Felice B. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective[J]. Mater Sci Eng, 2014(2):178-195.
- [13] Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats[J]. Nanomedicine, 2008(5):703-717.
- [14] Lian N. Application of dithizone-modified TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the preconcentration of trace chromium and lead from sample solution and determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry[J]. Microchim Acta, 2005(1-2):81-88.
- [15] Katas H, Alpar HO. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery[J]. J Control Release, 2006(2):216-225.
- [16] Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery[J]. Nat Rev Drug Discov, 2009(2):129-138.
- [17] Nam HY, Kwon SM, Chung H, et al. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles[J]. Control Release, 2009(3):259-267.
- [18] Oh N, Park JH. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells[J]. Int J Nanomed, 2014(Suppl. 1):51-63.
- [19] Guzman-Villanueva D, El-Sherbiny IM, Herrera-Ruiz D, et al. Formulation approaches to short interfering RNA and MicroRNA: challenges and implications[J]. J Pharm Sci, 2012(11):4046-4066.
- [20] Zuckerman JE. Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014(31):11449-11454.
- [21] Chen Y, Zhu X, Zhang X, et al. Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy[J]. Mol Ther, 2010(9):1650-1656.
- [22] Bhujbal SV, de Vos P, Niclou SP. Drug and cell encapsulation: alternative delivery options for the treatment of malignant brain tumors[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2014(2):142-153.
- [23] Gillespie, David L. RNA interference targeting hypoxia-inducible factor 1 via a novel multifunctional surfactant attenuates glioma growth in an intracranial mouse model[J]. J Neurosurg, 2015(2):331-341.
- [24] Simasi J. The role of BIM-EL and BCL2 on the efficacy of erlotinib and gefitinib in lung cancer[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2015(10):64-68.
- [25] Bachelier R, Confavereux CB, Peyruchaud O, et al. Combination of anti-angiogenic therapies reduces osteolysis and tumor burden in experimental breast cancer bone metastasis[J]. Int J Cancer, 2014(6):1319-1329.
- [26] Iyer AK, Khaled G, Fang J, et al. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting[J]. Drug Discov Today, 2006(17-18):812-818.

(2016-01-12 收稿, 2016-04-05 修回)

编辑: 刘平