

基于DNA纳米结构的siRNA输送体系的研究进展

薛晗, 高西辉, 张川*

上海交通大学化学化工学院, 金属基复合材料国家重点实验室, 上海 200240

* 联系人, E-mail: chuanzhang@sjtu.edu.cn

2018-08-30 收稿, 2018-11-29 修回, 2018-11-29 接受, 2019-01-25 网络版发表

国家重点研发计划(2015CB931801)、国家自然科学基金(21504053, 21661162001, 21673139, 91527304, 51690151, 51473093)、上海健康医学院协同创新重点专项(SPCI-17-15-001)和上海交通大学&附属第六人民医院南院精准医学联合研究中心合作基金(IPFM2016B001)资助

摘要 随着多个功能性核酸药物获得FDA的批准, 基因治疗近年来取得了长足的进步, 迸发了新的青春. 小干扰核糖核酸(siRNA)是基因治疗的核心成员, siRNA的高效递送则是其临床转化的关键. 不同于传统阳离子脂质体、聚合物等通过静电相互作用实现siRNA的负载压缩形成纳米递送体系, DNA纳米结构通过核酸亲和杂化作用负载功能性核酸, 实现siRNA的递送和相应的基因治疗. 本文简要回顾了siRNA在基因沉默过程中的功能和机制, 介绍了DNA纳米结构作为载体用于功能性核酸递送的基本原理和优缺点, 进而详述了几类具有特色的DNA纳米结构用于siRNA递送系统, 最后探讨了现有技术存在的挑战, 并对本领域的发展做了进一步展望.

关键词 基因治疗, siRNA, DNA 纳米结构, 基因载体

众所周知, 大多数疾病的发生与对应细胞基因的变异息息相关. 因此通过调控疾病相关基因的表达可有效干预疾病的发生和发展, 成为相关疾病治疗的有效方式. 基因沉默是基因治疗方法中的一种, 通常指通过抑制某些基因的过度表达从而达到治疗疾病的目的. 基因沉默根据其作用机制被分为发生在转录水平的基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS)以及转录水平之后的基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)^[1]. 发生在RNA水平上的PTGS相较于DNA水平上的TGS更普遍, 是目前研究的热点之一. 其中利用短链RNA实现RNA水平上的基因沉默通常被称为RNA干扰技术^[2](RNAi), 由Fire和Mello课题组^[3]于1998年在秀丽隐杆线虫(*C. Elegans*)中首次发现, 是一种由双链RNA诱发同源mRNA降解的现象. 早期研究中人们发现当外源性双链基因(dsRNA)进入细胞转录时会被核酸内切酶Dicer剪切成具有特定长度的短链RNA, 即小干扰

RNA^[4](siRNA, 图1(a)). 切割得到的siRNA可被胞质内的解旋酶解链成正义链和反义链, 其中正义链被切割成碎片, 而反义链与细胞内含有各种核酸酶的RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)^[5,6]结合, 并与其靶向的mRNA特异性结合, 诱发mRNA的高效切割和降解, 进而抑制蛋白的表达(图1(b)). 除了上述调控机制外, 反义链核酸还可通过空间位阻效应调控基因的转录, 实现RNA前体的选择性剪接、抑制蛋白的翻译^[5]. 作为基因特异性识别的向导, siRNA在RNA干扰过程中起着举足轻重的作用^[7].

根据其作用机理, Elbashir进一步指出将切割好的siRNA序列直接引入细胞可以避免Dicer酶催化反应, 从而达到更好的基因沉默效果^[8]. 目前siRNA治疗通常递送的序列是由21~23碱基的双链RNA组成的功能性核酸分子^[9,10], 无需Dicer酶进行剪切. 短链的siRNA可由固相合成方便地制备并且化学合成的

引用格式: 薛晗, 高西辉, 张川. 基于DNA纳米结构的siRNA输送体系的研究进展. 科学通报, 2019, 64: 1053–1066

Xue H, Gao X H, Zhang C. DNA nanostructure-based siRNA delivery systems (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 1053–1066, doi: 10.1360/N972018-00893

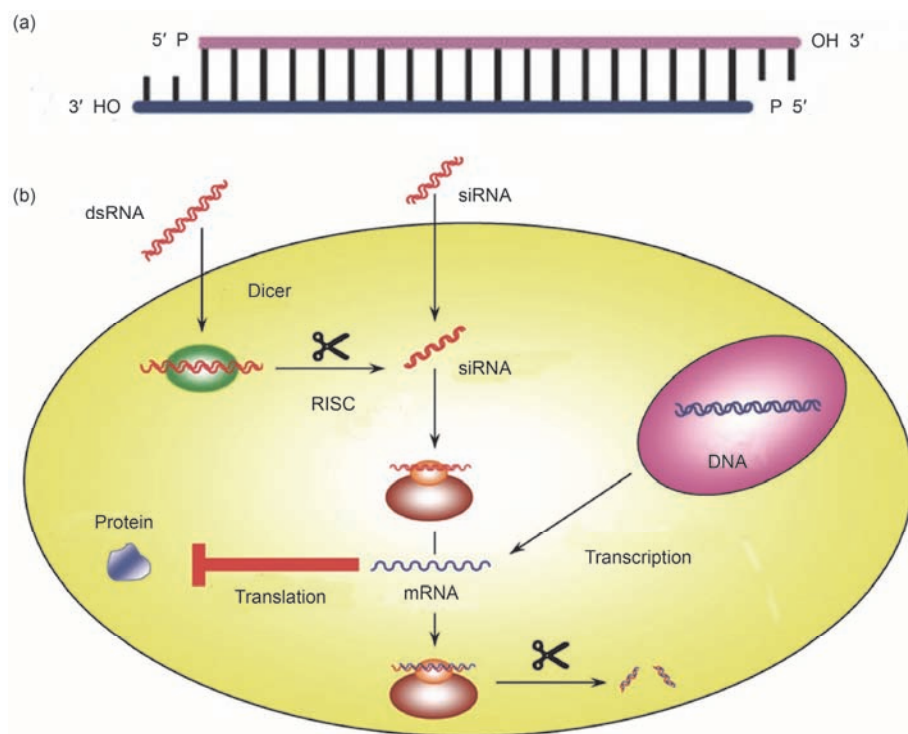


图1 (网络版彩色) siRNA结构及其调控基因表达的机制. (a) siRNA结构^[4]; (b) RNAi干扰机制^[5]

Figure 1 (Color online) Structure of siRNA and the mechanism of RNAi-based gene regulation. (a) Structure of siRNA^[4]; (b) the mechanism of RNAi process^[5]

siRNA也被证实可以有效的减少副作用^[11],在糖环和磷酸酯骨架上进行化学修饰可以有效降低免疫刺激反应同时减少错配的概率^[12],增强其在体内稳定性和生物可获得性,使其逐渐发展成为极具潜力的药物. siRNA药物最大的特点是其通用性,通过改变siRNA的序列设计,可以非常方便地实现对不同目标基因的调控,抑制相应蛋白的合成,改变细胞(如癌细胞)的增殖情况,达到治疗特定疾病的目的. 由于siRNA药物为RNA分子,进入细胞后不会整合到目标细胞基因当中,不会永久性地改变基因组,使得基

于此方法的治疗策略更易于控制且相对安全^[13]. 传统的小分子化学药物以及蛋白药物的靶点通常是一种蛋白质,如受体、激酶、抗原等,而以siRNA为代表的核酸药物则将药物靶点扩大到蛋白质的上游RNA分子,从而极大拓宽了人类药物的来源和开发方向. 相比于目前常用的小分子药物以及蛋白药物,基于siRNA的核酸类药物优点和缺点总结如表1所示^[14,15].

siRNA类药物在治疗疾病上有诸多优点,但仍存在极大的挑战阻碍着它在临床上的转化. siRNA在基因调控上相对于反义核苷酸策略具有更高的效率,

表1 小分子、基于蛋白质的药物以及siRNA药物的比较

Table 1 Comparison of small molecules, protein-based drugs (including monoclonal antibodies) and siRNA drugs

特性	小分子	蛋白类药物	siRNA药物
作用方式	目标抑制或失活	目标抑制或失活	目标抑制
靶蛋白位点	细胞内外	主要在胞外	几乎任何位点
选择性和药效	可变(取决于结合位点和配体特异性,它们的亲和力和效率等)	高度特异性和有效性	高度特异性和有效性
先导物优化	慢	慢	快
制备	容易	困难	容易
稳定性	稳定	不稳定	不稳定
递送	简单	困难	困难

但与所有基因药物一样，siRNA药物的最大问题是如何将其安全高效地输送到目标细胞中^[16]。虽然裸露的siRNA通过特定的化学修饰能够极大地提高其生理稳定性，其在输送过程中仍存在如下问题：(1) 极易被各种核酸酶水解^[17]；(2) 良好亲水性导致无法有效被细胞摄取^[18]；(3) 体内半衰期较短^[19]；(4) 容易引发机体的免疫反应^[20]；(5) 易与血清蛋白和正常细胞非特异性结合^[5]；(6) 尺寸小，易被肾脏清除出体内^[21]。上述困难使得siRNA无法有效地在特定细胞富集并发挥作用。为了解决这些问题，研究人员将焦点转移到合适的输送载体上，已经开发出诸如病毒载体、阳离子脂质体、聚合物等多种体系^[22]。非病毒载体中纳米颗粒通常依赖其所携带的阳离子与siRNA通过静电作用进行复合，保护siRNA免于核酸酶的降解，并且与细胞膜可通过静电吸引增强其进入细胞的能力，从而达到良好的基因调控效果，目前这些输送体系已有部分进入临床实验阶段^[23]。但这类阳离子载体通常会对细胞产生毒性，还容易导致纳米颗粒在肾小球基膜上被分解掉^[24]，使得siRNA过早从体系中释放出来被肾脏清除。因此找到安全稳定的基因载体对于RNA干扰过程尤为重要，也是目前致力于siRNA类药物开发和转化的科研工作者的重点研究方向之一。

1 基于DNA纳米结构的输送系统

自从DNA被确认为遗传信息的载体并最终确定其双螺旋结构后，关于DNA的功能研究一直是现代科学中最为重要的内容之一。除作为基因在生物学中处于中心地位外，DNA分子可以通过碱基互补配对形成稳定的组装结构^[25]，基于DNA的可编程自组装原理，在材料学领域Seeman^[26-30]开创全新的DNA纳米技术。该技术通过核酸的序列设计，可由DNA分子自组装形成基本的构建单元进行自下而上的组

装^[25]，从而制备结构和功能可控的纳米组装体。在DNA纳米技术的发展过程中，Woo和Rothenmund^[31]进一步提出了DNA折纸技术(DNA origami)同样成为DNA纳米结构组装的利器。近些年来利用金属配位^[32]或滚动圆环扩增(rolling-circle amplification, RCA)^[33]等技术与DNA组装相结合制备一系列一维、二维、三维纳米结构的新方法也不断崭露头角。在结构组装方面，DNA纳米技术可以说已经发展得炉火纯青，通过设计人们已经可以组装出任何想要的结构^[34-41]。目前该领域新的发展趋势则着重于如何利用其精确可控的组装结构实现其功能应用上的突破。作为生物体内的遗传信息载体，DNA与生俱来的生物相容性和可降解性使其在药物输送方面具有其他材料(如聚合物、无机纳米颗粒等)不可比拟的优势。但由于DNA骨架中磷酸二酯键使得DNA带强烈的负电，而细胞膜也具有电负性，两者之间的静电排斥作用导致未经修饰的DNA在没有转染试剂的情况下不能有效地进入细胞。然而经过组装得到的DNA纳米结构则被广泛报道可以通过内吞作用被细胞摄取，显示出比单链或双链核酸分子更高效进入细胞的能力，使得DNA纳米结构作为核酸药物输送载体成为可能。据文献报道，DNA纳米颗粒主要通过小窝蛋白或网格蛋白介导的胞饮机制^[42]到达细胞内的细胞器，如内质网、溶酶体。在该机制下细胞对纳米颗粒的吞噬有效粒径在20~200 nm^[43-45]。因此，目前大部分DNA纳米颗粒主要控制在这个尺寸范围内。DNA纳米结构进入细胞后，细胞内固有的核酸酶可以降解纳米结构^[46]，从而规避了聚合物或脂质体等其他材料普遍存在的毒性问题。除此之外，通过特定的修饰方法，可以向DNA纳米结构上引入更多的功能基团，比如适配体^[47]、蛋白质^[48]、受体等，这种功能化DNA纳米结构负载siRNA后可以增强对特定细胞的靶向能力，拓宽了其在药物靶向递送方面的应用(表2)。

表2 不同siRNA递送体系优缺点比较
Table 2 Comparison of siRNA delivery vectors

载体	优点	缺点
阳离子脂质体	稳定、摄取率高	细胞毒性、副作用大
阳离子聚合物	良好药代动力学特性	细胞毒性、特异性差
病毒载体	递送效率高	序列整合改变基因，存在免疫原性、安全性风险
金属纳米粒子	生物相容性好，表面功能化	成本高，不易排出，可能存在潜在毒性
蛋白	高选择性、活性	成本较高，生产工艺复杂
DNA纳米结构	生物相容性、降解性好，制备简易	稳定性不足，目前难大规模生产

近几年科研人员已经开发设计出了许多静态或动态的DNA纳米材料,用以携带小分子药物、抗体、免疫佐剂、siRNA等进入目标细胞^[49],取得了很多人鼓舞的结果.以DNA纳米结构为基础的生物医学应用以及生物表界面相互作用等方面的进展也有不少综述进行了较为详细的总结^[49-53].与上述综述文章有所区别,本文将聚焦于近几年DNA纳米结构用于siRNA递送中具有代表性和启示意义的工作.

2 不同种类的siRNA载体

2.1 DNA纳米笼

文献[49,54-62]理论分析了DNA纳米结构用于功能性核酸递送的可行性.2012年, Lee等人^[63]证实了自组装的DNA四面体可以成功地将siRNA输送到肿瘤细胞中并抑制相应基因的表达(图2(a)). Lee用6条30个碱基长度的DNA单链组装成四面体结构,四面体的每条棱中间伸出一段核苷酸序列可以与siRNA的3'端碱基配对,从而使每个四面体都可以负载6条siRNA.得到的寡核苷酸纳米粒子(oligonucleic acid nanoparticles, ONPs)具有清晰确定的尺寸和形貌.为了增强ONPs的靶向性,研究者还向四面体结构上引入叶酸配体,他们发现叶酸配体的数目和结合位点对细胞内吞和基因沉默的效果有一定的影响,实验证明至少需要3个叶酸分子才能对相应的基因表达产生抑制作用.随后他们在接种了KB异种移植瘤的裸鼠体内进行了体内递送和基因调控实验,发现携带有siRNA的DNA四面体可以有效减少目标基因荧光素酶的表达,同时不对细胞中的干扰素IFN- α 产生影响.基于DNA四面体的ONPs成功地将siRNA输送到肿瘤部位并在活体内实现了对目标基因的沉默作用,显示了较好的基因调控效果.然而该四面体棱上结合的siRNA完全暴露在核酸纳米结构之外,在递送过程中不可避免地会遇到各种核酸酶,存在易被酶降解的问题.但不可否认的是, Lee的工作打开了DNA纳米结构递送siRNA的大门,对后续的相关工作具有指导意义.

除了DNA四面体,其他三维笼状结构也可以用于siRNA的输送.2016年, Sleiman研究团队^[64]首次报道了一种自组装的DNA纳米笼(图2(b)),可以包裹siRNA并在寡核苷酸识别下实现有条件的释放.在优化设计的基础上,他们组装了棱柱形的DNA纳米笼,

并在DNA纳米盒两端设计了响应性的“门”结构,该结构在生物体内遇到特定信号分子时,两条红色“门”链发生位移,可以将空腔中的siRNA释放出来.该研究中作者将担任“门”的两条DNA链设计为反义寡核苷酸序列,使其可以靶向Bcl-2基因,从而实现双重治疗. Bcl-2是细胞程序死亡过程中的主要调控因子, Bcl-2的过度表达与肿瘤细胞的产生,增殖等密切相关.采用抗凋亡因子Bcl-2和Bcl-xL的反义核苷酸链作为门控序列来控制siRNA的释放,一方面本身可以敲低Bcl-2和Bcl-xL的表达,“门”打开后siRNA释放将进一步发挥基因调控的功能.实验中作者还利用FRET方法在分子水平上证明了组装的DNA纳米笼可以实现siRNA等治疗性基因的有效释放.此项工作不仅巧妙地通过结构设计实现了siRNA的响应性释放,更重要的是提出了利用DNA结构来对包裹siRNA进行保护的概念.与先前siRNA暴露在DNA四面体外侧不同,此结构中siRNA嵌入到纳米结构中,能够更好地规避核酸酶的降解,使其在生理情况下也表现出较好的稳定性. DNA纳米笼作为载体设计相对简单,所需DNA数量少,结构精确可控,但纳米笼本身属于比较开放的结构,其主体框架仍为DNA双链, DNA的排列不紧密,早期设计中DNA纳米笼通常未在结构上做优化和保护性设计,容易受到核酸酶的攻击,影响其作为载体的稳定性.为了提高纳米笼载体的稳定性, Sleiman研究团队^[65]通过在DNA立方体的顶点引入疏水性脂肪链段,利用该脂肪链段与白蛋白的相互作用实现与白蛋白的复合.作者通过调控脂肪链段的分布,验证了多位点的脂肪链段修饰能够极大地增强白蛋白与DNA立方体的结合常数,从而形成稳定的白蛋白-DNA立方体复合物,最终利用表面包覆的白蛋白的稳定性和长循环特性来实现载体DNA纳米结构和所负载siRNA的稳定.然而生物体内环境通常是复杂多变的, DNA纳米笼负载siRNA能否真正的在体内高效发挥基因调控作用还需要更多的动物实验进行验证,同时如何实现靶向输送也亟待解决.

2.2 DNA折纸结构

DNA折纸方法构建纳米结构具有操作简单,形貌可控性强,结构刚性大等优势.柯永刚研究团队^[66]利用DNA折纸的方法设计组装了不同形貌和大小的长方形或管状纳米结构用于siRNA的递送,并重

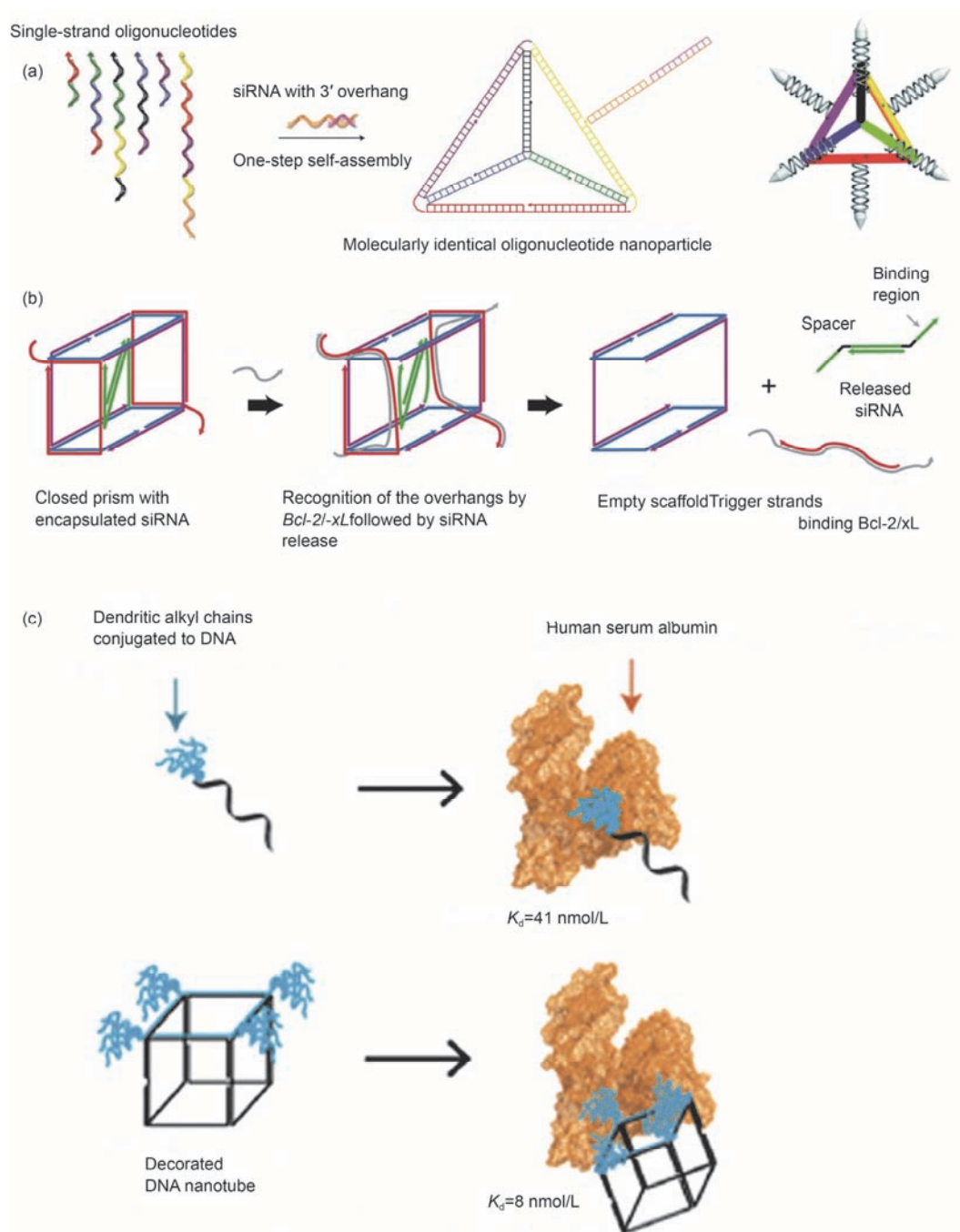


图 2 (网络版彩色)用于递送siRNA的DNA三维纳米载体。(a) 负载siRNA的DNA四面体递送系统^[63]；(b) 内置siRNA的DNA纳米笼组装以及释放示意图^[64]；(c) 表面结合人血清白蛋白的DNA立方体组装结构^[65]

Figure 2 (Color online) DNA three-dimensional nanostructures used for siRNA delivery. (a) Formation of siRNA-loaded DNA tetrahedron delivery system^[63]; (b) schematic of responsive DNA "suitcase" for siRNA delivery^[64]; (c) schematic of HSA-coated DNA nanocage to enhance the stability of drug delivery system^[65]

点探讨了不同DNA纳米结构形貌对其递送siRNA的影响(图3)。研究中他们设计并制备了8种DNA折纸结构,分别为6螺旋宽、96碱基的长方形(6H×96BP-Rect)和管状(6H×96BP-Tb)结构,6螺旋宽、192碱基的

长方形(6H×192BP-Rect)和管状(6H×192BP-Tb)结构,12螺旋宽、96碱基的长方形(12H×96BP-Rect)和管状(12H×96BP-Tb)结构,以及12螺旋宽、192碱基的长方形(12H×192BP-Rect)和管状(12H×192BP-Tb)结构。

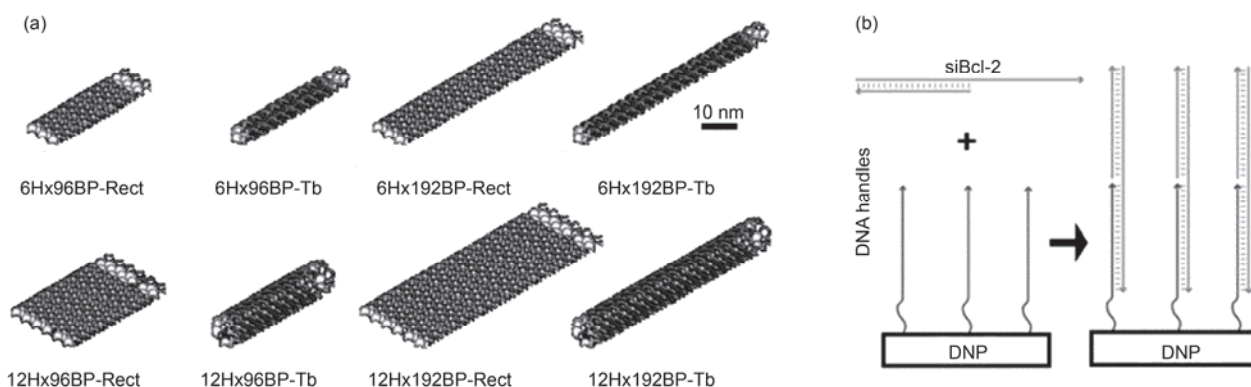


图3 基于DNA折纸结构的纳米载体。(a) 8种不同形貌DNA折纸纳米结构用于siRNA的递送;(b) 靶标Bcl-2基因的siRNA与DNA折纸纳米结构的结合机制^[66]

Figure 3 DNA origami-based siRNA delivery systems. (a) Schematic illustration of 8 DNA origami nanostructures as carriers for siRNA delivery; (b) hybridization-based loading of anti-Bcl-2 siRNA onto DNA origami nanostructures^[66]

紧密堆积的折纸结构相比开放式的DNA笼状结构对核酸酶具有更强的抵抗力,随后他们研究了这些不同纳米结构对细胞摄取的影响。流式细胞术和共聚焦显微照片表明相对于单独的DNA螺旋结构,组装的DNA纳米结构在不同细胞(H1299和DMS53)系的内化效率都更高。同时他们发现相同形貌中尺寸略小的DNA纳米颗粒比尺寸稍大的纳米颗粒表现出更高的入胞效率。在优化选取最佳DNA折纸结构作为载体后,他们将调控Bcl-2基因表达的siRNA结合到6Hx96BP-Rect结构上进行体内体外实验,均表现出显著的沉默Bcl-2 mRNA和蛋白质表达的效果,最终实现了对小鼠肿瘤的生长的抑制。DNA折纸结构可设计性强,结构更为致密稳定,有利于系统研究载体形貌对递送效率的影响,使其具备成为高效递送siRNA的载体的潜能。但正如作者所言,目前的纳米颗粒载体还无法增强靶向性,减少对健康组织的递送,成为其一大亟需解决的问题。同时此项研究中siRNA仍然裸露于载体表面,缺乏相应的保护,未来的设计可考虑构建致密的三维DNA盒子,并引入响应型触发开关,实现siRNA的保护性递送。

2.3 基于RCA的siRNA载体

在DNA纳米技术应用方面,通过设计DNA组装单元自下而上组装制备的纳米结构方法相对简单但形貌控制和多样性不如DNA折纸技术。相比之下,DNA折纸法因为设计复杂,需要的订书机链数目繁多使折纸结构的大规模生产受限,阻碍了其在基因治疗上的探究。近年来利用滚动圆环扩增技术并以

扩增的核酸链为模板进行纳米结构的组装则能综合两者的优点,并且其操作简便高效,成为DNA纳米结构制备以及应用研究新的发展方向。Hong等人^[67]利用RCA技术设计了许多Y型的DNA结构,例如含有159碱基的单链DNA模板可以自组装形成中心三角结,臂端为3个发夹环的Y-DNA结构(图4(a))。其中一个发夹环中含有缺口,可以将DNA引物嵌入,以圆形Y-DNA为模板,在Phi29DNA聚合酶的作用下持续扩增可制备与Y-DNA模板互补的重复序列。同时通过引入PstI的酶切位点,在PstI核酸内切酶作用下就可以特异性地将扩增序列切割成短的片段。在退火条件下,这些片段可以自组装形成恰好与最初Y-DNA模板互补的Y-DNA纳米结构,通过其3条臂上的黏性末端,可以实现与siRNA的共组装,构建siRNA递送体系。这是首次尝试使用RCA技术和分子自组装来制造用于siRNA递送的DNA纳米结构。随后Weizmann研究团队^[68],也利用RCA技术得到的产物作为脚手架,分别采用含有32碱基的短链和96碱基的长链作为订书机链,构建了周期性DNA纳米带T(DNR-T)和纳米带S(DNR-S)(图4(b))用于搭载siRNA来实现癌细胞的基因调控和治疗。研究中作者在DNR-T结构上修饰了胺酯SPDP,通过巯基交换反应负载能够抑制survivin表达的siRNA,并与人卵巢癌细胞SKOV-3进行共孵育转染实验。实时荧光定量技术(Real-PCR)以及酶联免疫吸附试验(ELISA)结果都表明,凋亡抑制基因survivin的mRNA和蛋白表达均明显下调,证实了DNR-T可以在不依赖阳离子转染剂的情况下将siRNA递送到细胞中发挥基因沉默

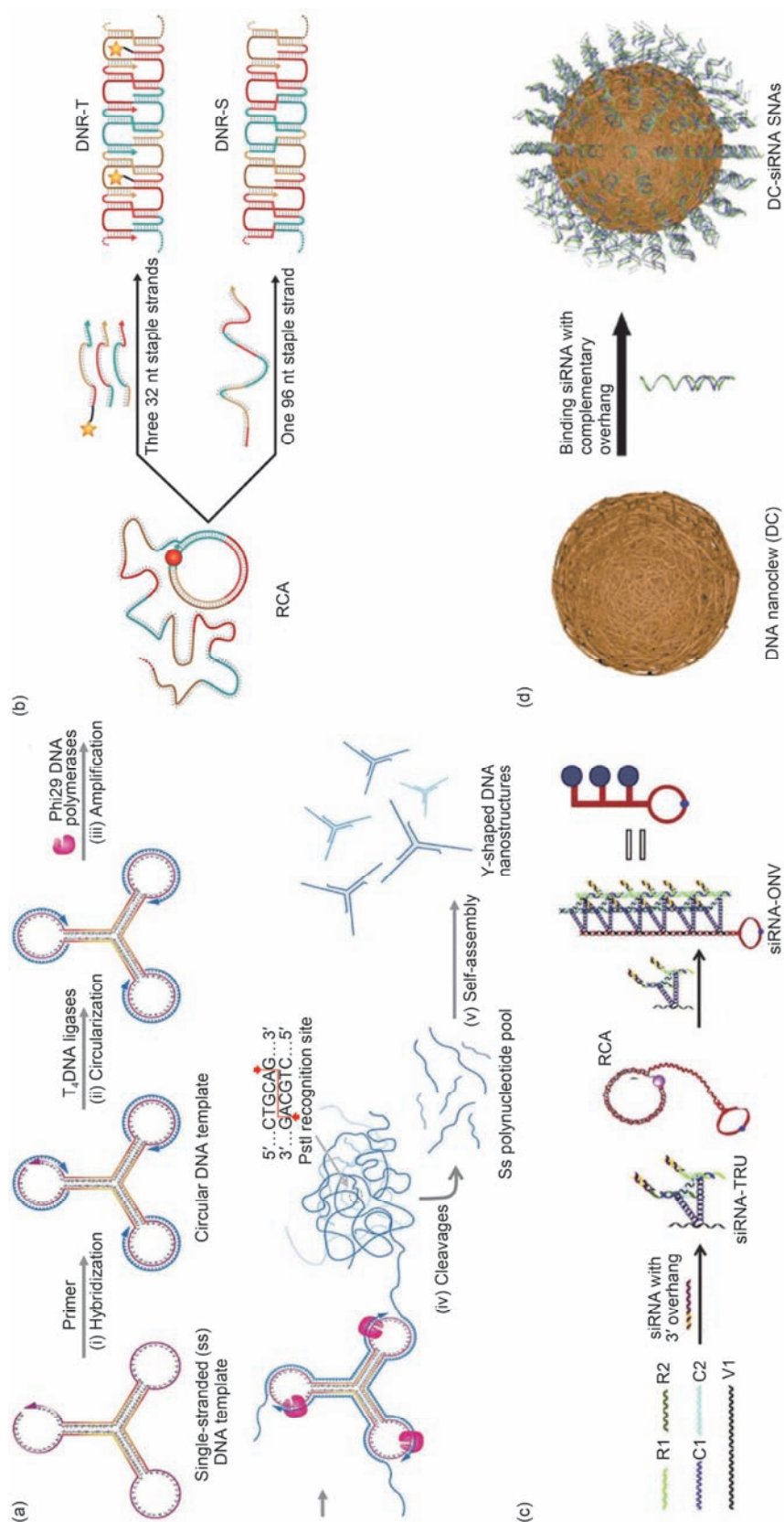


图 4 (网络版彩色) 基于 RCA 方法构建的 siRNA 载体。 (a) 基于 RCA 的逐步法制备三维 Y 形 DNA (Y-DNA) 纳米结构并用于 siRNA 递送^[67]; (b) RCA 方法组装制备 DNA 纳米带用于 siRNA 的递送示意图^[68]; (c) 基于 RCA 扩增模板制备的 siRNA-ONV 纳米管结构^[69]; (d) 基于 RCA 方法制备的 DNA 纳米线团用于构建负载 siRNA 的球形核壳结构^[70]

Figure 4 (Color online) siRNA nanocarriers constructed through RCA strategy. (a) Schematic illustration of the stepwise approach for the preparation of three-dimensional Y-shaped DNA (Y-DNA) motifs and their assemblies for siRNA delivery^[67]; (b) schematic of RCA-based DNA nanoribbons for siRNA delivery^[68]; (c) self-assembly of siRNA-TRU repeating unit and siRNA-ONV nanotube for siRNA delivery^[69]; (d) SNA-like DNA nanoclews loaded with siRNA for gene regulation^[70]

作用. 该研究中作者指出由于DNA纳米带结构坚固, 并且其尺寸大于通常内涵体的大小, 因此可能有助于其成功逃离内涵体, 提高siRNA的递送效率. 除直接将RCA长链进行折叠外, RCA扩增的长链还可以直接与绑定siRNA的DNA纳米结构结合, 构建不同形貌纳米结构用于siRNA的递送, 例如Ren^[69]以RCA扩增的单链为模板, 利用其重复序列绑定三角形DNA结构单元并最终组装成为三棱柱型纳米管, 在每个DNA结构单元侧链上则可通过核酸杂交负载siRNA, 实现siRNA的有效递送. 通过细胞实验, 作者证实这种纳米管结构相对于裸露siRNA具有更好的细胞转染效率. 此外以RCA扩增的长链为模板, 师冰洋课题组^[70]利用核酸杂交还构建了DNA球形纳米线团, 进一步通过核酸杂交将siRNA负载在纳米线团表面, 可形成类似于球形核酸(SNA)的siRNA递送载体. 利用SNA具有无需转染试剂快速进入细胞的特质, 作者通过与HeLa细胞进行共孵育, 成功地实现了细胞内荧光素酶基因的敲低. 上述一系列利用RCA扩增并结合核酸组装构建siRNA纳米输送体系设计简单, 产率好, siRNA负载率高, 但初期的研究工作中大多

没有讨论这些纳米结构在体内的稳定性问题, 作为siRNA载体在血液循环以及活体中是否可以稳定存在还需进一步研究.

2.4 DNA纳米水凝胶

DNA纳米水凝胶因其高负载能力和良好的可控性能被视为DNA纳米结构中的重要一员^[71,72]. 早在2015年, 谭蔚泓院士课题组就曾报道过可以利用DNA纳米凝胶来输送反义寡核苷酸来调控靶向基因^[73]. 除了反义核苷酸, DNA水凝胶同样可以用来构建siRNA递送系统. 本研究团队^[74]利用水溶性的多片段DNA接枝的聚己内酯(PCL)为底物, 将siRNA设计为交联剂(linker)通过核酸亲和杂化组装形成包载siRNA的纳米水凝胶, 在细胞和动物层面实现siRNA的高效输送和基因调控, 并在癌症动物模型中展示了良好的基因治疗效果(图5). 在此研究中, 通过无铜点击反应我们将大量DNA接枝到生物相容性和降解性良好的PCL上, 形成水溶性的DNA-g-PCL梳状聚合物. 接枝的DNA作为众多交联位点可以通过碱基识别与siRNA结合, 最终形成包载了siRNA的纳米

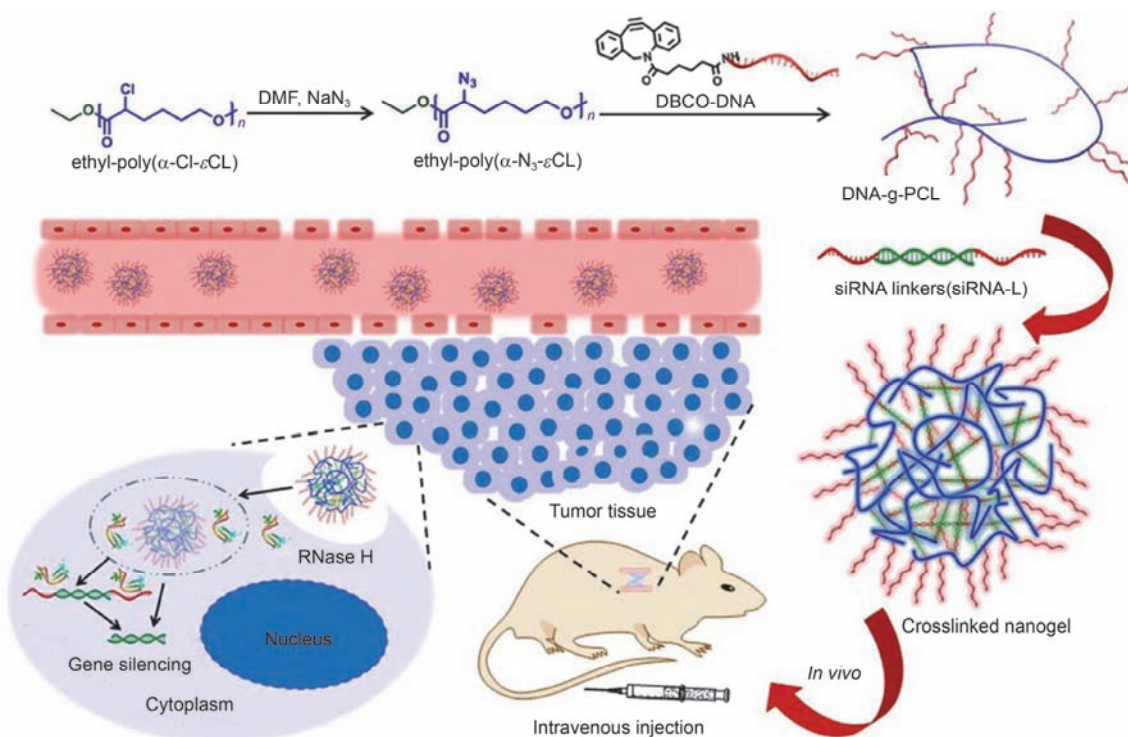


图5 (网络版彩色)DNA纳米凝胶的形成和siRNA递送示意图^[74]

Figure 5 (Color online) Schematic diagram of DNA nanogel formation and siRNA delivery^[74]

水凝胶. 通过调控DNA与siRNA linker的比例可有效调控纳米凝胶的尺寸. 形成凝胶后未参与杂化的DNA保留在纳米凝胶外部, 形成类似于球形核酸的纳米结构, 有利于对细胞的转染. 同时负载的siRNA被包裹在凝胶内部, 有效减少核酸酶的降解, 从而增强了其生理稳定性. 在与血清和不同浓度RNase A共混实验中, 纳米凝胶均显示了良好的稳定性. 同时我们也证实纳米凝胶与RNase H孵育后由于特定的酶切反应能够将负载的siRNA释放出来, 发挥基因调控的功能. 通过HeLa细胞共培育, 纳米凝胶能够快速地被摄取并有效敲低荧光报告基因EGFP基因以及癌症相关基因PLK-1的表达. 对荷瘤小鼠进行静脉注射, 相比于对照组可以明显的看到纳米凝胶能够有效地敲低PLK-1在肿瘤细胞中的表达, 从而抑制肿瘤生长. 此工作从体内体外两个方面展现了DNA纳米水凝胶作为siRNA载体在癌症治疗方面的巨大潜力. 基于保护性的结构设计, 纳米凝胶在血液循环中的稳定性、细胞摄取及治疗效果方面均体现出明显优势. 当然修饰后的PCL生物安全性仍需要进一步的考察, 设计全DNA构建的具有良好稳定性的水凝胶siRNA输送体系也是今后研究的重点.

2.5 单链siRNA输送体系

除了传统双链siRNA分子外, 单独递送siRNA反义链也能够实现相应的RNA干扰基因调控. 毛诚德研究团队与王冠松研究团队^[75]在2015年首次报道了基于DNA纳米管的siRNA递送工作. 他们使用了4条DNA单链(L, M, S和S')首先组装形成Y型结构单元, 然后两个Y型结构单元组装成为二聚体形成特定长径比的纳米管(图6(a)), 同时M链设计为携带黏性末端并伸出纳米管外从而与siRNA反义链结合, 实现siRNA的递送. 实验中作者选取了mTOR作为靶标基因, mTOR是一种调控细胞生长过程的重要蛋白, 也是癌症治疗的重要调控通路. 装备siRNA的DNA纳米管进入细胞后, 可以在正常和低氧条件下显著抑制肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)的生长和增殖, 这种DNA载体设计简单, 成本低. 但与前面大多数DNA载体递送siRNA的工作类似, siRNA的负载后都处于纳米载体表面, 缺乏相应的保护机制, 不利于提高siRNA的生理稳定性. 2016年, 毛诚德与王冠松研究团队^[76]又共同提出了一种将单链siRNA直接引入DNA纳米结构中形成的DNA与RNA的杂交体系(图6(b)). 作者以两种DNA:mTOR-1A和mTOR-2A组建

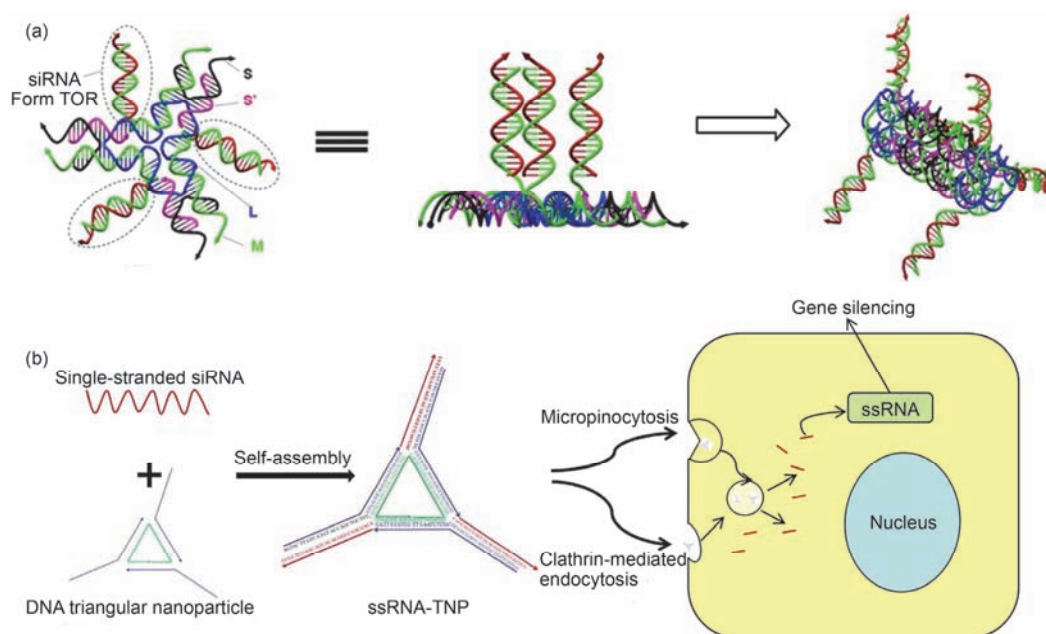


图6 (网络版彩色)基于DNA纳米结构的单条功能性siRNA递送体系. (a) 负载mTOR siRNA的纳米管递送系统^[75]; (b) 三角形DNA-RNA杂交体系的siRNA递送系统^[76]

Figure 6 (Color online) DNA nanostructure-based carriers for single functional siRNA delivery. (a) Schematic illustration of the mTOR siRNA-loaded nanotubes^[75]; (b) schematic of triangular DNA-RNA hybrid system for siRNA delivery^[76]

纳米结构并与表达mTOR的单链siRNA以1:3:3的比例退火组装形成三角形的DNA-RNA杂交结构(ssRNA-TNP). 细胞摄取实验证明这种结构可以通过大胞饮和网格蛋白介导的内吞方式进入细胞, 与未经修饰的siRNA相比显示出显著提升的细胞内化效率. 在稳定性方面, 裸露的siRNA在与血清培养12 h逐渐被降解, 而ssRNA-TNP共孵育24 h仍然没有明显的降解现象, 说明该设计可以在一定程度上实现siRNA保护, 提高其生理稳定性. 在此基础上他们以肺癌细胞NCI-H292为模型研究了ssRNA-TNP对细胞内mTOR基因的抑制作用, 发现该递送体系对mTOR mRNA和蛋白均具有显著的抑制效果, 表明RNA/DNA杂交结构也能作为有效的siRNA载体发挥递送及治疗作用. 该设计结构简单, 制备方便, 错配的概率小, 但是此类结构通常转染效率低, 需要转染试剂的协助, 增加了细胞毒性. 如能够进一步与靶向基因如核酸适配体结合可以提高其转染细胞能力, 是今后发展的方向. 此外这类杂化结构进入细胞后还容易受到特定核酸酶的影响, 例如RNase H会特异性地切割杂化双链中RNA链部分, 从而引起siRNA的快速降解, 其长时间的稳定性可能会面临一定的问题.

RNAi技术的另一个机制是通过shRNA被Dicer酶剪切成siRNA从而参与到抑制基因表达的过程. Lee等人^[77]曾经就金纳米颗粒和DNA寡核苷酸的偶联物用于shRNA的递送进行了研究, 发现这种基于DNA的纳米载体同样可以将shRNA载入癌细胞, 同时下调了*Mcl-1*基因和*p53*基因. 目前为止shRNA的递送主要依赖于病毒和某些阳离子载体, 但是他们的工作让我们看到了DNA纳米载体在这个领域的巨大潜力.

3 挑战与展望

作为新型基因载体, DNA纳米结构具有诸多优势, 如上面提到的优异的生物相容性和可降解特性, 可控自组装赋予其结构的精确性和多样性, 以及功能性基团的修饰和引入赋予其功能的多样性, 都为其在生物医学领域的应用奠定了巨大的潜能. 但要将其付诸于临床转化应用目前仍面临巨大的难题, 就作为功能性核酸载体而言, DNA纳米结构应用于siRNA递送面临的挑战包括:

(1) 稳定性问题. DNA纳米结构虽然生物兼容性好, 但直接暴露在生理条件下容易被降解, 输送系统的药代动力学比较差, 直接影响病症部位对siRNA的

可获得性, 导致可能无法产生有效的基因调控效果. 通过结构上的设计可以有效提高DNA纳米结构的稳定性, 例如采用紧密排布的DNA折纸结构作为载体, 将siRNA负载在密闭三维结构内部都可以增加所负载核酸药物的稳定性. 同时对载体表面进行改性也是有效提升其稳定性的途径之一, 例如利用具有长循环特性的蛋白进行包覆, Sleiman的工作已经充分证明了这一点. 除了蛋白包覆外, 在药物开发中经常用的表面PEG化也是增强输送体系稳定性和长循环性能的好方法, 而目前这方面的例子还不多, 我们也在探索在负载siRNA的纳米凝胶表面引入PEG以验证其对载体长循环性能的影响. 值得注意的是siRNA本身通过化学改性也能极大地提高其稳定性, 进入临床转化的siRNA无一例外均采用了修饰后的序列设计, 因此进一步提高siRNA递送系统的稳定性难题也有赖于将化学改性和结构设计结合起来, 使其产生协同效应, 增加生物利用度, 减少药物注射次数. (2) 免疫原性问题. DNA虽然具有良好的生物兼容性, 但DNA纳米结构作为外源性物质其免疫原性一直是药物递送和基因治疗不可忽视的问题. 虽然大多数报道都揭示DNA纳米载体生物安全性良好, 但以细胞层面的评价居多, 动物层面的评价还相对较少. 尤其是近来有报道外源性DNA作为佐剂能够通过STING通路辅助激活天然免疫反应^[78], 提示以DNA纳米结构作为siRNA载体可能带来难以忽视的免疫原性. 为此今后的应用研究中需要更多地考虑DNA纳米结构的序列设计以降低其可能带来的风险. 此外纳米结构的形状、表面修饰等多种因素对生物体系的影响仍然不是很清楚, 有待进一步的研究和探索. (3) 靶向性问题. 目前DNA纳米结构的细胞摄取机制研究相对还比较少, 前期的探索揭示DNA纳米结构进入细胞主要是通过小窝或网格蛋白介导的胞吞机制, 缺乏特定的靶向性, 导致siRNA纳米载体不仅被病症细胞摄取, 也会被正常细胞吞噬, 导致特异性差, 带来潜在的副作用. 因此如何增强输送体系的靶向性也是科研人员需要努力的方向. 在当前研究中, 采用直接涂抹或注射siRNA可用于个别病症的给药, 如视网膜黄斑病变、皮肤病、以及个别实体肿瘤等. 而系统给药则主要靶向肝脏组织, 例如基于阳离子脂质体、阳离子聚合物主要利用纳米尺寸效应在肝脏部位聚集, 糖分子修饰siRNA利用表面受体作用也能够很好地靶向肝脏细胞. 以DNA纳米结构为载

体如何通过设计引入其他靶向基团,如多肽、抗体、适配体等使其更好地实现靶向输送将是未来研究中不可忽视的内容。(4) 工艺和成本问题. siRNA和DNA的生产目前都比较成熟,但其综合成本仍远远高于小分子药物. DNA纳米结构的组装效率和纯化也是制约其大规模生产的关键因素之一. 目前基于DNA纳米结构的siRNA递送研究仍处于实验室阶段,现有的制备方法能否转化为大规模生产并保证品质和重复性也是极大的问题,例如绝大多数组装结构难以保证产物的单一性,纯化过程繁琐,也缺乏统一的质控标准. 如何简化合成步骤、降低成本、同时保证输送体系质量统一也是这一类型siRNA药物从实验室迈向产业化的过程中急需解决的问题.

虽然存在上述诸多困难,但不可否认的是相比

于传统材料, DNA纳米结构输送体系具有独特的优势. 一旦载体的上述挑战获得突破,除了siRNA外,基于相同的原理DNA纳米结构也将很方便地移植到用于输送其他功能性核酸,如miRNA、质粒、基因编辑工具等,极大地拓展基因治疗可选用的策略和工具. 在与疾病的斗争中,人类经历了从远古的神农尝百草般在植物、动物、矿石中寻找天然药物,到化学合成药物、生物药物,再到核酸药物、基因药物,科学的发展和技术进步使我们可以有更好的药物来治疗疾病,极大地改善了人类的生活质量,促进了社会的进步. 虽然目前核酸类药物的发展还面临一定的挑战,但我们相信在不久的将来这些难题终将在全世界科研人员的努力下得以解决,基于DNA纳米结构的siRNA输送体系在临床上也会发挥更大的作用.

参考文献

- 1 Castanotto D, Rossi J J. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*, 2009, 457: 426–433
- 2 Dogini D B, Pascoal V D A B, Avansini S H, et al. The new world of RNAs. *Genet Mol Biol*, 2014, 37: 285–290
- 3 Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806–811
- 4 Li J, Xue S, Mao Z W. Nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics. *J Mater Chem B*, 2016, 4: 6620–6639
- 5 Gallas A, Alexander C, Davies M C, et al. Chemistry and formulations for siRNA therapeutics. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 7983–7997
- 6 Jinek M, Doudna J A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 2009, 457: 405–412
- 7 Perkel J M. RNAi therapeutics: A two-year update. *Science*, 2009, 326: 454–454
- 8 Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411: 494–498
- 9 Rana T M. Illuminating the silence: Understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 23–36
- 10 Dykxhoorn D M, Novina C D, Sharp P A. Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 457–467
- 11 Pai S I, Lin Y Y, Macaes B, et al. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther*, 2006, 13: 464–477
- 12 Patil V S, Zhou R, Rana T M. Gene regulation by non-coding RNAs. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2014, 49: 16–32
- 13 Resnier P, Montier T, Mathieu V, et al. A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer. *Biomaterials*, 2013, 34: 6429–6443
- 14 Lam J K W, Chow M Y T, Yu Z, et al. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2015, 4: 252–272
- 15 Chakraborty C, Sharma A R, Sharma G, et al. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from bench to clinic as next generation medicine. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 8: 132–143
- 16 Castanotto D, Bertrand E, Rossi J. Exogenous cellular delivery of ribozymes and ribozyme encoding DNAs. In: Turner P C, ed. *Ribozyme Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 1997, 74: 429–439
- 17 Guzman-Villanueva D, El-Sherbiny I M, Herrera-Ruiz D, et al. Formulation approaches to short interfering RNA and MicroRNA: Challenges and implications. *J Pharm Sci*, 2012, 101: 4046–4066
- 18 Chen S H, Zhaori G. Potential clinical applications of siRNA technique: Benefits and limitations. *Eur J Clin Invest*, 2011, 41: 221–232
- 19 Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 2004, 432: 173–178
- 20 Zins K, Sioud M, Aharinejad S, et al. Modulating the tumor microenvironment with RNA interference as a cancer treatment strategy. *Methods Mol Biol*, 2015, 1218: 143

- 21 Chithrani B D, Ghazani A A, Chan W C W. Size and shape dependence of nanoparticles on Cellular Uptake. *Nano Lett*, 2006, 668: 662–668
- 22 Ma D. Enhancing endosomal escape for nanoparticle mediated siRNA delivery. *Nanoscale*, 2014, 6: 6415–6425
- 23 Gish R G, Yuen M F, Chan H L, et al. Synthetic RNAi triggers and their use in chronic hepatitis B therapies with curative intent. *Antiviral Res*, 2015, 121: 97–108
- 24 Zuckerman J E, Choi C H, Han H, et al. Polycation-siRNA nanoparticles can disassemble at the kidney glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 3137–3142
- 25 Wu X R, Wu C W, Zhang C. Discrete DNA three-dimensional nanostructures: The synthesis and applications. *Chin J Polym Sci*, 2017, 35: 1–24
- 26 Seeman N C. Nucleic acid junctions and lattices. *J Theor Biol*, 1982, 99: 237–247
- 27 Kallenbach N R, Ma R I, Seeman N C. An Immobile nucleic acid junction constructed from oligonucleotides. *Nature*, 1983, 305: 829–831
- 28 Chen J, Seeman N C. Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature*, 1991, 350: 631–633
- 29 Seeman N C. DNA in a material world. *Nature*, 2003, 421: 427–431
- 30 Jones M R, Seeman N C, Mirkin C A. Programmable materials and the nature of the DNA bond. *Science*, 2015, 347: 840–851
- 31 Woo S, Rothmund P W. Programmable molecular recognition based on the geometry of DNA nanostructures. *Nat Chem*, 2011, 3: 620–627
- 32 Millstone J E, Georganopoulou D G, Xu X, et al. DNA-Gold triangular nanoprism conjugates. *Small*, 2010, 4: 2176–2180
- 33 Ouyang X, Li J, Liu H, et al. Rolling circle amplification-based DNA origami nanostructures for intracellular delivery of immunostimulatory drugs. *Small*, 2014, 9: 3082–3087
- 34 Tian C, Li X, Liu Z, et al. Directed self-assembly of DNA tiles into complex nanocages. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 8041–8044
- 35 Han D, Pal S, Yang Y, et al. DNA gridiron nanostructures based on four-arm junctions. *Science*, 2013, 339: 1412–1415
- 36 Zhang F, Jiang S, Wu S, et al. Complex wireframe DNA origami nanostructures with multi-arm junction vertices. *Nat Nanotechnol*, 2015, 10: 779–784
- 37 And F A A, Sleiman H F. Modular access to structurally switchable 3D discrete DNA assemblies. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 13376–13377
- 38 Zhang C, Macfarlane R J, Young K L, et al. A general approach to DNA-programmable atom equivalents. *Nat Mater*, 2013, 12: 741–746
- 39 Benson E, Mohammed A, Gardell J, et al. DNA rendering of polyhedral meshes at the nanoscale. *Nature*, 2015, 523: 441–444
- 40 Ke Y, Ong L L, Shih W M, et al. Three-Dimensional structures self-assembled from DNA bricks. *Science*, 2012, 338: 1177–1183
- 41 He Y, Ye T, Su M, et al. Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedra. *Nature*, 2008, 452: 198–201
- 42 Lee D S, Qian H, Tay C Y, et al. Cellular processing and destinies of artificial DNA nanostructures. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 4199–4225
- 43 Petros R A, Desimone J M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discovery*, 2010, 9: 615–627
- 44 Choi H S, Liu W, Liu F, et al. Design considerations for tumour-targeted nanoparticles. *Nat Nanotechnol*, 2010, 5: 42–47
- 45 Davis M E, Chen Z G, Shin D M. Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discovery*, 2008, 7: 771–782
- 46 Chou L Y T, Zagorovsky K, Chan W C W. DNA assembly of nanoparticle superstructures for controlled biological delivery and elimination. *Nat Nanotechnol*, 2014, 9: 148–155
- 47 Keefe A D, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discovery*, 2010, 9: 537–550
- 48 Kozlov M M, McMahon H T, Chernomordik L V. Protein-driven membrane stresses in fusion and fission. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35: 699–706
- 49 Hu Q, Li H, Wang L, et al. DNA nanotechnology-enabled drug delivery systems. *Chem Rev*, 2018, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00663
- 50 Hu Q, Wang S, Wang L, et al. DNA nanostructure-based systems for intelligent delivery of therapeutic oligonucleotides. *Adv Healthcare Mater*, 2018, 7: 1701153
- 51 Bujold K E, Lacroix A, Sleiman H F. DNA nanostructures at the interface with biology. *Chem*, 2018, 4: 495–521
- 52 Wang P, Meyer T A, Pan V, et al. The beauty and utility of DNA origami. *Chem*, 2017, 2: 359–382
- 53 Pinheiro A V, Han D, Shih W M, et al. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology. *Nat Nanotechnol*, 2011, 6: 763–772
- 54 Juliano R L. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 6518–6548
- 55 Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Delivery Rev*, 2012, 64: 61–71
- 56 Jensen S A, Day E S, Ko C H, et al. Spherical nucleic acid nanoparticle conjugates as an RNAi-based therapy for glioblastoma. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 1–12

- 57 Chao J, Liu H, Su S, et al. Structural DNA nanotechnology for intelligent drug delivery. *Small*, 2015, 10: 4626–4635
- 58 Peer D, Karp J M, Hong S, et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2: 751–760
- 59 Afonin K A, Viard M, Martins A N, et al. Activation of different split functionalities on re-association of RNA-DNA hybrids. *Nat Nanotechnol*, 2013, 8: 296–304
- 60 Lee J B, Hong J, Bonner D K, et al. Self-assembled RNA interference microsponges for efficient siRNA delivery. *Nat Mater*, 2012, 11: 316–322
- 61 Choi C H, Hao L, Narayan S P, et al. Mechanism for the endocytosis of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 7625–7630
- 62 Liang L, Li J, Li Q, et al. Single-particle tracking and modulation of cell entry pathways of a tetrahedral DNA nanostructure in live cells. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 7745–7750
- 63 Lee H, Lyttonjean A K R, Chen Y, et al. Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted *in vivo* siRNA delivery. *Nat Nanotechnol*, 2013, 7: 389–393
- 64 Bujold K E, Hsu J C, Sleiman H F. Optimized DNA “Nanosuitcases” for encapsulation and conditional release of siRNA. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 14030–14038
- 65 Lacroix A, Edwardson T G W, Hancock M A, et al. Development of DNA nanostructures for high affinity binding to human serum albumin. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 7355–7362
- 66 Rahman M A, Wang P, Zhao Z, et al. Systemic delivery of Bc12-targeting siRNA by DNA nanoparticles suppresses cancer cell growth. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 16023–16027
- 67 Hong C A, Jang B, Jeong E H, et al. Self-assembled DNA nanostructures prepared by rolling circle amplification for the delivery of siRNA conjugates. *Chem Commun*, 2014, 50: 13049–13051
- 68 Chen G, Liu D, He C, et al. Enzymatic synthesis of periodic DNA nanoribbons for intracellular pH sensing and gene silencing. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 3844–3851
- 69 Ren K, Liu Y, Wu J, et al. A DNA dual lock-and-key strategy for cell-subtype-specific siRNA delivery. *Nat Commun*, 2016, 7: 13580
- 70 Ruan W, Zheng M, An Y, et al. DNA nanoclew templated spherical nucleic acids for siRNA delivery. *Chem Commun*, 2018, 54: 3609–3612
- 71 Nuhn L, Hirsch M, Krieg B, et al. Cationic nanohydrogel particles as potential siRNA carriers for cellular delivery. *ACS Nano*, 2012, 6: 2198–2214
- 72 Dahlman J E, Barnes C, Khan O F, et al. *In vivo* endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight. *Nat Nanotechnol*, 2014, 9: 648–655
- 73 Li J, Zheng C, Cansiz S, et al. Self-assembly of DNA nanohydrogels with controllable size and stimuli-responsive property for targeted gene regulation therapy. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 1412–1415
- 74 Ding F, Mou Q, Ma Y, et al. Crosslinked nucleic acid nanogel for effective siRNA delivery and antitumor therapy. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 3064–3068
- 75 You Z, Qian H, Wang C, et al. Regulation of vascular smooth muscle cell autophagy by DNA nanotube-conjugated mTOR siRNA. *Biomaterials*, 2015, 67: 137–150
- 76 Wang Y, You Z, Du J, et al. Self-assembled triangular DNA nanoparticles are an efficient system for gene delivery. *J Control Release*, 2016, 233: 126–135
- 77 Ryou S M, Kim S, Jang H H, et al. Delivery of shRNA using gold nanoparticle-DNA oligonucleotide conjugates as a universal carrier. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398: 542–546
- 78 Luo M, Wang H, Wang Z, et al. A STING-activating nanovaccine for cancer immunotherapy. *Nat Nanotechnol*, 2017, 12: 648–654

Summary for “基于 DNA 纳米结构的 siRNA 输送体系的研究进展”

DNA nanostructure-based siRNA delivery systems

Han Xue, Xihui Gao & Chuan Zhang*

State Key Laboratory of Metal Matrix Composites, School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

* Corresponding author, E-mail: chuanzhang@sjtu.edu.cn

With the approval of multiple nucleic acid drugs for clinic use by FDA, we witness a revival of gene therapy in recent years. As one of the most important drug candidates, small interfering ribonucleic acid (siRNA) plays an essential role in gene silencing. Although a large variety of siRNA delivery systems have been developed, lack of efficient way to deliver siRNA to target tissue remains as a hurdle that retards the translation of siRNA for clinic use. Different from traditional cationic liposome and polymer based nano-delivery systems that load and compress the siRNA by electrostatic interaction, self-assembled DNA nanostructures can be equipped with functional nucleic acids by DNA hybridization, which further serve as vehicles for siRNA delivery. In this mini-review, first we introduce the concept of RNA interference (RNAi) based gene silencing and emphasize the importance. It is well known that siRNA can disturb the process of translating, silence genes, and further inhibit the expression of corresponding proteins via RNAi. However, naked siRNA is not stable during the circulation. Besides that, it is difficult for siRNA itself to enter the cells, demanding proper gene vehicles to assist its cellular and systemic delivery. Unlike traditional cationic carriers that are usually toxic to cells, DNA nanostructures have been verified with excellent biocompatibility and biodegradability. Along with the rapid development of DNA nanotechnology and tremendous DNA-based nanostructures that have been assembled, more attentions have been paid on using DNA nanostructures as new carriers for siRNA delivery. Subsequently, we systematically summarize the recent progress of DNA-based siRNA delivery systems, including their designs, structures, functions, and various applications. For instance, DNA nanocage is one representative carrier used for siRNA delivery. Lee once assembled DNA tetrahedron with 6 siRNAs on each strut and folate ligands on its surface, achieving enhanced efficiency of siRNA delivery for both *in vitro* and *in vivo*. Sleiman group also reported a DNA “nanosuitcase” to encapsulate siRNA and release it upon specific trigger. By virtue of DNA origami, Ke et al. designed DNA nanoparticles to transport siRNA and further investigated the morphology influence on cellular uptake efficiency. Moreover, taking advantage of rolling-circle amplification (RCA) method, new DNA-based delivery systems with different shapes, including Y-DNA structure and periodic DNA nanoribbons, were developed for siRNA delivery. Except barely loading functional siRNA on DNA nanostructures, protecting siRNA from degradation in the new delivery systems is also important. Recently, we also reported a crosslinked DNA hydrogel platform for siRNA delivery, in which siRNA can be embedded inside the nanogel to avoid the enzymatic degradation. Both *in vivo* and *in vitro* results revealed that the crosslinked nanogel had excellent delivery efficiency and antitumor effect in an siRNA-based therapy. Despite great advances have been achieved, several problems remain to be solved in using DNA nanostructure for siRNA delivery. Lastly, we discuss the main challenges in this field, including the stability, immunogenicity, targeting capability, cost of the delivery vehicles and make a brief prospect. Once these problems are nicely addressed, we believe that DNA-based gene vectors will take a huge step toward practical use in clinic.

gene therapy, siRNA, DNA nanostructure, gene vectors

doi: 10.1360/N972018-00893