



核酸治疗的靶向性传递

张涛^{1,2}, 王承宇², 张伟¹, 杨松涛², 高玉伟², 王铁成², 夏咸柱^{1,2}

- (1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021;
2. 军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林省人兽共患病预防与控制重点实验室, 长春 130062)

【摘要】 寡核苷酸包括反义核酸和干扰 RNA 等, 它们能够为多种疾病提供快速、特异性的治疗, 具有很高的应用潜力。然而这些分子能否有效地传递到特定的细胞和组织对于最终的临床应用非常关键。靶向性的传递能够提高寡核苷酸药物的特异性和使用效率, 使药物分子能有效到达作用位点, 进而发挥它们的治疗效果。一些基于不同平台的靶向性配体传递策略已经形成, 并能够很好的发挥其生物学活性。本文针对当前该研究领域的进展提供一个概述。

【关键词】 AS-ODNs; siRNA; 靶向性传递

【中图分类号】 R342 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)03-0062-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7856.2011.03.016

Targeted Delivery for Oligonucleotide Molecular Therapeutics

ZHANG Tao^{1,2}, WANG Cheng-yu², ZHANG Wei¹, YANG Song-tao², GAO Yu-wei², WANG Tie-cheng², XIA Xian-zhu^{1,2}

- (1. Comparative Medicine Centre, Peking Union Medical College (PUMC); Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy Science (CAMS), Beijing 100021, China; 2. Institute of Military Veterinary, AMMS Key laboratory of Jilin province for zoonosis prevention and control, Changchun 130062, China)

【Abstract】 Oligonucleotides including antisense oligonucleotides and small interfering RNA can provide for a variety of diseases, rapid, specific treatment, with a high potential for application. However, effective delivery of oligonucleotide molecules to specific cells and tissues is critical for finally clinical application. Targeted system can greatly improve the efficiency and specificity of oligonucleotides delivery. Meanwhile, an effective delivery system enable the oligonucleotides to reach the sites of action and access their biological targets. Some delivery strategies based on different platforms and different targeting ligands have been developed, and can play their biological activity. In this paper, the current progress in the field of the study will be summarized.

【Key words】 AS-ODNs; siRNA; Targeted deliver

寡核苷酸 (Oligonucleotides, ONs) 作为临床药物治疗多种疾病的潜力已经越来越引起人们的重视, 早期的研究主要集中在反义寡核苷酸上 (antisense oligodeoxyribonucleotides, AS-ODNs), 然而以干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 为基础的治疗药物近几年得到了快速的发展。其他以核酸分子为基础的治疗药物还包括微 RNA (micro RNA, miRNA), 免疫调节剂 CpG 寡核苷酸 (CpG

oligodeoxyribonucleotides, CpG ODNs), 核酶 (ribozyme) 和适体 (aptamer) 等。

1 寡核苷酸传递过程中的障碍

作为多聚阴离子大分子, ONs 在到达细胞内作用位点的过程中会遇到很多障碍, 因此形成一个有效的传递系统是非常必要的。没有天然的机制能促使这些亲水小分子穿过细胞膜, 同时它们自身的

[基金项目] (国家科技支撑计划 (NO. 2006BAD06A15); 农业公益性行业项目 (NO. 200803014))。

[作者简介] 张涛 (1981 -), 男, 博士生, 主要从事禽流感的靶向性治疗研究。E-mail: zhangtao1012450@163.com。

[通讯作者] 夏咸柱, 教授, E-mail: xia_xzh@yahoo.com.cn。

生物学活性也是非常有限的。ONs 具有很多优点:长度一般小于 30 bp,在传递难度上远远小于质粒 DNA(平均 7 kb);能通过化学合成产生,进行大规模生产,且具有较高的纯度;能进行化学修饰,具有更好的代谢稳定性和较高的生物利用率。但是 ONs 在体内传递过程中仍面临着很多问题,使其不能进入特定的靶细胞或组织内部从而有效地发挥其生物学活性。当前 ONs 在体内传递的主要障碍包括^[1,2]:1、肾脏的快速清除;2、血液和组织中核酸酶的降解;3、网状内皮系统中巨噬细胞摄取导致的肝脾吸收;4、不能通过毛细管内皮组织;5、缓慢的和细胞外基质连接并扩散;6、组织细胞无效的内吞;7、不能从内体中有效地释放。因此 ONs 若能有效地发挥生物学活性必须避免血液中核酸酶的快速降解及肾脏过滤或网状内皮系统产生的快速清除;必须穿过毛细管内皮获得到达靶细胞的入口,使其能够存在于细胞外基质中;必须能被靶细胞摄取,并能够从内体中释放到达细胞内的靶位点。一个有效地传递系统除了解决以上障碍同时还应当避免可能会引起的组织毒性或不适宜的免疫反应。

2 寡核苷酸基础上的靶向性传递策略

许多靶向性策略已经被研究使其能更方便有效的进行 ONs 在细胞或组织内特异性传递。这些策略一般分为两类:配体-寡核苷酸直接偶联和配体-靶向性纳米颗粒。一般将寡核苷酸的 3'或 5'端加以修饰以抵抗核酸酶的降解,同时引入靶向性配体像肽段和适体。阳离子聚合物和阳离子脂质是两种用于包裹寡核苷酸形成纳米颗粒的主要材料,这两类物质能够特异性的吸附到靶点上,同时这些阳离子纳米载体能产生“质子海绵效应”(proton sponge effect),可以帮助复合物从内体中释放^[3]。

2.1 HDL/LDL 介导的传递

使用胆固醇进行寡核苷酸的末端修饰是一个有效的传递策略,可以提高 ONs 的稳定性和细胞摄取能力。在体内通过和低密度脂蛋白(low-density lipoproteins, LDL)或高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)相互作用能提高细胞摄取能力。胆固醇和 siRNA 偶联后静脉注射小鼠肝脏能诱导载脂蛋白 B(apolipoprotein B, apoB)的沉默^[4],apoB 是胆固醇代谢中固有的蛋白,能够反应出体内胆固醇的水平。虽然研究显示需要较高的 chol-siRNA 剂量,但该研究第一次证明能够在体内使用这种方

法起到 RNAi 效应,具有重要的临床意义。除了 Chol-siRNA 外,siRNA 和胆汁酸、长链脂酸、油脂偶联也能提高体内细胞摄取和基因沉默的能力^[5]。研究显示 HDL 和 LDL 是胆固醇和 siRNA 偶联的主要载体,清蛋白是寡核苷酸和中链脂肪酸偶联的主要载体。研究还证明 siRNA 结合物摄取的有效性和选择性取决于和脂蛋白颗粒、脂蛋白受体和跨膜蛋白 Sid1 的相互作用。HDL 直接使 siRNA 进入肝脏、消化道、肾脏和生成类固醇的器官,然而 LDL 靶向性 siRNA 主要集中在肝脏。Sterghios 将 chol-siRNA 通过气管灌输进入肺内,这种情况下,在 6 h 后 p38MAP 激酶的 mRNA 沉默效应达 30%~45%^[6]。最近,Nishina 显示一种新的脂偶联 siRNA (Toc-siRNA)将 siRNA 端连接 α -生育酚进行修饰,当体内静脉注射 2 mg/kg 的 Toc-siRNA 时,能有效地降低 apoB 蛋白的表达^[7]。

2.2 叶酸盐(folate)介导的传递

叶酸盐受体(folate receptor, FR),一种 GPI-锚定的糖蛋白,在核酸药物传递过程中是一个非常有效的靶标。叶酸盐受体在许多癌症如卵巢癌、结肠癌、乳腺癌等中都过量表达,在正常组织细胞中的含量比较低。叶酸盐介导的靶向传递具有很多优点,如叶酸分子量非常小、无免疫原性、利用方便、化学合成简单。叶酸和脂质体、多聚物的结合物能够使它们结合到肿瘤细胞表面的叶酸受体上,通过内吞作用进入细胞。叶酸已在寡核苷酸的肿瘤靶向性研究中被使用。例如,Rait 显示叶酸受体靶向性的阳离子脂质体比非选择性的脂质体转染试剂能更有效地传递 anti-HER 寡核苷酸进入乳腺癌细胞^[8]。此外,叶酸包被的阳离子脂质体-寡核苷酸比单独使用的寡核苷酸显示出更长的系统循环时间,能够提高肿瘤的定位^[9]。Kim 研究显示聚电解质复合物(polyelectrolyte complex micelle, PEMC)基础上的纳米颗粒(直径 70 nm)可用于叶酸靶向性传递 AS-ODN。PEMC 是由 FOL-PEG-ODN 复合物与阳离子脂质或脂质体偶联形成的结合物。PECM 诱导肺癌细胞 A549 和口腔癌细胞 KB 中 GFP 表达水平显著的降低^[10]。最近的研究中,Zhang 提出一个新的策略用于 siRNA 的细胞型特异性传递,将 siRNA 非共价的偶联到叶酸上形成叶酸-寡核苷酸复合物,产生的复合物能够被特异性的细胞摄取并能显著沉默静脉内皮细胞和 KB 细胞表面叶酸受体的表达^[11]。

2.3 转铁蛋白 (transferrin) 介导的传递

转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TfR) 是在许多肿瘤细胞表面大量表达的糖蛋白。转铁蛋白受体介导的内吞在细胞内的路径已被阐明。内吞的转铁蛋白受体能够通过再次循环到细胞表面而不经细胞内的降解。和转铁蛋白受体特异性的抗体相比较,转铁蛋白更易大规模制备和商品化。因此转铁蛋白介导的传递已广泛用于各种靶标的研究,包括肿瘤、内皮细胞和脑。一般通过化学方法将转铁蛋白、抗转铁蛋白受体抗体或抗体片段结合到纳米颗粒表面。Heidel 将 siRNA 和阳离子环糊精聚合物压缩形成纳米颗粒,然后利用转铁蛋白使其靶向尤文肉瘤 (Ewing's sarcoma) 细胞,这种肿瘤细胞高表达转铁蛋白受体。当小鼠尾静脉注射 2.5 mg/kg 的 siRNA 时能够观察到特异性 EWS-FLI1 基因表达的沉默,并能相应的抑制肿瘤生长。经过检测这种环糊精基础上在系统性传递并不会引起相关的免疫反应,同时转铁蛋白靶向性纳米颗粒 M2 siRNA 的传递在非人灵长类的研究也显示其是非常安全的^[12]。

Pirollo 报道针对肿瘤特异性的抗 HER-2 siRNA 能够自我组装成 100 nm 左右的免疫复合物 (scL)。抗 HER-2 siRNA 包裹的 scL 能够通过沉默靶基因而用于肿瘤细胞的化学治疗。这种靶向性沉默在胰腺癌模型中能显著抑制肿瘤的生长^[13]。此外, Tietze 应用聚乙烯亚胺衍生物 (OEI-HD) 改进 siRNA 多倍体用于体内传递 RAN siRNA 到肿瘤细胞,同时转铁蛋白作为靶向性配体结合到多倍体中。转铁蛋白结合的 OEI-HD/siRNA 多倍体能够在体外特异性的 Neuro2A 移植瘤模型中降低 RAN 蛋白的表达。体内 RAN 蛋白表达的下调能够增加肿瘤细胞的凋亡,降低肿瘤的生长^[14]。

2.4 抗体介导的传递

抗体基础上的 ONs 靶向性传递已经用于肿瘤和白血病的治疗中。抗体具有高的特异性,对靶抗原具有较高的亲和力,能作为纳米颗粒中的靶向性成份。治疗性抗体像 trastuzumab (Herceptin), rituximab (Rituxan) 和 alemtuzumab (Campath) 已经用于乳腺癌和白血病的临床治疗中^[15]。抗体片段如抗体可变区片段 (Fab) 和单链抗体 (scFv) 与全抗体相比具有很多优点:分子量更小,同时缺乏恒定区 (Fc) 降低抗体在体内传递的干扰。已有大量文献报道能使用单克隆抗体直接传递 AS-ODNs 和

siRNA 到体内特定的细胞中。Song 设计鱼精蛋白-抗体的融合蛋白传递 siRNA 到 HIV 感染的 CD4 T 细胞中或表达 HIV 包膜的 B16 黑素瘤细胞中^[16]。这些 siRNA-抗体-鱼精蛋白复合物通过瘤内或静脉注射能特异性的传递 siRNA 到体内表达 HIV 包膜的肿瘤细胞内抑制肿瘤的生长。同时他们设计针对人整合蛋白淋巴细胞功能相关抗原-1 的单链抗体到抗体-鱼精蛋白系统中。这个系统对人白血细胞和激活的粒细胞具有非常好的选择性,能够有效的沉默初级淋巴细胞,单核细胞和树突状细胞内的相关基因^[17]。Wen 设计鱼精蛋白和针对 HBV 的抗体融合蛋白进行 siRNA 的体外、体内的特异性传递,显示 siRNA 能被靶向性传递到 HBV 感染的细胞和转基因小鼠中,有效的抑制 HBV 基因的表达,提高 siRNA 在 HBV 治疗中的临床应用^[18]。Zhang 设计针对 AIV 血凝素 (HA) 的抗体鱼精蛋白融合蛋白,显示该融合蛋白在体外能靶向性传递 siRNA 进入 AIV 感染的细胞,能有效的抑制禽流感病毒的复制^[19]。

Peer 研究显示当脂质体结合抗 $\beta 7$ 整合素的抗体时,体内输入细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1, CyD1) 的 siRNA 能够靶向激活白细胞。siRNA 加载脂质体纳米颗粒能选择性的在体内、体外传递 Cyclin D1 siRNA 到 $\beta 7$ 阳性细胞中。通过 siRNA 介导的 CyD1 基因沉默,在大肠炎小鼠模型中能观察到白细胞的表达被抑制,显示 CyD1 是抗炎反应的潜在靶标。其他抗体介导的 ONs 的传递包括针对乳腺癌的抗 HER2 抗体,针对恶性肿瘤的抗 CD19 抗体和针对成神经细胞瘤和黑色素瘤的抗 GD2 抗体^[20]。

2.5 肽段介导的传递

细胞渗透肽 (cell-penetrating peptide, CPP) 能够穿过细胞膜,因此在药物和核酸的靶向性传递中有着重要的作用。细胞渗透肽包括,蛋白转导区或膜易位序列,一般含短的正电荷肽段序列,大部分具有精氨酸/赖氨酸序列。肽段介导的寡核苷酸传递能通过直接结合或连接其他的传递系统,如脂质体或多聚物纳米颗粒。Chiu 连接 Tat 肽段 (含 YGRKKRRQRRR 序列) 到 siRNA 的反义链的 3' 末端,siRNA-Tat 肽段结合物能被细胞快速内化,有效的沉默靶基因^[21]。

另一肽段如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (arginine-glycine-aspartic acid, RGD) 模式已经被用于靶向整合素受体,该受体在肿瘤脉管系统中激活的内皮细

胞表达。Moschos 将 RGD 模式吸附到 PEG 末端形成分支的聚乙烯亚胺,形成的纳米颗粒用于 siRNA 的体内传递^[22]。

Kumar 通过合成含狂犬病毒糖蛋白 (rabies virus glycoprotein, RVG-9R) 29 个氨基酸的嵌合肽,能成功在体内进行 siRNA 的传递。siRNA 和带正电荷的 RVG-9R 形成的复合物携带 siRNA 进入神经元细胞,静脉注射后特异性的抑制基因表达。此外还发现 RVG-9R/siRNA 复合物能很好的保护被致死剂量日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus) 感染的小鼠^[23]。

2.6 适体 (aptamer) 介导的传递

适体已被用于位点特异性的寡核苷酸传递,因为它像抗体一样对靶标具有较高的亲和力和特异性,前列腺特异性的膜抗原 (prostate-specific membrane antigen, PSMA) 是在前列腺癌细胞和肿瘤血管内皮细胞表面过量表达的受体。PSMA 的特异性适体能激发特定细胞的摄取并产生 RNAi 介导的靶 mRNA 沉默。通过直接将适体和 siRNA 连接或利用生物素-抗生物素蛋白链菌素的亲和力进行偶联实现 RNAi 介导的基因沉默^[24]。适体与肽段和抗体等其他靶向性配体相比具有很多优点:免疫原性低、易大规模合成、成本低。此外它们能进行多种化学修饰,并且适体 ($< 15 \times 10^3$) 的分子量远小于抗体 (150×10^3)。

2.7 microRNA 介导的传递

最近研究人员通过 microRNA 的方法将溶瘤病毒 (oncolytic picornavirus) 进行改造用于靶向治疗, Kelly 将一段与肌肉组织特异的 microRNA 互补序列插入溶瘤病毒的基因组 3' 末端,再将该病毒感染患肿瘤小鼠。重组的病毒在皮下组织里具有正常的活性,能引发小鼠的致死性肌炎和病毒血症。但是在表达肌肉组织特异 microRNA 的细胞里,重组病毒无法复制并且不引起致死性的肌炎。同时载体效率高,不产生毒副作用^[25]。因此改造的病毒可能成为新的载体系统,用做定向基因治疗载体或药物治疗载体。

2.8 无唾液酸糖蛋白受体介导的传递

在肝实质细胞上大量表达与无唾液酸糖蛋白 (asialoglycoprotein) 具有高亲和力的表面受体,结合后受体通过内吞作用使蛋白内化可进入细胞内。为了获得肝实质细胞特异性的基因传递,可将半乳糖和阳离子聚合物或阳离子脂质体结合。当前研

究已经利用这种方法将基因传递到肝细胞, Oishi 通过酸不稳定连接构建了聚乙烯-siRNA 结合物。在细胞内体弱酸性条件下,这种共价结构被破坏, Lac-PEG-siRNA 的共价连接被断裂, siRNA 释放到 HuH-7 细胞能够有效地进行靶基因的沉默^[26]。Wu 成功的将 PLL 和非唾液血清类粘蛋白结合用于寡核苷酸到肝细胞的体内传递^[27]。

2.9 甘露糖受体介导的传递

哺乳动物的树突状细胞表达甘露糖受体或甘露糖相关受体,巨噬细胞也表达甘露糖受体。靶向巨噬细胞的基因传递对 Gaucher 和 HIV 疾病的治疗是非常有意义的。Kawakami 合成新型的甘露糖-胆固醇衍生物 (Man-C4-Chol), 在小鼠腹腔巨噬细胞中, Man-C4-Chol 脂质体形成的复合物比传统单独使用阳离子脂质体转染显示出更高的沉默效率^[28]。

2.10 其他传递系统

Li 设计 sigma 受体靶向性的脂聚阳离子纳米颗粒用于体内 siRNA 到肺转移瘤的传递^[29]。抗 EGF 受体的 siRNA (载体 DNA) 与鱼精蛋白和脂质体形成复合物颗粒,这个颗粒和 PEG 结合,然后使用茴香酰胺作为配体向肺癌细胞进行靶向性传递。茴香酰胺是 sigma 受体的一个配体。靶向性纳米颗粒能够有效地渗透到肺转移灶,当静脉注射 siRNA 150 ug/kg 复合物时能导致转移灶模型中 70% ~ 80% 的基因沉默。最近的研究中, Sato 报道维生素 A 能介导 siRNA 进入体内星状细胞,使用这种方法能在星状细胞内发现特异和显著的基因沉默,这种沉默能逆转肝硬化^[30]。

3 结论和展望

随着对人类疾病在分子水平上的更多了解,有效地设计 AS-ODN 和 siRNA 能够干扰特异性的靶标。核酸药物应用的一个巨大挑战是体内传递到靶细胞的特异性和有效性。化学修饰、纳米颗粒包裹和配体偶联到寡核苷酸都是提高其体内稳定性,药物代谢动力学和靶特异性非常好的策略。最近的很多研究显示靶向性传递技术可能带动寡核苷酸药物治疗的进一步发展。

参考文献:

- [1] Yu B, Zhao X, Lee LJ, et al. Targeted delivery systems for oligonucleotide therapeutics [J]. AAPS J. 2009, 11 (1): 195 - 203.
- [2] Juliano R, Alam MR, Dixit V, et al. Mechanisms and strategies for

- effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides [J]. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36(12):4158-71.
- [3] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta M, et al. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in vivo: Polyethylenimine [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995, 92(16):7297-301.
- [4] 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):173-78.
- [5] Wolfrum C, Shi S, Jayaprakash K, et al. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs [J]. *Nature biotechnology.* 2007, 25(10):1149-57.
- [6] Moschos S, Jones S, Perry M, et al. Lung Delivery Studies Using siRNA Conjugated to TAT (48 ~ 60) and Penetratin Reveal Peptide Induced Reduction in Gene Expression and Induction of Innate Immunity [J]. *Bioconjugate Chem.* 2007, 18(5):1450-59.
- [7] Nishina K, Unno T, Uno Y, et al. Efficient in vivo delivery of siRNA to the liver by conjugation of α -tocopherol [J]. *Molecular Therapy.* 2008, 16(4):734-40.
- [8] Rait A, Pirollo K, Xiang L, et al. Tumor-targeting, Systemically Delivered Antisense HER-2 Chemosensitizes Human Breast Cancer Xenografts Irrespective of HER-2 Levels [J]. *Molecular medicine.* 2002, 8(8):475-86.
- [9] Zhou W, Yuan X, Wilson A, et al. Efficient intracellular delivery of oligonucleotides formulated in folate receptor-targeted lipid vesicles [J]. *Bioconjugate Chem.* 2002, 13(6):1220-25.
- [10] Kim S, Jeong J, Mok H, et al. Folate receptor targeted delivery of polyelectrolyte complex micelles prepared from ODN-PEG-folate conjugate and cationic lipids [J]. *Biotechnology Progress.* 2007, 23(1):232-37.
- [11] Zhang K, Wang Q, Xie Y, et al. Receptor-mediated delivery of siRNAs by tethered nucleic acid base-paired interactions [J]. *RNA.* 2008, 14(3):577-83.
- [12] HEIDEL J, ZHONGPING Y, LIU J, et al. Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007, 104(14):5715-21.
- [13] PIROLLO K, RAIT A. Materializing the potential of small interfering RNA via a tumor-targeting nanodelivery system [J]. *Cancer research.* 2007, 67(7):2938-43.
- [14] Tietze N, Pelisek J, Philipp A, et al. Induction of apoptosis in murine neuroblastoma by systemic delivery of transferrin-shielded siRNA polyplexes for downregulation of Ran [J]. *Oligonucleotides.* 2008, 18(2):161-74.
- [15] Christiansen J, Rajasekaran A. Biological impediments to monoclonal antibody based cancer immunotherapy [J]. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2004, 3(11):1493-1501.
- [16] Song E, Zhu P, Lee S, et al. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors [J]. *Nature biotechnology.* 2005, 23(6):709-17.
- [17] Peer D, Zhu P, Carman C, et al. Selective gene silencing in activated leukocytes by targeting siRNAs to the integrin lymphocyte function-associated antigen-1 [J]. *PNAS.* 2007, 104(10):4095-100.
- [18] Wen WH, Liu JY, Qin WJ, et al. Targeted inhibition of HBV gene expression by single-chain antibody mediated small interfering RNA delivery [J]. *Hepatology.* 2007, 46(1):84-94.
- [19] Zhang T, Wang C-y, Zhang W, et al. Generation and characterization of a fusion protein of single-chain fragment variable antibody against hemagglutinin antigen of avian influenza virus and truncated protamine [J]. *Vaccine.* 2010, 28(23):3949-55.
- [20] Pagnan G, Stuart D, Pastorino F, et al. Delivery of c-myc Antisense Oligodeoxynucleotides to Human Neuroblastoma Cells Via Disialoganglioside GD2-Targeted Immunoliposomes: Antitumor Effects [J]. *Journal of the National Cancer Institute.* 2000, 92(3):253-61.
- [21] Chiu Y, Ali A, Chu C, et al. Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells [J]. *Chemistry & biology.* 2004, 11(8):1165-75.
- [22] Schifferers R, Ansari A, Xu J, et al. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle [J]. *Nucleic Acids Research.* 2004, 32(19):e149-e49.
- [23] Kumar P, Wu H, McBride J, et al. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system [J]. *Nature.* 2007, 448(7149):39-43.
- [24] Zhou J, Li H, Li S, et al. Novel dual inhibitory function aptamer-CsiRNA delivery system for HIV-1 therapy [J]. *Molecular Therapy.* 2008, 16(8):1481-89.
- [25] Kelly E, Hadac E, Greiner S, et al. Engineering microRNA responsiveness to decrease virus pathogenicity [J]. *Nature medicine.* 2008, 14(11):1278-83.
- [26] Oishi M, Nagasaki Y, Itaka K, et al. Lactosylated Poly(ethylene glycol)-siRNA Conjugate through Acid-Labile [beta]-Thiopropionate Linkage to Construct pH-Sensitive Polyion Complex Micelles Achieving Enhanced Gene Silencing in Hepatoma Cells [J]. *J Am Chem Soc.* 2005, 127(6):1624-25.
- [27] Papadopoulos S, Jürgens K, Gros G. Protein diffusion in living skeletal muscle fibers: dependence on protein size, fiber type, and contraction [J]. *Biophysical Journal.* 2000, 79(4):2084-94.
- [28] Nishikawa M, Sato S, Yamashita A. Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes [J]. *Gene therapy.* 2000, 7(4):292-99.
- [29] Li S, Chono S, Huang L. Efficient gene silencing in metastatic tumor by siRNA formulated in surface-modified nanoparticles [J]. *Journal of Controlled Release.* 2008, 126(1):77-84.
- [30] Li S, Chono S, Huang L. Efficient oncogene silencing and metastasis inhibition via systemic delivery of siRNA [J]. *Molecular Therapy.* 2008, 16(5):942-46.

修回日期)2010-08-24