

跨越溶酶体途径的核酸药物递送策略

欧萌^{1,2},闫银雨¹,马宇¹,洪瑾^{2*},丁娅^{1**}

(¹中国药科大学药学院药物分析系,南京 211198; ²中国药科大学理学院生物医学功能材料重点实验室,南京 211198)

摘要 核酸药物通过在细胞质或细胞核中发挥作用,调控基因表达,在获得性或遗传性疾病治疗以及疫苗开发等方面有重要意义。目前开发的多种核酸递送载体,通过细胞内吞经内体/溶酶体途径入胞,转染效率较低。本文介绍和分析了跨越溶酶体途径的核酸药物递送策略,包括膜易位、膜融合、受体/转运体介导的非内吞摄取和小窝介导的细胞摄取等,讨论了目前此类策略面临的问题和挑战,为核酸药物跨越溶酶体途径递送的发展提供参考。

关键词 核酸药物;胞质递送;溶酶体途径;膜易位;膜融合

中图分类号 R945 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2023)01-0034-15

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20221115001

引用本文 欧萌,闫银雨,马宇,等.跨越溶酶体途径的核酸药物递送策略[J].中国药科大学学报,2023,54(1):34–48.

Cite this article as: OU Meng, YAN Yinyu, MA Yu, et al. Nucleic acid drug delivery strategies without the lysosomal pathway [J]. J China Pharm Univ, 2023, 54(1):34–48.

Nucleic acid drug delivery strategies without the lysosomal pathway

OU Meng^{1,2}, YAN Yinyu¹, MA Yu¹, HONG Jin^{2*}, DING Ya^{1**}

¹Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;

²Key Laboratory of Biomedical Functional Materials, School of Science, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract By regulating gene expression, nucleic acid drugs functioning in the cytoplasm or nucleus are of great significance in the treatment of acquired or inherited diseases and vaccine development. A variety of nucleic acid delivery vectors currently developed are suffering from low transfection efficiency due to endosome/lysosome entrapment. This paper introduces and summarizes the nucleic acid delivery strategies that bypass the endosomal/lysosomal pathway, including membrane translocation, membrane fusion, receptor/transporter-mediated non-endocytic uptake and caveolae-mediated endocytosis, and discusses the problems and challenges facing such strategies, aiming to facilitate the development of intracellular delivery of nucleic acid drugs bypassing lysosomal pathway.

Key words nucleic acid drugs; cytosolic delivery; lysosome pathway; membrane translocation; membrane fusion

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31870946, No. 32271453), and China Pharmaceutical University Double-First Class Prospective Project (No. CPU2022QZ12)

近年来基因疗法发展迅猛,已有十余种核酸药物[包括反义寡核苷酸(ASO)、小干扰RNA(siRNA)和信使RNA(mRNA)等]被批准上市,还有众多核酸药物已进入临床研究阶段。核酸药物通过基因

抑制、添加、替换或编辑等方式,调控相关基因的表达,用于获得性或遗传性基因紊乱引起的疾病的治疗,以及创新疫苗制剂的开发^[1]。核酸药物功能的发挥需要进入细胞质(如 ASO、siRNA 和

收稿日期 2022-11-15 通信作者 *Tel:025-86185163 E-mail:tiankonghj@163.com

**Tel:18915948060 E-mail:dingya@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 31870946, No. 32271453);中国药科大学“双一流”前瞻项目(No. CPU2022QZ12)

mRNA 等)或细胞核(如 DNA 和成簇规律间隔短回文重复序列 CRISPR 等)。因此,如何将带负电的亲水大分子核酸有效转运到胞内是核酸药物应用的主要挑战之一^[2]。

目前,多种核酸药物递送技术得到了广泛研究和发展。根据载体的来源,核酸药物递送体系可分为病毒载体和非病毒载体^[3]。虽然,重组病毒载体展现出良好的转染效率,但由于存在免疫原性、有限的基因携带能力、潜在的致突变和致癌风险等局限性,其应用受到限制^[4]。非病毒核酸递送方法包括膜破坏性的物理递送方法,以及使用合成载体的化学递送方法。物理递送方法无需封装核酸药物,通过使用电穿孔、声穿孔、显微注射或机械变形等技术暂时破坏细胞膜,使核酸药物直接入胞,但存在着低通量、细胞损伤、需要特制仪器设备,以及体内应用受限等问题^[5]。

基于非病毒载体的化学递送方法,通常使用脂质纳米颗粒(LNP, 包括可电离脂质、辅助脂质、胆固醇和聚乙二醇-脂质等成分)或可电离/阳离子胺基聚合物等合成载体压缩和封装核酸药物。相比于病毒载体和物理方法,非病毒化学载体具有更好的生物安全性和生物相容性、更简单的制备

工艺,以及更低的生产成本等优势,应用前景广阔。已被美国 FDA 正式批准上市的针对新型冠状病毒感染(COVID-19)的两种 mRNA 疫苗 Comirnaty(BNT162b2)和 Spikevax(mRNA-1273)均使用 LNP 作为核酸药物载体^[6]。然而,负载核酸的合成载体经细胞摄取后通常会经过内体/溶酶体途径,在溶酶体酸性环境下(pH 4~5),核酸药物易发生降解,转染效率降低^[7]。尽管目前已发展出多种溶酶体逃逸策略,如质子泵效应介导的渗透裂解、内体膜去稳定化,以及内体膜融合等,但内体/溶酶体逃逸效率仍十分有限。以 siRNA 为例,其内体逃逸效率不足 1%^[8]。溶酶体困境仍是目前核酸递送效率低下的主要原因之一,而跨越内体/溶酶体途径、直接入胞的策略可从根本上提高核酸药物的递送效率,使其具有更高的生物利用率。

本文总结了目前基于非病毒载体的递送方法,重点讨论跨越内体/溶酶体途径、直接胞质递送核酸药物的策略,主要包括膜易位、膜融合、受体/转运体介导的非内吞摄取和小窝介导的摄取等(图 1)。此外,还讨论了递送载体的入胞机制,及其在活细胞/体内的应用性,为促进核酸药物高效递送及治疗领域的发展提供参考。

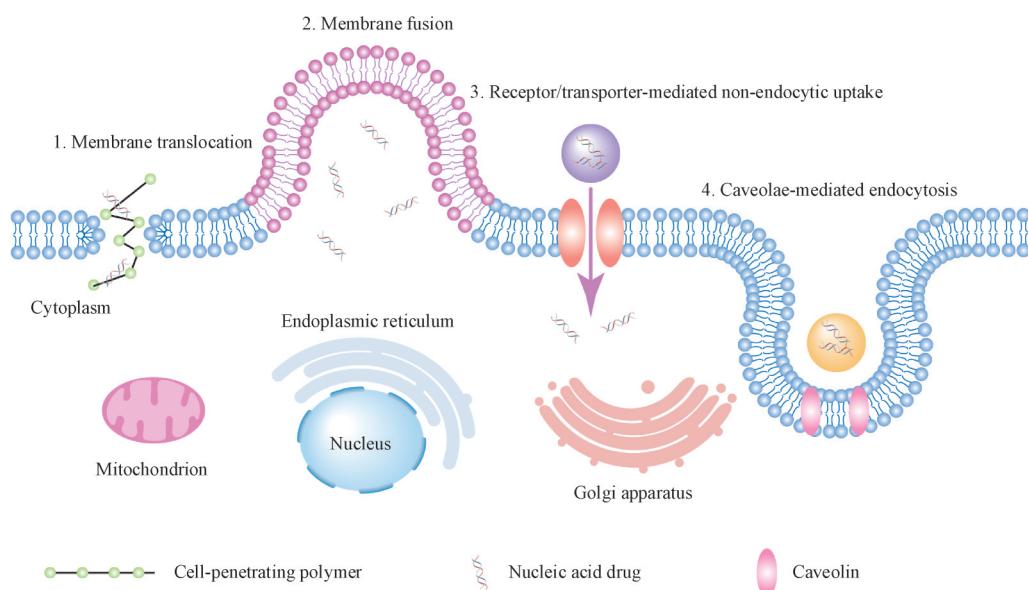


Figure 1 Schematic illustration of intracellular delivery strategies for nucleic acid drugs without endosome/lysosome pathway

1 膜易位

特定的化学基团与细胞膜上的分子发生相互作用后,使细胞膜去稳定化,引起细胞外物质直接

跨膜易位进入细胞质。细胞穿透肽(cell penetrating peptides, CPPs)及其衍生物细胞穿透聚二硫化物[cell penetrating poly (disulfide)s, CPD]是两类

广泛使用的具有直接跨膜性质的聚合物载体,可以将负载的货物直接递送到胞质中,避免经过内体/溶酶体途径。

1.1 细胞穿透肽(CPPs)

CPPs,也被称为蛋白转导域(protein transduction domains, PTDs),是一类可跨膜直接进入细胞内部的多肽,其长度一般不超过40个氨基酸残基^[9]。1988年首次报道了来源于人免疫缺陷病毒(HIV)的反式转录因子蛋白(Tat蛋白)具有膜易位能力,随后涌现出大量可以实现膜易位的天然或合成的CPPs。其中,对富含精氨酸的阳离子CPPs的研究和应用最为广泛^[10-11]。精氨酸的胍基质子化后,不仅能与细胞表面的阴离子磷酸盐、碳酸盐和/或硫酸盐发生静电相互作用(图2),还能与之形成双齿氢键,使CPPs紧密附着于细胞膜,通过形成反胶束或膜孔等可能的机制诱导细胞膜去稳定化,触发跨细胞膜易位^[12]。在易位到细胞内层膜后,CPPs与细胞内的阴离子发生反离子交换而从细胞膜上脱离,进入胞质。

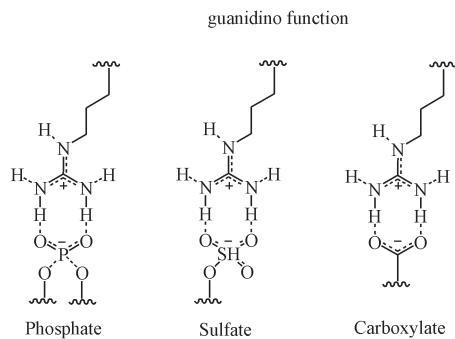


Figure 2 Guanidine group of arginine has the electrostatic interaction and forms bidentate hydrogen bonds with anionic molecules on the cell surface^[10]

经典的CPPs(如Tat肽等)通常需要较高的浓度(>10 μmol/L)才实现核酸药物的有效跨膜易位,但高浓度的CPPs可能会造成细胞膜的持续性破坏和细胞毒性。Kauffman等^[13]以Tat肽和penetratin为母代序列,通过合成分子进化(synthetic molecular evolution, SME)的方法,建立了含有8 192个Tat/penetratin杂合肽的CPP化合物库,并将CPP与肽核酸(PNAs,一种碱基连接于中性肽骨架上的核酸类似物)共价偶联,筛选出了在低浓度下(5 μmol/L),能将PNA705以非内吞的方式高效递送至胞内的P14嵌合体(序列为RKKRWFRRRRPKWKK)。在

低浓度下,P14-PNAs的细胞毒性低,但递送效率超过母体CPPs大约2个数量级。

除了形成CPPs-核酸共价偶联物,CPPs也能通过非共价的方式(静电相互作用和疏水相互作用)与核酸药物结合。在CPPs上修饰疏水尾,有利于形成CPPs-核酸纳米复合物,并提高CPPs与细胞膜的亲和力,增强CPPs的膜扰动作用,促进易位作用^[14]。在线性细胞穿透肽P1(RRLKRLRRRLKRL)的赖氨酸残基上修饰酰肼基团,利用腙键连接带有醛基的疏水尾部,通过考察连接不同疏水尾部的两亲性CPPs的转染效率,筛选出转染效率最佳的偶联十八烯醛的CPP(P1T₂₅)。通过分子动力学(MD)模拟发现,P1T₂₅破坏了脂质结构,诱导膜脂质重组,这与瞬时膜孔产生以及直接跨膜易位有关^[15]。

研究表明,环化的富含精氨酸的CPP(cCPPs)相比于其线性形式能更有效地以非内吞方式被细胞摄取。例如,环化Tat肽(cTat)比线性Tat肽提前约15 min进入细胞,且在细胞中的累积水平更高^[16]。这是由于环化之后,CPP结构刚性增加,胍基基团之间的距离增大,使得cTat更快更紧密地与细胞膜相互作用,促进易位过程。基于此策略,合成了偶联绿色荧光蛋白(GFP)纳米抗体的环寡聚精氨酸(GBP-cR₁₀),GBP-cR₁₀可将治疗性融合蛋白Mecp2-GFP以非内吞依赖的方式递送至胞内^[17]。除此之外,为促进核酸的释放,可以构建还原敏感的cCPPs,如含有二硫键的环状CPP(Ac-C(WR)₄CG-NH₂)能将siRNA高效递送至胞质。不仅如此,与非还原响应的硫醚环化肽[硫醚-(WR)₄CG-NH₂]相比,含有二硫键的环肽在肿瘤细胞内高浓度谷胱甘肽(GSH)的环境中可发生还原开环,接着发生肽水解,使得沉默TTF-1转录因子的siRNA与多肽载体快速分离,在A549细胞中达到超过90%的沉默效率^[18]。

受具有跨膜易位能力的CPPs启发,一系列具有胍基阳离子和不同合成聚合物骨架的细胞穿透肽模拟物被设计用于直接胞质递送货物^[19-22]。胍基封端并偶联疏水十八烯基的聚天冬氨酸胶束被设计用于直接胞质递送pEGFP和BSA,发现尺寸更小(<200 nm)以及胶体稳定性良好的聚合物/货物复合物更易通过非内吞的方式进入细胞^[21]。以聚降冰片烯为骨架,通过引入寡聚精氨酸侧链,可以得到细胞穿透聚合物。经筛选,每个侧链上连

接有 2 个精氨酸残基,且以己酸为柔性间隔链的聚降冰片烯(PTn-R2-C6)具有较高的成孔活性和较低的细胞毒性,可以将萤光素酶报告质粒 pGL4.13

快速递送至胞质溶浆中(图 3)。通过优化将聚合度调整至 25,得到转染效率高于金标准转染试剂 PEI 25K 的载体 PT25-R2-C6^[22]。

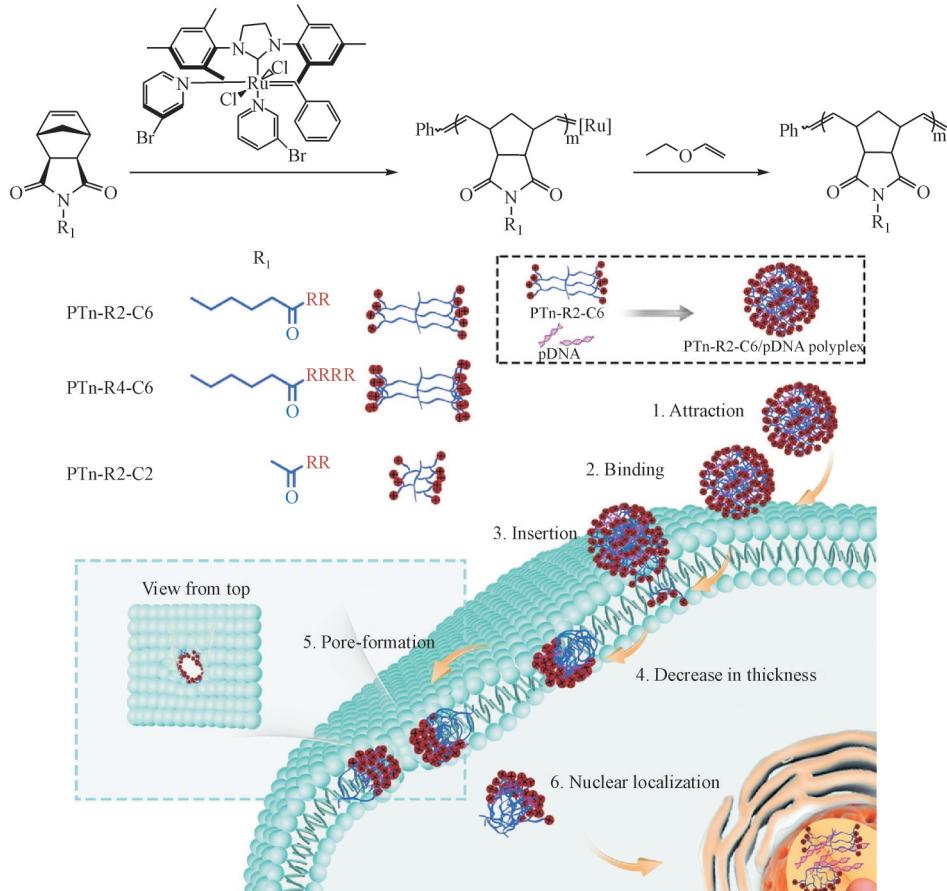


Figure 3 Schematic illustration of the synthesis of the cell penetrating polymers and the cellular internalization of the PTn-R2-C6/pDNA polyplex through direct translocation mechanism^[22]

CPPs 合成工艺成熟可控,是直接胞质递送核酸药物的常见且有力工具。但由于此类载体缺乏组织/细胞特异性,并且载体的强正电荷导致的膜扰动与破坏,具有一定的细胞毒性,因此, CPPs 类载体更适合用于局部给药。目前, CPPs 类载体仍未进入临床试验,为提高 CPPs 载体的体内可用性,可以考虑在 CPPs/核酸复合物表面添加刺激响应的 PEG 部分,延长复合物在体内的循环时间,屏蔽复合物在到达靶组织/细胞前的部分正电荷,减少对非靶组织/细胞的毒性。

1.2 细胞穿透聚二硫化物(CPDs)

CPDs 是 CPPs 的重要衍生物,近年来被广泛关注和研究。CPDs 同样富含胍基阳离子,不同之处是在 CPPs 的多肽主干中插入了多个二硫键。由于

细胞表面表达硫醇分子以抵御氧化环境,CPDs 可以与表面的硫醇分子发生动态共价二硫键交换,实现膜易位。之后,CPDs 与细胞内 GSH 发生二硫键交换,从细胞膜的内表面分离至细胞内部,并发生后续的还原响应降解(图 4)。经过以上硫醇介导的摄取过程,CPDs 不仅可以绕过内体/溶酶体途径,以非内吞依赖的方式进入胞质中,其还原响应解聚的性质还避免了持续的膜扰动,相较于 CPPs,生物安全性更高^[23]。

带大量负电荷的核酸药物可以通过静电相互作用与 CPDs 非共价结合,形成 CPDs/核酸复合物。以硫醇修饰的 β -环糊精(β CD-SH)为引发剂,通过开环聚合可以得到星形聚合物载体 β CD-CPD。其中, β CD 通过疏水相互作用负载喜树碱(CPT),CPDs 通

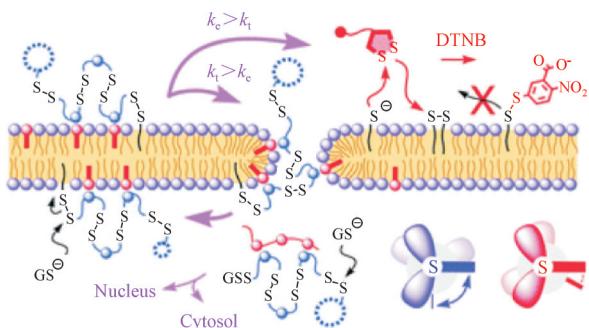


Figure 4 Schematic illustration of direct translocation mechanism of CPDs^[23]

过静电相互作用结合miRNA-203。 β CD-CPD-miR-203复合物与HeLa细胞共孵育2 h后,均匀分布于胞质中,与溶酶体无明显共定位;同时,通过使用内吞抑制剂和硫醇封闭剂确证复合物通过硫醇介导的非内吞途径直接易位进入细胞。进入细胞后,载体 β CD-CPD在GSH的作用下快速解聚,释放出CPT和miRNA,实现联合治疗,表现出最强的细胞毒性和生存素(survivin)表达抑制效果^[24]。此外,含有阳离子二乙烯三胺(DET)基团或胍基基团的两种硫辛酸衍生物单体可共聚生成DET-CPD。其中,可质子化的DET增强内体/溶酶体逃逸能力,胍基有利于直接跨细胞膜易位。DET-CPD可用于递送不同形式(质粒、mRNA和核糖核蛋白)的CRISPR/Cas9体系。研究DET-CPD/Cas9质粒纳米复合物的细胞摄取机制发现,复合物主要通过硫醇介导的非内吞方式直接入胞,同时网格蛋白介导的内吞也参与了少量细胞摄取。在293T细胞中,被递送到胞质内的CRISPR/Cas9体系成功靶向CCNE1基因位点并发挥基因编辑作用,并且DET-CPD/Cas9质粒复合物在药物诱导的暴发性肝衰竭小鼠模型中有效发挥治疗作用^[25]。

除了直接与核酸药物形成复合物外,CPDs还可以修饰于负载核酸的纳米颗粒(如介孔二氧化硅纳米粒,MSNs)表面,赋予其绕过内体/溶酶体途径进入细胞的能力。表面涂覆有CPDs的MSNs被用于同时直接向胞质递送3种诊疗组分:miR-21小分子抑制剂sm21、miR-21拮抗剂Ant21(ASO类似物)和聚乙二醇(PEG)连接的凋亡检测肽DEVD-AAN。sm21和Ant21协同抑制内源性miR-21的活性,其治疗效果可以用caspase响应的DEVD-AAN进行双光子荧光成像监测^[26]。类似地,表面连接

CPDs和猝灭剂BHQ-2的MSN纳米猝灭剂(qMSN)被用于负载生存素mRNA小分子抑制剂YM155,同时猝灭表面吸附的四甲基罗丹明(TMR)标记的ASO(靶向生存素mRNA)的荧光。qMSN经非内吞途径进入细胞后,门控分子TMR-ASO与内源性生存素mRNA杂交互补,从qMSN表面脱离,荧光恢复;同时负载的药物释放,抑制生存素mRNA的表达。因此,该纳米体系可以实现对内源性生存素mRNA的荧光定量,并能根据胞内生存素mRNA的水平来释放负载的抑制剂(图5)^[27]。

近来,在递送寡核苷酸药物时,为避免CPDs载体单独合成的繁琐操作,可通过寡核苷酸模板辅助CPDs聚合(template-assisted polymerization)的方法直接制备寡核苷酸纳米球(ONs NPs)。在此方法中,无需引发剂,含有胍基阳离子的二硫化物单体通过多重盐桥紧密吸附并排列于ONs模板上,单体的有效局部浓度增加,从而促进自发开环聚合反应的发生和ONs NPs的形成。ONs NPs通过硫醇介导的摄取直接进入胞质中,并在还原性胞质环境中发生解聚,释放ONs发挥基因沉默功能。用该方法递送靶向生存素mRNA的ON,成功降低HeLa细胞中生存素蛋白的表达并诱导细胞死亡,疗效优于商用转染试剂LipofectamineTM 3000(图6)^[28]。此策略还可用于递送其他相对分子质量较小的核酸类药物,如核酸类佐剂。含有胍基的二硫化物单体与CpG-ODN以及筛选出的高免疫原性H22新抗原自组装形成硫醇化纳米疫苗,硫醇介导的直接易位避免了新抗原与佐剂在内体/溶酶体中的降解,增加了抗原呈递细胞(APCs)的摄取和交叉递呈的效率,显著延长了H22荷瘤小鼠模型的生存期^[29]。类似地,干扰素基因刺激因子(STING)激动剂2',3'-环-GMP-AMP(cGAMP)与CPDs单体自组装并与Mn²⁺配位,形成纳米疫苗。聚硫化物使得免疫佐剂cGAMP和Mn²⁺以内吞非依赖的方式直接进入胞质,刺激STING,促进细胞因子分泌,抑制B16F10原位肿瘤的生长并建立长期免疫记忆^[30]。

CPDs类载体通过独特的硫醇介导的膜易位机制直接入胞,可以将不同类型的核酸药物高效递送到胞浆;并且,由于具有还原响应的性质,CPDs的生物相容性和生物安全性优于CPPs。因此,不管在临床前研究中,还是对于未来的临床转化,

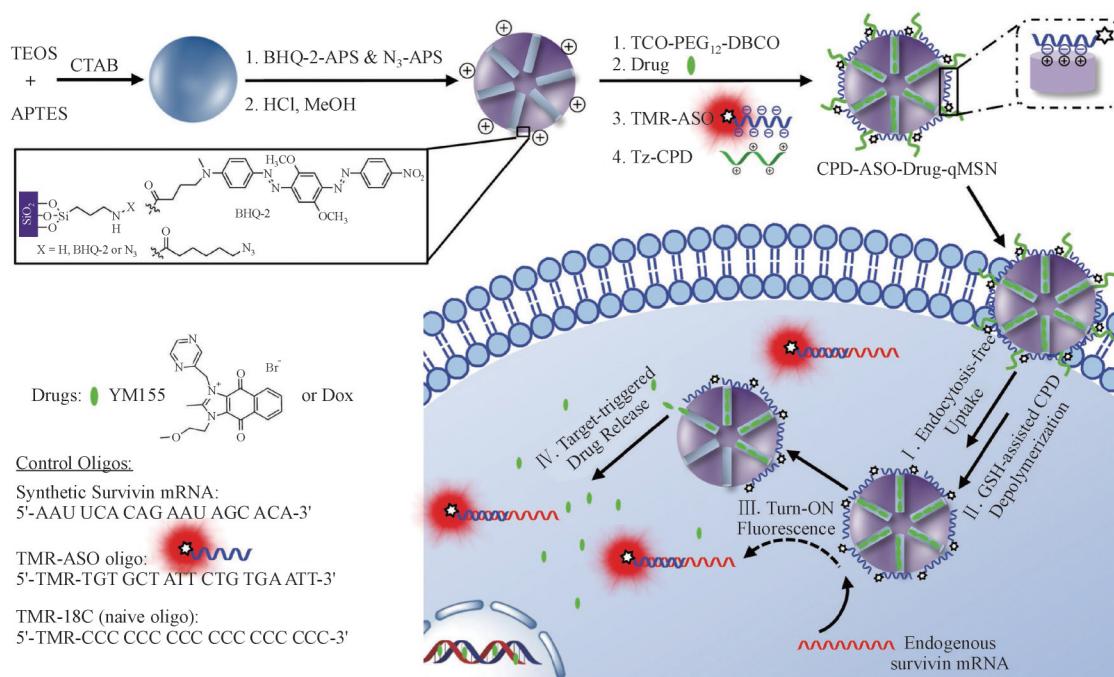


Figure 5 Schematic representation of CPDs-facilitated transmembrane transport of MSN-based theranostic nanosystems^[27]

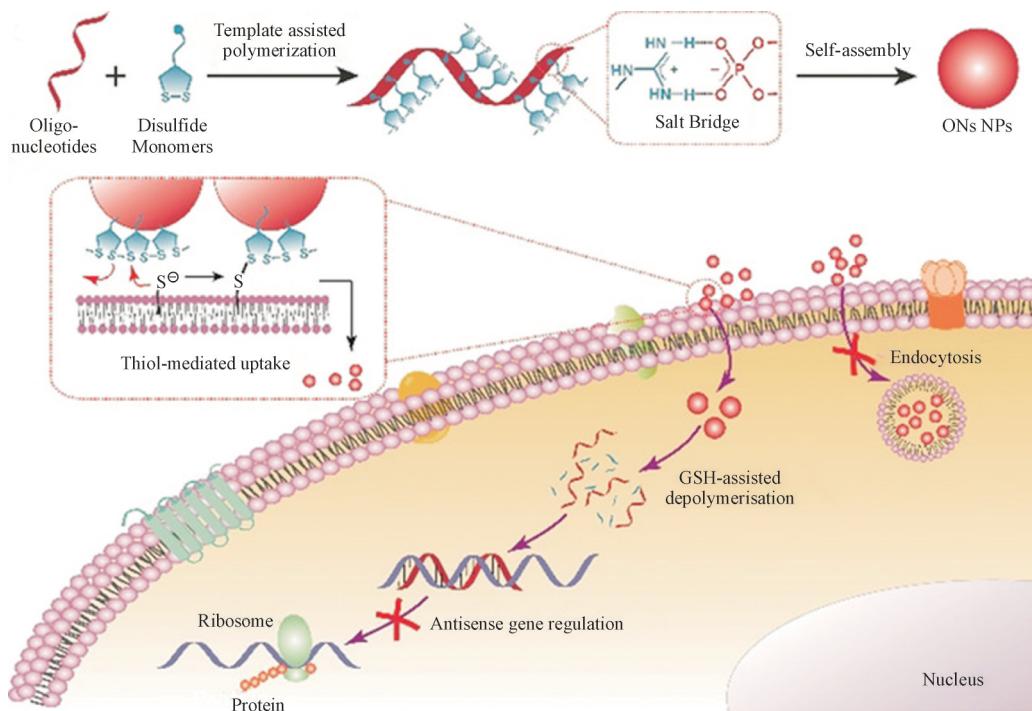


Figure 6 Schematic image of the assembly and thiol-mediated uptake of ONs NPs^[28]

CPDs 都具有巨大的发展前景。在后续的研究中, 可以考虑设计基于 CPDs 的具有组织/细胞特异性和平按需释放功能的纳米递送平台, 用于实现核酸药物的时空精准释放和起效。

2 膜融合

膜融合是实现细胞间信息交流与货物运输的基本生理过程, 发生于整个生命周期中。膜融合过程中, 在融合蛋白的作用下, 膜的距离被拉近,

脂质双层结构发生局部去稳定化和脂质重排,形成融合孔并扩大,最终两个单独的脂质层融合为一个连续的脂质层,使得细胞内容物发生混合^[31]。受此自然现象的启发,研究人员开发了人工膜融合系统,并用于核酸药物递送。通过与靶细胞发生膜融合,被负载的核酸药物直接进入胞质,不受内体/溶酶体限制,递送效率提高。目前已开发出多种膜融合策略,主要基于调整脂质体配方和参考天然膜结构及组分等方法进行载体设计和修饰。

2.1 合成脂质体介导的膜融合

目前已发现多种含不同组成成分的脂质涂层具有介导膜融合的功能。一种由二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、(2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺(DOTAP)和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-PEG)3种成分组成的脂质涂层可以实现有效的膜融合。其中DMPC作为主要的脂质成分,在脂质涂层中占比70%以上,由于其具有适宜的相转换温度(24 °C),在生理温度(37 °C)下为流态液晶相,具有一定的稳定性和结构灵活性,有利于膜融合。DOTAP作为阳离子脂质成分,可以吸引带负电荷的质膜,促进脂质层与质膜的接触和融合;PEG部分作为脱水剂,使融合脂质涂层与质膜之间的间隙脱水,在结构和能量上有利于膜融合的发生^[32]。

在以上3种脂质成分组成的融合脂质层上引入靶向肽,或者将脂质层与细胞膜杂交,再涂布于负载siRNA的纳米颗粒表面,可获得具有膜融合功能的靶向型脂质涂层纳米粒,实现特异且高效的基因沉默。例如,用多孔硅纳米颗粒(pSiNP)高效率负载沉默Irf5的siRNA,并在其表面涂覆修饰有M1型巨噬细胞靶向肽的膜融合脂质涂层,得到抗细菌感染的融合纳米体系(F-siRF5-CRV)。F-siRF5-CRV特异性地与巨噬细胞发生膜融合后,pSiNP在胞浆中迅速溶解,释放siRNA药物,在体外达到与标准转染试剂Lipofectamine相当的沉默效率(图7)。在体内,F-siRF5-CRV通过抑制巨噬细胞的炎症表型并促进巨噬细胞对病原体的吞噬作用,显著延长致死剂量的金黄色葡萄球菌感染的小鼠肺炎模型的生存期^[33]。类似地,该融合纳米体系也被用于负载沉默Rev3l的siRNA(C-FNPs),抑制肿瘤细胞DNA修复并实现化学增

敏;或负载沉默PI3K γ 的siRNA(T-FNPs),用于重编程肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)^[32]。除此之外,脂质层与血小板膜杂交后,涂布于负载miRNA-21的MSNs表面,使其靶向至心肌缺血区的炎性单核细胞,实现炎症巨噬细胞的修复性重编程^[34]。

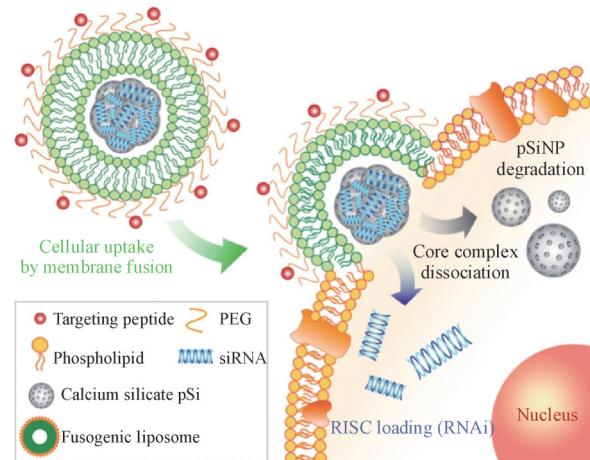


Figure 7 Schematic illustration of cellular uptake and mode of action of fusogenic pSiNPs with the components of DMPC, DOTAP and DSPE-PEG^[33]

另外,研究人员还开发出具有其他组分的膜融合脂质体,例如,二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、胆固醇琥珀酸单酯(CHEMS)和DSPE-PEG组成的脂质体已被报道通过膜融合方式直接胞质内递送DNA和短发夹RNA(shRNA)药物,用于肿瘤治疗^[35-37]。

膜融合脂质体由于具有类似细胞膜的脂质双层和特定的成分而能够与细胞膜融合。膜融合脂质体合成方法成熟简单,具有载药量高以及表面易修饰的特点,并且通过掺入靶向配体等方式,可以实现与靶细胞的膜融合。目前报道的膜融合脂质体成分多样,但未有研究指出具有何种成分的脂质体能更有效地实现核酸药物的直接胞质递送。此外,为促进膜融合脂质体的发展和临床转化,可以进一步探究具有膜融合效率更高和稳定性更好的脂质体组成。

2.2 仿生纳米颗粒介导的膜融合

将整个细胞膜涂覆在纳米粒子表面,或者将单个细胞成分如膜蛋白整合到人工纳米体系中,可以制备得到仿生纳米颗粒,通过模拟自然界中广泛存在的细胞-细胞膜融合行为,实现核酸药物的直接入胞^[38]。

2.2.1 天然细胞膜涂层 天然细胞膜表面表达的各类融合蛋白(如 AFF-1、EFF-1、CD9 以及 SNARE 等), 通过拉近细胞间的距离以及诱导膜去稳定化等过程来介导细胞间的膜融合^[39]。使用天然细胞膜包被纳米粒子是一个制备膜融合纳米体系的有效方法, 同时, 细胞膜修饰还可以提高纳米粒子在生理环境中的稳定性, 延长循环时间并赋予其同源靶向的性质。

将心脏成纤维细胞(CFs)重编程为诱导心肌细胞样细胞(iCM)对于心肌功能的再生有重要意义。在负载有 miRNA 1、133、208 和 499(miR Combo)的 MSNs 上使用 FH 肽修饰的中性粒细胞膜(FNLM-miR), 利用中性粒细胞归巢炎性部位以及 FH 肽与 CFs 表面肌腱蛋白-C(TN-C)特异性结合的性质, FNLM-miR 可特异性靶向至受损心肌中的 CFs, 通过膜融合的方式将 MSNs-miR 直接递送到胞质中并发生随后的 MSNs 降解和 miR Combo 释放, 在体外和体内成功将 CFs 重编程为功能性 iCM。系统性给药后, FNLM-miR 有效改善心肌缺血再灌注损伤小鼠模型的心脏纤维化, 且具有良好的生物安全性^[40]。

circBBS9(一种非编码的环状 RNA)通过 circBBS9/miR-423-3p/Traf6 轴在单核破骨前体细胞(pOCs)的融合中发挥调节作用, 敲低 circBBS9 能特异性抑制 pOCs 的多核化, 缓解多核破骨细胞(mOCs)的过量生成, 有效治疗骨质疏松等溶骨性疾病。基于此, 研究人员使用 ROS 响应的阳离子聚合物封装 siRNA/shRNA^{circBBS9} 药物, 并用 pOCs 细胞膜(POCM)包被复合物核心(POCM-NPs@RNA)。由于 POCM 高度表达迁移与靶向相关蛋白如 CXCR4、CDC42 和 RAC2, 以及融合相关蛋白如 CD44 和 OSCAR, 因此 POCM 涂层赋予了 NPs@RNA 靶向破骨细胞和膜融合的性质。与没有细胞膜伪装的 NPs@siRNA 和巨噬细胞膜修饰的 MM-NPs@siRNA 相比, POCM-NPs@siRNA 可被破骨细胞特异性摄取, 并通过非内吞依赖的膜融合方式直接将 RNA 药物递送至胞浆中。在小鼠骨质疏松模型中, POCM-NPs@siRNA/shRNA^{circBBS9} 实现了有效的骨归巢和骨保护^[41]。

天然细胞膜修饰的纳米颗粒具有生物相容性良好的优点, 但制备过程的复杂性和高成本是其临床转化需要解决的问题。

2.2.2 外泌体 外泌体是天然细胞分泌的细胞外囊泡, 来源于内体区室/多泡体(MVB), 具有非免疫原性和良好的生物相容性等特点。外泌体可携带核酸、蛋白质、脂质等多种内源性成分, 参与细胞间信息通讯, 因此也被开发作为递送外源性生物大分子至受体靶细胞的有效载体。另外, 由于外泌体膜上有融合蛋白, 外泌体可以通过非内吞依赖的膜融合将核酸药物直接递送到胞浆中^[42]。基于此, 研究人员利用叶酸(FA)修饰的外泌体以膜融合的方式将沉默生存素的 siRNA(FA/Exo/Sur)靶向递送至表面表达 FA 受体的 KB 细胞胞质中, 避免内体捕获, 而直接共价偶联 FA 的 siRNA(FA-Sur)与内体/溶酶体有较高共定位, 在体外, FA/Exo/Sur 能沉默约 60% 的生存素 mRNA, 而 FA-Sur 处理没有实现明显的基因沉默作用。在结直肠癌小鼠模型中, FA/Exo/Sur 治疗组的肿瘤抑制效果最显著^[43]。

外泌体的制备过程费时耗力, 同时, 将核酸药物导入到外泌体中也需要热激或电转等较复杂精细的操作, 且外泌体的载药量较低。此外, 除了需要递送的外源性核酸药物, 外泌体中还可能存在其他内源性生物分子, 这些物质对于受体靶细胞的影响还需进一步探究。

2.2.3 细胞膜相关组分修饰 虽然利用天然的膜结构修饰载体或直接负载货物是有效且生物相容性良好的实现膜融合的方法, 但制备这些天然膜来源的融合纳米系统需要专门的仪器设备和复杂费力的操作。选择将细胞膜(或病毒包膜)上具有融合功能的成分如融合蛋白(或其模拟物)或胆固醇单独集合在纳米粒子表面可以避免上述缺陷, 是较为简单而可信赖的实现膜融合介导的细胞摄取的方法。

1) 融合蛋白(或其模拟物)修饰 目前研究最广泛的融合蛋白之一是参与神经系统细胞间通讯的 SNARE 超家族(可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体)蛋白。表达在相对的膜表面的 SNARE 蛋白通过形成四螺旋卷曲螺旋束, 迫使膜之间的距离缩小至 2~3 nm, 诱导脂质重排和相邻的脂质双层融合^[31]。受 SNARE 蛋白复合物介导膜融合的启发, Kros 课题组开发了可互补形成卷曲螺旋的肽“E₃”(EIAALEK)₃ 和 “K₃”(KIAALKE)₃, 并通过 PEG 连接链偶联脂质分子使其插在磷脂层

中,得到膜融合脂质体。筛选不同的脂质锚发现,连接胆固醇的互补肽 CPE₃ 和 CPK₃ 原位修饰的脂质体之间的融合效率最高^[44]。除了用可互补肽形成卷曲螺旋,还可利用膜锚定的互补杂交 DNA 链拉近脂膜之间的距离,从而引发膜融合。偶联两个胆固醇锚的 DNA 链被设计插在磷脂双层中,并通过互补形成“拉链”样的杂交结构,使得修饰互补 DNA 链的囊泡紧密接近,诱导膜融合且不造成囊泡内容物的泄漏^[45]。可以利用膜相分离的策略来增加膜锚定的胆固醇-DNA 链介导的膜融合效率。例如,在含有 DOPC、DOPE 和胆固醇的囊泡中添加 DSPC 制备得到的相分离膜,可用于包载荧光标记的寡核苷酸,并通过膜融合将其靶向递送至表面修饰有互补 DNA 链的囊泡中。此外,该膜融合体系还可以实现无细胞蛋白质合成。将修饰有互补 DNA 链的囊泡分别装载编码绿色荧光蛋白的质粒或商业无细胞蛋白质合成体系(PURExpress),相应的荧光蛋白会在融合后的囊泡中表达,且含有相分离结构域的互补囊泡由于融合效率更高,囊泡中的荧光强度也更高,而非互补的囊泡之间无法发生膜融合,囊泡中的荧光强度基本不变^[46]。模拟 SNARE 蛋白之间形成卷曲螺旋束是较为简单的诱导膜融合的方式,但在递送核酸

药物时,需要对纳米粒子和细胞膜表面均进行修饰,而原位细胞膜修饰较为困难,因此该策略的体内应用可能会受到限制。

包膜病毒与宿主细胞间发生的膜融合使得病毒的基因组进入细胞中。早期有将灭活的病毒与脂质体混合以制备融合脂质体用于直接胞质递送基因药物的报道,但出于生物安全性方面的考虑,只将具有诱导膜融合功能的病毒融合蛋白修饰在脂质膜表面来构建模拟病毒的融合纳米粒子是更好的选择^[47]。病毒融合蛋白在生理条件变化(如 pH 降低)的刺激下发生构型变化,从而诱导病毒包膜与细胞膜的融合,使病毒的遗传物质进入细胞质中。水疱性口炎病毒刺突蛋白 G(VSVG)是一种 pH 响应性病毒融合蛋白,将 VSVG 修饰在 M1 型巨噬细胞来源的细胞外囊泡(EVs)表面并负载抗-PD-L1 siRNA(siRNA@V-M1 EV),可用于肿瘤免疫治疗(图 8)。由于 M1 EV 具有天然的肿瘤归巢功能,siRNA@V-M1 EV 可靶向肿瘤部位,在酸性肿瘤微环境中,VSVG 转变为非折叠的融合态,触发膜融合,使得 siRNA 药物以非内吞依赖的方式被细胞摄取并分散于肿瘤细胞胞质中,而 siRNA@lipo 与内体/溶酶体有较高程度的共定位。在 CT26 结肠癌肿瘤模型中,siRNA@V-M1 EV 有效沉默 PD-L1

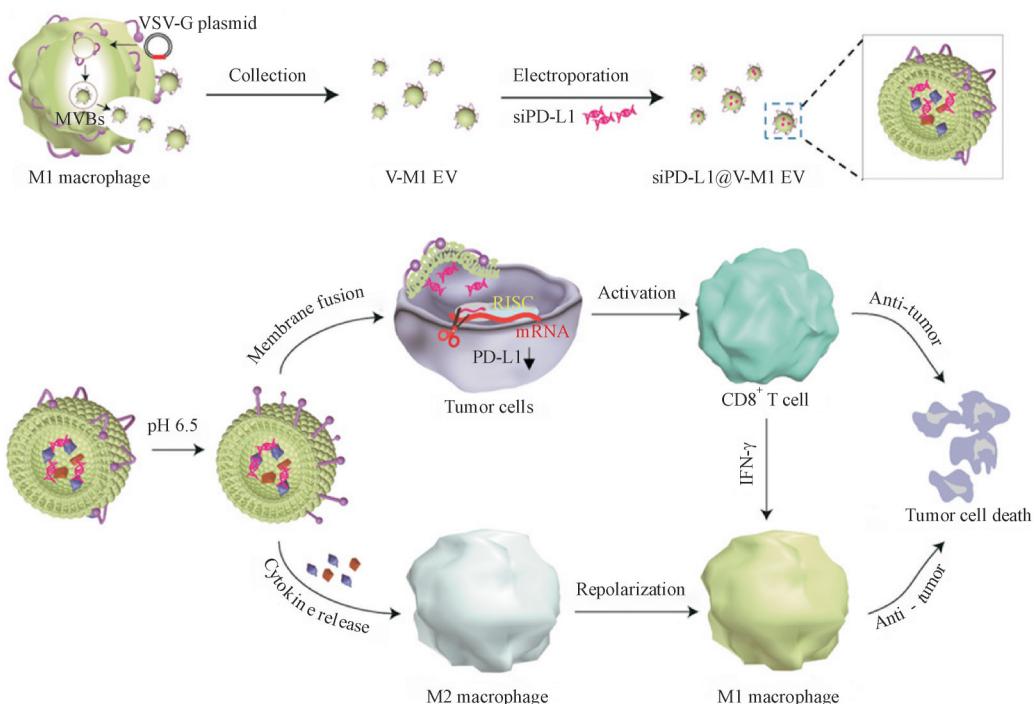


Figure 8 Schematic showing of VSVG decorated M1 EV to deliver siRNA through membrane fusion for cancer immunotherapy^[48]

基因,增加CD8⁺T细胞浸润和IFN- γ 分泌,并将肿瘤区域的M2型巨噬细胞重极化为M1型,有效抑制肿瘤^[48]。使用VSVG等具有pH响应的病毒融合蛋白修饰载体可以将核酸药物特异性递送至肿瘤组织或炎症部位等pH偏低的病理组织,但外源的病毒蛋白具有潜在的免疫原性,可能会诱发宿主的免疫反应,削弱递送效果。

2) 胆固醇修饰 作为细胞膜的重要组成成分之一,疏水性小分子胆固醇易与哺乳动物细胞膜融合。小核酸等药物与胆固醇非共价结合后,可绕过内吞途径,直接进入胞浆中。通过设计与 siRNA 亲和基团偶联的化学标签胆固醇-乙锭,并在 siRNA 的双螺旋链中嵌入多个标签(siRNA 与标签的比例约为 1:6),可以更好地掩蔽 siRNA 的强负电性并增强与细胞膜的相互作用,使 siRNA 以非内吞依赖的方式均匀大量地分布于胞质中;而共价偶联单个胆固醇分子的 siRNA(Chol-siRNA)在细胞内呈现点状分布,与溶酶体共定位强,且分布量少^[49]。类似地,通过偶联蛋白质染料考马斯亮蓝制备得到的非共价胆固醇标签,可用于直接胞质递送相对分子质量较小(< 60 kD)的蛋白质,不受蛋白质序列和细胞种类的限制^[50]。这种胆固醇修饰的策略无需对药物进行共价修饰,避免其生物活性造成影响,但该策略往往局限于相对分子质量较小的核酸或蛋白药物,且不具有组织/细胞特异性。

2.3 胆固醇依赖的膜融合

Rotello课题组开发了由表面精氨酸功能化的金纳米颗粒(Arg-AuNP)壳与长链亚油酸核构成的纳米颗粒稳定的纳米胶囊(NPSCs)。NPSCs的稳定形成依赖于Arg-AuNP的胍基与脂肪酸油滴核的羧基之间的超分子胍基-羧基相互作用,以及阴离子货物与胍基阳离子的静电相互作用提供的侧向稳定作用。通过与细胞膜发生膜融合样疏水相互作用,NPSCs以胆固醇依赖的方式将生物大分子货物直接递送至胞质中,绕过内体/溶酶体途径。

NPSCs 可用于直接胞质递送 siRNA，避免内体捕获(图9)。用制霉菌素去除膜中胆固醇，或使用动力蛋白抑制剂 dynasore 抑制融合孔扩大，均显著降低胞内 siRNA 摄取，表明 NPSCs/siRNA 以胆固醇依赖的膜融合过程直接进入胞质。NPSCs/siRNA 表现出优于商用转染试剂 Lipofectamine 2000 的高

效基因沉默能力,以不稳定绿色荧光蛋白(deGFP)为靶标,NPSCs/siRNA 在 HEK 293 细胞中达到约 90% 的敲除效率;同时 NPSCs 也能高效递送靶向 polo 样激酶 1 的 siRNA(siPLK1)至 MDA-MB-231 细胞中,实现有效的基因沉默和细胞杀伤^[51]。除此之外,NPSCs 也被用于直接递送针对肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的 siRNA(si_TNF- α)至巨噬细胞浆中,进行抗炎治疗。在体外,NPSCs/si_TNF- α 处理使得脂多糖(LPS)刺激后的 RAW264.7 的 TNF- α 分泌降低约 90%。在 LPS 诱导的小鼠炎症模型中,静脉给药后 NPSCs/si_TNF- α 选择性蓄积于脾脏部位,有效减少 LPS 刺激后的小鼠血清 TNF- α 水平^[52]。

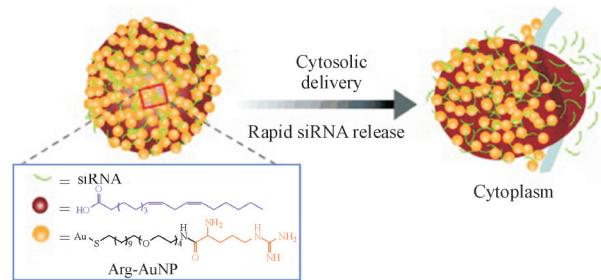


Figure 9 Schematic representation of the construction and delivery mechanism of NPSCs/siRNA^[51]

NPSCs 含有 AuNP 和长链脂肪酸等成分，组成和制备较为复杂，且各个成分的生物安全性还需进一步考察。

3 受体或转运体介导的非内吞细胞摄取

受体/转运体介导的非内吞机制使底物通过受体或转运体在细胞膜上形成的通道直接跨膜转运进入胞质中,因此可以利用这些受体/转运体将化学结构中含有或修饰有相应转运底物的货物直接递送至胞质中,从而避免货物被困于内体/溶酶体。

高密度脂蛋白(HDL)介导胆固醇逆转运,将外周组织的胆固醇转运到肝脏中进行代谢清除,这一过程需要清道夫受体B类I型(SR-BI)的参与。SR-BI是一种膜糖蛋白受体,在识别HDL的载脂蛋白A-I(ApoA-1)后,在细胞膜上形成疏水通道,介导胆固醇酯沿浓度梯度从HDL以非内吞的方式转运到肝细胞胞质中^[53]。由于SR-BI也在乳腺癌和肝癌等多种肿瘤细胞表面高表达,模拟天然HDL的结构和功能构建的肽-磷脂支架(HPPS,成分为磷脂DMPC、胆固醇油酸酯和模拟ApoA-1的两亲

性 α -螺旋肽)可以将共价偶联胆固醇的siRNA(chol-si-bcl-2)特异性靶向递送到SR-BI高表达的肿瘤细胞胞质中,避免内体捕获,实现**bcl-2**的高效沉默,降低其蛋白表达并诱导细胞凋亡^[54]。

以同样的策略制备得到的重组HDL(rHDL,含有大豆磷脂、胆固醇、胆固醇酯和ApoA-1)可用于直接胞质递送沉默血管内皮生长因子的Chol-siRNA(Chol-siRNA-VEGF)。rHDL/Chol-siRNA-VEGF显著降低了MCF-7细胞中VEGF mRNA的含量和VEGF蛋白的表达,并在MCF-7荷瘤小鼠模型中显示出良好的长循环、靶向递送能力和显著的治疗效果^[55]。

L型氨基酸转运蛋白1(LAT1)是一种在肿瘤细胞表面高度过表达的跨膜蛋白,可按照浓度梯度将氨基酸底物以非内吞依赖的方式直接转运进入胞质内,用于满足肿瘤细胞过度增殖的蛋白质合成要求。最近,研究人员提出借助LAT1直接将

修饰有H₂O₂响应结构域(N compound)和LAT1底物3,4-二羟基-L-苯丙氨酸(P compound)标签的蛋白质大分子(PN-Protein)转运到肿瘤细胞胞质中,绕过内吞途径。在胞质中过量H₂O₂的存在下,标签分子降解,蛋白质货物的结构和功能恢复(图10)。除了可以将毒素、酶和抗体等多种蛋白质药物直接递送至肿瘤细胞胞质中,该策略还可以有效递送CRISPR-Cas9核糖核蛋白(PN-RNP),且转染效果显著优于商用转染试剂lipofectamine CRISPRMAX。递送针对polo样激酶1(PLK1)基因的PN-RNP有效降低了HeLa细胞中PLK1 mRNA和蛋白水平,将细胞周期阻滞在G₂-M期,引起显著细胞毒性。具有良好肿瘤靶向和胞质递送能力的LAT1介导的转运体系可以用于体内,在4T1荷瘤小鼠模型中静脉注射PN-皂草素后,有效抑制肿瘤生长,且体内生物相容性良好,未引起全身毒性^[56]。

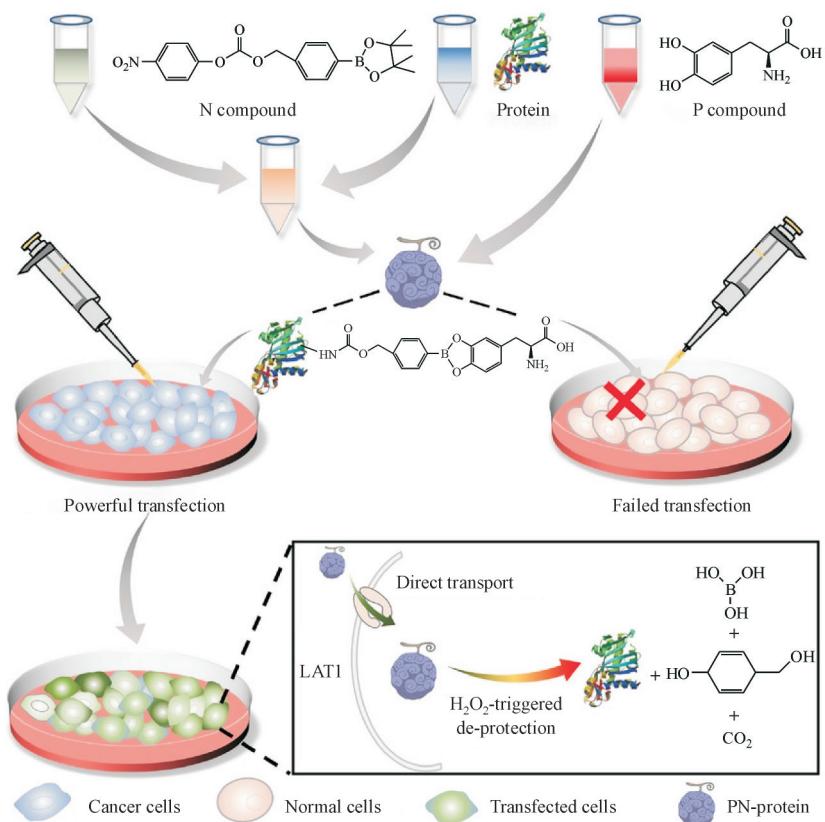


Figure 10 Schematic showing of the structure, direct transport mechanism and H₂O₂-caused de-protection of the PN-Protein inside cancer cells^[56]

利用肿瘤细胞表面特异性过表达的受体/转运体,可以将偶联底物的生物大分子货物特异性递

送至肿瘤部位。该策略通常涉及货物的共价修饰,为确保货物入胞后其生物活性不受影响,最好

脱去与货物分子共价偶联的底物分子, 恢复货物原本的结构。因此, 可在货物与底物之间修饰具有肿瘤细胞胞质响应(如 H₂O₂响应或 GSH 响应)性质的连接链, 在前体货物被高效递送至肿瘤细胞胞质后, 可发生前体货物的去保护。

4 小窝(caveolae)介导的细胞摄取

除了以上提及的非内吞摄取途径, 小窝介导的内吞摄取也能绕过溶酶体的降解途径。小窝是质膜表面的灯泡状凹陷, 含有小窝蛋白(caveolin)、胆固醇和鞘磷脂等成分。小窝的直径为 60~80 nm, 广泛分布于内皮细胞、脂肪细胞和肌肉细胞等多种细胞表面^[57]。与网格蛋白介导的细胞摄取不同, 小窝介导的摄取可以跨越溶酶体途径, 将核酸药物递送到高尔基体, 再通过外被蛋白 I(COPI)被膜小泡将核酸药物从高尔基体转运至内质网, 减少核酸药物在溶酶体中的降解, 从而提高转染效率。

在基于阳离子脂质二油酰丙基氯化三甲铵(DOTMA)和非离子表面活性剂聚山梨醇酯 60 的囊泡(DP60)中添加天然脂质成分番茄红素, 得到新型基因递送载体 DP60L。与 DP60/pCMS-EGFP 主要通过网格蛋白介导的细胞摄取不同, DP60L/pCMS-EGFP 更倾向于通过小窝介导的内吞等非溶酶体途径进入细胞, 从而减少质粒在溶酶体中的降解, 显著提高在 ARPE-19 细胞中的转染效率。在大鼠视网膜下和玻璃体内给药后, DP60L/pCMS-EGFP 均可有效转染至大鼠视网膜外段^[58]。

此外, 运用内质网靶向策略, 可以有效改变纳米颗粒的细胞摄取方式, 实现小窝介导的内吞, 从而改变胞内运输途径, 减少溶酶体对核酸药物的降解。4-(2-氨基乙基)苯磺胺(ABS)通过识别内质网表面的磺酰脲类受体来靶向内质网。含有 ABS 的聚合物载体 CA₃S₂通过小窝介导的内吞通路减少溶酶体对外源性 pDNA 的捕获, 使得 pDNA 快速到达内质网并分布于细胞核周围, 促进 pDNA 入核。与主要通过网格蛋白介导的内吞的 PEI 25K/pDNA 相比, CA₃S₂载体显著提高 pDNA 在 4T1 细胞中的转染和表达效率, 包括报告基因质粒 pGFP 和治疗性基因药物程序性细胞死亡质粒(pPDCD4)。在小鼠 4T1 乳腺癌模型中, CA₃S₂/pPDCD4 处理组显著抑制了肿瘤生长, 且具有良好的生物相容性^[59]。

除了修饰小分子靶向配体, 也可以直接在纳米颗粒表面修饰内质网膜, 来有效实现小窝介导的内吞。在负载有沉默表皮生长因子受体(EGFR)的 siRNA 的阳离子脂质体(Cv/siEGFR NPs)表面修饰来源于肿瘤细胞的内质网膜得到杂合纳米复合物(EhCv/siEGFR NPs), 与未修饰的 Cv/siEGFR NPs 相比, EhCv/siEGFR NPs 通过小窝介导的摄取进入细胞, 并通过内体—高尔基体—内质网途径转运 siRNA 药物, 避免溶酶体对 siEGFR 的降解, 显著提高 siEGFR 在体外的沉默效率, 以及在 MCF-7 人乳腺癌裸鼠模型中的治疗效果^[60]。

值得注意的是, 在研究小窝介导的内吞的初始阶段, 有研究学者提出了“小窝体(caveosome)”的概念, 认为其是一种 pH 为中性的不同于早期内体(pH 6.2)的独立细胞器。随后, 这一概念被纠正, 所谓的“小窝体”是一个假象, 它是由 C 端标记了 GFP 的小窝蛋白过表达引起的^[61]。事实上, 小窝介导的内吞仍会经过内体^[62]。尽管如此, 小窝介导的内吞过程也较大程度地跨越了溶酶体途径, 避免核酸药物在酸性更强和富含水解酶的溶酶体中的降解, 有助于转染效率的提高^[60]。此外, 由于内质网紧邻细胞核, 并且内质网是编码膜或分泌蛋白的 mRNA 翻译位点, 以及 miRNA 介导的翻译抑制位点, 因此, 通过小窝介导的内吞可能会促进核酸药物发挥相应作用。

5 结语与展望

核酸药物通过高特异性地调整基因的表达, 在遗传病、肿瘤以及病毒感染等疾病中展现出良好的治疗效果。生物安全性更好的非病毒核酸载体在临床应用中展现出巨大的潜力, 但由内体/溶酶体捕获引起的递送效率低下的问题急需解决。本综述总结了绕过内体/溶酶体途径的递送方法, 包括膜易位、膜融合和受体/转运体介导的非内吞摄取等方式, 与内体逃逸策略相比, 这些递送策略可实现更好的转染效率和治疗效果。尽管已在细胞水平验证了以上直接胞质递送策略的可行性, 然而, (1) CPPs 仍缺乏明确的序列—结构—功能关系, 阻碍了跨膜易位效率进一步的提高; (2) 仿生膜融合体系的生物安全性以及扩大生产的可行性等仍需进一步考察和改进; (3) 受体/转运体介导的非内吞摄取方式中, 底物大量进入细胞后对细胞/

生物体的影响尚不清楚;(4)对直接胞质递送的核酸药物的更灵敏直接的定量测定方法还比较缺乏;(5)体内复杂生理环境中,直接胞质递送的效率和有效性还有待验证;(6)通常使用染料木素或filipin等抑制剂来验证纳米颗粒是否通过小窝介导的通路进入细胞,但这些抑制剂的特异性还需进一步明确;(7)纳米颗粒通过小窝介导的内吞进入高尔基体后,高尔基体可能会将药物转运至细胞膜而非内质网,仍会造成药物损失,因此促进核酸药物到达内质网是小窝介导的细胞摄取策略中需要优化的部分。

References

- [1] Kulkarni JA, Witzigmann D, Thomson SB, et al. The Current landscape of nucleic acid therapeutics [J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, **16**(6):630-643.
- [2] Vargason AM, Anselmo AC, Mitragotri S. The evolution of commercial drug delivery technologies[J]. *Nat Biomed Eng*, 2021, **5**(9):951-967.
- [3] Kim JM, Shin E, Ryou SM, et al. Gene delivery platforms [J]. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2013, **18**(4):637-647.
- [4] Dutta K, Das R, Medeiros J, et al. Charge-conversion strategies for nucleic acid delivery[J]. *Adv Funct Mater*, 2021, **31**(24) : 2011103.
- [5] Fajrial AK, He QQ, Wirusanti NI, et al. A review of emerging physical transfection methods for CRISPR/Cas9-mediated gene editing[J]. *Theranostics*, 2020, **10**(12):5532-5549.
- [6] Barbier AJ, Jiang AY, Zhang P, et al. The clinical progress of mRNA vaccines and immunotherapies [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, **40**(6):840-854.
- [7] Pei DH, Buyanova M. Overcoming endosomal entrapment in drug delivery[J]. *Bioconjugate Chem*, 2019, **30**(2):273-283.
- [8] Goswami R, Jeon T, Nagaraj H, et al. Accessing intracellular targets through nanocarrier-mediated cytosolic protein delivery [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2020, **41**(10):743-754.
- [9] Zorko M, Jones S, Langel Ü. Cell-penetrating peptides in protein mimicry and cancer therapeutics[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, **180**:114044.
- [10] Futaki S, Nakase I. Cell-surface interactions on arginine-rich cell-penetrating peptides allow for multiplex modes of internalization[J]. *Acc Chem Res*, 2017, **50**(10):2449-2456.
- [11] Stanzl EG, Trantow BM, Vargas JR, et al. Fifteen years of cell-penetrating, guanidinium-rich molecular transporters: basic science, research tools, and clinical applications [J]. *Acc Chem Res*, 2013, **46**(12):2944-2954.
- [12] Madani F, Lindberg S, Langel U, et al. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides[J]. *J Biophys*, 2011, **2011**: 414729.
- [13] Kauffman WB, Guha S, Wimley WC. Synthetic molecular evolution of hybrid cell penetrating peptides [J]. *Nat Commun*, 2018, **9**(1):2568.
- [14] Katayama S, Hirose H, Takayama K, et al. Acylation of octaarginine: implication to the use of intracellular delivery vectors[J]. *J Control Release*, 2011, **149**(1):29-35.
- [15] Louzao I, García-Fandiño R, Montenegro J. Hydrazone-modulated peptides for efficient gene transfection [J]. *J Mater Chem B*, 2017, **5**(23):4426-4434.
- [16] Lättig-Tünemann G, Prinz M, Hoffmann D, et al. Backbone rigidity and static presentation of guanidinium groups increases cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides [J]. *Nat Commun*, 2011, **2**:453.
- [17] Herce HD, Schumacher AFL, Schneider AFL, et al. Cell-permeable nanobodies for targeted immunolabelling and antigen manipulation in living cells [J]. *Nat Chem*, 2017, **9** (8) : 762-771.
- [18] Welch JJ, Swanekamp RJ, King C, et al. Functional delivery of siRNA by disulfide-constrained cyclic amphipathic peptides [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2016, **7**(6):584-589.
- [19] Jiang XL, Fu JJ, Zhong JY, et al. Guanidinylated cyclic synthetic polypeptides can effectively deliver siRNA by mimicking the biofunctions of both cell-penetrating peptides and nuclear localization signal peptides [J]. *ACS Macro Lett*, 2021, **10** (7) : 767-773.
- [20] Yoo J, Lee D, Gujrati V, et al. Bioreducible branched poly(modified nona-arginine) cell-penetrating peptide as a novel gene delivery platform[J]. *J Control Release*, 2017, **246**:142-154.
- [21] Sarkar AK, Debnath K, Arora H, et al. Direct cellular delivery of exogenous genetic material and protein via colloidal nano-assemblies with biopolymer [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, **14**(2):3199-3206.
- [22] Kang ZY, Liu Q, Zhang ZZ, et al. Arginine-rich polymers with pore-forming capability enable efficient intracellular delivery via direct translocation across cell membrane [J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, **11**(14):e2200371.
- [23] Gasparini G, Bang EK, Montenegro J, et al. Cellular uptake: lessons from supramolecular organic chemistry [J]. *Chem Commun*, 2015, **51**(52):10389-10402.
- [24] Yang WH, Yu CM, Wu CX, et al. Cell-penetrating poly(disulfide)-based star polymers for simultaneous intracellular delivery of miRNAs and small molecule drugs [J]. *Polym Chem*, 2017, **8**(27):4043-4051.
- [25] Guo JJ, Wan T, Li BW, et al. Rational design of poly(disulfide)s as a universal platform for delivery of CRISPR-Cas9 machineries toward therapeutic genome editing [J]. *ACS Cent Sci*, 2021, **7**(6):990-1000.
- [26] Yu CM, Qian LH, Ge JY, et al. Cell-penetrating poly(disulfide)-assisted intracellular delivery of mesoporous silica nanoparti-

- cles for inhibition of miR-21 function and detection of subsequent therapeutic effects [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, **55**(32):9272-9276.
- [27] Yuan PY, Mao X, Chong KC, et al. Simultaneous imaging of endogenous survivin mRNA and on-demand drug release in live cells by using a mesoporous silica nanoquencher [J]. *Small*, 2017, **13**(27).doi:10.1002/smll.201700569.
- [28] Zhou J, Sun LQ, Wang LP, et al. Self-assembled and size-controllable oligonucleotide nanospheres for effective antisense gene delivery through an endocytosis-independent pathway [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, **58**(16):5236-5240.
- [29] Zhang D, Lin ZG, Wu M, et al. Cytosolic delivery of thiolated neoantigen nano-vaccine combined with immune checkpoint blockade to boost anti-cancer T cell immunity [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, **8**(6):2003504.
- [30] Chen CY, Tong YH, Zheng YS, et al. Cytosolic delivery of thiolated Mn-cGAMP nanovaccine to enhance the antitumor immune responses [J]. *Small*, 2021, **17**(19):e2102241.
- [31] Marsden HR, Tomatsu I, Kros A. Model systems for membrane fusion [J]. *Chem Soc Rev*, 2011, **40**(3):1572-1585.
- [32] Kim B, Sun S, Varner JA, et al. Securing the payload, finding the cell, and avoiding the endosome: peptide-targeted, fusogenic porous silicon nanoparticles for delivery of siRNA [J]. *Adv Mater*, 2019, **31**(35):e1902952.
- [33] Kim B, Pang HB, Kang J, et al. Immunogene therapy with fusogenic nanoparticles modulates macrophage response to *Staphylococcus aureus* [J]. *Nat Commun*, 2018, **9**(1):1969.
- [34] Tan HP, Song YN, Chen J, et al. Platelet-like fusogenic liposome-mediated targeting delivery of miR-21 improves myocardial remodeling by reprogramming macrophages post myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, **8**(15):e2100787.
- [35] Liu X, Xiang JJ, Zhu DC, et al. Fusogenic reactive oxygen species triggered charge-reversal vector for effective gene delivery [J]. *Adv Mater*, 2016, **28**(9):1743-1752.
- [36] Xu SJ, Ling SB, Shan QN, et al. Self-activated cascade-responsive sorafenib and USP22 shRNA Co-delivery system for synergistic hepatocellular carcinoma therapy [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, **8**(5):2003042.
- [37] Chen XJ, Zhu QW, Xu X, et al. Sequentially site-specific delivery of apoptotic protein and tumor-suppressor gene for combination cancer therapy [J]. *Small*, 2019, **15**(40):e1902998.
- [38] Chen NX, He Y, Zang MM, et al. Approaches and materials for endocytosis-independent intracellular delivery of proteins [J]. *Biomaterials*, 2022, **286**:121567.
- [39] Martens S, McMahon HT. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, **9**(7):543-556.
- [40] Wang QZ, Song YN, Chen J, et al. Direct *in vivo* reprogramming with non-viral sequential targeting nanoparticles promotes cardiac regeneration [J]. *Biomaterials*, 2021, **276**:121028.
- [41] Wang QQ, Wang HL, Yan HG, et al. Suppression of osteoclast multinucleation via a posttranscriptional regulation-based spatiotemporally selective delivery system [J]. *Sci Adv*, 2022, **8**(26):eabn3333.
- [42] O'Brien K, Breyne K, Ughetto S, et al. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, **21**(10):585-606.
- [43] Zheng Z, Li ZF, Xu CC, et al. Folate-displaying exosome mediated cytosolic delivery of siRNA avoiding endosome trapping [J]. *J Control Release*, 2019, **311/312**:43-49.
- [44] Versluis F, Voskuhl J, van Kolek B, et al. *In situ* modification of plain liposomes with lipidated coiled coil forming peptides induces membrane fusion [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(21):8057-8062.
- [45] Stengel G, Zahn R, Höök F. DNA-induced programmable fusion of phospholipid vesicles [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, **129**(31):9584-9585.
- [46] Peruzzi JA, Jacobs ML, Vu TQ, et al. Barcoding biological reactions with DNA-functionalized vesicles [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, **58**(51):18683-18690.
- [47] Kunisawa J, Masuda T, Katayama K, et al. Fusogenic liposome delivers encapsulated nanoparticles for cytosolic controlled gene release [J]. *J Control Release*, 2005, **105**(3):344-353.
- [48] Liu HL, Huang LL, Mao MC, et al. Viral protein-pseudotyped and siRNA-electroporated extracellular vesicles for cancer immunotherapy [J]. *Adv Funct Mater*, 2020, **30**(52):2006515.
- [49] Tai WY, Gao XH. Noncovalent tagging of siRNA with steroids for transmembrane delivery [J]. *Biomaterials*, 2018, **178**:720-727.
- [50] Tai WY, Zhao PF, Gao XH. Cytosolic delivery of proteins by cholesterol tagging [J]. *Sci Adv*, 2020, **6**(25):eabb0310.
- [51] Jiang Y, Tang R, Duncan B, et al. Direct cytosolic delivery of siRNA using nanoparticle-stabilized nanocapsules [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, **54**(2):506-510.
- [52] Jiang Y, Hardie J, Liu YC, et al. Nanocapsule-mediated cytosolic siRNA delivery for anti-inflammatory treatment [J]. *J Control Release*, 2018, **283**:235-240.
- [53] Zhang ZH, Cao WG, Jin HL, et al. Biomimetic nanocarrier for direct cytosolic drug delivery [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, **48**(48):9171-9175.
- [54] Yang M, Jin HL, Chen J, et al. Efficient cytosolic delivery of siRNA using HDL-mimicking nanoparticles [J]. *Small*, 2011, **7**(5):568-573.
- [55] Ding Y, Wang YZ, Zhou JP, et al. Direct cytosolic siRNA delivery by reconstituted high density lipoprotein for target-specific therapy of tumor angiogenesis [J]. *Biomaterials*, 2014, **35**(25):7214-7227.
- [56] Zhao ZY, Liu X, Hou MY, et al. Endocytosis-independent and cancer-selective cytosolic protein delivery via reversible tag-

- ging with LAT1 substrate [J]. *Adv Mater*, 2022, **34** (35) : e2110560.
- [57] Parton RG, Del Pozo MA, Vassilopoulos S, et al. Caveolae: the FAQs[J]. *Traffic*, 2020, **21**(1):181-185.
- [58] Mashal M, Attia N, Puras G, et al. Retinal gene delivery enhancement by lycopene incorporation into cationic niosomes based on DOTMA and polysorbate 60 [J]. *J Control Release*, 2017, **254**:55-64.
- [59] Qi LY, Wang Y, Hu LF, et al. Enhanced nuclear gene delivery via integrating and streamlining intracellular pathway [J]. *J Control Release*, 2022, **341**:511-523.
- [60] Qiu C, Han HH, Sun J, et al. Regulating intracellular fate of siRNA by endoplasmic reticulum membrane-decorated hybrid nanoplexes[J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1):2702.
- [61] Hayer A, Stoeber M, Ritz D, et al. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation[J]. *J Cell Biol*, 2010, **191**(3):615-629.
- [62] Griffiths G, Gruenberg J, Marsh M, et al. Nanoparticle entry into cells; the cell biology weak link[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, **188**:114403.



中國藥科大學 學報

中国精品科技期刊 中国高校精品科技期刊
中国中文核心期刊 中国科学引文数据库核心期刊

传播医药科技创新研究成果的优秀媒体

药学前沿
提供药学领域的前沿信息 反映最新的药学研究进展

创新成果
展示医药科技最新成果 构建学术交流的平台

研究论文
科学研究原创论文 国家重大药学研究基金产出论文

邮发代号：28-115，欢迎订阅，欢迎投稿！