医药生物技术

壳聚糖/透明质酸复合物纳米粒子的制备及其在 siRNA 递送中的应用

刘怀艺,黄方茜,陈柏求,燕云峰*

浙江工业大学 生物工程学院,浙江 杭州 310014

刘怀艺,黄方茜,陈柏求,燕云峰. 壳聚糖/透明质酸复合物纳米粒子的制备及其在 siRNA 递送中的应用[J]. 生物工程学报,2025,41(4):1340-1353.

LIU Huaiyi, HUANG Fangqian, CHEN Baiqiu, YAN Yunfeng. Fabrication of chitosan/hyaluronic acid complex nanoparticles for effective siRNA delivery[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1340-1353.

摘 要:发展高效安全的递送载体是提高 siRNA 药物体内稳定性、推进 siRNA 药物的临床应用的 关键。壳聚糖(chitosan, CS)是一类天然阳离子聚合物,在核酸药物的递送中具有巨大的应用前景。 为了优化 CS/siRNA 纳米粒子(nanoparticles, NPs)的物理化学性质,提高其 siRNA 递送效率,本研究 在 CS 中加入透明质酸(hyaluronic acid, HA),通过静电作用形成稳定的复合物纳米粒子,同时利用 HA 对肿瘤细胞表面 CD44 的靶向作用,实现 siRNA 的高效递送。首先,系统探究了 CS 和 HA 的分 子量和质量比对 CS/HA NPs 的物理化学性质的影响。结果显示,混合体系在 HA:CS 的质量比为 5:5 和 6:4 左右可以形成粒径较小、粒径分布较窄且存储稳定性较高的复合物纳米粒子。在其他条件相 同的情况下, CS/HA NPs 的尺寸随着 CS 和 HA 分子量的提高而增大。在此基础上,选择合适的条 件制备 CS/HA NPs 用于 siRNA 的递送。细胞实验结果显示,通过引入 HA 可以有效降低 CS 递送体 系的细胞毒性,提高了纳米粒子的细胞摄取,相关 CS/HA/siRNA NPs 可以沉默 HeLa-Luc 细胞中 50%-60%荧光素酶基因。与纯 CS 相比, CS/HA NPs 可以与 siRNA 形成更小的纳米粒子,并由 HA 介导与肿瘤细胞的特异性相互作用,从而实现 siRNA 的高效递送。研究结果为天然高分子复合物纳 米粒子的构建及 siRNA 递送提供了有益的参考。

关键词: RNA 干扰; 壳聚糖; 透明质酸; 纳米粒子; siRNA 递送

资助项目: 国家自然科学基金(22275167, U1932164)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22275167, U1932164). *Corresponding author. E-mail: yfyan@zjut.edu.cn

Received: 2024-07-24; Accepted: 2024-12-03; Published online: 2024-12-05

Fabrication of chitosan/hyaluronic acid complex nanoparticles for effective siRNA delivery

LIU Huaiyi, HUANG Fangqian, CHEN Baiqiu, YAN Yunfeng*

College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: The development of safe and effective carriers is crucial for improving the in vivo stability of siRNA drugs and facilitating their clinical translation. Chitosan (CS), a natural cationic polymer, shows great potential in nucleic acid drug delivery. To optimize the physicochemical properties of CS/siRNA nanoparticles (NPs) and increase their siRNA delivery efficacy, in this study, hyaluronic acid (HA) was added into CS to form stable complex NPs through electrostatic interactions. The HA component is able to target the CD44 receptors on the surface of tumor cells, facilitating efficient siRNA delivery. First, we systematically investigated the effects of the molecular weights and mass ratio of CS and HA on the physicochemical properties of CS/HA NPs. The results showed that at HA:CS mass ratios of approximately 5:5 and 6:4, the complex NPs exhibited small particle sizes, narrow size distribution, and high storage stability. Under similar conditions, the size of CS/HA NPs increased with the increase in the molecular weights of CS and HA. Based on these findings, suitable conditions were selected to prepare CS/HA NPs for siRNA delivery. Cell experiments demonstrated that the introduction of HA effectively reduced the cytotoxicity of the CS delivery system and enhanced the NP uptake. The CS/HA/siRNA NPs achieved 50% to 60% silencing of the luciferase gene in HeLa-Luc cells. CS/HA NPs formed smaller nanoparticles with siRNA than pure CS and mediated specific interactions with tumor cells via HA, leading to efficient siRNA delivery. These findings provide valuable insights into the construction of natural polymer composite nanoparticles for application in siRNA delivery. **Keywords:** RNA interference; chitosan; hyaluronic acid; nanoparticles; siRNA delivery

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是生物 体内广泛存在的一种对抗外源性遗传物质入侵 的作用机制。它由高度保守的小分子双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)介导目标 mRNA 的特异性降解,沉默特定基因的表达。dsRNA 首先被 Dicer 酶识别并切割成 21–23 个碱基对 的短干扰 RNA (short interfering RNA, siRNA), siRNA 结合细胞质内 argonaute-2 (Ago2)蛋白, 形成 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)。siRNA 在其中完成解 链, 之后随从链离开, 引导链留在 RISC 中, 完成复合物的激活。激活的 RISC 通过序列互 补特异性与靶标 mRNA 结合,完成目标 mRNA 降解,从而抑制蛋白的表达^[1-2]。利用这一原理, 研究人员可以设计合成靶向致病蛋白 mRNA 相 关序列的 siRNA 或 microRNA (miRNA),经特 定的方式导入细胞,通过 RNAi 机制特异性抑 制致病蛋白的表达^[3],实现遗传性疾病和癌症 等疾病的高效治疗^[4]。与传统药物相比,基于 RNAi 的治疗具有高效性、高特异性以及可以针 对常规药物无法针对的靶标的优势,因此近 20 年来在基础研究和临床应用方面获得了广泛 的关注^[5]。2018 年全球首款 siRNA 药物 Onpattro (Patisiran)由美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准上市,用于 治疗由遗传性甲状腺素转运蛋白淀粉样变性 (hereditary transthyretin amyloidosis, hATTR)引 起的多发性神经系统疾病^[6]。后续还有 4 款 RNAi 药物获批上市,分别是新一代治疗遗传性 转甲状腺素蛋白淀粉样变性多发性神经病的 Vutrisiran、治疗急性肝卟啉症的 Givosiran、治疗 原发性高草酸尿症的 Lumasiran、治疗低密度脂 蛋白胆固醇的 Inclisiran^[7]。

然而 RNAi 疗法的临床应用仍面临着许多 挑战,缺乏高效、安全的递送手段是其中的一 个瓶颈问题^[8]。游离的外源性 siRNA 很容易被 体内核酸酶降解或被免疫系统清除,并且 siRNA 带有大量负电荷、尺寸大,导致其无法 自主穿过细胞膜。通过常规的内吞途径进入细 胞之后, siRNA 药物还需从晚期内体逃逸, 避 免在消化性溶酶体中被降解^[9-10]。在细胞质释放 的 siRNA 需要维持一定的浓度,结合相关蛋白 形成 RISC,才能有效降解目标 mRNA^[7]。为了 克服这些挑战,研究人员发展了各种递送载体 来高效结合 siRNA,提高其稳定性,增强细胞 摄取和内体逃逸作用。目前 siRNA 递送载体可 分为病毒载体和非病毒载体。与病毒载体相比, 非病毒载体的安全性更高、免疫原性更低, siRNA 负载能力突出,结构丰富、易于制备,已 成为当前核酸药物递送领域的研究热点[10-11]。

目前广泛使用的 siRNA 非病毒载体主要包括脂质/类脂质(lipidoid)载体和聚合物载体。其中脂质纳米粒子(lipid nanoparticle, LNP)是临床转化方面发展最快的一类核酸药物递送系统,2018年FDA 批准的第一个 siRNA 药物 Patisiran 便采用 LNP 递送系统^[8]。LNP 在组成上通常包括可电离脂质、两性离子脂质、聚乙二醇

(polyethylene glycol, PEG)脂质和胆固醇。其中 胆固醇提供额外的疏水作用,有利于提高 LNP 的稳定性。PEG 脂质在 LNP 表面形成亲水的保 护层,有利于降低 LNP 的聚集,减少 LNP 在体 内的蛋白质吸附,提高 LNP 的体内稳定性和血液 循环时间。通过引入与细胞质膜中的脂质分子结 构类似的两性脂质,可调节 LNP 的表面性质,促 进 LNP 与细胞质膜的融合和载荷的细胞摄取^[12]。 可电离脂质是 LNP 的关键组分,通常由含1个以 上可质子化胺基的头基和2条以上的疏水尾链组 成。胺基通过质子化可以带上正电荷,进而吸附 带负电荷的 siRNA 形成 LNP,同时促进了 LNP 与细胞质膜的相互作用。胺基的脂质化程度和正 电性随着 pH 降低而提高,在酸性内体中产生质 子海绵效应或引起内体膜的结构改变,促进了 LNP 的内体逃逸,提高了 siRNA 递送效率^[13-14]。 聚合物是另一类广受关注的 siRNA 递送载体,具 有良好的结构和功能多样性以及优异的 siRNA 负载能力[15-17]。聚合物载体包括功能化天然高分 子如蛋白质和多糖,以及合成聚合物如聚乙烯亚 胺(polyethyleneimine, PEI)、聚赖氨酸(poly-Llysine, PLL)、聚酰胺胺[poly(amidoamine), PAMAM]、 聚-胺基酯[poly(β-amino ester), PBAE]等^[8]。阳离 子聚合物带有大量正电荷,因此可以与 siRNA 高 效结合。然而,高密度正电荷和较长的高分子 链常常会导致细胞毒性和 siRNA 释放不足的问 题^[15]。提高聚合物纳米粒子的 siRNA 递送效率, 一方面需要进一步优化聚合物分子结构,改善载 体的电荷密度、分子量、刺激响应性和亲-疏水性 质[18],另一方面可以通过改变聚合物纳米粒子的 组成和制备方式,调控聚合物载体-siRNA 复合物 纳米粒子的物理化学性质,进而提高 siRNA 细胞 内外的转运效率[19]。

本研究采用天然高分子壳聚糖(chitosan, CS)与多羧基多糖透明质酸(hyaluronic acid,

HA)制备复合物纳米粒子作为 siRNA 递送的载 体。CS 是少有的天然阳离子多糖,其胺基在中 性或酸性 pH 质子化带正电荷,因而可以负载 siRNA^[20-21]。CS作为天然高分子载体材料,其生 物相容性好、生物降解性强、免疫原性低^[22-23]。 HA 是跨膜糖蛋白 CD44 的配体,因此可以作为 治疗癌症的纳米药物的靶向分子,理论上可通 过 HA 修饰的方式,提高纳米药物对 CD44 过 表达的癌细胞的靶向作用^[24-27]。由于 HA 带有 较多羧基基团,这使得 HA 溶液在 pH 7.4 的生 理条件下带有负电。将 HA 与 CS 复合, 可适当 减少 CS 载体体系的正电荷,增加纳米药物的 血液稳定性^[28],并赋予复合物纳米粒子潜在靶 向 CD44 的能力。然而,两种相反电荷的高分 子通过静电作用形成复合物,其作用过程和复 合物尺寸往往不易控制。本研究利用 CS 与 HA 静电相互作用制备纳米粒子,系统探究了 CS/HA 稳定复合物的形成条件,揭示高分子的 分子量和比例等制备条件对其复合物纳米粒子 的物理化学性质及 siRNA 递送性能的影响。

1 材料与方法

1.1 原料和试剂

CS:脱乙酰度≥90%,纯度≥90%,浙江金 壳药业股份有限公司;HA:纯度≥97%,国药 集团化学试剂有限公司;磷酸氢钠:纯度 ≥99.5%,Sigma-Aldrich公司;柠檬酸钠:纯度 ≥99.5%,Sigma-Aldrich公司;氢氧化钠:纯度 ≥96%,国药集团化学试剂有限公司;二甲亚砜: 纯度≥99.5%,国药集团化学试剂有限公司;盐 酸:纯度36%-38%,国药集团化学试剂有限公 司;醋酸:纯度>98%,国药集团化学试剂有限 公司;磷酸:纯度≥98%,国药集团化学试剂有限 公司;磷酸缓冲溶液:生工生物工程(上海) 股份有限公司;琼脂糖:Sigma-Aldrich 公司; RNase, 上海碧云天生物技术股份有限公司; 十 二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS): 纯度 ≥86%, 西陇科学股份有限公司; 50×Tris 乙酸盐 EDTA 缓冲液(Tris-acetate-EDTA, TAE): 生工生物 工程(上海)股份有限公司;乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA): 纯度≥99%, 安耐吉化学; 20×PBS: 生工生物工程(上海)股份 有限公司; 高糖 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM): HyClone 公司; 上样缓冲液(loading buffer): TaKaRa 公司; 4S Red Plus 核酸染色剂: 生工生 物工程(上海)股份有限公司: RiboGreen Assav Kit: Invitrogen 公司; Lipofectamine[™] RNAiMax: Invitrogen 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS): Gibco 公司; siLuc (sense: 5'-GAUUAUGU CCGGUUAUGUA[dT][dT]-3'; antisense: 5'-UA CAUAACCGGACAUAAUC[dT][dT]-3'): 纯度 ≥99.8%, 上海吉玛制药技术有限公司; cy5-siLuc: 纯度>99.8%,上海吉玛制药技术有限公司;双 抗(青霉素、链霉素): 生工生物工程(上海)股份 有限公司;胰蛋白酶(trypsin):生工生物工程(上 海)股份有限公司; D-荧光素钠盐: 纯度≥99%, GoldBio 公司; 氯化镁: 纯度≥98%, Sigma-Aldrich 公司; 辅酶 A 水合物: 纯度≥85%, 上 海碧云天生物技术股份有限公司; ATP 二钠盐 水合物: 纯度≥98%, Adamas 公司; 三羟甲基 氨基甲烷:纯度≥99%,国药集团化学试剂有限 公司; Triton X-100: 纯度≥98%, Sigma-Aldrich 公司; 1,2-二氨基环已四乙酸: 纯度≥98%, Adamas 公司; 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6diamidino-2-phenylindole, DAPI): 纯度≥95%, ThermoFisher Scientific 公司。

1.2 实验仪器

电子分析天平:梅特勒-托利多科技(中国) 有限公司;超声仪:上海泰坦科技股份有限公 司; pH 计: 梅特勒-托利多科技(中国)有限公 司; 动态光散射仪(dynamic light scattering, DLS): Malvern Panalytical 公司; 荧光分光光 度计: 日立高新技术(上海)国际贸易有限公司; 磁力搅拌器: 海道尔夫仪器设备(上海)有限公 司; 酶标仪: BioTeck 公司; 显微镜: Olympus 公 司; CO₂培养箱: ThermoFisher Scientific 公司; 超 净台: ThermoFisher Scientific 公司; 荧光显微 镜: ThermoFisher Scientific 公司; 离心机: Eppendorf 公司; 电泳仪: 北京六一生物科技有限 公司; 凝胶成像仪: ThermoFisher Scientific 公司。

1.3 CS/HA复合物纳米粒子制备和表征

称取 60 mg 分子量分别为 50、100、300 kDa 的 CS (分别记为 CS_{50 k}、CS_{100 k}、CS_{300 k})溶于 15 mL 去离子水,室温搅拌至 CS 全部溶解, 配制成 4 mg/mL 的 CS 母液,4 ℃保存待用。称 取 100 mg 分子量分别为 10、135、300 kDa 的 HA (分别记为 HA_{10 k}、HA_{135 k}、HA_{300 k})溶于 50 mL 去离子水,室温搅拌至 HA 全部溶解,配制成 2 mg/mL 的 HA 母液,4 ℃保存待用。

用 pH 2.85 的醋酸溶液稀释 CS 母液得到 1 mg/mL 的 CS (分子量分别为 50、100 和 300 kDa) 溶液。用去离子水稀释 HA 母液得到 1 mg/mL 的 HA (135 kDa)溶液。固定样品总浓度为 1 mg/mL, 设置 HA 溶液体积: CS 溶液体积为 1:9、 2:8 …… 9:1,将 HA 溶液缓慢滴加(60 mL/min) 到放置于磁力搅拌器(200 r/min)上的 CS 溶液中,混合完毕继续搅拌 1 h。通过观察激光笔 照射 HA/CS 混合溶液产生的散射光路,判断 HA 和 CS 的络合程度和混合体系的稳定性。用 DLS 表征相关 NPs 的物理化学性质。取 100 μL 溶液放入微量粒径测量杯,在粒径模式下测量 5 次,每次 5 个循环,每个循环测量 10 s。取 800 μL 溶液放入电位测量杯,在电位模式下测量 量5次,每次12个循环。选择特定 CS/HA NPs,

http://journals.im.ac.cn/cjbcn

室温静置 1、3、7、14 d。用 DLS 检测 NPs 的 D_h、多分散性(polydispersity, PDI)和ζ电位随时 间的变化,表征 CS/HA NPs 的室温存储稳定 性。DLS 表征实验中,每个样品在相同条件下 重复制备 3 次,取相应测量结果的平均值和标 准偏差作图。

1.4 CS/HA/siRNA 纳米粒子的制备和表征

按照 NPs:siRNA=100:1 或者 50:1 (质量 比),将如上制备好的 CS/HA 纳米粒子加入 siRNA 柠檬酸/柠檬酸钠(10 mmol/L, pH 4.2)缓 冲液中(siRNA 终浓度为 2.5 ng/μL),用移液枪 吹打 40-50 次混合均匀得到 CS/HA/siRNA NPs (sNPs)。使用 DLS 表征 sNPs 的粒径和多分散性 (polydispersity, PDI)及ζ电荷。此外,为了探究 混合程序对 siRNA 负载的影响,将 CS 或 HA 先与 siRNA 混合,再与另一个高分子混合,得 到组成及 siRNA 终浓度与上述复合物纳米粒子 相同的体系用于 siRNA 递送。

将 0.6 g 琼脂糖加入到 1×TAE 缓冲液中,加 热溶解,稍冷后加入核酸染料,制备 2%琼脂糖 凝胶。取 5 μL 负载有 siRNA 的样品与 1 μL 上样 液(6×)混合,将其加入到孔道中。然后将琼脂糖 凝胶置于 1×TAE缓冲液中,在100 V电压下电泳 15 min,最后使用凝胶成像仪拍摄凝胶照片。

1.5 细胞实验

实验使用的细胞系为稳定表达萤火虫荧光 素酶的人宫颈癌细胞 HeLa-Luc 和人非小细胞 肺癌细胞 A549-Luc。细胞使用含 5% FBS 和 1%双抗(青霉素和链霉素)的高糖 DMEM 培养 基,在 37 ℃、5% CO₂的培养箱中培养。

将 HeLa-Luc 或 A549-Luc 按 1×10⁴ 细胞/孔 密度接种于白色 96 孔板,每孔 100 μL 培养 基。培养 24 h 后更换 200 μL 新鲜培养基,每孔 加入 20 μL 负载 siLuc 的复合物纳米粒子。继续 培养 24 h 后,加入细胞培养裂解液和加有荧光

素的 TMCA 检测试剂,通过酶标仪检测化学发 光信号评估细胞的萤火虫荧光素酶的表达量。 其中没有加药的组别(untreat)作为阴性对照。 选择商品化递送载体 RNAiMax, 按照生产商 的使用指南制备 siRNA 纳米粒子^[29],将相同 siRNA 剂量的 RNAiMax 递送结果作为阳性对 照。另一对照 ALC-0315 脂质纳米粒子制备过 程如下:将胆固醇、二硬脂酰基磷脂酰胆碱 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine, DSPC)、二肉豆蔻酰甘油-聚乙二醇 2000 (1.2dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000, DMG-PEG2000) 与可电离脂质 ALC-0315 (摩尔比为 38.5:10:1.5:50)溶于乙醇, 取脂质的乙醇溶液与 siRNA 溶液在体积比为 1:3 条件下(脂质载体与 siRNA 质量比为 20:1)混合并 吹打混匀。摇床室温孵育1h后,加入PBS稀释 5倍,继续孵育1h待用。按照相同的方法,在 透明96孔板上接种细胞,加入负载 siLuc 的复合 物纳米粒子,转染24h后,利用MTT方法检测 相应复合物纳米粒子处理后的细胞活力。以未 处理细胞存活率为 100%, 得到实验组细胞的相 对活力。将实验组的萤火虫荧光素酶的表达量 与细胞活力进行归一化处理,以排除细胞毒性 对萤火虫荧光素酶基因沉默效率测试的影响。 荧光素酶表达和细胞活力测试均进行 3 次重 复,取相应结果的平均值和标准偏差作图。

将 HeLa-Luc 细胞接种于透明 24 孔板中, 密度为每孔 4×10⁴ 个细胞。待细胞贴壁生长 后,更换新鲜的 DMEM,加入 80 µL CS/HA/ Cy5-siLuc NPs 溶液,分别孵育 2 h 和 6 h 后, 移去 DMEM,用 PBS 漂洗细胞 2 次,并以 4% 多聚甲醛4 ℃固定 30 min,加入 0.5 mL 10 µg/mL DAPI 染色 15 min,吸走染液,用 0.5 mL PBS 冲 洗 2 遍。最后,用荧光显微镜(EVOS M7000) 观测 CS/HA/Cy5-siLuc NPs 在细胞的摄取和胞 内分布情况。 基于荧光显微镜检测结果,采用流式细胞 仪对细胞摄取效果进行定量测定。将 HeLa 细 胞按 3×10⁶/孔密度接种于透明 6 孔板中,每孔 加入 1 500 µL DMEM 培养基,培养过夜。加 入 100 µL CS/HA/Cy5-siLuc NPs 溶液,孵育 6 h 后用流式细胞仪(CytoFLEX)测定细胞中的 Cy5 信号强度。流式细胞术检测实验重复 3 次,取 各组 Cy5 荧光强度的平均值和标准偏差作图。

2 结果与分析

2.1 CS/HANPs 的制备与性能优化

质量比是影响 2 种带相反电荷的聚电解质 的络合程度和复合物性质的重要参数。络合程 度太低不足以形成复合物纳米粒子,而相互作 用非常充分的情况下往往容易形成宏观沉淀。 本研究首先探索了固定浓度下,分子量和质量 比对 CS 和 HA 复合物形成和物化性质的影响, 这是制备合适的 CS/HA 复合物纳米粒子用于 siRNA 递送的基础。从图 1 可以看出,从左至 右,随着 HA/CS 质量比的提高,溶液逐渐由澄 清变浑浊,溶液中散射光也逐渐增强,在质量 比为 6:4 时散射光最强。质量比继续增加, 溶液 浑浊度太高,一定程度上掩盖了散射光路。这 些现象说明 CS 和 HA 在质量比为 5:5-6:4 左右 时产生较强络合,同时又不至于产生宏观沉淀, 这个范围可以作为制备 CS/HA 纳米粒子的条 件。在相同质量比的条件下,随着 CS 或 HA 分 子量增大,混合体系的光散射现象更加明显。在 HA的分子量不变, CS分子量由 50 kDa 增加到 300 kDa 时,混合体系中出现明显络合现象的 HA/CS 质量比逐渐降低(图 1A)。在 CS 分子量 不变时, HA 与 CS 的络合程度随着 HA 分子量 的减小而降低。HA/CS 质量比为 8:2 时, 高分 子量HA与CS100k的混合溶液呈现较高浑浊度, 而低分子量的 HA10 k 与 CS100 k 形成较澄清的混 合溶液(图 1B)。



图 1 不同分子量和 HA/CS 质量比下复合物的外观和光散射 A: HA_{135 k} 与不同分子量 CS 制备的复合物; B: CS_{100 k} 与不同分子量 HA 制备的复合物。

Figure 1 Appearance and light scattering of HA/CS mixture at varying molecular weights and weight ratios of HA to CS. A: Complexes prepared with HA_{135 k} and CS with various molecular weights; B: Complexes prepared with $CS_{100 k}$ and HA with various molecular weights.

由于 CS 和 HA 是带相反电荷的聚电解质, 随着 HA 所带负电荷比例的提高,将 CS 带有的 正电荷逐渐中和,使 NPs 复合物更接近于电中 性,易于发生聚集。使用分子量大的 CS 与 HA 制备的纳米粒子会更容易在 HA/CS 质量比增加 的情况下形成络合甚至宏观沉淀。各组样品中 处于 5:5、6:4 这 2 个比例的溶液大多呈现为澄 清透明的淡蓝色,光散射现象明显,表明此比 例条件可能适用于后续递送载体的制备。

进一步用 DLS 测量了上述样品的粒径和 ζ 电位,结果如图 2 所示。在相同 HA/CS 质量比 下,CS 与 HA_{135 k}形成的复合物粒径总体上随 着 CS 分子量的增大而升高(图 2A)。同样,CS_{100k} 与 HA 形成的复合物粒径大多随着 HA 分子量 的增大而升高(图 2C)。这与图 1 中的变化趋势 一致。在高分子分子量不变的情况下,随着 HA/CS 质量比的提高,复合物的粒径总体上呈 现先减小再增大的趋势,在 HA/CS 质量比为 5:5 和 6:4 的情况下纳米粒子的粒径达到最小值。

http://journals.im.ac.cn/cjbcn

在 5:5-7:3 的质量比范围内, 纳米粒子的分布 (PDI)也相对比较窄。质量比太小时,难以有效 形成复合物,或者复合物比较松散、表观尺寸 较大。当质量比大于 5:5-6:4 这个范围时, HA 增加会进一步增加复合物之间的聚集,复合物 尺寸增加,甚至出现沉淀。根据 CS 和 HA 的化 学结构可计算得到 HA 和 90%脱乙酰度的 CS 中羧基和氨基的含量分别为 5.44 mmol/g 和 2.66 mmol/g (图 3)。因此在 HA/CS 质量比为 1:1 时,体系中氨基的含量多于羧基,复合物带净 正电荷(图 2B、2D)。随着 HA 的增加,其电离 产生的负电荷增多,体系的ζ电位随之逐渐降 低,并在质量比由 7:3 变为 8:2 时, (电位由之 前的正值变为负值。值得注意的是,在 HA/CS 质量比依赖的复合物尺寸变化图中, CS50 k 与 HA135 k复合物的最小尺寸出现在体系由正电荷 转变为负电荷之前。在这种条件下, HA 可以高 效地交联 CS,同时体系保持净正电荷,以稳定 相应复合物纳米粒子。较小的尺寸和正电荷属性

也为后续利用这些复合物纳米粒子进行 siRNA 负载和递送提供了良好的基础。

2.2 CS/HA NPs 的存储稳定性

选择 HA_{135 k} 与不同分子量的 CS 以不同质 量比条件制备 NPs,利用 DLS 检测 NPs 在室温 下存储 14 d 内其尺寸变化来表征 NPs 的稳定性 (图 4)。结果显示, HA_{135 k}/CS_{50 k} 在 5:5、6:4 质 量比的条件下, 粒径和 PDI 较小(图 2), 随着室 温下存放时间延长, 粒径几乎没有变化(图 4A), 表明该条件下这 2 个比例制备的 NPs 具有良好 的稳定性。而其他质量比制备的纳米粒子的粒 径和 PDI 起伏变化都较大。图 4B 显示 HA135 k/ CS100 k在 6:4、7:3 质量比的条件下, 粒径较小 且在 14 d 的存储时间内尺寸都非常稳定。当 CS



图 2 不同 HA/CS 质量比制备的 NPs 的 DLS 表征 A、B: HA_{135 k}与不同分子量 CS 制备的复合物 NPs 的粒径、PDI 与 ζ 电位; C、D: CS_{100 k}与不同分子量 HA 制备的 NPs 的粒径、PDI 与 ζ 电位。图 中箭头指向相应数据所对应的纵坐标轴。

Figure 2 DLS characterization of NPs fabricated with HA and CS at varying HA/CS mass ratios. A, B: Particle size, PDI, and ζ -potential of NPs fabricated with HA_{135 k} and CS with various molecular weights; C, D: Particle size, PDI, and ζ -potential of NPs fabricated with CS_{100 k} and HA with various molecular weights. The arrows in the diagram point to the y-axis corresponding to their respective data.



图 3 HA 和 90% 脱乙酰度 CS 的化学结构式

Figure 3 Structure of HA and CS with deacetylation degree of 90%.

HA135 k与不同分子量的 CS 形成 NPs 的稳 图 4 定性 A: HA_{135 k}和 CS_{50 k}在质量比 1:9 到 9:1 形成的 NPs 在 14 d 内的粒径和 PDI; B: HA_{135 k} 和 CS100k 在质量比从 1:9 到 9:1 形成的 NPs 在 14 d 内的粒径和 PDI; C: HA135 k和 CS300 k在质量比 从 1:9 到 9:1 形成的 NPs 在 14 d 内的粒径和 PDI。 图中箭头指向相应数据所对应的纵坐标轴。

Figure 4 Stability of NPs fabricated with HA_{135 k} and CS with various molecular weights. A: Particle size and PDI of CS50 k/HA135 k NPs at HA/CS mass ratios of 1:9 to 9:1 during 14 day-storage; B: Particle size and PDI of CS_{100 k}/HA_{135 k} NPs at HA/CS mass ratios of 1:9 to 9:1 during 14 daystorage; C: Particle size and PDI of CS_{300 k}/HA_{135 k} NPs at HA/CS mass ratios of 1:9 to 9:1 during 14 day-storage. The arrows in the diagram point to the y-axis corresponding to their respective data.

的分子量上升到 300 kDa 时,复合物纳米粒子 的尺寸在 14 d 存储期间的变化明显大于分子量较 小的 CS 形成的纳米粒子, 说明过长的 CS 链不利 于形成稳定的 CS/HA 复合物纳米粒子(图 4C)。

http://journals.im.ac.cn/cjbcn

负载 siRNA 的 CS/HA NPs 表征 2.3

图 2显示,在 HA 与 CS 的质量比小于 8:2 时, CS/HA NPs 都带正电荷, 说明在该条件下 NPs 可以通过静电作用结合 siRNA。选择 CS50 k 与 HA135k 在 HA/CS 质量比为 5:5 和 6:4 的条件下 制备复合物纳米粒子,在其中加入 siRNA (NP/siRNA 质量比为 50:1)形成 CS/HA/siRNA 纳 米粒子,利用 SDS-PAGE 检验 NP 对 siRNA 的负 载作用。结果显示, 在载体和 siRNA 的质量比为 50:1 的情况下, CS50k和 CS50k/HA135k NPs 均具可 高效结合 siRNA (图 5A),载体/siRNA 混合体系 在电泳胶上看不到明显的自由 siRNA 的条带。

为了探究 siRNA 与载体混合的程序对 siRNA 复合物纳米粒子尺寸和 siRNA 递送效率的影响, 除了采用纳米粒子吸附 siRNA 的方法(得到的纳 米粒子以 HA/CS+s 表示),本研究还尝试了在制备 CS/HA 纳米粒子之前, 先将 siRNA 与 CS 或 HA 混合(记为 sCS 或 sHA),再制备复合纳米粒子(得 到的纳米粒子以 sHA/CS 或 HA/sCS 表示)。DLS 检测结果显示,CS50k单独和 siRNA 混合制备纳米 粒子(sCS_{50 k})的粒径非常大,尺寸远大于 CS_{50 k}, 结合了 siRNA 之后, C 电位略有下降, 这说明 siRNA 加入后引起了 CS_{50 k}的聚集(图 5B、5C)。 对于HA135k与CS50k在质量比为5:5时形成的纳米 粒子,加入 siRNA 后,尺寸没有显著变化,而表 面电荷从+36 mV降低到了+19 mV。表明通过这 种方法, siRNA 可以较好吸附到 CS/HA NPs 上, 中和了部分表面正电荷,且未引起粒子间的聚 集。而事先将 siRNA 加入 HA_{135 k} 或 CS_{50 k},再 与另一个高分子混合的制备方法得到的纳米粒 子表面电荷与没有 siRNA 的体系相比也显著降 低,但是其尺寸明显大于吸附方法制备的 siRNA 复合物纳米粒子。HA135 k与 CS50 k在质 量比为 6:4 条件下形成的纳米粒子,负载 siRNA 后表面电荷也发生了显著下降, 但吸附法和预



1349





混合 2 种 siRNA 负载方法得到的复合物纳米粒 子的尺寸没有显著差异。

2.4 siRNA 递送

本研究选择靶向萤火虫荧光素酶的 siRNA,在稳定表达萤火虫荧光素酶的HeLa细 胞和A549细胞上进行 siRNA体外递送效率评价。siRNA成功递送可以沉默荧光素酶的表达, 进而降低细胞内荧光素酶的浓度。检测添加荧 光素酶底物 luciferin 后细胞内化学发光强度时, 通过与未处理的细胞相比较来评估细胞内荧光 素酶的水平以及相应的基因沉默效率。初步筛 选结果显示,几乎所有的实验组都没有明显的细胞毒性,相关的复合物纳米粒子在该实验条件下有较好的生物相容性(图 6A)。在NPs:siRNA质量比为100:1、siRNA质量浓度为50 ng/孔的条件下,各组的相对荧光素酶表达都在50%以上。HA_{135 k}/CS_{50 k} 5:5 和 HA_{135 k}/CS_{50 k} 6:4 的siRNA 递送效率相对较高,在该条件下约25%荧光素酶基因被沉默。这可能与在该比例下形成的纳米粒子尺寸较小有关。

选择 HA_{135 k}/CS_{50 k} 6:4 复合物在 A549-Luc 细胞上进行递送效率评估,结果显示相应纳米

粒子在这2种细胞上的siRNA 递送效率类似(图 6B)。与纯 CS 体系相比, CS/HA 复合物纳米粒 子具有良好的细胞相容性, 但是复合物的组成 和物理化学性质需要进一步调控以提高其 siRNA 递送效率。当 NPs/siRNA 质量比为 100:1, siRNA 浓度提高到 200 ng/孔时, 相关复 合物在 HeLa-Luc 细胞中取得了良好的目标基 因沉默效果, 其中 HA_{135 k}/sCS_{50 k} 5:5 的 siRNA 递送效率接近阳离子脂质 ALC-0315 脂质纳米 粒子,同时细胞活力仍然保持在 100%左右,高 于 ALC-0315 脂质纳米粒子(图 6C)。在相同剂 量和制备条件下,仅使用 CS_{50 k}负载 siRNA 的 复合物的细胞活力则降低了很多,说明随着 CS 浓度的提高,正电荷的 CS 引起了严重的细胞 毒性。在 CS 体系加入适量的 HA 后,可以形成 稳定的、尺寸较小的 CS/HA 复合物纳米粒子, 同时降低体系正电荷和复合物纳米粒子的尺 寸,提高了 siRNA 的体外递送效率。





Figure 6 In vitro siRNA delivery capacity of CS/HA complex NPs. A: Screening of CS/HA complex NPs for siRNA delivery to HeLa-Luc cells. B: Delivery efficacy of selected CS/HA complex NPs on A549-Luc cells. C: siRNA delivery efficacy of selected NPs with high siRNA dose (200 ng siRNA per well). ***: P < 0.001. The arrows in the diagram point to the y-axis corresponding to their respective data.

http://journals.im.ac.cn/cjbcn

2.5 细胞摄取

使用 HA_{135 k}和 CS_{50 k}在质量比 6:4 的条件 下,采用混合法和吸附法制备的负载 Cy5 标记 的 siRNA 的 NPs,加到 HeLa 细胞中,共孵育 2 h 或 6 h, PFA 固定,DAPI 染色后,荧光显微 镜观察相关纳米粒子的细胞摄取(图 7A)。单独 CS_{50 k}结合 siRNA 形成的复合物(sCS_{50 k})的平均 粒径较大,但是 CS 带有较多正电荷,可以与 细胞膜发生强静电相互作用,导致了在 HeLa 细胞的快速内化。随着孵育时间由2h延长至6 h, 细胞内的红色信号并未增加。通过吸附作用制备的纳米粒子(6:4+s)和 siRNA 预加入再混合的纳米粒子(s6:4和 6:4s)与细胞共孵育后,可以发现在细胞核周围成簇的 Cy5 红色荧光信号,说明 siRNA 负载的复合物纳米粒子被有效摄取到了细胞中,而且随着孵育时间延长,细胞中的Cy5 信号增强。流式细胞术分析显示(图 7B、7C),孵育 6 h 后, CS/HA 纳米粒子比纯 CS_{50 k}介导了更多的 Cy5-siRNA 被 HeLa 细胞摄取。 尽管 HA 的加入减少了 siRNA-载体体系的正电



图 7 Cy5-siRNA NPs 在 HeLa 细胞中的摄取 A: Cy5-siRNA NPs 孵育 2 h 和 6 h 后 HeLa 细胞的荧 光图像。比例尺=30 µm。B、C: 流式细胞术定量分析孵育 6 h 后 Cy5-siRNA NPs 在 HeLa 细胞中的摄取。 Figure 7 Cellular uptake of Cy5-siRNA NPs by HeLa cells. A: Fluorescence images of HeLa cells after treatment with Cy5-siRNA NPs for 2 h and 6 h. Scale bar=30 µm. B, C: Flow cytometry analysis of cellular uptake of Cy5-siRNA NPs by HeLa cells after 6 h incubation with these NPs.

荷,降低了 siRNA-载体复合物与细胞的相互作用,从而一定程度上阻碍了细胞的摄取,但是HA 的引入也同时导致了尺寸更小、更稳定的复合物的形成,而且 HA 还赋予了纳米粒子与细胞表面 CD44 特异性相互作用的能力,因此,与不含 HA 的 CS NPs 相比,CS/HA NPs 在一定条件下可以介导更多的细胞摄取,实现更高效的 siRNA 递送。

3 讨论与结论

基于多糖的复合物纳米粒子具有良好的生 物相容性,且其物理化学性质可以通过改变组 成比例和制备条件进行有效调节,因此在降低 siRNA 纳米粒子毒性、提高 siRNA 递送效率方 面具有独特的优势^[30-32]。然而,带相反电荷的 聚电解质之间的静电络合容易导致沉淀或者大 尺寸纳米粒子的形成,进而影响 siRNA 的递送 效率[31-34]。本研究首先系统探究了阳离子多糖 CS 和阴离子多糖 HA 的分子量和质量比对 CS/HA 络合行为以及复合物纳米粒子的物化性 质的影响。结果显示, CS和 HA的络合作用及 复合物纳米粒子的尺寸在相同条件下随着聚合 物的分子量的增大而增加。体系在 HA 与 CS 质量比为 5:5 和 6:4 左右形成粒径较小、粒径分 布较窄的 NPs。进一步研究显示,这些纳米粒 子也具有更高的稳定性, 室温存放 14 d, 粒径 几乎没有变化。细胞实验表明, CS/HA NPs 具 有比纯 CS NPs 更好的细胞相容性。由于 CS/HA NPs 具有更小的尺寸, 且 HA 具备靶向癌细胞 表面 CD44 的能力,因此与 CS NPs 相比,CS/HA NPs 可以实现更高效的细胞摄取和 siRNA 递 送。HA135 k与 CS50 k以 5:5、6:4 质量比制备的 NPs负载 siRNA,在NPs:siRNA 质量比为100:1、 siRNA 剂量为 200 ng/孔条件下, 沉默了 HeLa-Luc 细胞中 50%-60%的荧光素酶基因。本研究 通过对复合物纳米粒子制备过程中带不同电荷的

多糖的分子量和复合物纳米粒子组成的综合优 化,克服了聚电解质复合物纳米粒子常见的不稳 定性问题^[31-34],制备了稳定的、尺寸较小的 CS/HA 纳米粒子,获得了良好的 siRNA 递送效果,为带 相反电荷高分子复合物纳米粒子的性能调控和 siRNA 载体的发展提供了借鉴。

作者贡献声明

刘怀艺:方案设计、实验操作、初稿写作; 黄方茜:数据管理、方案设计、实验操作;陈 柏求:数据管理、实验操作、提供材料;燕云 峰:监督指导、经费支持、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工 作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] CHARBE NB, AMNERKAR ND, RAMESH B, TAMBUWALA MM, BAKSHI HA, ALJABALI AAA, KHADSE SC, SATHEESHKUMAR R, SATIJA S, METHA M, CHELLAPPAN DK, SHRIVASTAVA G, GUPTA G, NEGI P, DUA K, ZACCONI FC. Small interfering RNA for cancer treatment: overcoming hurdles in delivery[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2020, 10(11): 2075-2109.
- [2] TATIPARTI K, SAU S, KASHAW SK, IYER AK. siRNA delivery strategies: a comprehensive review of recent developments[J]. Nanomaterials, 2017, 7(4): 77.
- recent developments[J]. Nanomaterials, 2017, 7(4): 77.
 [3] WENG YH, XIAO HH, ZHANG JC, LIANG XJ, HUANG YY. RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(5): 801-825.
- [4] TRABER GM, YU AM. RNAi-based therapeutics and novel RNA bioengineering technologies[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2023, 384(1): 133-154.
- [5] HU B, WENG YH, XIA XH, LIANG XJ, HUANG YY. Clinical advances of siRNA therapeutics[J]. The Journal of Gene Medicine, 2019, 21(7): e3097.
- [6] COLLINS TR. In the pipeline-hereditary transthyretin amyloidosis[J]. Neurology Today, 2018, 18(11): 26-27.
- [7] KELLEHER AD, CORTEZ-JUGO C, CAVALIERI F, QU YJ, GLANVILLE AR, CARUSO F, SYMONDS G, AHLENSTIEL CL. RNAi therapeutics: an antiviral strategy for human infections[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2020, 54: 121-129.
- [8] DONG YZ, SIEGWART DJ, ANDERSON DG. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2019, 144: 133-147.
- [9] JONES CH, CHEN CK, RAVIKRISHNAN A, RANE S, PFEIFER BA. Overcoming nonviral gene delivery

barriers: perspective and future[J]. Molecular Pharmaceutics, 2013, 10(11): 4082-4098.

- [10] MENDES BB, CONNIOT J, AVITAL A, YAO D, JIANG X, ZHOU X, SHARF-PAUKER N, XIAO Y, ADIR O, LIANG H, SHI J, SCHROEDER A, CONDE J. Nanodelivery of nucleic acids[J]. Nature Reviews Methods Primers, 2022, 2: 24.
- [11] ABOSALHA AK, AHMAD W, BOYAJIAN J, ISLAM P, GHEBRETATIOS M, SCHALY S, THAREJA R, ARORA K, PRAKASH S. A comprehensive update of siRNA delivery design strategies for targeted and effective gene silencing in gene therapy and other applications[J]. Expert Opinion on Drug Discovery, 2023, 18(2): 149-161.
- [12] KANASTY R, DORKIN JR, VEGAS A, ANDERSON D. Delivery materials for siRNA therapeutics[J]. Nature Materials, 2013, 12(11): 967-977.
- [13] XU Y, JR SZOKA FC. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection[J]. Biochemistry, 1996, 35(18): 5616-5623.
- [14] MAHON KP, LOVE KT, WHITEHEAD KA, QIN JE, AKINC A, LESHCHINER E, LESHCHINER I, LANGER R, ANDERSON DG. Combinatorial approach to determine functional group effects on lipidoid-mediated siRNA delivery[J]. Bioconjugate Chemistry, 2010, 21(8): 1448-1454.
- [15] YANG J, LIU HM, ZHANG X. Design, preparation and application of nucleic acid delivery carriers[J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(4): 804-817.
 [16] PATIL ML, ZHANG M, MINKO T. Multifunctional
- [16] PATIL ML, ZHANG M, MINKO T. Multifunctional triblock Nanocarrier (PAMAM-PEG-PLL) for the efficient intracellular siRNA delivery and gene silencing[J]. ACS Nano, 2011, 5(3): 1877-1887.
- [17] KOOIJMANS SAA, FLIERVOET LAL, van der MEEL R, FENS MHAM, HEIJNEN HFG, van BERGEN EN HENEGOUWEN PMP, VADER P, SCHIFFELERS RM. PEGylated and targeted extracellular vesicles display enhanced cell specificity and circulation time[J]. Journal of Controlled Release, 2016, 224: 77-85.
- [18] BHOLAKANT R, QIAN HL, ZHANG JM, HUANG X, HUANG DC, FEIJEN J, ZHONG YN, CHEN W. Recent advances of polycationic siRNA vectors for cancer therapy[J]. Biomacromolecules, 2020, 21(8): 2966-2982.
- [19] KIM B, PARK JH, SAILOR MJ. Rekindling RNAi therapy: materials design requirements for *in vivo* siRNA delivery[J]. Advanced Materials, 2019, 31(49): e1903637.
- [20] 王丹阳, 吴颉, 王宁. 壳聚糖盐酸盐稳定乳液的制备及 免疫效果分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 262-274.
 WANG DY, WU J, WANG N. Preparation of chitosan hydrochloride stabilized emulsion and its immunostimulatory effect[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 262-274 (in Chinese).
 [21] 苗淑杰. 半乳糖修饰组氨酸壳聚糖衍生物靶向给药
- [21] 苗淑杰. 半乳糖修饰组氨酸壳聚糖衍生物靶向给药 系统研究[J]. 材料科学, 2019, 9(1): 93-103.
 MIAO SJ. The study on the drug delivery of galactosylated histidine chitosan nanoparticles[J].
 Material Sciences, 2019, 9(1): 93-103 (in Chinese).
- galactosylated institute entosan hanoparticles[j]. Material Sciences, 2019, 9(1): 93-103 (in Chinese).
 [22] 张德蒙,娄茹云,王雨,刘袖洞,于炜婷,马小军. 壳聚糖/siRNA 纳米粒的制备与性能研究[J]. 功能材料, 2016, 47(2): 2188-2192.
 ZHANG DM, LOU RY, WANG Y, LIU XD, YU WT, MA XJ. Preparation and property characterization of chitosan/siRNA nanoparticles[J]. Journal of Functional Materials, 2016, 47(2): 2188-2192 (in Chinese).
- [23] 陈彦伶,张立,张凌琳,王琨. 壳聚糖及其衍生物在 口腔疾病防治中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2322-2333.

CHEN YL, ZHANG L, ZHANG LL, WANG K. Advances of chitosan and its derivatives in the prevention and treatment of oral diseases[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(7): 2322-2333 (in Chinese).
[24] ZHANG LZ, YANG AJ, RUAN CP, JIANG BP, GUO

- XL, LIANG H, KUO WS, SHEN XC. Copper-nitrogen-coordinated carbon dots: transformable phototheranostics from precise PTT/PDT to post-treatment imaging-guided PDT for residual tumor cells[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2023, 15(2): 3253-3265
- [25] HU XC, LI RH, LIÙ J, FANG K, DONG CY, SHI S. Engineering dual-responsive prodrug-MOFs as immunogenic cell death initiator for enhancing cancer immunotherapy[J]. Advanced Healthcare Materials, 2024, 13(7): e2302333.
- [26] HEMALATHA D, SUNEETHA M, KIM H, UTHAPPA UT, RAO KK, HAN SS. CD-44 active cystamine-bridged hyaluronic acid-polydopamine nanoparticles for chemo-photothermal cancer therapy[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2024, 682: 132879.
- [27] LEE MY, PARK SJ, PARK K, KIM KS, LEE H, HAHN SK. Target-specific gene silencing of layer-by-layer assembled gold-cysteamine/siRNA/PEI/HA nanocomplex[J]. ACS Nano, 2011, 5(8): 6138-6147.
- [28] PAIDIKONDALA M, RANGASAMI VK, NAWALE GN, CASALINI T, PERALE G, KADEKAR S, MOHANTY G, SALMINEN T, OOMMEN OP, VARGHESE OP. An unexpected role of hyaluronic acid in trafficking siRNA across the cellular barrier: the first biomimetic, anionic, non-viral transfection method[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2019, 58(9): 2815-2819.
 [29] WAN Y, DAI W, NEVAGI RJ, TOTH I, MOYLE PM.
- [29] WAN Y, DAI W, NEVAGI RJ, TOTH I, MOYLE PM. Multifunctional peptide-lipid nanocomplexes for efficient targeted delivery of DNA and siRNA into breast cancer cells[J]. Acta Biomaterialia, 2017, 59: 257-268.
- [30] GAO H, WANG SQ, LONG Q, CHENG RY, LIAN WH, KOIVUNIEMI A, MA M, ZHANG BD, HIRVONEN J, DENG XM, LIU ZH, YE XF, SANTOS HA. Rational design of a polysaccharide-based viral mimicry nanocomplex for potent gene silencing in inflammatory tissues[J]. Journal of Controlled Release, 2023, 357: 120-132.
- [31] VERMA A, CHAUHAN A, SHARMA T, THAKUR S, BHATIA R, SINGH TG, AWASTHI A. Advances in gene therapy: polysaccharide nanoparticles as pioneers in safe and effective gene delivery[J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2024, 102: 106287.
- [32] FAN YQ, LIU YQ, WU Y, DAI FF, YUAN MQ, WANG FY, BAI Y. DENG HB. Natural polysaccharides based self-assembled nanoparticles for biomedical applications: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 192: 1240-1255.
- [33] LALLANA E, RIOS de la ROSA JM, TIRELLA A, PELLICCIA M, GENNARI A, STRATFORD IJ, PURI S, ASHFORD M, TIRELLI N. Chitosan/hyaluronic acid nanoparticles: rational design revisited for RNA delivery[J]. Molecular Pharmaceutics, 2017, 14(7): 2422-2436.
- [34] LIANG Y, WANG YH, WANG LP, LIANG ZJ, LI D, XU XY, CHEN YB, YANG XC, ZHANG HB, NIU HT. Self-crosslinkable chitosan-hyaluronic acid dialdehyde nanoparticles for CD44-targeted siRNA delivery to treat bladder cancer[J]. Bioactive Materials, 2021, 6(2): 433-446.

圖: 010-64807509