

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.06.001

• 基础研究 •

用于核酸递送的 GSH 响应型纳米粒构建 *

张 钟 黄彦虎 隆 梅 张 攀 陆 琴 方 超^Δ

(上海交通大学医学院药理学与化学生物学系 上海 200025)

摘要 目的:核酸治疗近年来越来越受到关注,但是核酸药物易被快速清除、易被核酸酶降解、非特异性生物分布、以及不易被细胞摄取的缺点使其在体内难以发挥效果。本文提供了一种具有谷胱甘肽(GSH)响应性释放的纳米粒,能够进行有效核酸药物递送。**方法:**使用十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)制备介孔硅纳米粒,在介孔硅纳米粒表面进行巯基修饰并活化,使其与巯基修饰的聚丙烯亚胺和聚乙二醇反应,形成具有 GSH 响应的介孔硅纳米粒,通过静电吸附进行核酸荷载。马尔文粒度仪测量表面电位、粒径,透射电镜观察纳米粒形态。核酸电泳检测其核酸负载效率,通过体外检测 GSH 响应释放聚乙烯亚胺(PEI)情况,共聚焦显微镜观察细胞摄取以及溶酶体逃逸情况。**结果:**成功构建了具有 GSH 响应的纳米粒,粒径为 76.44 ± 1.68 nm,表面电位为 33.93 ± 0.59 mV;通过透射电镜观察到纳米粒呈圆形带孔颗粒状;琼脂糖核酸负载试验观察到当氮磷比大于 20 时,能够有效进行核酸负载。共聚焦显微镜显示该纳米粒能够成功被 MDA-MB-231 乳腺癌细胞摄取。在溶酶体逃逸试验中观察到纳米粒进入细胞后 3 h, Cy5-siRNA 与溶酶体的荧光分离,证明构建的纳米粒成功从溶酶体逃脱。**结论:**成功构建了具有 GSH 响应的介孔硅纳米粒,能够有效用于核酸递送。

关键词:核酸递送;介孔硅;GSH 响应;MDA-MB-231 细胞

中图分类号:R-33;R943 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)06-1001-06

Construction of GSH Responsive Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery*

ZHANG Zhong, HUANG Yan-hu, LONG Mei, ZHANG Pan, LU Qin, FANG Chao^Δ

(Department of Pharmacology and Chemical Biology, College of Medicine Sciences, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: Nucleic acid therapy has received more and more attention in recent years, but nucleic acid drugs are easily cleared quickly, easily degraded by nucleases, non-specific biodistribution and not easily taken up by cells, making it difficult to exert effects in the body. This article provides glutathione (GSH) responsive release nanoparticles capable of effective nucleic acid drug delivery. **Methods:** Use hexadecyltrimethylammonium chloride (CTAC) to prepare mesoporous silicon nanoparticles, modify and activate sulfhydryl groups on the surface of mesoporous silicon nanoparticles, and make them react with sulfhydryl modified polypropylene imine and polyethylene glycol to form mesoporous silicon nanoparticles with GSH response. The particles are loaded with nucleic acid by electrostatic adsorption. The Malvern particle size analyzer measures the surface potential and particle size, and observes the morphology of the nanoparticles with a transmission electron microscope. Nucleic acid electrophoresis is used to detect the nucleic acid loading efficiency, the GSH response to the release of PEI is detected in vitro, and the cell uptake and lysosome escape are observed by confocal microscope. **Results:** The nanoparticles with GSH response were successfully constructed, with a particle size of 76.44 ± 1.68 nm and a surface potential of 33.93 ± 0.59 mV. The nanoparticles were observed to be round and porous particles through transmission electron microscopy. The agarose nucleic acid loading experiment demonstrated when the ratio of nitrogen to phosphorus is greater than 20, nucleic acid can be loaded efficiently. Confocal microscopy showed that the nanoparticles could be successfully taken up by MDA-MB-231 breast cancer cells. In the lysosomal escape experiment, it was observed that the fluorescence of Cy5-siRNA separated from the fluorescence of the lysosome after 3 h entering the cell, which proved the established nanoparticles successful escaped from the lysosome. **Conclusions:** The mesoporous silicon nanoparticles with GSH response have been successfully constructed, which can be effectively used for nucleic acid delivery.

Key words: Nucleic acid delivery; Mesoporous silica; GSH response; MDA-MB-231 cells

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R943 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)06-1001-06

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81773274;82073379)

作者简介:张钟(1995-),男,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤靶向递送系统, E-mail: zhongz977@163.com

^Δ 通讯作者:方超,男,博士生导师,教授,主要研究方向:肿瘤靶向递送系统, E-mail: fangchao32@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2021-08-31 接受日期:2021-09-28)

前言

研究表明许多人类疾病都与基因有关^[1],基因治疗在癌症的治疗中有较好的前景^[2]。小干扰 RNA 是比较理想的核酸药物,它能够化学合成并以序列匹配的方式作用于细胞内的基因位点^[3]。但游离的 siRNA 药物由于容易被快速清除^[4],易被核酸酶降解^[5],非特异性生物分布和不易被细胞摄取^[6]的缺点而无法发挥作用。因此,构建有效的核酸药物递送系统显得尤为重要。阳离子胺基聚合物如 PEI 可以有效的进行核酸负载,但是高分子量 PEI 拥有良好的转染效率,但也会有高毒性 -- 诱导细胞膜损伤和凋亡^[7,8]。低分子量 PEI (<2000 Da)毒性低,但无法单独进行有效的核酸负载^[9,10]。介孔硅纳米粒在药物递送系统中具有较好的表现^[11,12],其表面功能化可实现多种用途^[13-15]。基于此,本文设计了能有效进行核酸递送的 GSH 响应型纳米粒。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)、三乙醇胺(TEOA)、聚乙烯亚胺 1800(PEI1800)、N- 羧基琥珀酰亚胺(NHS)、1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、三巯基丙酸(MPA)、氯化铵、冰醋酸($C_2H_4O_2$)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;正硅酸乙酯(TEOS)购自 sigma-aldrich 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;3- 硫丙基三甲氧基硅烷(MPTMS)、2,2'- 二硫二吡啶($C_{10}H_8N_2S_2$)购自上海麦克林生化科技有限公司;甲醇(CH_3OH)购自上海大同化学有限公司;Spectra/Por(R) 6 Membranes 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;DEPC 水(无 DNase, RNase)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;邻二硫吡啶 - 聚乙二醇 5000- 邻二硫吡啶(OPSS-PEG5000) 购自北京健凯科技股份有限公司;MDA-MB-231 乳腺癌细胞购自 ATCC;DPBS 和 L-15 培养基购自上海源培生物科技股份有限公司。

1.2 实验仪器

马尔文动态光散射(DLS)激光粒度仪购自英国 Malvern 公司;ThermoHeraeus Multifuge X1R 离心机购自 Thermo Fisher Scientific 公司;Milli-Q Integral 3 纯水仪购自默克密理博公司;1300 Series A2 生物安全柜购自 Thermo Fisher Scientific 公司;Varioskan Flash 多功能酶标仪购自 Thermo Fisher Scientific 公司;琼脂糖凝胶电泳槽购自北京龙方科技有限公司;超声波清洗机 SB-5200DTD 购自宁波新芝生物科技股份有限公司;德国 IKA/ 艾卡 C-MAG HS7 加热磁力搅拌器购自艾卡(广州)仪器设备有限公司;激光共聚焦显微镜(LSM5)购自德国徕卡(Leica)公司。

1.3 实验方法

1.3.1 siRNA@PEI-ss-MSN 纳米粒制备与表征 精确称取 0.65 g CTAC 溶解于 20 mL 三蒸水中,加入 1 mL 8% TEOA 溶液,在 95 °C 条件下搅拌 1 h,然后逐滴加入 1.5 mL TEOS 溶液,继续在 95 °C 条件下搅拌 1 h,冷却至室温,使用甲醇洗 2 次,收集纳米粒沉淀,将收集得到的纳米粒超声溶解在 100 mL 氯化铵的甲醇溶液中(10 mg/mL),水浴超声 3 h,离心收集沉淀,重复 3 次,去除模板剂,得到 MSN 纳米粒重悬于甲醇溶液中备

用。取 250 mg MSN 溶解于 100 mL 的甲醇溶液中,水浴超声 5 min,在搅拌条件下逐滴加入 1 mL MPTMS。在氮气保护下,于 80 °C 搅拌 12 h,对 MSN 外表面进行巯基化修饰。精确称取 550 mg 2,2'- 二硫二吡啶溶解于 10 mL 甲醇溶液中,在搅拌条件下加入 0.2 mL 冰醋酸,然后加入 250 mg 巯基化后的介孔硅纳米粒(超声分散于 30 mL 甲醇溶液中),在室温闭光条件下搅拌 12 h,然后使用甲醇洗 3 次,活化介孔硅表面巯基。精确称取 575 mg NHS、960 mg EDC、290 μ L MPA 溶解于 10 mL 甲醇溶液中,室温条件下搅拌 5 h,然后逐滴加入 10 mL 的 PEI 1800 甲醇溶液(15 mg/mL),在氮气保护下搅拌 12 h,将得到的溶液置于 1000 Da 的透析膜内,在 1 L 的大烧杯中 4 °C 条件下搅拌 12 h,换水,继续搅拌 12 h,冻干,得到巯基化的 PEI 1800-SH。取上述吡啶化的介孔硅纳米粒分散于 0.1 M HEPES(pH 8.0)缓冲液中,加入适量的 PEI 1800-SH,室温条件下搅拌 3 h。使用 HEPES 溶液洗 1 次,加入适量的 OPSS-PEG5000,继续在室温条件下搅拌 3 h,使用 DEPC 水洗 2 次,得到 PEI-ss-MSN 纳米粒。将 PEI-ss-MSN 纳米粒与 siRNA 按照合适的 N/P ratio 混匀后,静置 10 min,即得到 siRNA@PEI-ss-MSN 纳米粒。将纳米粒重悬于水溶液中,使用马尔文动态光散射(DLS)激光粒度仪进行 Zeta 电位和粒径的测量。将纳米粒的水溶液滴加到铜网上,进行电镜观察。

1.3.2 PEI-ss-MSN 纳米粒核酸装载 将 PEI-ss-MSN 纳米粒与 Cy5-siRNA 纳米粒按照不同氮磷比混合后作为样品备用。称取 1.2 g 琼脂糖于 250 mL 烧杯中,加入 60 mL 1 $\times$ TAE 溶液,加入 6 μ L 核酸染料,搅拌均匀后,在微波炉高火中加热 2 min,待胶呈透明状,几乎无明显气泡时,倒入胶板架中,插入梳子,等待 30 min。拔出梳子,将配好的胶放入琼脂糖凝胶电泳槽中,上样,在 90 V 电压条件下电泳 30 min,然后在显影仪上曝光。

1.3.3 纳米粒表面 PEI 的 GSH 响应性释放考察 取定量 PEI-ss-MSN 纳米粒,分散于 5 mL PBS 溶液的试管中,一组含有 5 mM GSH,另一组不含 GSH,在室温下进行 PEI 的 GSH 响应性释放实验。分别在 1、2、4、8、12、24 h 取 0.2 mL 溶液,离心(12000 rpm, 10 min)收集上清,使用荧光胺法检测上清中释放的 PEI 与荧光胺反应产物的荧光强度(激发:406 nm,发射 476 nm)。使用纳米粒溶液与荧光胺反应物的荧光强度作为总荧光强度,来计算 PEI 的相对释放量,计算公式为:PEI 相对释放量 = 收集上清 PEI 与荧光胺反应后的荧光强度 / 纳米粒与荧光胺反应后的荧光总强度。

1.3.4 MDA-MB-231 细胞培养 L-15 细胞完全培养基配制(50 mL):44.5 mL L-15 培养基 + 5 mL FBS + 0.5 mL 青霉素 - 链霉素双抗。从 -80 °C 冰箱中取出冻存的 MDA-MB-231 细胞,迅速放入 37 °C 水浴锅解冻,然后将解冻的细胞悬液加入含有 DPBS 溶液的离心管中,离心(800 rpm, 5 min)弃上清,加入 5 mL 预热的 L-15 完全培养基,重悬后移入 25 mm 培养瓶中,于 37 °C,无 CO₂ 条件下培养。2 天换一次液,培养 2-3 天按照 1:2 进行细胞传代。

1.3.5 siRNA@PEI-ss-MSN 纳米粒的细胞摄取 将 MDA-MB-231 细胞以 1 $\times$ 10⁵ 的密度接种在有细胞爬片的 24 孔板中,培养 24 h。吸去原有培养基溶液,向孔中加入 1 mL 含有 Cy5-siRNA@PEI-ss-MSN(Cy5-siRNA 200 nM)的无血清培

培养基,共孵育 2 h。孵育结束后用 DPBS 溶液洗 2 次。用 4%多聚甲醛固定,Hoechst 对细胞核染色 10 min,DPBS 洗 3 次,将爬片固定在载玻片上,使用共聚焦显微镜观察。

1.3.6 siRNA@PEI-ss-MSN 纳米粒的溶酶体逃逸 将 MDA-MB-231 细胞以 1×10^5 的密度接种在带有细胞爬片的 24 孔板中,培养 24 h。吸去培养基,向孔中加入 1 mL 含有 Cy5-siRNA@PEI-ss-MSN 的无血清培养基,孵育 0.5 h 后,吸去含有纳米粒的培养基,加入培养基分别继续孵育 0 h、0.5 h、1.5 h。然后使用溶酶体染料 (LysoTracker® Red DND-99) 标记溶酶体 1 h。结束孵育后,使用 DPBS 洗 2 次,用 4%多聚甲醛固定,Hoechst 染细胞核,DPBS 洗 3 次,将爬片固定在载玻片上,使用共聚焦显微镜观察。

1.4 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8 软件进行数据处理,结果以 Mean $\pm$ SD 表示。

2 实验结果

2.1 siRNA@PEI-ss-MSN 纳米粒表征

通过以上方法制备得到的 MSN 的粒径为 56.35 ± 4.53 nm,Zeta 电位为 -25.43 ± 0.47 mV,经过修饰连接上 PEI 和 PEG 后,PEI-ss-MSN 粒径增加为 65.38 ± 3.09 nm,电位变为 39.10 ± 0.71 mV,再通过静电吸附装载 siRNA 后,siRNA@PEI-ss-MSN 纳米粒的粒径增加为 76.44 ± 1.68 nm,电位变为 33.93 ± 0.59 mV。图 1(A)(B)(C)为透射电镜观察到的纳米粒。

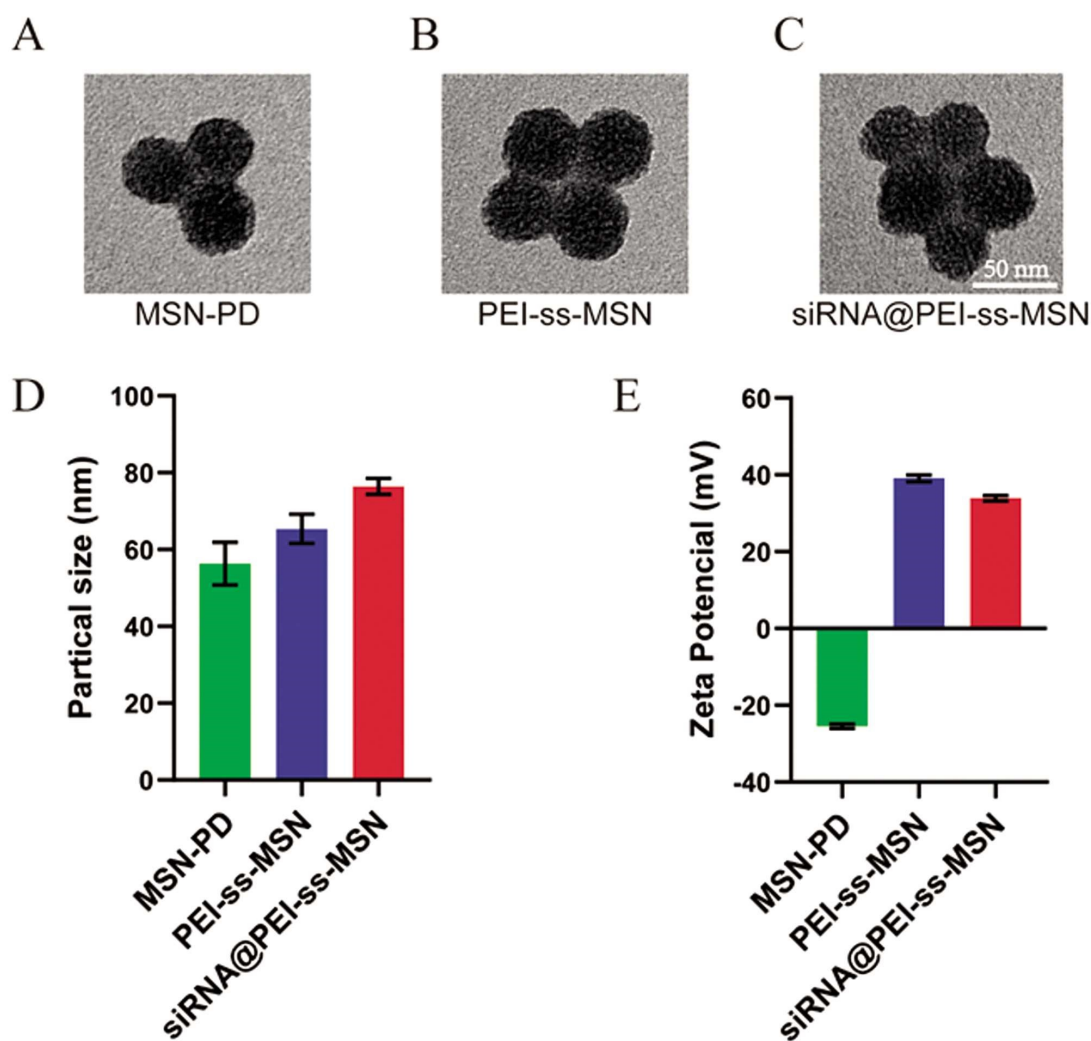


图 1 纳米粒表征

Fig.1 Characterization of nanoparticles

Note: (A) TEM of MSN-PD. (B) TEM of PEI-ss-MSN. (C) TEM of siRNA@PEI-ss-MSN. (D) Particle sizes change. (E) Surface potential change.

2.2 siRNA@PEI-ss-MSN 纳米粒核酸负载效率

通过琼脂糖电泳的方法来考察纳米粒载体对 siRNA 的装载能力。可以观察到随着氮磷比的增加,当 N/P ratio > 20 的时候,纳米粒能够完全负载 siRNA,使 siRNA 被完全阻滞在上样孔道之中,琼脂糖凝胶上没有 siRNA 的泳带,表明我们构建的介孔硅纳米粒递送系统能够有效的进行 siRNA 负载,从而进

行核酸的有效递送。

2.3 siRNA@PEI-ss-MSN 纳米粒体外 GSH 响应性释放

聚乙炔亚胺(PEI1800)本身是没有荧光的,荧光胺自身也无法发光,但是当荧光胺与 PEI 上面的伯胺发生反应后,即可产生荧光,在 406 nm 处进行激发,在 476 nm 处接受,可得到荧光光谱(图 3B),据此来考察纳米粒 PEI 的释放。

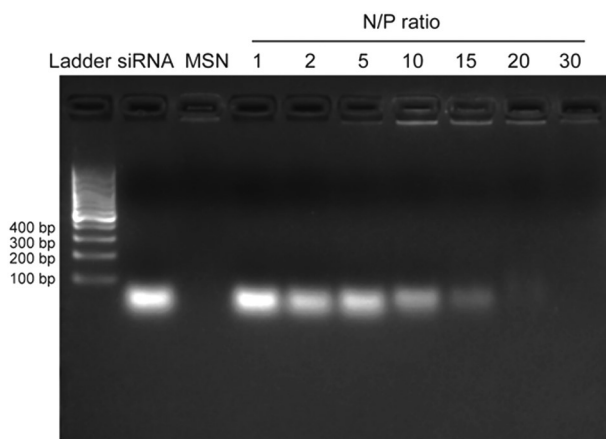


图2 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Photograph of agarose gel electrophoresis

纳米粒 PEI 的释放结果如图 3A 所示,在室温条件下,加有 5 nM GSH 的纳米粒组表现为先突释、后缓释的特性,GSH 作为还原剂可以将二硫键还原为巯基而使其断开。在 4 h 时,释

放出超过 40% 的 PEI,随后继续进行释放,在 24 h 时达到释放峰值,接近 80%。然而,没有加 GSH 的纳米粒组仅有少量 PEI 释放,24 h 释放量为 12% 左右。

图 3B 为 24 h 时,纳米粒的释放荧光光谱。可以观察到,在 476 nm 处,荧光达到峰值,在荧光峰值处,加 GSH 的纳米粒组,释放量接近 80%,而未加 GSH 的纳米粒组释放仅为 12% 左右。结果表明,加入 GSH 可以促进 PEI 从纳米粒表面进行释放。

2.4 siRNA@PEI-ss-MSN 纳米粒的细胞摄取

游离 siRNA 分子量太小且为带负电荷而无法被细胞有效摄取,通过将 siRNA 装载在介孔硅纳米粒上就能够实现 siRNA 的有效递送,被细胞进行摄取。MDA-MB-231 细胞摄取 siRNA@PEI-ss-MSN 纳米粒 2 h 后,负载 siRNA 的纳米粒成功摄取进细胞。Hoechst 染色细胞核,通过 405 nm 波长激发,461 nm 波长接受发射荧光;Cy5 标记的 siRNA,通过 647 nm 波长激发,在 670 nm 波长接受发射荧光,观察细胞的摄取情况(图4)。

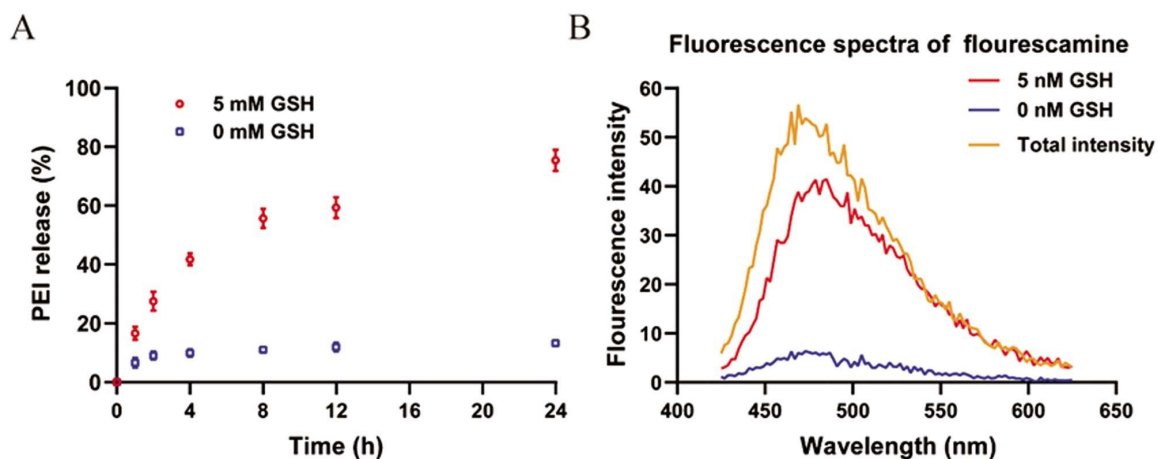


图3 纳米粒表面 PEI 的释放

Fig.3 Release of PEI from the nanoparticles' surface

Note: (A) Release curve of PEI from the surface of nanoparticles. (B) Fluorescence amine spectrum of 24 h PEI releasing.

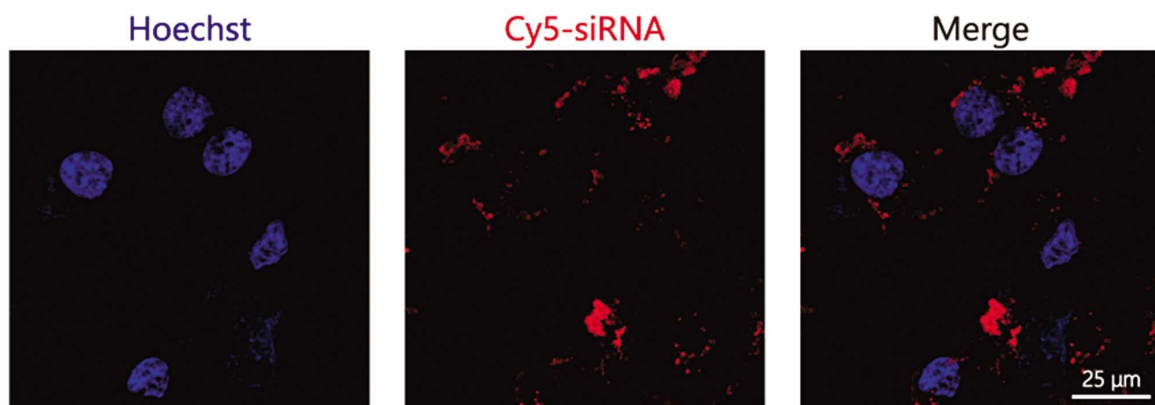


图4 MDA-MB-231 细胞摄取 siRNA@PEI-ss-MSN 纳米粒

Fig.4 MDA-MB-231 cells ingested siRNA@PEI-ss-MSN nanoparticles

2.5 siRNA@PEI-ss-MSN 纳米粒的溶酶体逃逸

核酸药物被细胞摄取之后,能够成功从溶酶体逃逸才能发挥其作用^[16]。MDA-MB-231 细胞摄取 siRNA@PEI-ss-MSN 纳米粒 0.5 h 后,继续孵育进行溶酶体的标记,随后进行观察。

DND-99 标记的溶酶体,在 577 nm 波长激发,590 nm 波长接受发射激光。可以看到在 1.5 h 时,RNA 的荧光和溶酶体的荧光重叠在一起呈黄色,表明纳米粒在溶酶体内。随后 2 h 逐渐分离,在 3 h 时可以观察到 RNA 的荧光和溶酶体的荧光完全分离。

表明纳米粒成功从溶酶体逃逸。由于 PEI 的质子海绵效应^[17], 能够使得纳米粒快速从溶酶体逃逸, 有利于后续 RNA 的表达。

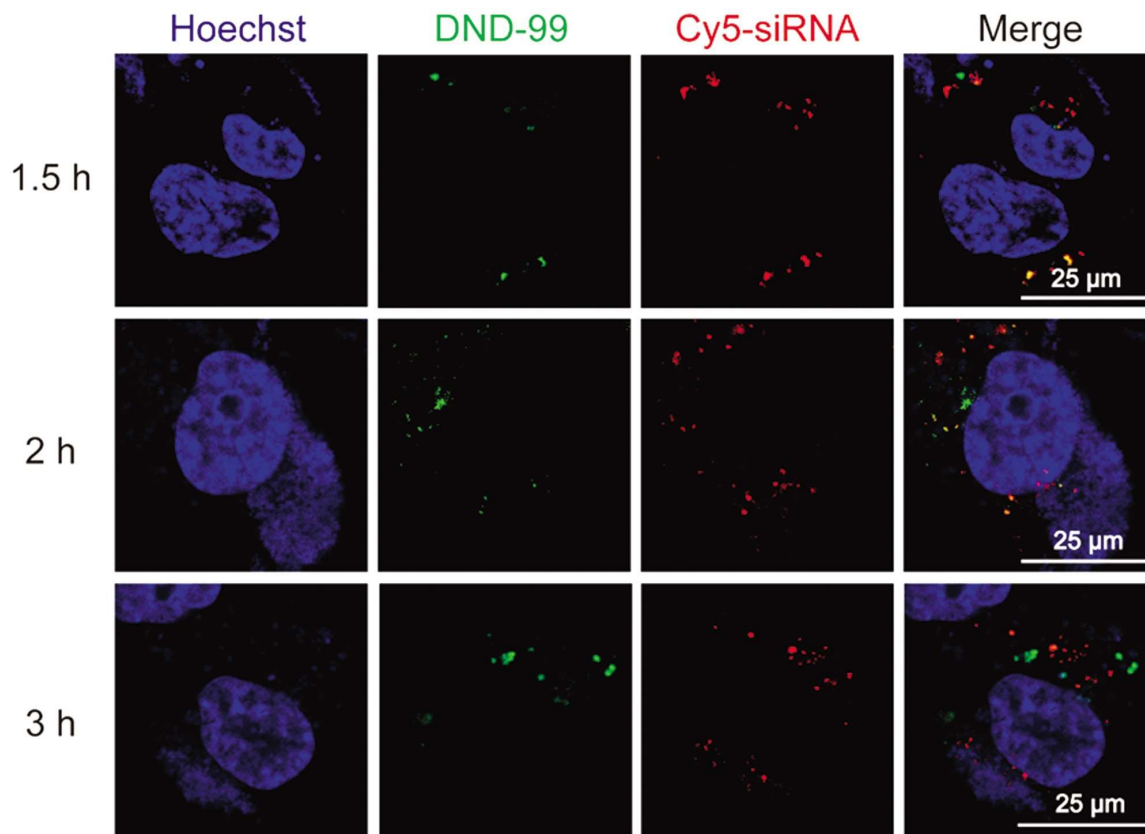


图 5 共聚焦显微镜观察 siRNA@PEI-ss-MSN 纳米粒溶酶体逃逸

Fig.5 Confocal microscopy observation of siRNA@PEI-ss-MSN nanoparticles lysosome escape

3 讨论

基因治疗具有巨大潜力,它为目前依靠传统疗法无法治愈的疾病提供了新的选择。从 2016 年以来,欧洲药品管理局和美国食品药品监督管理局批准了 6 种用于基因治疗的药物产品^[18]。在基因治疗中,核酸治疗目前已成为医学研究领域的热点。基于基因编辑和基因表达的广泛研究,包括 siRNA、miRNA、shRNA、sgRNA 等核酸药物得以研究开发^[19]。而核酸作为一种高度亲水且带负电荷的生物聚合物,一直以来难以进行递送,未经修饰的核酸无法进入细胞内,并且会被快速分解和清除^[20-22]。因此构建有效的核酸递送平台是至关重要的^[23,24]。

首先,我们使用了介孔硅这一纳米粒,介孔硅可以通过氨基化修饰^[25-27],连接阳离子聚合物,例如 PAMAM^[28]、PEI^[10,29]等提高与核酸药物的结合和提高转染效率。此外,由于质子海绵效应的存在,PEI 涂层修饰的 MSN 是一种有效提高转染,促进核酸药物溶酶体的方式^[30,31]。在此,我们构建了 MSN 通过二硫键连接 PEI 和 PEG 的纳米粒作为核酸递送平台。

然后,通过 DLS 检测纳米粒的粒径和电位变化,证明 PEI 和 siRNA 成功结合到纳米粒上。随后使用琼脂糖电泳的实验,直观的观测到纳米粒载体能够良好的吸附 siRNA,当氮磷比大于 20 时,siRNA 会被完全阻滞在上样孔道之中。同时,我们又通过 GSH 的释放实验证明了二硫键连接的 PEI 的成功修饰,以及纳米粒的响应性释放。最后,将纳米粒与 MDA-MB-231 细胞共孵育,通过共聚焦显微镜观察到 siRNA 成功被细胞摄取。

同时,可以观察到纳米粒成功从细胞溶酶体逃逸出来。

综上所述,本文提供了一种具有 GSH 响应性释放的核酸递送系统。对于介孔硅纳米粒药物递送进行了探索,该纳米材料的良好修饰性和稳定性,为以后的药物递送研究提供了新思路。后续计划对该纳米系统递送核酸药物的治疗效果进行探究。

参考文献(References)

- [1] Dewey FE, Murray MF, Overton JD, et al. Distribution and clinical impact of functional variants in 50,726 whole-exome sequences from the DiscovEHR study[J]. Science, 2016, 354(6319): aaf6814
- [2] Bertrand N, Wu J, Xu X, et al. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2014, 66: 2-25
- [3] de Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, et al. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics [J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(6): 443-453
- [4] Takakura Y, Nishikawa M, Yamashita F, et al. Development of gene drug delivery systems based on pharmacokinetic studies [J]. Eur J Pharm Sci, 2001, 13(1): 71-76
- [5] Abdelhady HG, Allen S, Davies MC, et al. Direct real-time molecular scale visualisation of the degradation of condensed DNA complexes exposed to DNase I[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(14): 4001-4005
- [6] Huang Y, Hong J, Zheng S, et al. Elimination pathways of systemically delivered siRNA[J]. Mol Ther, 2011, 19(2): 381-385
- [7] Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, et al. A two-stage poly(ethyleneimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy

- [J]. *Mol Ther*, 2005, 11(6): 990-995
- [8] Patnaik S, Gupta KC. Novel polyethylenimine-derived nanoparticles for in vivo gene delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2013, 10(2): 215-228
- [9] Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly (ethylenimine) as a gene delivery vehicle [J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 45(3): 268-275
- [10] Meng H, Mai WX, Zhang H, et al. Codelivery of an optimal drug/siRNA combination using mesoporous silica nanoparticles to overcome drug resistance in breast cancer in vitro and in vivo [J]. *ACS Nano*, 2013, 7(2): 994-1005
- [11] Knežević NŽ, Ruiz-Hernández E, Hennink WE, et al. Magnetic mesoporous silica-based core/shell nanoparticles for biomedical applications[J]. *RSC Advances*, 2013, 3(25): 9584-9593
- [12] Martínez-Carmona M, Ho QP, Morand J, et al. Amino-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticle-Encapsulated Octahedral Organoruthenium Complex as an Efficient Platform for Combatting Cancer[J]. *Inorg Chem*, 2020, 59(14): 10275-10284
- [13] Mekaru H, Lu J, Tamanoi F. Development of mesoporous silica-based nanoparticles with controlled release capability for cancer therapy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 95: 40-49
- [14] Barui S, Cauda V. Multimodal Decorations of Mesoporous Silica Nanoparticles for Improved Cancer Therapy[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(6): 527
- [15] Alyassin Y, Sayed EG, Mehta P, et al. Application of mesoporous silica nanoparticles as drug delivery carriers for chemotherapeutic agents[J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25(8): 1513-1520
- [16] Yang XZ, Dou S, Wang YC, et al. Single-step assembly of cationic lipid-polymer hybrid nanoparticles for systemic delivery of siRNA [J]. *ACS Nano*, 2012, 6(6): 4955-4965
- [17] Pei D, Buyanova M. Overcoming Endosomal Entrapment in Drug Delivery[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2019, 30(2): 273-283
- [18] High KA, Roncarolo MG. Gene Therapy[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(5): 455-464
- [19] Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, et al. Non-viral vectors for gene-based therapy[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(8): 541-555
- [20] Juliano RL. The delivery of therapeutic oligonucleotides [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(14): 6518-6548
- [21] Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, et al. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles[J]. *Mol Pharm*, 2008, 5(4): 505-515
- [22] Pecot CV, Calin GA, Coleman RL, et al. RNA interference in the clinic: challenges and future directions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(1): 59-67
- [23] Singh A, Trivedi P, Jain NK. Advances in siRNA delivery in cancer therapy[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(2): 274-283
- [24] Wu X, Wu T, Liu J, et al. Gene Therapy Based on Nucleic Acid Nanostructure[J]. *Adv Healthc Mater*, 2020, 9(19): e2001046
- [25] Tao C, Zhu Y, Xu Y, et al. Mesoporous silica nanoparticles for enhancing the delivery efficiency of immunostimulatory DNA drugs[J]. *Dalton Transactions*, 2014, 43(13): 5142-5150
- [26] Kim TH, Kim M, Eltohamy M, et al. Efficacy of mesoporous silica nanoparticles in delivering BMP-2 plasmid DNA for in vitro osteogenic stimulation of mesenchymal stem cells [J]. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 2013, 101 A(6): 1651-1660
- [27] Zheng K, Yang H, Wang L, et al. Amino-functionalized mesoporous silica nanoparticles: Adsorption and protection for pcDNA3.1 (+) -PKB-HA[J]. *Journal of Porous Materials*, 2013, 20(5): 1003-1008
- [28] Chen AM, Zhang M, Wei D, et al. Co-delivery of Doxorubicin and Bcl-2 siRNA by mesoporous silica nanoparticles enhances the efficacy of chemotherapy in multidrug-resistant cancer cells[J]. *Small*, 2009, 5(23): 2673-2677
- [29] Zhang L, Wang T, Li L, et al. Multifunctional fluorescent-magnetic polyethyleneimine functionalized Fe₃O₄-mesoporous silica yolk-shell nanocapsules for siRNA deliver[J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(69): 8706-8708
- [30] Kircheis R, Wightman L, Wagner E. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 53(3): 341-358
- [31] Cebrián V, Yagüe C, Arruebo M, et al. On the role of the colloidal stability of mesoporous silica nanoparticles as gene delivery vectors [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2011, 13(9): 4097-4108