

TRAUTEC 创健医疗 × 沙利文

FROST & SULLIVAN

# 核酸四面体 蓝皮书

Blue Book of Tetrahedral Framework Nucleic Acid

## ■ 引言

核酸是生命的基本构建单元，在生物学和医学领域占据着核心地位。随着科技的进步，核酸不仅是遗传信息的载体，还成为设计和构建纳米材料的重要原料。其中，核酸四面体（tetrahedral framework nucleic acids, tFNA）作为一种新兴的纳米材料，在生物医学和化妆品领域展现出巨大的应用潜力。

本报告从核酸的基本概念出发，系统地介绍了核酸的类型、历史、命名以及分子结构，为理解tFNA的创新应用奠定了基础。我们详细阐述了DNA、RNA以及人工核酸的特性和功能，探讨了核酸的分子组成与大小、拓扑结构，建立了对这些生命分子的全面认识。随后，报告介绍了DNA纳米技术的演进历程，从早期的DNA拼接技术到现代的DNA折纸术和动态DNA纳米结构，展示了这一领域的快速进步。我们重点讨论了tFNA的独特结构特性，包括其高机械强度、稳定性、可编辑性以及良好的生物相容性和安全性。

在应用方面，本报告详细探讨了tFNA在多个领域的潜在价值。从基于结构的细胞生物学调控到作为药物载体，tFNA展现出多样化的功能。特别是在皮肤和软组织修复、骨组织再生、神经系统保护、免疫系统调节以及抗菌治疗等方面，tFNA都显示出独特的优势。

应用的另一个核心部分聚焦于tFNA在皮肤领域的创新应用，包括促进伤口愈合、缓解皮肤衰老、美白、修复光敏损伤和防脱生发等。我们以tFNA寡核苷酸合成成本高昂这一核心痛点为切入点，介绍了创健医疗创新性的生物合成策略。这一策略不仅显著降低了生产成本，还为tFNA在化妆品产业领域的应用开辟了新的可能性。本报告深入探讨了tFNA作为化妆品原料的多重功效，以及其在生物合成和化妆品领域的广阔应用前景。化妆品领域的应用不仅为tFNA开辟了新的市场，还为其在更广泛生物医学领域的应用积累了宝贵经验。这种创新性的应用探索代表了推动核酸纳米材料产业化发展的重要尝试，有助于解决tFNA高成本的问题，同时为化妆品行业带来革新性的产品和技术。通过在化妆品领域的实际应用，我们不仅可以为tFNA的产业化积累经验，还能为其在更广泛领域的应用铺平道路。

最后，我们展望了tFNA在未来研究和应用中的潜力，讨论了可能面临的挑战和机遇。这包括进一步优化生产工艺、探索新的应用领域等。通过系统性地分析tFNA的特性和应用，本报告旨在为研究者、产业界人士以及政策制定者提供一个全面的视角，以更好地理解和开发这一前沿材料的潜力。

我们希望，本报告能够帮助读者更全面地理解tFNA的重要性和广泛应用前景，为tFNA的研究和应用提供有价值的参考，并为相关领域的研究人员和从业人员提供启示和灵感。随着研究的深入和技术的进步，我们相信tFNA将在未来的生物医学和个人护理领域发挥越来越重要的作用，不仅推动科技创新，还将为提升人类健康和生活质量做出重要贡献。此外，tFNA的发展也将为其他新兴纳米材料的产业化道路提供宝贵的经验和参考。

### 编写顾问（以姓氏拼音首字母排序）：

丁小燕、樊春海，林云锋，刘玮，朱世辉

### 编写委员会

江苏创健医疗科技股份有限公司（以姓氏拼音首字母排序）：曹凯杰，储筠，凡孝菊、冯佩莹，付生伟，韩剑南，胡淑娴，纪白慧，李斌，李丹璐，李李佳，李海航，潘立旭，钱松，秦天，翟源心，朱家慧

成都云海四面体生物科技有限公司（以姓氏拼音首字母排序）：罗德伦，刘巾男，李蓉，肖文丹，余阳，朱江

弗若斯特沙利文（北京）咨询有限公司：毛化，李谦，汪鹏，吕晓彤

### 联合发布单位

江苏创健医疗科技股份有限公司

成都云海四面体生物科技有限公司

弗若斯特沙利文（北京）咨询有限公司

## ■ 序言

受樊春海院士“框架核酸”理论启发，我们团队用12年完成了核酸四面体的技术研究和临床转化应用。核酸四面体具有良好的可编程性和自组装能力，可以像编写程序一样精确地控制它的结构和功能，使其能够自组装成更高阶的稳定三维结构，具有卓越的透皮跨膜特性，在细胞抗衰领域也呈现出优秀功效。创健医疗在全球范围首次生物合成四面体核酸，产量产能大幅度提升，标志着该领域正从实验室走向产业化应用。此次蓝皮书的发布能够帮助读者更好地了解核酸四面体的重要性和作用，可以预见，在不久的将来，中国自主原研的核酸四面体将会在医疗健康、生物技术、新材料等领域发挥越来越重要的作用，为人类社会带来颠覆性的变革。

——四川大学华西口腔医学院党委副书记、口腔疾病研究国家重点实验室副主任，林云锋

核酸四面体为什么如此特别？首先，它具有优异的生物相容性。作为构成生命遗传物质的基本单元，DNA本身对人体非常安全，这使得核酸四面体在生物医学领域拥有巨大的应用潜力。比如，我们正在探索利用它来治疗中枢神经系统疾病和眼科疾病。其次，核酸四面体易于功能化改造。这意味着我们可以根据不同的需求，在它的表面「嫁接」上各种功能分子，就像为它穿上不同的「工作服」，使其胜任不同的任务。作为化妆品，核酸四面体可以搭载靶向美容成分，同步实现多元化的抗衰美容效果。创健医疗在生物合成技术上的重大突破让大众很快能体验到核酸四面体的神奇，我们也将进一步加强与创健医疗的合作，将生物合成核酸四面体应用在一系列药物研发中，共同为造福社会贡献力量。

——云海生物总裁，罗德伦

tFNAs, as a promising nanomaterial, demonstrate significant potential in both wellness and beauty industry. But this technology also has quite a few constraints to overcome, e.g., production, safety, regulatory, etc. Shiseido CIC appreciate Trautec embrace this challenge. And sincerely congratulate Trautec on tFNAs R&D progress and Blue Paper published! As a top beauty and wellness global group, we are also looking forward to research deepening and technology advancement on tFNAs, especially efficacy and safety. In coming future, tFNAs will play a more and more important role on biomedicine and personal care, even from global wise, with joint efforts from different industries.

——Shiseido China CIO, Araki Hidefumi

二十年来，珀莱雅秉承着科学护肤的理念，不断开拓、探索、引领中国国内品牌的发展。以创新的原料和配方技术，成为世界一流品牌的企业使命，让更多消费者看到中国品牌背后的科研故事。创健医疗是珀莱雅全球独家XVII型重组胶原蛋白的战略合作伙伴，很高兴看到创健医疗在原料端不断创新突破技术瓶颈，首次生物合成创新成分核酸四面体，其独特的空间构象决定了优异的生物学功能，成功的规模化量产也让大众很快就能体验到核酸四面体的魅力。我们深知科学护肤的重要性，也坚信只有不断创新，才能满足消费者日益增长的护肤需求，很期待和创健医疗持续保持紧密合作，共同研究探索核酸四面体这款来自前沿合成生物学技术、超越想象的中国成分，真正走进“基因抗衰”时代。

——珀莱雅原料开发总监，黄雪锋

## ■ 序言

随着现代护肤科技的不断进步，我们对皮肤健康和护理的理解也在不断深化。作为护肤品行业的领导者，Allergan始终致力于引领创新，运用最先进的科学技术为全球消费者提供卓越的护肤体验。在这个过程中，我们与创健医疗的合作至关重要，他们不断为我们提供优质的重组胶原蛋白材料，并在此基础上不断开拓新的可能性。此次，创健医疗推出的核酸四面体（tFNAs）材料，为护肤品配方注入了革命性的活性成分。tFNAs作为一种纳米结构，不仅具有出色的生物兼容性，还能够显著提升护肤品的功效。这项突破性的技术将进一步推动护肤品的功能创新，为消费者带来更加显著的皮肤改善效果。在这本白皮书中，您将了解到tFNAs的研发背景、技术优势以及其在护肤品中的应用潜力。我们相信，这项新技术将开启护肤品科学的全新篇章，并期待与创健医疗一起，共同推动护肤行业的未来发展。

——艾尔建皮肤护理研究开发部副总监， Tony Wang

创健医疗作为自然堂集团的长期重要合作伙伴，始终走在生物科技探索的前沿。我们期待四面体核酸技术的最新进展，可以为下游应用领域带来革命性的突破。四面体核酸，作为新型生物材料，本身被证实具有细胞调控、组织修复等多重功能，是潜在高效、生物兼容性好和具备个性化可行性的肌肤根源级抗衰老解决方案，而且，更是在医药给药和化妆品成分递送方面有着广阔的应用前景，可以说是合成生物学领域的又一个前沿应用突破领域，有望开启生物科技在化妆品及医疗领域应用的新篇章。

——自然堂集团研发中心总经理， 邹岳 博士

tFNA is a nano high-tech material highly anticipated for use as a platform technology that can enhance efficacy not only in biomedicine and disease diagnosis but also in cosmetics, which are close to our daily lives. TrauTEC deserves credit for achieving the commercial production of tFNA, which is challenging to synthesize. We appreciate TrauTEC's efforts in pioneering an uncharted path for its first application in the cosmetics field, leading safety and efficacy tests, and sharing the process and results with the industry through the publication of the bluebook. We hope that Cosmax, the world's leading OBM/ODM company, propagates various high-efficacy materials developed based on tFNA into cosmetics, and that we collaborate to create beauty worldwide.

——COSMAX China R&I/ BCT Director, Kim Youngheui

In 2023, we finally got big criteria of aging 12 hall marks. The change will make the game of sailing for future healthcare and beauty care in the point of aging. Last 25 years we got technology of peptides and made innovation of healthcare and especially of beauty care. And pandemic experience realized Nucleotides technology for healthcare. Trautech, here, starts next innovative technology of nucleotides, called tFNAs. This challenge will open the world for next 25 years healthcare, beauty care revolution. tFNAs has multifunction, such as drug delivery, injective tissue remodeling and also topical anti-aging property by itself. This high potential bio-material will be a key technology for coming hyper-personalized healthcare with AI and wearable monitoring system. Here Sincerely congratulate Trautech new innovation and expect continuous challenge to realize tFNA technologies in various life scene.

—— Naturelab Japan R&D senior manager, Atsushi Takeoka

## ■ 目录

### 第一章 核酸概述

1.1 核酸的定义和结构	-----	10
1.2 核酸的发现和应⽤历史	-----	11
1.3 核酸的命名	-----	12
1.4 核酸的类型	-----	13
1.4.1 脱氧核糖核酸 (DNA)	-----	13
1.4.2 核糖核酸 (RNA)	-----	14
1.4.3 人工核酸	-----	16
1.5 核酸的分子⼤小和组成	-----	20
1.6 核酸的拓扑结构	-----	21

### 第二章 DNA纳米技术

2.1 DNA纳米技术概述	-----	23
2.1.1 纳米级结构制造⽅法	-----	23
2.1.2. DNA纳米技术发展史	-----	23
2.2 早期的DNA拼砌技术	-----	25
2.3 DNA折纸术	-----	27
2.4 三维DNA结构	-----	29
2.5 动态DNA纳米结构	-----	31
2.6 超分子DNA组装	-----	34
2.6.1 超分子DNA组装概述	-----	34
2.6.2 DNA纳米结构中的有机顶点	-----	34
2.6.3 新DNA基序 (motifs) 的开发	-----	35
2.6.4 过渡金属与DNA纳米⾃组装	-----	36
2.6.5 聚合物与脂质体与DNA⾃组装	-----	38

## ■ 目录

### 第三章 核酸四面体

3.1 核酸四面体的简介	-----	41
3.2 核酸四面体的结构优势	-----	42
3.2.1 机械强度高	-----	43
3.2.2 稳定性高	-----	44
3.2.3 可编辑性	-----	46
3.2.4 良好的生物相容性与安全性	-----	47
3.2.5 易进入细胞	-----	49

### 第四章 核酸四面体的应用价值

4.1 基于结构的细胞生物学调控的第一代tFNA	-----	53
4.2 作为载体的第二代tFNA	-----	54
4.3 在皮肤和软组织中的应用	-----	55
4.3.1 促进细胞增殖与迁移作用	-----	55
4.3.2 抗炎和促进组织修复作用	-----	57
4.3.3 清除活性氧与促血管形成作用	-----	59
4.3.4 抑制细胞死亡和清除衰老细胞作用	-----	60
4.4 在骨组织再生中的应用	-----	63
4.4.1 促进成骨分化作用	-----	63
4.4.2 促进成骨组织修复作用	-----	65
4.4.3 促进软骨修复再生作用	-----	66
4.5 在神经系统中的应用	-----	70
4.5.1 神经保护作用	-----	70
4.5.2 促进神经再生作用	-----	72
4.5.3 神经药物递送	-----	73

## ■ 目录

4.6 在免疫系统中的应用	-----	75
4.6.1 调控炎症反应	-----	75
4.6.2 免疫细胞功能调节	-----	75
4.6.3 自身免疫疾病治疗	-----	75
4.7 在抗菌治疗中的应用	-----	77
4.7.1 与抗生素联合使用	-----	77
4.7.2 与肽核酸（PNA）联合使用	-----	78
4.7.3 与抗菌肽（AMP）联合使用	-----	79
4.7.4 反义寡核苷酸（ASO）联合使用	-----	81

### 第五章 核酸四面体在皮肤领域的典型应用研究

5.1 促进皮肤伤口无瘢痕愈合	-----	84
5.2 缓解皮肤老化	-----	86
5.3 皮肤美白	-----	87
5.4 修复光敏损伤	-----	88
5.5 防脱生发	-----	89
5.6 携带药物治疗皮肤病	-----	90

### 第六章 核酸四面体的生物合成与化妆品领域的应用探究

6.1 tFNA寡核苷酸的合成	-----	92
6.2 tFNA作为化妆品原料的安全性测试	-----	94
6.2.1 无体外皮肤刺激性	-----	94
6.2.2 无眼睛刺激性	-----	94
6.2.3 无皮肤光毒性	-----	95
6.2.4 极低皮肤致敏性	-----	95

## ■ 目录

6.2.5 无致突变性	-----	96
6.2.6 无染色体毒性	-----	96
6.2.7.总结	-----	97
6.3 tFNA作为化妆品原料的功效	-----	98
6.3.1 修复DNA损伤导致的皮肤衰老	-----	98
6.3.2 维持皮肤蛋白稳态	-----	99
6.3.3 促进细胞自噬维持皮肤年轻态	-----	100
6.3.4 抑制细胞复制性衰老	-----	101
6.3.5 修复线粒体损伤	-----	102
6.4 展望	-----	104
◆ 参考文献	-----	105
◆ 法律声明	-----	114
◆ 联系我们	-----	115



The background features a blue-to-purple gradient with faint molecular models and a globe. A large white hexagon is centered on the page, containing the chapter title. The number '01' is highlighted in a dark blue rounded square.

01

第一章  
核酸概述

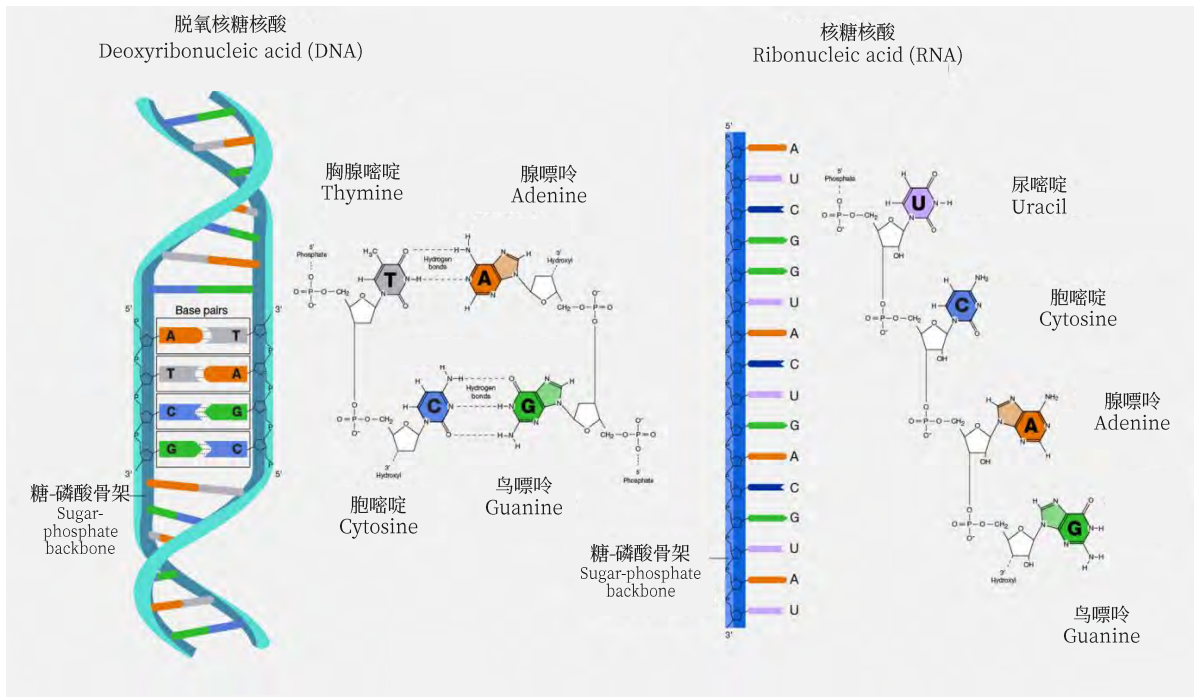
# 1.1 核酸的定义与结构

## 1.1.1 核酸的定义与结构

核酸 (Nucleic acids) 是所有细胞和病毒中至关重要的大型生物分子。核酸的基本组成单位是核苷酸：包括一个五碳糖、一个磷酸基团和一个含氮碱基。核酸的两大主要类别是脱氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA)，如图1所示。如果糖是核糖，聚合物就是RNA；如果糖是核糖的变种脱氧核糖，聚合物就是DNA。

核酸是自然界中发现的化合物，它们在细胞中携带信息并构成遗传物质。这些核酸在所有生物中都非常常见，它们在地球上每个生命体的每个活细胞中生产、编码和存储信息。随后，它们在细胞核内外传递和表达这些信息。从细胞的内部运作到生物体的后代，它们通过核酸序列提供信息。这使得RNA和DNA在其分子内呈现出明显的“阶梯状”核苷酸排列顺序。两者在指导蛋白质合成中发挥着关键作用。

图1：核酸DNA与RNA的螺旋结构与核酸碱基的比较



核苷酸链通过化学键连接，形成螺旋状的骨架结构，并组装成链。RNA通常为单链结构，而DNA则为双链，包含碱基对。RNA和DNA中的碱基包含腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶。胸腺嘧啶仅在DNA中出现，而尿嘧啶仅在RNA中出现。通过氨基酸和蛋白质合成，DNA中这些核碱基对的特定序列帮助保存和传递作为基因的编码指令。在RNA中，碱基对序列有助于制造决定所有生物体大多数化学过程的新蛋白质。

核酸存在于所有动植物细胞、微生物和病毒、噬菌体内，是生命的最基本物质之一，对生物的成长、遗传、变异等现象起着重要的决定作用。

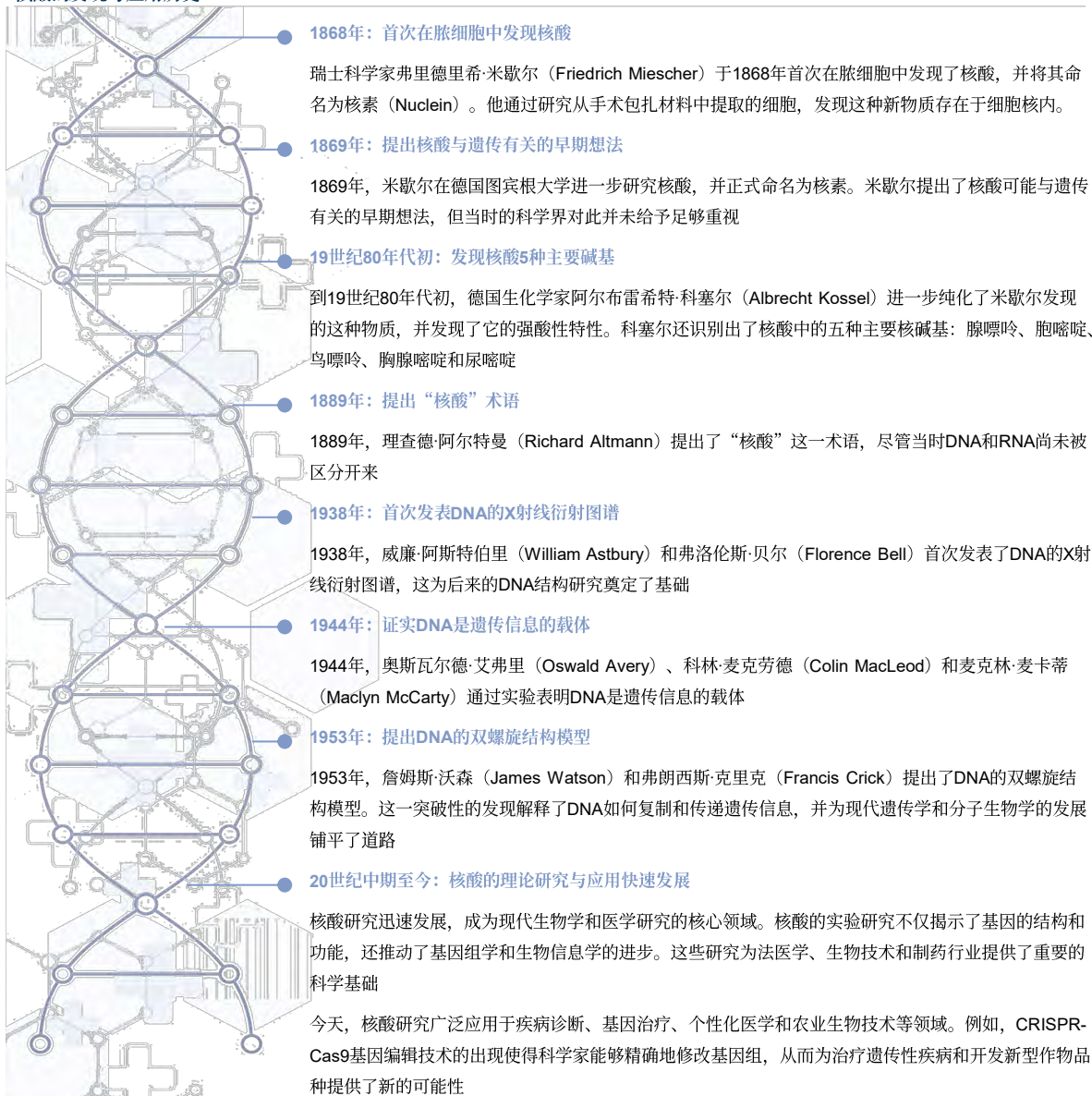
来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 1.2 核酸的发现与应用历史

### 1.2.1 核酸发现与应用历史

核酸研究的历史不仅展示了科学发现的渐进过程，也反映了科学技术对社会进步和人类福祉的深远影响。总结来看，核酸是DNA和RNA的总称，属于一类生物聚合物，也被称为多核苷酸。核酸最初是在真核细胞的细胞核中发现的，但现在已知它们存在于所有生命形式中，包括细菌、古菌和病毒（关于病毒是否为生命形式仍有争议）。所有活细胞都含有DNA和RNA（某些细胞除外，如成熟的红细胞），而病毒通常只含有DNA或RNA，很少同时含有这两种核酸。

#### 核酸的发现与应用历史



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

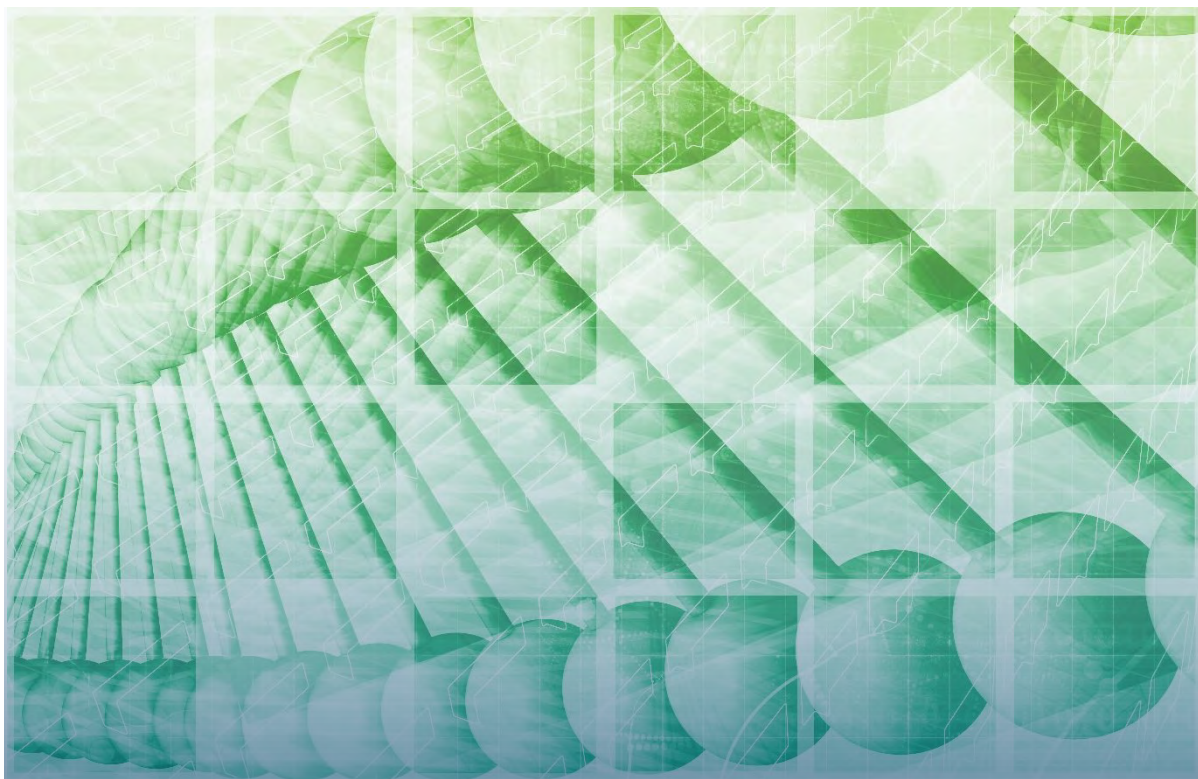
## 1.3 核酸的命名

### 1.3.1 核酸的命名

核酸之所以被命名为“nucleic acid”，是因为它们最初是在细胞核（nucleus）中发现的，并且含有磷酸基团（与磷酸有关）。核酸的基本组成部分是核苷酸，每个核苷酸包含一个戊糖（核糖或脱氧核糖）、一个磷酸基团和一个核碱基。尽管核酸最初在真核细胞的细胞核中被发现，但现已知它们在所有生命形式中均有存在。

除了在自然界中发现外，核酸也可以在实验室中通过酶（如DNA和RNA聚合酶）的使用或固相化学合成的方法来生成。实验室合成核酸的技术为科学研究提供了强大的工具，广泛应用于基因组学、分子生物学和生物技术等领域。

核酸作为遗传信息的载体，其发现和命名反映了科学家对生命分子基础认识的逐步深入。从细胞核中的初次发现，到在各种生命形式中的普遍存在，核酸研究的进展展示了分子生物学的重要性，并为理解生命的基本过程提供了关键的线索。



## 1.4 核酸的类型

### 1.4.1 脱氧核糖核酸 (DNA)

脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid, 简称DNA) 是一种核酸, 包含用于所有已知生物体发育和功能的遗传指令。虽然DNA化学物质在1869年被发现, 但其在遗传继承中的作用直到1943年才得到证实。携带遗传信息的DNA片段称为基因。其他DNA序列具有结构性用途, 或参与调控遗传信息的使用。核酸 (DNA和RNA)、蛋白质和多糖一起, 是所有已知生命形式必不可少的三大生物大分子之一。

#### DNA的组成

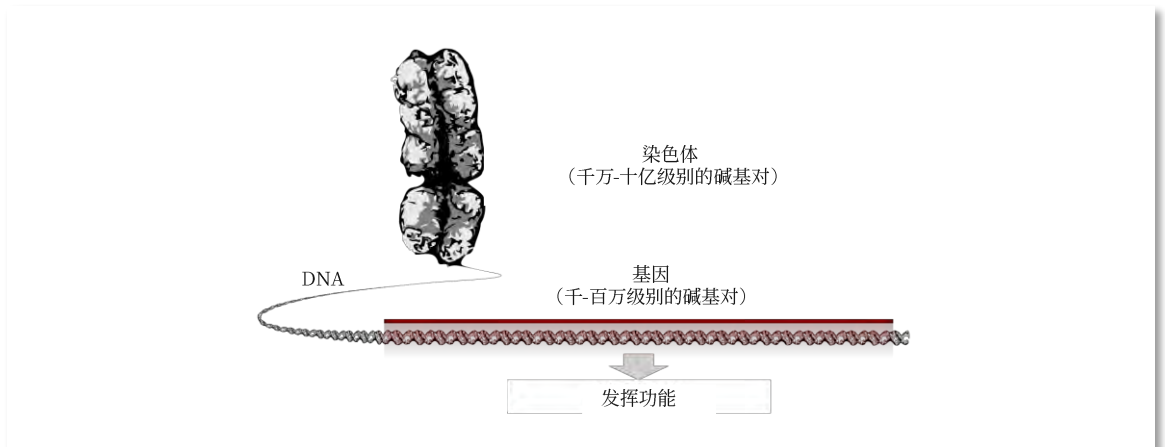
DNA由两条被称为多核苷酸的链组成, 这些链由更简单的单体单位——脱氧核糖核苷酸组成。每个脱氧核糖核苷酸由一个含氮碱基 (胞嘧啶 [C]、鸟嘌呤 [G]、腺嘌呤 [A] 或胸腺嘧啶 [T])、一种名为脱氧核糖的糖和一个磷酸基团组成。核苷酸通过共价键 (称为磷酸二酯键) 连接在一起, 形成交替的糖-磷酸骨架。两条独立的多核苷酸链的含氮碱基根据碱基配对规则 (A与T配对, C与G配对) 通过氢键结合, 形成双链DNA。互补的氮基分为两组: 单环的嘧啶和双环的嘌呤。在DNA中, 嘧啶是胸腺嘧啶和胞嘧啶; 嘌呤是腺嘌呤和鸟嘌呤。

#### DNA与生物信息

双链DNA的两条链存储相同的生物信息。当这两条链分离时, 这些信息被复制。DNA中有很大一部分 (在人类中超过98%) 是非编码的, 这意味着这些部分不作为蛋白质序列的模板。两条DNA链以相反的方向排列, 因此是反向平行的。每个糖分子上连接着四种类型的碱基之一, 这些碱基沿着骨架的序列编码遗传信息。在转录过程中, DNA链作为模板生成RNA链, 其中DNA碱基被相应的RNA碱基取代, 但胸腺嘧啶 (T) 被尿嘧啶 (U) 替代。在遗传密码下, 这些RNA链指定蛋白质中的氨基酸序列, 这一过程称为翻译。

在真核细胞中, DNA被组织成称为染色体的长结构, 如图2所示。在典型的细胞分裂之前, 这些染色体在DNA复制过程中被复制, 为每个子细胞提供完整的染色体组。真核生物 (动物、植物、真菌和原生生物) 将大部分DNA存储在细胞核内, 称为核DNA, 并在线粒体中存储一些DNA, 称为线粒体DNA, 或在叶绿体中存储, 称为叶绿体DNA。原核生物, 包括细菌、放线菌、立克次氏体、衣原体、支原体、蓝细菌和古细菌等, 仅在细胞质中以环状DNA的形式存储遗传信息, 这种结构被称为“拟核”。与此相对, 真核生物的染色体中, DNA与染色质蛋白 (如组蛋白) 相结合, 这些蛋白有助于压缩和组织DNA。这种压缩的DNA结构不仅指导了DNA与其他蛋白质的相互作用, 而且还参与调控了DNA的转录过程, 决定哪些基因被激活或抑制。

图2: DNA-基因-染色体的生物信息



来源: 公开资料, 文献检索, 沙利文分析

## 1.4 核酸的类型



### DNA的结构

DNA是一种由重复单位核苷酸组成的长聚合物。沿着其长度，DNA的结构是动态的，能够卷曲成紧密的环状和其他形状。在所有物种中，DNA由两条螺旋链组成，这些链通过氢键结合在一起。这两条链围绕同一轴线盘绕，并具有相同的螺距34埃（3.4纳米）。双链的直径为10埃（1.0纳米）。根据另一项研究，当在不同溶液中测量时，DNA链的宽度为22-26埃（2.2-2.6纳米），一个核苷酸单位的长度为3.3埃（0.33纳米）。大多数DNA的浮力密度为1.7 g/cm<sup>3</sup>。

DNA通常不会以单链形式存在，而是以两条紧密结合在一起的链形式存在。这两条长链围绕彼此盘绕，形成双螺旋。核苷酸包含分子骨架的一部分（将链连接在一起）和一个核碱基（与螺旋中的另一条DNA链相互作用）。一个与糖连接的核碱基称为核苷，一个与糖和一个或多个磷酸基团连接的碱基称为核苷酸。由多个连接的核苷酸组成的生物聚合物（如DNA）称为多核苷酸。

DNA链的骨架由交替的磷酸基团和糖基团组成。DNA中的糖是D-2-脱氧核糖，它是一种五碳糖。这些糖通过磷酸基团连接，形成相邻糖环的第三和第五碳原子之间的磷酸二酯键。因而，每条DNA链通常在一端有一个附着在核糖5'碳上的磷酸基团（5'磷酸基）和另一端有一个附着在核糖3'碳上的游离羟基（3'羟基）。3'和5'碳在糖-磷酸骨架上的排列赋予每条DNA链方向性（有时称为极性）。在核酸双螺旋中，一条链中核苷酸的方向与另一条链的方向相反：链是反向平行的。DNA链的不对称末端被称为5'端（五端）和3'端（三端），5'端有一个末端磷酸基团，3'端有一个末端羟基。DNA和RNA之间的一个主要区别是糖，DNA中的D-2-脱氧核糖在RNA中被相应的D-核糖取代。

DNA双螺旋主要由两种力稳定：核苷酸之间的氢键和芳香核碱基之间的碱基堆叠相互作用。DNA中存在四种碱基：腺嘌呤（A）、胞嘧啶（C）、鸟嘌呤（G）和胸腺嘧啶（T）。这四种碱基与糖-磷酸骨架结合，形成完整的核苷酸，腺嘌呤与胸腺嘧啶配对，鸟嘌呤与胞嘧啶配对，形成A-T和G-C碱基对。

### 1.4.2 核糖核酸（RNA）



### RNA的组成

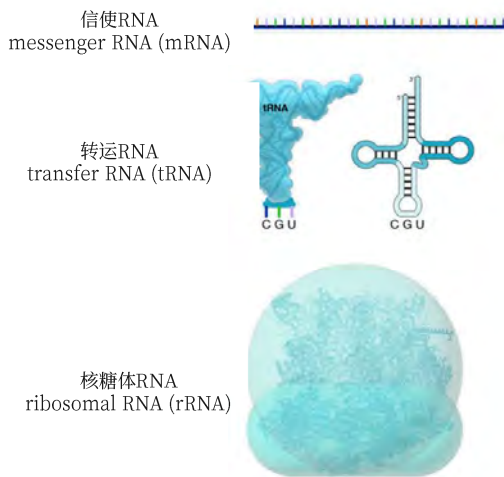
核糖核酸（Ribonucleic acid，简称RNA）是一种聚合分子，在大多数生物功能中扮演着关键角色，可以通过自身的功能（非编码RNA）或作为蛋白质合成的模板（信使RNA）来实现这些功能。RNA和脱氧核糖核酸（DNA）都是核酸，而核酸是所有已知生命形式中必不可少的四种大分子之一。RNA由核苷酸链组成，细胞生物利用信使RNA（mRNA）传递遗传信息（使用鸟嘌呤、尿嘧啶、腺嘌呤和胞嘧啶四种碱基，分别用字母G、U、A和C表示），这些信息指导特定蛋白质的合成。许多病毒利用RNA基因组编码其遗传信息。



### RNA的作用

某些RNA分子在细胞内发挥主动作用，通过催化生物反应、控制基因表达或感知和传递细胞信号来实现这些功能。其中一个重要的过程是蛋白质合成，这是一种普遍存在的功能，RNA分子在核糖体上指导蛋白质的合成。在这一过程中，转运RNA（tRNA）分子将氨基酸运输到核糖体，核糖体RNA（rRNA）则将氨基酸连接在一起形成编码的蛋白质，如图3所示。

图3：三种不同类型的RNA

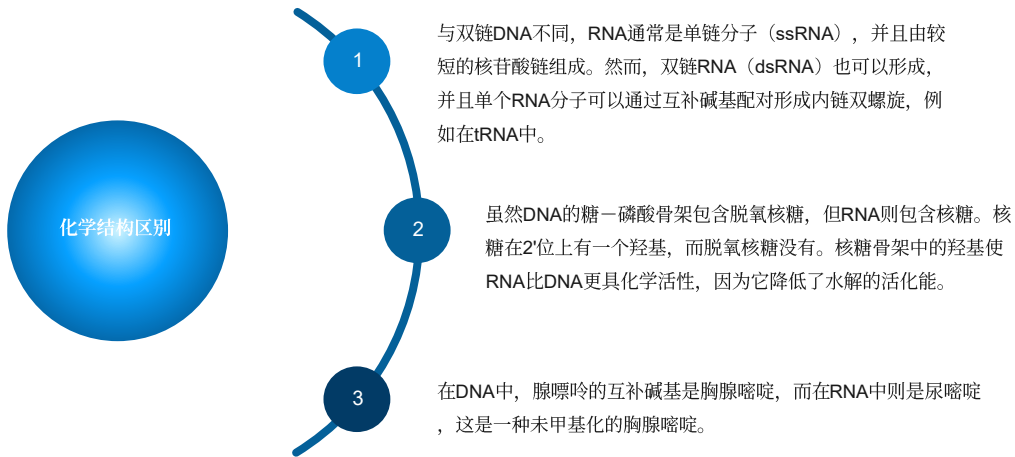


来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 1.4 核酸的类型

### RNA的结构

RNA的化学结构与DNA非常相似，但存在3个主要区别：



每个RNA中的核苷酸包含一个核糖，其碳原子编号为1'到5'。在1'位上连接一个碱基，通常是腺嘌呤（A）、胞嘧啶（C）、鸟嘌呤（G）或尿嘧啶（U）。腺嘌呤和鸟嘌呤是嘌呤类，胞嘧啶和尿嘧啶是嘧啶类。一个磷酸基团连接在一个核糖的3'位和下一个核糖的5'位。磷酸基团带有负电荷，使RNA成为一个带电分子（聚阴离子）。碱基之间形成氢键：胞嘧啶与鸟嘌呤配对，腺嘌呤与尿嘧啶配对，鸟嘌呤与尿嘧啶也可以配对。

RNA与DNA的一个关键区别在于RNA中的核糖在2'位上含有一个羟基（-OH）官能团。这个羟基的存在导致RNA倾向于形成A型双螺旋结构，尽管在单链的二核苷酸片段中，RNA偶尔也可以呈现B型结构。A型双螺旋结构特征为一个深而窄的主沟（major groove）和一个浅而宽的次沟（minor groove）。2'-羟基的引入还使得RNA分子在未形成双螺旋的区域更加灵活，这些区域可以通过化学方式攻击相邻的磷酸二酯键，从而裂解RNA的骨架。

在RNA的转录过程中，最常见的四种碱基（腺嘌呤（A）、胞嘧啶（C）、鸟嘌呤（G）和尿嘧啶（U））被合成。然而，随着RNA的成熟，这些碱基及其连接的核糖可以通过多种化学修饰进行改变。例如，伪尿苷（ $\Psi$ ）的形成，其中尿嘧啶与核糖的连接从通常的C-N键变为C-C键，以及在特定的RNA分子中，如tRNA的T $\Psi$ C环，核糖胸苷（T）的出现。另一种重要的修饰碱基是次黄嘌呤，它是脱氨的腺嘌呤碱基，其相应的核苷称为肌苷（I）。肌苷在遗传密码的摇摆假说中扮演着关键角色，这一假说解释了在某些情况下，一个密码子可以编码多种氨基酸。

单链RNA分子的功能形式，就像蛋白质一样，经常需要特定的三级结构。这个结构的框架由分子内的氢键提供的二级结构元素构成。这导致了几个可识别的二级结构域，如发夹环、凸出和内环。为了创造即设计一个具有特定二级结构的RNA，两个或三个碱基是不够的，而四个碱基是足够的。这可能是自然选择了四碱基字母表的原因：少于四个碱基不足以创造所有结构，而超过四个碱基则没有必要。由于RNA是带电的，金属离子如Mg<sup>2+</sup>常常被用来稳定许多二级和三级结构。

RNA在生物化学中的一个重要功能是作为生物催化剂（类似于酶）。例如，核糖体的结构——一个催化肽键形成的RNA-蛋白质复合物——表明其活性位点完全由RNA组成。RNA分子的化学催化能力使其在早期生命历史中扮演了关键角色，这一假说被称为“RNA世界”假说。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 1.4 核酸的类型

### 1.4.3 人工核酸

人工核酸也被称为核酸类似物，是一类在结构上类似于天然存在的RNA和DNA的化合物，广泛应用于医学和分子生物学研究。核酸是由核苷酸链组成的，这些核苷酸由三部分构成：磷酸骨架、戊糖（核糖或脱氧核糖）和四种核碱基之一。核酸类似物可能对这些部分中的任何一部分进行修改。这些类似物核苷酸通常赋予核酸不同的碱基配对和碱基堆叠特性，例如通用碱基可以与四种标准碱基配对，而类似磷酸-糖骨架的化合物如肽核酸（PNA）则可以影响核酸链的性质（PNA甚至可以形成三螺旋结构）。核酸类似物也称为异核酸，是异源生物学的重要支柱之一，异源生物学是基于替代生物化学设计的新型生命形式。

人工核酸包括肽核酸（PNA）、莫啉代核酸（Morpholino）、锁核酸（LNA）、甘油核酸（GNA）和苏糖核酸（TNA）。每种人工核酸在分子骨架上都有与天然DNA或RNA不同的变化。这些变化使得它们在研究和应用中具有独特的优势。

#### 肽核酸（PNA）

肽核酸（Peptide Nucleic Acid, PNA）是一种人工合成的聚合物，类似于DNA或RNA，由 Peter E. Nielsen（哥本哈根大学）、Michael Egholm（哥本哈根大学）、Rolf H. Berg（Risø 国家实验室）和 Ole Buchardt（哥本哈根大学）于 1991 年发明。

自从PNA问世以来，它被广泛应用于分子生物学程序、诊断检测和反义疗法中。由于PNA具有较高的结合强度，通常不需要设计很长的PNA寡聚物用于这些应用，一般长度为20—25个碱基的寡核苷酸探针即可满足要求。设计PNA寡聚物的主要关注点是确保其特异性。PNA寡聚物在与互补的DNA结合时显示出更高的特异性，相较于DNA/DNA双链，PNA/DNA配对中的碱基错配对双链的稳定性影响更大。这种结合强度和特异性也适用于PNA/RNA双链。此外，PNA不易被核酸酶或蛋白酶识别，因此对酶的降解具有抵抗力，并且在广泛的pH范围内保持稳定。然而，未修饰的PNA难以穿透细胞膜进入细胞质，但通过将PNA与细胞穿透肽共价结合可以改善其细胞内递送。

DNA和RNA的骨架分别由脱氧核糖和核糖组成，而PNA的骨架由重复的N-(2-氨基乙基)-甘氨酸（AEG）单元通过肽键连接而成。各种嘌呤和嘧啶碱基通过亚甲基桥（-CH<sub>2</sub>-）和羰基（-C=O-）连接到骨架上。PNA的表示方式类似于肽，N-末端在第一个（左侧）位置，C-末端在最后一个（右侧）位置。

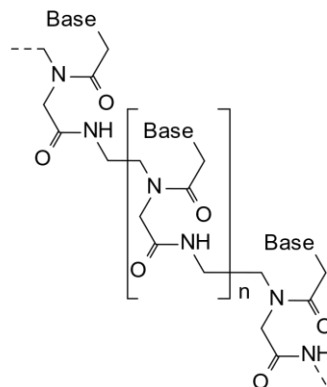
肽核酸（PNA）的分子骨架缺少带负电的磷酸基团，这一特性赋予了PNA与DNA链之间更紧密的结合力，主要归因于静电排斥的减少。但与此同时，缺乏磷酸基团也使得PNA具有较高的疏水性，这在一定程度上影响了其在生物体内的溶解性和稳定性。因此，在将PNA递送到细胞内的过程中，它可能更容易被体内的清除机制所移除。早期对同嘧啶链（仅由一种重复的嘧啶碱基组成的链）的实验表明，一个由6个碱基组成的胸腺嘧啶PNA/腺嘌呤DNA双螺旋的熔解温度（T<sub>m</sub>）为31℃，而等效的6个碱基DNA/DNA双链的熔解温度不到10℃。混合碱基的PNA分子在碱基配对识别方面是真正的DNA模拟物。PNA/PNA结合比PNA/DNA结合更强。

近年来，多个实验室报告了从DNA或RNA模板上序列特异性地聚合肽核酸的方法。Liu及其同事利用这些聚合方法进化出具有三维结构折叠能力的功能性PNA，类似于蛋白质、适配体和核酶。2015年，Jain等人描述了一种基于跨作用DNA的两亲性递送系统，用于方便递送聚A尾未带电的核酸（如PNA和Morpholino），从而可以轻松地离体实验中筛选多个核酸。

PNA在多个领域具有广泛应用，包括基因表达调控（可作为抑制剂或促进剂）、反义治疗、抗癌、抗病毒、抗菌和抗寄生虫剂的开发，还可用作分子工具、生物传感器探针、DNA序列检测工具以及纳米技术中的应用。此外，PNA还可用于改进植物和土壤样本中的高通量16S核糖体RNA基因测序，阻止污染的质体和线粒体序列的扩增。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

图4：PNA的骨架结构





## 1.4 核酸的类型

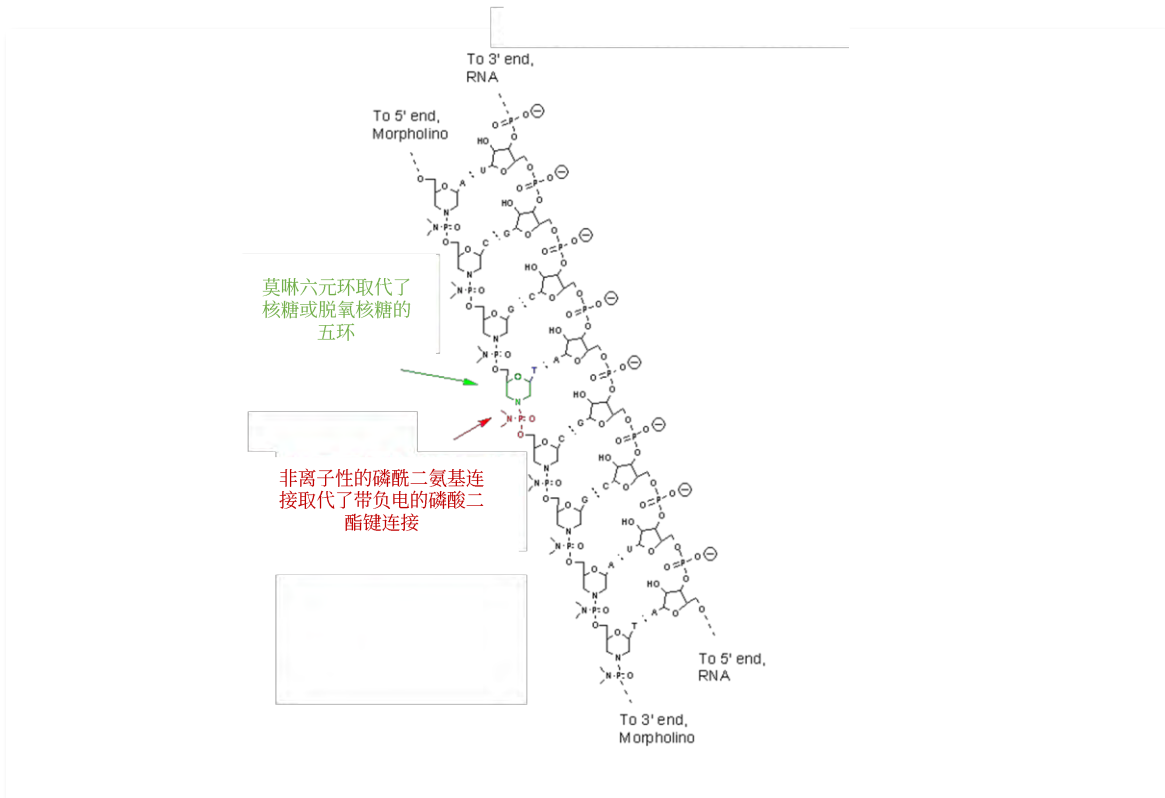
### 莫啉代核酸 (Morpholino)

莫啉代核酸 (Morpholino)，也称为磷酸二氨基莫啉代核酸 (PMO)，是一种用于分子生物学的寡聚物分子。Morpholino寡聚物由Summerton (Gene Tools公司) 在AntiVirals Inc. (现Sarepta Therapeutics) 设想，并与Weller合作最初开发。PMO其分子结构中包含DNA碱基，这些碱基附着在由亚甲基莫啉环通过磷酸二氨基连接的骨架上。Morpholino通过阻断其他分子与RNA碱基配对表面的小特定序列 (约25个碱基) 来修改基因表达。Morpholino作为反义寡聚物，被广泛应用于逆向遗传学研究中，通过降低基因功能实现基因敲降。

Morpholino的分子结构与天然核酸不同。DNA和RNA的骨架分别由脱氧核糖和核糖组成，而Morpholino的骨架由亚甲基莫啉环通过磷酸二氨基连接而成。这种结构使Morpholino在生理pH范围内保持中性，不带电，从而在细胞或生物体内表现为不带电荷的分子。

Morpholino通过标准的核酸碱基配对与RNA或单链DNA的互补序列结合，如图 5所示。它们通常有25个碱基长，通过“空间阻断”的方式起作用，结合到RNA的特定序列上，阻止其他分子与RNA相互作用。与许多反义结构类型 (如硫代磷酸酯 (Thiophosphates)、siRNA) 不同，Morpholino不会触发其靶标RNA分子的降解。

图5: 莫啉代核酸与标准RNA的杂合



来源：公开资料，文献检索，创建医疗，沙利文分析

## 1.4 核酸的类型

### 锁核酸 (LNA)

锁核酸 (Locked Nucleic Acid, LNA), 也称为桥联核酸 (Bridged Nucleic Acid, BNA), 是一种改良的RNA核苷酸。在LNA中, 核糖部分被修饰, 增加了一条连接2'氧和4'碳的桥, 如图6所示, 这种桥使得核糖固定在3'-endo (北) 构象中, 这种构象常见于A型双螺旋结构。这一结构增强了LNA对酶降解的稳定性, 同时作为单体或寡核苷酸的组成部分, LNA还提供了更高的碱基配对特异性和亲和力。LNA核苷酸可以与DNA或RNA残基混合在寡核苷酸中使用。

LNA最早由Obika等人于1997年合成, 随后Jesper Wengel的团队在1998年也独立合成了LNA。Zamecnick和Stephenson在1978年奠定了寡核苷酸作为基因表达调控工具的基础, 推动了LNA的合成发展。目前, 高效合成LNA有两种主要策略: 线性策略和会聚策略。线性策略由Obika等人首次详细描述, 这种方法以尿苷 (或其他易得的RNA核苷) 为起始材料。会聚策略则需要合成糖中间体, 该中间体作为糖基供体与核苷碱基偶联, 常用D-葡萄糖来生成糖中间体, 并通过改良的Vorbrüggen方法实现立体选择性偶联。

LNA的独特结构使其在生物体系中具有显著的优势。LNA修饰的寡核苷酸在与RNA、单链DNA (ssDNA) 和双链DNA (dsDNA) 的杂交中表现出更好的热力学特性。LNA提供了增强的生物稳定性, 比天然核酸具有更高的结合亲和力和特异性。

### 甘油核酸 (GNA)

甘油核酸 (Glycol Nucleic Acid, 简称GNA), 有时也称为丙三醇核酸, 是一种类似于DNA或RNA的核酸, 但其糖-磷酸二酯骨架使用的是丙二醇而非核糖或脱氧核糖。GNA具有化学稳定性, 但尚未在自然界中发现。然而, 由于其结构简单, 有学者推测它可能在生命演化过程中起到了一定的作用。

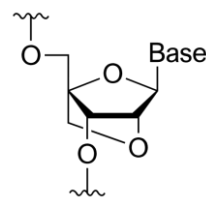
与DNA和RNA分别具有脱氧核糖和核糖的骨架不同, GNA的骨架由重复的甘油单元通过磷酸二酯键连接而成, 如图7所示。甘油单元仅有三个碳原子, 但仍能显示出沃森-克里克 (Watson-Crick) 碱基配对。GNA中的碱基对比其天然对应物DNA和RNA更加稳定, 形成的双链GNA需要高温才能解链。由于其简单的结构, GNA被认为是可能的RNA前体之一。

GNA的研究始于1971年, 当时Ueda等人首次合成了2, 3-二羟基丙基核苷类似物。不久之后, Seita等人展示了这些类似物的磷酸连接寡聚物在溶液中与RNA和DNA共存时表现出低色性。Cook等人于1995年和1999年详细描述了这些聚合物的制备方法, 而Acevedo和Andrews在1996年也进行了相关研究。然而, GNA-GNA自我配对的能力首次由Zhang和Meggers于2005年报道。随后, Essen和Meggers报道了GNA双链的晶体结构。

由于GNA具有更高的碱基配对稳定性, 其双链结构在高温下才能解链, 这表明GNA在早期生命形成过程中可能比RNA更为稳固。GNA的简单结构使其成为研究核酸演化和生命起源的理想模型。尽管GNA尚未在自然界中发现, 其在实验室中的成功合成和稳定特性为理解核酸的化学稳定性和生物功能提供了新的视角。

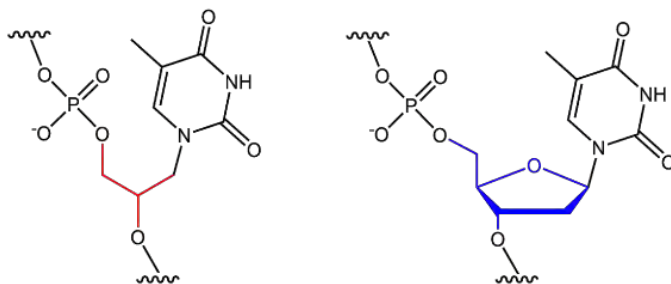
目前, GNA主要在实验室环境中进行研究, 其潜在应用领域包括合成生物学和分子工程。由于GNA的稳定性, 它可能在未来用于设计新型核酸药物或作为基因编辑工具。进一步的研究将探索GNA在生命演化中的可能角色, 以及如何利用其独特的化学特性开发新的生物技术应用。

图6: LNA的化学结构\*



\*戊糖的2'氧和4'碳之间有额外的桥键连接

图7: GNA的乙二醇骨架 (左, 红色) 与天然DNA的戊糖骨架 (蓝色, 戊糖) 对比



来源: 公开资料, 文献检索, 沙利文分析

## 1.4 核酸的类型

### 苏糖核酸 (TNA)

苏糖核酸 (Threose Nucleic Acid, 简称TNA) 是一种人工合成的遗传聚合物, 其天然的五碳核糖被一种非天然的四碳四糖取代。TNA是由阿尔伯特·埃申莫泽 (Albert Eschenmoser) 在探索RNA的化学起源过程中发明的。由于TNA能够高效地与DNA和RNA的互补序列配对, 因此成为了一种重要的合成遗传聚合物 (XNA)。

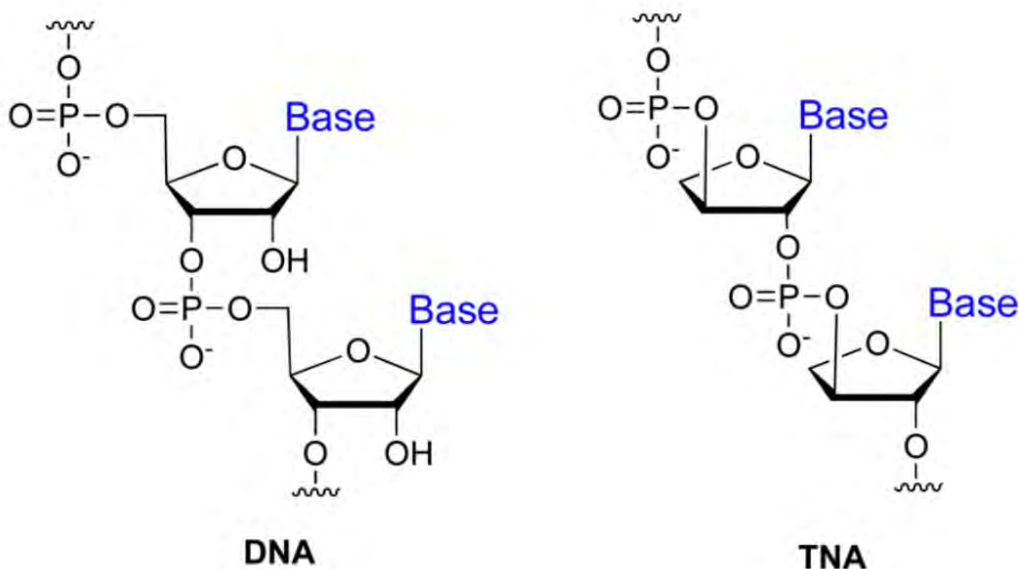
TNA与DNA和RNA的主要区别在于它们的骨架结构, 如图 8所示。DNA和RNA的磷酸骨架分别连接在脱氧核糖或核糖环的5'碳上, 而TNA的磷酸骨架直接连接在环的3'碳上, 因为TNA没有5'碳。这种改良的骨架使得TNA完全不受核酸酶的消化, 因此在治疗和诊断应用中具有很大的潜力。

TNA寡核苷酸最早通过磷酸胺化学的自动固相合成法构建。为了支持合成生物学项目的研究, TNA单体 (磷酸胺和核苷三磷酸) 的化学合成方法得到了大量优化。近年来, 聚合酶工程的努力已经发现了可以在DNA和TNA之间复制遗传信息的TNA聚合酶。这些系统中, TNA通过逆转录转化为DNA, DNA通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增, 然后再转录回TNA。

TNA的高生物稳定性使其成为开发下一代治疗性适配体的强有力候选者。体外选择实验表明, TNA适配体对小分子和蛋白质靶标表现出良好的结合能力。这些实验表明, 遗传和进化的特性不仅限于天然的DNA和RNA遗传聚合物。

尽管TNA研究仍处于初期阶段, 但其实际应用已经显现出来。TNA在达尔文进化中的能力以及对核酸酶的抵抗力使其成为开发高生物稳定性诊断和治疗应用的有希望的候选者。这包括演化出能够结合特定小分子和蛋白质靶标的TNA适配体, 以及开发能够催化化学反应的TNA酶 (四糖酶)。此外, TNA在涉及基因沉默技术的RNA治疗中也具有很大的潜力。例如, TNA已经在反义技术的模型系统中进行了评估。

图8: TNA与DNA结构对比



来源: 公开资料, 文献检索, 沙利文分析

## 1.5 核酸的分子大小与组成

### 1.5.1 分子大小

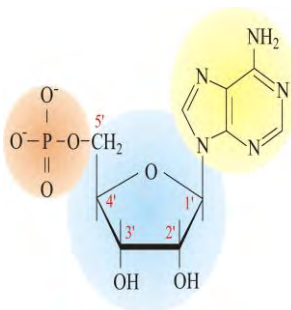
核酸分子可以非常大，DNA分子是已知最大的一类分子之一。例如，人类的1号染色体是一个单一的DNA分子，包含约2.47亿个碱基对。相比之下，小干扰RNA（siRNA）仅有21个核苷酸。通常，DNA比RNA更大，因为它主要负责存储和传递遗传信息，而RNA更多地承担信息传递和功能执行的角色。

### 1.5.2 分子组成

在大多数情况下，天然存在的DNA分子是双链的，而RNA分子是单链的。然而，也有许多例外情况——一些病毒的基因组由双链RNA组成，而其他一些病毒的基因组是单链DNA。此外，在某些情况下，还可以形成具有三股或四股结构的核酸。

核酸是由核苷酸组成的线性聚合物（链）。每个核苷酸由三个部分组成：一个嘌呤或嘧啶核碱基（有时称为含氮碱基或简称为碱基）、一个戊糖和一个磷酸基团。由于磷酸基团的存在，分子表现出酸性。由核碱基和糖组成的亚结构称为核苷。

#### 核苷酸分子组成



核酸类型在其核苷酸的糖结构上有所不同：DNA含有2'-脱氧核糖，而RNA含有核糖（唯一的区别是核糖上存在一个羟基基团）。此外，DNA和RNA中的核碱基也有所不同：腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤在DNA和RNA中都有，而胸腺嘧啶仅在DNA中存在，尿嘧啶仅在RNA中存在。

#### DNA与RNA结构对比

	糖结构	核碱基
DNA	2'-脱氧核糖	腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、 <b>胸腺嘧啶</b>
RNA	核糖	腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、 <b>尿嘧啶</b>

核酸中的糖和磷酸通过磷酸二酯键以交替链（糖—磷酸骨架）连接。在传统命名法中，磷酸基团连接的碳原子是糖的3'-端和5'-端碳原子。这使得核酸具有方向性，核酸分子的两端被称为5'-端和3'-端。核碱基通过N—糖苷键连接到糖上，这个键涉及核碱基环上的氮原子（嘧啶的N-1和嘌呤的N-9）与戊糖环的1'碳原子。

在RNA和DNA中还发现了非标准核苷，通常是通过DNA分子内或初级RNA转录物的标准核苷进行修饰而产生的。转移RNA（tRNA）分子含有大量修饰过的核苷，这些修饰对于其功能非常重要。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 1.6 核酸的拓扑结构

### 1.6.1 双链核酸

双链核酸由互补序列组成，其中广泛的沃森-克里克（Watson-Crick）碱基配对形成高度重复且相当均匀的双螺旋三维结构。DNA的这种结构使其具备了稳定的螺旋形态，有利于其遗传信息的存储和传递。在这个双螺旋结构中，碱基对通过氢键连接，形成稳定的内部结构，双螺旋的直径大约为20埃。

### 1.6.2 单链核酸

与双链结构不同，单链RNA和DNA分子不受限于规则的双螺旋结构，可以采用高度复杂的三维结构。这些复杂结构基于短的分子内碱基配对序列，包含了沃森-克里克碱基对和非标准碱基对以及各种复杂的三级相互作用。单链核酸的这种灵活性使其能够在生物体中执行各种功能，如催化、调控和信息传递。

### 1.6.3 线性和环状结构

核酸分子通常是无分支的，可以以线性或环状形式存在。例如，细菌基因组DNA、质粒、线粒体DNA和叶绿体DNA通常是环状双链DNA分子，而真核细胞核内的染色体通常是线性双链DNA分子。大多数RNA分子是线性单链分子，但RNA剪接反应可以产生环状和分支的分子。

### 1.6.4 拓扑结构的多样性

DNA分子的总嘧啶含量等于总嘌呤含量，这是由于碱基配对的规则性决定的。双链DNA的结构相对简单和均匀，而RNA的结构则表现出更大的多样性。RNA不仅可以形成常见的单链结构，还可以通过分子内的碱基配对和其他相互作用形成复杂的二级和三级结构。这些复杂结构使RNA在细胞中能够执行包括催化在内的多种功能。

核酸的拓扑结构对其生物学功能至关重要。双螺旋结构使DNA在复制和转录过程中能够被精确地复制和读取。而RNA的复杂结构则使其能够在细胞中发挥多种作用，例如mRNA在翻译中的信使作用，tRNA在翻译中的氨基酸携带作用，以及rRNA在核糖体中的结构和功能作用。

核酸的拓扑结构体现了其在生物系统中的多样性和复杂性。从双链DNA的稳定性到单链RNA的灵活性，这些结构特点决定了核酸在遗传信息传递、表达和调控中的关键角色。



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

The background features a blue-to-purple gradient. At the top, there is a molecular structure resembling a DNA double helix. On the right side, there is a stylized globe composed of a grid of dots. A large white hexagonal outline is centered on the page, framing the text.

02

第二章

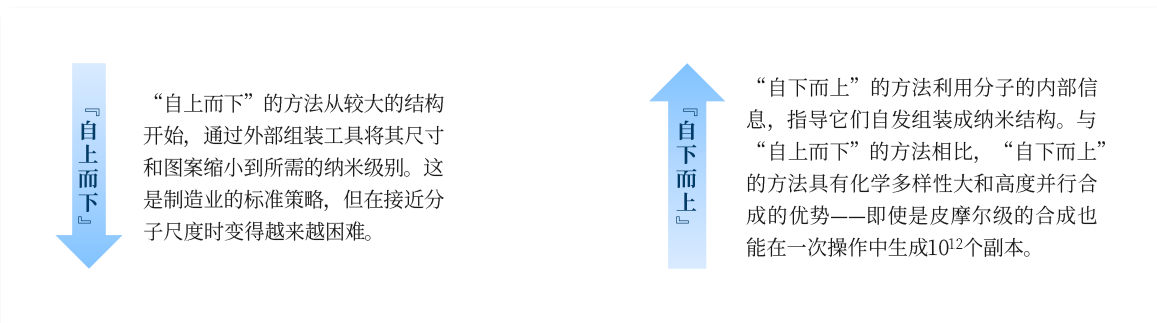
DNA纳米技术

## 2.1 DNA纳米技术概述

### 2.1.1 纳米级结构制造方法

纳米级结构的制造采用两种不同的方法：“自上而下”和“自下而上”。分子自组装已经产生了许多对称或周期性结构的例子，这些结构具有精美的组织特征。然而，针对特定的功能，将分子组装成复杂的非对称图案要困难得多。

#### 纳米级结构“自上而下”与“自下而上”的制造方法对比



### 2.1.2 DNA纳米技术发展史

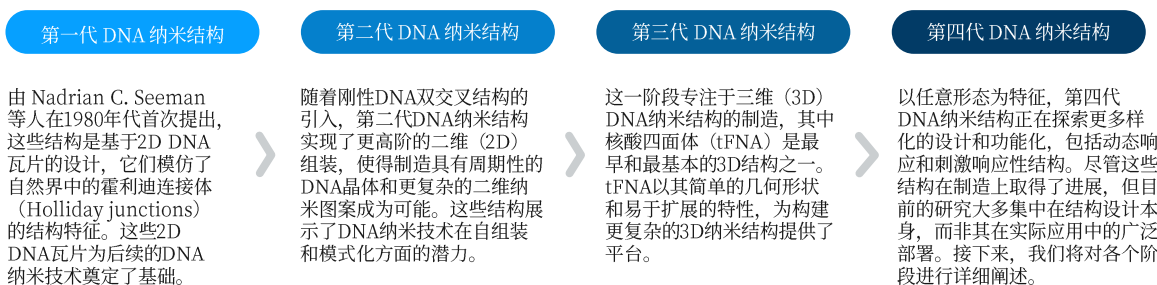
DNA具有任何天然或合成分子中最可预测和可编程的相互作用。它具有显著的结合特异性和热力学稳定性，并且可以通过几乎无限的序列选择可靠地与其互补配对结合。

在纳米尺度上，DNA的结构定义明确，其在常规条件下的持久长度约为50纳米。使用自动化方法可以快速合成和修改DNA，并且可以通过多种DNA作用酶可控地进一步调整和修改其结构。

DNA纳米技术专门研究利用脱氧核糖核酸或其他核酸的分子性质（如自组装的特性），来建构出可操控的新型纳米尺度结构或机械。在这个领域，核酸被用作非生物的材料而不是在活细胞中那样作为遗传信息的载体。严格的核酸碱基配对法则（使链上特定的碱基列相互连接以形成牢固的双螺旋结构）使这一技术成为可能。

这一技术允许合理的碱基链设计，从而严格地组合形成具有精密控制的纳米级特性的复杂的目标结构。脱氧核糖核酸是常使用的优势材料，但包括其他核酸如核糖核酸和肽核酸也被用来构造结构，所以偶尔也用“核酸纳米技术”来概括这个领域。

#### DNA 纳米结构的发展的4个主要阶段

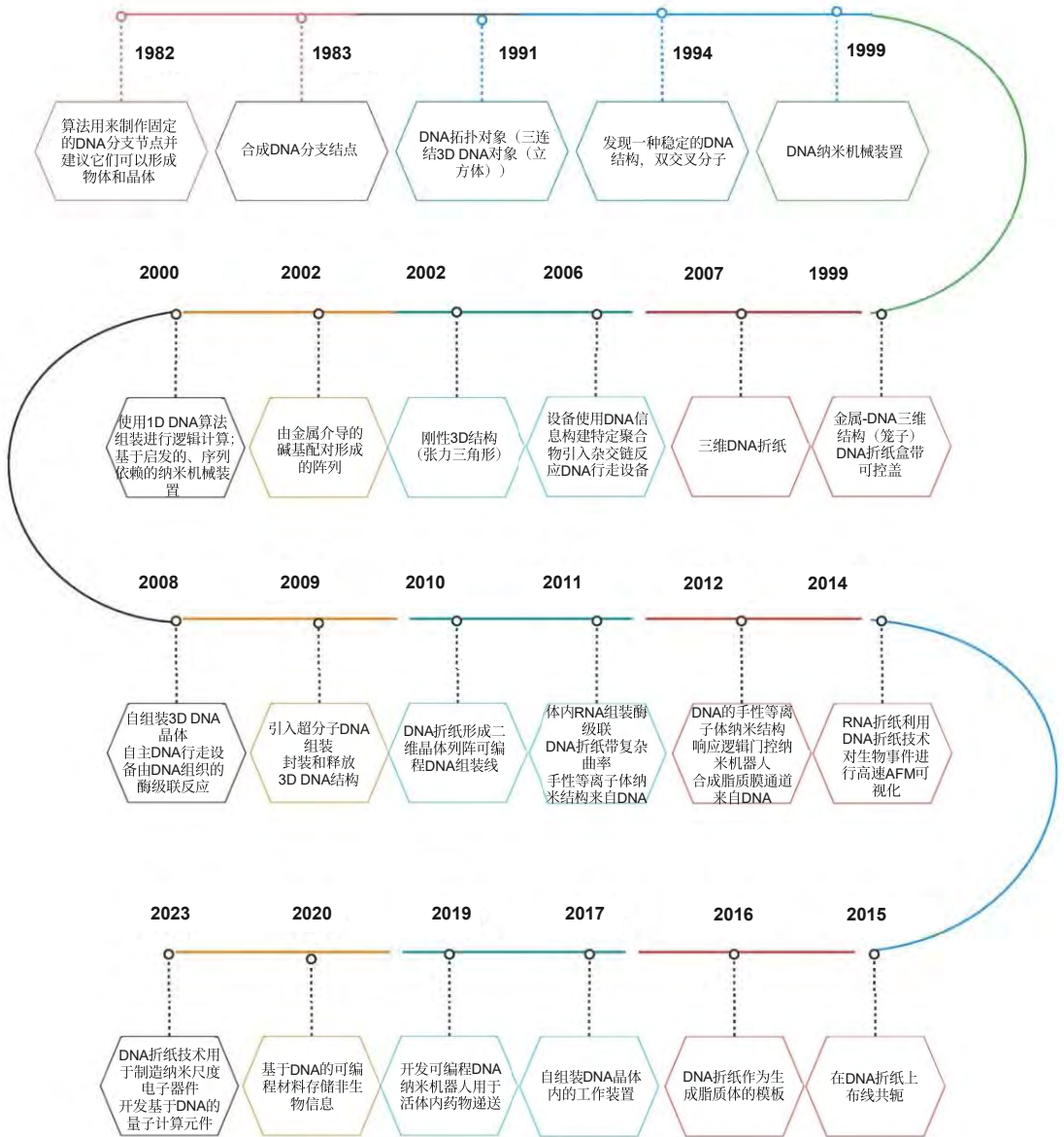


来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 2.1 DNA纳米技术概述

在纳米结构制造领域中，基于DNA的组装真正改变了纳米科学，如图9所示DNA纳米技术的主要时间线列出了主要的一些发现的进展。DNA纳米技术概念的基础最先由纳德里安·西曼（Nadrian Seeman）在1980年代早期阐述，在2000年后开始引起广泛的关注。这一领域的研究者已经构建了静止结构如二维和三维晶体结构、毫微管、多面体和其他任意的造型；和功能结构如纳米机器人和DNA运算。一些组建方法被用来构建拼装结构、折叠结构和动态可重构结构。

图9：DNA纳米技术的主要时间线



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析



## 2.2 早期的DNA拼砌技术

### 2.2.1 早期的DNA拼砌技术

DNA拼砌技术的早期发展为纳米科技领域开辟了一条全新的道路。通过利用DNA分子的独特性质，科学家们成功地设计和构建了各种精确的纳米结构和设备。这些研究不仅推动了纳米技术的进步，还为生物学、材料科学等领域提供了新的研究工具和方法。随着技术的不断进步，我们可以期待DNA纳米技术在未来将有更广阔的应用前景。



#### DNA分支结构的早期构想：三维晶体

DNA拼砌技术（DNA tile assembly或DNA tiling）的早期发展可以追溯到1980年，当时科学家Ned Seeman在思考六臂DNA分支结构时产生了一个革命性的想法。他意识到这些分支结构可以通过单链突出端（称为粘性末端）的碱基配对连接在一起，形成三维晶体材料。这一构想的核心是利用可预测的Watson-Crick碱基配对，而不是传统的试错法来晶化生物大分子（图10 (a)）。Seeman的梦想是将分支结构组装成三维晶体，并将这种晶体用作蛋白质和其他生物大分子的三维组织支架，从而解决大分子晶体化问题（图10 (b)）。



#### 由三臂结连接而成的三维DNA立方体

然而，早期的DNA分支结构（如四臂Holliday结）存在几何灵活性和不稳定性问题。1983年，Seeman通过使用独特序列的分支臂成功地使Holliday结固定，克服了有害的二重对称性。在接下来的十年里，科学家们取得了几个关键突破：构建了由三臂结连接而成的三维DNA立方体，发明了双交叉（double-crossover, DX）分子，它由两个通过两次链交换连接的DNA双螺旋组成。这些DX分子提供了构建具有可控几何形状、连接性和拓扑结构的扩展DNA结构所需的几何刚性和稳定性。

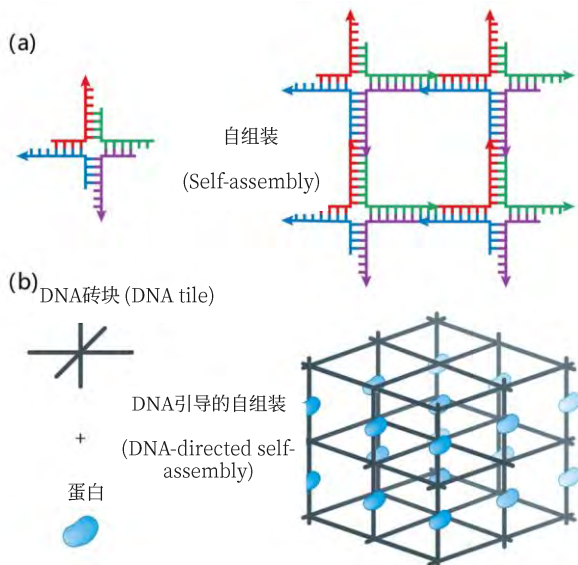


#### 首次利用DNA中的信息生长预设计的晶体阵列

随后，科学家们使用DX分子设计组装出二维DNA晶体。这些DNA构建块（DNA tiles，通常称为“DNA瓦片”或“DNA砖块”）由含有粘性末端的DX分子制成，可以自主生长成二维晶体，并可以通过原子力显微镜（AFM）进行表征。研究人员在这些瓦片上垂直于组装平面放置DNA发夹，证明了可以预先设计这些发夹的任何周期性排列。这是首次利用DNA中的信息生长预设计的晶体阵列。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

图10：基础的DNA组装结构\*



\* (a)具有自我互补、粘性末端的DNA四向连接会自组装成四边形；(b)有助于蛋白质（蓝色）结晶的DNA自组装支架



#### 第一个DNA纳米机械装置原型

1999年标志着DNA纳米技术的另一个里程碑，科学家们使用刚性DX分子，展示了第一个DNA纳米机械装置原型。该结构由两个DNA DX基序组成，中间由一段可在正常右手（B-DNA）双螺旋和左手（Z-DNA）双螺旋之间可逆切换的DNA部分分隔。通过添加和去除 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ ，该结构可以在多个循环中围绕中心DNA部分可逆扭转。

## 2.2 早期的DNA拼砌技术



### DNA结构作为分子机器动态组件的应用

从1980年到1998年，科学家们报道了许多2D和3D离散和扩展DNA结构的理性设计实例，并证明DNA结构可以用作分子机器的动态组件。这一领域的发展离不开DNA固相合成技术的重要发现，这使得可以轻松获得任何序列的DNA链。自动化DNA合成在分子生物学、合成生物学、DNA计算、寡核苷酸治疗、分子诊断和测序等众多领域都产生了变革性影响。



### 新型DNA瓦片基序的开发和二维晶体表面的创建

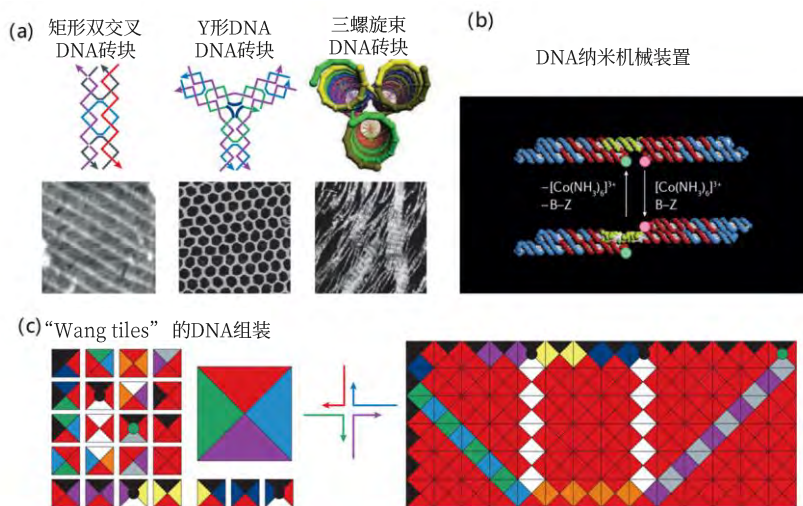
基于这些基础工作，结构DNA纳米技术领域开始蓬勃发展。科学家们开发了众多新型DNA瓦片基序，创建了具有精心设计的几何形状和周期性的高度有序二维晶体表面。他们发明了“定向成核组装”技术，使用单链DNA作为模板来组装DX瓦片，并开发了构建长单链DNA模板（>1,000个碱基）的简单方法。此外，他们还引入了DNA瓦片基序位置的序列对称性概念，以减少形状畸变并允许使用最少的起始单元生长大型二维阵列。



### 算法自组装和计算机科学原理应用于DNA组装

此外，科学家们将算法自组装和计算机科学原理应用于DNA组装，提出了理论上可以从DNA生长非周期性晶体的方法。例如“Wang tiles”概念被引入DNA纳米技术，它源自数学中的Wang tiles理论。在数学中，Wang tiles是一种可以平铺整个平面的几何形状，每个形状都有特定的边缘，这些边缘可以与其他形状的边缘相匹配，从而形成无限多种不同的图案。在DNA纳米技术中，Wang tile的概念被用来设计可以自组装的DNA结构单元，每个单元都有特定的黏性末端，这些末端可以与其他单元的黏性末端互补配对，从而形成更大的结构。也就是说，每种Wang tile颜色代表一个特定的DNA序列，Wang tile是具有四个不同颜色侧面的正方形，只有当相邻边缘颜色相同时，它们才能与相邻瓷砖组装在一起。尽管在生长过程中仍存在一些错误，如非模板生长和瓦片错位，但无错误的算法DNA组装仍然是一个值得追求的目标，相信随着更强大工具的出现，这一目标终将实现。

图11：二维DNA组装结构\*



\* (a) DNA 纳米技术图案。顶部为 DNA 纳米技术中的平铺图案，底部为组装成晶格的原子力显微镜图像。(b) 纳米机械 DNA 装置。(c) Wang tiles 是具有四个不同颜色侧面的正方形，只有当相邻边缘颜色相同时，它们才能与相邻瓷砖组装在一起。在算法 DNA 组装中，每种 Wang 瓷砖颜色都可以是特定的 DNA 序列，从而导致非周期性图案的组装。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 2.3 DNA折纸技术

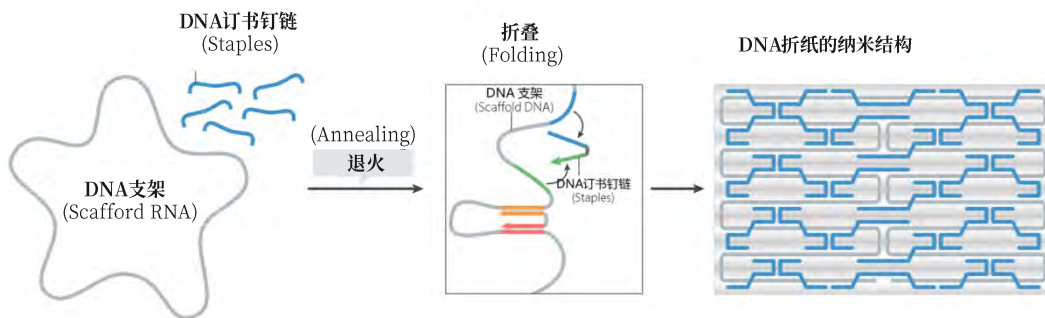
### 2.3.1 DNA折纸术



#### DNA折纸术的提出

2006年，Paul Rothemund发表的一篇具有里程碑意义的论文彻底改变了DNA纳米技术的格局。Rothemund提出了一种新颖的DNA构建方法，即DNA折纸术（DNA origami）。这种方法基于一条长的单链DNA作为“支架”，在短“订书钉链”的辅助下，可以精确地折叠成预设的图案，如图12所示。虽然DNA折纸术的概念完全归功于Rothemund，但之前的一些工作，如使用短链辅助连续DNA链折叠成八面体的构建，以及DNA“条形码”系统，可能为这一突破性想法提供了一些灵感。

图12: DNA折纸术的基本原则



#### DNA折纸术的优势

DNA折纸术的独特之处在于其前所未有的复杂性、非周期性和自组装的便利性。每个DNA折纸结构通常包含约200个可寻址点，覆盖8,000-10,000平方纳米的面积。这种方法使得研究人员能够设计和制造出各种任意复杂的非周期性二维结构，如美洲地图、矩形、笑脸、星星等图案。DNA折纸术的一个重要优势是，与支架相互作用的“订书钉链”通常不需要纯化，这大大简化了组装过程，提高了效率。

随着技术的发展，任何研究人员，无论是化学家、生物学家、物理学家还是计算机科学家，都可以利用免费提供的计算机设计软件和商业可获得的DNA链来设计和制造这些复杂的纳米结构。这极大地推动了DNA纳米技术的普及和跨学科应用。



#### 新方法的诞生：“单链瓦片”或“砖块”组装

近年来，另一种不需要长支架链就能达到与DNA折纸术相似复杂度的方法被报道，称为“单链瓦片”或“砖块”组装（“single-stranded tile”或“brick” assembly）。这种方法由Peng Yin团队开发，涉及计算机辅助设计任意结构，并使用数百条形成交错双螺旋的DNA单链进行组装。每个构建块是含有四个模块化区域的DNA单链，这些单链被设计成相互形成交错的双螺旋，最终形成DNA晶格。由于每个序列都是唯一的，这些基序可以用作分子画布，通过选择定义结构的一组链，可以制造出任何任意形状。

这两种方法的一个共同限制是需要数百条不同序列的DNA链来产生单个纳米结构。然而，随着寡核苷酸合成成本的持续下降，这个问题正在逐渐减轻。事实上，DNA成本似乎存在一个类似摩尔定律的规律，即有效成本每30个月减半。这一趋势将进一步推动DNA纳米技术的发展和應用。

## 2.3 DNA折纸技术

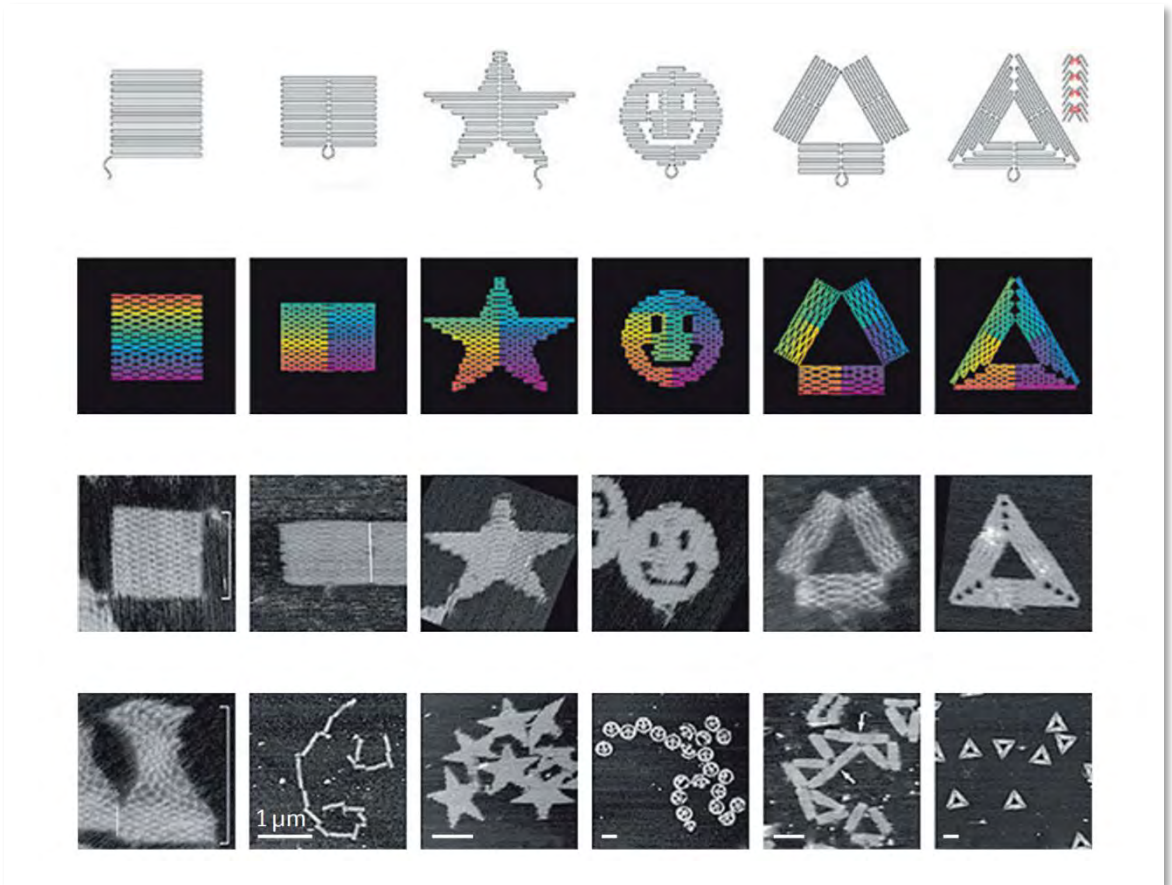
### DNA纳米技术的可扩展性进展

在可扩展性方面，研究人员已经取得了重要进展。例如，使用具有空心内部的DNA折纸框架作为周期性瓦片阵列的成核和生长位点。此外，十字形折纸分子被证明可以形成二维周期性阵列，这是对Wenyan Liu等人早期设计的规则的一个示范，即N维DNA阵列应该由螺旋轴跨越这些维度的基序传播。这些进展为构建更大规模、更复杂的DNA纳米结构铺平了道路。

### RNA纳米技术的重大突破

此外，RNA纳米技术也取得了重大突破。研究人员报道了一种强大的方法，可以从单链RNA构建复杂结构。RNA纳米结构被设计成共转录形成：由于转录在RNA组装的时间尺度上很慢，新生RNA链可以在合成后立即使用发夹和基于RNA的关联基序折叠成所需的形状。这种方法解决了合成生物学中的一个重要目标：将RNA折叠成复杂的功能形状（如核糖体）。早期的一些工作已经实现了理性设计的RNA纳米结构，并且RNA纳米结构的体内组装也被证实。

图13: DNA折纸术获得不同形状DNA纳米结构



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

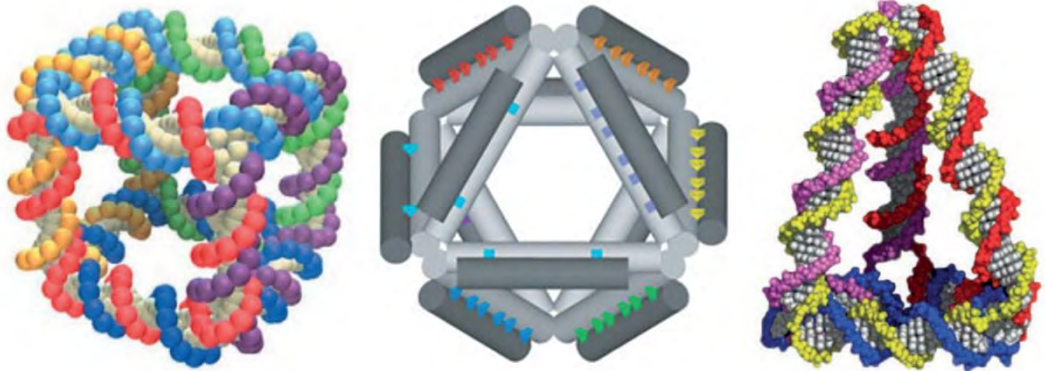
## 2.4 三维DNA结构

### 2.4.1 三维DNA结构

三维DNA结构的发展历程是DNA纳米技术领域一个令人振奋的阶段。科学家们不断突破技术限制，创造出越来越复杂和功能化的DNA纳米结构。这一过程不仅体现了DNA分子作为构建材料的无限潜力，也反映了跨学科合作在推动科技进步中的重要作用。

1991年，第一个离散的三维DNA结构——DNA立方体被成功构建（图 14左），这一开创性的实验证明了使用DNA作为构建三维结构的可行性。随后，科学家们利用固相支持技术构建了更复杂的截短八面体。虽然这些早期的三维DNA结构在制备时的产量较低，但它们为后续研究奠定了重要基础。

图14：基本三维DNA结构\*



\*左图为由三臂连接点构成的 DNA 立方体。中间为由长 DNA 链和五个连接链构成的八面体。右图为由四个 DNA 单链构建的四面体

随着原子力显微镜（AFM）和透射电子显微镜（TEM）等先进表征技术的引入，科学家们能够分析未闭合的DNA结构，这大大拓展了可构建的结构类型。例如，通过将一条1700个碱基长的DNA链与五条短的订书钉链退火，成功构建了DNA八面体（图 14中）。此外，四条不同的DNA单链被编程形成四面体（图 14右），这些合成方法显著提高了产量。

接着，模块化方法的引入使得构建大量三维DNA结构成为可能，如三角形、正方形、五边形和六边形棱柱。通过使用对称的DNA三点星或五点星瓦片的分层组装方法，科学家们成功构建了四面体、十二面体、二十面体和巴基球等复杂的DNA多面体结构。这些进展不仅展示了DNA结构的多样性，也为未来的应用奠定了基础。

DNA折纸技术的出现为三维DNA结构的构建带来了革命性的变化。研究人员开发了多种方法将DNA折纸扩展到三维结构。一种通用方法是通过在特定位置连接平行的DNA双螺旋来卷曲DNA折纸片，从而确保一个螺旋相对于下一个螺旋的曲率。另一种策略是将多层DNA螺旋堆叠成蜂窝状或方形晶格，这种方法能高效创建复杂且刚性的三维DNA折纸结构。通过在多层DNA折纸中引入扭曲和曲率，科学家们能够精确控制结构的形状和特性。

此外，科学家们还开发了将支架链组装成八连接折纸方形片的方法，这些片可以用作立方体盒子的面。这种三维结构的“盖子”可以通过添加DNA链选择性地打开或关闭，展示了DNA结构的动态特性。另一种方法是通过将支架链重复包裹在整个结构周围来构建DNA四面体，定义由未配对核苷酸“铰链”分隔的三角形。

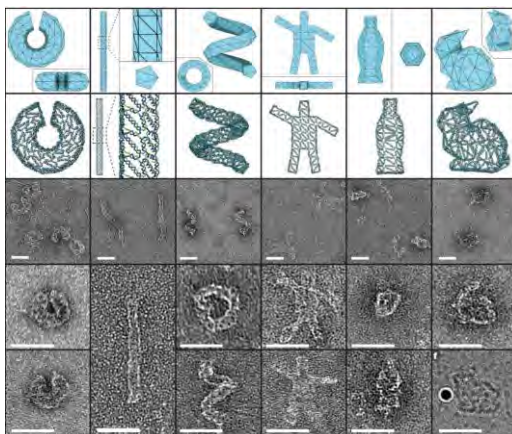
来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 2.4 三维DNA结构

最近，一种创新的方法被引入，通过堆叠同心双螺旋圆来匹配目标三维形状的轮廓。这种方法极大地增加了可构建的三维结构的复杂性和多样性（图 16 (a)）。多臂DNA折纸方法也被用来制备二维DNA支架，然后通过二维结构上的连接链将其折叠成三维棱柱结构。

后期的进展包括一种创建线框DNA折纸三维结构的方法（图 15），这种方法被称为一种革命性的DNA纳米技术，通过高度自动化的流程，将数字化设计的三维多面体网格转化为实际的DNA结构。首先，在三维软件中绘制出目标几何形状，然后应用图论算法来规划DNA分子的路径，确保每个边缘都由单一的DNA双螺旋代表。接着，通过物理模拟来优化DNA结构的布局，减少张力和重叠。之后，使用定制软件自动生成构成DNA结构的钉扎链序列。最终，在实验室中将设计转化为现实，合成DNA分子，并通过精确的化学过程使它们自动组装成预定的三维形状，这些结构在生理条件下显示出了良好的稳定性和应用潜力。这种方法产生的复杂三维结构主要由双链DNA作为边缘。在一种相关但不同的方法中，复杂的线框二维和三维折纸结构被构建，其中每个边由反平行DNA交叉瓦片表示，每个顶点由多臂瓦片结表示。

图15: 线框 DNA 折纸方法用于三维DNA结构的构建

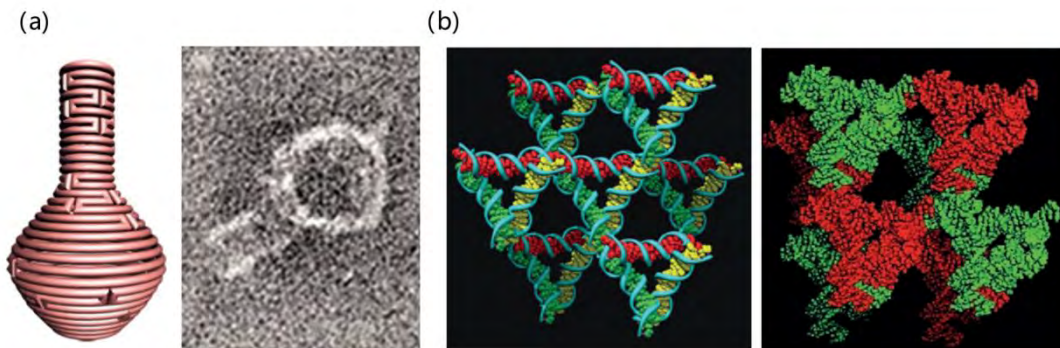


DNA纳米管的设计也取得了重大进展，科学家们通过DNA瓦片组装、DNA折纸、单链瓦片和线框纳米管等多种方法，构建出越来越复杂和功能化的纳米管结构。这些结构在药物递送、生物传感和纳米电子学等领域具有广泛的应用前景。

三维DNA晶体阵列的自组装起初被证明是一个比预期更具挑战性的目标。经过多年努力，科学家们终于在2009年报道了第一个自组装的三维DNA晶体（图 16 (b)）。这种晶体基于分支、刚性的DNA三维三角形基序，尾部带有非常短的黏性末端。这些粘性末端在跨越三维空间的方向上的结合产生了晶体排列，这种结构有望应用于蛋白质结晶的模板和纳米材料的多孔宿主。

此外，科学家们还构建了每个不对称单位含有两个分子的晶体，并展示了用DNA三螺旋后组装稳定这些晶体的方法。新的见解正在揭示刚性基序形成自组装晶体的倾向，同时新的三维DNA结晶基序也在不断涌现。

图16: 复杂DNA三维结构\*



\* (a)左图展示为一个由同心圆以折纸设计堆叠而成的 DNA “瓮”；右图显示了该结构的电子显微镜图像。(b) 由刚性三角形和两个碱基粘性末端自组装的 DNA 晶体

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 2.5 动态DNA纳米结构

### 2.5.1 动态DNA纳米结构

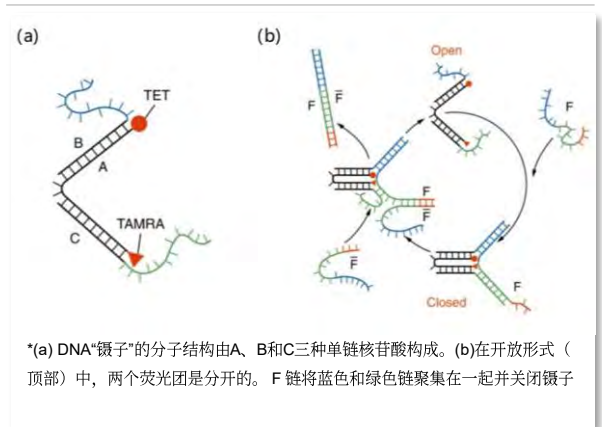
动态DNA结构的发展是DNA纳米技术领域一个激动人心的方向，其展示了DNA分子不仅可以构建静态的纳米结构，还能创造出具有动态特性和功能的纳米机器。这一领域的进展不仅体现了DNA分子的多功能性，也为未来在智能材料、纳米机器人和生物医学等领域的应用开辟了新的可能性。

2000年，一篇开创性的论文引入了等温DNA链置换的概念，这一概念成为构建许多DNA机器的基础（图 17）。链置换过程是通过精确设计的DNA链之间的互补和杂交来实现的，这种设计允许对DNA分子机器的状态进行精确控制。通过添加和移除特定的燃料链，可以控制镊子的开合，从而实现对纳米尺度结构的精确操作。链置换过程是这种DNA分子机器操作的核心部分，涉及两个主要的燃料链：关闭链（F）和移除链（F'）。

初始状态下，DNA分子机器由三股DNA链A、B和C组成，形成一对镊子的结构。在初始的开放状态下，链B和C的未杂交的24个碱基部分从镊子的两端松散地悬挂。关闭链F由两段连续的24个碱基序列组成，这些序列与链B和C的悬挂端互补。当关闭链F与链B和C的自由端杂交时，它会拉动镊子的两端，使它们闭合。这个过程涉及链F的8个碱基的悬垂部分与链B和C的相应部分杂交，从而拉动镊子闭合。当移除链F'被添加到已经闭合的镊子中时，链置换过程开始。移除链F'与关闭链F的悬垂部分开始杂交，这个过程称为分支迁移。

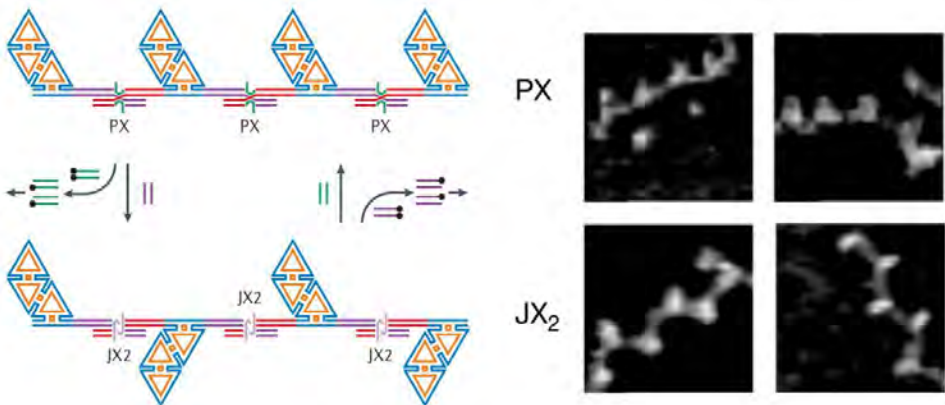
分支迁移是一个随机过程，涉及新杂交的F'链与仍然与镊子组件B和C杂交的区域之间的连接点的移动。随着分支迁移的继续，链B和C被完全置换，最终形成双链的废物产物FF'，并且镊子重新回到开放状态。链置换反应的速率限制步骤是F和F'链之间杂交的放热成核。

图17: DNA“镊子”（tweezer）的构建\*



这种等温链置换技术被用来可逆地旋转一系列DNA装置，在顺式和反式形态之间切换（图 18），例如将一行平行的DNA梯形转变为交替的“上”和“下”梯形（‘up’ and ‘down’ trapezoids）。此外，科学家们还将DNA执行器引入二维瓦片晶格，使整个晶格能够在拉伸和紧凑构象之间切换。这些成果展示了DNA结构的动态特性，为构建可控的纳米机器奠定了基础。

图18: 链位移可以可逆地将DNA纳米结构从平行梯形线转变为交替排列\*



\*PX是可以提供类似于反式的平面构象的结构，而JX2提供类似于顺式的平面构象

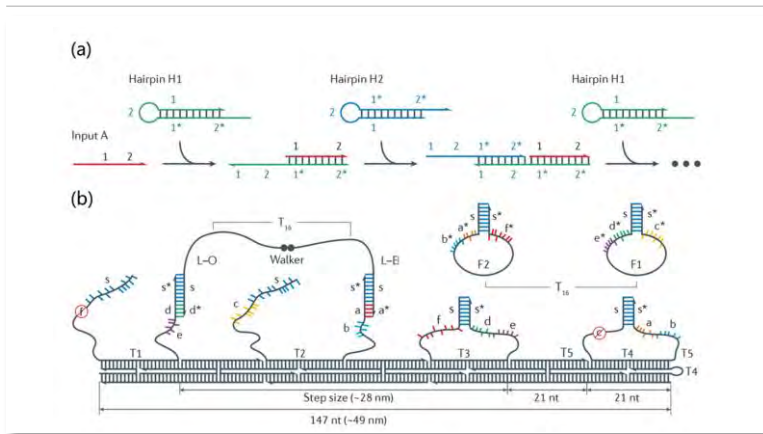
来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 2.5 动态DNA纳米结构

另一个重要概念是杂交链反应，在这个过程中，发夹DNA单体只有在添加触发DNA链时才会组装。具体来说，触发链打开第一个发夹，然后第一个发夹可以打开第二个发夹，第二个发夹又可以打开第一个，如此循环（图 19 (a)）。这种方法使DNA组装可以被触发并自主放大，为信号放大和分子检测提供了新的工具。

随着研究的深入，DNA机器的复杂性显著增加。科学家们报道了多种DNA“步行器”（DNA "walkers"），包括一个具有两条“腿”（“legs”）的DNA单元，可以在轨道上定向和自主行走。此外，还有DNA“齿轮”（DNA “gears”）可以相互“滚动”，以及可以沿着DNA折纸上预设轨道行走的DNA“蜘蛛”（DNA “spider”）（图 19 (b)）。这些策略进一步扩展到了一个装配线，其中包括一个筋斗步行器（somersaulting walker），可以沿着预设轨道运输和组合货物（例如金颗粒）。

图19: 杂交链式反应(a)与DNA“步行器”(b)用于构建动态DNA的纳米机构

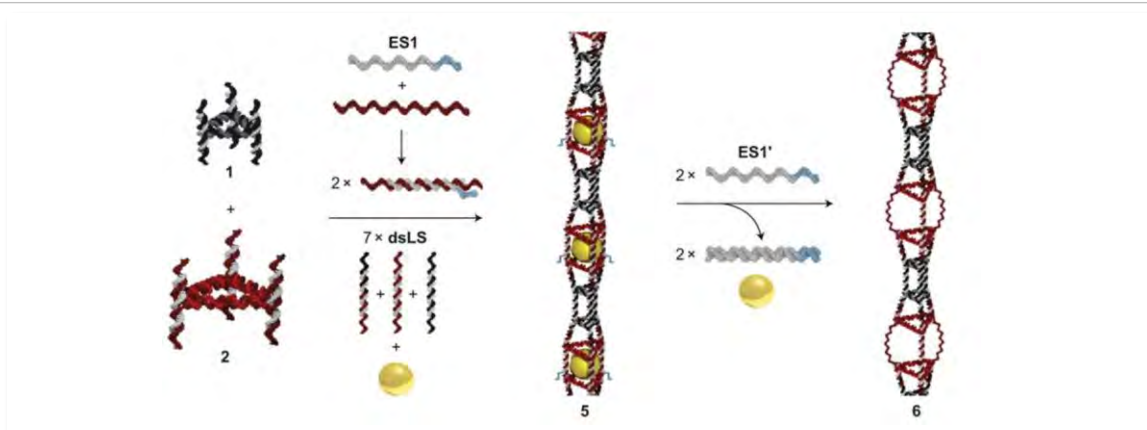


更令人兴奋的是，研究人员成功地使用DNA步行器执行了多步有机合成，按照预设的顺序进行。这一成果展示了DNA纳米机器在化学合成领域的潜在应用。此外，科学家们还构建了DNA级联系统、条件组装系统，以及可以在DNA折纸表面放置各种图案的“捕获”装置（“capture” device）。这些进展使我们现在能够对动态DNA系统进行详细的生物物理测量。

DNA的动态运动也被实现在三维结构中。结构动态的DNA笼（DNA cages）可以通过添加特定的DNA链来诱导膨胀和收缩到不同的尺寸，这种重构也在DNA四面体中得到了证实。这些机制与DNA笼在生物环境中对药物的包封和释放应用相关。在一个概念验证实验中，报道了一种DNA纳米管（图 20），可以将金纳米颗粒封装成预设设计的等离子体线。通过添加DNA“橡皮擦”链（DNA “eraser” strand），可以高效快速地释放金纳米颗粒客体，这对等离子体结构和药物递送都具有重要意义。

链置换技术还被用于不同几何形状的三维结构之间的相互转换，以及获取无法直接制造的结构。动态运动也被引入到DNA折纸结构中，例如，一个DNA折纸莫比乌斯带（DNA origami Möbius strip）可以动态切换为环链。此外，使用光响应偶氮苯DNA（photoresponsive azobenzene DNA）实现了DNA折纸结构的光开关。

图20: 纳米管封装金纳米颗粒及DNA可控的释放



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

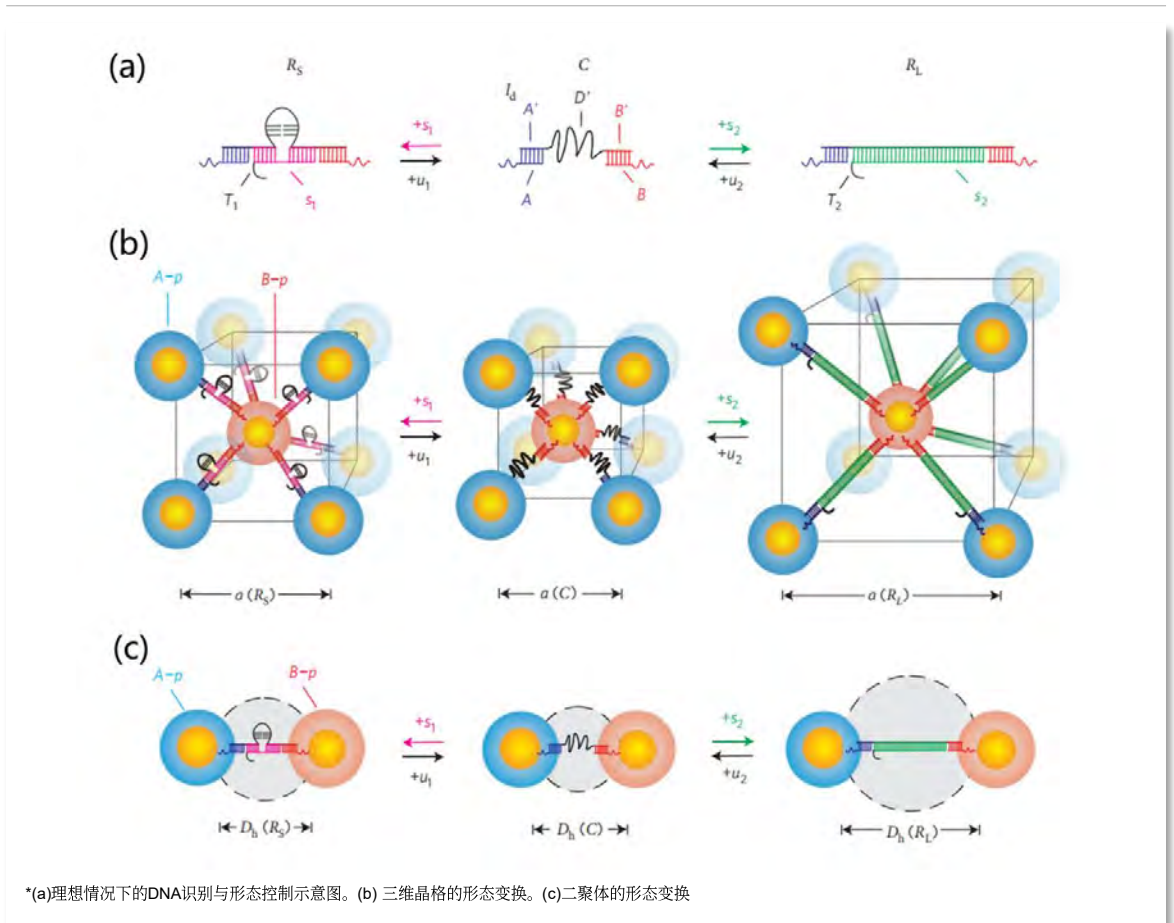


## 2.5 动态DNA纳米结构

DNA纳米结构的动态运动已被用于重构其他功能材料，如金纳米颗粒三维晶格。这项研究探讨了利用DNA作为生物分子基元来组装纳米结构的潜力，强调了DNA的多样性和可逆性，这使得它成为构建能够动态变化、可重构和响应外界刺激的纳米结构的理想选择。接着，基于此思想开发了一种基于单链DNA的创新装置 (single-stranded DNA (ssDNA) device,  $1d$ )，这种装置充当粒子间的连接件，能够在自组装过程完成后，通过添加简单的DNA链作为分子刺激来调整超晶格和团簇中的粒子间距，同时确保结构的完整性得以维持 (图 21)。进一步地，通过改变DNA装置的结构状态和灵活性，实现了超晶格和二聚体团簇在两个不同的刚性状态之间的切换。

更为重要的是，研究强调了利用DNA构建的复杂形态作为控制纳米粒子放置的模板的能力，这不仅体现了DNA作为具有高度特异性识别特性的构建材料的优势，还展示了其在组装后系统重构方面的便利性。此外，DNA装置已被整合到水凝胶中，从而将DNA识别和刺激响应行为转化为宏观变化，如定向形状变化、形状记忆和电催化行为。

图21：基于 DNA 的纳米颗粒间的形态控制\*



这些动态DNA结构的发展不仅展示了DNA分子的多功能性和可编程性，也为未来在智能材料、纳米机器人、生物传感器和药物递送等领域的应用开辟了新的可能性。随着技术的不断进步和跨学科合作的深入，我们可以期待看到更多令人兴奋的动态DNA纳米结构和装置的出现，这些创新将有望在解决能源、环境、医疗等全球性挑战中发挥重要作用。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 2.6 超分子DNA组装

### 2.6.1 超分子DNA组装概述

超分子DNA组装是DNA纳米技术领域一个令人兴奋的新方向，它将DNA的自组装能力与有机化学、高分子化学和超分子化学的概念相结合，为创造新型纳米结构和功能材料开辟了广阔的前景。这一领域的发展不仅体现了跨学科研究的重要性，也展示了化学在DNA纳米技术中的巨大潜力。

DNA纳米技术是一个跨学科领域，主要由结晶学家、生物化学家、生物学家、物理学家和计算机科学家共同推动。尽管化学家在这一领域的贡献目前相对较少，但物理有机化学、大分子化学和超分子化学的概念性进展为DNA纳米技术带来了革命性的变化。在短期内，这些进展提供了创造含有异源组分的新型纳米结构的工具，并能够稳定这些纳米结构，使其在生物学和医学应用中发挥作用。从长远来看，它们可能提供新的DNA组装范式，扩展未经修饰的DNA字母表（腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤和胞嘧啶），从而实现更高的结构复杂性。

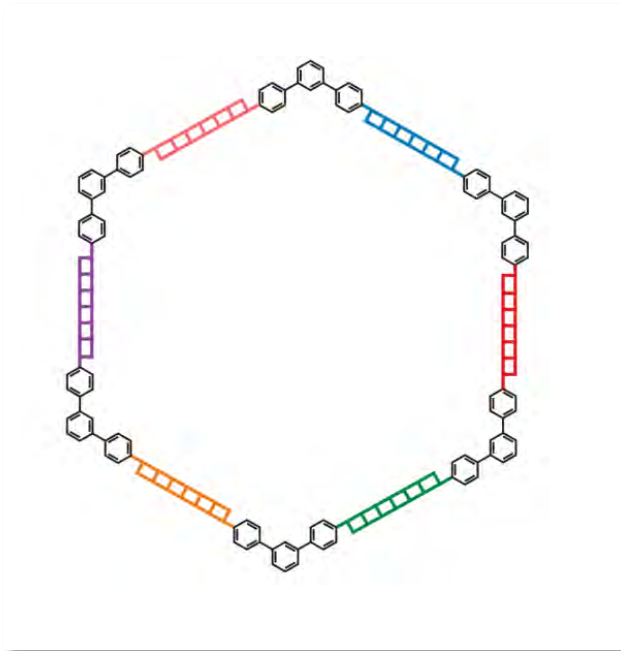
将DNA构建块与合成的有机、无机和聚合物分子结合在一起，还可以赋予DNA结构功能性。尽管DNA结构在结构多样性和易于生产方面表现出美感，但其化学性质相对单一。通过引入其他化学组分，我们可以大大扩展DNA纳米结构的功能范围。

### 2.6.2 DNA纳米结构中的有机顶点

首先，将有机顶点引入DNA结构中是一项重要的创新。传统的DNA纳米技术主要依赖于交叉结构基序，而合成化学提供了使用基于有机分子或过渡金属的角单元的可能性。这种方法可以显著减少所需的DNA链数量，并引入未经修饰的DNA无法实现的结构基序（structural motifs）。

在这种策略的早期例子中，一个中心四面体碳被连接到两个相同的、自互补的DNA链上。这些结构自组装成环状和寡聚体组装体。为了提高组装的选择性，科学家们通过自动化合成在DNA链的中间插入了一个刚性有机分子。六条具有互补序列的这样的链可以很容易地组装成一个DNA六边形（图 22），这个六边形也可以作为模板形成金纳米粒子六边形。为了引入模块性和动态特性，研究人员使用了具有刚性有机角单元和单侧侧面的DNA多边形作为不同几何形状的支架。这些多边形是通过在一条链中引入多个有机顶点，然后将这条链环化而产生的。它们可以用作重构性模板来组织金纳米粒子，以及创建DNA棱柱形笼和DNA纳米管。有趣的是，这些小的有机角单元被发现能够深刻影响组装结果，稳定DNA杂交，并增加其协同性。它们可以被高效合成，毫无疑问将在DNA纳米技术中得到越来越多的应用。

图22：刚性有机分子为顶点组装的DNA六边形纳米结构



这种将有机化学与DNA纳米技术结合的方法不仅简化了复杂结构的设计和合成过程，还为DNA纳米结构引入了新的功能和特性。例如，通过选择不同的有机角单元，可以调控DNA结构的刚性、稳定性和动态特性。此外，这些有机角单元还可以作为功能化的位点，用于引入其他分子或纳米粒子，从而赋予DNA结构新的光学、电学或催化性质。随着这一领域的不断发展，我们可以预见更多创新性的超分子DNA组装策略的出现。例如，利用可逆共价键或非共价相互作用来构建动态可调的DNA纳米结构，或者利用超分子主客体化学来实现DNA结构的可控组装和解组装。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

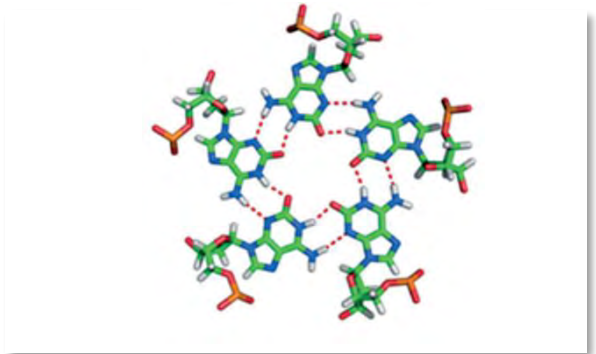
## 2.6 超分子DNA组装

### 2.6.3 新DNA基序 (motifs) 的开发

新型DNA基序的开发指的是通过化学合成和修饰，如何扩展DNA分子的结构和功能多样性。这一领域的进展不仅拓宽了我们对核酸化学的理解，也为创造具有新颖特性的纳米材料和装置开辟了新的可能性。

合成化学使得科学家们能够修饰DNA双螺旋内部的核苷酸碱基，从而创造出全新的DNA结构单元。例如，自互补的异鸟嘌呤具有两个以特定角度排列的氢键面，这种独特的结构使其能够形成五聚体组装。更有趣的是，在铯离子存在的情况下，聚异鸟嘌呤可以形成高阶的DNA五重螺旋结构（图 23），而不是传统的双螺旋结构。这种现象揭示了离子环境对DNA结构的深远影响，为设计新型DNA纳米材料提供了灵感。

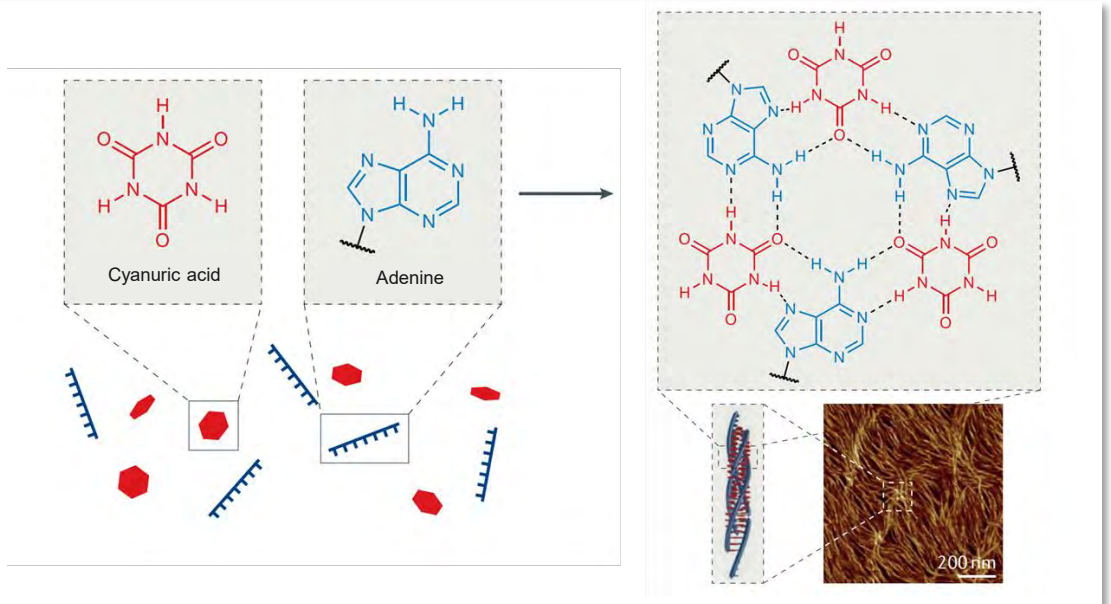
图23: 聚（异鸟嘌呤）自组装形成高阶的DNA五重螺旋结构



另一个引人注目的例子是使用具有三个类胸腺嘧啶面的小分子（三聚氰酸）来重新编程未修饰的聚腺嘌呤的组装。这种方法可以将聚腺嘌呤组装成具有六聚体玫瑰花内部结构的三重螺旋，这些三重螺旋进一步协同组装成长纤维（图 24）。这种策略展示了如何通过引入外部小分子来调控DNA的自组装行为，为设计复杂的DNA纳米结构提供了新的工具。使用外部添加的小分子来改变DNA分子识别的方法具有巨大的潜力，因为它操作简单，而且有大量具有两个或三个氢键面的小分子可供选择。这种方法很可能会产生许多新的DNA基序，从而极大地扩展DNA纳米技术的工具箱。

人工DNA碱基的研究领域虽然广泛而复杂，但其中一些重要的进展值得关注。研究人员已经开发出多种结构和相互作用来替代传统的沃森-克里克碱基配对，包括改变的氢键基序，以及不形成氢键但表现出疏水性和 $\pi$ -堆积相互作用的分子。这些新型碱基不仅拓展了DNA的化学多样性，也为设计具有特定功能的DNA纳米结构提供了新的可能性。

图24: 三聚氰酸与聚（腺嘌呤）组装形成六聚玫瑰花结，并延伸成三螺旋纤维



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 2.6 超分子DNA组装

更令人兴奋的是，一些人工DNA碱基已经被证明可以被聚合酶复制。例如，研究人员成功地让大肠杆菌复制和传播包含扩展遗传字母表的DNA。这一成果不仅在合成生物学领域具有重要意义，也为创造具有新功能的DNA纳米材料开辟了道路。

除了修饰天然DNA碱基，科学家们还在创造合成的寡核苷酸类似物方面取得了巨大进展。这些类似物比天然DNA或RNA具有更高的血清稳定性和较低的免疫原性，包括肽核酸、锁核酸、镜像DNA、2'-氟和2'-甲氧基衍生物等。这些合成类似物在DNA纳米技术中的应用前景广阔，特别是在生物医学领域。它们可以用来构建更稳定、更耐受生理环境的DNA纳米结构，为药物递送、生物传感和基因治疗等应用提供新的可能性。

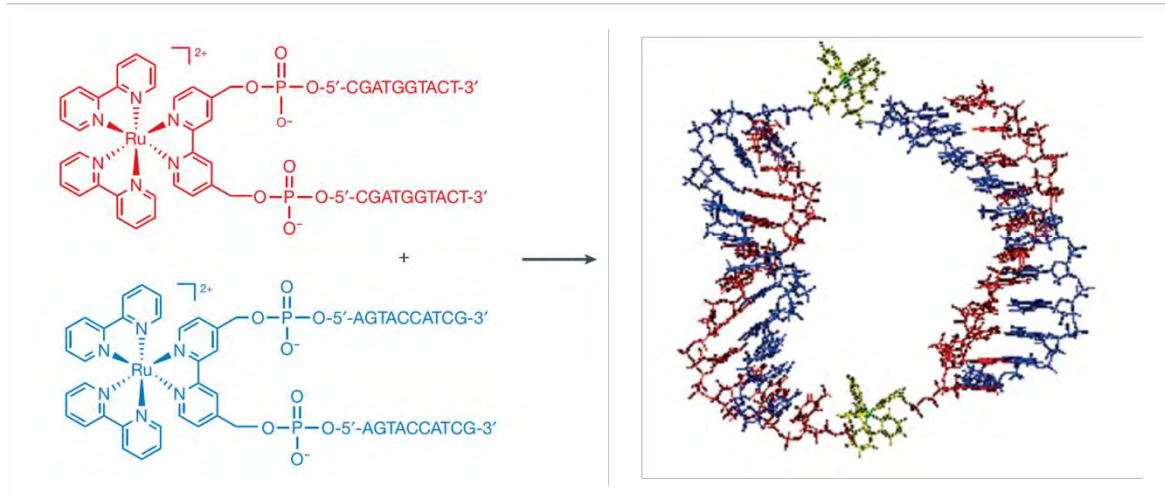
然而，目前这些合成类似物的高成本限制了它们作为标准寡核苷酸的广泛应用。随着合成技术的进步和规模化生产的实现，我们可以期待这些新型DNA类似物在未来DNA纳米技术中发挥越来越重要的作用。

### 2.6.4 过渡金属与DNA纳米自组装

将过渡金属引入DNA结构不仅赋予了DNA分子新的重要特性，如增强的稳定性、氧化还原活性以及光化学、催化和磁性等性质，还为精确组织过渡金属复合物提供了一种独特的方法。

2001年，第一个金属-DNA分支结构被报道，这标志着金属-DNA纳米结构研究的开端。这种结构由一个发光的钌联吡啶中心和两条作为附属物的DNA链组成。当两个互补的复合物结合在一起时，它们可以自组装成环状的金属-DNA纳米结构（图 25）。这种设计不仅展示了DNA的可编程性，还引入了金属元素的独特光学性质。

图25：具有过渡金属角单元的分支DNA链组装成金属-DNA纳米结构



过渡金属角单元的引入带来了DNA杂交稳定性的显著提高。例如，在DNA双链中引入单个金属复合物，可以使融解温度从40°C跃升至80°C。此外，这种结构还实现了从DNA到金属的手性转移，并改善了DNA的电荷传输性能。这些策略被用来构建金属-核酸三维笼，其中过渡金属可以在结构的顶点处进行位点特异性掺入。研究人员还构建了手性金属-DNA四路结，并用它们制作金属-DNA纳米管。

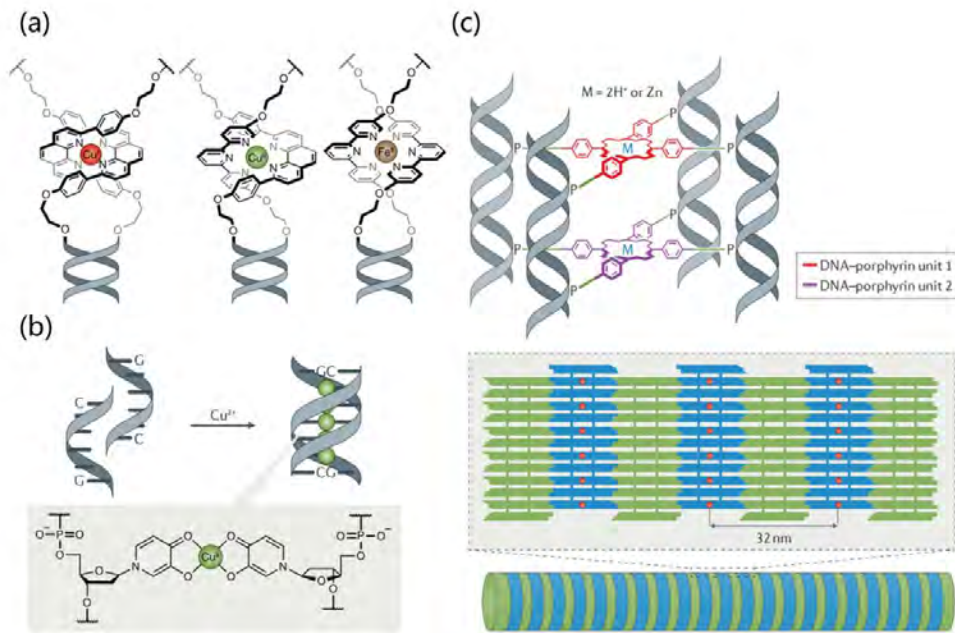
DNA的真正力量在于其能够在纳米结构内组织不同的过渡金属。例如，研究人员展示了DNA模板创建三种不同配体环境的能力，每种环境对特定的过渡金属离子具有选择性。当添加“错误”的金属离子时，会发生“错误纠正”（图 26 (a)）。这种高度选择性和自纠错能力为设计复杂的多金属纳米结构提供了可能。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 2.6 超分子DNA组装

DNA杂交已被用作模板来构建金属萨伦（Metal salen）复合物和纳米结构，这些结构还可以被酶催化复制。这种方法不仅展示了DNA在组织金属复合物方面的潜力，还为创造可自我复制的金属-DNA纳米材料开辟了道路。一个重要的突破是用金属结合配体替换DNA碱基，通过DNA杂交创建金属介导的碱基对（图 26 (b)）。这种方法可以在短的寡核苷酸中排列多达五个铜介导的碱基对，其中金属以铁磁方式耦合。在这个系统中，金属中心被发现可以介导DNA内的电荷传输。随后，不同的金属被掺入这些人工作碱基对，进一步扩展了这种方法的应用范围。金属-DNA结构还被用来改变DNA纳米结构的曲率。例如，将卟啉分子连接到四条DNA链上，可以诱导DNA瓦片卷曲成管状结构（图 26 (c)）。这种方法为设计具有特定形状和拓扑结构的DNA纳米材料提供了新的工具。

图26: DNA与过渡金属形成的纳米结构\*



\* (a) DNA 双螺旋形成对过渡金属金选择性的配位模板。(b) DNA 碱基被配体取代，并形成具有五个铜介导碱基对的核苷酸链。(c) 卟啉分子连接到四条DNA链上，诱导DNA瓦片卷曲成管状结构

这些进展展示了金属-DNA纳米结构的巨大潜力。通过精确控制金属离子的类型、位置和数量，研究人员可以设计具有特定电子、光学、磁性和催化性质的纳米结构。这种程序化组织的过渡金属有望应用于纳米电子学、纳米光学、数据存储、分子磁性行为、光捕获和催化等领域。例如，在纳米电子学方面，金属-DNA结构可以用作分子导线或开关，利用金属中心的氧化还原性质实现电子传输和控制。在纳米光学领域，发光金属中心的精确排列可以用于设计新型的光子晶体或光学传感器。对于数据存储，金属中心的磁性可以用于编码信息，而DNA骨架则提供了精确的空间定位。

在分子磁性行为方面，通过控制金属离子之间的距离和相对取向，可以设计具有独特磁性质的纳米材料。对于光捕获应用，金属-DNA结构可以模拟自然光合作用系统，通过精确排列金属中心来优化能量转移效率。在催化领域，金属-DNA结构可以作为高选择性、高效率的纳米催化剂，其中DNA骨架提供了精确的空间控制，而金属中心则提供催化活性。

这种将DNA的可编程性与过渡金属的多样功能相结合的方法，为设计和制造具有前所未有的精确度和功能性的纳米材料开辟了新的途径。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 2.6 超分子DNA组装

### 2.6.5 聚合物与脂质体与DNA自组装

DNA与聚合物和脂质的结合可以将DNA的可编程性与聚合物和脂质的独特物理化学性质相结合，为创造新型纳米材料和结构开辟了广阔的前景。

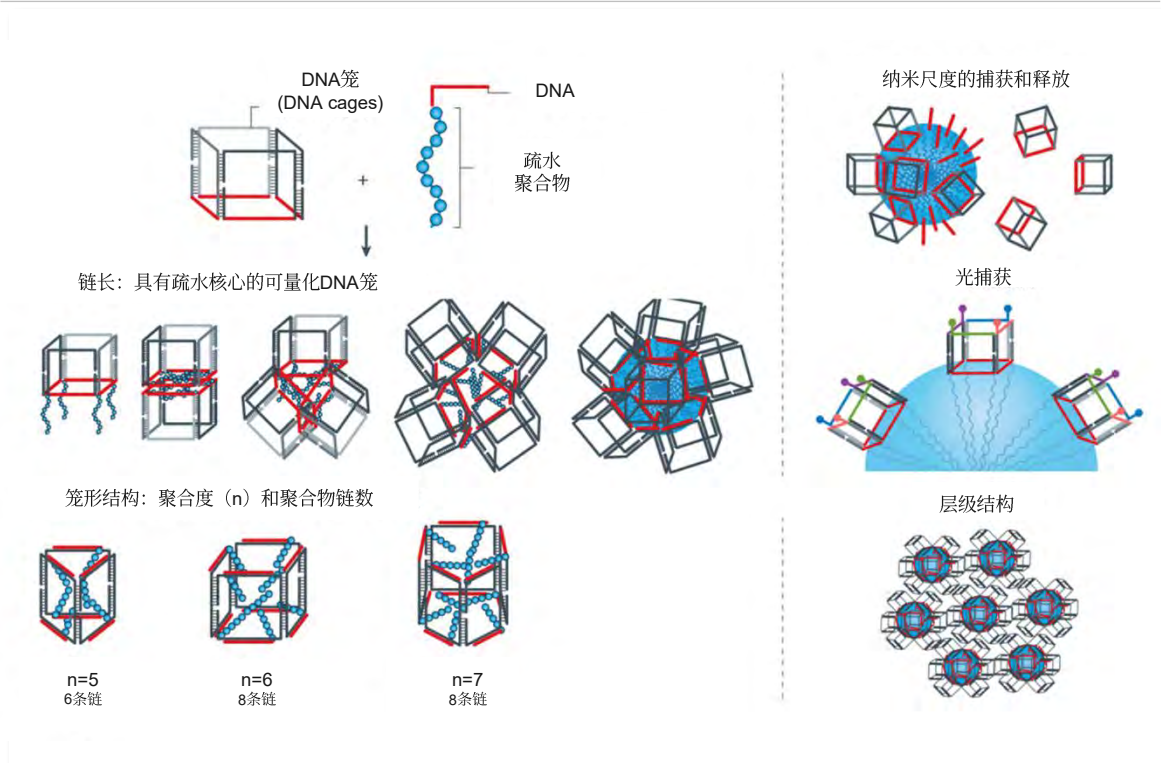
嵌段聚合物自组装是材料科学中一个重要的研究领域，它可以形成具有长程有序性的可预测形态，如球形胶束、棒状结构、囊泡和双层膜，在材料科学和生物医学领域有广泛应用。而面向对象的DNA纳米技术则提供了独特的可编程性，可以形成具有相对短程有序性的组装体。

聚合物通过多种相互作用进行组装，包括但不限于疏水、静电、 $\pi$ - $\pi$ 堆积和氟亲性相互作用，这与DNA简单的A-T、G-C组装“语言”形成鲜明对比。将这两种材料结合起来，可以通过多种正交相互作用实现DNA的长程组织，形成新的结构，这是一个极具前景的研究领域。

研究人员已经成功地诱导DNA块共聚物在不同的长程形态之间切换，这可以通过外部添加的DNA链或酶来实现。此外，科学家们还报道了一种简单且高产的DNA-聚合物共轭物合成方法，其中聚合物块是单分散的，并且序列完全可控。通过将这些聚合物附着到三维DNA棱镜上，研究人员展示了通过疏水相互作用实现的自组装（图27）。

当聚合物位于棱柱的单一面上时，DNA笼子通过疏水相互作用进行组装。疏水聚合物的长度决定了这些量化组装体的聚集数。使用相对较长的聚合物时，可以观察到具有疏水核心和外部DNA棱柱的单分散球形胶束。这些棱柱可以通过链置换从胶束上“剥离”，而笼状胶束还可以用作光捕获天线。相比之下，当聚合物排列在DNA笼子的两侧时，它们可以进行分子内“握手”，在DNA笼子内部形成胶束结构。在这种情况下，内部疏水关联可以包封小分子，并与DNA碱基配对协同工作，增加DNA组装的协同性。

图27: DNA 笼与疏水性聚合物自组装的纳米结构



来源: 公开资料, 文献检索, 沙利文分析

## 2.6 超分子DNA组装

脂质链和胆固醇单元也被附着到DNA支架上，以调节它们的组装行为。如果DNA折纸片的表面被修饰有胆固醇单元，它们可以通过疏水作用被诱导自身折叠（图 28 (a)）。胆固醇取代的DNA笼可以相互关联，显示动态行为，然后从二氧化硅微球上的球形支持脂质双层上脱离。通过静电锚定在支持脂质双层上的折纸结构被报道可以通过钝端相互作用组装成高度有序的二维晶格（图 28 (b)）。

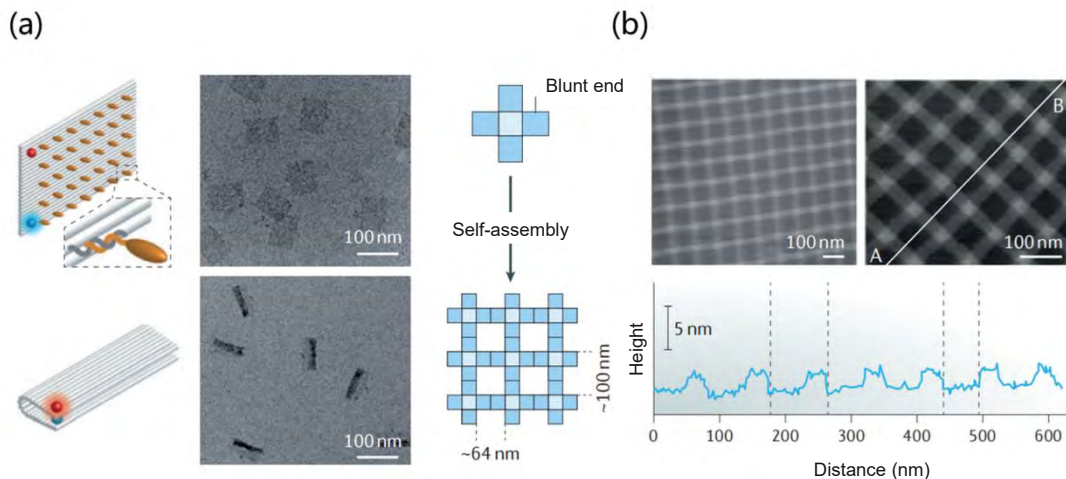
此外，二维折纸结构可以通过光化学方法从结合状态切换到未结合状态。高速原子力显微镜显示，具有疏水锚的DNA桶状纳米结构已被用作膜纳米孔，有证据表明分子可以通过这些孔进行转运，并且这些结构可能对细胞有毒性。这些发现为设计新型的药物递送系统和生物传感器提供了灵感。

除了使用脂质调节DNA组装外，DNA纳米结构还被用作模板来形成大小确定的脂质体并定向组装共轭聚合物链。例如，内部被装饰有脂质的DNA折纸环和笼子，可以用于包封和“雕刻”脂质体的形成，提供了对脂质环境如何生长的基本理解。这种方法为设计具有精确尺寸和形状的脂质体提供了新的工具，有望应用于药物递送和生物传感等领域。

在另一个独特的应用中，DNA纳米结构沿着明确定义的路径排列成共轭聚合物链。一种用短DNA链取代的聚苯乙炔（polyphenylene vinylene）被杂交到折纸结构上的互补位置，这种结构被定向到预设的“路线”中，有潜力将光学或电子分子线组织成任意几何形状。这种方法为设计新型的有机电子器件和光电材料开辟了新的可能性。

这些研究表明，脂质和聚合物可以为DNA纳米技术引入新的组装基序，具有类似蛋白质折叠的新兴特性。反过来，DNA纳米技术也为将聚合物或脂质排列成异性和大小可控的结构提供了独特的机会。这种跨学科的融合不仅拓展了DNA纳米技术的应用范围，还为创造具有新颖功能和性质的智能材料开辟了道路。例如，通过精确控制DNA-聚合物复合物的组装，可以设计具有特定响应性的智能水凝胶，这些材料可能在药物递送和组织工程中找到应用。而DNA-脂质复合物则可能用于设计新型的生物被膜模拟系统，为研究膜蛋白功能和药物-膜相互作用提供工具。

图28: 胆固醇与DNA自组装形成的纳米结构\*



\* (a) 胆固醇单元装饰 DNA 折纸矩形，使其利用胆固醇的疏水性接触自行折叠。(b) 利用 DNA 折纸十字形图案的每条边缘上钝端之间的  $\pi$  堆积相互作用而自组装形成晶格。

The background features a blue-to-purple gradient with faint molecular models of atoms and bonds. A large white hexagonal frame is centered on the page. The number '03' is displayed in white on a dark blue rounded square within the frame.

03

第三章  
核酸四面体

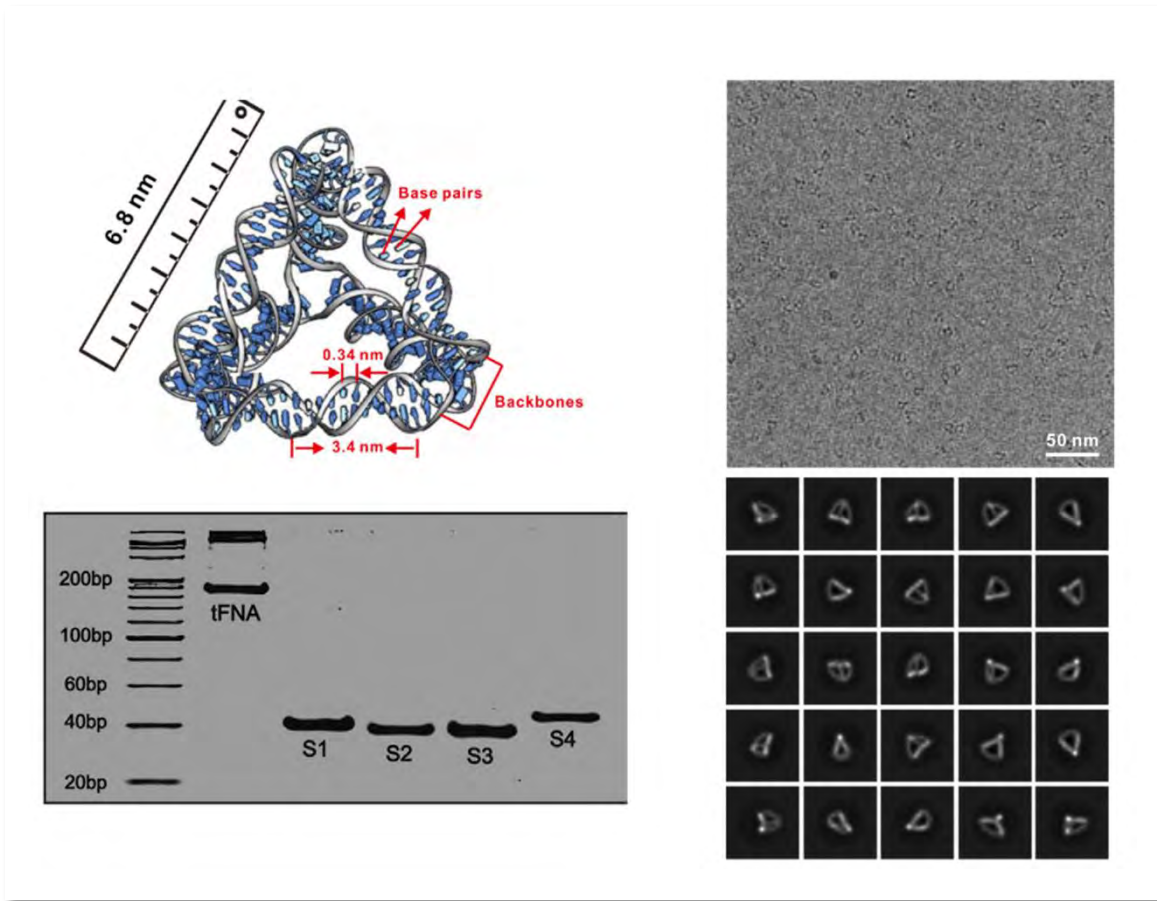


## 3.1 核酸四面体概述

### 3.1.1 核酸四面体简介

DNA纳米技术的发展可以追溯到20世纪80年代初，Nadrian C Seeman首次设计出了第一个四臂核酸连接点，这一突破性发现为三维分子纳米制造的繁荣奠定了基础，随后出现了DNA构建块组装、基于瓦片的组装以及DNA折纸技术的演进。如今，科学家们已经成功制造出了多种三维DNA纳米结构，包括立方体、四面体、八面体、二十面体、管状结构和DNA折纸结构。

图29: tFNA的结构与大小



在众多DNA纳米结构中，四面体DNA纳米结构（Tetrahedral DNA Nanostructure, TDN），也被称为“四面体框架核酸”或“核酸四面体”（Tetrahedral framework nucleic acids, 简称tFNA(s)）因其独特的性能而脱颖而出。tFNA由四条经过精心设计的单链DNA（ssDNA）基于碱基配对的互补规则合成而成。与其他DNA笼状结构（如DNA立方体和八面体）相比，tFNA的合成过程更为简单，在短短几秒内就能以高达95%的产率一步完成。

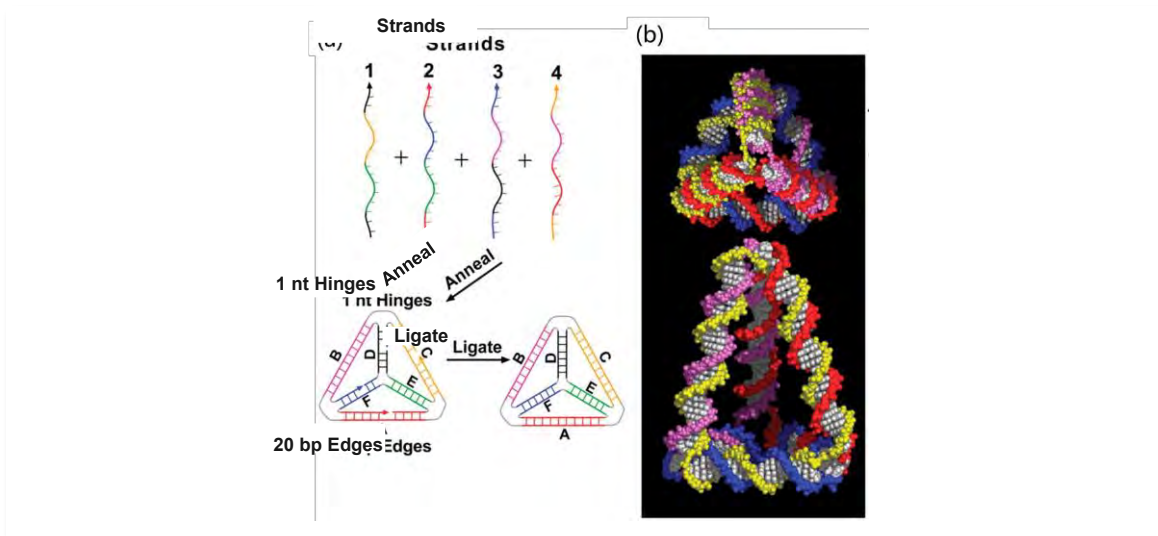
目前，核酸四面体（tFNA）是DNA纳米技术领域的一个重要组成部分。它们是通过四个单链DNA的合成产生的，每条链包含与其他三条链互补的序列，最终形成一个金字塔形的纳米结构，尺寸约为10纳米。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 3.2 核酸四面体的结构优势

核酸四面体 (tFNA) 的合成过程具有高度的简便性和可重复性 (图 30)。在典型的合成过程中, 首先将四个设计好的单链DNA片段在1X TM (Tris-Magnesium sulphate) 缓冲液中以等摩尔比例混合。接着, 将混合物加热至95°C进行热变性, 以确保所有DNA片段都处于单链状态, 消除任何预先形成的二级结构。随后, 通过逐步降低温度至4°C, 允许DNA链通过互补碱基配对自发组装成四面体结构。这一退火过程通常在数小时内完成, 从而得到具有高度对称性和稳定性的tFNA纳米结构。

图30: tFNA的退火制备(a)及空间示意图(b)



更重要的是, 四面框架核酸 (tFNA) 显示出许多独特的结构优势, 这些优势使其在生物医学应用中极为有用。一是tFNA具有高机械强度, 这使得它们能够在各种生物环境中保持结构的完整性。二是它们相对稳定, 即使在血清等复杂生物环境中也能保持其结构, 表现出良好的血清相对稳定性。三是tFNA的可编辑性极高, 它们可以通过静电吸附、序列延伸、序列互补等多种方式与小分子物质、多肽、核酸等连接, 从而作为载体在药物递送和分子识别中发挥作用。这种多功能性使得tFNA能够适应不同的生物医学需求。四是tFNA还具有良好的生物相容性, 这意味着它们在与生物系统相互作用时不会引起不利的免疫反应或细胞损伤。这一点对于确保它们在体内的安全性和有效性至关重要。最后, tFNA易于通过细胞膜, 这一特性对于它们在细胞内递送药物或基因编辑工具等应用中至关重要。这种跨膜能力使得tFNA能够高效地将有效载荷传递到目标细胞内, 从而提高治疗效率。

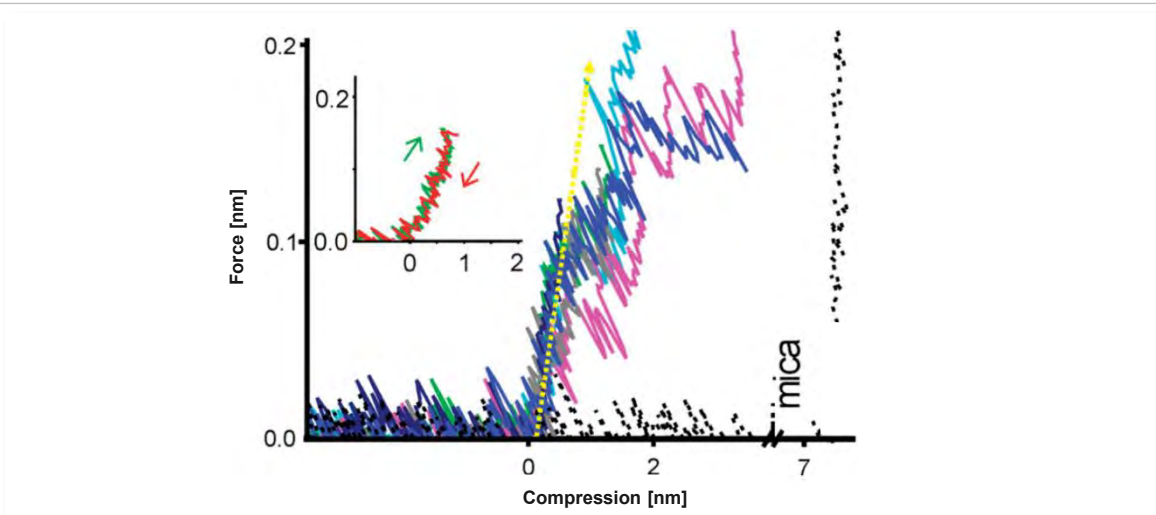
## 3.2 核酸四面体的结构优势

### 3.2.1. 机械强度高

tFNA的结构设计本质上就决定了其较高的机械稳定性。它由四条寡核苷酸链组成，每条链环绕一个面并杂交形成双螺旋边缘。这种设计创造了一个由刚性DNA三角形组成的三角架构，三角形在顶点处通过共价键连接。这种三角架构不仅能够抵抗变形，还能均匀分散外部压力。值得注意的是，在每个顶点，相邻的边缘通过单个未配对的“铰链”碱基连接。这种设计允许一定程度的柔性，同时又不影响整体结构的稳定性。另外，四个边缘含有缺口（DNA骨架中的断裂处）这些缺口的位置经过精心设计，使得分子内相互作用不会受到明显阻碍，从而保证了高效的自组装过程。研究人员使用原子力显微镜（AFM）对单个tFNA进行了直接的机械响应测量。具体来说，他们对具有 $3 \times 20/3 \times 30$ bp（四面体6条边的长度）的tFNA进行了压缩实验（图31）。结果显示：

- **a)线性弹性响应:** 在力达到约100 pN之前，tFNA表现出近似线性和可逆的响应。平均力常数为 $0.18 (\pm 0.07)$  N/m。这种线性响应表明tFNA在一定范围内能够像弹簧一样储存和释放能量，而不发生永久变形；
- **b)高压压缩强度:** 大多数tFNA在70-200 pN的载荷范围内才开始突然软化并发生不可逆变形。这个范围远高于许多其他生物大分子结构，凸显了tFNA的优异机械强度；
- **c)轴向压缩特性:** 从压缩曲线的线性部分，研究者推导出DNA双螺旋在压缩状态下的弹性模量约为 $0.7 (\pm 0.3)$  nN。这个值接近于DNA在拉伸状态下测得的弹性模量（约1.1 nN）。这一发现它首次直接测量了短DNA螺旋在压缩下的轴向弹性响应。之所以能够直接测量DNA在压缩时的轴向弹性响应，也是因为四面体的支撑结构使短DNA螺旋能够承受压缩载荷而不会弯曲或倾斜。

图31: tFNA的压缩曲线显示出其高的机械强度



研究者还建立了一个理论模型来解释tFNA的压缩行为。他们将tFNA的边缘视为在顶点处自由铰接的弹性杆。计算表明，tFNA对压缩载荷的响应主要由支撑边的轴向压缩决定。这个模型预测的力-位移曲线在达到临界载荷之前近似线性，这与实验观察一致。更重要的是，模型预测的欧拉屈曲临界力（50-300 pN）与实验中观察到tFNA突然软化的力范围吻合。这表明tFNA的失效机制可以用传统的均匀DNA弯曲模型来解释。

tFNA的高机械强度还得益于其立体选择性合成。研究发现，合成过程中会产生一个优势非对称异构体，其中每个螺旋的主沟在顶点处朝内。这种立体选择性确保了tFNA结构的精确性和一致性，从而增强了其作为纳米结构构建模块的机械稳定性。相比之前报道的DNA立方体和八面体结构，tFNA具有更高的合成效率（约95%产率）和更好的结构刚性。这主要归功于其三角架构设计和经过优化的自组装过程。高产率和结构一致性进一步保证了tFNA的机械性能的可靠性和可重复性。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 3.2 核酸四面体的结构优势

### 3.2.2. 稳定性高

tFNA凭借其独特的刚性和结构稳定性，能够有效抵抗核酸酶的降解作用，这一特性对于它们在生物体内的应用至关重要。此外，tFNA还具有优异的血清稳定性，这意味着它们在与血清中的各种成分接触时，仍能保持其结构和功能不受破坏。

科学家研究发现，包括tFNA在内的DNA纳米结构表现出相对较好的血清稳定性。研究人员通过系统的实验设计，考察了影响DNA功能化纳米粒子血清稳定性的多个因素。他们将不同密度（8—138条/粒子）、长度（25—55个碱基）和结构（单链/双链）的DNA连接到金纳米粒子上，并用不同分子量（5-20 kDa）的聚乙二醇（PEG）进行修饰。这些纳米粒子被置于未稀释的小鼠血清中孵育0.5—8小时，然后通过凝胶电泳和密度扫描定量分析DNA的降解情况。结果显示，较高的DNA密度（如每粒子45条以上）、较短的DNA链长（25—35个碱基）、双链结构以及较厚的PEG修饰层（10-20 kDa）都能显著提高纳米粒子在血清中的稳定性。特别是，当DNA链长小于PEG层厚度时，降解速率可降至0.1-0.2 h<sup>-1</sup>。相比之下，游离DNA在血清中迅速降解。此外，研究还发现这些DNA功能化纳米粒子对核酸酶DNase I具有很强的抗性，需要500倍于生理浓度的DNase I才能观察到明显降解。通过分析降解产物，研究者也确定了两种主要的降解机制：3'端外切酶降解和蛋白质介导的全链脱附。这些发现证实了包含tFNA在内的DNA纳米结构在血清中具有好的稳定性，为其在生物医学领域的应用奠定了基础。

接着，研究人员针对tFNA对其稳定性进行了更为详尽的研究。研究人员设计了一系列精密的实验来评估tFNA在细胞质中的稳定性（图 32）。他们使用了一个三步Förster共振能量转移（FRET）染料级联系统来标记tFNA，包括Alexa Fluor 488（供体，AF488）、ATTO550（中继，AT550）和ATTO633（受体，AT633）。这种设计允许通过监测FRET效率来实时追踪tFNA的结构完整性。实验中，研究者将1 μM浓度的荧光标记tFNA直接微注射到多种细胞类型的细胞质中，注射体积约为15 fL。注射参数为500 hPa注射压力，0.30秒注射时间，45 hPa补偿压力。随后，他们使用共焦荧光显微镜在60分钟内连续监测细胞内的荧光信号。结果显示，tFNA在注射后至少1小时内保持了显著的FRET信号，表明其结构在此期间基本保持完整。具体来说，tFNA的归一化A/D比率（受体荧光强度/供体荧光强度）在1小时内几乎没有显著下降。相比之下，对照的十字形DNA结构（nanocrosshair）在前10分钟内就出现较为快速的降解，其结构半衰期仅为3—4分钟。

这种稳定性在多种细胞类型中都得到了验证，包括COS-1猴肾上皮细胞、人皮肤成纤维细胞、人星形胶质细胞、A549人肺腺癌细胞和HeLa人宫颈癌细胞。在所有这些细胞类型中，tFNA都表现出相似的稳定性曲线，这表明其稳定性是一种普遍现象，不受细胞类型的影响。

为了进一步了解tFNA的稳定性机制，研究者进行了体外核酸酶消化实验。他们选择了三种常见的核酸酶：DNase I（作用于非特异性双链DNA）、外切酶I（作用于单链DNA的3'端）和外切酶III（作用于双链DNA的3'端）。在实验中，tFNA和对照的十字形DNA结构分别与这些核酸酶孵育。酶浓度具体为：DNase I 2单位/mL、外切酶III 500单位/mL、外切酶I 50单位/mL。通过监测FRET信号的变化来评估DNA结构的降解程度。结果显示，tFNA对DNase I和外切酶I表现出显著的抗性，在这两种酶的作用下几乎没有观察到结构降解。然而，外切酶III能够导致tFNA的部分降解。相比之下，十字形DNA结构对所有三种核酶都表现出高度敏感性，迅速发生降解。

研究者还使用了核酶抑制剂芥子酸（Aurintricarboxylic acid, ATA）来进一步验证核酶在细胞质降解中的作用。当将不同浓度的ATA（从10 nM到10 μM）与十字形DNA结构共注射到细胞中时，观察到DNA结构的降解速率随着ATA浓度的增加而逐渐降低。这一结果强烈支持了核酶在细胞质DNA降解中的关键作用。

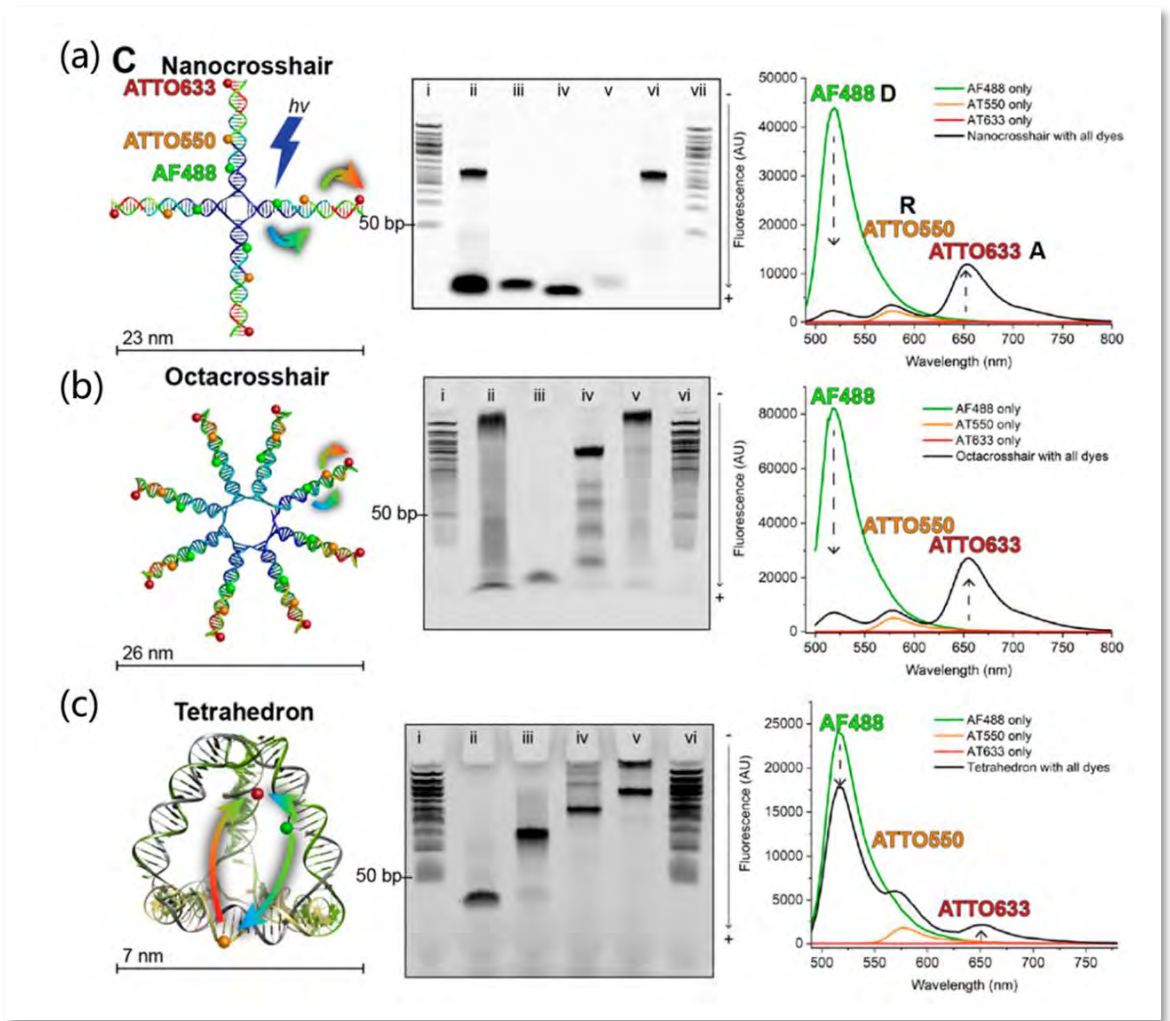
研究者对tFNA和十字形DNA结构进行了详细的结构比较，以解释它们稳定性的差异。tFNA由四条寡核苷酸链组成，形成一个封闭的四面体结构，边长约7 nm，总共包含126个碱基对。这种紧凑的三维结构具有较短的边长、固定的顶点和扭转刚性。相比之下，十字形DNA结构由四个或八个线性DNA“臂”组成，直径约23-26 nm，总共包含160—320个碱基对。这种开放的“树状”结构有多个自由暴露的双链末端。研究者推测，tFNA的紧凑结构可能使核酶难以接近和识别其潜在的切割位点。此外，tFNA的末端密度较低（平均每15个碱基对有一个3'或5'末端），而十字形结构的末端密度较高（平均每5个碱基对有一个末端）。较低的末端密度可能减少了核酶可能的作用位点，从而提高了结构的整体稳定性。

## 3.2 核酸四面体的结构优势

虽然这些主要实验关注了前60分钟的稳定性，研究者也进行了更长时间的观察。结果显示，tFNA的荧光信号和FRET效应可以持续观察到至少5小时。这表明tFNA在细胞质中具有长期稳定性。更为有趣的是，研究者还观察到十字形DNA结构在降解过程中，其荧光信号逐渐在细胞核中积累。这可能是由于较小的DNA片段 (< 5 nm) 能够通过核孔进入细胞核。相比之下，tFNA的荧光信号主要保持在细胞质中，这进一步证实了其结构的完整性。

此外的研究结果，表明tFNA在其他生理相关环境中也表现出较高的稳定性。例如，在细胞裂解液中，tFNA也能保持其结构完整性。这些结果进一步支持了tFNA作为潜在生物医学应用载体的优势。

图32: tFNA相比十字形DNA纳米结构的具有高的细胞质稳定性



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 3.2 核酸四面体的结构优势

### 3.2.3. 可编辑性

tFNA的可编辑性首先体现在其结构设计的灵活性上。研究者可以通过调整构成边的DNA序列长度来精确控制tFNA的尺寸，从而获得边长从5 nm到20 nm不等的结构。同时，通过在顶点引入柔性连接或额外碱基，可以调节tFNA的刚性和稳定性。更进一步，通过在特定位置引入G-四链体、i-motif等非经典DNA结构，研究者能够赋予tFNA特殊的物理化学性质和功能。这种结构上的可编辑性为tFNA的功能化奠定了坚实的基础。

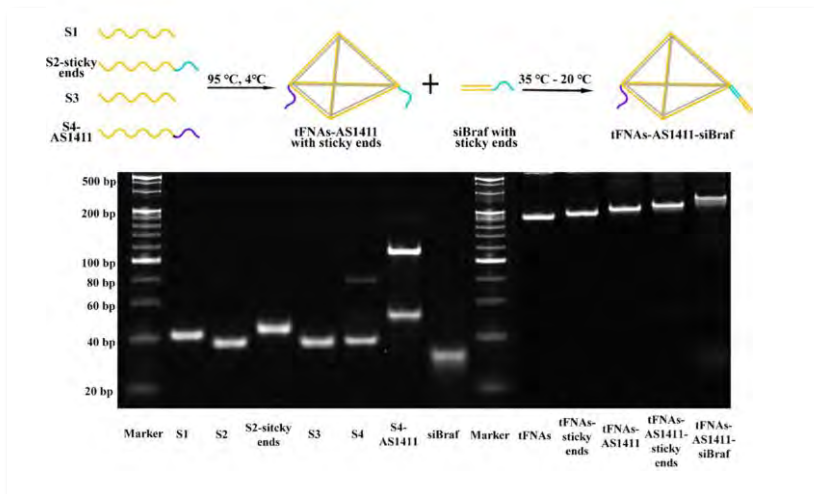
tFNA的可编辑性还体现在其提供了多个可修饰位点，使其通过静电吸附、序列延伸、序列互补等多种方式与小分子物质、多肽、核酸等连接，能够整合多种功能。四个顶点可用于连接大分子，如靶向配体或蛋白质；六条边可用于连接小分子药物或核酸类分子；内部空腔可用于包裹疏水性药物或纳米粒子；表面则可通过静电或疏水相互作用吸附各种分子。这种多位点修饰能力使tFNA能够同时整合诊断、治疗和成像等多种功能，实现协同效应。例如，研究者成功地在同一个顶点连接了叶酸受体靶向配体，在另一个顶点连接了荧光染料，实现了肿瘤细胞的靶向成像。

tFNA的修饰过程具有高度的可控性和精确性。通过调节反应物的摩尔比，可以精确控制修饰分子的数量。利用DNA的序列特异性，可以实现功能分子在tFNA上的定点修饰。通过设计互补序列，研究者能够将siRNA精确定位到特定边上。此外，通过调节修饰基团的分布，可以在tFNA表面创造修饰密度梯度，这对于调控细胞相互作用至关重要。利用可逆的DNA杂交或化学反应，还可以实现tFNA表面修饰的动态调控，为构建智能响应系统提供了可能。

tFNA的修饰通常可以通过简单高效的方法实现（图 33）。许多功能分子可以在tFNA自组装过程中直接整合，无需复杂的后续修饰步骤。通过预先功能化的DNA链，可以实现tFNA的模块化组装，便于大规模生产和质量控制。利用DNA连接酶等酶促反应，可以在温和条件下实现tFNA的功能化修饰，适合生物活性分子的连接。点击化学方法，如铜催化的叠氮-炔烃环加成反应，也被广泛应用于高效地将各种功能分子连接到tFNA上。

tFNA可以整合多种类型的功能分子，实现多样化的应用。这包括siRNA、miRNA等核酸类分子用于基因调控；阿霉素、紫杉醇等小分子药物用于化学治疗；抗体、生长因子等蛋白质和肽用于靶向治疗和组织工程；金纳米粒子、磁性纳米粒子等无机纳米粒子用于成像和热疗；以及光敏剂、造影剂和各种酶用于光动力治疗、磁共振成像和生物传感等。这种多样化的功能整合使tFNA成为一个多功能纳米平台，能够满足诊断、治疗、成像等多方面的需求。

图33：利用tFNA的可编辑性实现siRNA修饰



通过巧妙的设计，tFNA还可以实现对各种刺激的智能响应。研究者利用i-motif结构或酸敏感化学键，实现了酸性环境下的药物释放；通过DNA双链解链温度的调控，实现了热敏药物释放；引入光敏基团，实现了光控药物释放或结构转变；设计特定酶识别序列，实现了酶触发的药物释放。更复杂的设计还包括利用二硫键实现还原环境下的结构解离，以及整合磁性纳米粒子实现磁场诱导的药物释放或热疗。这种智能响应性设计使tFNA能够根据特定的生理或病理环境精确调控其功能，提高治疗效果和降低副作用。

## 3.2 核酸四面体的结构优势

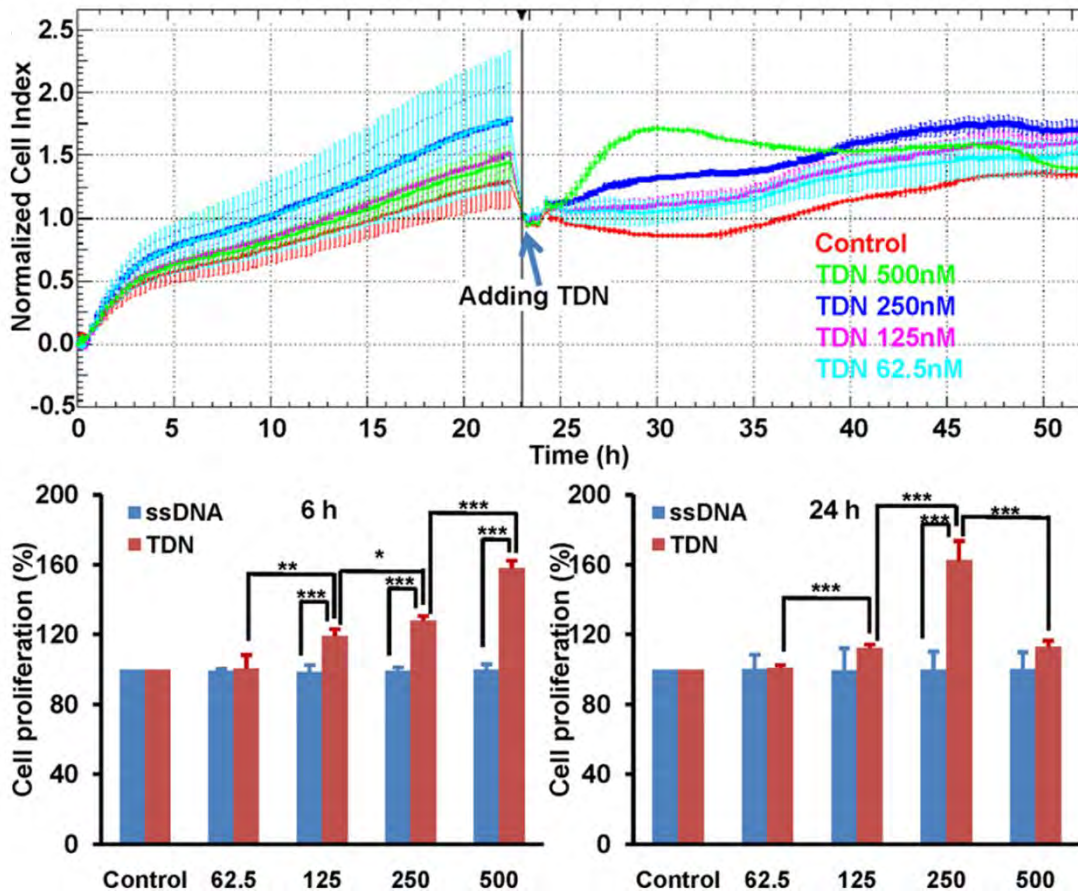
### 3.2.4. 良好的生物相容性与安全性

作为一种天然的遗传物质，tFNA表现出优异的生物相容性与安全性。可以从以下几个角度来阐述tFNA的这一特点。

#### ■ tFNA对细胞的低毒性是其生物相容性的重要体现

科学家研究详细评估了tFNA对小鼠L929成纤维细胞的影响（图 34）。他们使用实时细胞分析系统（RTCA）和CCK-8 Assay连续监测了细胞在不同浓度tFNA（62.5至500 nM）处理下的增殖情况。结果显示，在这个浓度范围内，tFNA不仅没有抑制细胞生长，反而呈浓度依赖性地促进了细胞增殖。特别是在250 nM浓度下，tFNA处理24小时后的细胞活力比对照组高出约50%。这一结果不仅证明了tFNA的低毒性，还揭示了其潜在的促细胞生长作用。

图34: tFNA对细胞的良好生物相容性



研究人员进一步将这一研究拓展到原代软骨细胞。他们发现，250 nM的tFNA同样能显著促进软骨细胞的增殖，且不会导致细胞形态的异常改变。通过流式细胞术分析发现，tFNA处理组的S期细胞比例显著增加，而G1期细胞比例降低，表明tFNA能够促进细胞周期的进程而不引起细胞周期阻滞。这些细节化的实验结果强有力地支持了tFNA在多种细胞类型中的良好生物相容性。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 3.2 核酸四面体的结构优势

### ■ tFNA的高效细胞摄取是其另一个重要特性

研究人员对tFNA在人角膜上皮细胞（HCECs）中的摄取进行了深入研究。他们使用荧光标记的tFNA和单链DNA（ssDNA）对比分析了细胞摄取效率。通过共聚焦显微镜观察发现，tFNA在细胞质中呈现均匀分布的强荧光信号，而ssDNA处理组几乎看不到荧光。流式细胞术定量分析显示，6小时后tFNA的细胞摄取率达到41.1%，而ssDNA仅为4.3%。更重要的是，研究人员还探讨了tFNA的摄取机制。通过使用不同的内吞抑制剂，他们发现小窝蛋白介导的内吞是tFNA进入细胞的主要途径。这种摄取机制相对温和，不会对细胞膜造成明显损伤，这也解释了为什么高效摄取的tFNA并未引起明显的细胞毒性。

### ■ tFNA在细胞内的稳定性是其生物相容性的另一个重要方面

在关于tFNA的稳定性论述中，我们知道与裸露的DNA相比，tFNA的三维结构使其能够更好地抵抗细胞内核酸酶的降解。这种稳定性不仅有利于tFNA发挥持续的生物学效应，也减少了DNA降解产物可能引起的细胞毒性。

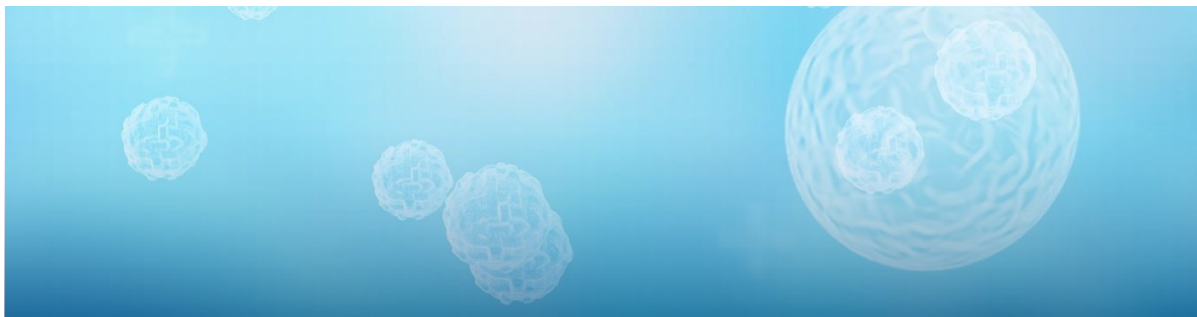
tFNA能够与细胞内的多种生物分子相互作用而不引起明显的负面影响。多项研究表明，tFNA可以调节细胞内的多条信号通路，如Wnt/ $\beta$ -catenin通路和Notch通路，从而影响细胞的增殖、分化等行为。这种调节作用通常是温和的，不会导致细胞功能的剧烈改变或异常。例如，在软骨细胞中，tFNA通过下调Notch信号通路来维持细胞的正常表型，这种作用更像是一种“微调”而非“重塑”。

在兔角膜碱烧伤模型中科学家评估了tFNA的体内生物相容性。他们连续14天每天局部滴加250 nM的tFNA，不仅没有观察到任何毒性反应或炎症加重，反而显著促进了角膜的愈合。组织学分析显示，tFNA处理组的角膜上皮再生更快，基质层水肿更轻，胶原纤维排列更有序。这些结果强有力地支持了tFNA在复杂生理环境中的良好生物相容性。此外，研究人员将修饰了血管生成适配体的tFNA应用于体内血管生成研究。他们在小鼠Matrigel栓塞模型中连续7天注射tFNA，结果显示tFNA不仅安全无毒，还能显著促进新生血管的形成。这进一步证实了tFNA在体内应用的安全性和功能性。

### ■ tFNA的可编辑性为进一步优化其生物相容性提供了可能

例如，科学家通过在tFNA表面修饰AS1411适配体，不仅提高了其对特定细胞的靶向性，还提高了细胞摄取效率。这种修饰不仅没有降低tFNA的生物相容性，反而通过提高靶向性降低了对非靶细胞的影响。另一个例子是科学家通过调整tFNA的大小和表面电荷，优化了其在不同pH环境下的稳定性和细胞摄取效率。这种精细调控使得tFNA能够更好地适应不同的生理环境，从而提高其生物相容性和功能性。

这些详细的研究结果从多个层面证实了tFNA的优异生物相容性与安全性。从分子水平的核酶抗性，到细胞水平的低毒性和高摄取效率，再到组织和体内水平的安全性和功能性，tFNA都表现出了令人印象深刻的生物相容性。这种全方位的生物相容性使tFNA成为一种极具潜力的生物医学材料，为药物递送、基因调控、组织工程等领域提供了新的可能性。



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析



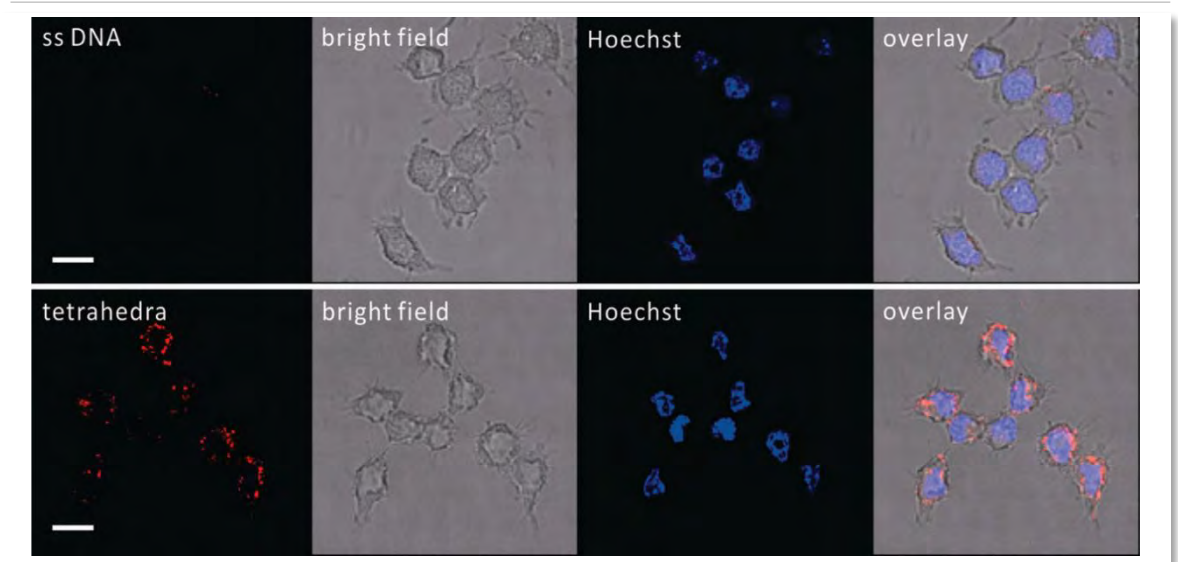
## 3.2 核酸四面体的结构优势

### 3.2.5. 易进入细胞

tFNA的一个很突出特点就是易通过细胞膜，这一特性使其在生物医学应用中具有显著优势。例如，虽然哺乳动物细胞通常对外源DNA的摄取效率较低，但tFNA却能在没有病毒载体或转染试剂的情况下高效进入细胞。这种独特的性质可能会使得tFNA在生物医学研究和临床应用中具有极大的潜力。

研究已经表明，tFNA高效进入细胞而无需转染试剂。tFNA能够高效地进入多种哺乳动物细胞，这一特性使其在生物医学应用中具有显著优势。科学家们使用流式细胞术定量分析了Cy3标记的tFNA在RAW264.7巨噬细胞中的摄取情况。结果显示，在100 nM浓度下孵育2小时后，约41%的细胞成功摄取了tFNA。为了突出tFNA的优势，研究人员同时进行了单链DNA的对照实验，发现单链DNA在相同条件下的细胞摄取率仅为4.3%（图35）。

图35: tFNA相比双链DNA可以更高效地进入RAW264.7巨噬细胞



更加值得注意的是，其他研究人员的研究进一步扩展了这一发现。科学家们不仅研究了HeLa细胞，还包括了人角膜上皮细胞等多种细胞类型。通过共聚焦显微镜观察，他们发现tFNA在细胞质中呈现均匀分布的强荧光信号，而单链DNA处理组几乎看不到荧光。这种高效的细胞摄取特性不仅限于特定细胞类型，而是在多种细胞中都有体现，这大大拓宽了tFNA的潜在应用范围。

研究者们还探讨了tFNA高效进入细胞的可能原因。Walsh等人发现，在没有任何转染试剂的情况下，tFNA能够有效地进入人胚肾细胞，同时提出tFNA的三维结构和相对较小的尺寸（约6 nm）可能是其易于进入细胞的关键因素。这种结构使得tFNA能够更容易地与细胞膜相互作用，并通过内吞作用进入细胞。

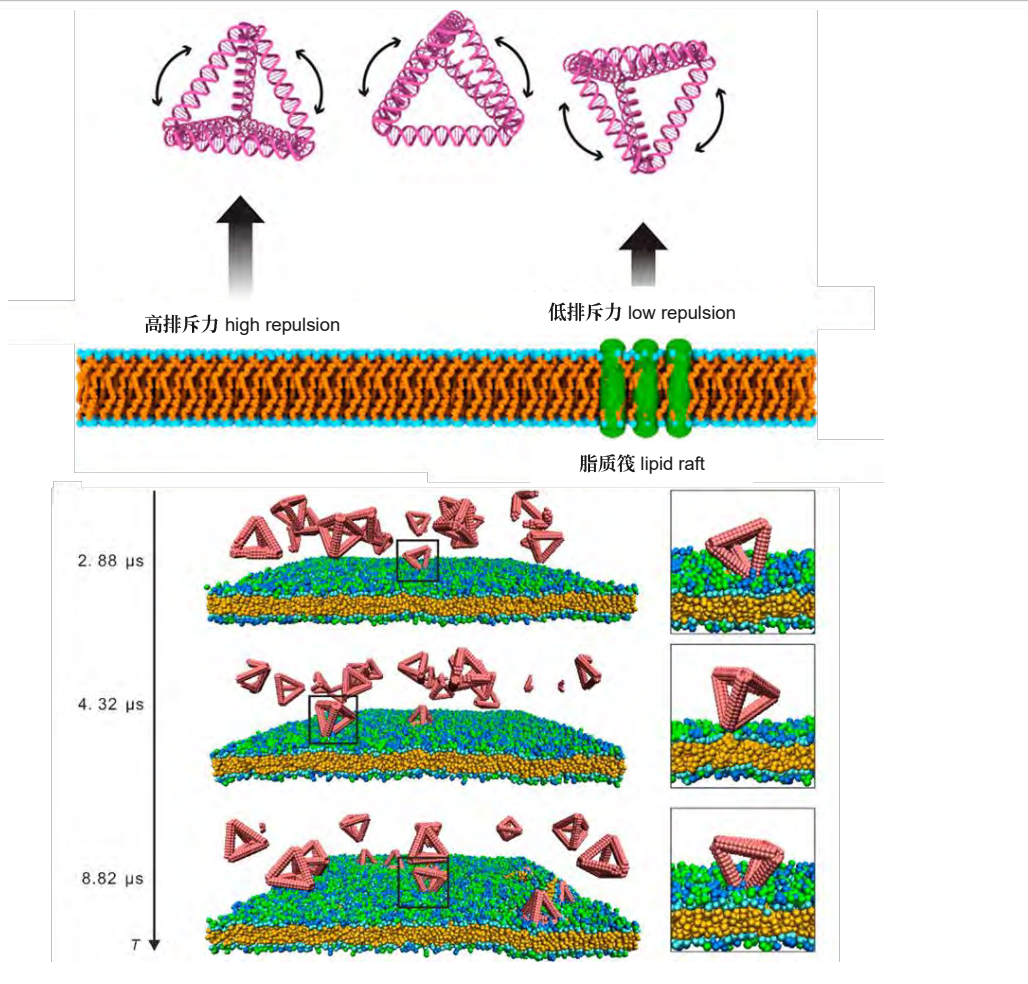
tFNA通过脂筏/小窝蛋白介导的内吞途径进入细胞。tFNA的细胞摄取机制主要通过脂筏/小窝蛋白介导的内吞途径完成，这一点已经被多项研究通过不同方法证实。2018年发表在ACS Central Science杂志的研究成果提供了详细和直接的证据。研究人员首先使用了不同的内吞抑制剂来研究tFNA的摄取机制。结果显示，使用甲基-β-环糊精（MβCD，一种脂筏/小窝蛋白介导内吞的抑制剂）处理细胞后，tFNA的细胞摄取效率降低了约54%。相比之下，氯丙嗪（CPZ，一种网格蛋白介导内吞的抑制剂）对tFNA的细胞摄取几乎没有影响。这一结果强烈暗示了脂筏/小窝蛋白介导的内吞途径在tFNA细胞摄取中的关键作用。更为直接的证据来自实时共聚焦成像研究。通过基因工程方法，在HeLa细胞中表达了绿色荧光蛋白标记的小窝蛋白1（GFP-Cav1）。他们观察到tFNA与GFP-Cav1在细胞内具有高度的共定位关系。更重要的是，他们通过时间分辨的荧光强度分析，发现tFNA和GFP-Cav1的荧光强度呈现同步波动，这强烈暗示了tFNA是通过小窝蛋白形成的内吞小泡进入细胞。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 3.2 核酸四面体的结构优势

其他科学家的研究进一步支持了这一结论。他们使用了单粒子追踪技术，实时观察了tFNA在细胞膜上的运动轨迹。他们发现tFNA在细胞膜上的运动模式与已知的小窝蛋白介导的内吞过程非常相似，进一步证实了这一内吞机制。

图36: tFNA相比双链DNA可以更高效地进入RAW264.7巨噬细胞



tFNA表现出独特的“角攻击”模式。科学家通过分子动力学模拟和单分子追踪实验，详细揭示了tFNA接近和进入细胞的过程（图36）。在模拟研究中，他们构建了一个包含带负电脂质和小窝蛋白的细胞膜模型，并模拟了16个tFNA结构与膜的相互作用。结果显示，大多数tFNA在接近细胞膜的过程中会旋转，使得其顶角朝向膜表面。具体来说，他们分析了40次独立的模拟，发现约92.5%的tFNA是以小于30°的攻击角度接近细胞膜的。为了验证这一模拟结果，研究人员设计了一个巧妙的对照实验。他们合成了tFNA的二聚体(tFNA-20d)，这种结构由于连接DNA的存在，其旋转自由度受到限制。实验结果显示，tFNA-20d的细胞摄取效率比单体tFNA低约30%。通过全内反射荧光显微镜(TIRF)的单粒子追踪，他们观察到tFNA-20d进入细胞的速度确实比单体tFNA慢，这与模拟结果一致。

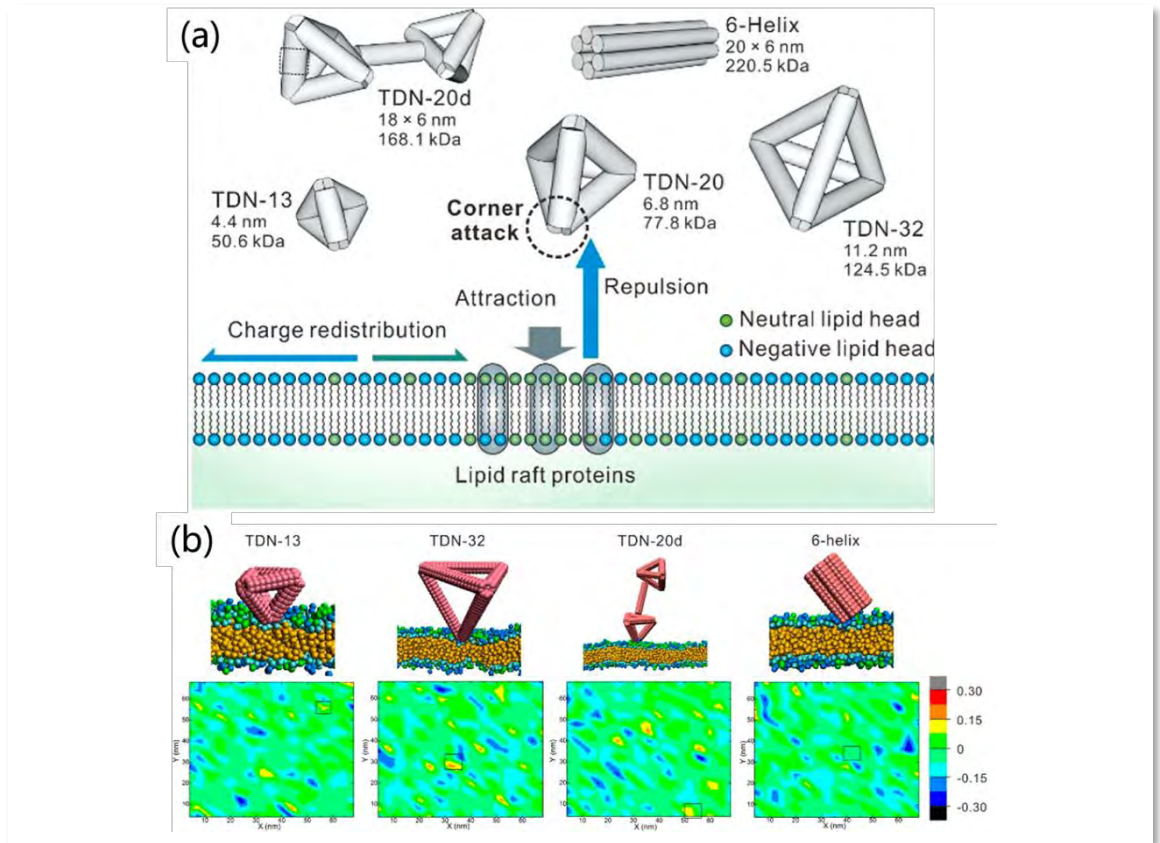
这种“角攻击”模式的发现不仅解释了为什么带负电的tFNA能够有效穿透同样带负电的细胞膜，也为设计更高效的DNA纳米结构提供了重要指导。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 3.2 核酸四面体的结构优势

研究还发现tFNA的接近会引起细胞膜电荷的局部重分布。通过分子动力学模拟研究，研究人员观察到tFNA倾向于攻击膜上带轻微负电荷甚至电荷反转的“热点”区域（图 37）。当tFNA接近这些区域时，会导致膜上的电荷发生重新分布。具体来说，带负电的脂质分子会被推开，而带正电的分子会被吸引到tFNA附近。这种电荷重分布现象类似于物理学中的“像电荷”效应，可能是tFNA克服静电排斥进入细胞的关键机制之一。进一步的共聚焦荧光成像实验显示，荧光标记的tFNA在细胞膜上的分布呈现出明显的斑点状，而不是均匀分布。这一观察结果与模拟中预测的“热点”攻击模式一致。

图37: tFNA进入细胞的示意图及攻击细胞膜的图像和着陆点模拟



研究还揭示了细胞生理状态对tFNA摄取效率的显著影响。科学家系统地研究了处于不同细胞周期阶段和自噬状态的细胞对tFNA的摄取情况。具体来说，他们使用流式细胞术分析了同步化的HeLa细胞在G0/G1期、S期和G2/M期对tFNA的摄取效率。结果显示，S期的细胞对tFNA的摄取量约为G0/G1期细胞的5倍。这一显著差异可能源于细胞周期不同阶段细胞膜的流动性和电荷分布的变化。此外，他们还研究了西罗莫司诱导的自噬状态对tFNA摄取的影响。结果显示，自噬状态的细胞对tFNA的摄取效率也有显著变化。进一步的模拟研究发现，改变模拟中膜的流动性和电荷分布确实能够影响tFNA的摄取效率，这与实验观察结果一致。

这些发现不仅深化了我们对tFNA细胞摄取机制的理解，也为根据细胞状态优化tFNA的递送策略提供了重要依据。例如，在设计针对快速分裂癌细胞的tFNA递送系统时，可以考虑利用S期细胞对tFNA的高摄取效率。

总的来说，这些详细的研究结果不仅揭示了tFNA细胞摄取的复杂机制，也为设计更高效的DNA纳米结构递送系统提供了重要指导。未来的研究可能需要进一步探索这些机制在不同细胞类型和生理条件下的普适性，以及如何利用这些知识来优化tFNA的设计和应用。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

The background features a blue-to-purple gradient with several molecular models. At the top, there are ball-and-stick models of molecules. On the right side, there is a large, semi-transparent globe composed of a grid of dots, with some dots highlighted in a lighter blue. A white geometric shape, resembling a diamond or a stylized 'D', is overlaid on the center of the page, containing the text.

## 第四章

04

# 核酸四面体的 应用价值

## 4.1 基于结构的细胞生物学调控的第一代tFNA

核酸四面体 (tFNA) 作为一种新兴的生物材料, 在生物医学领域展现出广泛的应用价值。本章将系统地探讨tFNA的多方面应用, 从基于结构的细胞生物学调控 (“第一代tFNA”) 到作为药物和基因递送载体 (“第二代tFNA”), 再到皮肤和软组织、骨组织、神经系统、免疫系统以及抗菌治疗中的具体应用。通过这些多样化的应用实例, 我们将全面展示tFNA在生物医学领域的巨大潜力和前景。每个应用领域都体现了tFNA独特的结构特性和功能优势, 为解决当前医学难题提供了新的思路和方法。本章的内容涵盖了tFNA研究的最新进展, 旨在为读者提供一个全面的视角, 以理解tFNA如何在不同的生物医学领域中发挥作用。

核酸四面体 (tFNA) 作为一种新兴的生物分子, 凭借其独特的结构特性和生物相容性, 在细胞生物学调控领域展现出卓越的应用价值。这种基于结构的细胞生物学调控, 代表了tFNA应用的第一代发展阶段, 通常称之为“第一代tFNA”, 也是其在生物医学领域广泛应用的基础。第一代tFNA 依赖于其结构特性赋予了它多方面的生物学功能。优势不仅限于其出色的载荷能力, 还体现在三个主要方面, 使其在生物医学研究领域特别具有吸引力。



**首先, 尽管DNA本质上带有多重负电荷, 但tFNA的典型空间结构使其能够穿透细胞质膜**

单粒子追踪技术已经证实, Cy3标记的tFNA通过依赖于胞吞蛋白的方式被内吞, 随后在溶酶体中降解。这种无需转染试剂就能轻易进入细胞的特性, 不仅简化了应用过程, 也为携带带负电荷的核酸 (如tDNA和tRNA) 和中性电荷的肽核酸 (PNA) 穿越细胞膜提供了可能。



**其次, tFNA在生物环境中表现出优异的稳定性**

虽然DNA纳米结构的稳定性受到浓度、细胞内外基质中核酶活性和先天免疫反应的影响, 但研究表明tFNA在活细胞中的结构稳定性可持续长达48小时。这种持久的稳定性满足了其作为递送载体的基本要求, 为tFNA在复杂生物系统中的应用提供了可能。



**第三, tFNA展现出优秀的生物相容性**

在低浓度下 (通常<250 nM), tFNA对各种类型的活细胞 (如RAW264.7细胞和L929成纤维细胞样细胞) 没有显示出明显的细胞毒性或不良影响。更值得注意的是, 最新研究发现, 相对较高浓度的tFNA能够调节细胞生物学行为, 如促进细胞增殖和迁移, 这进一步证实了tFNA的优异生物相容性。

tFNA的这些特性使其能够全面调控细胞的基本生物学过程。在细胞增殖方面, tFNA能够显著促进多种类型细胞的增殖, 包括干细胞和分化细胞。细胞迁移方面, tFNA展现出促进多种细胞类型迁移的能力, 这对于伤口愈合和组织工程具有重要意义。在细胞分化方面, tFNA表现出引导干细胞向特定方向分化的能力, 特别是在神经系统中。此外, tFNA还展现出显著的抗凋亡特性。通过调节氧化应激和炎症反应, tFNA能够保护细胞免受多种损伤因素的影响, 维持细胞的生存和功能。在分子水平上, tFNA通过调节关键信号通路 (如Wnt/ $\beta$ -catenin和STAT通路) 来实现其生物学效应, 以一种全面且协调的方式影响细胞的整体行为。tFNA在免疫系统中也展现出独特的调节作用, 影响细胞因子的分泌和免疫细胞的分化。这种免疫调节能力为开发新型免疫治疗策略提供了可能。

因此, tFNA通过其独特的结构特性, 展现出全面调控细胞生物学行为的能力 (“第一代tFNA”)。这种基于结构的调控涵盖了细胞增殖、迁移、分化、凋亡和免疫反应等多个方面, 为生物医学研究和临床应用开辟了新的视角。tFNA的易于细胞摄取、良好的稳定性和优异的生物相容性, 使其成为一个多功能的生物学工具, 能够同时影响多个细胞过程, 进而实现对复杂生物系统的精细调控。

来源: 公开资料, 文献检索, 沙利文分析

## 4.2 作为载体的第二代tFNA

### 核酸四面体在多个方面显示出显著优势

将核酸四面体（tFNA）用作药物和传递系统的应用被称为“第二代tFNA”。相较于传统载体如病毒载体、脂质纳米粒等，tFNA凭借其独特的结构和性质，在多个方面显示出显著优势。首先，tFNA具有优异的安全性框架。与病毒载体相比，tFNA不存在插入突变和免疫原性等安全隐患，这一特性使其在临床应用中更具吸引力。其次，tFNA展现出卓越的递送效率，可达99%以上，远超其他载体系统。这种高效的递送能力不仅可以提高治疗效果，还可能降低所需的给药剂量，从而减少潜在的副作用。tFNA的尺寸优势也不容忽视。其约6nm的粒径使其更容易穿透各种生物屏障，如细胞膜和血脑屏障等，这对于靶向递送和提高药物的生物利用度至关重要。此外，tFNA展现出良好的生物相容性和可控的生物降解性，这些特性进一步增强了其作为药物递送系统的适用性。

### 核酸四面体具有出色的应用多样性

作为多功能的药物和基因传递平台，tFNA具有出色的应用多样性。在核酸类药物的递送方面，tFNA可以通过序列延伸或杂交等方式，灵活地结合DNA、RNA、PNA等多种核酸分子。这种方法不仅可以用于基因治疗，还可用于siRNA递送和基因编辑等前沿领域。对于小分子药物，tFNA的螺旋结构提供了多种结合选择。通过插入、静电相互作用或沟槽结合等机制，各种抗癌药物、中药单体、金属复合物甚至荧光分子都可以被有效装载。这种多样化的装载能力为开发复合治疗策略提供了可能。

### 核酸四面体作为载体的其他优势

蛋白质和多肽类药物的递送一直是一个挑战，但tFNA提供了一种新的解决方案。带正电荷的蛋白质或多肽可以通过静电作用稳定地结合到带负电荷的tFNA上，这为蛋白质药物的递送开辟了新的途径。

此外，tFNA表面丰富的修饰位点允许进行多种功能化，如添加靶向分子以提高特异性，或结合成像探针实现诊疗一体化。

tFNA作为载体还具有提高药物溶解度、减少脱靶效应、增加细胞内积累等优点。这些特性不仅可以提高药物的治疗效率，还可能降低给药频率，提高患者依从性。

然而，需要注意的是，药物的结合可能会影响tFNA的结构稳定性。例如，研究发现阿霉素的插入可能导致DNA从B型向A型构象的部分转变。因此，在设计tFNA载体时，需要仔细考虑药物结合对结构的影响，并优化设计以保持载体的稳定性和功能。

### 核酸四面体的巨大潜力和广阔的应用前景

从已有的研究来看，tFNA作为新一代药物递送系统展现出巨大潜力和广阔的应用前景（“第二代tFNA”）。其多功能性、高效性和安全性使其成为解决当前药物递送挑战的极具前景的候选者。目前的研究正在积极开展“第三代tFNA”的研发，旨在通过多步组装工艺实现刺激响应和精准药物释放，也被称之为“智能DNA纳米机器人”。这种进阶技术有望进一步提升tFNA在药物递送中的应用效果，推动其在临床治疗中的广泛应用。

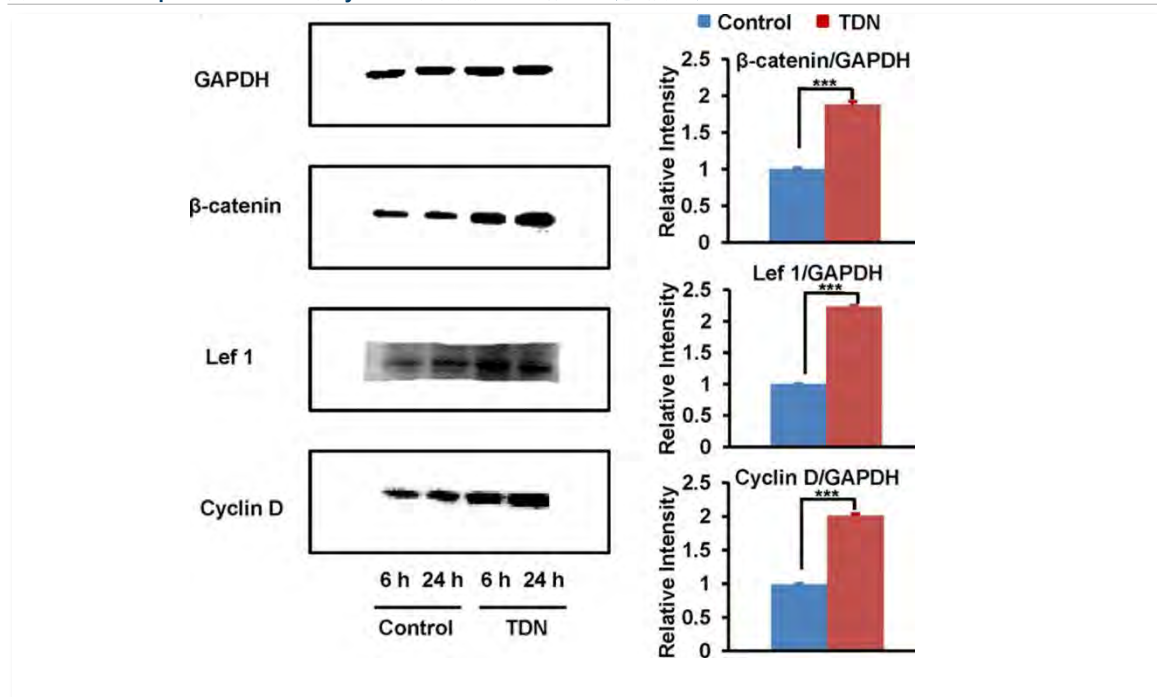
## 4.3 在皮肤和软组织中的应用

核酸四面体 (tFNA) 在皮肤和软组织修复领域展现出巨大潜力, 其应用范围涵盖了细胞增殖、迁移、伤口愈合及抗衰老等多个方面。研究表明, tFNA通过多种机制促进皮肤和软组织的修复与再生, 为tFNA在皮肤和软组织领域的应用和相关疾病的治疗提供了新的思路。

### 4.3.1 促进细胞增殖与迁移作用

研究发现tFNA展现出显著促进细胞增殖的能力, 这一过程涉及多层次的分子机制调控, 体现了tFNA作为新型生物材料的独特优势。首先, tFNA通过激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路, 触发了一系列下游事件: 上调了 $\beta$ -catenin、Lef 1和cyclin D等关键蛋白的表达, 这些蛋白质协同作用, 推动细胞周期进程。 $\beta$ -catenin作为核心信号分子, 其在细胞质中的积累和随后向细胞核的转运, 与Lef-1形成转录复合物, 进而激活包括cyclin D在内的多个目标基因, 共同调控细胞增殖。同时, tFNA显著上调了CDK1L基因的表达, 该基因编码的蛋白质类似于细胞周期蛋白依赖性激酶, 在调控细胞周期G1/S转换中发挥关键作用, 进一步加速了细胞分裂过程。

图38: tFNA促进 $\beta$ -catenin、Lef 1和cyclin D等与细胞增殖线管的关键蛋白的表达



流式细胞术分析进一步证实, tFNA处理导致细胞周期分布发生显著变化, 特别是S期细胞比例的增加, 同时G1期和G2期细胞比例降低, 这一现象直接印证了tFNA促进DNA复制和细胞分裂的作用。值得注意的是, 这种细胞周期分布的改变是浓度依赖性的, 在250 nM tFNA处理24小时后达到最显著效果, 揭示了tFNA促进细胞增殖的最佳剂量和时间窗口。

更为重要的是, tFNA还表现出逆转Wnt/ $\beta$ -catenin通路特异性抑制剂DKK1作用的能力。在存在DKK1的情况下, 添加tFNA不仅恢复了 $\beta$ -catenin、Lef 1和cyclin D的表达水平, 还显著提高了细胞增殖率。这一发现不仅强化了tFNA在Wnt/ $\beta$ -catenin通路中的关键作用, 也暗示了其可能通过独特的机制调控细胞增殖。

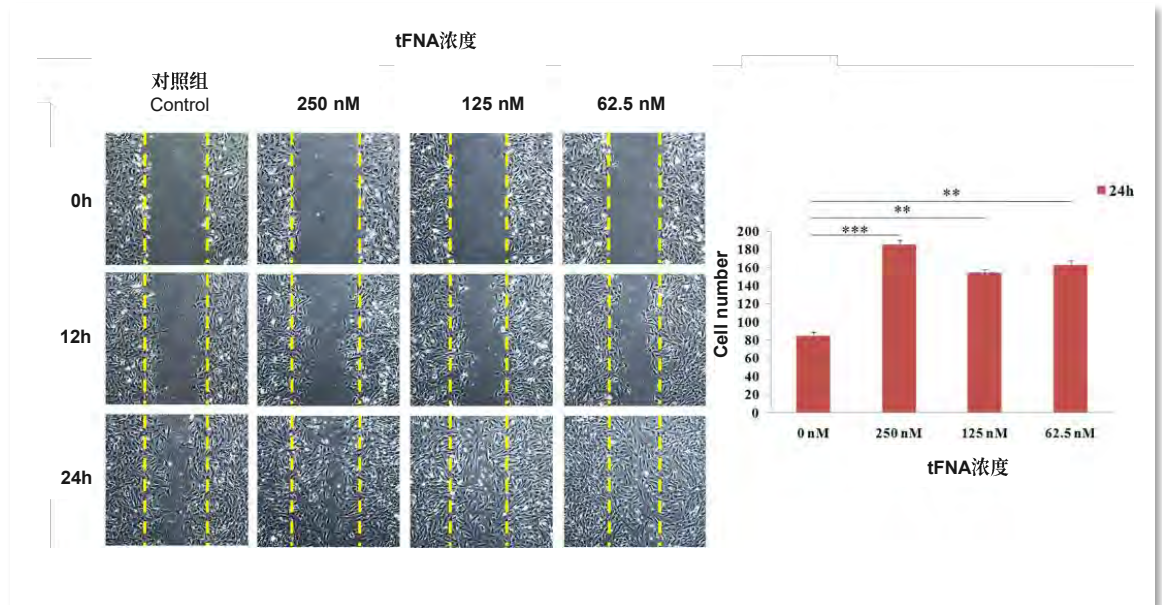
来源: 公开资料, 文献检索, 沙利文分析

## 4.3 在皮肤和软组织中的应用

此外，tFNA促进细胞增殖的能力还体现在其对不同类型细胞的广泛作用上。研究表明，tFNA不仅能促进成纤维细胞的增殖，还能增强角膜上皮细胞、人脐静脉内皮细胞、脂肪源性干细胞等多种细胞类型的增殖能力。例如，tFNA在表观遗传学层面增强了脂肪源性干细胞（ASCs）的增殖并抑制细胞凋亡。具体来讲，tFNA处理导致ASCs中Dlg3基因启动子区域的DNA高甲基化，从而抑制了Dlg3基因的表达。Dlg3是一个负调控细胞增殖的基因，其表达下调导致细胞周期调控蛋白cyclinD1的上调。cyclinD1作为G1/S期转换的关键调控因子，其表达增加促进了细胞周期的进程。同时，Dlg3表达的下调还降低了促凋亡蛋白Bax和Caspase3的水平，上调了抗凋亡蛋白Bcl2的表达，从而抑制了细胞凋亡。这种对细胞周期和凋亡通路的双重调控，最终导致ASCs增殖能力的显著提高。

此外，tFNA还能显著增强大鼠脂肪源性干细胞的迁移能力。这一过程涉及复杂的分子调控网络。研究发现，tFNA处理导致长链非编码RNA XLOC 010623的表达下调，这进而引发了一系列下游效应。XLOC 010623的下调解除了对TIAM1（T淋巴瘤侵袭和转移诱导蛋白1）的抑制，使TIAM1表达上调。TIAM1作为RAC1的激活因子，促进了RAC1的活化。同时，tFNA还显著上调了RHOA、ROCK2和vinculin的mRNA和蛋白表达水平。RAC1的活化和RHOA/ROCK2信号通路的激活共同调控细胞骨架重组、细胞极性建立和黏着斑形成，这些过程对细胞迁移至关重要。此外，黏着斑蛋白（vinculin）作为细胞黏着斑的关键组分，其上调进一步增强了细胞与细胞外基质的相互作用，促进了细胞迁移。这种对多个迁移相关信号通路的协同调控，最终导致ASCs迁移能力的显著提高。

图39: tFNA促进细胞迁移



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析



## 4.3 在皮肤和软组织中的应用

### 4.3.2 抗炎和促进组织修复作用

基于tFNA这种广谱的促增殖作用使得tFNA在组织修复、伤口愈合等多个生物医学领域具有广阔的应用前景。已有诸多研究证实tFNA在抗炎和促进组织修复方面表现出色。

在探究tFNA在促进上皮伤口愈合的研究中，兔角膜碱烧伤模型的实验结果提供了关键的体内证据。首先体外研究显示，250 nmol/L的tFNA处理能增强角膜上皮细胞的迁移和增殖。研究者接着建立了标准化的兔角膜碱烧伤模型。通过在角膜中央放置浸有1M NaOH溶液的滤纸20秒，造成了统一的角膜损伤。实验组接受250 nmol/L tFNA眼药水治疗，而对照组则使用生理盐水，每天给药5次。这种设计确保了实验的可靠性和可比性。

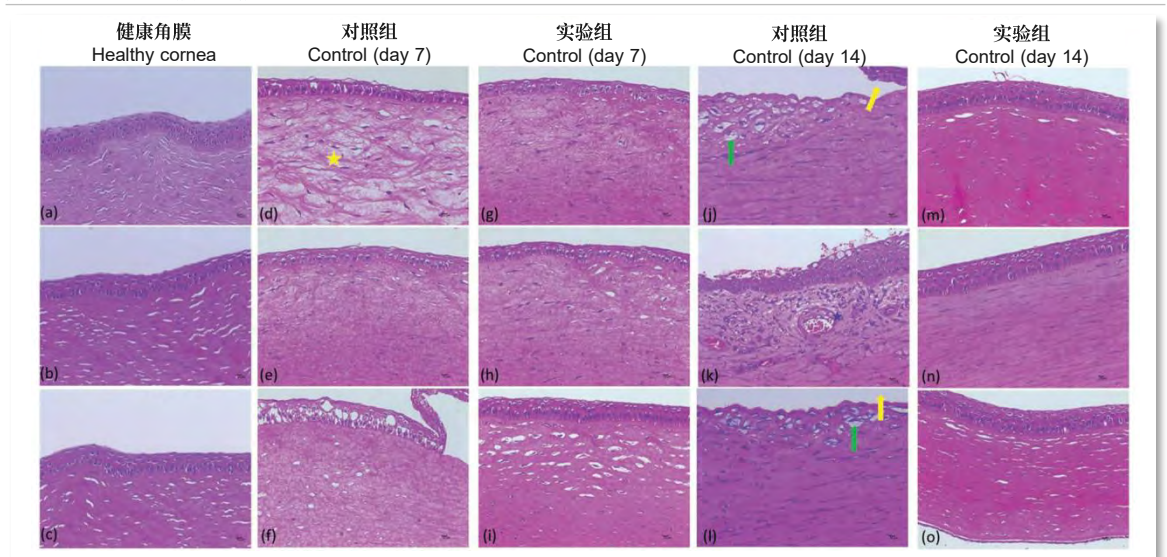
在为期14天的观察期内，tFNA处理组在多个方面表现出显著的治疗优势（图 40）。在角膜透明度恢复方面，临床评估显示，tFNA处理组的角膜透明度恢复速度明显快于对照组：

- 从第7天开始，实验组角膜中央的白色病变区域开始消退，而对照组则变化不明显。这一现象表明tFNA能有效促进角膜组织的修复，减少瘢痕形成；
- 在上皮化速度方面，通过荧光素钠染色观察，研究者发现tFNA处理组的角膜上皮缺损面积减少速度明显快于对照组。这一结果直接证明了tFNA能加速角膜上皮的再生和修复过程；
- 在角膜混浊程度方面，研究采用了5级评分系统来评估角膜混浊程度。结果显示，tFNA处理组的角膜混浊评分显著低于对照组，这意味着tFNA不仅加速了愈合，还改善了愈合质量，有助于维持角膜的光学特性。

同时H&E染色和Masson三色染色的组织学分析提供了更深入的证据。在治疗14天后，tFNA处理组的角膜上皮结构趋于完整，基质层水肿减轻，胶原纤维排列更加有序。相比之下，对照组仍存在大面积上皮脱落、炎症渗出和新生血管形成等问题。这些微观层面的观察进一步证实了tFNA在促进组织修复和减少炎症反应方面的优势。另外值得注意的是，tFNA处理组表现出较少的新生血管形成。角膜的无血管性对于维持其透明度至关重要，因此这一发现暗示tFNA可能具有抑制炎症和血管生成的潜在作用。

此外，Masson染色结果显示，tFNA处理组的胶原纤维分布更接近正常角膜，而对照组则出现了部分肌纤维化和沉积物。机制研究表明，可能与通过激活P38和ERK1/2信号通路有关。

图40: tFNA促进角膜组织修复



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

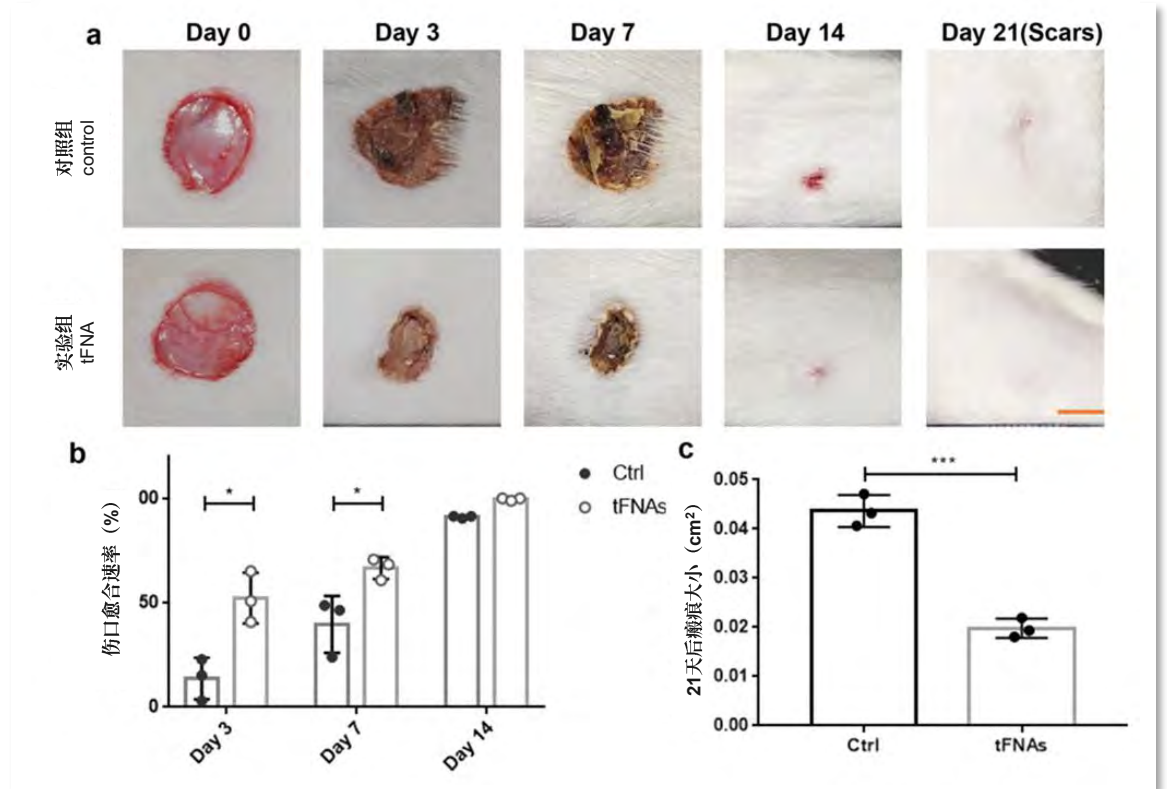
## 4.3 在皮肤和软组织中的应用

在另外一项关于tFNA促进皮肤伤口愈合的研究中，研究者通过大鼠皮肤全层伤口模型进行了为期21天的观察。结果显示，tFNA处理组的伤口愈合速度明显快于对照组，且最终形成的疤痕面积更小。这表明tFNA不仅加速了愈合过程，还改善了愈合质量。组织学分析进一步支持了这些宏观观察。H&E染色显示，tFNA处理组的表皮厚度增加，疤痕区域缩小，炎症细胞浸润减少。Masson染色则表明，tFNA处理减轻了皮肤纤维化程度。这些结果意味着tFNA促进了更好的组织重构和更少的疤痕形成。

在分子水平上，免疫荧光染色揭示了tFNA的抗炎作用。tFNA处理显著降低了伤口区域炎症因子TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表达水平。同时，促进血管生成和组织修复的关键因子VEGF和bFGF在tFNA处理组中表达增加。这些发现与体外实验结果一致，进一步证实了tFNA的多重生物学效应。

关于tFNA促进伤口愈合的机制，研究者基于体外和体内实验结果提出了综合解释。首先，tFNA能够促进角质形成细胞和成纤维细胞的增殖和迁移，直接加速伤口闭合。其次，tFNA通过调节细胞周期，增加G2-M期细胞比例，促进细胞有丝分裂。此外，tFNA刺激成纤维细胞分泌更多生长因子，有助于血管生成和组织再生。

图41: tFNA促进皮肤创伤炎症较少



tFNA的抗炎作用也是其促进愈合的重要机制之一。通过降低炎症因子的表达，tFNA有助于控制过度炎症反应，为组织修复创造有利环境。同时，tFNA减轻皮肤纤维化的能力可能是减少疤痕形成的关键。在细胞信号通路层面，体外实验证实tFNA能够激活AKT信号通路。AKT通路在细胞存活、增殖和代谢调节中起关键作用，其激活可能是tFNA发挥多重生物学效应的核心机制。

总结来看，角膜碱烧伤模型和大鼠皮肤全层伤口模型的实验结果全面展示了tFNA在促进伤口和皮肤创面愈合方面的多重优势。tFNA不仅加速了愈合过程，还改善了愈合质量、促进上皮再生、减少炎症反应以及改善组织结构重建。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 4.3 在皮肤和软组织中的应用

### 4.3.3 清除活性氧与促血管形成作用

不受控制的氧化应激是多种疾病发病机制的关键因素。线粒体功能障碍会引发细胞内活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 过度产生, ROS直接攻击细胞蛋白质和脂质, 从而引发氧化应激和随后的炎症。补体成分5a的激活会使这一连串反应持续下去, 从而加剧炎症反应。这反过来又触发了细胞因子的级联反应, 扩大了组织损伤并加剧器官功能障碍。已有研究证实了tFNA在清除 ROS 方面的潜力, 为修复ROS引起的损伤提供了一条前景广阔的途径。清除 ROS 的能力与 tFNA成分本身有内在联系, 与单链 DNA 相比, tFNA结构的复杂性大大提高了其清除效率。正如前所述, tFNA具有渗透细胞膜和广泛内吞的能力。这使tFNA成为 ROS 氧化过程竞争中的有力对抗者, 具有强效 ROS 清除剂的功效。

在皮肤创面愈合过程中, 细胞增殖、迁移、血管生成和重塑的整合是不可或缺的。然而, 病理状态可能会导致这一有序过程的失衡, 从而引发难愈慢性创面。在一项对tFNA在糖尿病创面愈合中的作用的研究中, 研究者证实了tFNA的抗氧化和促血管生成作用。

研究团队首先建立了模拟糖尿病环境的体外模型。他们使用晚期糖基化终末产物 (AGEs) 处理人脐静脉内皮细胞 (HUVECs), 成功诱导了类似糖尿病状态下的细胞损伤。在这一模型中, 研究者系统地评估了tFNA对细胞功能的影响。实验结果表明tFNA在抗氧化和促血管生成方面的显著作用 (图 42)。

在抗氧化方面, tFNA展现出强大的活性氧 (ROS) 清除能力。荧光显微镜检测结果定量分析显示, AGEs处理使HUVECs内ROS水平显著上升至对照组的3.53倍, 而随后tFNA处理能将其有效降低至2.23倍。这一结果直观地展示了tFNA对抗氧化应激的能力。更重要的是, tFNA不仅直接清除ROS, 还全面增强了细胞的抗氧化防御系统。具体而言, tFNA显著提高了一氧化氮 (NO) 的分泌水平, 从AGEs处理后的0.72倍恢复到0.92倍。NO作为重要的血管舒张因子, 不仅有助于改善血流, 还能直接中和部分ROS。同时, tFNA还提高了超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性, 从AGEs抑制的0.72倍显著上升到1.22倍。SOD是细胞抗氧化防御系统的关键酶, 其活性的提高意味着细胞清除超氧阴离子自由基的能力增强。

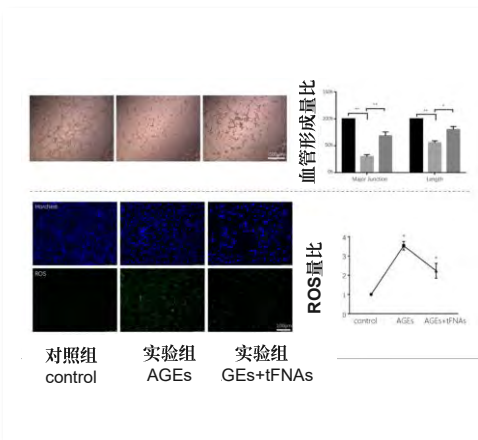
此外, tFNA还显著降低了氧化应激标志物的水平。丙二醛 (MDA) 作为脂质过氧化的终产物, 其水平反映了细胞膜的氧化损伤程度。实验数据显示, tFNA处理将MDA水平从AGEs诱导的2.18倍降低到1.37倍。同样, 乳酸脱氢酶 (L-LDH) 是反映细胞损伤的重要指标, 其分泌水平在tFNA处理后从1.45倍降低到1.09倍。这些结果共同证实了tFNA全面而有效的抗氧化作用。

在促血管生成方面, tFNA同样表现出色。Matrigel管腔形成实验是评估血管生成能力的金标准, 其结果显示, tFNA能够显著改善AGEs引起的血管生成障碍。具体而言, tFNA处理将管腔结构的主要连接点从AGEs抑制的0.29倍恢复到0.68倍, 管腔长度从0.55倍恢复到0.80倍。这一结果不仅在统计学上显著, 更重要的是在生物学上具有实质性意义, 表明tFNA处理后的内皮细胞恢复了形成完整血管网络的能力。

Western blot分析进一步从分子水平证实了tFNA的促血管生成作用。结果显示, tFNA能够有效逆转AGEs导致的血管内皮生长因子A (VEGF-A) 表达下降, 将其水平从0.79倍提高到1.07倍。考虑到VEGF-A是调控血管生成最关键的因子之一, 这一发现为理解tFNA促血管形成作用的分子机制提供了重要线索。深入的机制研究揭示, Akt/Nrf2/HO-1信号通路在tFNA的抗氧化和促血管生成作用中起关键作用。Western blot和免疫荧光分析显示, tFNA处理显著提高了Akt的磷酸化水平, p-Akt/总Akt比值从AGEs抑制的0.48上升到0.75。同时, 核因子红系相关因子2 (Nrf2) 的表达水平从0.51上升到0.99, 血红素加氧酶-1 (HO-1) 的表达水平从0.45上升到0.96。这些数据不仅在统计学上显著, 更重要的是反映了细胞内抗氧化防御系统的全面激活。Akt的磷酸化激活是许多细胞生存和生长信号通路的关键节点。它可以直接磷酸化并激活Nrf2, 促进其核转位。核内的Nrf2与抗氧化反应元件 (ARE) 结合, 启动一系列抗氧化基因的转录, 包括HO-1。HO-1不仅是一种重要的抗氧化酶, 还具有抗炎和细胞保护作用。此外, Akt的激活还可以直接促进VEGF的表达, 从而促进血管生成。因此, tFNA可以通过Akt/Nrf2/HO-1信号通路发挥抗氧化作用, 保护内皮细胞功能, 减轻炎症反应, 抑制氧化损伤。

来源: 公开资料, 文献检索, 沙利文分析

图42: tFNA促进血管形成和清除活性氧



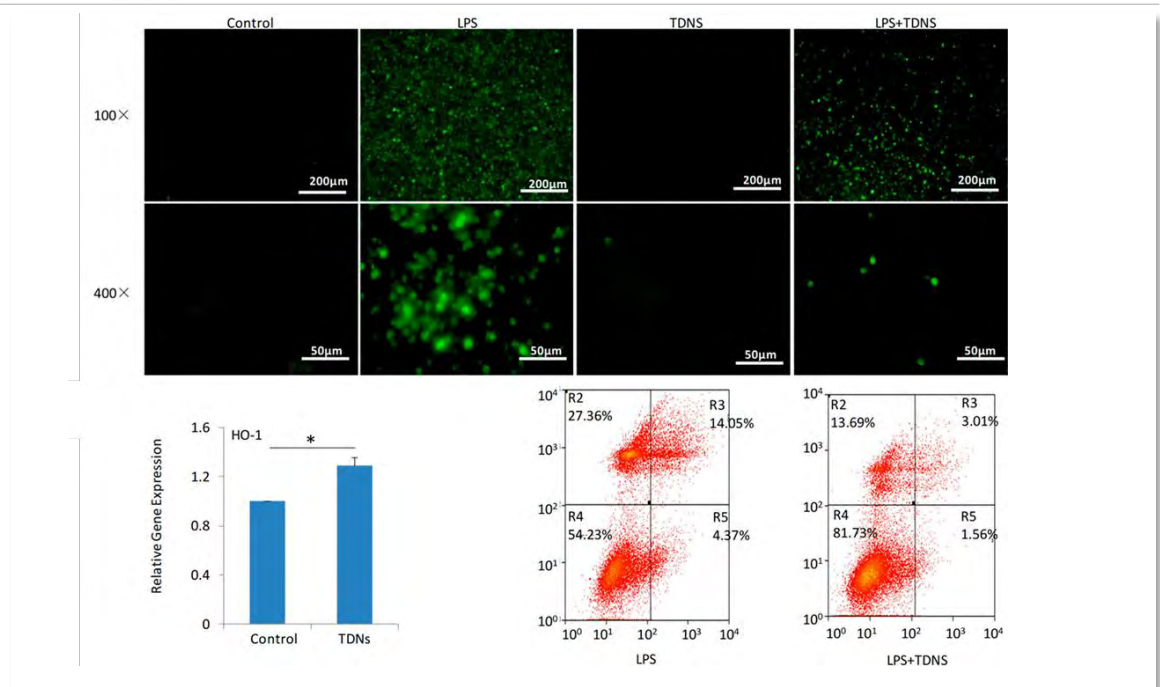
## 4.3 在皮肤和软组织中的应用

### 4.3.4 抑制细胞死亡和清除衰老细胞作用

细胞凋亡 (Apoptosis) 是一种程序化的细胞死亡过程, 通常由内部或外部的信号触发, 如DNA损伤、细胞老化、发育过程中的组织形态发生等。tFNA的抗凋亡作用与其抗氧化和抗炎特性密切相关。研究发现, tFNA能显著降低脂多糖 (LPS) 诱导的细胞内活性氧 (ROS) 水平。过量的ROS是导致细胞凋亡的重要因素之一。一项研究探讨了tFNA对巨噬细胞RAW264.7凋亡的影响及其潜在机制。

研究者首先建立了一个炎症诱导的细胞凋亡模型。他们使用LPS, 这是一种经典的细菌内毒素, 来诱导RAW264.7巨噬细胞的炎症反应和随后的凋亡过程。实验分为两组: 一组为单纯LPS处理组 (对照组) 另一组为tFNA预处理1小时后再加入LPS的组 (实验组)。两组细胞均培养24小时后进行流式细胞术分析。流式细胞术使用Annexin V-FITC和碘化丙啶 (PI) 双染色法来区分不同阶段的细胞。Annexin V能特异性结合细胞早期凋亡时外翻的磷脂酰丝氨酸, 而碘化丙啶只能进入晚期凋亡或坏死的细胞并与DNA结合。通过这种双染色方法, 可以将细胞分为四类: 活细胞 (Annexin V-/PI-), 早期凋亡细胞 (Annexin V+/PI-), 晚期凋亡细胞 (Annexin V+/PI+) 和死亡细胞 (Annexin V-/PI+)。实验结果显示, 与单纯LPS处理组相比, tFNA预处理显著降低了各阶段的细胞凋亡比例: 晚期凋亡细胞比例从4.37%降至1.56%, 减少了64.3%。早期凋亡细胞比例从14.05%降至3.01%, 减少了78.6%。死亡细胞比例从27.36%降至13.69%, 减少了50.0%。这些数据表明, tFNA预处理能有效抑制LPS诱导的细胞凋亡过程, 且对早期凋亡的抑制作用最为显著 (图 43)。

图43: tFNA抑制细胞凋亡



为了探究tFNA抑制细胞凋亡的分子机制, 研究者关注了血红素加氧酶-1 (HO-1) 这一重要的抗氧化和抗凋亡蛋白。他们采用定量PCR (qPCR) 技术测定了HO-1的mRNA表达水平。实验同样设置了对照组 (未处理) 和tFNA处理组。qPCR结果显示, 与对照组相比, tFNA处理组的HO-1 mRNA表达水平显著上调。具体倍数变化在文中未给出, 但研究者描述为“显著上调”。这一发现提示, tFNA可能通过上调HO-1的表达来发挥其抗凋亡作用。HO-1作为一种应激反应蛋白, 具有多重细胞保护功能, 包括抗氧化、抗炎和抗凋亡。HO-1的上调可能是tFNA抗凋亡作用的重要机制之一, 但具体的调控通路和下游效应还需要进一步研究。这些实验结果为tFNA的抗凋亡作用提供了直接的证据和可能的分子机制, 为后续研究和潜在的应用奠定了基础。

来源: 公开资料, 文献检索, 沙利文分析

## 4.3 在皮肤和软组织中的应用

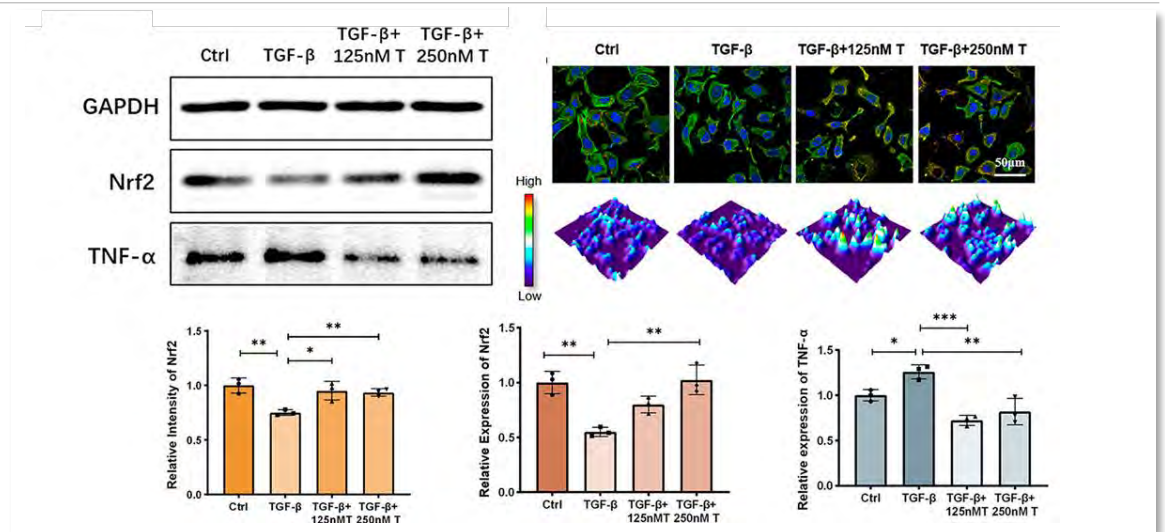
另一方面，细胞焦亡（Pyroptosis）是一种由炎症小体（细胞凋亡蛋白酶，caspase）介导的细胞死亡方式，在多种组织的纤维化过程中扮演重要角色。为探究tFNA对细胞焦亡的影响，研究者设计了一系列体外和体内实验，结果揭示了tFNA在抑制细胞焦亡方面的显著效果。

在体外实验中，研究者首先使用转化生长因子- $\beta$ （TGF- $\beta$ ）诱导人角质形成细胞（HaCaT细胞）产生纤维化表型。Western blot分析显示，TGF- $\beta$ 处理导致细胞焦亡相关蛋白表达显著上调，包括NLRP3炎症小体、活化的细胞凋亡蛋白酶1（caspase-1）、GSDMD的N端片段以及炎症因子IL-1 $\beta$ 和IL-18。这表明纤维化过程伴随着细胞焦亡的激活。然而，当用tFNA处理细胞后，这些细胞焦亡标志物的表达水平均显著降低，清楚地表明tFNA能够有效抑制TGF- $\beta$ 诱导的细胞焦亡过程。

为进一步验证tFNA的抗细胞焦亡作用，研究者建立了博莱霉素诱导的小鼠皮肤纤维化模型。通过皮下注射tFNA，他们观察到皮肤组织中NLRP3、procaspase-1和GSDMD的N端片段表达水平均显著降低，同时炎症因子的分泌也减少。这些体内实验结果与体外实验高度一致，进一步证实了tFNA的抗细胞焦亡作用。

研究者推测，tFNA抑制细胞焦亡的机制可能与其抗氧化和抗炎作用密切相关。他们发现tFNA能够上调抗氧化转录因子Nrf2的表达，同时下调促炎因子TNF- $\alpha$ 的水平（图 44）。考虑到氧化应激和炎症反应是激活NLRP3炎症小体的重要因素，tFNA可能通过减轻这两个过程来抑制细胞焦亡的启动。此外，研究还发现tFNA能够抑制与纤维化相关的YAP1和En-1的表达。这一发现暗示tFNA不仅能抑制细胞焦亡，还可能通过多重机制共同作用，降低瘢痕形成，促进无瘢痕组织再生。

图44: tFNA通过调节细胞焦亡途径抑制细胞死亡



在研究tFNA可以清除衰老细胞方面，研究人员建立了人皮肤成纤维细胞（HDFs）的衰老细胞模型。首先，通过BrdU染色实验观察到处理后的HDFs停止了DNA复制，表明细胞周期停滞。其次，使用SA- $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒检测到衰老HDFs中该酶的活性显著增加。此外，通过qPCR和Western blot分析发现，衰老细胞标志物p16INK4A和p21CIL1的mRNA和蛋白表达水平均显著上调。研究人员还通过免疫荧光染色观察到53BP1和PML蛋白形成的DNA损伤灶，进一步证实了细胞衰老的特征。

在实验结果方面，研究人员首先证实了tFNA能够被衰老的HDFs摄取。他们将Cy5荧光标记的tFNA与细胞共培养12小时后，通过流式细胞术检测到64.2%的衰老HDFs摄取了tFNA，而对对照组单链DNA仅有7.4%的摄取率。共聚焦显微镜观察进一步证实了Cy5-tFNA主要分布在细胞质中。随后，研究人员通过CCK-8实验发现tFNA处理显著降低了衰老HDFs的存活率。更为重要的是，通过Annexin V/PI双染流式细胞术分析，他们观察到tFNA处理显著增加了衰老HDFs的凋亡比例，从31.1%上升到69.8%。这一结果明确表明tFNA具有诱导衰老细胞凋亡的作用。

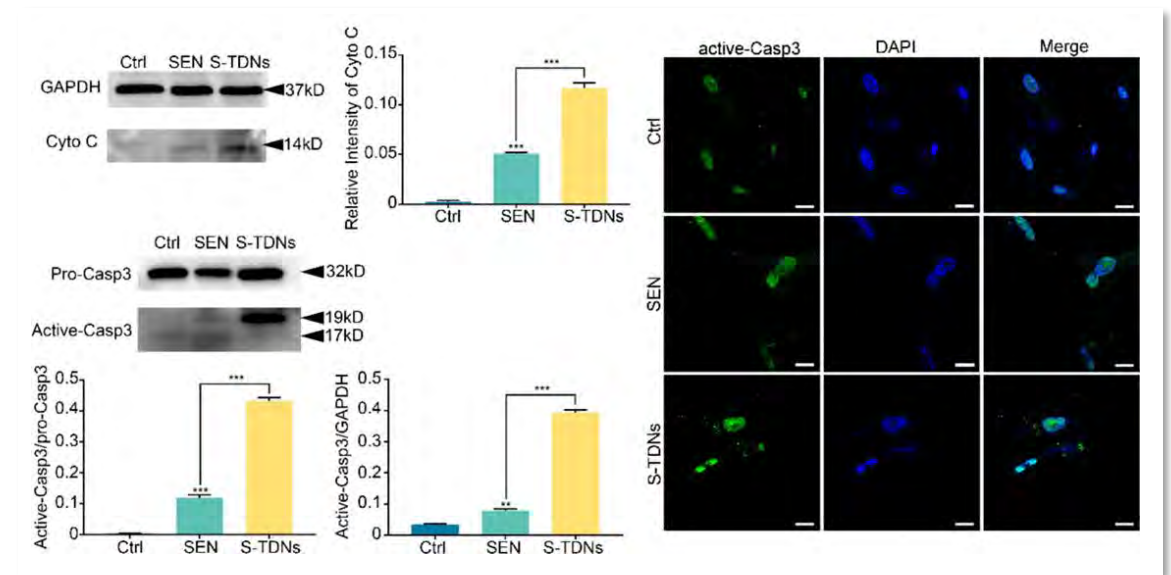
来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 4.3 在皮肤和软组织中的应用

为了深入了解tFNA清除衰老细胞的分子机制，研究人员对相关蛋白的表达进行了详细检测。通过qPCR和Western blot分析，他们发现tFNA处理抑制了抗凋亡蛋白BCL-2和BCL-XL的mRNA和蛋白表达，同时上调了促凋亡蛋白BAX的表达。免疫荧光染色结果也证实了BCL-2荧光强度在tFNA处理后显著降低，而BAX荧光强度增强。这种BCL-2家族蛋白表达模式的改变导致了线粒体膜通透性的变化，促进了细胞色素C的释放。Western blot结果显示，tFNA处理组细胞色素C的表达水平显著高于对照组和衰老组。细胞色素C的释放进一步激活了下游的caspase-3蛋白酶。通过Western blot分析，研究人员观察到pro-caspase-3水平降低，而活化的caspase-3水平显著增加。免疫荧光实验进一步证实了活化的caspase-3从细胞质转移到细胞核，最终诱导细胞凋亡。

这一系列实验结果详细揭示了tFNA通过调节BCL-2家族蛋白表达，激活线粒体依赖的凋亡通路来清除衰老细胞。具体来说，tFNA降低了BCL-2和BCL-XL的表达，同时增加了BAX的表达，导致线粒体膜通透性增加，促进细胞色素C释放。释放的细胞色素C随后激活caspase-3，触发细胞凋亡过程。这种机制解释了tFNA如何特异性地诱导衰老细胞凋亡，从而实现对衰老细胞的清除作用。

图45: tFNA通过激活Casp3清除衰老细胞



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 4.4 在骨组织再生中的应用

骨组织缺损是临床实践中常见且具有挑战性的问题，全球范围内影响着大量患者。骨组织修复是一个复杂的生理过程，通常始于炎症免疫反应的激活，随后涉及血管新生、成骨分化、生物矿化等多个环节。尽管骨组织具有持续重塑和再生的能力，但在严重骨损伤或缺损的情况下，往往需要外部干预来增强这一过程。

目前，自体或异体骨移植技术是处理严重骨缺损最常用的方法。然而，这些方法受到可获取的移植体大小的限制，且增加了手术区域并发症的风险，如感染和持续的术后疼痛。鉴于传统方法的局限性，基于生物活性材料的骨组织工程技术为修复骨缺损提供了新的方向。

近年来，核酸四面体（tFNA）在骨组织工程领域展现出了广阔的应用前景。研究表明，tFNA能够促进间充质干细胞的成骨分化，增强骨再生，并在多种体外和体内模型中抑制软骨降解。这些发现为开发新型骨和软骨组织工程策略提供了重要基础。

当然，tFNA的优势不仅体现在其本身的生物活性，还表现在其作为生物活性分子递送系统的潜力。研究者利用tFNA作为载体，实现了生物活性分子的靶向递送，进一步增强了骨组织再生效果。这种策略结合了tFNA的结构优势和功能特性，为骨组织工程提供了新的思路。

值得注意的是，tFNA在骨组织工程中的应用还涉及多个方面。例如，tFNA可以通过调节特定信号通路（如Wnt/ $\beta$ -catenin、BMP等）来促进成骨分化。此外，tFNA的三维结构特性使其能够模拟细胞外基质，为细胞提供有利的生长微环境。在血管化骨组织构建方面，tFNA也展现出促进血管形成的潜力，这对于大体积骨缺损的修复至关重要。

此外，tFNA在骨免疫调节方面也显示出潜力。骨组织修复过程中的免疫反应对最终修复效果有重要影响。研究表明，tFNA可以调节巨噬细胞的极化，促进抗炎M2型巨噬细胞的产生，从而创造有利于骨再生的免疫微环境。

### 4.4.1 促进成骨分化作用

间充质干细胞（MSCs）作为一类具有自我更新和多向分化能力的多能干细胞，其成骨分化过程受到tFNA的积极影响。这一现象已在多种MSCs中得到证实，包括脂肪来源干细胞（APSCs）、骨髓干细胞（DPSCs）和牙周膜干细胞（PDLSCs）。

每种干细胞类型在tFNA作用下都表现出独特的成骨分化特征，为骨组织工程提供了多样化的细胞来源选择。其中，PDLSCs因其特殊的生物学特性而受到广泛关注。这些细胞不仅易于通过微创手术从牙周膜组织中获取，而且具有较低的免疫原性，使其成为牙槽骨缺损修复的理想候选细胞。

最新研究揭示，tFNA通过精密调节Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路促进PDLSCs的成骨分化。这一发现不仅阐明了tFNA促进成骨分化的分子机制，还为开发基于PDLSCs的骨组织再生策略提供了新的理论基础。

牙槽骨缺损修复面临的一个主要挑战是慢性炎症和感染环境。在这种复杂的微环境中，tFNA展现出了多重生物学功能。除了直接促进成骨分化外，tFNA还表现出显著的抗炎和抗氧化活性。这些作用主要通过抑制MAPK磷酸化来调节巨噬细胞的反应，从而在分子水平上改善炎症微环境。这种多功能性使tFNA成为一种潜在的全方位骨组织修复促进剂。

为了深入了解tFNA在炎症微环境下对PDLSCs的影响，研究人员构建了精密的体外和体内炎症模型。在体外，通过脂多糖（LPS）刺激模拟炎症环境；在体内，则采用丝线结扎法诱导牙周炎模型。这些模型不仅模拟了临床上常见的炎症状态，还为评估tFNA的治疗效果提供了参考。

研究结果发现，在分子水平上，tFNA处理显著增强了关键成骨基因ALP和Runx2的表达（图 46）。这两种基因在早期成骨分化过程中起着核心作用，其表达水平的提高直接反映了细胞向成骨方向分化的倾向。同时，成骨相关蛋白如OPN和Runx2的表达也相应增加，进一步证实了tFNA促进成骨分化的效果。更值得注意的是，tFNA在炎症环境中表现出了强大的调节作用。它能显著降低活性氧（ROS）的产生，这对于减轻氧化应激、保护细胞免受炎症损伤至关重要。此外，tFNA还能有效抑制LPS诱导的多种炎症因子（如TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ ）在PDLSCs中的表达。这种抗炎作用不仅有助于创造有利于骨再生的微环境，还可能减少炎症对新生骨组织的破坏。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

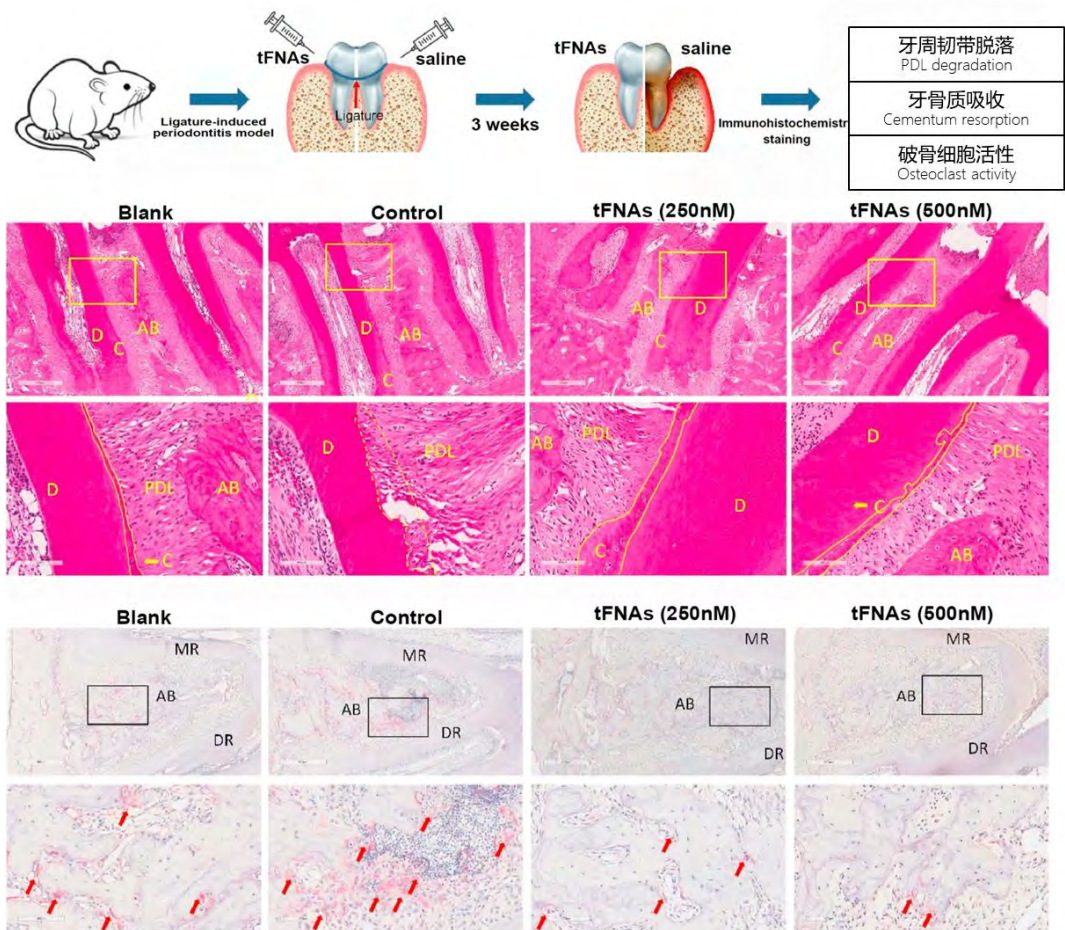
## 4.4 在骨组织再生中的应用

体内实验结果显示，在牙周炎模型中，tFNA治疗显著抑制了牙周组织的破坏。这一发现不仅验证了体外实验结果，还为tFNA在临床应用中的潜力提供了直接证据。通过抑制炎症反应和促进骨再生，tFNA有望成为治疗牙周炎和修复牙槽骨缺损的新型治疗策略。

这些研究成果不仅证实了tFNA在正常和炎症条件下均能有效促进PDLSCs的成骨分化，还揭示了tFNA在调节炎症微环境中的多重作用。tFNA通过直接促进成骨相关基因和蛋白的表达，同时抑制炎症反应和氧化应激，为骨再生创造了有利条件。这种多方面的调节作用使tFNA成为一种独特的骨组织工程工具，有望在复杂的炎症性骨缺损环境中发挥重要作用。

随着研究的深入，tFNA在骨组织工程和再生医学领域的应用前景日益广阔。未来，研究者可能会进一步探索tFNA与其他生物活性分子的协同作用，开发更高效的骨再生策略。

图46: tFNA促进牙齿中的成骨分化



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析



## 4.4 在骨组织再生中的应用

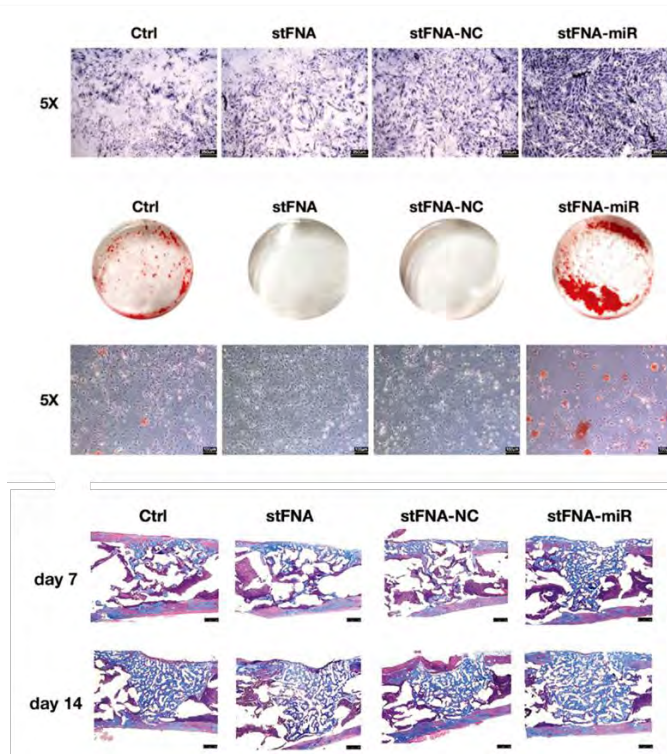
### 4.4.2 促进骨组织修复作用

tFNA可以作为一种新型的基因递送系统，在骨组织修复中的应用尤为引人注目。tFNA不仅能有效保护和递送各种核酸分子，还能促进骨组织的修复和再生。

微小RNA (miRNA) 是一类在调控细胞增殖、分化和血管生长等生理病理活动中发挥重要作用的非编码短链RNA分子。然而，miRNA易被RNA酶降解的特性限制了其治疗的广泛应用。为解决这一问题，研究人员开发了基于tFNA的递送系统，以提高miRNA的稳定性和递送效率。

科学家开发了一种多功能tFNA递送系统，用于递送miR-2861以促进骨再生。该系统利用四条带有黏性末端的单链DNA自组装成tFNA，作为“载体”递送双链miRNA。实验结果显示，tFNA/miR复合物能够在12小时内轻松穿透骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 的细胞膜。碱性磷酸酶染色和茜素红染色进一步证实了这种复合物能显著促进BMSCs的成骨分化，表现为更深的蓝紫色沉淀和更密集的矿化结节。为了评估tFNA/miR-2861在体内促进骨再生的效果，研究人员构建了股骨缺损模型。微CT成像结果显示，局部注射tFNA-miR-2861复合物两周后，骨缺损区域完全修复。组织学分析进一步证实，再生组织的结构更接近天然骨组织。这些结果充分证明了tFNA作为miRNA递送系统在促进骨再生中的显著效果 (图 47)。

图47: tFNA作为载体递送成骨miRNA促进骨再生



为了延长释放时间并增强骨修复效果，研究人员还开发了一种双重递送的肝素锂水凝胶系统，用于递送锂离子和tFNA-miR-335-5复合物，以治疗类固醇相关性骨坏死 (SAON) 中的骨损伤。结果表明，这种可注射的多孔肝素锂水凝胶包裹tFNA-miR-335-5复合物，能够有效促进SAON早期的骨缺损修复。

## 4.4 在骨组织再生中的应用

在骨组织再生领域，科学家们不断探索创新性方法来克服衰老相关的挑战。其中一项引人注目的研究聚焦于利用核酸四面体（tFNA）递送miRNA-21-5p，以促进骨组织修复并缓解衰老造成的负面影响。这项研究不仅展示了tFNA在基因递送方面的潜力，还揭示了其在调节衰老微环境中的多重作用。研究者们构建了一种基于tFNA的纳米复合物tFNA-miR-21-5p，旨在解决miR-21-5p递送过程中面临的细胞吸收差和易降解等挑战。miRNA-21-5p作为最丰富的骨相关miRNA，在诱导成骨和血管生成分化中扮演着关键角色。通过将其与tFNA结合，研究者成功提高了miR-21-5p的递送效率和稳定性。结果表明，tFNA-miR-21-5p纳米复合物不仅促进了衰老骨髓干细胞（O-BMSCs）的成骨分化，还显著缓解了其衰老状态。同时，这种复合物还增强了衰老内皮祖细胞（O-EPCs）的血管生成能力。这一多重效应对于改善衰老微环境中的骨缺损修复具有重要意义。深入的机制研究揭示，tFNA-miR-21-5p可能通过激活AKT和Erk信号通路直接调控O-BMSCs的成骨分化和衰老进程。更为有趣的是，研究者发现tFNA-miR-21-5p还能通过刺激O-EPCs分泌促血管生成因子，间接促进O-BMSCs的成骨分化并缓解其衰老。这种双重作用机制为理解tFNA-miR-21-5p在骨组织再生中的综合效应提供了新的视角。

为了进一步提高tFNA-miR-21-5p的临床应用潜力，研究者创新性地将其与明胶甲基丙烯酸酯（GelMA）水凝胶结合，制成了一种新型的递送支架。在体内衰老的临界大小颅骨缺损模型中，tFNA-miR-21-5p@GelMA支架展现出优异的骨修复能力。组织学分析显示，成骨和血管生成相关标记物的表达显著增加，这进一步证实了tFNA-miR-21-5p在促进骨组织再生和血管化方面的协同效应。

此外，科学家还将包裹克林霉素（CLI）的tFNA载体与BMSCs整合到3D生物打印的甲基丙烯酸酯化明胶（GelMA）支架中，用于治疗感染性骨缺损。这种水凝胶提供了类似细胞外基质的3D环境，可持续释放移植细胞或抗生素，其相互连通的孔隙结构有利于血管化和骨组织长入。

这些研究成果充分展示了tFNA在骨组织修复和再生中的多功能性和高效性。tFNA不仅能有效递送miRNA等治疗用药物分子，还能与其他材料（如水凝胶）结合，形成更复杂的治疗系统。这种多层次的治疗策略为解决复杂的骨缺损问题提供了新的思路。

未来，基于tFNA的骨组织修复策略有望进一步发展。研究者可能会探索将tFNA与其他生物活性分子（如生长因子、小分子药物）结合，开发更加高效和多功能的骨再生系统。同时，tFNA的可修饰性为开发靶向递送系统提供了可能，有望实现对特定骨组织或细胞类型的精准治疗。此外，将tFNA基因递送系统与先进的生物材料和3D打印技术相结合，可能会开发出更加复杂和个性化的骨组织工程支架，为大面积骨缺损的修复提供新的解决方案。

### 4.4.3 促进软骨修复再生

软骨组织修复和再生一直是临床研究和再生医学领域的重大挑战。关节软骨由于缺乏血管、神经和淋巴管，其自我修复能力极为有限。传统的临床治疗方法，如保守药物治疗和关节置换，都存在各自的局限性。近年来，基于种子细胞、生物材料和适当微环境的组织工程技术在软骨再生方面展现出巨大潜力。其中，tFNA作为一种新型纳米材料，在软骨修复和再生领域显示出独特的优势。

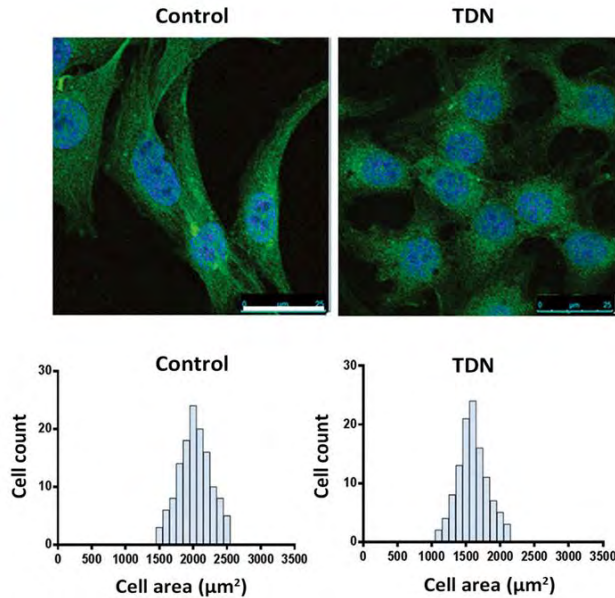
tFNA对软骨细胞功能的调节作用是其促进软骨修复的重要基础。软骨细胞作为软骨组织中唯一的细胞类型，在基于细胞的软骨再生策略中扮演着关键角色。然而，软骨细胞的应用受到供体部位稀缺和分离细胞产量低的限制。更重要的是，软骨细胞在体外扩增过程中容易发生脱分化，丧失其特征性表型，这严重影响了其在组织工程中的效果。这一问题在老年患者中尤为突出，因为老年人的软骨细胞增殖和分化能力降低，显著影响其在软骨组织工程中的功能。

针对这些挑战，研究人员对tFNA的作用进行了深入研究。研究人员尝试将tFNA应用于原代软骨细胞的培养，取得了显著的成果。实验表明，250 nmol/L浓度的tFNA能有效维持大鼠原代软骨细胞的正常表型，使细胞从扁平的成纤维细胞样形态恢复为正常的圆形三维结构。这一现象与Notch信号通路的激活密切相关。此外，在62.5-250 nmol/L的浓度范围内，tFNA还能以浓度依赖的方式促进软骨细胞的增殖和迁移。tFNA对软骨细胞的影响不仅限于形态和增殖，还涉及细胞的自噬过程（图 48）。研究发现，tFNA处理显著增加了软骨细胞中自噬体的数量。在分子水平上，250 nmol/L tFNA处理后，磷脂酰肌醇3-激酶（PI3K）和AKT的mRNA表达上调，而哺乳动物西罗莫司靶蛋白（mTOR）的转录水平下降。这些结果表明，tFNA可能通过PI3K/AKT/mTOR通路调节软骨细胞的自噬过程。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 4.4 在骨组织再生中的应用

图48: tFNA促进软骨细胞性能



除了促进增殖，tFNA还能增强软骨细胞的迁移能力。通过伤口愈合实验，研究者发现tFNA处理后软骨细胞的迁移能力显著增强。统计分析显示，tFNA处理组的迁移细胞数量明显多于对照组。这一结果对于促进软骨缺损修复具有重要意义，因为细胞迁移是组织修复过程中的关键步骤。

更为重要的是，tFNA能帮助维持软骨细胞的特征性表型。免疫荧光染色结果显示，tFNA处理后的软骨细胞能保持其特有的圆形和立体形态，而非退化为扁平的成纤维细胞样形态。细胞面积分布分析进一步证实了这一点，tFNA处理组的细胞面积分布更加集中，表明细胞形态更加一致。这一发现意味着tFNA能更有效地维持软骨细胞的表型，这对于保持软骨细胞的功能至关重要。

在软骨修复和再生方面，tFNA展现出了多方面的治疗潜力。骨关节炎（OA）是最常见的慢性关节疾病，严重影响成年人的生活质量。OA的病理变化主要表现为软骨细胞功能障碍导致的细胞外基质合成和降解失衡。tFNA作为一种具有抗凋亡和抗氧化作用的治疗试剂，在OA治疗中显示出潜在价值。

研究表明，tFNA能抑制IL-1 $\beta$ 刺激引起的软骨细胞凋亡和氧化应激。基于这一发现，研究人员开发了一种可注射的tFNA/黄芩苷复合系统。该系统通过将黄芩苷插入双链DNA沟槽中形成，展现出显著的治疗效果。它能降低炎症因子和基质金属蛋白酶（MMP1, MMP3, MMP13）的表达，同时增加软骨标志物含量和相关MMP抑制蛋白的水平。在体外实验中，这种复合物显著减少了炎症介质的产生，有效保护了软骨细胞。更为重要的是，在大鼠膝关节注射后，tFNA/黄芩苷复合物能使软骨表面更加光滑和结构完整，证实了其在体内的治疗效果。

另一项创新性研究提出了基于滑膜间充质干细胞（SMSCs）的组织工程策略。该策略将tFNA与壳聚糖（CS）水凝胶/3D打印的聚己内酯（PCL）混合支架结合，并包埋SMSCs。也就是说，CS水凝胶和3D打印PCL构成的混合支架用于包埋具有优异软骨分化能力的滑膜充质干细胞。这种支架设计不仅提供了细胞生存和分化所需的三维微环境，还具有良好的机械性能和生物相容性。将该支架植入兔子关节软骨缺损部位后，研究者通过关节腔注射tFNA，利用静电相互作用与CS水凝胶结合。这种设计巧妙地利用了tFNA的特性，为SMSCs的增殖和软骨分化提供了最佳微环境。实验结果显示，这种策略显著促进了软骨缺损的修复，再生组织的结构和功能更接近天然软骨。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 4.4 在骨组织再生中的应用

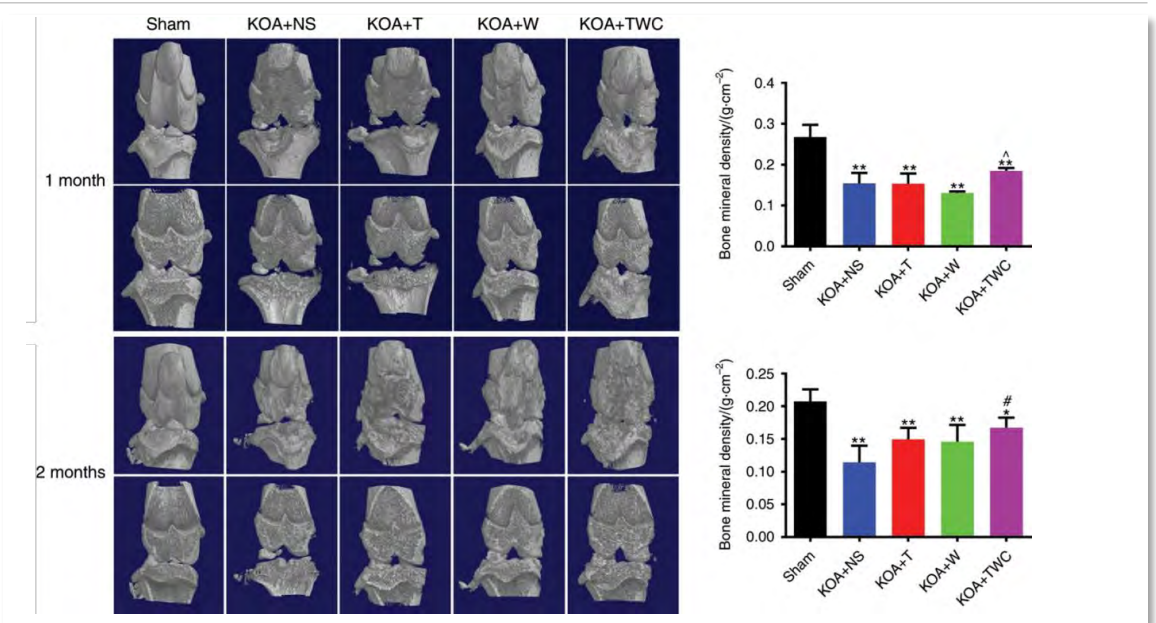
类风湿性关节炎 (RA) 是一种慢性炎症性疾病, 以滑膜炎为特征, 最终导致关节破坏。对 RA 的治疗主要包括细胞因子抑制剂、B 细胞清除剂和 T 细胞激动阻断剂。近年来, miRNA 以其更好的治疗效果和更小的副作用开始发挥作用, 但其临床应用往往受到其结构不稳定性的限制。研究者通过将 miR-23b 加入 tFNA 结构中形成名为 T-23b 的复合物, miR-23b 的稳定性得到了增强, 从而可以在生物体内有效传递, 充分发挥其治疗作用。在组织学层面, T-23b 可抑制炎症细胞的浸润, 抑制滑膜增生, 从而缓解滑膜炎。它还能抑制病理性血管生成、软骨基质降解和破骨细胞生成, 从而保护关节结构。在细胞水平上, 它能抑制滑膜成纤维细胞的迁移以及炎症因子和破骨因子的合成和分泌。在转录水平上, T-23b 可以调节相关基因的表达, 从而改善与上述疾病相关的表型。与 miR-23b 和 tFNA 各自的作用相比, T-23b 的作用更为明显。

强直性脊柱炎 (AS) 是一种慢性全身性炎症疾病, 会导致严重的脊柱畸形和强直。持续的炎症和进行性强直导致强直性脊柱炎患者的脊柱失去灵活性。在强直性脊柱炎 (AS) 的治疗中, tFNA 展现出了多方面的治疗效果。它不仅能抑制局部和系统性炎症, 还能阻止椎间盘组织的异位骨化, 从而延缓疾病进展。体外实验表明, tFNA 通过 IL-17 通路调节 AS 原代软骨细胞的生物学行为, 抑制多种促炎细胞因子的分泌。同时, tFNA 在转录水平上抑制了软骨细胞的成骨分化, 最终达到缓解 AS 相关症状、改善患者生活质量的目标。

此外, tFNA 还被用作药物载体, 进一步扩展了其应用范围。研究使用 tFNA 作为葛根素 (Pue) 载体, 并合成了 tFNA/Pue 复合物 (TPC), 该复合物比游离葛根素具有更好的稳定性、生物相容性和组织利用率。此外, 通过建立了地塞米松 (DEX) 处理的骨髓间充质干细胞 BMSCs 体外模型和甲泼尼龙 (MPS) 诱导的股骨头坏死 (ONFH) 体内模型, 以探讨 TPC 对 BMSC 成骨和凋亡的调控作用。研究表明, TPC 可通过 Akt/Bcl-2 通路恢复大剂量糖皮质激素 (GCs) 诱导的成骨功能障碍, 并减轻 BMSC 的凋亡, 有助于预防高剂量糖皮质激素诱导的大鼠股骨头坏死。

在骨质疏松症相关骨折的研究中, tFNA 展现出促进骨生成和血管再生的能力。研究者将 tFNA 分别应用于完整小鼠和股骨骨折老年性骨质疏松症小鼠, 评估 tFNA 对老年性骨质疏松症和骨质疏松症骨折修复早期胫腓体的成骨和血管生成的影响, 并初步探讨其潜在机制。结果表明, tFNA 治疗后 3 周内对完整老年性骨质疏松症小鼠股骨和下颌骨的成骨和血管生成无明显影响, 而在骨质疏松性骨折修复中, tFNA 可促进胫腓体的成骨和血管生成, 这潜在机制可能是由 FoxO1 相关的 SIRT1 通路调控的。因此, tFNA 可通过促进成骨和血管生成来促进老年性骨质疏松性骨折的修复, 为老年性骨质疏松性骨折的治疗提供了一种新策略。

图49: tFNA促进软骨再生



来源: 公开资料, 文献检索, 沙利文分析

## 4.4 在骨组织再生中的应用

最后，tFNA在肌肉代谢方面也显示出了显著效果。肌肉疏松症被称为与年龄有关的肌肉萎缩，其特点是肌肉质量、力量和性能逐渐下降。迄今为止，肌肉疏松症的临床治疗方法仅限于康复干预和膳食补充剂。研究人员评估了tFNA在体内和体外对肌肉疏松症的治疗效果。肌肉生物生理学特征的结果表明，在老年小鼠模型中，tFNA处理不仅改善了肌肉功能和耐力，还优化了肌纤维的形态学特征。在体外地塞米松诱导的肌萎缩模型中，tFNA能有效抑制线粒体介导的细胞凋亡，促进肌肉结构和功能的改善。

尽管这些基于tFNA的策略为软骨修复和再生提供了新的治疗方法，但其有效性仍需进一步验证，同时还面临一些挑战。其中一个主要挑战是如何平衡tFNA的快速降解和组织缓慢再生之间的矛盾。tFNA在生理环境中的稳定性有限，而软骨组织的再生是一个缓慢的过程。这可能需要多次注射tFNA，从而增加关节内感染的风险和患者的不适。

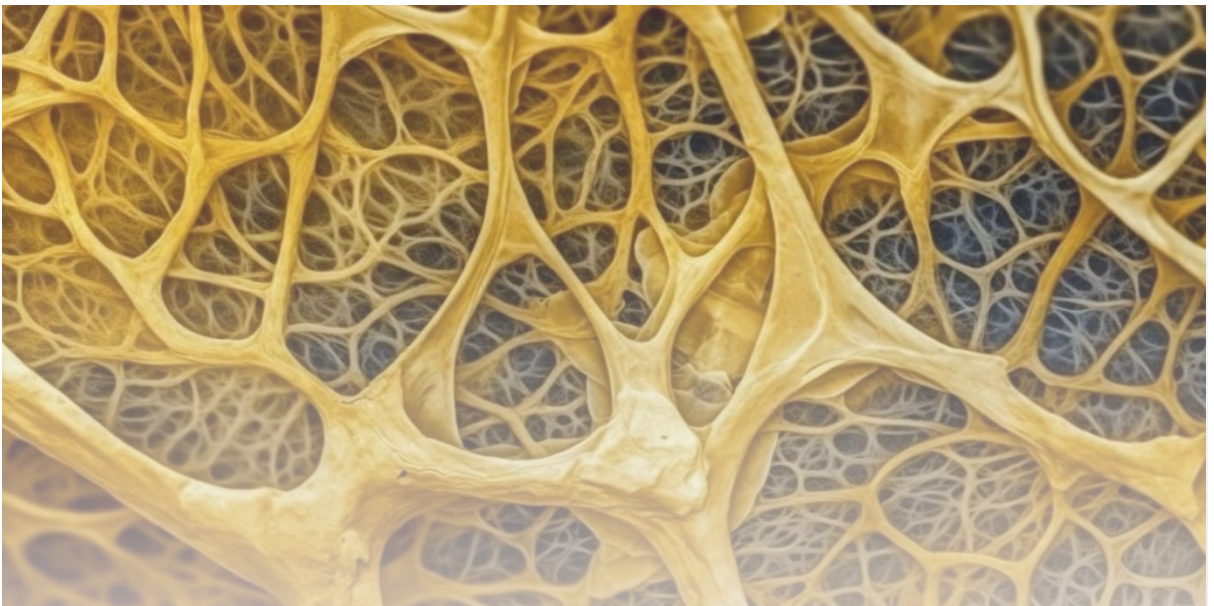
此外，tFNA在体内的长期安全性和免疫原性也需要进一步研究。虽然短期研究表明tFNA具有良好的生物相容性，但其长期使用的潜在副作用尚不清楚。同时，如何实现tFNA在软骨组织中的精确靶向和控制释放也是未来研究需要解决的问题。

尽管如此，基于tFNA的注射剂仍然是治疗软骨缺损和骨关节炎的有前途方法。未来研究可能需要进一步优化tFNA的设计，以延长其在体内的作用时间，同时探索tFNA与其他生物活性分子或材料的协同作用，开发更加高效和持久的软骨修复系统。例如，可以考虑将tFNA与缓释系统结合，或者开发能响应特定生理信号的智能tFNA系统，以实现更精准的治疗效果。深入研究tFNA调节软骨细胞和干细胞行为的分子机制，有助于开发更加精准的治疗策略。例如，可以探索tFNA如何影响软骨细胞的基因表达谱，以及它是否能调节关键的信号通路，如TGF- $\beta$ /BMP通路或Wnt通路。这些机制研究不仅有助于优化tFNA的设计，还可能揭示新的治疗靶点。

结合先进的生物材料和3D打印技术，有望开发出更加复杂和个性化的软骨组织工程支架。例如，可以设计具有梯度结构的支架，模拟天然软骨的分层结构。同时，通过精确控制tFNA在支架中的分布，可以实现对再生过程的空间调控。

此外，考虑到软骨损伤常常伴随着骨和滑膜的病变，未来的研究也应关注tFNA在整个关节修复中的作用。例如，可以探索tFNA是否能同时促进软骨和软骨下骨的修复，或者是否能调节滑膜的炎症反应。

总之，基于tFNA的软骨修复和再生策略展现出了广阔的应用前景。通过持续的研究和创新，有望克服现有挑战，为软骨损伤和退行性疾病患者提供更加有效的治疗选择。这不仅将推动再生医学的发展，还有望显著改善患者的生活质量。随着研究的深入，tFNA有望成为软骨组织工程和再生医学领域的关键工具，为解决这一长期困扰医学界的难题提供新的希望。



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 4.5 在神经系统中的应用

总的来说，tFNA作为神经保护剂展现出多重作用机制。通过抗氧化应激、抗细胞凋亡和提供神经营养支持，tFNA在多种神经系统疾病模型中表现出显著的保护作用。这种多靶点、多层次的保护机制，使得tFNA成为极具潜力的神经保护剂。

神经系统疾病的病因和病理机制各不相同，但它们普遍具有隐匿性进展、全球性发病和严重影响生活质量的特点。其中，中枢神经系统疾病的治疗面临着巨大挑战，主要源于血脑屏障的存在以及对某些神经系统疾病起源和发病机制的认知不足。

传统治疗方法的局限性日益凸显。许多治疗分子中的大型功能基团难以进行化学修饰，或者修饰可能会降低其治疗效果。因此，克服这些障碍成为开发下一代神经系统疾病治疗药物的关键。理想的神经系统疾病治疗药物应具备多项特性：无毒性、生物相容性好、可生物降解、在血液中稳定（不被蛋白质吸附）、低免疫原性（不引起血小板聚集）、能够穿过血脑屏障（理想情况下应为纳米级颗粒或具有受体介导的运输机制），以及易于通过各种功能材料进行修饰而不影响药物的治疗效果。

如前在介绍核酸四面体（tFNA）的结构的前述章节所述，tFNA作为一种新型纳米材料，凭借其独特的物理化学特性和生物学功能，在神经系统疾病的治疗中展现出良好的潜力。tFNA不仅具有良好的生物相容性和可控的生物降解性，还能够通过精确设计实现靶向递送和可控释放。这些特性使得tFNA成为理想的神经系统疾病治疗试剂载体和潜在的神经保护剂。本节将详细探讨tFNA在神经系统疾病治疗中的应用，包括其在神经保护与再生和药物递送等方面的最新研究进展。

### 4.5.1 神经保护作用

tFNA在神经保护领域展现出多方面的作用，主要体现在抗氧化应激、抗细胞凋亡和神经营养支持三个方面。这些作用机制相互交织，共同构成了tFNA强大的神经保护能力。

#### ■ 抗氧化应激

氧化应激是多种神经系统疾病的共同病理机制，如神经退行性疾病、缺血性脑损伤等。tFNA在抗氧化应激方面表现出显著效果。在视网膜缺血再灌注损伤模型中，研究发现tFNA能有效抑制细胞内活性氧（ROS）水平。具体而言，科学家使用叔丁基过氧化物（TBHP）构建了视网膜神经节细胞（RGCs）的氧化应激模型。结果表明，tFNA通过激活Akt/Nrf2信号通路，调节细胞内氧化相关酶的表达，从而抑制ROS的产生，保护视网膜神经节细胞免受氧化损伤。这一机制不仅对视网膜疾病具有重要意义，还为其他涉及氧化应激的神经系统疾病提供了新的治疗思路。在阿尔茨海默病（AD）模型中，tFNA同样展现出强大的抗氧化能力。已有研究显示，250 nM的tFNA处理能显著抑制 $\beta$ -淀粉样蛋白（A $\beta$ ）诱导的PC12细胞（一种广泛用于神经系统体外研究的细胞）中ROS的产生。这种抗氧化作用与tFNA激活ERK1/2通路密切相关，为阿尔茨海默病的治疗提供了新的靶点。

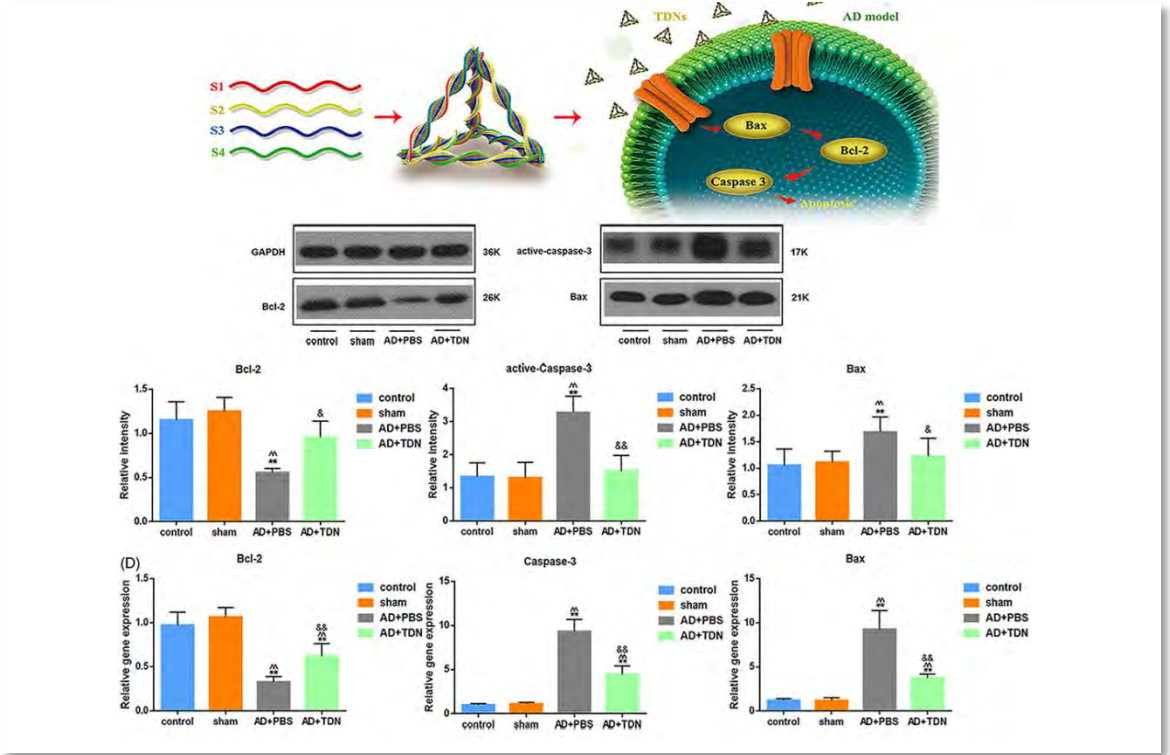
#### ■ 抗细胞凋亡

神经元凋亡是多种神经系统疾病的关键病理过程，tFNA在抑制神经元凋亡方面表现出卓越的效果。在阿尔茨海默病模型中，科学家发现250 nM的tFNA能够通过多重机制保护PC12细胞免受A $\beta$ 诱导的凋亡（图 50）。具体而言，tFNA处理能调节异常的细胞周期，恢复受损的核形态，并抑制细胞凋亡蛋白酶（caspase）活性。在分子水平上，tFNA显著抑制了细胞凋亡相关蛋白如caspase 3和bax的表达。更重要的是，在阿尔茨海默病（AD）大鼠模型中，尾静脉注射tFNA能显著抑制海马区A $\beta$ 25-35的表达，减少Nissl染色异常细胞的数量，这进一步证实了tFNA在体内的抗凋亡作用。在帕金森病（PD）模型中，tFNA同样展现出强大的抗凋亡能力。研究表明，tFNA能抑制1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶（MPTP）诱导的PC12细胞凋亡。这一保护作用与tFNA上调Pi3k/Akt通路密切相关。具体而言，tFNA处理增加了抗凋亡蛋白bcl2的表达，同时降低了促凋亡蛋白bax和caspase 3的表达。这种对关键凋亡调节蛋白的精细调控，为PD的治疗提供了新的思路。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 4.5 在神经系统中的应用

图50: tFNA保护神经细胞免受凋亡



在缺血性脑损伤模型中，tFNA也表现出显著的抗凋亡作用。研究发现，tFNA能抑制缺氧-复氧(OGD/R)诱导的钙超载和ROS生成，从而保护星形胶质细胞免于凋亡。同时，tFNA还能下调Toll样受体(TLRs)/核因子κB(NF-κB)信号通路，这可能是tFNA在缺血性脑损伤中发挥保护作用的重要机制。

### ■ 神经营养支持

tFNA在神经营养支持方面的作用主要体现在其作为生物活性分子载体的能力，以及对内源性神经营养因子表达的调节。在视网膜疾病研究中，科学家开发了一种新型DNA纳米复合物(tFNA-miR22)，通过将microRNA-22-3p(miR-22)连接到tFNA上。这种复合物不仅能有效将miR-22转运到受损的RGCs中，还能选择性激活酪氨酸激酶受体B，增加脑源性神经营养因子(BDNF)的表达水平。BDNF作为重要的神经营养因子，在神经保护和再生中发挥关键作用。这一研究不仅证明了tFNA作为miRNA载体的潜力，还揭示了tFNA通过调节内源性神经营养因子发挥神经保护作用的新机制。在周围神经损伤修复中，tFNA同样展现出促进神经营养因子表达的能力。研究发现，tFNA能增加神经生长因子(NGF)的表达，这对于轴突再生和神经功能恢复至关重要。此外，tFNA还能上调其他重要的神经营养相关蛋白，如髓鞘碱性蛋白(MBP)和周围髓鞘蛋白22(peripheral myelin protein 22)，这些蛋白对于髓鞘的形成和维持起着关键作用。在神经退行性疾病模型中，tFNA也表现出对神经营养支持系统的调节作用。例如，在帕金森病(PD)模型中，tFNA能够上调α-突触核蛋白的表达，这一蛋白在维持突触功能和神经元存活方面发挥重要作用。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

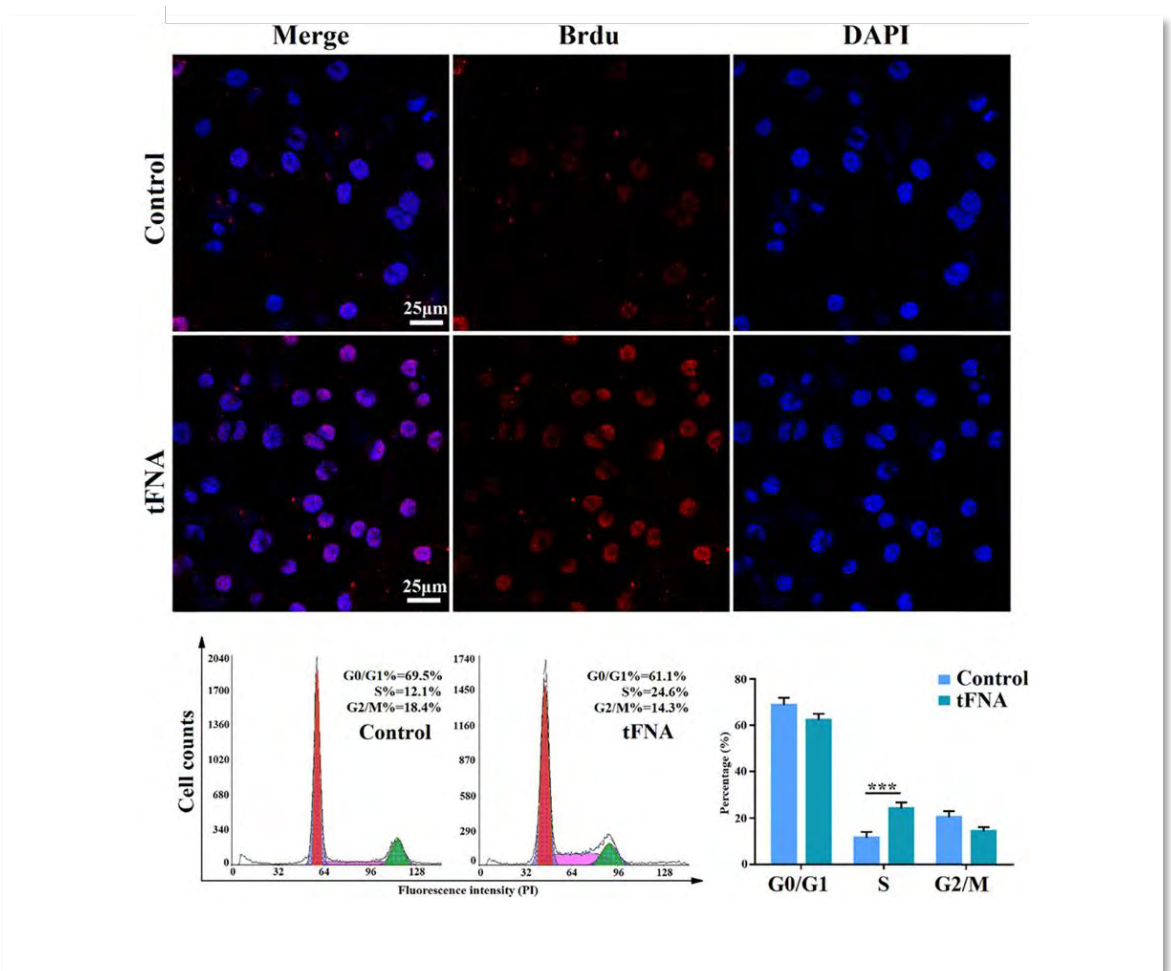
## 4.5 在神经系统中的应用

### 4.5.2 促进神经再生作用

神经再生是神经系统疾病治疗的关键挑战之一，tFNA在这一领域展现出显著的潜力，主要体现在神经干细胞调控、轴突再生和髓鞘修复三个方面。

tFNA在神经干细胞（NSCs）调控方面表现出卓越的能力，为神经再生提供了新的可能性。研究表明，tFNA能够显著促进神经外胚层干细胞的迁移和增殖。科学家研究发现，tFNA通过精细调节Notch信号通路，诱导NSCs向神经元方向分化。这一发现为利用内源性NSCs促进神经再生提供了新的思路（图 51）。在脊髓损伤（Spinal cord injury, SCI）模型中，tFNA与NSCs的协同作用尤为突出。研究显示，经过8周的观察，接受tFNA-NSC联合治疗的大鼠在BBB（Basso-Beattie-Bresnahan）量表评分上显著高于单独使用tFNA或NSCs的组别。这一结果表明tFNA-NSC联合治疗能够显著改善运动功能的恢复。更为重要的是tFNA-NSC治疗组的Nestin（一种NSC标记物）免疫荧光强度明显增强，这揭示了tFNA对NSC存活和增殖的积极影响。此外，tFNA处理还能增加移植NSCs的存活率，促进损伤部位的组织再生。这些发现为脊髓损伤（SCI）的治疗提供了新的策略。

图51: tFNA促进神经干细胞再生



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析



## 4.5 在神经系统中的应用

tFNA在促进轴突再生方面也展现出显著效果，尤其是在周围神经损伤的修复中。以面神经损伤为例，研究发现，125 nM的tFNA能够通过激活神经保护性信号通路（NGF/PI3K/AKT）来增强施万细胞（Schwann细胞：一种分泌髓鞘的胶质细胞，它螺旋地包裹在外周神经系统的轴突周围，形成髓鞘。）的增殖、迁移和功能蛋白分泌。在面神经损伤模型中，tFNA处理促进了神经传导恢复、肌肉运动改善，以及受损髓鞘和轴突的修复。具体而言，tFNA增加了与轴突生长相关的标志物表达，如神经生长因子、髓鞘碱性蛋白（MBP）、神经生长因子（NGF）和周围髓鞘蛋白22。这些蛋白对于受损神经的修复和成熟髓鞘的形成至关重要。在脊髓损伤（SCI）模型中，研究人员也观察到tFNA处理能够上调髓鞘碱性蛋白的表达水平，这不仅有利于髓鞘重建，也为轴突再生创造了有利环境。

髓鞘修复是神经功能恢复的关键环节，tFNA在这一领域也展现出显著效果。在多发硬化（MS）研究中，科学家发现，250 nM的tFNA能够通过调节线粒体凋亡相关蛋白（如caspase 3、bcl2和bax），保护少突胶质前体细胞免受干扰素- $\gamma$ 介导的细胞死亡。在体内实验中，tFNA显著促进了髓鞘再生和髓鞘化轴突的富集。具体表现为增加髓鞘相关蛋白（如MBP）的表达，并抑制胼胝体区域的细胞凋亡。在脊髓损伤（SCI）模型中，科学家研究进一步证实了tFNA在髓鞘修复中的作用。他们发现tFNA处理能够上调髓鞘碱性蛋白的表达水平，促进髓鞘重建。这一发现不仅对脊髓损伤（SCI）的治疗具有重要意义，也为其他脱髓鞘疾病的治疗提供了新的思路。

此外，在周围神经损伤修复中，tFNA也展现出促进髓鞘修复的能力。科学家在面神经损伤模型中观察到，tFNA处理能够增加髓鞘碱性蛋白（MBP）和周围髓鞘蛋白22的表达，这对于髓鞘的重建和功能恢复至关重要。值得注意的是，tFNA促进髓鞘修复的作用并不局限于直接增加髓鞘相关蛋白的表达。研究发现，tFNA还能调节炎症反应，创造有利于髓鞘再生的微环境。例如，在多发硬化（MS）中，tFNA能够抑制炎症因子的释放，减少对少突胶质细胞的损伤，从而间接促进髓鞘修复。

### 4.5.3 神经药物递送

tFNA在神经系统疾病治疗中作为药物递送系统展现出独特的优势，主要体现在其跨血脑屏障递送能力和对特定神经细胞的靶向递送能力。这些特性使tFNA成为解决中枢神经系统药物递送难题的潜在工具。血脑屏障（BBB）是中枢神经系统疾病治疗面临的主要障碍之一，tFNA在克服这一障碍方面表现出显著优势。

在胶质母细胞瘤（GBM）治疗研究中，研究者开发了一种名为Gint4.T-tFNA-GMT8（GTG）的复合物。这种复合物不仅能靶向并抑制胶质瘤细胞的增殖，还能帮助抗肿瘤药物紫杉醇有效穿过血脑屏障。GTG复合物由三部分组成：Gint4.T是一种能结合并抑制血小板衍生生长因子受体 $\beta$ （PDGFR $\beta$ ，GBM的标志物）的适配体，GMT8是一种特异性结合U87MG胶质瘤细胞的适配体，而tFNA作为骨架将这两种适配体连接起来。这种设计不仅提高了药物的靶向性，还显著增强了其穿透BBB的能力。另一项研究将替莫唑胺（TMZ）装载于经GS24修饰的tFNA纳米颗粒中。GS24是一种能与小鼠脑血管内皮细胞上的转铁蛋白受体结合的DNA适配体。这种设计显著提高了TMZ穿过血脑屏障的能力。实验结果显示，经6小时孵育后，tFNA-TMZ复合物能有效穿过BBB，对替莫唑胺敏感的细胞（U87和A172）表现出显著的杀伤效果，远超单独使用TMZ的效果。

此外，已有研究展示了tFNA作为维生素B12（VB12）载体的潜力。他们通过静电结合将维生素B12装载到tFNA上，形成TVC复合物。这种设计显著提高了维生素B12穿过BBB的能力，在MPTP（1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶，是一种强效的神经毒素，它被广泛用于在动物模型中诱导帕金森病（PD）的症状）诱导的PD小鼠模型中表现出良好的治疗效果。TVC复合物通过抑制LRRK2蛋白激酶和恢复纹状体自噬，延长了帕金森病（PD）小鼠在杆测试中的停留时间。

除了增强药物穿过BBB的能力，tFNA还展现出对特定神经细胞的靶向递送能力，这在提高治疗效果和减少副作用方面具有重要意义。

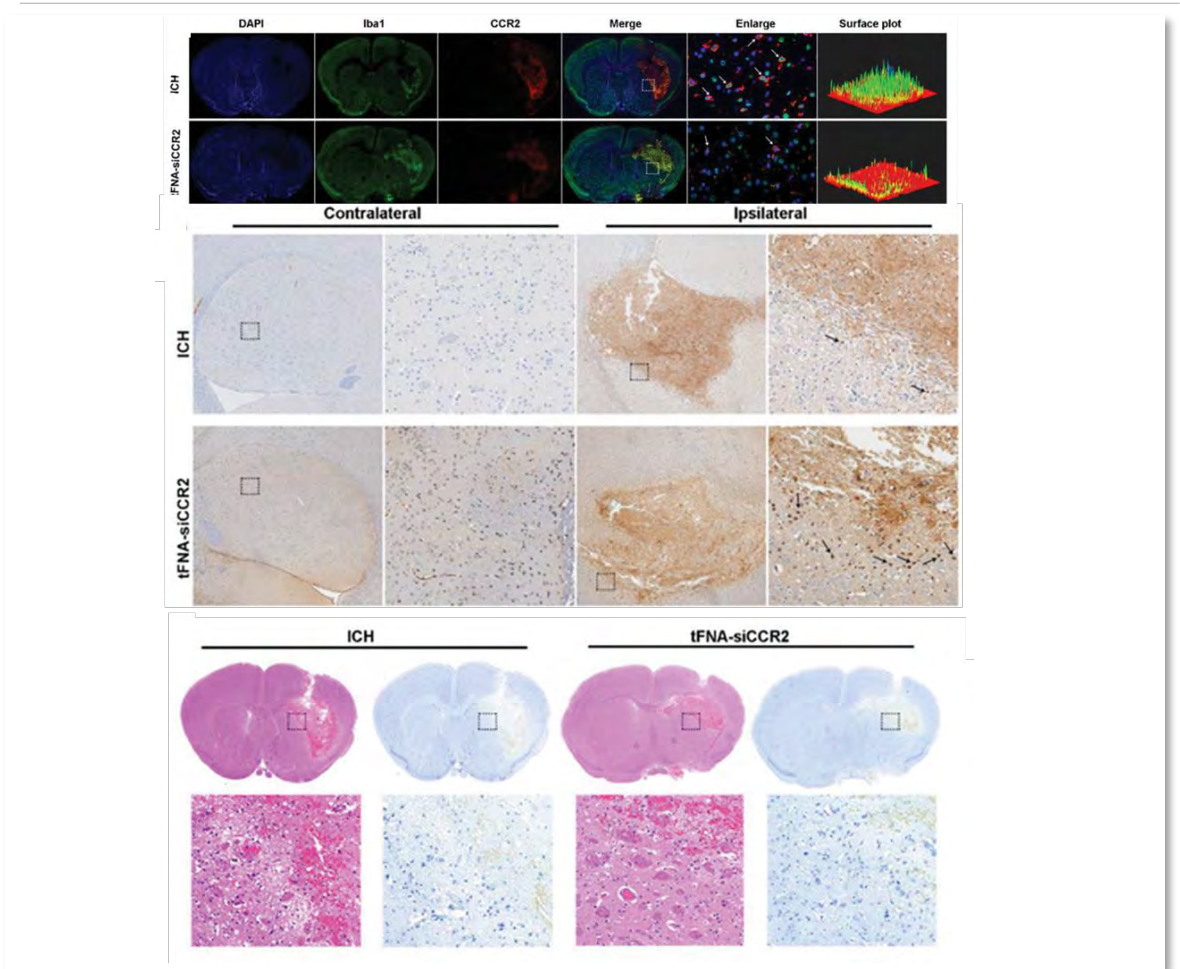
在胶质母细胞瘤（GBM）治疗研究中，上述提到的GTG复合物不仅能跨越血脑屏障，还能特异性靶向并抑制胶质瘤细胞的增殖。实验结果显示，装载紫杉醇的GTG能有效诱导U87MG细胞凋亡。这种精准递送策略大大提高了治疗效果，同时减少了对正常细胞的影响。还有上述提到的tFNA-miR22复合物，也已经展示了tFNA在靶向递送小RNA分子方面的潜力。这种复合物能有效将miR-22转运到受损的视网膜神经节细胞中，通过选择性激活酪氨酸激酶受体B，增加脑源性神经生长因子（BDNF）的表达水平，从而对视网膜神经节细胞产生保护作用。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 4.5 在神经系统中的应用

在周围神经系统疾病治疗中，tFNA也展现出优秀的靶向递送能力。例如，在面神经损伤修复研究中，tFNA能够有效递送功能性蛋白和生长因子到损伤部位的施万细胞，促进神经再生。此外，研究开发的tFNA-siCCR2复合物在颅内出血（ICH）治疗研究中展示了tFNA在靶向递送siRNA方面的潜力（图 52）。这种复合物能够特异性靶向小胶质细胞，有效抑制CCR2基因表达，促进小胶质细胞从促炎的M1型向抗炎的M2型转化。

图52: tFNA携带siRNA修复神经损伤



tFNA作为药物递送系统的优势还体现在其可修饰性和多功能性上。研究者可以通过修饰tFNA的结构，如添加特定的适配体或靶向分子，进一步增强其靶向性和穿透能力。例如，在胶质母细胞瘤（GBM）治疗研究中，研究者通过在tFNA上修饰GS24适配体，显著提高了药物穿过BBB的能力。此外，tFNA还可以同时装载多种治疗分子，实现协同治疗。例如，可以同时装载小分子药物和siRNA，既直接杀伤肿瘤细胞，又抑制特定基因的表达，从而增强治疗效果。

综上，已有研究已经表明，tFNA作为药物递送系统在神经系统疾病治疗中展现出巨大潜力。它不仅能够有效克服BBB这一主要障碍，还能实现对特定神经细胞的靶向递送。这些特性使tFNA成为解决中枢神经系统药物递送难题的有力工具，为神经系统疾病的精准治疗开辟了新的途径。随着研究的深入和技术的进步，相信tFNA基于的药物递送系统将在神经系统疾病治疗中发挥越来越重要的作用。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 4.6 在免疫系统中的应用

核酸四面体 (tFNA) 在免疫系统中的应用展现出多方面的调节作用, 主要涉及炎症反应调控、免疫细胞功能调节、自身免疫疾病治疗等方面。

### 4.6.1 调控炎症反应

tFNA在调节炎症反应方面表现出显著效果。研究发现, tFNA能够调节巨噬细胞RAW264.7中诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的转录水平, 从而减少脂多糖 (LPS) 诱导的一氧化氮 (NO) 产生。在巨噬细胞M1/M2极化方面, tFNA能刺激M1型标志物一氧化氮合酶的表达, 同时抑制M2型标志物精氨酸酶的表达。更重要的是, 与脂多糖处理组相比, tFNA处理组的多种重要炎症因子 (如IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ ) 水平显著降低, 表明炎症反应得到缓解。

### 4.6.2 免疫细胞功能调节

tFNA在免疫细胞功能调节方面展现出全面而独特的作用, 涉及巨噬细胞、T细胞、树突状细胞 (DC) 等与免疫系统相关的多种细胞行为和相关生理过程。研究发现, 负载miR-155的tFNA能有效诱导巨噬细胞向抗血管生成的M1型极化, 这一发现在眼科疾病治疗中具有重要意义。在激光诱导的脉络膜新生血管 (CNV) 小鼠模型中, 将miR-155负载的tFNA注射入玻璃体后, 观察到CNV面积显著减少, 血管渗漏得到有效抑制, 炎症反应明显改善。这些结果表明, 通过调控巨噬细胞极化, tFNA-miR-155复合物能够有效缓解CNV相关的炎症反应, 为湿性年龄相关性黄斑变性等眼科疾病的治疗提供了新的思路。

在T细胞功能调节方面, 负载miR-155的tFNA在免疫抑制模型中展现出显著的保护作用。研究表明, 这种复合物能促进T细胞增殖, 增强其抵抗氧化应激的能力, 同时缓解环磷酸腺苷诱导的免疫抑制小鼠的脾脏和胸腺损伤, 减轻造血抑制。这些发现对于化疗后免疫功能恢复和预防机会性感染具有重要意义, tFNA-miR-155复合物可能成为化疗辅助治疗的潜在选择。

tFNA-miR-155复合物还在调节树突状细胞 (DC) 分化方面发挥重要作用。体外研究揭示, 通过调节ERK1/2信号通路, 这种复合物能诱导未成熟DC向成熟DC分化, 从而增强抗原呈递能力和T细胞激活能力。这一发现为提高疫苗效果和开发新型免疫治疗策略提供了新的思路。此外, tFNA还能通过NF- $\kappa$ B信号通路将M0型巨噬细胞转化为具有更强抗原呈递能力的M1型, 进一步增强整体抗原呈递能力和免疫监视功能。

在骨髓微环境保护方面, 负载骨生成肽 (OGP) 的tFNA展现出独特优势。研究发现, 这种复合物能够保护骨髓基质细胞免受化疗药物5-氟尿嘧啶 (5-FU) 诱导的DNA损伤和凋亡。通过激活细胞外信号调节激酶 (ERK) 信号通路, 下调凋亡相关蛋白的表达, OGP-tFNA复合物不仅保护了造血细胞及其微环境, 还促进了造血再生。这一发现为减轻化疗对造血系统的副作用提供了新的策略, 可能有助于提高化疗的安全性和有效性。

### 4.6.3 自身免疫疾病治疗

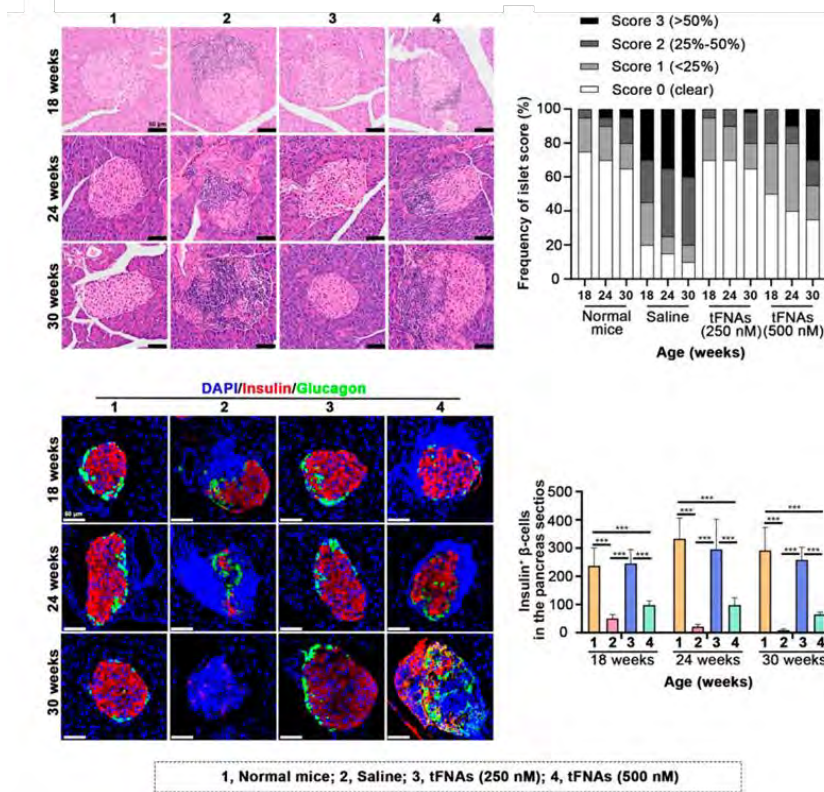
tFNA在自身免疫疾病治疗领域展现出广泛的应用前景, 涵盖了多种复杂的免疫介导疾病。在1型糖尿病的研究中, tFNA展示了恢复免疫耐受的潜力。通过抑制自身反应性T细胞并诱导调节性T细胞 (Tregs) 的产生, tFNA治疗能有效维持正常血糖水平, 显著降低糖尿病发病率 (图 53)。更为重要的是, 这种治疗方法不仅保护了胰岛 $\beta$ 细胞的质量和功能, 还增加了调节性T细胞数量, 同时抑制了自身反应性T细胞。这一多方位的调节作用为1型糖尿病的治疗提供了新的思路, 有望改变传统的治疗模式。

在代谢紊乱相关的自身免疫问题中, 研究者创新性地将白藜芦醇 (RSV) 整合到tFNA中, 开发出一种新型复合物。这种RSV-tFNA复合物通过改善炎症环境来改善胰岛素抵抗, 展现出独特的双重作用。在适应性免疫反应方面, 它能抑制促炎症的Th17和Th1细胞的激活, 同时促进具有抗炎作用的调节性T细胞和Th2细胞的产生。这种T细胞亚型分布的调节为治疗代谢综合征和相关自身免疫疾病提供了新的策略。

来源: 公开资料, 文献检索, 沙利文分析

## 4.6 在免疫系统中的应用

图53: tFNA治疗助于血糖控制



针对糖尿病并发症，研究者开发了一种创新性的治疗方法。通过将靶向晚期糖基化终末产物受体（RAGE）的siRNA装载到tFNA中，研究者实现了对RAGE表达的持续下调。这种方法不仅发挥了显著的抗氧化作用，还通过NF- $\kappa$ B通路缓解了炎症反应。考虑到RAGE在多种糖尿病并发症中的关键作用，这一策略可能为预防和治疗糖尿病相关的血管病变、神经病变等并发症提供新的选择。

在神经系统自身免疫疾病方面，tFNA同样展现出独特的治疗潜力。研究发现，tFNA能通过JNK信号通路抑制c-Jun N-末端激酶（JNK）和ERK的磷酸化，从而显著抑制T细胞激活剂干扰素 $\gamma$ （IFN $\gamma$ ）的分泌。这一作用机制在视神经脊髓炎谱系疾病（NMOSD）患者的自身反应性T细胞中得到了验证，为这类难治性神经系统自身免疫疾病的治疗提供了新的思路。

干燥综合征（Sjögren's syndrome, SS）是一种常见的自身免疫疾病，以外分泌腺功能障碍为特征。tFNA在干燥综合征治疗中展现出多方面的治疗效果。研究表明，tFNA治疗能有效抑制炎症，促进唾液分泌，恢复特定功能蛋白的合成，并保护颌下腺腺泡细胞的结构完整性。在体内实验中，tFNA不仅增加了调节性T细胞（Tregs）的比例，还抑制了T辅助细胞反应。在B细胞方面，tFNA减少了生发中心B细胞和浆细胞的数量，同时显著增加了具有免疫调节作用的调节性B细胞数量。这种全面的免疫调节作用可能与血清细胞因子水平的改变有关，为SS的治疗提供了新的靶点和策略。

在已有的研究中，tFNA在自身免疫疾病治疗中展现出多靶点、多层次的调节作用。从调节T细胞亚群平衡，到影响B细胞分化，再到调控细胞因子网络，tFNA几乎涉及了自身免疫反应的各个关键环节。这种全面的免疫调节能力使tFNA成为开发新型自身免疫疾病治疗策略的理想平台。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 4.7 在抗菌治疗中的应用

细菌感染是一个全球性的重大健康问题，每年影响数百万人，导致各种疾病和健康并发症。细菌感染的直接影响常常表现为对组织的物理损害，但它还可能对人体组织再生能力产生深远的影响。细菌毒素和炎症反应可能干扰组织修复和再生过程中复杂的细胞机制，导致愈合延迟或不完整。更为严峻的是，耐药菌株的出现使得感染治疗和组织再生变得越来越具有挑战性。因此，开发新的治疗方法来对抗细菌感染并支持组织再生已成为当务之急。

在这一严峻的形势下，核酸四面体 (tFNA) 已被科学家开发为多功能抗菌辅助工具，也已展现出巨大潜力。tFNA具有优异的递送能力、丰富的修饰位点和高细菌吸附率等特点，使其成为抗菌研究领域的热点。目前的研究表明，基于tFNA的纳米平台能够抑制多种细菌菌株，包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA)、牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*) 和大肠杆菌 (*E. coli*) 等。tFNA的抗菌机制多样，包括提高抗生素的摄取率、防止抗生素外排、通过转录调控抑制细菌生长，以及抑制生物被膜形成等。

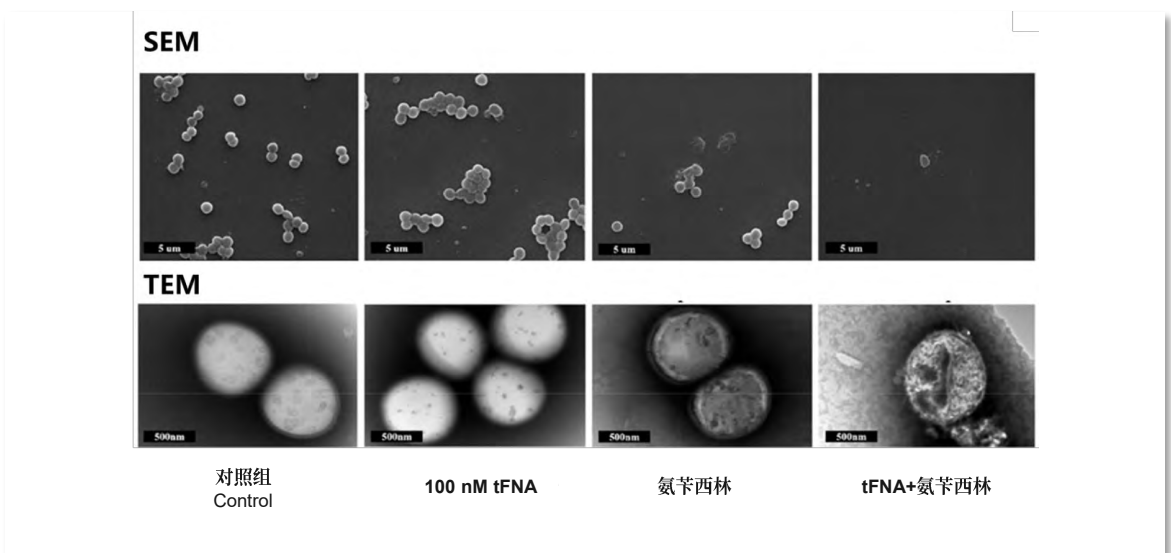
近年来，tFNA已被开发成为一种新型递送系统，能够高效地将抗生素 (antibiotics)、肽核酸 (peptide nucleic acids, PNAs)、抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 和反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASOs) 等多种抗菌物质递送到细菌中。这种多功能性使tFNA在抗菌领域展现出独特优势，为解决耐药性问题和提高抗菌治疗效果提供了新的可能性。

本节将总结近年来基于tFNA的新型抗菌策略，并深入探讨其潜在的作用机制。通过分析tFNA在不同类型细菌感染中的应用，我们将揭示这种新型纳米材料如何改变传统抗菌方法，为克服耐药性和促进组织再生开辟新的途径。这些创新性的抗菌策略不仅有望提高感染治疗的效果，还可能为组织工程和再生医学领域带来新的机遇，从而为解决细菌感染这一全球性健康挑战提供全新的思路。

### 4.7.1 与抗生素联合使用

tFNA与抗生素的联合使用在抗菌领域展现出显著的协同效应，特别是针对耐药菌株。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 作为一种重要的院内和社区感染病原体，在全球范围内占有金黄色葡萄球菌感染的13%至74%，对公共健康构成巨大威胁。传统的广谱β-内酰胺类抗生素如氨苄西林，由于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的多重耐药机制，在常规剂量下往往难以发挥有效作用。

图54: tFNA-氨苄西林复合物提高了抗MRSA能力



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 4.7 在抗菌治疗中的应用

为了提高氨苄西林对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抗菌效果，科学家开发了一种创新性的tFNA-氨苄西林复合物。这种复合物不仅表现出高包封率和良好的稳定性，更重要的是，它显著提高了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌对抗生素的摄取率。流式细胞术和共聚焦显微镜观察结果表明，MRSA18908（一种耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株）对tFNA-氨苄西林的摄取率远高于单独使用氨苄西林。更为显著的是，tFNA-氨苄西林对MRSA的最小抑菌浓度（MIC）仅为单独使用氨苄西林的一半，远低于欧洲抗菌药物敏感性测试委员会（European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing）推荐的耐药剂量。形态学观察揭示，tFNA-氨苄西林对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌细胞壁的破坏作用比游离氨苄西林更强（图 54）。这可能是因为tFNA提高了氨苄西林与青霉素结合蛋白2（PBP2）的结合效率，而PBP2是细菌细胞壁主要成分肽聚糖合成的关键蛋白。这一发现为解释tFNA-氨苄西林复合物的增强抗菌效果提供了分子机制层面的解释。

类似地，研究者将红霉素装载到tFNA中，评估其对大肠杆菌的抗菌活性。结果显示，tFNA-红霉素复合物比游离红霉素表现出更强的抑菌效果。研究者推测，这可能是由于tFNA增加了细菌细胞膜的通透性，使红霉素能更有效地进入细胞内。值得注意的是，革兰氏阴性细菌因其独特的厚细胞外膜结构，对大多数抗生素表现出高度耐药性，并且这种耐药性正在不断加强。厚细胞外膜阻碍了大多数抗生素进入细菌细胞膜，此外，革兰氏阴性细菌还具有外排泵系统，能够主动将抗生素排出体外，从而增强其存活能力。面对这一挑战，tFNA的优异跨膜能力使其成为递送抗生素的理想平台，有望增强抗生素对革兰氏阴性细菌的杀菌活性。聚焦于设计特殊的适配体，未来的研究有望进一步提高tFNA的靶向性和递送效率。同时，在基因水平上降低抗生素的最小抑菌浓度（MIC）也是一个重要方向，这可能直接消除耐药菌株。此外，探索tFNA与其他抗菌策略的协同作用，如光动力治疗或免疫调节，可能为开发更有效的抗耐药菌感染治疗方案提供新的思路。

可以认为，tFNA与抗生素的联合使用为克服细菌耐药性开辟了新的途径。通过提高抗生素的细胞摄取、增强其与靶标的结合以及改变细菌膜通透性等多重机制，tFNA-抗生素复合物展现出优于传统抗生素的抗菌效果。这种策略不仅有望提高现有抗生素的使用效率，还可能为开发新型抗菌剂提供思路。

### 4.7.2 与肽核酸（PNA）联合使用

经此前介绍内容我们知道，肽核酸（peptide nucleic acids, PNAs）作为一种人工合成的寡核苷酸模拟物，因其独特的结构和性质，其在抗菌领域呈现出良好的应用的潜力。与传统核酸不同，PNAs具有中性肽骨架而非带负电的磷酸核糖骨架，这种结构使其兼具肽和核酸的特性，同时拥有多项优势：良好的稳定性、强大的结合能力和优异的特异性。PNAs能够形成比天然DNA或RNA更稳定的双链结构，不易被核酸酶降解，这使其在生物体内有更长的半衰期。同时，PNAs与靶标序列的结合能力比传统核酸更强，能够有效竞争和置换已经存在的DNA或RNA双链。此外，PNAs的结合特异性极高，即使单个碱基错配也会显著降低其结合能力，这为精确靶向特定基因提供了可能。这些特性使PNAs成为极具前景的治疗应用工具，特别是在抗菌和基因调控领域。

先前的研究表明，反义PNA寡聚体能够通过抑制细菌的翻译过程，在微摩尔浓度下有效抑制细菌生长。PNAs可以与细菌mRNA形成稳定的复合物，阻止核糖体结合或移动，从而抑制蛋白质的合成。这种机制不同于传统抗生素，有望克服现有的耐药机制。然而，PNAs的应用面临着一些挑战。首先，PNAs骨架的疏水性导致其水溶性较差，难以有效递送到细菌细胞中。这种疏水性不仅影响PNAs在水溶液中的分散性，还可能导致非特异性聚集，降低其生物利用度。其次，某些细菌通过编码转运蛋白的基因突变，能够阻止这些肽的摄取。这种适应性机制可能会限制PNAs的长期治疗效果。因此，开发能够有效递送PNAs且对哺乳动物细胞无害的新型载体成为一项迫切需求。

tFNA的出现为解决这一问题提供了新的思路。tFNA作为一种精确可控的纳米级结构，具有优异的生物相容性和可修饰性，为PNAs的递送提供了理想平台。2017年，Readman等科学家开发了一种创新性的tFNA纳米颗粒平台，将靶向抗blaCTX-M-group 1的反义PNA（PNA4）整合其中。这种PNA4此前已被证实能抑制大肠杆菌中blaCTX-M-15的表达，部分恢复头孢噻肟（cefotaxime, CTX）对敏感性降低菌株的抗菌活性。blaCTX-M-15是一种常见的产超广谱β-内酰胺酶（ESBL）基因，其表达是导致细菌对多种β-内酰胺类抗生素产生耐药性的主要原因之一。研究结果显示，tFNA-PNA4能以剂量依赖的方式增强CTX的抗菌活性，显著降低最小抑菌浓度（MIC）。这意味着通过使用tFNA-PNA4，可以在较低剂量下实现有效的抗菌效果，从而减少抗生素的使用量和潜在的副作用。值得注意的是，单独使用tFNA载体并未观察到生长抑制效应，这证实了PNA4在抗菌过程中的关键作用，同时也说明tFNA本身对细菌生长无直接影响，具有良好的生物安全性。

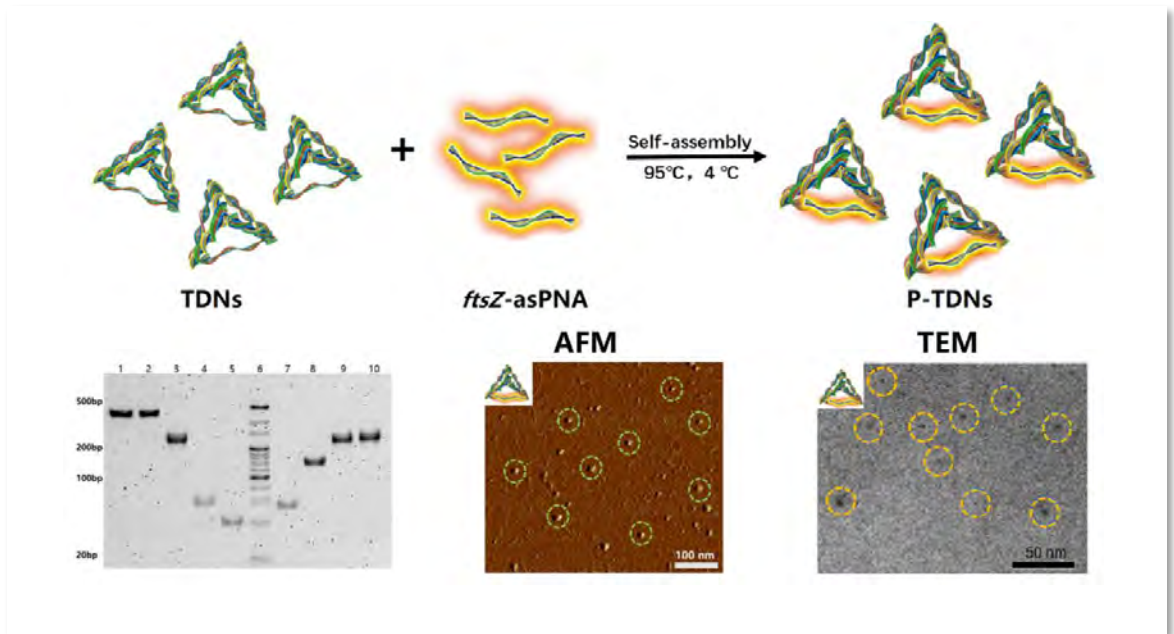
来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 4.7 在抗菌治疗中的应用

类似地，另一项研究将靶向细菌细胞分裂关键基因ftsZ的反义肽核酸（asPNA）插入tFNA结构中（图 55）。ftsZ基因编码FtsZ蛋白，这是细菌细胞分裂过程中形成Z环的关键组分，抑制其表达可以有效阻止细菌的分裂增殖。这种设计是通过改变tFNA单链上的短序列来实现的，展示了tFNA结构的高度可修饰性。实验结果发现，tFNA-asPNA能够被耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）细胞轻易摄取，并通过降低ftsZ的表达，以剂量依赖的方式有效抑制MRSA的生长。这一发现对于对抗MRSA这种难治性耐药菌株具有重要意义，为开发新型抗MRSA策略提供了新的方向。

然而，这种创新性策略仍面临一些挑战。研究发现，与裸露的tFNA相比，tFNA-asPNA结构更容易降解。这可能是由于DNA双链之间应力分布不均衡导致的。因此，如何提高载体的稳定性仍是需要进一步研究的问题。这些研究不仅证明了tFNA作为PNAs递送载体的可行性，还展示了这种策略在克服细菌耐药性方面的巨大潜力。通过精确靶向细菌的关键基因，tFNA-PNA复合物提供了一种全新的抗菌机制。

图55: tFNA与PNA结合用于抗菌治疗的平台



### 4.7.3 与抗菌肽（AMP）联合使用

抗菌肽（antimicrobial peptides, AMPs）是一类多样化的生物活性寡肽，因其独特的作用机制而在抗击耐药菌方面展现出巨大潜力。AMPs主要通过破坏细菌细胞壁来实现抗菌效果，这种机制与传统抗生素有所不同，因此有望克服现有的耐药问题。AMPs的作用机制通常包括直接与细菌细胞膜相互作用，形成孔道或破坏膜结构，导致细胞内容物泄漏和细菌死亡。此外，一些AMPs还能进入细菌细胞内，干扰核酸和蛋白质的合成，或与细胞内关键组分相互作用。这种多重作用机制使得细菌难以快速产生耐药性。然而，AMPs的应用仍面临一些挑战，包括其抗菌活性和稳定性需要进一步优化。在生理环境中，AMPs容易被蛋白酶降解，限制了其治疗效果。此外，某些AMPs在高盐浓度下可能会失活，这也限制了它们在某些生理条件下的应用。

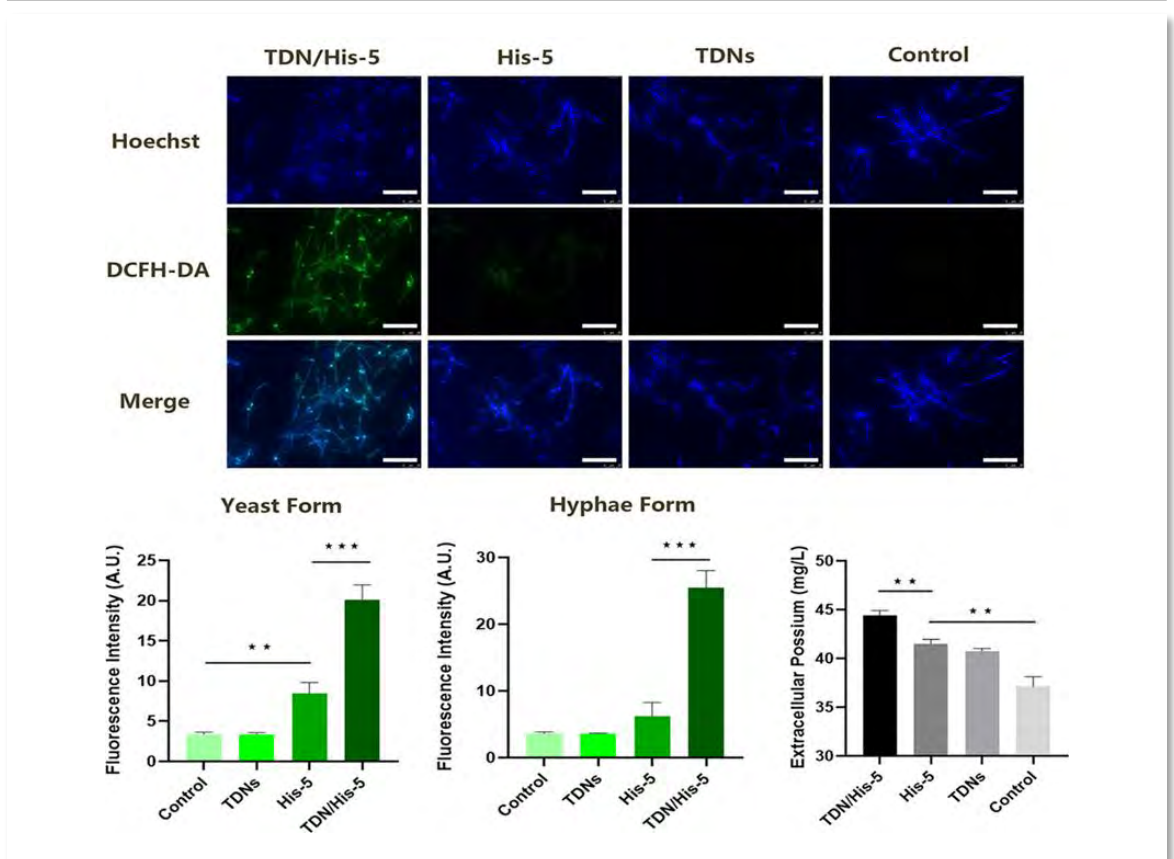
来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 4.7 在抗菌治疗中的应用

为了解决这些问题，研究者们将目光投向了核酸四面体（tFNA）。tFNA作为一种精确可控的纳米级结构，具有优异的生物相容性和可修饰性，为AMPs的递送提供了理想平台。2020年的一项研究中，抗菌肽GL13K通过静电相互作用被成功包覆在tFNA表面。GL13K是一种人工合成的抗菌肽，源于人唾液中的涎凝集素蛋白，具有广谱抗菌活性。这种方法实现了约95%的高装载效率，在tFNA与GL13K比例为1:500时达到最佳效果。这种高装载效率不仅提高了AMPs的利用率，还可能降低所需的给药剂量，减少潜在的副作用。更重要的是，tFNA显著提高了GL13K在富含牙龈卟啉单胞菌（*P. gingivalis*）蛋白酶的细胞外环境中的稳定性，有效减少了GL13K的降解。这一发现对于口腔感染的治疗具有重要意义，因为*P. gingivalis*是牙周炎的主要病原菌之一，其分泌的蛋白酶常常降低AMPs的治疗效果。

流式细胞术分析进一步揭示，tFNA能够显著提高大肠杆菌（*E. coli*）和牙龈卟啉单胞菌对GL13K的摄取。这种增强的细胞摄取可能是由于tFNA改变了细菌细胞膜的通透性，或者为GL13K提供了更有效的细胞靶向机制。这种增强的细胞摄取最终导致两种细菌菌株的变形和解体，展示了tFNA-GL13K复合物强大的抗菌效果。这一发现不仅证明了tFNA作为AMPs载体的可行性，还表明这种策略可以有效增强AMPs的抗菌活性，特别是对于革兰氏阴性菌（如大肠杆菌和牙龈卟啉单胞菌），这类细菌通常因其复杂的细胞壁结构而对某些AMPs具有天然抗性。

图56: tFNA与AMP结合提高抗菌效果



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析



## 4.7 在抗菌治疗中的应用

另一项研究同样采用静电吸引方法将另一种抗菌肽样分子Histatin 5与tFNA结合（图 56）。Histatin 5是一种天然存在于人唾液中的抗菌肽，具有独特的抗真菌活性。实验结果显示，tFNA-Histatin 5复合物具有优异的稳定性和对念珠菌（*Candida albicans*）表现出增强的杀菌活性。这一发现进一步拓展了tFNA-AMPs复合物的应用范围，表明这种策略不仅适用于抗细菌，还可用于抗真菌治疗。这对于口腔真菌感染的预防和治疗具有重要意义，特别是对于免疫功能低下的患者。

这些研究结果表明，tFNA不仅是装载AMPs进行抗菌应用的理想载体，还可能适用于其他类型的蛋白酶敏感AMPs的治疗应用。例如，tFNA可以作为抗菌AMPs和其他治疗分子（如抗炎或促进成骨的AMPs）的共递送系统，用于治疗结膜炎、牙周炎和感染性骨缺损修复等体内感染模型。在结膜炎治疗中，tFNA-AMPs复合物可能通过局部给药实现长效抗菌，同时减少全身副作用。

对于牙周炎，tFNA-AMPs不仅可以抑制致病菌，还可能通过递送促进成骨的AMPs来促进牙槽骨再生。在感染性骨缺损修复中，tFNA-AMPs复合物可以同时解决感染控制和骨组织再生的双重挑战。这种多功能递送系统有望实现协同治疗效果，同时解决感染和组织修复的问题，为复杂感染性疾病的治疗提供新的策略。

### 4.7.4 与反义寡核苷酸（ASO）联合使用

反义寡核苷酸（antisense oligonucleotides, ASOs）是一类短链的单链DNA或RNA序列，通常长度为15—25个核苷酸，能够通过其序列与目标基因的mRNA形成互补配对，从而阻断基因的转录或翻译过程。这种作用机制基于沃森-克里克（Watson-Crick）碱基配对原理，具有高度的序列特异性，因此，反义寡核苷酸（ASOs）作为一种精准的基因调控工具。

ASOs可以通过多种机制发挥作用，包括诱导RNA酶（RNase H）介导的mRNA降解、阻止核糖体结合或移动、干扰mRNA剪接等。这种独特的作用机制使ASOs成为治疗多种疾病，包括细菌感染、癌症、遗传疾病等的有前景的候选物。

然而，天然ASOs的应用面临着一些重大挑战：首先，它们在体内容易被核酸酶快速降解，导致治疗效果短暂，通常半衰期仅为几分钟到几小时。这种快速降解不仅降低了治疗效果，还可能增加给药频率，影响患者依从性。其次，特异性不足可能引起非特异性结合，影响治疗效果并可能导致脱靶效应。ASOs可能与非目标序列部分互补，导致意外的基因调控。此外，某些ASOs可能引起毒性副作用，如激活免疫系统导致的炎症反应、肝毒性或肾毒性等，这些都限制了其临床应用。

为了克服这些限制，研究者们将目光投向了核酸四面体（tFNA）。tFNA作为一种可精确设计的纳米级结构，具有多项优势：首先，其三维结构可以为ASOs提供物理保护，减少核酸酶的降解；其次，tFNA的可修饰性允许研究者在其表面添加靶向分子或功能基团，提高ASOs的靶向性和细胞摄取效率；再者，tFNA本身具有良好的生物相容性和低免疫原性。理论上，ASOs可以通过互补碱基配对与tFNA结合，这种结合方式不仅能保护ASOs免受降解，还可能通过tFNA的纳米尺寸效应提高其细胞摄取效率和靶向性。

2020年，科学家开发了一种创新性的ASO修饰tFNA递送系统（图 57）。这个系统通过自组装四条单链DNA和一条ASO序列构建而成，展现出优异的稳定性和细胞穿透能力。

与传统的ASO递送系统相比，如脂质纳米粒或聚合物载体，tFNA-ASO复合物具有更精确的结构控制和更好的生物相容性。研究者选择了变形链球菌（*S. mutans*）作为研究对象，这种细菌是龋齿形成的主要病原体之一，其生物被膜形成能力是导致持续性感染的关键因素。结果发现tFNA-ASO复合物能够轻松穿透*S. mutans*的细胞壁，将ASO有效递送到细菌细胞内。这种高效的细胞摄取可能是由于tFNA的纳米尺寸和独特的三维结构，使其能够更容易地与细菌细胞膜相互作用并被内吞。

更为重要的是，这种系统能够同时靶向多个关键基因（*gtfBCD*、*gbpB*和*ftf*）。*gtfBCD*基因编码葡萄糖基转移酶，负责合成不溶性葡聚糖；*gbpB*基因编码葡聚糖结合蛋白，参与细菌的黏附；*ftf*基因则编码果糖基转移酶，参与果聚糖的合成。这些基因在细菌的胞外多糖合成和生物被膜形成过程中起着关键作用。

通过抑制这些基因的表达，tFNA-ASO复合物显著减少了胞外多糖的合成，有效抑制了生物被膜的形成。这种多基因靶向策略不仅提高了抗菌效果，还可能降低细菌产生耐药性的风险，因为同时突变多个关键基因的概率较低。

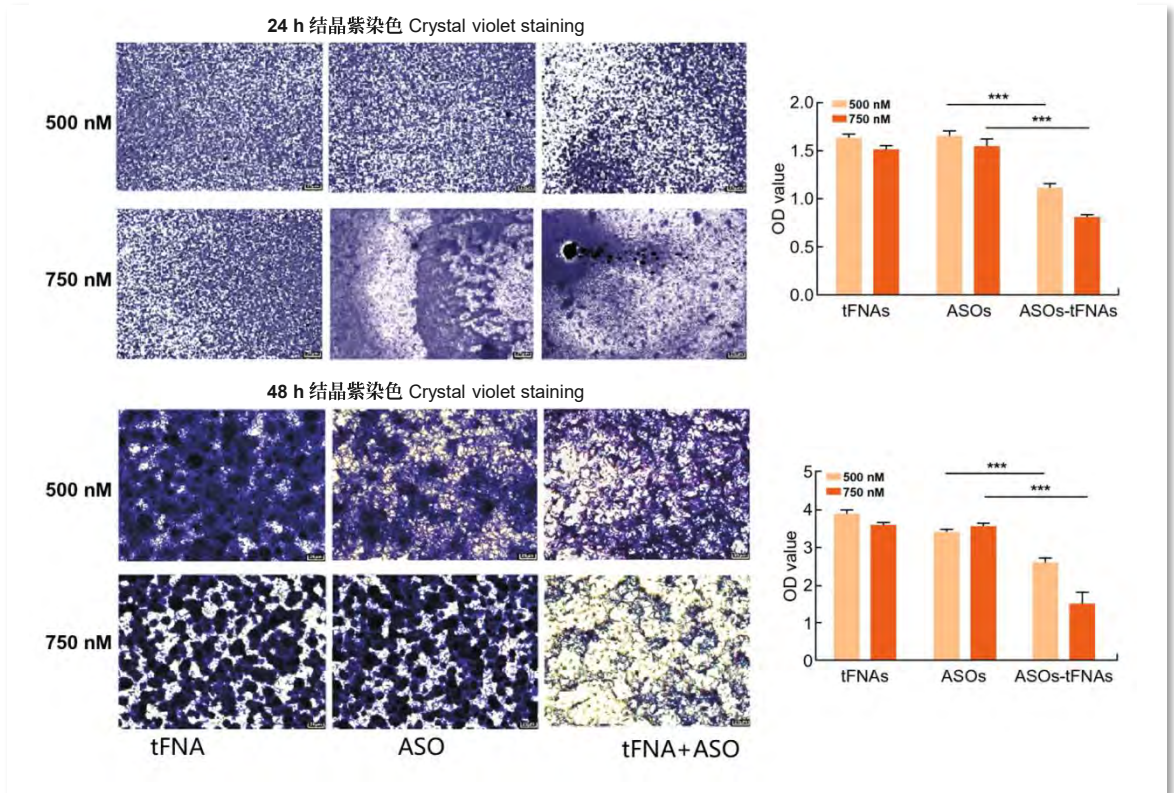
来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 4.7 在抗菌治疗中的应用

这一发现对于治疗慢性生物被膜（biofilm）介导的感染具有重要意义，为早期清除和预防生物被膜形成提供了新的策略。生物被膜是细菌感染持续性和耐药性的主要原因之一，传统抗生素往往难以穿透生物被膜。tFNA-ASO复合物通过阻止生物被膜形成的关键步骤，可能是预防和治疗生物被膜相关感染的一条新途径。这项研究代表了ASOs与tFNA在抗菌应用中结合的首次尝试，其结果为治疗慢性生物被膜介导的感染提供了新的方向。通过早期干预和清除，这种方法可能会显著改善传统抗生素治疗的效果，特别是对于那些难以根除的持续性感染。例如，在口腔医学领域，这种策略可能用于预防龋齿和牙周炎；在医疗器械相关感染方面，可能用于预防导管或植入物表面的生物被膜形成。

然而，这项研究也提出了一些需要进一步探索的问题。首先，需要评估这种方法在不同类型的细菌菌株和生物被膜中的有效性。不同细菌的细胞壁结构和基因表达模式可能会影响tFNA-ASO复合物的效果。例如，革兰氏阴性菌的外膜可能会对tFNA-ASO的穿透造成额外障碍。其次，长期的安全性和可能的耐药性发展也需要深入研究。虽然基因靶向策略可能降低传统耐药性的风险，但细菌可能会通过其他机制适应这种治疗，如改变靶基因序列或上调替代通路。此外，tFNA-ASO复合物在体内的代谢和清除机制、潜在的免疫原性以及与宿主细胞的相互作用都需要进一步评估。

图57：TND与ASO结合提高抗生物被膜（biofilms）性能



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

The background features a blue-to-purple gradient with faint molecular models and a globe. A white hexagonal frame is centered on the page.

## 第五章

05

# 核酸四面体在 皮肤领域应用

## 5.1 促进皮肤伤口无瘢痕愈合

核酸四面体 (tFNA) 在皮肤应用领域展现出广阔的前景，其独特的结构和性质为多种皮肤问题的治疗提供了新的可能。作为一种多功能的纳米材料，tFNA不仅可以直接参与皮肤组织的修复和再生过程，还可以作为药物载体。本节将详细探讨tFNA在皮肤领域的六个典型应用案例，涵盖从促进伤口愈合到防脱发等多个方面。这些应用充分展示了tFNA在皮肤医学和美容领域的潜力，也为开发新型皮肤治疗策略和产品提供了有力支持。

在前述章节中，我们详细阐述了核酸四面体 (tFNA) 在皮肤和软组织中的多样化应用。这些应用策略实际上涵盖了皮肤伤口愈合的不同阶段和过程。为了更系统地理解tFNA在伤口愈合中的作用，本小节将从伤口愈合的一般过程角度出发，对tFNA在各个愈合阶段的作用进行概述。

### 5.1.1 皮肤伤口愈合阶段

我们将按照伤口愈合的四个主要阶段——止血期、炎症期、增殖期和重塑期——来梳理tFNA的作用机制。通过这种方式，我们可以更清晰地看到tFNA如何在整个愈合过程中发挥多重作用，从而全面促进伤口修复。值得注意的是，本节将主要聚焦于tFNA在各阶段的关键作用和机制，按照伤口愈合时序的概述方法，希望能有助于我们理解tFNA在不同愈合阶段的特定作用，也能让我们更好地把握tFNA作为一种多功能治疗试剂在整个愈合过程中的连续性影响。

皮肤伤口愈合是一个复杂而精密的生物学过程，通常分为四个相互重叠的阶段：止血期、炎症期、增殖期和重塑期。

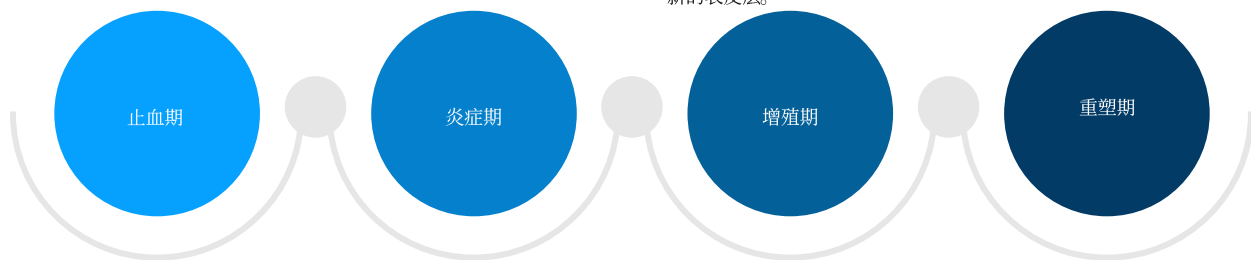
#### 皮肤伤口愈合的四个阶段

是伤口愈合的第一阶段，通常在受伤后立即开始，持续几分钟到几小时。在这个阶段，血小板聚集在伤口部位，形成血凝块以阻止出血。同时，血小板释放多种生长因子和细胞因子，为后续的修复过程提供信号。

炎症期紧随其后，通常持续3—5天。在此期间，中性粒细胞和巨噬细胞等免疫细胞被招募到伤口部位，清除细菌和细胞碎片。这些细胞还会释放细胞因子和生长因子，进一步刺激修复过程。然而，过度或持续的炎症反应可能会延迟愈合。

大约在受伤后3天开始，可持续2~3周。这个阶段的主要特征是新组织的形成。成纤维细胞迁移到伤口部位并产生新的细胞外基质，主要是胶原蛋白。同时，新的血管形成（血管新生）以供应氧气和营养。表皮细胞开始在伤口边缘增殖和迁移，形成新的表皮层。

是最后一个阶段，可持续数月甚至数年。在这个阶段，新形成的组织逐渐重组和加强。胶原纤维重新排列，提高伤口的强度，瘢痕组织逐渐成熟。



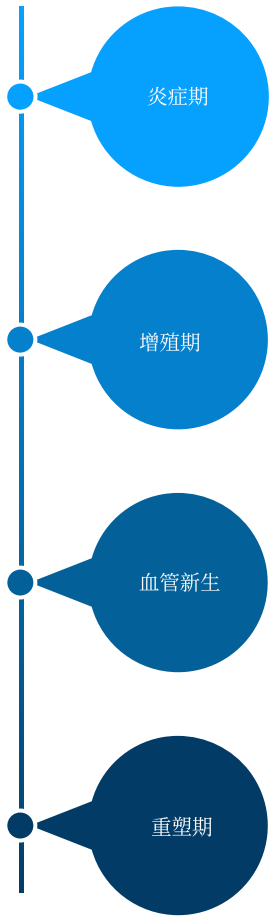
来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 5.1 促进皮肤伤口无瘢痕愈合

### 5.1.2. tFNA在皮肤伤口愈合过程中的作用

tFNA在这一复杂的愈合过程中展现出多方位的治疗潜力，其作用贯穿伤口愈合的全过程。

#### tRNA在皮肤愈合过程中的作用



在炎症期，tFNA主要通过调控炎症反应和氧化应激来发挥作用。研究发现，tFNA能够激活Akt/Nrf2/HO-1信号级联，这一通路在氧化应激反应和细胞保护中起关键作用。通过这一机制，tFNA显著抑制了促炎因子TNF- $\alpha$ 和IL-6的表达，同时增强了细胞的抗氧化能力。进一步研究揭示了tFNA在抑制活性氧（ROS）产生方面的作用，这对于防止过度的氧化损伤至关重要。值得注意的是，tFNA不仅能够直接清除自由基，还能通过上调抗氧化酶的表达来增强细胞的内源性抗氧化防御系统。这种多重的抗炎和抗氧化作用有助于控制过度的炎症反应，为后续的组织修复创造有利条件。

在增殖期，tFNA的作用更加多元化，主要体现在促进细胞增殖、迁移和血管新生三个方面。相关研究详细阐述了tFNA如何通过激活AKT信号通路来促进角质形成细胞（HaCaT）和成纤维细胞（HSF）的增殖和迁移。通过实时细胞分析技术（RTCA）和划痕实验，研究者观察到tFNA处理组的细胞填充伤口区域的速度比对照组快约30%。更为重要的是，tFNA还能促进成纤维细胞分泌多种生长因子，如血小板衍生生长因子（PDGF）和转化生长因子- $\beta$ （TGF- $\beta$ ），这些因子在伤口愈合中扮演着关键角色。

在血管新生方面，已有研究发现tFNA不仅能够上调VEGF-A的表达，还能促进内皮细胞中一氧化氮合酶（eNOS）的活化，从而增加NO的产生。通过体外管腔形成实验，研究者观察到tFNA处理后的内皮细胞形成的血管样结构数量增加了约50%，管腔长度也显著延长。这种促血管新生的效果在体内实验中得到了进一步验证，tFNA处理的伤口区域显示出更高密度的新生血管网络。

在重塑期，tFNA主要通过调节细胞外基质合成和抑制过度纤维化来改善愈合质量。研究显示，tFNA处理能够促进I型和III型胶原的均衡合成，这对于恢复皮肤的强度和弹性至关重要。通过皮肤张力测试和组织学分析，他们发现tFNA处理组的伤口愈合质量显著优于对照组，伤口抗张强度提高了约40%。同时，另外一项研究揭示了tFNA在抑制纤维化方面的独特作用。他们发现tFNA能够通过调节Smad2/Smad3信号通路来抑制肌成纤维细胞的活化和过度增殖，从而减少瘢痕形成的风险。

多项体内实验进一步证实了tFNA的therapeutic效果。在小鼠全层皮肤缺损模型中，皮下注射tFNA溶液后，伤口闭合速度显著加快，且瘢痕面积减少。在糖尿病db/db小鼠模型中，tFNA处理不仅加速了伤口愈合，还显著改善了新生组织的质量，表现为更完整的表皮结构、更有序的胶原纤维排列和更高密度的毛细血管网络。

这些研究结果共同揭示了tFNA在皮肤伤口愈合中的多重作用机制和广泛应用前景。通过在伤口愈合的各个阶段发挥调节作用，tFNA展现出全面的调控能力，为开发新型伤口治疗策略提供了新的方向。

来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 5.2 缓解皮肤老化

### 5.2.1 缓解皮肤老化

核酸四面体 (tFNA) 在抗衰老领域展现出了多方面的应用潜力, 不仅体现在其本身的生物结构性能上, 还体现在其作为载体传递治疗分子的能力上。在前述章节中, 我们已经详细讨论了tFNA凭借其独特的结构特性, 能够抑制细胞死亡并清除衰老细胞, 这种能力在人皮肤成纤维细胞 (HDFs) 的衰老模型中得到了验证。这种直接作用为tFNA在缓解皮肤衰老方面奠定了基础。然而, tFNA在抗衰老领域的应用远不止于此, 其作为精确递送系统的潜力为开发更加高效的抗衰老策略提供了新的可能。

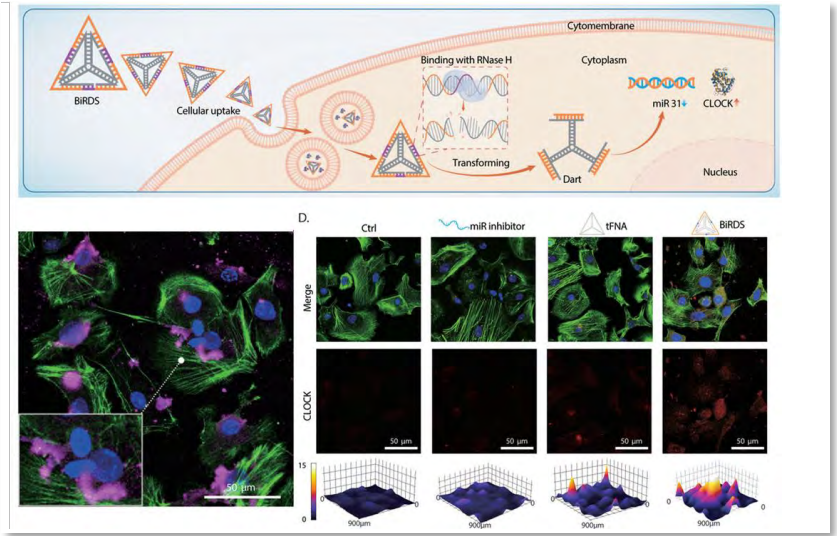
2022年的一项创新性研究利用tFNA作为载体给出用于缓解皮肤衰老的应用案例。他们设计了一种名为BiRDS (bioswitchable miRNA inhibitor delivery system, 生物可切换miRNA抑制剂递送系统, 也被称为“太阳神鸟”) 的新型递送平台, 巧妙地将miRNA抑制剂融合在四面体框架内 (图 58)。这种设计灵感来源于中国古代的“日与三足乌金饰”, 其中三个miRNA抑制剂代表三只不死鸟, 核酸核心则象征太阳。BiRDS不仅最大化了miRNA抑制剂的装载能力, 还保留了小尺寸tFNA的优良特性, 同时避免了传统装载方式中RNA暴露所带来的不稳定性。

研究者选择了miR-31抑制剂作为模型载荷, 这是一种最近被发现的对毛囊干细胞 (HFSCs) 具有显著抗衰老作用的miRNA。通过将BiRDS应用于皮肤衰老模型, 研究团队观察到了很好的抗衰老效果。在细胞水平上, BiRDS能够有效地被HFSCs摄取, 并通过抑制miR-31的表达, 上调CLOCK蛋白和角蛋白14的表达, 这与先前报道的抗衰老机制相一致。更为重要的是, 在体内实验中, 接受BiRDS治疗的小鼠表现出更深的毛发颜色、更高的毛发密度, 以及更快的毛发再生速度。

组织学分析进一步证实了BiRDS的治疗效果。

图58: tFNA作为载体的平台缓解皮肤老化

BiRDS处理后, 小鼠皮肤中HFSCs的数量显著增加, CLOCK蛋白表达上调, ERK磷酸化被抑制。这些分子水平的变化直接反映在组织形态上: 毛囊变得更大更饱满, 表皮层变厚, 这些都是改善衰老的典型特征。BiRDS的作用机制主要通过抑制miR-31的表达, 上调CLOCK蛋白来实现。CLOCK作为关键的昼夜节律基因, 其表达与毛发生长和皮肤衰老密切相关, 这一发现为理解皮肤衰老的分子机制提供了新的视角。



值得注意的是, BiRDS展现出优异的皮肤渗透能力和RNA递送效率。长期治疗后, BiRDS能够在表皮和真皮中均匀分布, 显示出强烈的荧光信号, 这证明了其作为经皮递送系统的潜力。同时, 长期使用BiRDS没有观察到皮肤炎症或其他不良反应, 表明其具有良好的生物相容性和安全性, 这对于开发临床可用的抗衰老策略至关重要。

这项研究不仅展示了tFNA作为miRNA递送载体在抗皮肤衰老方面的巨大潜力, 还提出了一种创新的miRNA抑制剂递送系统设计策略。BiRDS通过将miRNA抑制剂融合在tFNA框架内, 成功克服了传统递送方式的局限性, 实现了高效、稳定的RNA递送。这种方法为开发新型抗衰老策略提供了全新的思路。

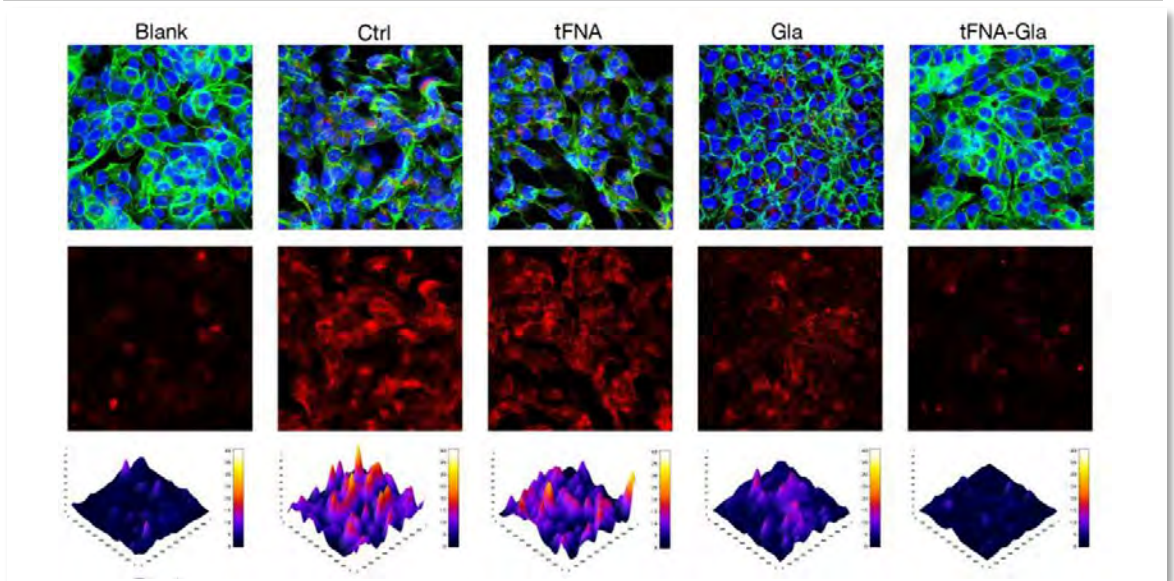
## 5.3 皮肤美白

核酸四面体 (tFNA) 在皮肤美白领域也展现出了应用潜力。在前述章节中，我们提到研究发现tFNA能够有效抑制皮肤纤维化，这有望将tFNA应用于制备预防或治疗皮肤硬皮病的药物。进一步，由于tFNA能够改善皮肤症状，可以将tFNA应用于美容中，具有抗皱、紧致嫩肤、美白等作用。

当然，tFNA也是一种药物载体，可承载其他治疗皮肤疾病或美容的药物，增强效果。2023年，科学家就开发了一种创新的皮肤美白治疗方法，利用tFNA作为载体递送光甘草定 (Glabridin, Gla)。研究者首先合成了tFNA，并将其与Gla混合形成复合物 (tFNA-Gla)。通过一系列表征方法，包括凝胶电泳、动态光散射、透射电镜和原子力显微镜，他们确认了tFNA-Gla的成功合成和稳定结构。结果显示，tFNA-Gla保持了四面体结构，平均粒径约为21.50 nm。

为了评估tFNA-Gla的细胞摄取能力和生物学效应，研究者使用B16黑色素瘤细胞进行了一系列体外实验。通过共聚焦显微镜和流式细胞观察，他们发现Cy5标记的tFNA-Gla能够有效进入细胞，并在6小时达到最高摄取水平。CCK-8实验结果表明，当tFNA与Gla的比例为1:160时，复合物具有最大药物负载能力，同时不会抑制细胞增殖。更重要的是，tFNA-Gla显著降低了B16细胞的黑色素含量，其效果优于单独使用Gla。进一步的机制研究揭示了tFNA-Gla的作用原理。Western blot和免疫荧光实验结果显示，tFNA-Gla能有效抑制酪氨酸酶 (TYR)、TRP-1、TRP-2和MITF的表达。这些蛋白是黑色素合成的关键调控因子，抑制它们的表达可以直接减少黑色素的产生。

图59: tFNA作为载体的平台调节黑色素相关基因促使皮肤美白



为了验证tFNA-Gla在体内的美白效果，研究者建立了C57BL/6J小鼠UVB诱导的黑色素沉着模型，并进行了为期14天的局部给药实验。结果发现，tFNA-Gla处理组小鼠耳朵皮肤的RGB值显著降低，表明具有明显的美白效果，其效果可与临床常用的4%氢醌相媲美 (图 59)。组织学分析进一步证实了这一发现，H&E染色和Masson三色染色结果显示，tFNA-Gla处理能够减少UVB诱导的表皮增厚和黑色素沉着。同时，研究者还探讨了tFNA-Gla的皮肤渗透性和安全性。通过荧光标记，他们观察到tFNA-Gla在给药24小时后能够渗透到表皮层，证明了其良好的经皮递送能力。同时，长期使用tFNA-Gla未观察到明显的皮肤炎症或其他不良反应，表明其具有良好的生物相容性，这对于开发临床可用的皮肤美白策略至关重要。

因此，这项研究成功开发了一种基于tFNA的经皮给药系统，能够有效递送Gla并抑制黑色素的产生。通过调控黑色素合成相关蛋白的表达，tFNA-Gla-Gla实现了显著的美白效果。该系统展现出优异的皮肤渗透能力、药物递送效率以及良好的生物相容性，是开发新型皮肤美白策略的一种新的尝试。

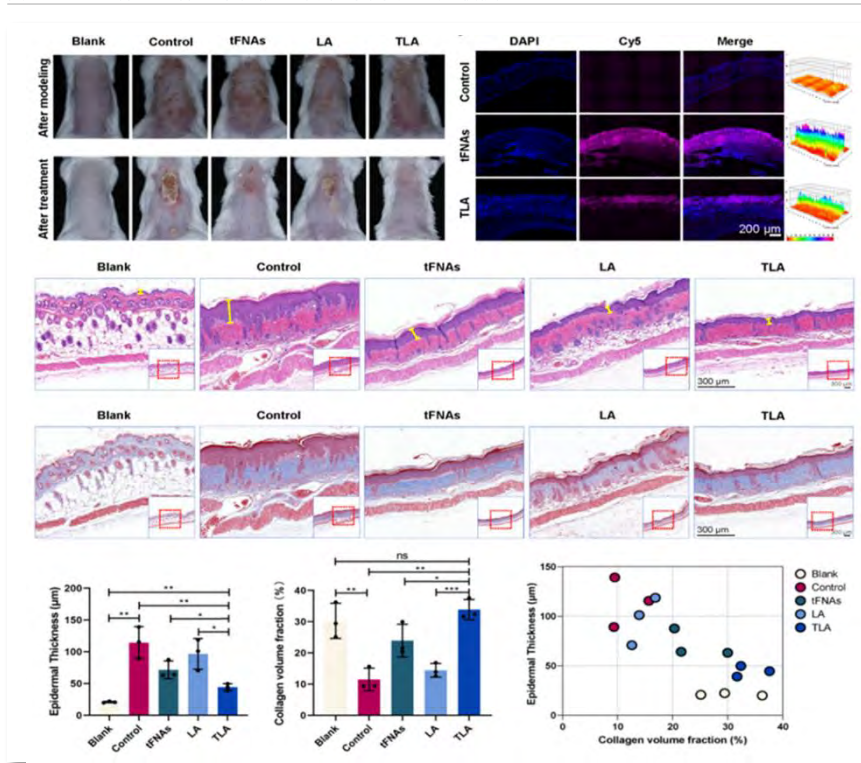
来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

## 5.4 修复光敏损伤

光敏损伤主要由紫外线 (UV) 辐射引起, 其中紫外线B (UVB, 波长: 280-320 nm) 是造成皮肤损伤的主要因素。UVB辐射会导致表皮和真皮细胞内产生大量的活性氧 (ROS) 和自由基, 从而引发氧化应激、DNA损伤和蛋白质损伤。为了研究核酸四面体 (tFNA) 在光敏损伤治疗中的应用, 研究人员开发了一种基于tFNA和硫辛酸 (LA) 的经皮药物递送系统。

在本研究中, 首先通过自组装程序合成了tFNA, 然后将硫辛酸 (LA) 与tFNAs混合, 生成tFNA-LA (TLA) 复合物。利用AFM和TEM分析了TLA的形态和结构, 结果显示tFNA为典型的三角锥结构, 而TLA更接近球形结构, 这表明LA的负载导致了颗粒形态的变化。动态光散射测量显示TLA的平均粒径为 $18.3 \pm 3.7$  nm。为了建立光损伤的HDF细胞模型, 研究采用窄谱UVB灯照射HDF细胞, 照射条件为 $100$  mJ/cm<sup>2</sup>。照射后, 细胞的黏附性减弱, 形态变形和收缩, 细胞质含量增加。研究发现, tFNA和TLA能够促进正常HDF细胞的增殖。在光损伤细胞中, TLA处理能够恢复细胞的增殖活性, 表明TLA对光损伤细胞具有促进增殖的作用。通过划痕实验发现, TLA处理显著提高了光损伤细胞的迁移速度, 恢复并超过了正常细胞的迁移速度。

图60: tFNA作为载体的平台修复紫外线等引起的光敏损伤



通过流式细胞术检测发现, UVB照射后HDF细胞的凋亡率显著增加, 而TLA处理有效抑制了凋亡的激活。ROS检测结果显示, 光损伤后细胞内ROS的产生增加了约250%, 而TLA处理能够显著降低ROS的产生, 接近正常水平。免疫荧光染色结果显示, TLA处理恢复了抗凋亡蛋白Bcl-2的表达, 并降低了促凋亡蛋白Bax和Caspase-3的表达, 表明TLA具有良好的抗凋亡作用。

实验结果表明, 光损伤后细胞内NF-κB和磷酸化NF-κB的表达显著增加, 而IκB的表达减少, 表明UVB照射激活了NF-κB信号通路。TLA处理能够下调NF-κB和磷酸化NF-κB的表达, 并上调IκB的表达, 抑制了NF-κB信号通路的激活。同时, TLA处理显著抑制了IL-1β蛋白的表达, 并上调了TGF-β和Collagen-1的表达, 表明TLA能够抑制炎症反应并促进胶原蛋白的合成。

在体内实验中, 局部应用TLA促进了光损伤小鼠皮肤的组织愈合 (图 60)。H&E染色结果显示, TLA处理显著减少了表皮层的厚度, 减轻了真皮层的炎症细胞浸润。Masson染色结果显示, TLA处理后皮肤中的胶原纤维排列更加有序, 胶原体积分数 (CVF) 恢复至正常水平。免疫组织化学染色结果显示, TLA处理显著抑制了NF-κB的表达, 并恢复了Collagen-1和Collagen-3的表达水平, 表明TLA通过调节NF-κB信号通路和胶原相关蛋白的表达, 有助于光损伤皮肤的修复。

因此, 本研究开发了一种新型的经皮药物递送系统TLA, 通过将硫辛酸 (LA) 负载到tFNA上, 展示了其高效的细胞内摄取和皮肤渗透能力。TLA在光损伤细胞和皮肤的修复中表现出显著的抗炎和促修复作用, 实现了对光损伤的非侵入性治疗。TLA通过抑制炎症、促进胶原蛋白合成, 表现为表皮厚度的减少和组织学上的修复。总之, TLA作为一种新型的核酸纳米药物, 展示了其在光损伤局部修复中的积极作用, 为UVB引起的皮肤损伤治疗提供了新的视角和策略。

来源: 公开资料, 文献检索, 沙利文分析



## 5.5 防脱生发

脱发是一种常见的细胞衰老表现，困扰着大量人群。尽管受脱发困扰的群体庞大，但目前有效的治疗方法却十分有限。常见的治疗手段包括药物治疗（如米诺地尔、非那雄胺）、手术治疗（植发）以及物理疗法（中医针灸、低频激光疗法）等，但这些方法往往无法长期阻止脱发，更无法实现毛囊再生。虽然FDA批准了礼来Incyte开发的口服脱发药物巴瑞替尼（baricitinib），但该药物主要针对斑秃，而斑秃在脱发中的占比不到2%。因此，开发新型高效的防脱生发方法具有重要的临床意义。

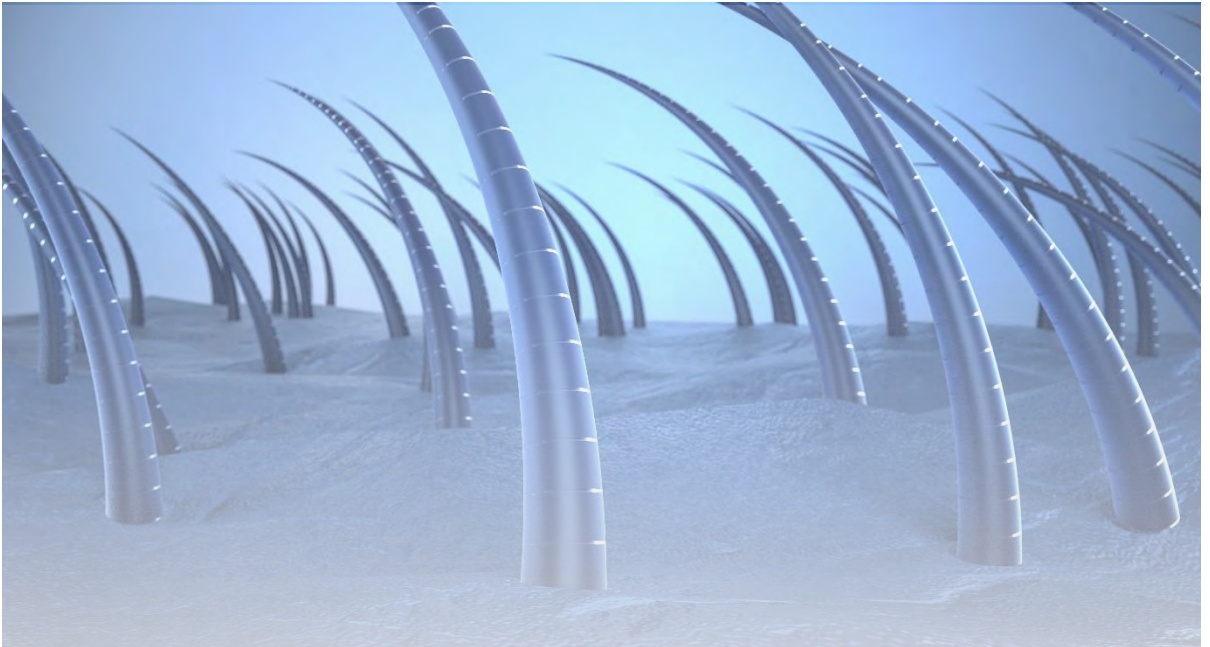
核酸四面体（tFNA）在这一领域展现出了巨大的应用潜力。在前述章节中，我们已经讨论了tFNA携带miR-31抑制剂（BiRDS系统）在改善毛发生长方面的显著效果。接受BiRDS治疗的小鼠表现出更深的毛发颜色、更高的毛发密度，以及更快的毛发再生速度。这一结果为tFNA在防脱生发领域的应用奠定了基础。

最新的未公开实验结果进一步证实了tFNA在防脱生发方面的潜力。研究人员发现，tFNA携带槲皮素能够实现优异的生发功效。这一发现对于治疗雄性激素源性脱发（称脂溢性脱发、男性脱发或遗传性脱发）具有重要意义。雄性激素源性脱发的症状包括头皮脂肪过量溢出，多发生于皮脂腺分泌旺盛的青壮年，患者一般头发细软，有些还伴有头皮脂溢性皮炎。

tFNA作为一种新型纳米材料，如前论述的具有的多项结构优势使其成为理想的防脱生发药物载体。优异的透皮性能和组织渗透性：tFNA能够有效穿透皮肤屏障，到达毛囊深处。结构稳定性：tFNA的稳定结构确保了其携带的药物能够安全有效地递送到目标位置。可编辑性：tFNA的结构可以根据需要进行调整，以适应不同的药物分子。调节细胞增殖分化的能力：tFNA可以使毛囊干细胞的增殖增大100%，并精准调控干细胞的分化。

槲皮素-四面体复合物（QT复合物）在防脱生发方面表现出了令人兴奋的效果。QT复合物能够直接到达毛囊深处，调节干细胞的增殖分化，促进细胞活性，从而完全恢复雄性激素源性脱发的生发功能。更重要的是，QT复合物对全身各器官完全无毒副作用，这为其潜在的临床应用提供了安全保障。

除了在防脱生发方面的应用，携带槲皮素的核酸四面体还在其他领域展现出了潜力。有研究证实，利用槲皮素功能化的核酸四面体纳米结构能够改善放射性膀胱炎，进一步凸显了tFNA这一新型纳米材料的多功能性和广泛应用前景。



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

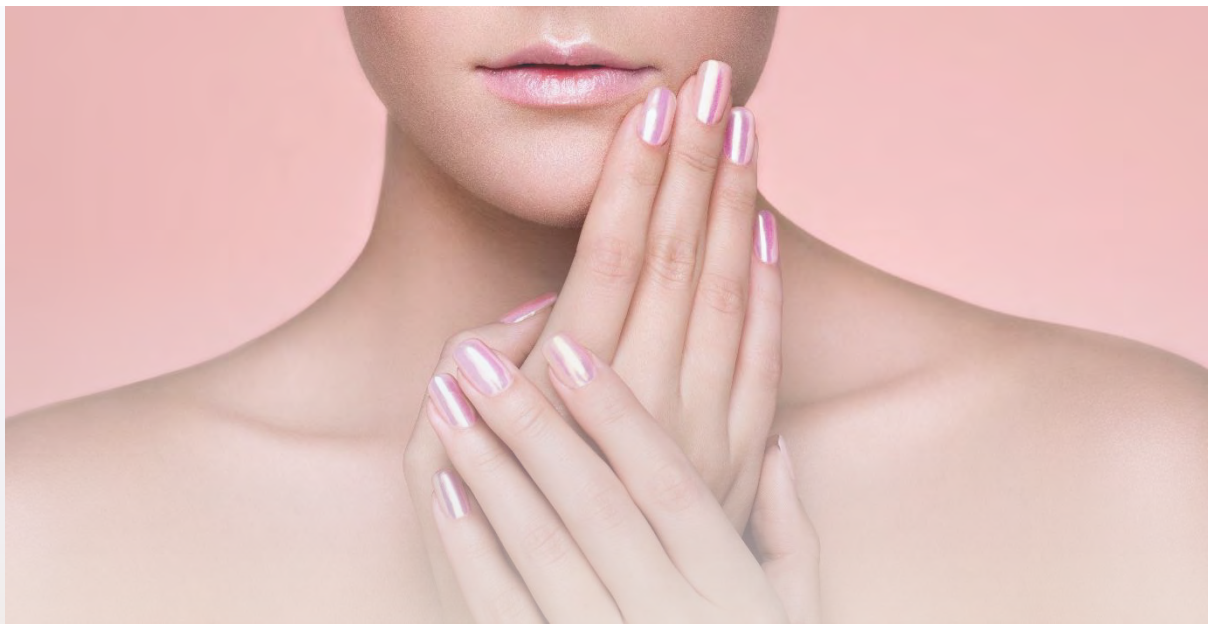
## 5.6 携带药物治疗皮肤病

核酸四面体 (tFNA) 作为一种新型的纳米药物载体 (第二代tFNA)，在皮肤病治疗领域也具有很好的应用案例。tFNA的独特结构和性质使其成为理想的经皮给药系统，能够有效地穿透皮肤屏障，将药物递送到目标部位。因此，tFNA可以作为高效的载体递送各种药物分子，进一步增强治疗效果。

一个典型的应用案例是科学家们开发了一种基于tFNA的级联响应可降解纳米复合物 (STT)，用于治疗银屑病 (psoriasis)。该系统由三部分组成：siRNA、tFNA和单宁酸 (TA)。其中，siRNA用于靶向核因子 $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65，tFNA作为载体，TA则提供pH响应性和增强稳定性。实验结果表明，STT能够有效地透过皮肤屏障，并在细胞内环境中实现可控释放。在体外实验中，STT显著抑制了NF- $\kappa$ B信号通路，减少了炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-23的分泌，抑制了角质形成细胞的过度增殖。在小鼠银屑病模型中，STT显著减轻了皮肤红斑、鳞屑和厚度，改善了组织病理学表现。这项研究不仅展示了tFNA在治疗银屑病方面的潜力，还为开发新型经皮给药系统提供了新思路。

另外一项研究中，科学家基于前面章节中提到的生物可切换的miRNA模拟物递送系统 (BiRDS)，将其开发用于治疗皮肤纤维化。BiRDS由一个“太阳核心”和三个“不死鸟”miRNA分子组成，可以高效递送miR-27a。这种独特的设计使BiRDS具有更高的稳定性和递送效率。在体外实验中，BiRDS显著抑制了TGF- $\beta$ 诱导的上皮-间质转化 (EMT)，减少了胶原I和纤维连接蛋白的表达。在体内实验中，BiRDS有效减轻了博来霉素诱导的皮肤纤维化，降低了皮肤厚度和羟脯氨酸含量。此外，BiRDS还显著抑制了NLRP3介导的细胞焦亡通路，这为治疗与炎症相关的皮肤疾病提供了新的方向。与传统tFNA相比，BiRDS展现出更高的递送效率和治疗效果，每个BiRDS分子可以携带三个miRNA分子，大大提高了药物负载能力。

这两项研究充分展示了tFNA作为药物载体在皮肤病治疗中的多项优势。tFNA不仅可以高效穿透皮肤屏障，还可以实现药物的可控释放，提高治疗效果。其多功能性使其既可以作为独立的治疗剂，又可以作为各种药物分子的载体。研究还显示tFNA具有良好的生物相容性和安全性，适合长期使用。此外，tFNA本身具有抗炎和抗纤维化作用，可与所载药物产生协同效应，进一步增强治疗效果。



来源：公开资料，文献检索，沙利文分析

The background features a blue-to-purple gradient with a molecular structure of spheres and sticks at the top. A white hexagonal frame is centered on the page. To the right, a globe is depicted with a grid of dots and lines.

## 第六章

06

# 核酸四面体的生物合成与化妆品领域的应用探究

## 6.1 tFNA寡核苷酸的合成

核酸四面体 (tFNA) 作为一种新兴的纳米材料, 在生物医学领域的应用包括促进骨骼、软骨、神经、皮肤、血管系统或肌肉的再生, 以及治疗骨缺损、神经系统疾病、关节相关炎症性疾病、牙周炎和免疫疾病等多个方面。然而, 尽管tFNA在实验室研究中取得了令人瞩目的成果, 其产业化应用仍面临着诸多挑战。

首先, 大多数关于tFNA的研究仍停留在体外实验或小动物实验阶段, 这可能无法完全反映人体的复杂性。因此, 需要通过大型动物实验进一步验证tFNA的临床效果。其次, tFNA的生物利用率仍需深入研究, 以揭示任何潜在的未知风险或益处。此外, 化学修饰的tFNA必须满足体内应用的必要要求, 包括生物稳定性、适当的药效学和药代动力学特性。

当然, 在众多挑战中, 最为突出的是tFNA的高昂生产成本问题。这一问题严重制约了tFNA的大规模生产和广泛临床应用, 成为阻碍其产业化发展的主要障碍。传统的化学合成方法不仅成本高, 而且难以满足大规模生产的需求。

为了解决这一关键问题, 研究者们正在积极探索tFNA的生物合成途径。通过利用合成生物学的方法, 有望实现tFNA的低成本、高效率生产。这种生物合成方法不仅可以大幅降低生产成本, 还可能提高tFNA的生物相容性和稳定性, 为其更广泛的应用奠定基础。

在寻求降低成本和扩大应用的过程中, 将tFNA引入化妆品领域成为一个极具前景的方向。化妆品行业对创新材料的需求旺盛, 且产品附加值高, 这为tFNA的应用提供了理想的切入点。通过在化妆品中应用tFNA, 可以充分发挥其独特的物理化学性质, 如优异的皮肤渗透性、抗氧化能力和药物递送功能, 开发出具有高附加值的护肤品和功能性化妆品。

化妆品领域的应用不仅可以为tFNA开拓新的市场, 还可以为其在更广泛生物医学领域的应用积累宝贵经验。这种应用探索代表了推动核酸纳米材料产业化发展的重要尝试, 有助于解决tFNA高成本的问题, 同时为化妆品行业带来革新性的产品和技术。

结合合成生物学的生物合成途径, 可以加快推动核酸四面体等更多生物创新材料的研发与量产。这不仅有助于降低生产成本, 还可能提高材料的性能和生物相容性。通过在化妆品领域的应用探索, 可以为tFNA的产业化积累宝贵经验, 为其在更广泛领域的应用铺平道路。

当然, 要真正实现tFNA的产业化应用, 仍需要科研人员、工程师和企业家的共同努力, 持续推进tFNA及其他具有真正治疗价值的DNA纳米材料的研究和开发。通过跨学科合作和产学研结合, 我们有望在不久的将来见证tFNA在化妆品领域乃至更广泛生物医学应用中的突破性进展。

### 6.1.1 tFNA寡核苷酸的合成

核酸四面体 (tFNA) 是通过将四个设计好的单链DNA片段退火实现的。这些单链DNA, 也就是寡核苷酸, 是tFNA的合成原料。寡核苷酸的合成是tFNA产业应用生产过程中的关键环节。目前, 寡核苷酸的合成主要采用几种不同的方法, 每种方法都有其独特的优势和局限性。

#### 不同寡核苷酸合成方法比较

	描述	优势	局限性
固相合成	固相合成是当前最广泛使用的寡核苷酸合成方法。这种方法主要采用柱式亚磷酸酰胺化学合成法, 将酸活化的脱氧核苷亚磷酸酰胺分子逐步耦合到固定在固相支持物 (如可控孔度玻璃或聚苯乙烯微珠) 上的脱氧核苷酸分子上	可以高效地合成长度达100 nt的寡核苷酸, 甚至可以合成300-600 nt的长链	随着链长增加, 合成产率会急剧降低, 这主要是由于合成过程中引入随机突变以及某些碱基 (如腺嘌呤) 容易受到化学修饰的影响, 导致主链断裂
液相合成	液相合成是另一种重要的合成方法。与固相合成相比, 液相合成在溶液中进行, 可以实现更大规模的生产	可以减少固相支持物的使用, 降低成本	纯化过程较为复杂, 需要更多的后处理步骤来获得高纯度的产品
酶促合成	酶促合成是一种利用生物体内天然DNA合成机制的方法。这种方法主要利用DNA聚合酶等酶来进行合成, 可以获得较长的DNA片段	可以在温和的条件下进行, 减少了化学试剂的使用, 同时可以生成更长的DNA片段	成本较高, 且对于特定序列的合成可能存在一定的局限性
微阵列合成	微阵列合成是近年来发展起来的一种新兴高通量合成方法。这种技术可以在小面积芯片上同时合成大量不同序列的寡核苷酸, 大大提高了合成效率	可以显著提高寡核苷酸的合成通量, 同时大幅减少试剂消耗, 从而降低成本	

来源: 公开资料, 文献检索, 创建医疗, 沙利文分析

## 6.1 tFNA寡核苷酸的合成

### ■ tFNA寡核苷酸合成痛点及解决方案

尽管现有方法在不断改进和发展，但寡核苷酸合成的核心痛点仍然是成本较高。目前，每个碱基的合成成本在0.10-0.30美元之间，这意味着合成一个1kb的基因需要100-300美元。这个成本在过去十多年里没有明显下降，严重制约了tFNA及其他DNA纳米材料的大规模应用。

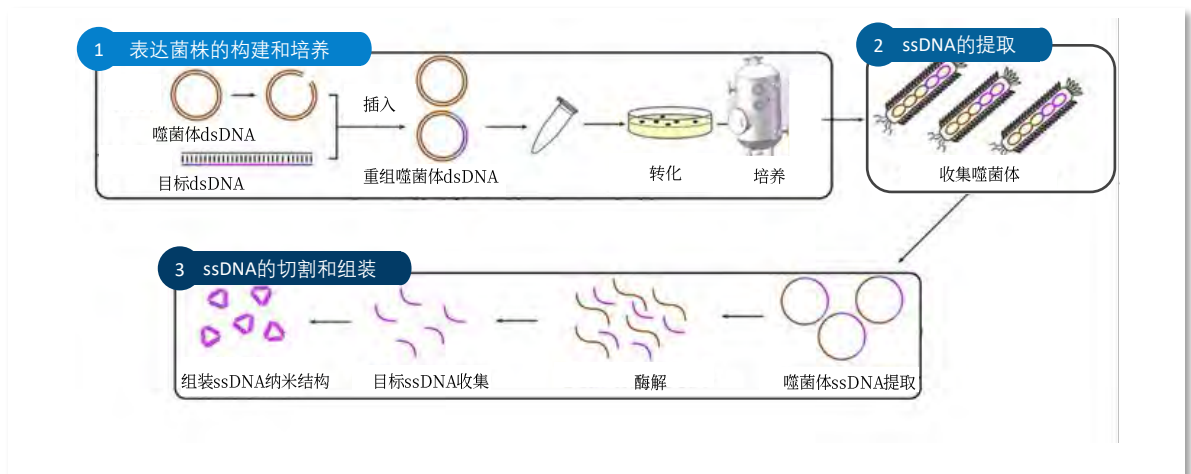
为了解决寡核苷酸高成本的问题，生物技术合成正成为一种极具前景的方法。Praetorius等科学家2017年发表在《自然》(Nature)杂志上的研究展示了一种利用生物技术大规模生产DNA折纸结构的方法，为寡核苷酸的生物合成提供了新的思路。这种方法的核心是利用生物体内的DNA复制和修复机制，在体内直接合成所需的DNA序列。具体来说，研究者首先使用标准的基因合成技术组装假基因，并将其克隆到一个或多个噬菌粒载体中。随后，在液体大肠杆菌培养基中，通过辅助质粒或辅助噬菌体的方法进行实际的单链DNA生产。在这个过程中，噬菌体基因的表达导致噬菌粒DNA在细胞内以单链形式进行滚环扩增，然后被包装成胞外噬菌粒颗粒。这些噬菌粒颗粒随后从细菌细胞中分离出来，目标单链DNA被提取。最后，通过添加氯化锌诱导纯化的噬菌粒单链DNA中的DNA酶功能基因簇(DNAzyme cassettes)自我切除，从而回收所需的DNA分子。

### 企业案例——创建医疗

受到这种生物合成方法的启发，江苏创健医疗科技股份有限公司(创建医疗)的研究者们积极探索了用于合成四面框架核酸(tFNA)所需寡核苷酸的创新生物合成方法。他们通过合成生物学手段，巧妙地利用生物体内的DNA复制和修复机制，实现了在体内规模化、高效地直接合成所需的DNA序列(图61)。这种方法的优势是显著的。初步研究表明，生物合成方法有望将寡核苷酸的生产成本降低至传统化学合成方法的1/3左右。这种成本的大幅降低不仅使得tFNA的生产更加经济可行，还为其在更广泛领域的应用铺平了道路。特别是，这种方法显著降低了核酸的获取成本，使得将tFNA用于化妆品领域成为可能。

江苏创健医疗科技股份有限公司也正在积极探索tFNA在化妆品领域的产业化发展与应用。通过降低成本，tFNA有望成为大多数化妆品品牌“用得起”的高科技原料。这不仅为化妆品行业带来了创新的功能性原料，还为tFNA的大规模应用开辟了新的市场。

图61: 创健医疗合成tFNA所需寡核苷酸的创新生物合成方法



来源: 公开资料, 文献检索, 创建医疗, 沙利文分析

## 6.2 tFNA作为化妆品原料的安全性测试

为了全面评估核酸四面体 (tFNA) 作为化妆品原料的安全性, 创建医疗的科学家们进行了一系列的体外和人体安全性测试。这些测试包括体外皮肤刺激试验、体外眼刺激试验、体外皮肤光毒性试验、人体皮肤斑贴试验、细菌回复突变试验等。tFNA在所有这些测试中均表现出优异的安全性能。体外试验结果显示tFNA对皮肤和眼睛无刺激性, 在光照条件下也不会引起毒性反应。人体测试进一步证实了其对人体皮肤的安全性。此外, 细菌回复突变和哺乳细胞毒理试验的阴性结果表明tFNA不会引起遗传毒性。这些全面的安全性数据为tFNA在化妆品领域的应用奠定了坚实的基础, 同时也为消费者提供了使用安全的保障。以下将详细介绍各项测试研究的具体结果。

### 6.2.1 无体外皮肤刺激性

为评估 tFNA对皮肤的潜在刺激性, 研究者采用了OECD 《体外皮肤刺激性试验—重建人体表皮测试方法》指南推荐的重建人体表皮模型 (RhE) 进行体外皮肤刺激试验。这种模型利用人源细胞构建了与正常人体表皮高度相似的三维结构, 能够有效模拟化学物质与皮肤的相互作用。

在实验中, 研究者将 tFNA样品直接施加于重建人体表皮模型表面, 在模拟生理条件下孵育30分钟后进行彻底清洗。随后, 继续培养处理过的皮肤模型42小时, 最后使用细胞毒性 (MTT法) 测定细胞活力。通过比较处理组与对照组的吸光度值, 研究者计算出相对细胞存活率, 用以评估 tFNA的刺激性。

实验结果显示, tFNA处理后的重建人体表皮模型相对细胞存活率高达94.61%, 远超过OECD TG439标准中50%的判定阈值。相比之下, 阳性对照组的相对细胞存活率仅为2.50%。这一结果明确表明, 根据OECD TG439的评判标准, tFNA可被分类为“非刺激性 (NI)”。

这个实验结果不仅证实了tFNA对人体表皮细胞几乎没有明显的毒性作用, 还凸显了其作为化妆品原料的优异皮肤相容性。这意味着在正常使用条件下, tFNA不太可能引起皮肤刺激反应。更重要的是, 这一发现为tFNA在敏感性肌肤护理产品中的潜在应用提供了有力支持, 同时也与我们先前观察到的tFNA促进细胞增殖和皮肤修复的功效相互印证, 进一步确立了tFNA作为一种安全且有效的化妆品原料的地位。

### 6.2.2 无眼睛刺激性

为全面评估tFNA的安全性, 研究者进行了体外眼刺激试验。这项测试对评估化妆品原料的安全性至关重要, 特别是考虑到化妆品可能意外接触眼部的情况。研究采用了OECD TG492推荐的重建人角膜样上皮 (RhCE) 模型, 具体使用的是SkinEthic™ HCE模型。这种模型能够有效模拟人眼角膜上皮的结构和功能, 是评估化学物质对眼睛潜在危害的可靠工具。

在实验过程中, 研究人员将tFNA样品直接应用于HCE模型表面, 模拟其与眼睛接触的情况。样品在模型表面停留4小时后, 使用MTT法测定细胞活力。MTT法是一种广泛使用的细胞代谢活性测定方法, 可以准确反映细胞的存活状态。根据OECD TG492的标准, 如果处理后的组织活力高于60% (对于液体样品), 则可以判定该物质不会引起眼睛刺激或严重的眼睛损伤。

实验结果显示, 经过4小时的tFNA处理后, HCE模型的组织活力达到97.88%。这一数值远远超过了60%的判定标准, 表明tFNA对眼部组织几乎没有任何刺激性。为确保实验的可靠性, 研究者还设置了阴性和阳性对照。阴性对照组的细胞活力为100%, 而阳性对照组 (使用已知的刺激性物质) 的细胞活力显著降低, 这进一步验证了实验系统的有效性和可靠性。

基于这些结果, 根据联合国全球化学品统一分类和标签制度 (GHS) 的标准, tFNA被评定为“无眼睛刺激性”, 分类为“没有类别”。这一结论不仅证实了tFNA作为化妆品原料的安全性, 还为其在眼部护理产品中的潜在应用提供了科学依据。

值得注意的是, tFNA在眼刺激试验中表现出的高度安全性与其在皮肤刺激试验中的结果相一致。这种一致性进一步增强了对tFNA安全性的信心, 同时也凸显了其作为多功能化妆品原料的潜力。无论是用于面部护理还是眼部周围的产品, tFNA都展现出了优异的安全性能, 这可能会拓展其在化妆品行业的应用前景。

来源: 公开资料, 文献检索, 创建医疗, 沙利文分析

## 6.2 tFNA作为化妆品原料的安全性测试

### 6.2.3 无皮肤光毒性

为了评估tFNA在光照条件下对皮肤的潜在毒性，研究者进行了体外皮肤光毒性试验。因为许多化妆品在日常使用中会暴露于阳光下，这项测试对于评估化妆品原料的安全性也很有必要。研究采用了OECD TG432推荐的3T3 NRU光毒性试验方法，这是一种广泛认可的评估化学物质光毒性潜力的体外方法。

实验过程中，研究人员使用了Balb/c 3T3小鼠成纤维细胞系。细胞首先与不同浓度的tFNA样品共同孵育，然后分为两组：一组暴露于模拟太阳光（UVA）下，另一组保持在黑暗中。之后，通过中性红摄取（NRU）法测定细胞存活率。这种方法可以通过比较光照和非光照条件下的细胞毒性来评估物质的光毒性潜力。

实验结果通过两个关键参数进行评估：光效应因子（PIF）和平均光效应（MPE）。根据OECD TG432的标准：如果 $PIF < 2$ 或 $MPE < 0.1$ ，判定为无光毒性；如果 $2 \leq PIF < 5$ 或 $0.1 \leq MPE < 0.15$ ，判定为可能有光毒性；如果 $PIF \geq 5$ 或 $MPE \geq 0.15$ ，判定为有光毒性。实验结果显示，tFNA的MPE值为-0.012，PIF值为\*1.000（\*表示无法精确计算，因为在最高测试浓度下未观察到明显的细胞毒性）。这两个值均远低于判定光毒性的阈值。为了确保实验的可靠性，研究者同时进行了阳性对照实验。阳性对照物质（氯丙嗪）在光照条件下显示出明显的毒性（ $MPE = 0.333$ ， $PIF = 17.876$ ），这验证了实验系统的敏感性和有效性。

基于以上结果，研究者得出结论：在本实验条件下，tFNA被评定为“无光毒性”。这一结果表明，tFNA在光照条件下不太可能引起皮肤的光毒性反应，进一步证实了其作为化妆品原料的安全性。

这项光毒性试验的结果与之前的皮肤刺激试验和眼刺激试验结果相一致，共同构成了tFNA安全性评估的重要组成部分。这种全面的安全性数据不仅支持tFNA在日常护肤品中的应用，还为其在防晒产品等特殊化妆品中的潜在使用提供了科学依据。

### 6.2.4 极低皮肤致敏性

为了进一步验证tFNA在实际应用中的皮肤安全性，研究者进行了人体皮肤斑贴试验。这项试验是评估化妆品原料潜在致敏性的关键步骤，可以直接反映物质与人体皮肤接触后可能引起的不良反应。

实验设计遵循《化妆品安全技术规范》（2015年版）第七章的指导原则。研究者招募了30名志愿者参与试验，其中包括6名男性和24名女性，年龄范围为37至60岁，平均年龄为 $50.17 \pm 6.10$ 岁。所有志愿者均符合受试者入选标准，确保试验结果的可靠性和代表性。

试验采用封闭式斑贴方法进行。研究人员将0.020~0.025 mL的tFNA样品置于标准斑试器内，然后使用低致敏性胶带将其固定在受试者的前臂内侧。同时设置了空白对照组，以排除其他因素的影响。斑贴持续时间为24小时，之后移除斑贴，并在移除后0.5小时、24小时和48小时三个时间点观察皮肤反应。

研究者根据《化妆品安全技术规范》中规定的皮肤反应分级标准评估结果。该标准将皮肤反应分为5个等级，从0级（无反应）到4级（极强阳性反应）。试验结果显示：在30名受试者中，29人（96.67%）在所有观察时间点均未出现任何皮肤反应，即0级反应。仅有1名受试者（3.33%）在所有观察时间点出现了1级反应，即“可疑反应，仅有微弱红斑”。没有受试者出现2级或更高级别的皮肤反应。空白对照组在所有受试者中均未引起任何反应。

这些结果表明，tFNA在人体皮肤上表现出极低的刺激性和致敏性。96.67%的受试者完全没有出现不良反应，而唯一出现反应的受试者也仅表现出最轻微的可疑反应。这一结果与之前的体外皮肤刺激试验结果高度一致，进一步证实了tFNA对人体皮肤的安全性。值得注意的是，即使在延长观察至48小时后，绝大多数受试者仍未出现任何皮肤反应，这表明tFNA不太可能引起延迟性过敏反应。这一特性对于化妆品原料而言尤为重要，因为它确保了产品在长期使用中的安全性。

人体皮肤斑贴试验的结果强有力地支持了tFNA作为化妆品原料的安全性。这不仅验证了先前体外试验的结果，还为tFNA在各种皮肤护理产品中的应用提供了直接的人体安全性证据。这些数据将有助于提高消费者对含tFNA产品的信心，同时为进一步开发基于tFNA的创新护肤配方奠定了坚实的基础。

## 6.2 tFNA作为化妆品原料的安全性测试

### 6.2.5 无致突变性

研究者还进行了细菌回复突变试验，也称为Ames试验。这项试验是评估化学物质潜在致突变性的关键方法，对于预测物质的长期安全性和潜在致癌风险具有重要意义。实验方法遵循《化妆品安全技术规范》（2015年版）第六章8的指导原则，采用了五种标准的细菌菌株：TA97a、TA98、TA100、TA1535和WP2uvrA (pKM101)。这些菌株经过特殊改造，对不同类型的突变特别敏感，能够全面评估受试物质的致突变潜力。

实验过程中，研究者将不同浓度的tFNA（最高浓度为5.00 μL/皿）与这些细菌菌株一起培养，分别在有代谢活化系统（+S9）和无代谢活化系统（-S9）的条件下进行。代谢活化系统模拟了哺乳动物体内的代谢过程，可以检测出那些需要经过代谢才能显示致突变性的物质。试验结果的判定基准如下：对于TA1535菌株，如果回变菌落数是溶剂对照的三倍或以上，则判定为阳性。对于其他菌株，如果回变菌落数是溶剂对照的二倍或以上，则判定为阳性。

实验结果显示：在所有测试浓度下，无论是否添加S9代谢活化系统，tFNA都未导致任何菌株的回变突变数显著增加。具体数据显示，tFNA处理组的回变菌落数与溶剂对照组相近，没有出现剂量依赖性的增加趋势。阳性对照组（使用已知致突变物质）显示出明显的突变增加，验证了实验系统的敏感性和有效性。在最高测试浓度（5.00 μL/皿）下，tFNA也未表现出明显的细胞毒性，这进一步证实了其良好的生物相容性。

基于这些结果，研究者得出结论：在本实验条件下，tFNA被判定为“致突变阴性”。这一结果表明，tFNA不太可能引起DNA损伤或遗传毒性，进一步支持了其作为化妆品原料的安全性。细菌回复突变试验的阴性结果具有重要意义。它不仅表明tFNA在短期使用中安全，还暗示了其长期使用的潜在安全性。这对于化妆品原料而言尤为重要，因为许多护肤品都是设计用于长期日常使用的。

### 6.2.6 无染色体毒性

为了更全面地评估tFNA的遗传毒性潜力，特别是在染色体水平上的影响，研究者进行了体外哺乳动物细胞染色体畸变试验。这项试验旨在检测化学物质是否会导致哺乳动物细胞染色体结构或数目的异常，是评估化妆品原料安全性的重要组成部分。研究者采用了中国仓鼠肺细胞（CHL）作为实验模型。这种细胞系广泛用于遗传毒性研究，具有染色体数目少、形态清晰等优点。实验设计包括代谢活化和非代谢活化两种条件，以评估tFNA本身及其可能的代谢产物的影响。代谢活化系统（S9 mix）模拟了哺乳动物体内的代谢过程。

实验设置了三个tFNA剂量组（5 μL/mL、2.5 μL/mL、1.25 μL/mL），并在三种处理条件下进行评估：代谢活化4小时、非代谢活化4小时和24小时。同时设置了阴性对照（溶剂）和阳性对照（甲磺酸甲酯MMS和环磷酰胺CP）组。实验首先将CHL细胞以 $2 \times 10^5$ 个/mL的密度接种于培养皿中。随后将tFNA溶于MEM培养基，制备不同浓度的处理液。根据不同处理条件（±S9，4h/24h）对细胞进行染毒。染毒结束后，添加秋水仙素阻断细胞分裂。经过低渗、固定等步骤后，制作染色体标本并进行姬姆萨染色。最后每组选取200个中期分裂相细胞，观察染色体结构和数目异常。

实验结果显示，在所有测试浓度下，tFNA未显示明显的细胞毒性，细胞存活率均在87.8%以上。在代谢活化4h、非代谢活化4h和24h处理后，所有tFNA剂量组（5 μL/mL、2.5 μL/mL、1.25 μL/mL）的畸变细胞数均为0，畸变率为0%。阴性对照组同样未观察到染色体畸变。阳性对照组（MMS和ICP）显示显著的染色体畸变，畸变率为12.0%，证实了实验系统的敏感性和有效性。

根据《化妆品安全技术规范》（2015年版）的评判标准，在本实验条件下，tFNA对体外哺乳动物细胞染色体畸变为“致突变阴性”。这一结果表明，tFNA在染色体水平上不会引起结构或数目的异常，进一步支持了其作为化妆品原料的安全性。这项试验的结果与之前的细菌回复突变试验结果相一致，共同构建了tFNA遗传毒性安全性的全面评估。



## 6.2 tFNA作为化妆品原料的安全性测试

### 6.2.7 总结

综上，通过一系列全面而严格的安全性测试，核酸四面体（tFNA）展现出了优异的安全性能，为其作为化妆品原料的应用提供了坚实的科学基础，结果总结在表 1所示。

#### tFNA作为化妆品原料的安全性测试评价

	实验结果	作为化妆品原料的应用场景与优势
体外皮肤致敏性试验	非刺激性 (NI)	优异皮肤相容性，不会引起皮肤刺激反应。
体外眼刺激试验	无眼睛刺激性	优异皮肤相容性，面部护理及眼部周围的产品均可。
体外皮肤光毒性试验	无光毒性	光照刺激无毒性，可从日常护肤扩展至防晒产品。
人体皮肤斑贴试验	极低致敏性	可用于敏感肌肤，同时适用于长期使用。
细菌回复突变试验	致细菌细胞突变阴性	高的安全性，无细胞毒性（不会引起DNA损伤或遗传毒性）。
哺乳细胞染色体毒理试验	无哺乳细胞染色体毒性	

体外皮肤刺激试验和体外眼刺激试验结果均表明tFNA对皮肤和眼部组织无刺激性，证实了其良好的生物相容性。体外皮肤光毒性试验的阴性结果进一步支持了tFNA在光照条件下的安全使用。人体皮肤斑贴试验的结果验证了tFNA在实际使用中的皮肤安全性，表明其具有极低的致敏风险。细菌回复突变试验和体外哺乳动物细胞染色体畸变试验的阴性结果共同证实了tFNA不具有遗传毒性，排除了长期使用可能带来的潜在风险。这些全面的安全性数据不仅支持tFNA在化妆品领域的广泛应用，还为其在更广阔的生物医学领域的潜在应用奠定了基础。tFNA优异的安全性表现，结合其独特的生物学特性，预示着它在个人护理产品等领域可能带来的革新性应用，展现出令人期待的发展前景。

来源：公开资料，文献检索，创建医疗，沙利文分析

## 6.3 tFNA作为化妆品原料的功效

在前述章节中，我们深入探讨了核酸四面体（tFNA）的独特性质及其在生物医学领域的广泛应用。tFNA展现出与生物系统的天然兼容性以及高效穿透细胞膜的能力，这些特性使其成为调节各种细胞生物过程、促进组织再生和调节免疫反应的理想材料。随着研究的深入，tFNA的设计和功​​能不断演进，呈现出更强的适应性和生物稳定性。这些进步包括了多方面的结构修饰，如在tFNA的顶点或侧臂添加功能域，整合低分子量药物，以及实施多种策略以逆转微生物中的多药耐药性。这些创新极大地扩展了tFNA的应用范围和效能，使其在生物医学领域的潜力得到进一步释放。

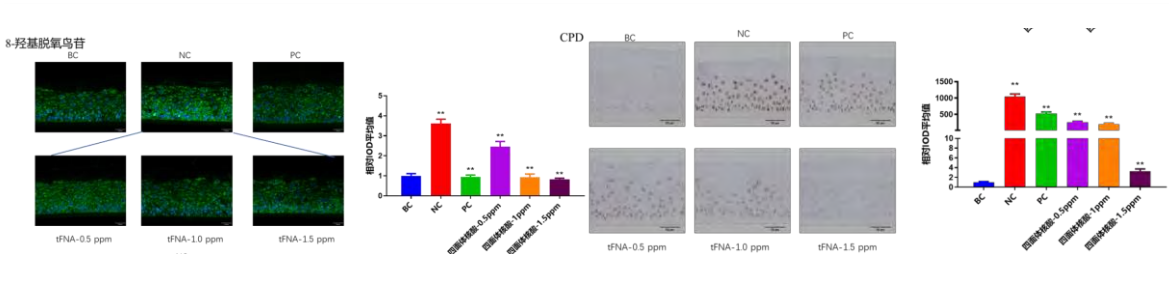
在本节中，我们将聚焦于江苏创健医疗科技股份有限公司通过创新的生物合成方法制备的tFNA在化妆品领域的应用前景。这种生物合成方法不仅显著降低了tFNA的生产成本，还可能提高了其生物相容性，为tFNA在化妆品行业的大规模应用开拓道路。作为化妆品原料，tFNA展现出多方面的功效优势，包括卓越的皮肤渗透能力、修复损伤、维持皮肤蛋白稳态、保持皮肤年轻态、抗衰老的潜力、促进胶原蛋白合成的可能性，以及长效作用等。

### 6.3.1 修复DNA损伤导致的皮肤衰老

DNA损伤在皮肤衰老过程中扮演着核心角色。根据Schumacher等科学家在2021年发表在《自然》（Nature）的研究，DNA损伤会在分子、细胞和系统三个层面产生一系列影响。在分子水平上，DNA损伤可导致基因组不稳定、端粒功能障碍、表观遗传学改变、蛋白质稳态失衡以及线粒体功能受损。在细胞水平上，它会引​​起干​​细胞耗竭和细胞衰老。在系统水平上，DNA损伤会影响信号机制，引发炎症和导致营养感应失调。这些变化共同推动了皮肤衰老的进程。

为了研究四面框架核酸（tFNA）作为化妆品原料在修复DNA损伤导致的皮肤衰老方面的潜力，研究者设计了一个基于EpiKutis®表皮模型的实验。实验通过600 mJ/cm<sup>2</sup>的UVB照射建立体外氧化应激损伤模型，模拟皮肤受到紫外线照射后产生大量自由基导致的DNA损伤过程。研究者采用了不同浓度的tFNA（0.5 ppm、1 ppm、1.5 ppm）进行处理，并以维生素E（VE）作为阳性对照。

图62：tFNA修复DNA损伤导致的皮肤衰老



实验主要检测了两个DNA损伤的标志物：8-羟基脱氧鸟苷和环嘧啶二聚体（CPD）。8-羟基脱氧鸟苷是DNA氧化损伤的重要生物标志物，而CPD则是紫外线诱导DNA损伤的主要形式，约占70%-80%。实验结果发现，在8-羟基脱氧鸟苷的检测中，与阴性对照组相比，tFNA处理后的样品显示出显著的损伤修复效果。tFNA浓度为0.5 ppm、1 ppm和1.5 ppm时，8-羟基脱氧鸟苷含量的抑制率分别达到32.04%、74.03%和77.07%。这表明tFNA能有效减少由氧化应激引起的DNA损伤。在CPD的检测中，tFNA的效果更为显著。与阴性对照组相比，0.5 ppm、1 ppm和1.5 ppm浓度的tFNA处理使CPD含量分别下降了75.77%、80.83%和99.69%。这一结果表明tFNA对紫外线诱导的DNA损伤有极强的修复能力，尤其是在高浓度下几乎可以完全修复CPD损伤。

这些实验结果清楚地表明，tFNA作为化妆品原料具有显著的DNA损伤修复能力。通过减少8-羟基脱氧鸟苷和CPD的含量，tFNA可以有效地修复由氧化应激和紫外线辐射引起的DNA损伤，从而潜在地减缓皮肤衰老过程。

来源：公开资料，文献检索，创建医疗，沙利文分析

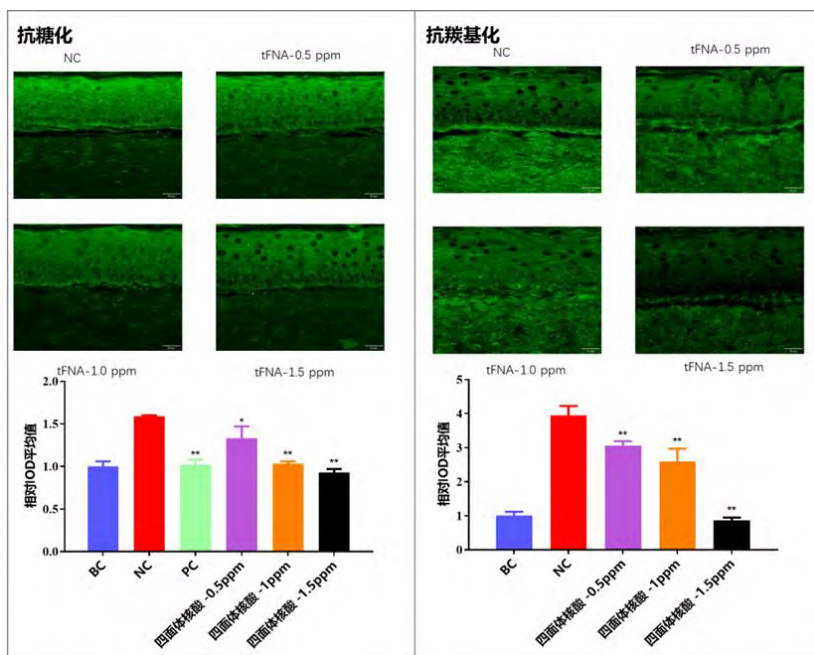
## 6.3 tFNA作为化妆品原料的功效

### 6.3.2 维持皮肤蛋白稳态

皮肤稳态是保持皮肤健康、预防衰老的关键，涉及水分平衡、抗氧化能力、细胞更新和蛋白质稳态等多个方面。其中，蛋白质稳态尤为重要，因为蛋白质是皮肤结构和功能的基础。蛋白质的糖基化作为一种常见的氧化损伤形式，会导致蛋白质功能失调，进而影响皮肤整体健康。创健医疗的研究者们着重探讨了tFNA在抗糖化和抗羰基化两个关键方面的作用，这两个过程都与蛋白质稳态和皮肤衰老密切相关。

首先，研究者使用全层皮肤模型Fu1Kutis进行了抗糖化实验。实验通过甲基乙二醛（MGO）和UVA联合处理来模拟糖化过程，并以羧甲基赖氨酸（CML）作为糖基化终末产物（AGEs）的代表性指标。结果显示，不同浓度的tFNA处理均能显著降低CML的含量。具体而言，0.5 ppm、1 ppm和1.5 ppm浓度的tFNA处理分别使CML含量下降了16.35%、35.22%和41.51%。这一结果清楚地表明，tFNA具有浓度依赖性的抗糖化作用，随着浓度的增加，其效果显著提高。

图63: tFNA维持皮肤稳态



其次，研究者还评估了tFNA的抗羰基化能力。羰基化是氧化应激中一种不可逆的化学修饰，可导致蛋白质功能失调和皮肤衰老。实验采用UVA和油酸联合处理来诱导羰基化，并使用2,4-二硝基苯肼（DNPH）作为检测蛋白质羰基化程度的标志物。结果显示，tFNA同样表现出显著的抗羰基化效果。0.5 ppm、1 ppm和1.5 ppm浓度的tFNA处理分别使DNPH含量下降了22.34%、34.26%和78.17%。这一数据再次证实了tFNA的浓度依赖性效应，尤其是在1.5 ppm浓度下，tFNA表现出极强的抗羰基化能力。

tFNA的这种双重作用——抗糖化和抗羰基化——对维持皮肤稳态具有重要意义。糖化和羰基化都是导致皮肤蛋白质（如胶原蛋白和弹性蛋白）功能失调的重要因素，它们会导致皮肤失去弹性、出现皱纹，甚至改变肤色（如糖化导致的棕色沉着）。通过抑制这两个过程，tFNA可以有效保护皮肤蛋白质的正常功能，维持皮肤的弹性和年轻态。此外，tFNA的抗糖化和抗羰基化作用还表明它具有强大的抗氧化能力。氧化应激是导致蛋白质糖化和羰基化的主要原因之一，tFNA可能通过中和自由基、减少氧化压力来实现其保护作用。这不仅有助于维持蛋白质稳态，还可能对整体皮肤健康产生积极影响，如改善皮肤屏障功能、促进细胞更新等。

来源：公开资料，文献检索，创健医疗，沙利文分析

## 6.3 tFNA作为化妆品原料的功效

### 6.3.3 促进细胞自噬维持皮肤年轻态

细胞自噬 (autophagy) 是一种高度保守的细胞代谢过程, 在维持皮肤健康和延缓衰老方面扮演着关键角色。这一过程不仅对于皮肤细胞的正常功能至关重要, 还在应对各种环境压力和维持皮肤年轻态方面发挥着重要作用。自噬过程在皮肤中的重要性体现在多个方面。首先, 它是皮肤细胞清除受损组分的主要机制。通过自噬, 细胞能够降解和回收受损的蛋白质、细胞器和其他细胞成分, 防止这些有害物质的积累, 从而维持细胞的健康状态。这对于长期暴露于紫外线辐射、污染和其他环境压力下的皮肤细胞尤为重要。其次, 自噬在维持皮肤细胞能量平衡和代谢稳态方面发挥着关键作用。在营养缺乏或压力条件下, 自噬可以为细胞提供必要的能量和代谢前体, 确保细胞功能的正常运转。

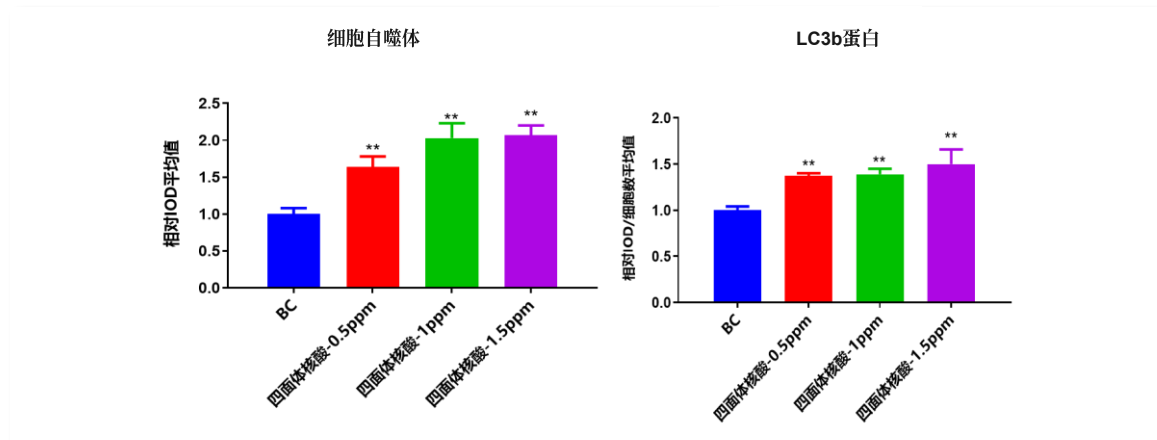
此外, 自噬还参与调节皮肤的免疫反应和炎症过程。通过清除受损的细胞组分和病原体, 自噬可以减轻炎症反应, 有助于维持皮肤的健康状态。在皮肤衰老过程中, 自噬功能的下降被认为是导致皮肤老化的重要因素之一。随着年龄增长, 自噬活性降低, 导致受损蛋白质和细胞器的积累, 进而加速皮肤衰老。

从过程来看, 自噬是真核细胞在自噬相关基因 (Atg) 的调控下, 利用溶酶体降解自身细胞质蛋白和受损细胞器的过程。这一过程对于维持细胞内的蛋白质稳态、清除受损的细胞器, 以及为细胞提供能量和代谢前体物质都起着至关重要的作用。细胞自噬体是自噬过程中的关键结构。它是由细胞自身的膜 (如内质网或高尔基复合体的膜) 包裹形成的, 内含待降解的细胞内容物, 如受损的细胞器或过量储存的糖原。自噬体的形成是自噬过程的重要标志, 其数量可以反映细胞自噬活性的强弱。自噬相关蛋白LC3-II (即LC3b) 是目前公认的自噬标记物, 贯穿整个自噬过程。LC3蛋白在自噬过程中经过一系列修饰, 最终形成LC3-II并定位于自噬体内外膜上。因此, LC3-II的含量可以直接反映自噬活性的水平。

为了评估tFNA对细胞自噬的影响, 研究者设计了一项实验, 使用成纤维细胞作为研究模型。实验分为空白对照组和不同浓度 (0.5 ppm、1 ppm和1.5 ppm) 的tFNA处理组。通过荧光显色法观察细胞自噬体的数量, 并使用免疫荧光 (IF) 技术检测LC3b蛋白的表达水平, 研究者全面评估了tFNA对细胞自噬的影响。实验结果显示 (图 64), tFNA对细胞自噬有显著的促进作用。在细胞自噬体方面, 与空白对照组相比, 0.5 ppm、1 ppm和1.5 ppm浓度的tFNA处理分别使细胞自噬体含量提升了64.00%、103.00%和107.00%。这表明tFNA能够显著促进自噬体的形成, 且这种作用呈现浓度依赖性。在LC3b蛋白表达方面, 相同浓度的tFNA处理分别使LC3b蛋白含量提升了37.00%、39.00%和50.00%。这进一步证实了tFNA在促进细胞自噬过程中的积极作用。

这些结果表明, tFNA具有强大的促进细胞自噬的能力。通过增加细胞自噬体的数量和提高LC3b蛋白的表达, tFNA可能帮助皮肤细胞更有效地清除受损组分, 维持细胞内的蛋白质稳态, 提高细胞应对环境压力的能力。这些作用共同作用到皮肤的年轻态维持, 可能表现为改善皮肤弹性、减少细纹和皱纹、增强皮肤光泽等效果。

图64: tFNA促进细胞自噬维持年轻态



来源: 公开资料, 文献检索, 创建医疗, 沙利文分析

## 6.3 tFNA作为化妆品原料的功效

### 6.3.4 抑制细胞复制性衰老

细胞复制性衰老是皮肤衰老过程中的一个关键因素，它不仅影响细胞的正常功能，还会导致皮肤外观的显著变化。具体来讲，复制性衰老现象是由于细胞因为不断地分裂导致端粒缩短，从而诱导细胞发生衰老的现象。端粒的作用是在染色体末端维持基因组的稳定性。正常细胞端粒的长度会随着DNA的复制而不断地缩短。当端粒DNA缩短到一定程度时，细胞会自动开启衰老程序，这个过程就被称之为端粒缩短诱导的细胞衰老（Telomere-induced senescence），也可以被称之为复制性细胞衰老（Replicative senescence）。

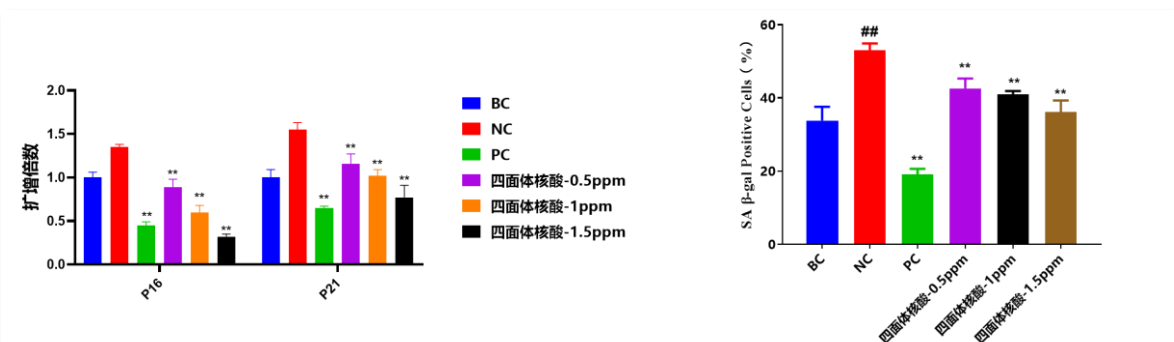
为了深入研究tFNA作为化妆品原料是否具有抑制复制性衰老的作用，研究者设计了一系列实验，着重观察了几个与细胞衰老密切相关的指标。在实验中，研究者采用了P40代的成纤维细胞作为研究模型，通过连续3天每天使用400 μM的双氧水刺激2小时来诱导氧化性损伤，结合传代培养，建立了一个相对稳定的衰老细胞模型。这种方法模拟了皮肤细胞在长期氧化应激下的衰老过程，为评估tFNA的抗衰老效果提供了理想的平台。

实验主要关注了三个重要的衰老标志物：P16、P21和SA-β-gal（衰老相关β-半乳糖苷酶）。P16调控了CDK4和CDK6进而影响了Rb信号通路，阻断细胞周期，促使细胞发生细胞衰老现象，因而p16分子可以作为细胞衰老的标志物之一。有研究发现，在通常情况下，p16蛋白在健康且没有应激压力反应的组织细胞内，表达量很低，但是在衰老的细胞p16的表达会明显地升高。P21蛋白为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂家族中的重要成员，通过抑制周期素依赖激酶（Cyclin-dependent kinases, CDKs）复合物活性，协调细胞周期。SA-β-gal，全称是senescence-associated βgalactosidase，衰老相关β-半乳糖苷酶。它是目前应用最为广泛的细胞衰老的标志物之一，可以将发生衰老的细胞和处于分裂静息期或者是终末分化状态的细胞区分开来。当细胞发生衰老时，β-gal在pH 6.0时，表现出高的酶活性。在检测衰老细胞时，可以人为给予β-gal的作用底物X-gal和pH6.0的环境，衰老细胞可以在β-半乳糖苷酶的作用下，将底物转变为深蓝色的产物，使得发生衰老的细胞在普通光学显微镜下即可观察到。总结来看，P16和P21是细胞周期调控蛋白，它们的表达增加通常与细胞衰老密切相关。P16通过影响Rb信号通路阻断细胞周期，而P21则通过抑制细胞周期依赖性激酶复合物的活性来实现类似的效果。SA-β-gal则是目前应用最为广泛的细胞衰老标志物之一，它可以有效地区分衰老细胞和处于分裂静息期或终末分化状态的细胞。

实验结果发现，在P16和P21的表达方面，tFNA展现出了显著的抑制效果。与阴性对照组相比，0.5 ppm、1 ppm和1.5 ppm浓度的tFNA处理分别使P16的表达下降了34.07%、55.56%和76.30%，同时P21的表达也分别下降了25.16%、34.19%和50.32%。这些数据清楚地表明，tFNA能够有效抑制这两个关键衰老标志物的表达，且这种抑制作用呈现出明显的浓度依赖性。在SA-β-gal阳性细胞率方面，tFNA同样表现出显著的抑制效果。0.5 ppm、1 ppm和1.5 ppm浓度的tFNA处理分别使SA-β-gal阳性细胞率下降了19.62%、22.73%和31.74%。这进一步证实了tFNA在抑制细胞衰老过程中的积极作用。

这些结果共同表明，tFNA具有强大的抑制细胞复制性衰老的能力。通过降低P16和P21的表达，tFNA可能帮助细胞维持正常的细胞周期进程，延缓细胞进入衰老状态的速度。同时，SA-β-gal阳性细胞率的降低直接反映了衰老细胞数量的减少，这对于维持皮肤的年轻状态具有重要意义。

图65: tFNA抑制皮肤细胞复制性衰老



来源：公开资料，文献检索，创建医疗，沙利文分析

## 6.3 tFNA作为化妆品原料的功效

### 6.3.5 修复线粒体损伤

线粒体作为细胞的能量供应和代谢中枢，在维持皮肤健康和延缓衰老过程中扮演着至关重要的角色。然而，环境因素尤其是紫外线辐射常常导致线粒体功能受损，进而加速皮肤衰老。线粒体损伤通常表现为活性氧（ROS）增加、ATP产量下降以及膜电位异常。紫外线照射后，线粒体会产生大量的活性氧等自由基，导致氧化应激损伤。过多的ROS不仅直接损害线粒体DNA，还会引发一系列连锁反应，进一步促进ROS释放，形成恶性循环。同时，线粒体作为ATP的主要来源，其功能受损将导致细胞能量供应不足。线粒体膜电位则是维持正常功能的关键，其异常往往预示着线粒体功能障碍和细胞衰老。

为深入研究tFNA的是否具有修复线粒体损伤的功效，研究者设计了一系列实验，重点关注了线粒体功能的三个关键指标：线粒体活性氧（ROS）水平、线粒体ATP水平和线粒体膜电位。这三个指标的选择基于对线粒体功能和细胞健康状态的全面理解。

#### ◆ 线粒体ROS水平

是评估细胞氧化应激状态的重要指标。当活性氧的形成与分解失衡时，机体处于氧化应激状态。过量的ROS会对线粒体DNA造成严重损伤。线粒体DNA由于其特殊的结构、功能和位置，比核DNA更易受到氧化损伤。更为关键的是，线粒体DNA的氧化损伤会引发一系列连锁反应，导致线粒体DNA突变或基因产物丢失，进而促进更多ROS的释放，形成恶性循环。这种循环不仅与细胞老化密切相关，还可能引发多种病理状态。通过检测线粒体ROS含量的变化，研究者可以评估tFNA调节能量代谢和保护线粒体的能力。

#### ◆ 线粒体ATP水平

是另一个关键指标。ATP是生物体内最直接的能量来源，由线粒体合成。它由腺嘌呤、核糖和3个磷酸基团连接而成，水解时释放大量能量。在细胞凋亡、坏死或处于毒性状态时，ATP水平通常会下降。ATP水平的降低不仅意味着线粒体功能受损，还往往与线粒体膜电位的下降同步发生。研究者采用了基于萤火虫萤光素酶的高灵敏度检测方法测定ATP浓度。这种方法利用萤火虫萤光素酶催化萤光素产生荧光时需要ATP提供能量的原理，在一定浓度范围内，荧光强度与ATP浓度成正比，从而实现了ATP浓度的精确测定。

#### ◆ 线粒体膜电位

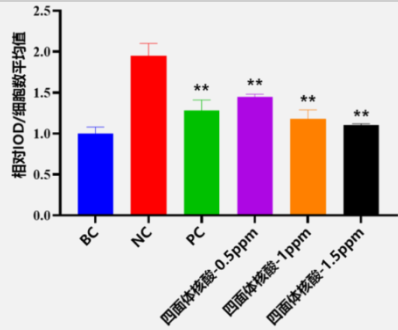
是第三个重要指标。它是线粒体内外膜的电场差，其去极化（即膜电位降低）通常表明线粒体功能受损。线粒体氧化损伤会导致膜电位损伤，进而引发细胞能量代谢下降，这是衰老细胞的重要特征。研究者使用了JC-1荧光探针来检测线粒体膜电位的变化。JC-1在高膜电位时形成红色荧光的聚合物，在低膜电位时则以绿色荧光的单体形式存在。通过观察红绿荧光的相对比例，可以准确评估线粒体去极化的程度。

## 6.3 tFNA作为化妆品原料的功效

### ◆ 线粒体ROS水平

研究者首先观察了其对于线粒体ROS水平的影响。实验结果显示，与阴性对照组相比，0.5 ppm、1 ppm和1.5 ppm浓度的tFNA处理分别使线粒体活性氧含量显著下降，抑制率达到了25.64%、39.49%和43.59%。这一结果清楚地表明，tFNA具有显著的抗氧化作用，能有效降低线粒体内的氧化应激水平。

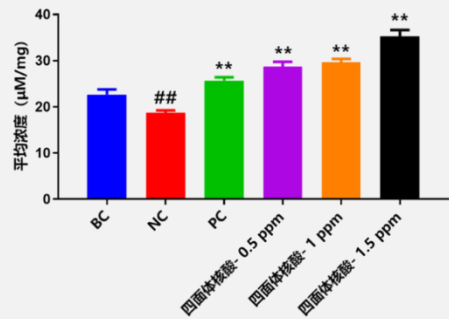
图66: tFNA降低线粒体的ROS



### ◆ 线粒体ATP水平

在ATP产量方面，研究者采用了UVA (30 J/cm<sup>2</sup>) 照射来模拟紫外线对皮肤的损伤。结果显示，UVA照射显著降低了细胞的ATP含量，而tFNA处理能有效逆转这一趋势。具体而言，0.5ppm、1ppm和1.5ppm浓度的tFNA处理分别使线粒体ATP含量提升了52.80%、58.35%和88.21%。这一结果不仅证实了tFNA在修复线粒体功能方面的卓越效果，还暗示着其可能有助于提高细胞的整体能量水平和活力。

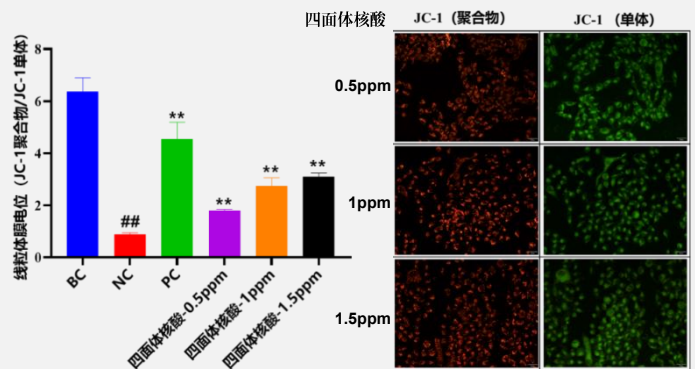
图67: tFNA促进ATP生产



### ◆ 线粒体膜电位

在线粒体膜电位方面，研究结果同样正向（图 67）。与阴性对照组相比，0.5 ppm、1 ppm和1.5 ppm浓度的tFNA处理分别使线粒体膜电位显著上升，提升率高达103.37%、208.99%和249.44%。这一结果进一步证实了tFNA在维持和改善线粒体功能方面的作用。线粒体膜电位的显著提高意味着线粒体的能量生产能力得到了极大的改善，这与之前观察到的ATP水平提升结果高度一致。

图68: tFNA增加线粒体膜电位



这三个指标的综合结果清楚地展示了tFNA在修复线粒体损伤方面的多重作用。tFNA不仅能够显著降低ROS水平，保护线粒体免受氧化应激的损害，还能大幅提高ATP产量和维持高水平的膜电位，从而全面提升线粒体的功能和能量产生效率。这些发现为tFNA在抗衰老化妆品中的应用提供了强有力的科学支持。通过全面改善线粒体功能，tFNA不仅可能延缓细胞衰老过程，还可能提高皮肤细胞应对环境压力的能力。这意味着tFNA可能成为一种多功能的护肤成分，不仅能保护皮肤免受环境伤害，还能从细胞能量代谢层面延缓皮肤衰老，为消费者提供更全面、更有效的抗衰老护理方案。

来源：公开资料，文献检索，创建医疗，沙利文分析

## 6.4 核酸四面体应用前景及展望

核酸四面体 (tFNA) 作为一种创新的化妆品原料, 已经展现出了多方面的功效优势和广阔的应用前景。随着研究的深入和技术的不断进步, tFNA在化妆品领域乃至更广泛的应用场景中的潜力正在逐步显现

### 1 tFNA在抗衰老护肤品中的应用前景尤为广阔

其卓越的皮肤渗透能力和多重功效, 如修复DNA损伤、维持皮肤蛋白稳态、促进细胞自噬、抑制细胞复制性衰老以及修复线粒体损伤等, 为开发新一代全方位抗衰老产品提供了坚实基础。未来, 我们可能会看到更多针对特定衰老机制的tFNA配方, 如专门针对氧化应激、细胞能量代谢或DNA修复的产品线。

### 2 tFNA的精准药物递送能力为开发高效、靶向的功能性护肤品开辟了新途径

我们可以预见, 未来将会出现更多结合tFNA与各种活性成分(如抗衰老肽、维生素、植物提取物等)的创新配方, 以实现更精准、更持久的护肤效果。这种精准递送系统不仅可以应用于日常护肤品, 还可能在治疗性护肤品中发挥重要作用, 如针对痤疮、色素沉着或敏感肌肤的专业护理产品。

### 3 tFNA在调节皮肤免疫反应和促进皮肤修复方面的潜力, 也为其在医疗美容领域的应用铺平了道路

我们可以期待看到tFNA在术后护理、伤口愈合, 或者特殊皮肤问题(如湿疹、牛皮癣等)的辅助治疗产品中的应用。这不仅将扩大tFNA的应用范围, 还可能为皮肤健康管理提供新的解决方案。

### 4 tFNA的多功能性和可定制性为个性化护肤开辟了新的可能

随着基因检测和皮肤分析技术的进步, 我们可能会看到基于个人皮肤状况和需求定制的tFNA护肤方案, 实现真正的精准护肤。在生产技术方面, 随着合成生物学和纳米技术的发展, tFNA的生产效率和成本有望进一步优化。这将为tFNA在大众化妆品市场的普及奠定基础, 使更多消费者能够享受到这一创新科技的益处。



#### 展望未来, 我们也需要注意到一些关键的研究方向和挑战

首先, 需要进行更多的长期的有效性研究, 特别是在不同皮肤类型和年龄段人群中的表现。

其次, tFNA与其他护肤成分的相互作用及潜在的协同效应也是一个值得深入探索的领域。

此外, 如何进一步提高tFNA的稳定性和生物利用率, 以及如何实现更精确的功能调控, 都是未来研究的重要方向。

在更广泛的应用场景中, tFNA的潜力远不止于化妆品领域。其独特的结构和性质可能在生物医学、环境保护、材料科学等领域找到新的应用。例如, 在药物递送系统、生物传感器、环境污染物检测等方面, tFNA都可能发挥重要作用。

总的来说, tFNA作为一种多功能、高效、可定制的纳米材料, 正在为化妆品行业乃至更广泛的领域带来革命性的变化。随着研究的不断深入和技术的持续创新, 我们有理由相信, tFNA将在未来的护肤科技和个人护理领域中扮演越来越重要的角色, 为消费者带来更安全、更有效、更个性化的护肤体验, 同时也为解决更多皮肤健康问题提供新的可能性。这一创新不仅将推动化妆品行业的技术进步, 还将为合成生物学在日常生活中的应用开辟新的道路, 展现出科技创新在改善人类生活质量方面的巨大潜力。

来源: 公开资料, 文献检索, 沙利文分析



## ■ 参考文献

- [1] Watson JD, Crick FH (April 1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid". *Nature*. 171 (4356): 737–8.
- [2] Nielsen PE (December 2008). "Triple Helix: Designing a New Molecule of Life". *Scientific American*. 299 (6): 64–71.
- [3] Gupta A, Mishra A, Puri N (October 2017). "Peptide nucleic acids: Advanced tools for biomedical applications". *Journal of Biotechnology*. 259: 148–159.
- [4] Brudno Y, Birnbaum ME, Kleiner RE, Liu DR (February 2010). "An in vitro translation, selection and amplification system for peptide nucleic acids". *Nature Chemical Biology*. 6 (2): 148–55.
- [5] Jain HV, Verthelyi D, Beaucage SL (2015). "Amphipathic trans-acting phosphorothioate DNA elements mediate the delivery of uncharged nucleic acid sequences in mammalian cells". *RSC Advances*. 5 (80): 65245–65254.
- [6] Summerton JE (2017). "Invention and Early History of Morpholinos: From Pipe Dream to Practical Products". *Morpholino Oligomers. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1565. Humana Press (Springer). pp. 1–15. ISBN 978-1-4939-6817-6.
- [7] Summerton J, Weller D (June 1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties". *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*. 7 (3): 187–95.
- [8] Elayadi, Anissa N.; Braasch, Dwaine A.; Corey, David R. (August 2002). "Implications of High-Affinity Hybridization by Locked Nucleic Acid Oligomers for Inhibition of Human Telomerase". *Biochemistry*. 41 (31): 9973–9981.
- [9] Obika, Satoshi; Nanbu, Daishu; Hari, Yoshiyuki; Morio, Ken-ichiro; In, Yasuko; Ishida, Toshimasa; Imanishi, Takeshi (1997-12-15). "Synthesis of 2'-O, 4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3, -endo sugar puckering". *Tetrahedron Letters*. 38 (50): 8735–87
- [10] Orum, Miriam Frieden and Henrik (2008-03-31). "Locked Nucleic Acid Holds Promise in the Treatment of Cancer". *Current Pharmaceutical Design*. 14 (11): 1138–1142.
- [11] Zhang L, Peritz A, Meggers E (March 2005). "A simple glycol nucleic acid". *Journal of the American Chemical Society*. 127 (12): 4174–5
- [12] Schlegel MK, Essen LO, Meggers E (July 2008). "Duplex structure of a minimal nucleic acid". *Journal of the American Chemical Society*. 130 (26): 8158–9.
- [13] Schlegel MK, Essen LO, Meggers E (February 2010). "Atomic resolution duplex structure of the simplified nucleic acid GNA". *Chemical Communications*. 46 (7): 1094–6.
- [14] Schöning, K. U. et al. Chemical etiology of nucleic acid structure: the a-threofuranosyl-(3'→2') oligonucleotide system. *Science* 290, 1347-1351, (2000)
- [15] Eschenmoser, A. Chemical etiology of nucleic acid structure. *Science* 284, 2118-2124, (1999).
- [16] Pinheiro, V. B. et al. Synthetic genetic polymers capable of heredity and evolution. *Science* 336, 341-344, (2012).
- [17] Liu, L. S. et al. alpha-L-Threose Nucleic Acids as Biocompatible Antisense Oligonucleotides for Suppressing Gene Expression in Living Cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 10, 9736-9743, (2018).
- [18] Seeman, N. C. & Belcher, A. M. Emulating biology: building nanostructures from the bottom up. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 6451–6455 (2002).
- [19] Pinheiro AV, Han D, Shih WM, Yan H (November 2011). "Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology". *Nature Nanotechnology*. 6 (12): 763–772.
- [20] History: Pelesko JA (2007). *Self-assembly: the science of things that put themselves together*. New York: Chapman & Hall/CRC. pp. 201, 242, 259. ISBN 978-1-58488-687-7.
- [21] Seeman, N. C. Nucleic-acid junctions and lattices. *J. Theor. Biol.* 99, 237–247 (1982).
- [22] Kallenbach, N. R., Ma, R. I. & Seeman, N. C. An immobile nucleic-acid junction constructed from oligonucleotides. *Nature* 305, 829–831 (1983).
- [23] Chen, J. H. & Seeman, N. C. Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature* 350, 631–633 (1991).
- [24] Fu, T. J. & Seeman, N. C. DNA double-crossover molecules. *Biochemistry* 32, 3211–3220 (1993).
- [25] Winfree, E., Liu, F. R., Wenzler, L. A. & Seeman, N. C. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature* 394, 539–544 (1998).

## ■ 参考文献

- [26] Mao, C. D., Sun, W. Q., Shen, Z. Y. & Seeman, N. C. A nanomechanical device based on the B–Z transition of DNA. *Nature* 397, 144–146 (1999).
- [27] Lin, C., Liu, Y., Rinker, S. & Yan, H. DNA tile based self-assembly: building complex nanoarchitectures. *ChemPhysChem* 7, 1641–1647 (2006).
- [28] McBride, L. J. & Caruthers, M. H. An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* 24, 245–248 (1983).
- [29] Aldaye, F. A., Palmer, A. L. & Sleiman, H. F. Assembling materials with DNA as the guide. *Science* 321, 1795–1799 (2008).
- [30] Hamblin, G. D., Rahbani, J. F. & Sleiman, H. F. Sequential growth of long DNA strands with user-defined patterns for nanostructures and scaffolds. *Nat. Commun.* 6, 7065 (2015).
- [31] Rothmund, P. W., Papadakis, N. & Winfree, E. Algorithmic self-assembly of DNA Sierpinski triangles. *PLoS Biol.* 2, e424 (2004).
- [32] Rothmund, P. W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* 440, 297–302 (2006).
- [33] Shih, W. M., Quispe, J. D. & Joyce, G. F. A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron. *Nature* 427, 618–621 (2004).
- [34] Yan, H., LaBean, T. H., Feng, L. & Reif, J. H. Directed nucleation assembly of DNA tile complexes for barcode-patterned lattices. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 8103–8108 (2003).
- [35] Hong, F., Zhang, F., Liu, Y. and Yan, H., 2017. DNA origami: scaffolds for creating higher order structures. *Chemical reviews*, 117(20), pp.12584-12640.
- [36] Wei, B., Dai, M. J. & Yin, P. Complex shapes self-assembled from single-stranded DNA tiles. *Nature* 485, 623–626 (2012).
- [37] Schmidt, T. L. et al. Scalable amplification of strand subsets from chip-synthesized oligonucleotide libraries. *Nat. Commun.* 6, 8634 (2015).
- [38] Li, W., Yang, Y., Jiang, S. X., Yan, H. & Liu, Y. Controlled nucleation and growth of DNA tile arrays within prescribed DNA origami frames and their dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 3724–3727 (2014).
- [39] Liu, W., Zhong, H., Wang, R. & Seeman, N. C. Crystalline two-dimensional DNA-origami arrays. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 264–267 (2011).
- [40] Geary, C., Rothmund, P. W. & Andersen, E. S. A single-stranded architecture for cotranscriptional folding of RNA nanostructures. *Science* 345, 799–804 (2014).
- [41] Hao, C. H. et al. Construction of RNA nanocages by re-engineering the packaging RNA of Phi29 bacteriophage. *Nat. Commun.* 5, 3890 (2014).
- [42] Delebecque, C. J., Lindner, A. B., Silver, P. A. & Aldaye, F. A. Organization of intracellular reactions with rationally designed RNA assemblies. *Science* 333, 470–474 (2011).
- [43] Chen, J. H. & Seeman, N. C. Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature* 350, 631–633 (1991).
- [44] Zhang, Y. & Seeman, N. C. Construction of a DNA-truncated octahedron. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 1661–1669 (1994).
- [45] Shih, W. M., Quispe, J. D. & Joyce, G. F. A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron. *Nature* 427, 618–621 (2004).
- [46] Goodman, R. P., Berry, R. M. & Turberfield, A. J. The single-step synthesis of a DNA tetrahedron. *Chem. Commun. (Camb.)* 1372–1373 (2004).
- [47] Aldaye, F. A. & Sleiman, H. F. Modular access to structurally switchable 3D discrete DNA assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 13376–13377 (2007).
- [48] Shih, W. M. & Lin, C. Knitting complex weaves with DNA origami. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 276–282 (2010).
- [49] Han, D. R. et al. DNA origami with complex curvatures in three-dimensional space. *Science* 332, 342–346 (2011).
- [50] Andersen, E. S. et al. Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature* 459, 73–75 (2009).
- [51] Ke, Y. et al. Scaffolded DNA origami of a DNA tetrahedron molecular container. *Nano Lett.* 9, 2445–2447 (2009).

## ■ 参考文献

- [52] Han, D. R. et al. DNA origami with complex curvatures in three-dimensional space. *Science* 332, 342–346 (2011).
- [53] Endo, M., Hidaka, K., Kato, T., Namba, K. & Sugiyama, H. DNA prism structures constructed by folding of multiple rectangular arms. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 15570–15571 (2009).
- [54] Benson, E. et al. DNA rendering of polyhedral meshes at the nanoscale. *Nature* 523, 441–444 (2015).
- [55] Zheng, J. et al. From molecular to macroscopic via the rational design of a self-assembled 3D DNA crystal. *Nature* 461, 74–77 (2009).
- [56] Zhao, J. et al. Post-assembly stabilization of rationally designed DNA crystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 9936–9939 (2015).
- [57] an, H., Zhang, X. P., Shen, Z. Y. & Seeman, N. C. A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology. *Nature* 415, 62–65 (2002).
- [58] Feng, L., Park, S. H., Reif, J. H. & Yan, H. A two-state DNA lattice switched by DNA nanoactuator. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 4342–4346 (2003).
- [59] Yin, P., Choi, H. M., Calvert, C. R. & Pierce, N. A. Programming biomolecular self-assembly pathways. *Nature* 451, 318–322 (2008).
- [60] Omabegho, T., Sha, R. & Seeman, N. C. A bipedal DNA Brownian motor with coordinated legs. *Science* 324, 67–71 (2009).
- [61] He, Y. & Liu, D. R. Autonomous multistep organic synthesis in a single isothermal solution mediated by a DNA walker. *Nat. Nanotechnol.* 5, 778–782 (2010).
- [62] Gu, H., Chao, J., Xiao, S.-J. & Seeman, N. C. Dynamic patterning programmed by DNA tiles captured on a DNA origami substrate. *Nat. Nanotechnol.* 4, 245–248 (2009).
- [63] Lo, P. K., Altvater, F. & Sleiman, H. F. Templated synthesis of DNA nanotubes with controlled, predetermined lengths. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 10212–10214 (2010).
- [64] Yang, Y., Endo, M., Hidaka, K. & Sugiyama, H. Photo-controllable DNA origami nanostructures assembling into predesigned multiorientational patterns. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 20645–20653 (2012).
- [65] Maye, M. M., Kumara, M. T., Nykpanchuk, D., Sherman, W. B. & Gang, O. Switching binary states of nanoparticle superlattices and dimer clusters by DNA strands. *Nat. Nanotechnol.* 5, 116–120 (2010).
- [66] Kahn, J. S., Hu, Y. & Willner, I. Stimuli-responsive DNA-based hydrogels: from basic principles to applications. *Acc. Chem. Res.* 50, 680–690 (2017).
- [67] Seeman, N. C. Nucleic-acid junctions and lattices. *J. Theor. Biol.* 99, 237–247 (1982).
- [68] Shi, J. F. & Bergstrom, D. E. Assembly of novel DNA cycles with rigid tetrahedral linkers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36, 111–113 (1997).
- [69] Aldaye, F. A. & Sleiman, H. F. Sequential self-assembly of a DNA hexagon as a template for the organization of gold nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 118, 2262–2267 (2006).
- [70] Greschner, A. A., Toader, V. & Sleiman, H. F. The role of organic linkers in directing DNA self-assembly and significantly stabilizing DNA duplexes. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 14382–14389 (2012).
- [71] Chaput, J. C. & Switzer, C. A DNA pentaplex incorporating nucleobase quintets. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 10614–10619 (1999).
- [72] Avakyan, N. et al. Reprogramming the assembly of unmodified DNA with a small molecule. *Nat. Chem.* 8, 368–376 (2016).
- [73] Leal, N. A. et al. Transcription, reverse transcription, and analysis of RNA containing artificial genetic components. *ACS Synth. Biol.* 4, 407–413 (2015).
- [74] Malyshev, D. A. & Romesberg, F. E. The expanded genetic alphabet. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 11930–11944 (2015).
- [75] Zhang, Y. et al. A semisynthetic organism engineered for the stable expansion of the genetic alphabet. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 114, 1317–1322 (2017).
- [76] Vargas-Baca, I., Mitra, D., Zulyniak, H. J., Banerjee, J. & Sleiman, H. F. Solid-phase synthesis of transition metal linked, branched oligonucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 4629–4632 (2001).
- [77] McLaughlin, C. K., Hamblin, G. D. & Sleiman, H. F. Supramolecular DNA assembly. *Chem. Soc. Rev.* 40, 5647–5656 (2011).

## ■ 参考文献

- [78] Yang, H., Rys, A. Z., McLaughlin, C. K. & Sleiman, H. F. Templated ligand environments for the selective incorporation of different metals into DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 9919–9923 (2009).
- [79] Yang, H. et al. Chiral metal–DNA four-arm junctions and metalated nanotubular structures. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 4620–4623 (2011).
- [80] Yang, H., Rys, A. Z., McLaughlin, C. K. & Sleiman, H. F. Templated ligand environments for the selective incorporation of different metals into DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 9919–9923 (2009).
- [81] Kaul, C., Muller, M., Wagner, M., Schneider, S. & Carell, T. Reversible bond formation enables the replication and amplification of a crosslinking salen complex as an orthogonal base pair. *Nat. Chem.* 3, 794–800 (2011).
- [82] Clever, G. H., Kaul, C. & Carell, T. DNA–metal base pairs. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 6226–6236 (2007).
- [83] Endo, M., Shiroyama, T., Fujitsuka, M. & Majima, T. Four-way-branched DNA-porphyrin conjugates for construction of four double-helix-DNA assembled structures. *J. Org. Chem.* 70, 7468–7472 (2005).
- [84] Mai, Y. Y. & Eisenberg, A. Self-assembly of block copolymers. *Chem. Soc. Rev.* 41, 5969–5985 (2012).
- [85] Chien, M.-P., Rush, A. M., Thompson, M. P. & Gianneschi, N. C. Programmable shape-shifting micelles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 5076–5080 (2010).
- [86] Chidchob, P., Edwardson, T. G., Serpell, C. J. & Sleiman, H. F. Synergy of two assembly languages in DNA nanostructures: self-assembly of sequence-defined polymers on DNA cages. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 4416–4425 (2016).
- [87] List, J., Weber, M. & Simmel, F. C. Hydrophobic actuation of a DNA origami bilayer structure. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 4236–4239 (2014).
- [88] Conway, J. W. et al. Dynamic behavior of DNA cages anchored on spherically supported lipid bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 12987–12997 (2014).
- [89] Suzuki, Y., Endo, M. & Sugiyama, H. Lipid-bilayer-assisted two-dimensional self-assembly of DNA origami nanostructures. *Nat. Commun.* 6, 8052 (2015).
- [90] Yang, Y. et al. Self-assembly of size-controlled liposomes on DNA nanotemplates. *Nat. Chem.* 8, 476–483 (2016).
- [91] Knudsen, J. B. et al. Routing of individual polymers in designed patterns. *Nat. Nanotechnol.* 10, 892–898 (2015).
- [92] Seeman NC. Nucleic acid junctions and lattices. *J Theor Biol.* 1982;99(2):237–247. doi:10.1016/0022-5193(82)90002-9
- [93] Li S, TIAN T, ZHANG T, et al Advances in biological applications of self-assembled DNA tetrahedral nanostructures. *Mater Today.* 2019;24:57–68.
- [94] R. P. Goodman et al. , Rapid Chiral Assembly of Rigid DNA Building Blocks for Molecular Nanofabrication. *Science* 310, 1661–1665(2005).DOI:10.1126/science.1120367
- [95] R. P. Goodman et al. , Rapid Chiral Assembly of Rigid DNA Building Blocks for Molecular Nanofabrication. *Science* 310, 1661–1665(2005).DOI:10.1126/science.1120367
- [96] Zagorovsky, K., Chou, L. Y. T. & Chan, W. C. W. Controlling DNA–nanoparticle serum interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 13600–13605 (2016).
- [97] Mathur D, Rogers KE, Díaz SA, et al. Determining the cytosolic stability of small DNA nanostructures in cellula. *Nano Lett.* 2022;22(12):5037–5045. doi:10.1021/acs.nanolett.2c00917
- [98] Chandrasekaran, A. R. Nuclease Resistance of DNA Nanostructures. *Nat. Rev. Chem.* 2021, 5 (4), 225– 239, DOI: 10.1038/s41570-021-00251-y
- [99] Chandrasekaran, A. R.; Vilcapoma, J.; Dey, P.; Wong-Deyrup, S. W.; Dey, B. K.; Halvorsen, K. Exceptional Nuclease Resistance of Paranemic Crossover (PX) DNA and Crossover-Dependent Biostability of DNA Motifs. *J. Am. Chem. Soc.* 2020, 142 (14), 6814–6821, DOI: 10.1021/jacs.0c02211
- [100] Hong S, Jiang W, Ding Q, Lin K, Zhao C, Wang X. The Current Progress of Tetrahedral DNA Nanostructure for Antibacterial Application and Bone Tissue Regeneration. *Int J Nanomedicine.* 2023;18:3761-3780
- [101] Xiao D, Li Y, Tian T, et al. Tetrahedral framework nucleic acids loaded with aptamer AS1411 for siRNA delivery and gene silencing in malignant melanoma. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2021;13(5):6109–6118. doi:10.1021/acsmi.0c23005

## ■ 参考文献

- [102] Peng Q, Shao XR, Xie J, et al. Understanding the biomedical effects of the self-assembled tetrahedral DNA nanostructure on living cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(20):12733–12739. doi:10.1021/acsami.6b03786
- [103] Shao X, Lin S, Peng Q, et al. Tetrahedral DNA nanostructure: a potential promoter for cartilage tissue regeneration via regulating chondrocyte phenotype and proliferation. *Small*. 2017;13(12). doi:10.1002/smll.201602770
- [104] Liu N, Zhang X, Li N, et al. Tetrahedral framework nucleic acids promote corneal epithelial wound healing in vitro and in vivo. *Small*. 2019;15(31):e1901907. doi:10.1002/smll.201901907
- [105] Li J, Pei H, Zhu B, et al. Self-assembled multivalent DNA nanostructures for noninvasive intracellular delivery of immunostimulatory CpG oligonucleotides. *ACS Nano*. 2011;5(11):8783–8789. doi:10.1021/nn202774x
- [106] Ding H, Li J, Chen N, et al. DNA nanostructure-programmed like-charge attraction at the cell-membrane interface. *ACS Cent Sci*. 2018;4(10):1344–1351. doi:10.1021/acscentsci.8b00383
- [107] Walsh AS, Yin H, Erben CM, Wood MJ, Turberfield AJ. DNA cage delivery to mammalian cells. *ACS Nano*. 2011;5(7):5427–5432. doi:10.1021/nn2005574
- [108] Kim KR, Kim DR, Lee T, et al. Drug delivery by a self-assembled DNA tetrahedron for overcoming drug resistance in breast cancer cells. *Chem Commun*. 2013;49(20):2010–2012. doi:10.1039/c3cc38693g
- [109] Ding H, Li J, Chen N, et al. DNA nanostructure-programmed like-charge attraction at the cell-membrane interface. *ACS Cent Sci*. 2018;4(10):1344–1351. doi:10.1021/acscentsci.8b00383
- [110] Liang L, Li J, Li Q, et al. Single-particle tracking and modulation of cell entry pathways of a tetrahedral DNA nanostructure in live cells. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2014;53(30):7745–7750. doi:10.1002/anie.201403236
- [111] Peng Q, Shao XR, Xie J, et al. Understanding the biomedical effects of the self-assembled tetrahedral DNA nanostructure on living cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(20):12733–12739. doi:10.1021/acsami.6b03786
- [112] Lin, S. Y.; Zhang, Q.; Zhang, T.; Shao, X. R.; Li, Y.; Shi, S. R.; Tian, T. R.; Wei, X. W.; Lin, Y. F. Tetrahedral DNA Nanomaterial Regulates the Biological Behaviors of Adipose-Derived Stem Cells via DNA Methylation on Dlg3. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018, 10, 32017–32025,
- [113] Shi, S.; Peng, Q.; Shao, X.; Xie, J.; Lin, S.; Zhang, T.; Li, Q.; Li, X.; Lin, Y. Self-Assembled Tetrahedral DNA Nanostructures Promote Adipose-Derived Stem Cell Migration via LncRNA XLOC 010623 and RHOA/ROCK2 Signal Pathway. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, 8 (30), 19353–19363, DOI: 10.1021/acsami.6b06528
- [114] Liu, N., Zhang, X., Li, N., Zhou, M., Zhang, T., Li, S., Cai, X., Ji, P. and Lin, Y., 2019. Tetrahedral framework nucleic acids promote corneal epithelial wound healing in vitro and in vivo. *Small*, 15(31), p.1901907.
- [115] Zhu, J., Zhang, M., Gao, Y. et al. Tetrahedral framework nucleic acids promote scarless healing of cutaneous wounds via the AKT-signaling pathway. *Sig Transduct Target Ther* 5, 120 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0173-3>
- [116] Boutaud O, Moore K P, Reeder B J, et al. Acetaminophen inhibits hemoprotein-catalyzed lipid peroxidation and attenuates rhabdomyolysis-induced renal failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107: 2699-2704
- [117] Zhao D, Cui W, Liu M, et al. Tetrahedral Framework Nucleic Acid Promotes the Treatment of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws by Promoting Angiogenesis and M2 Polarization. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12: 44508-44522
- [118] Lin, S., Zhang, Q., Li, S., Zhang, T., Wang, L., Qin, X., Zhang, M., Shi, S. and Cai, X., 2020. Antioxidative and angiogenesis-promoting effects of tetrahedral framework nucleic acids in diabetic wound healing with activation of the Akt/Nrf2/HO-1 pathway. *ACS applied materials & interfaces*, 12(10), pp.11397-11408.
- [119] Zhang, Q., Lin, S., Shi, S., Zhang, T., Ma, Q., Tian, T., ... & Lin, Y. (2018). Anti-inflammatory and antioxidative effects of tetrahedral DNA nanostructures via the modulation of macrophage responses. *ACS applied materials & interfaces*, 10(4), 3421-3430.
- [120] Jiang, Y.; Li, S.; Zhang, T.; Zhang, M.; Chen, Y.; Wu, Y.; Liu, Y.; Liu, Z.; Lin, Y. Tetrahedral Framework Nucleic Acids Inhibit Skin Fibrosis via the Pyroptosis Pathway. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2022, 14 (13), 15069–15079, DOI: 10.1021/acsami.2c02877
- [121] C. Mao, W. Pan, X. Shao, W. Ma, Y. Zhang, Y. Zhan, Y. Gao, Y. Lin. The clearance effect of tetrahedral DNA nanostructures on senescent human dermal fibroblasts. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 11 (2) (2019), pp. 1942-1950, 10.1021/acsami.8b20530
- [122] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429):149–155. doi:10.1016/S0140-6736(04)16627-0

## ■ 参考文献

- [123] Zhou M, Liu N, Zhang Q, et al. Effect of tetrahedral DNA nanostructures on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Cell Prolif.* 2019;52(3):e12566. doi:10.1111/cpr.12566
- [124] Zhang Q, Lin S, Shi S, et al. Anti-inflammatory and antioxidative effects of tetrahedral DNA nanostructures via the modulation of macrophage responses. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(4):3421–3430. doi:10.1021/acsami.7b17928
- [125] Zhou M, Gao S, Zhang X, et al. The protective effect of tetrahedral framework nucleic acids on periodontium under inflammatory conditions. *Bioact Mater.* 2021;6(6):1676–1688. doi:10.1016/j.bioactmat.2020.11.018
- [126] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(3):203–222. doi:10.1038/nrd.2016.246
- [127] Li S, Liu Y, Tian T, et al. Bioswitchable delivery of microRNA by framework nucleic acids: application to bone regeneration. *Small.* 2021;17(47):e2104359. doi:10.1002/smll.202104359
- [128] Li D, Yang Z, Luo Y, Zhao X, Tian M, Kang P. Delivery of MiR335-5p-pendant tetrahedron DNA nanostructures using an injectable heparin lithium hydrogel for challenging bone defects in steroid-associated osteonecrosis. *Adv Healthc Mater.* 2022;11(1):e2101412. doi:10.1002/adhm.202101412
- [129] Qi, L., Hong, S., Zhao, T., Yan, J., Ge, W., Wang, J., Fang, X., Jiang, W., Shen, S.G. and Zhang, L., DNA Tetrahedron Delivering miR-21-5p Promotes Senescent Bone Defects Repair through Synergistic Regulation of Osteogenesis and Angiogenesis. *Advanced Healthcare Materials*, p.2401275.
- [130] Li J, Lai Y, Li M, et al. Repair of infected bone defect with clindamycin-tetrahedral DNA nanostructure complex-loaded 3D bioprinted hybrid scaffold. *Chem Eng J.* 2022;435:134855. doi:10.1016/j.cej.2022.134855
- [131] Shao, X., Lin, S., Peng, Q., Shi, S., Wei, X., Zhang, T. and Lin, Y., 2017. Tetrahedral DNA nanostructure: a potential promoter for cartilage tissue regeneration via regulating chondrocyte phenotype and proliferation. *Small*, 13(12), p.1602770.
- [132] Shi, S., Lin, S., Li, Y., Zhang, T., Shao, X., Tian, T., Zhou, T., Li, Q. and Lin, Y., 2018. Effects of tetrahedral DNA nanostructures on autophagy in chondrocytes. *Chemical Communications*, 54(11), pp.1327-1330.
- [133] Lin, S., Zhang, Q., Li, S., Qin, X., Cai, X. and Wang, H., 2022. Tetrahedral framework nucleic acids-based delivery promotes intracellular transfer of healing peptides and accelerates diabetic wound healing. *Cell Proliferation*, 55(9), p.e13279.
- [134] Sirong S, Yang C, Taoran T, et al. Effects of tetrahedral framework nucleic acid/wogonin complexes on osteoarthritis. *Bone Res.* 2020;8:6. doi:10.1038/s41413-019-0077-4
- [135] Li P, Fu L, Liao Z, et al. Chitosan hydrogel/3D-printed poly( $\epsilon$ -caprolactone) hybrid scaffold containing synovial mesenchymal stem cells for cartilage regeneration based on tetrahedral framework nucleic acid recruitment. *Biomaterials.* 2021;278:121131. doi:10.1016/j.biomaterials.2021.121131
- [136] L. Wang, Y. Wang, T. Lu, C. Luo, B. Qiu, S. Huang, Y. Lin, Tetrahedral Framework Nucleic Acid Loaded miR-23b Inhibits Synovial Inflammation and Cartilage Matrix Degradation in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Adv. Funct. Mater.* 2024, 34, 2310749. <https://doi.org/10.1002/adfm.202310749>
- [137] Wang L, Wang Y, Jiang Y, et al. Tetrahedral Framework Nuclear Acids Can Regulate Interleukin-17 Pathway to Alleviate Inflammation and Inhibit Heterotopic Ossification in Ankylosing Spondylitis. *ACS Nano*, 2023, 17: 24187-24199
- [138] Liu L-N, Hu P, Liu Y, et al. Tetrahedral Framework Nucleic Acids Promote Senile Osteoporotic Fracture Repair by Enhancing Osteogenesis and Angiogenesis of Callus. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, 15: 25403-25416
- [139] Yu X, Wang Y, Ran L, et al. Tetrahedral Framework Nucleic Acids Inhibit Muscular Mitochondria-Mediated Apoptosis and Ameliorate Muscle Atrophy in Sarcopenia. *Nano Letters*, 2023, 23: 8816-8826
- [140] Coucha, M., Elshaer, S.L., Eldahshan, W.S., Mysona, B.A. and El-Remessy, A.B., 2015. Molecular mechanisms of diabetic retinopathy: potential therapeutic targets. *Middle East African journal of ophthalmology*, 22(2), pp.135-144.
- [141] Shao, X., Ma, W., Xie, X., Li, Q., Lin, S., Zhang, T., et al. (2018). Neuroprotective Effect of Tetrahedral DNA Nanostructures in a Cell Model of Alzheimer's Disease. *ACS Appl. Mater. Inter.* 10 (28), 23682–23692. doi:10.1021/acsami.8b07827
- [142] Shao, X., Cui, W., Xie, X., Ma, W., Zhan, Y., and Lin, Y. (2020). Treatment of Alzheimer's Disease with Framework Nucleic Acids. *Cell Prolif* 53 (4), e12787. doi:10.1111/cpr.12787
- [143] Cui, W., Zhan, Y., Shao, X., Fu, W., Xiao, D., Zhu, J., et al. (2019). Neuroprotective and Neurotherapeutic Effects of Tetrahedral Framework Nucleic Acids on Parkinson's Disease In Vitro. *ACS Appl. Mater. Inter.* 11 (36), 32787–32797. doi:10.1021/acsami.9b10308

## ■ 参考文献

- [144] Li, J., Xiao, L., Yan, N., Li, Y., Wang, Y., Qin, X., et al. (2021). The Neuroprotective Effect of MicroRNA-22-3p Modified Tetrahedral Framework Nucleic Acids on Damaged Retinal Neurons via TrkB/BDNF Signaling Pathway. *Adv. Funct. Mater.* 31 (36), 2104141. doi:10.1002/adfm.202104141
- [145] Ma, W., Zhan, Y., Zhang, Y., Xie, X., Mao, C., and Lin, Y. (2020). Enhanced Neural Regeneration with a Concomitant Treatment of Framework Nucleic Acid and Stem Cells in Spinal Cord Injury. *ACS Appl. Mater. Inter.* 12 (2), 2095–2106. doi:10.1021/acsami.9b19079
- [146] Wu, Q., Shaikh, M. A., Meymand, E. S., Zhang, B., Luk, K. C., Trojanowski, J. Q., et al. (2020). Neuronal Activity Modulates Alpha-Synuclein Aggregation and Spreading in Organotypic Brain Slice Cultures and In Vivo. *Acta Neuropathol.* 140 (6), 831–849. doi:10.1007/s00401-020-02227-6
- [147] Yao, Y., Wen, Y., Li, Y., Zhu, J., Tian, T., Zhang, Q., et al. (2021). Tetrahedral Framework Nucleic Acids Facilitate Neurorestoration of Facial Nerves by Activating the NGF/PI3K/AKT Pathway. *Nanoscale* 13, 15598–15610. doi:10.1039/d1nr04619e
- [148] Yang, Y., Zhu, J., Ma, W., Zhang, W., Xie, Y., Chen, X., et al. (2021). The Remyelination Effect of DNA Framework Nucleic Acids on Demyelinating Diseases. *Appl. Mater. Today* 24, 101098. doi:10.1016/j.apmt.2021.101098
- [149] Ma, W., Zhan, Y., Zhang, Y., Xie, X., Mao, C., and Lin, Y. (2020). Enhanced Neural Regeneration with a Concomitant Treatment of Framework Nucleic Acid and Stem Cells in Spinal Cord Injury. *ACS Appl. Mater. Inter.* 12 (2), 2095–2106. doi:10.1021/acsami.9b19079
- [150] Yao, Y., Wen, Y., Li, Y., Zhu, J., Tian, T., Zhang, Q., et al. (2021). Tetrahedral Framework Nucleic Acids Facilitate Neurorestoration of Facial Nerves by Activating the NGF/PI3K/AKT Pathway. *Nanoscale* 13, 15598–15610. doi:10.1039/d1nr04619e
- [151] Shi, S., Fu, W., Lin, S., Tian, T., Li, S., Shao, X., et al. (2019). Targeted and Effective Glioblastoma Therapy via Aptamer-Modified Tetrahedral Framework Nucleic Acid-Paclitaxel Nanoconjugates that Can Pass the Blood Brain Barrier. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biol. Med.* 21, 102061. doi:10.1016/j.nano.2019.102061
- [152] Fu, W., You, C., Ma, L., Li, H., Ju, Y., Guo, X., et al. (2019). Enhanced Efficacy of Temozolomide Loaded by a Tetrahedral Framework DNA Nanoparticle in the Therapy for Glioblastoma. *ACS Appl. Mater. Inter.* 11 (43), 39525–39533. doi:10.1021/acsami.9b13829
- [153] Cui, W., Yang, X., Chen, X., Xiao, D., Zhu, J., Zhang, M., et al. (2021). Treating LRRK2-Related Parkinson's Disease by Inhibiting the mTOR Signaling Pathway to Restore Autophagy. *Adv. Funct. Mater.* 31, 2105152. doi:10.1002/adfm.202105152
- [154] Fu, W., Ma, L., Ju, Y., Xu, J., Li, H., Shi, S., et al. (2021). Therapeutic siCCR2 Loaded by Tetrahedral Framework DNA Nanorobotics in Therapy for Intracranial Hemorrhage. *Adv. Funct. Mater.* 31, 2101435. doi:10.1002/adfm.202101435
- [155] Fu, W., You, C., Ma, L., Li, H., Ju, Y., Guo, X., et al. (2019). Enhanced Efficacy of Temozolomide Loaded by a Tetrahedral Framework DNA Nanoparticle in the Therapy for Glioblastoma. *ACS Appl. Mater. Inter.* 11 (43), 39525–39533. doi:10.1021/acsami.9b13829
- [156] Zhang Q, Lin S, Shi S, et al. Anti-inflammatory and Antioxidative Effects of Tetrahedral DNA Nanostructures via the Modulation of Macrophage Responses. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10: 3421-3430
- [157] Qin, X., Xiao, L., Li, N., Hou, C., Li, W., Li, J., Yan, N. and Lin, Y., 2022. Tetrahedral framework nucleic acids-based delivery of microRNA-155 inhibits choroidal neovascularization by regulating the polarization of macrophages. *Bioactive materials*, 14, pp.134-144.
- [158] Qin, X., Zhang, B., Sun, X., Zhang, M., Xiao, D., Lin, S., Liu, Z., Cui, W. and Lin, Y., 2023. Tetrahedral-framework nucleic acid loaded with MicroRNA-155 enhances immunocompetence in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice by modulating dendritic cells and macrophages. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(6), pp.7793-7803.
- [159] Zhang, T., Zhou, M., Xiao, D., Liu, Z., Jiang, Y., Feng, M., Lin, Y. and Cai, X., 2022. Myelosuppression alleviation and hematopoietic regeneration by tetrahedral-framework nucleic-acid nanostructures functionalized with osteogenic growth peptide. *Advanced Science*, 9(27), p.2202058.
- [160] Gao, S., Li, Y., Xiao, D., Zhou, M., Cai, X. and Lin, Y., 2021. Tetrahedral framework nucleic acids induce immune tolerance and prevent the onset of type 1 diabetes. *Nano letters*, 21(10), pp.4437-4446.
- [161] Kim, K.R., Kim, D.R., Lee, T., Yhee, J.Y., Kim, B.S., Kwon, I.C. and Ahn, D.R., 2013. Drug delivery by a self-assembled DNA tetrahedron for overcoming drug resistance in breast cancer cells. *Chemical communications*, 49(20), pp.2010-2012.

## ■ 参考文献

- [162] Cai, Z., Li, Y., Bai, L., Xu, J., Liu, Z., Zhang, T., Gao, S. and Lin, Y., 2023. Tetrahedral framework nucleic acids based small interfering RNA targeting receptor for advanced glycation end products for diabetic complications treatment. *ACS nano*, 17(22), pp.22668-22683.
- [163] Liu, X., Yu, Z., Wu, Y., Shi, S., Yao, J., Feng, X., Wen, D., Shi, Z., Zhao, Z., Li, Y. and Zhou, H., 2021. The immune regulatory effects of tetrahedral framework nucleic acid on human T cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cell Proliferation*, 54(8), p.e13084.
- [164] Zhou, M., Zhang, T., Zhang, X., Zhang, M., Gao, S., Zhang, T., Li, S., Cai, X., Li, J. and Lin, Y., 2022. Effect of tetrahedral framework nucleic acids on neurological recovery via ameliorating apoptosis and regulating the activation and polarization of astrocytes in ischemic stroke. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(33), pp.37478-37492.
- [165] Zhang Y, Ma W, Zhu Y, et al. Inhibiting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by tetrahedral DNA nanostructure-enabled antisense peptide nucleic acid delivery. *Nano Lett.* 2018;18(9):5652–5659. doi:10.1021/acs.nanolett.8b02166
- [166] Liu Y, Sun Y, Li S, et al. Tetrahedral framework nucleic acids deliver antimicrobial peptides with improved effects and less susceptibility to bacterial degradation. *Nano Lett.* 2020;20(5):3602–3610. doi:10.1021/acs.nanolett.0c00529
- [167] Sun Y, Liu Y, Zhang B, et al. Erythromycin loaded by tetrahedral framework nucleic acids are more antimicrobial sensitive against *Escherichia coli* (*E. coli*). *Bioact Mater.* 2021;6(8):2281–2290. doi:10.1016/j.bioactmat.2020.12.027
- [168] Sun Y, Li S, Zhang Y, et al. Tetrahedral framework nucleic acids loading ampicillin improve the drug susceptibility against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020;12(33):36957–36966. doi:10.1021/acsami.0c11249
- [169] Skov R, Varga A, Matuschek E, et al. EUCAST disc diffusion criteria for the detection of *mecA*-mediated  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus pseudintermedius*: oxacillin versus ceftiofex. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(1):122.e121–122.e126. doi:10.1016/j.cmi.2019.05.002
- [170] Sun Y, Liu Y, Zhang B, et al. Erythromycin loaded by tetrahedral framework nucleic acids are more antimicrobial sensitive against *Escherichia coli* (*E. coli*). *Bioact Mater.* 2021;6(8):2281–2290. doi:10.1016/j.bioactmat.2020.12.027
- [171] Narenji H, Hozoladeh P, Aghazadeh M, Rezaee MA, Asgharzadeh M, Kafil HS. Peptide nucleic acids (PNAs): currently potential bactericidal agents. *Biomed Pharmacother.* 2017;93:580–588. doi:10.1016/j.biopha.2017.06.092
- [172] Readman JB, Dickson G, Coldham NG. Tetrahedral DNA nanoparticle vector for intracellular delivery of targeted peptide nucleic acid antisense agents to restore antibiotic sensitivity in cefotaxime-resistant *Escherichia coli*. *Nucleic Acid Ther.* 2017;27(3):176–181. doi:10.1089/nat.2016.0644
- [173] Haydon DJ, Stokes NR, Ure R, et al. An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity. *Science.* 2008;321(5896):1673–1675. doi:10.1126/science.1159961
- [174] Zhang T, Cui W, Tian T, Shi S, Lin Y. Progress in biomedical applications of tetrahedral framework nucleic acid-based functional systems. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020;12(42):47115–47126. doi:10.1021/acsami.0c13806
- [175] Liu Y, Sun Y, Li S, et al. Tetrahedral framework nucleic acids deliver antimicrobial peptides with improved effects and less susceptibility to bacterial degradation. *Nano Lett.* 2020;20(5):3602–3610. doi:10.1021/acs.nanolett.0c00529
- [176] Zhang B, Qin X, Zhou M, et al. Tetrahedral DNA nanostructure improves transport efficiency and anti-fungal effect of histatin 5 against *Candida albicans*. *Cell Prolif.* 2021;54(5):e13020. doi:10.1111/cpr.13020
- [177] Zhang Y, Xie X, Ma W, et al. Multi-targeted antisense oligonucleotide delivery by a framework nucleic acid for inhibiting biofilm formation and virulence. *Nanomicro Lett.* 2020;12(1):74. doi:10.1007/s40820-020-0409-3
- [178] Li, S., Liu, Y., Zhang, T., Lin, S., Shi, S., He, J., \*\*e, Y., Cai, X., Tian, T. and Lin, Y., 2022. A tetrahedral framework DNA-based bioswitchable miRNA inhibitor delivery system: application to skin anti-aging. *Advanced Materials*, 34(46), p.2204287.
- [179]林云锋,姜玥莹,蔡潇潇.DNA四面体框架纳米核酸在美容中的用途:CN202210243429.8[P].CN202210243429.8[2024-07-21].
- [180] He, J., Chen, W., Chen, X., Xie, Y., Zhao, Y., Tian, T., Guo, B. and Cai, X., 2023. Tetrahedral framework nucleic acid loaded with glabridin: A transdermal delivery system applied to anti-hyperpigmentation. *Cell Proliferation*, 56(12), p.e13495.
- [181] Xie, Y., He, J., Li, S., Chen, X., Zhang, T., Zhao, Y., Lin, Y. and Cai, X., 2023. A transdermal drug delivery system based on nucleic acid nanomaterials for skin photodamage treatment. *Advanced Functional Materials*, 33(46), p.2303580.
- [182] <https://mp.weixin.qq.com/s/yiDH6JqRWm821UvTrgvkSA>
- [183] Wang W, Yan R, Lin L, Peng L, Xiong Y, Chen H, Gao X, Liu K, Zhou L, Lin Y. Amelioration of radiation cystitis by tetrahedral framework nucleic acid nanostructures functionalized with quercetin. *Chemical Engineering Journal.* 2024 Jun 1:152736.



## ■ 参考文献

- [184] Liu, Z., Chen, X., Ma, W., Gao, Y., Yao, Y., Li, J., Zhang, T., Qin, X., Ge, Y., Jiang, Y. and Lin, Y., 2022. Suppression of lipopolysaccharide-induced sepsis by tetrahedral framework nucleic acid loaded with quercetin. *Advanced Functional Materials*, 32(43), p.2204587.
- [185] Zhang, M., Qin, X., Gao, Y., Liang, J., Xiao, D., Zhang, X., Zhou, M. and Lin, Y., 2023. Transcutaneous immunotherapy for RNAi: a cascade-responsive decomposable nanocomplex based on polyphenol-mediated framework nucleic acid in psoriasis. *Advanced science*, 10(33), p.2303706.
- [186] Jiang, Y., Li, S., Shi, R., Yin, W., Lv, W., Tian, T. and Lin, Y., 2024. A novel bioswitchable miRNA mimic delivery system: therapeutic strategies upgraded from tetrahedral framework nucleic acid system for fibrotic disease treatment and pyroptosis pathway inhibition. *Advanced Science*, 11(1), p.2305622.
- [187] Praetorius, F., Kick, B., Behler, K. et al. Biotechnological mass production of DNA origami. *Nature* 552, 84–87 (2017). <https://doi.org/10.1038/nature24650>
- [188] <http://www.trautec.com.cn/>
- [189] Schumacher, B., Pothof, J., Vijg, J. and Hoeijmakers, J.H., 2021. The central role of DNA damage in the ageing process. *Nature*, 592(7856), pp.695-703.

## ■ 法律声明

- ◆ 本报告著作权归沙利文、创健医疗所有，未经书面许可，任何机构或个人不得以任何形式翻版、复刻、发表或引用。若征得沙利文、创健医疗同意进行引用、刊发的，需在允许的范围内使用，并注明出处为“沙利文、创健医疗”，且不得对本报告进行任何有悖原意的引用、删节或修改。
- ◆ 本报告分析师具有专业研究能力，保证报告数据均来自合法合规渠道，观点产出及数据分析基于分析师对行业的客观理解，本报告不受任何第三方授意或影响。本报告数据和信息均来源于公开信息渠道，沙利文、创健医疗拥有对报告的最终解释权。
- ◆ 本报告所涉及的观点或信息仅供参考，不构成任何投资建议。本报告仅在相关法律许可的情况下发放，并仅为提供信息而发放，概不构成任何广告。在法律许可的情况下，沙利文可能会为报告中提及的企业提供或争取提供投融资或咨询等相关服务。本报告所指的公司或投资标的的价值、价格及投资收入可升可跌。
- ◆ 本报告的部分信息来源于公开资料，沙利文、创健医疗对该等信息的准确性、完整性或可靠性拥有最终解释权。本文所载的资料、意见及推测仅反映沙利文、创健医疗于发布本报告当日的判断，过往报告中的描述不应作为日后的表现依据，沙利文、创健医疗不保证本报告所含信息保持在最新状态。在不同时期，沙利文、创健医疗可发出与本文所载资料、意见及推测不一致的报告和文章。同时，沙利文、创健医疗对本报告所含信息可在不发出通知的情形下做出修改，读者应当自行关注相应的更新或修改。任何机构或个人应对其利用本报告的数据、分析、研究、部分或者全部内容所进行的一切活动负责并承担该等活动所导致的任何损失或伤害。

## 联系我们

付生伟 Shengwei Fu

江苏创健医疗科技股份有限公司先进研究中心 科学家

 电话: +86 0519-82885966

 手机: +86 18018338356

 邮箱: fushengwei@trautec.com.cn

知识中心 Knowledge Center

弗若斯特沙利文大中华区生命科学事业部

 电话: +86 21 3209 6800 x 8863

 邮箱: hcknowledgecenter@frostchina.com

TRAUTEC 创健医疗 × FROST & SULLIVAN 沙利文

[www.frostchina.com](http://www.frostchina.com)

版权所有

©2024弗若斯特沙利文

©江苏创健医疗科技股份有限公司



扫码了解详情