

全 2'-F/OMe-siRNA 的设计合成及其新型混合脂材纳米制剂抗肝癌活性评价

高宇晴¹, 王玺贤², 潘宇飞², 汪全鑫², 朱月洁², 潘德林^{1*}, 关注², 杨振军^{2*}

(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 北京大学药学院/天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191)

摘要: 本文设计合成了多条全 2'-F/OMe 修饰的抗肝癌 siRNA, 并在细胞水平进行活性评价, 探究 2'-F/OMe 修饰的位置差异对 siRNA 活性的影响。使用 K&A DNA/RNA H-8 合成仪合成全 2'-F/OMe 修饰 siRNA, 利用中性胞苷脂材 DNCA 混合阳离子脂材 CLD 包载递送 siRNA 入胞。通过 RT-qPCR 实验检测 Huh-7 和 HepG2 细胞的靶基因沉默活性, CCK-8 实验检测 Huh-7 和 HepG2 细胞增殖活力, RNA 结合蛋白免疫沉淀及 RT-qPCR 实验检测 siRNA 载入 Ago2 蛋白的情况, 流式细胞术检测药物摄取和细胞凋亡, Western blot 实验检测 PLK1 蛋白的表达。部分全 2'-F/OMe 修饰 siRNA 增强了与 Ago2 蛋白的结合, 进而增强了基因沉默活性及肝癌细胞增殖抑制活性。此外, 多数 siRNA 修饰物制剂的 Huh-7 细胞摄取率提高, 更大幅度下调 PLK1 蛋白, 诱导更多 Huh-7 细胞凋亡, 其中 siPLK1A3 最优。以上结果为进一步研究 siRNA 修饰模式及研发抗肝癌新型制剂提供了工作基础。

关键词: 小干扰 RNA; 全 2'-修饰; 抗肝癌; Ago2; DNCA/CLD

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)06-1634-07

Synthesis and anti-HCC activity of full 2'-F/OMe-siRNA encapsulated with neutral cytidinyl/cationic lipid

GAO Yu-jing¹, WANG Xi-xian², PAN Yu-fei², WANG Quan-xin², ZHU Yue-jie², PAN De-lin^{1*},
GUAN Zhu², YANG Zhen-jun^{2*}

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract: A variety of full 2'-F/OMe-modified siRNAs were designed and synthesized, and the activity against hepatocellular carcinoma Huh-7 and HepG2 cells was evaluated. K&A DNA/RNA H-8 synthesizer was used to synthesize siRNAs, and neutral cytidinyl lipid DNCA mixed with cationic lipid CLD were used to transfect siRNA. By RT-qPCR and CCK-8 assay, the target gene silence and the proliferation of Huh-7 and HepG2 cells were detected. The siRNAs loading into Ago2 protein was detected by RNA-binding protein immunoprecipitation. Drug uptake and cell apoptosis were detected by flow cytometry, and the expression of PLK1 protein was detected by Western blot. Partial full 2'-F/OMe modified siRNAs, especial siPLK1A3, increased the uptake of Huh-7 cells, enhanced their binding to Ago2 and gene silencing activity, down-regulated PLK1 protein, as well as induced more Huh-7 cell apoptosis and proliferation inhibition activity. It provides important data for the development of novel siRNA modification patterns and anti-HCC formulations.

Key words: siRNA; full 2'-modification; anti-HCC; Ago2; DNCA/CLD

收稿日期: 2022-12-07; 修回日期: 2023-01-13.

基金项目: 浙江大学(余杭)基础医学创新研究院(校合-2019-KYY-A07043-0018); 国家自然科学基金资助项目(21778006).

*通讯作者 Tel: 86-10-82805781, E-mail: yangzj@bjmu.edu.cn;

Tel: 13547460729, E-mail: linfeng_0130@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1345

肝癌是全球第六大常见癌症,也是癌症相关死亡的第三大原因。临床上已有 6 种肝癌的全身性治疗方法,主要是小分子化疗药物和单抗,仅能一定程度上改善患者的预后,严重的毒副作用及耐药性问题尚未得到有效解决^[1,2]。探索肝癌发生和进展的潜在机制,并开发靶向药物的治疗方案至关重要。

近年来,小干扰 RNA (siRNA) 正成为一种有潜力的抗肝癌疗法。TKM-080301 是一种阳离子混合脂材 SNALP 递送的 siRNA 药物,其靶标为 Polo 样激酶 1 (PLK1),已完成临床 II 期试验^[3]。PLK1 是一种广泛存在于真核细胞中高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,参与多种有丝分裂进程^[4],在胶质母细胞瘤、乳腺癌、直肠癌、胃癌、肾癌及肝癌等中过表达^[5-8],与癌症患者的预后不良有关^[9-11]。PLK1 促进肝癌发展中的细胞生长,是肝癌最可能的治疗靶点^[12]。ALN-VSP02 是靶向血管内皮生长因子 (VEGF) 和驱动蛋白纺锤体蛋白 (KSP) 的双靶点 siRNA 药物,已完成 I 期临床试验^[13]。KSP 在有丝分裂早期染色单体分离和双极纺锤体的形成中起重要作用,其在正常细胞中低表达,但在喉癌、肺癌、前列腺癌、神经胶质瘤、膀胱癌及肝细胞癌等中过表达^[14-17],与肝癌预后不良有关^[18],是抗肝癌治疗的良好分子靶标。

TKM-080301 及 ALN-VSP02 均为部分位点 2'-OMe 的 siRNA,易被血清核酸酶降解^[19]。2'-F 与 2'-OH 大小和性质很相似,用于修饰反义链切割位点也有较高的适应性。2'-OMe 和 2'-F 修饰能够显著提高 siRNA 双

链的结合亲和力、核酸酶抗性和靶基因沉默活性,与 2'-F 所处的位置和数量密切相关^[20,21]。较为成功的 siRNA 使用全 2'-F 和 2'-OMe 交替修饰的 ESC 策略,已经形成一些具有指导意义的修饰策略,但其普适性有限^[22,23]。截至 2022 年初,已有五款 FDA 批准上市的 siRNA 药物,除第一款外,其余四款均为全 2'-修饰。在高胆固醇血症 (inclisiran) 等治疗中取得的成功证实了全 2'-修饰 siRNA 药物具有很重要的发展潜力^[24,25]。

Advanced ESC 修饰策略是在 siRNA 反义链的 2/6/14/16 位和正义链的 7/9/10/11 位使用 2'-F 修饰,其他位置使用 2'-OMe 修饰,同时在反义链的两端以及正义链的 5'-端使用磷硫代 (PS)^[26]。Lumasiran 反义链 8/9 位由 2'-OMe 修饰换成了 2'-F 修饰^[26]。Inclisiran 相对 Advanced ESC 的修饰不同,为反义链 4/5/8/10/18 位由 2'-OMe 换成了 2'-F 修饰,正义链 10 位由 2'-F 换成了 2'-OMe 修饰,正义链 11 位用胸苷替代了尿苷 (图 1)。对 siRNA 某个位点进行化学修饰会影响其相邻位点、整体构象及同互补链的结合^[27]。

本项全 2'-F/2'-OMe 修饰 siRNA 研究,选择有抗肝癌活性的 siPLK1A、siPLK1B 和 siKSP^[28,29]。参考 Alnylam 公司的 advanced ESC 及其上市药物 lumasiran 和 inclisiran 的修饰策略,设计合成了 siPLK1A1/2/3、siPLK1B1/2/3;参考 advanced ESC 修饰模式,设计合成了 siKSP1 (表 1)。本课题组前期利用自主知识产权的中性胞苷脂材 DNCA 和阳离子脂材 CLD 包载各类核

Table 1 All-2'-modified anti-hepatocellular carcinoma siRNA sequences and modification methods. Bold in the modification sequence (e.g. **A**) indicates that the position is modified using 2'-F, the rest of the positions are modified with 2'-OMe, "s" indicates that the site is modified using PS and T is thymidylate

No.	Name		Sequence 5'→3'	(Calcd./Measured) molecular weight
1	siPLK1A	AS	UAU UUA AGG AGG GUG AUC UTT	6 716.1/6 718.1
		SS	AGA UCA CCC UCC UUA AAU ATT	6 562.0/6 563.5
2	siPLK1A1	AS	UsAsU UUA AGG AGG GUG AUC UsTsT	6 994.6/6 996.0
		SS	AsGsA UCA CCCUCC UUA AAU AsTsT	6 840.6/6 842.3
3	siPLK1A2	AS	UsAsU UUA AGGAGG GUG AUC UsTsT	6 970.6/6 972.0
		SS	AsGsA UCA CCCUCC UUA AAU AsTsT	6 840.6/6 842.3
4	siPLK1A3	AS	UsAsUUUA AGG AGG GUG AUCUsTsT	6 934.5/6 935.7
		SS	AsGsA UCA CCCUCC UUA AAU AsTsT	6 840.6/6 842.3
5	siPLK1B	AS	UUG AUC CGG AGG UAG GUC UTT	6 706.1/6 708.8
		SS	AGA CCU ACC UCC GGA UCA UTT	6 678.1/6 679.5
6	siPLK1B1	AS	UsUsG AUC CGG AGG UAG GUC UsTsT	6 985.6/6 986.9
		SS	AsGsA CCU ACCUCC GGA UCA AsTsT	6 894.7/6 896.2
7	siPLK1B2	AS	UsUsG AUC CGG AGG UAG GUC UsTsT	6 961.6/6 963.0
		SS	AsGsA CCU ACCUCC GGA UCA AsTsT	6 894.7/6 896.2
8	siPLK1B3	AS	UsUsGAUC CGG AGG UAG GUCUsTsT	6 925.4/6 896.2
		SS	AsGsA CCU ACCUCC GGA UCA AsTsT	6 894.7/6 896.2
9	siKSP	AS	AGU UAG UUU AGA UUC UGG ATT	6 712.9/6 713.2
		SS	UCG AGA AUC UAA ACU AAC UTT	6 222.1/6 622.1
10	siKSP1	AS	AsGsU UAG UUU AGA UUC UCG AsTsT	6 915.6/6 917.3
		SS	UsCsG AGAAUCUAA ACU AAC UsTsT	6 904.7/6 905.6

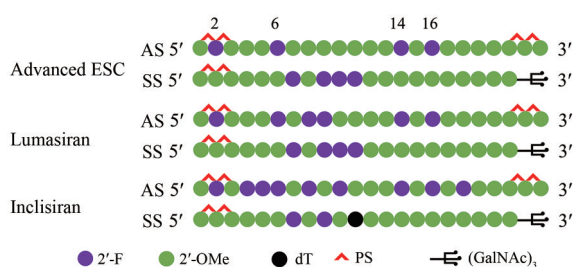


Figure 1 Modification patterns and sequences of advanced ESC/lumasiran/inclisiran

酸药物, 实现了 siRNA、反义核酸、mRNA 及环二鸟苷酸的静脉注射及核酸适配体的瘤旁注射给药, 体内药效非常显著, 制剂安全^[30-32]。继续使用 DNCA/CLD 转染上述修饰的 siRNA, 三者摩尔比为 21:31.5:1^[30,33],

评价其靶基因沉默等情况, 期望对全 2'-F/2'-OMe 修饰方案提供一些有意义的补充, 为进一步体内药效学研究奠定基础。

结果

1 抗肝癌 siRNA 及其全 2'-F/OMe 修饰物对靶基因沉默及细胞增殖抑制活性

RT-qPCR 实验检测各序列转染细胞 24 h 后胞内靶 mRNA 的相对表达水平, 给药浓度为 5 nmol·L⁻¹ (图 2A), CCK-8 试剂检测抗肝癌 siRNA 各序列的细胞增殖抑制活性, 给药剂量为 25 nmol·L⁻¹ (图 2B), 对于 siPLK1A 和 siKSP, 全 2'-修饰后靶基因沉默活性及细胞增殖抑制能力均有所提升, 3 种修饰模式在同一条序列上表

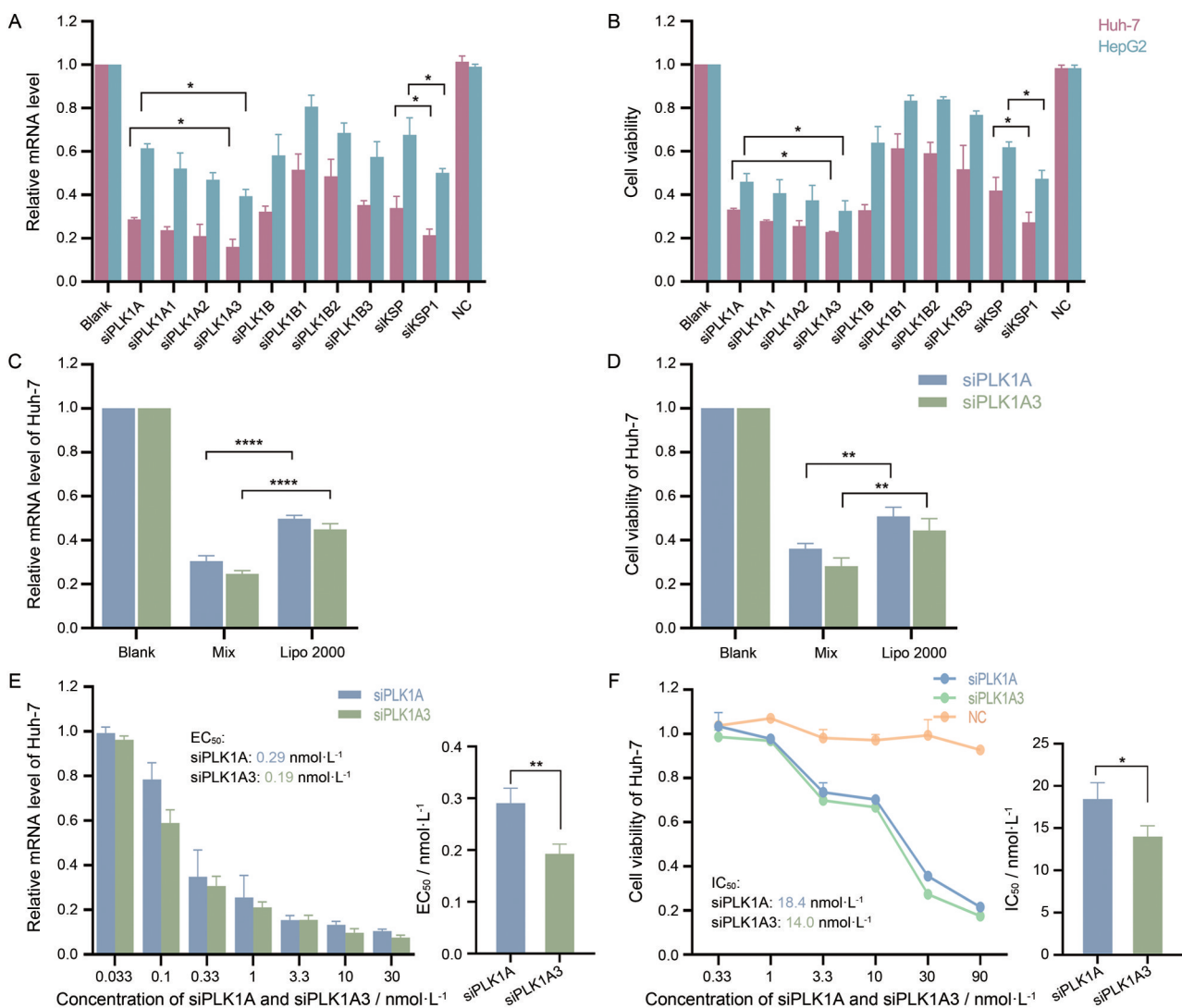


Figure 2 A. Target mRNA silencing activity of each siRNA. B. Cell proliferation inhibitory activity of each siRNA. C. Silencing activity of siPLK1A and siPLK1A3 on PLK1 mRNA. D. Cell proliferation inhibitory activity of siPLK1A and siPLK1A3. E. Silencing activity of different concentrations of siPLK1A and siPLK1A3 on PLK1 mRNA. F. Cell proliferation inhibitory activity of different concentrations of siPLK1A and siPLK1A3. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

现出相同的规律。而 siPLKB1/2/3 靶基因沉默活性及细胞增殖抑制活性则差于 siPLKB, 可能由于全 2'-修饰后影响 siRNA 与靶标 mRNA 的互补配对、局部构象以及 Ago2 相互作用, 从而影响了其活性, 表明序列差异对修饰模式的筛选优化也具有一定影响; DNCA/CLD (Mix) 转染 siPLK1A 及 siPLK1A3 并以商用转染试剂 Lipo 2000 为对照, 考察对 Huh-7 细胞 PLK1 mRNA 的沉默活性及细胞增殖抑制作用。Mix 显著优于 Lipo 2000 包载 siRNA 活性 (图 2C、D); 进一步考察不同浓度 siPLK1A 及 siPLK1A3 对 PLK1 mRNA 的沉默活性及阴性对照 (NC) 对 Huh-7 细胞增殖抑制活力。结果显示, siPLK1A3 与 siPLK1A 相比 EC_{50} 、 IC_{50} 明显降低 (图 2E、F)。因此, siPLK1A3 更有效沉默 PLK1 基因表达, 对 Huh-7 细胞增殖抑制作用更佳。NC 组对 Huh-7 细胞没有细胞毒性, 表明该制剂具有良好的细胞安全性。

2 siPLK1A 及其修饰物与 Ago-2 蛋白免疫共沉淀 (RIP)

RIP 实验结果如图 3 所示, 给药浓度为 $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 siRNA/Mix 转染 Huh-7 细胞, 与 siPLK1A 相比, Ago2 蛋白富集结合了 1.3 倍的 siPLK1A3。显然全 2'-F/OMe 修饰的 siRNA 增强其与 Ago2 蛋白的结合能力, 是部分修饰物如 siPLK1A3 靶基因沉默活性提高的原因。

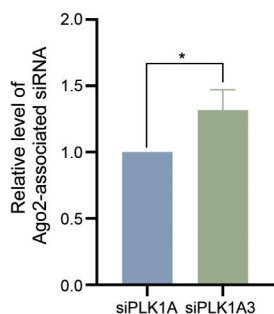


Figure 3 Quantitative analysis of Ago2-associated siRNA. Unmodified siRNA in mock-transfected cells was treated as 100%. $n = 3, \bar{x} \pm s. *P < 0.05$

3 siPLK1A 及其修饰物新型制剂的细胞摄取

利用 Cy5.5 标记的 siPLK1A 及 siPLK1A3 转染 Huh-7 细胞, 给药量为 $25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 通过流式细胞术检测 Huh-7 的 Cy5.5 荧光情况 (4 h)。结果如图 4 所示, 与裸给组相比, siPLK1A 及 siPLK1A3 制剂均显著被 Huh-7 细胞摄取, 后者具有更宽的单吸收峰, 显著提高了细胞摄取率。

4 siPLK1A 及其修饰物对 PLK1 蛋白表达的影响

通过 Western blot 考察给药后 Huh-7 细胞内 PLK1 蛋白表达情况, 给药剂量为 $25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果如图 5 所示, NC 组与 Blank 组相比 PLK1 蛋白表达量无明显

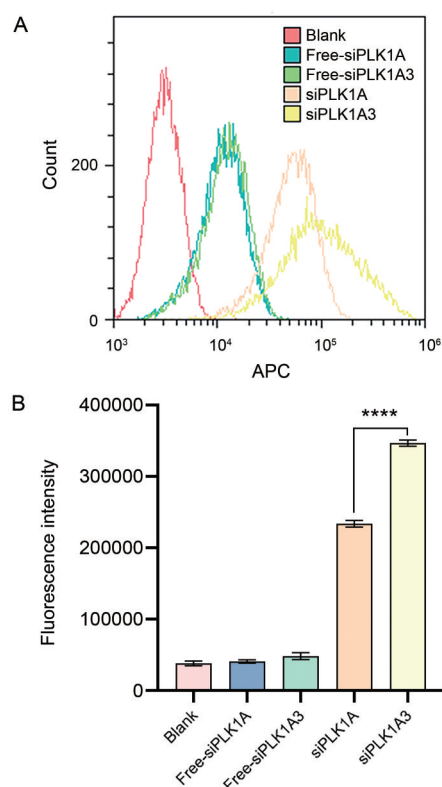


Figure 4 A. Flow cytometry detection of cell uptake peaks. B. Statistical plot of cell uptake fluorescence. $n = 3, \bar{x} \pm s. ****P < 0.0001$

变化, 而 siPLK1A 及 siPLK1A3 显著抑制 PLK1 蛋白表达, siPLK1A 下调了 63% PLK1 蛋白, siPLK1A3 下调了 69% PLK1 蛋白。

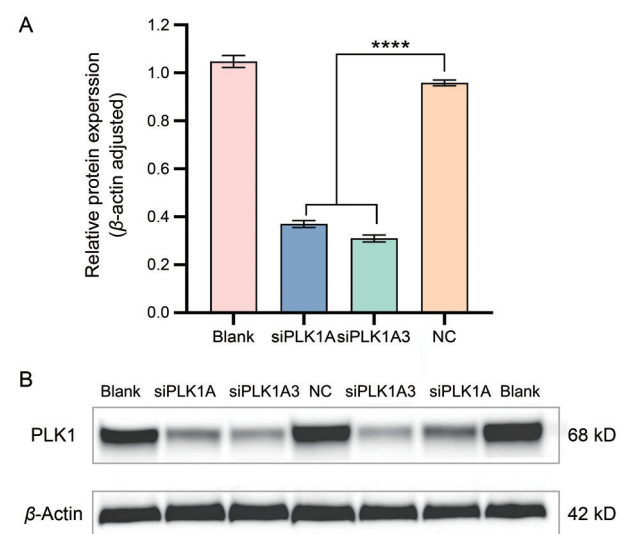


Figure 5 Changes in PLK1 protein expression in Huh-7 cells. A. Grayscale scans of gel plots were performed to calculate the PLK1/ β -actin protein grayscale ratio for each group. NC: Negative control; B. Results of polyacrylamide gel electrophoresis presentation of PLK1 protein and β -actin protein. $n = 3, \bar{x} \pm s. ****P < 0.0001$

5 siPLK1A 及其修饰物对细胞凋亡的影响

利用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 siPLK1A 及 siPLK1A3 对细胞凋亡的影响, 给药剂量为 $25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 结果如图6所示, NC 组对 Huh-7 细胞的凋亡无明显影响, 而 siPLK1A 能诱导 Huh-7 细胞的凋亡 (18%), siPLK1A3 能诱导更多 Huh-7 的细胞凋亡 (25%)。

讨论

肝癌治疗的一线及二线药物存在明显毒副作用及易产生耐药性等问题。siRNA 可以在哺乳动物细胞中发挥特异性 RNAi 作用, 能在体内介导基因沉默, 尤其在局部组织中。全 2'-修饰可以有效抑制其免疫反应, 提高酶稳定性和靶基因沉默作用, 降低脱靶效应产生的毒性问题。本研究发现全 2'-F/OMe 修饰的 siPLK1A 活性提高是源于基因沉默复合物中 siRNA 的负载量增加, 由此确定了可显著提高 siRNA 靶基因沉默活性的最佳 2'-F/OMe 修饰模式。总的来说, 修饰后的 siPLK1A 和 siKSP 基因沉默活性和肝癌细胞增殖抑制活性均有所提升, 其中 siPLK1A3 和 siKSP1 活性显著上升, 可以作为体内抗肝癌研究的候选序列。而 siPLK1B 在修饰后多数情况下基因沉默活性有所下降, 其中 siPLK1B3 相对保持, 可作为体内抗肝癌研究的备选序列。

实验部分

未修饰的 siRNA 及引物订购自生工生物工程 (上

海) 股份有限公司。siRNA 合成使用 K&A DNA/RNA H-8 合成仪 (德国, K&A LaborgeraeteGbR), 纯化 siRNA 使用 GILSON 液相系统 (157 UV-VIS、306 PUMP、806、811D) (美国, Gilson)、XBridge™ OST C18 OBD™ 色谱柱 (美国, Waters) 和 HiPrep™ 26/10 Desalting 凝胶柱 (美国, GE), GenOpti-DMEM 高糖培养基、PBS 系迈晨科技 (北京) 有限公司产品, FBS 购自美国 Gibco 公司, Cell Counting Kit-8 购自日本同仁化学, RIP 试剂盒系广州伯信生物科技有限公司产品, 总 RNA 提取试剂盒购自美国 Promega 公司, 凋亡试剂盒系美国 BD 公司产品, BCA 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, PLK1、Ago2 抗体购自英国 Abcam 公司, 多功能酶标仪 (美国, Molecular Devices), 贝克曼的流式细胞仪 (美国, BECKMAN COULTER), Real-time PCR 仪 (德国, Agilent Technologies), eBLOT 的 Western blot 化学发光蛋白印迹成像仪 (中国, 易亨特)。

1 siRNA 的合成及纯化

全 2'-修饰的 siRNA 使用固相合成法在 K&A DNA/RNA H-8 合成仪中自动合成。合成使用 CPG 固相载体, 使用 2'-F 或 2'-OMe 修饰的 RNA 亚磷酸胺单体、三氯乙酸的二氯甲烷溶液 (3%)、5-乙硫基四氮唑的乙腈溶液 ($0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、CAP-A (10% Ac₂O 和 10% 吡啶的乙腈溶液)、CAP-B (10% *N*-甲基咪唑的乙腈溶液)、氧化剂 ($0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ I}_2/2\% \text{ H}_2\text{O}/20\% \text{ 吡啶}$ 的四氢呋喃溶液) 及二苯乙酰基二硫化物的吡啶乙腈 (50%) 溶液。

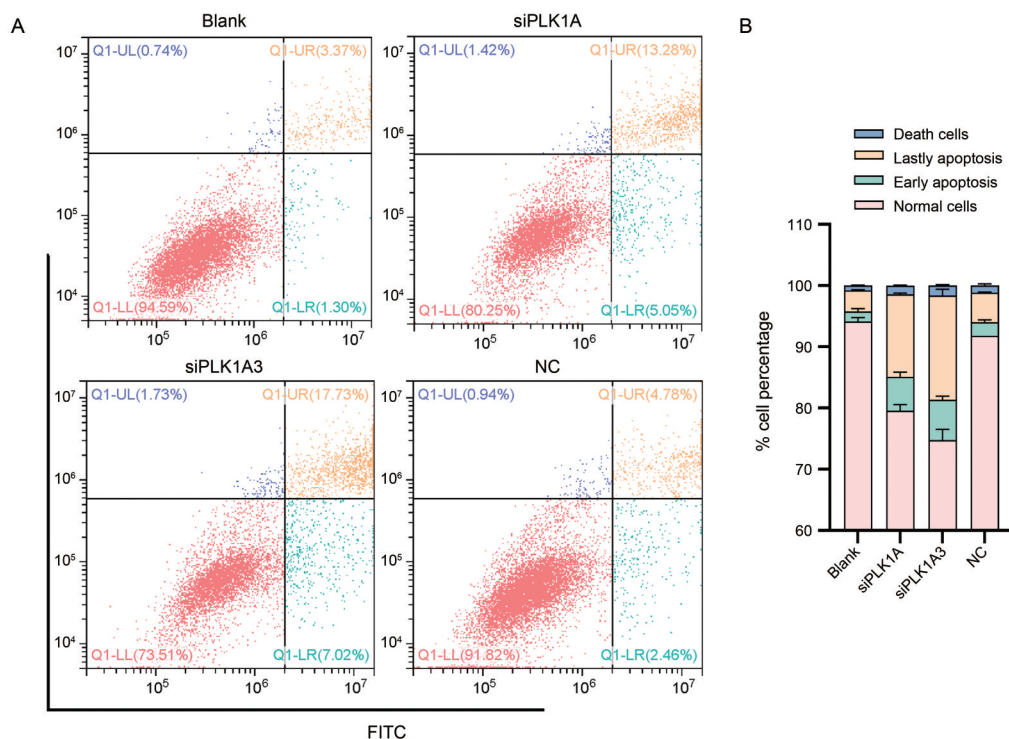


Figure 6 A: Typical graph of apoptosis detection by flow cytometry. B: Typical graph of apoptosis

固相合成结束时保留最后一个5'-端DMT保护基, 使用浓氨水脱下5'-DMT-AS/SS, 使用半制备HPLC系统和C18反相色谱柱纯化(洗脱方法: ACN/0.05 mol·L⁻¹ TEAB; 0 min-15% ACN, 22 min-40% ACN), 使用0.05 mol·L⁻¹ TCA水溶液脱除DMT保护基, 随后使用0.1 mol·L⁻¹ NaHCO₃水溶液中和过量TCA, 再使用Desalting凝胶柱除盐, 得到纯品进行ESI-LC/MS确证, 随后退火AS/SS得到相应的siRNA修饰物。

2 脂质复合物的制备和转染

siRNA溶于无酶水, DNCA、CLD溶于无水乙醇。加入一半总体积的GenOpti, 依次加入siRNA、DNCA、CLD溶液至液面下, 补加GenOpti至额定体积, 50 °C超声10 min。

3 生物活性检测

人肝癌细胞Huh-7/HepG2使用含10%胎牛血清(FBS)的DMEM高糖培养基在37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中培养。

3.1 细胞增殖抑制活性实验(CCK-8) 将Huh-7和HepG2细胞以每孔1×10⁴密度铺至96孔板, 孵箱培养24 h时转染siRNA制剂。48 h后, 真空泵吸弃孔内原有液体, 每孔加入100 μL含10% CCK-8工作液的培养基, 孵育显色30 min后, 使用酶标仪检测450 nm处吸光度值。细胞生存率(V) = (RA-RE)/(RB-RE)×100% (RA、RB、RE分别代表实验组、对照组及溶剂底色组的吸光度值)。

3.2 RNA结合蛋白免疫沉淀实验(RIP) 转染24 h后收集细胞, 加入裂解缓冲液, 细胞裂解液中加入Ago2抗体, 放至垂直混匀器4 °C孵育16 h。平衡好A/G磁珠加入细胞裂解液中, 垂直混匀器4 °C孵育1 h。裂解缓冲液洗涤磁珠两次以去除未结合的抗体, 55 °C孵育1 h洗脱RNA。RT-qPCR实验定量与Ago2蛋白结合siRNA的量。

3.3 基因沉默活性实验(RT-qPCR) 将Huh-7和HepG2细胞以每孔5×10⁴密度铺至12孔板, 孵箱培养24 h后进行转染, 细胞转染24 h后进行RT-qPCR实验, 用Trizol裂解细胞并提取总RNA, 提取的RNA溶于无酶水, 按逆转录试剂盒操作得到cDNA。然后进行实时定量PCR, 获得各个样品组的Ct值。RT-qPCR实验涉及的引物序列如表2所示。

3.4 细胞摄取测定 将Huh-7细胞以每孔7×10⁵个细胞的密度接种到12孔板中并生长24 h。用Cy5.5标记的siPLK1A和siPLK1A3纳米复合物处理细胞4 h后, 通过胰蛋白酶消化收集细胞并用预冷的PBS洗涤。流式细胞仪测定摄取情况。

3.5 Western blot实验检测蛋白表达 将Huh-7细胞

Table 2 The primer sequences involved in this study

Name	Sequence
PLK1 gene forward	ATCACCTGCCTGACCATTCCACCAAGG
PLK1 gene reverse	AATTGCGGAAATATTTAAGGAGGGTGATCT
KSP forward	CTGAACAGTGGGTATCTTCCTTA
KSP reverse	GATGGCTCTTGACTTAGAGGTTC
β -Actin forward	CCAACCGCGAGAAGATGA
β -Actin reverse	CCAGAGGCGTACAGGGATAG

以每孔7×10⁵个细胞的密度接种到12孔板中并生长24 h后进行转染。继续培养24 h后, RIPA裂解液裂解细胞。按照BCA蛋白定量试剂盒说明书操作定量, 在SDS-PAGE凝胶中每孔上样15 μg含loading buffer且已煮沸变性的蛋白样品, 180 V电泳分离20 min。利用iBlot 2转膜仪设置20 V转膜7 min, 用封闭液常温浸泡PVDF膜封闭过夜, 次日洗膜3次, 依次以一抗、二抗孵育, 最后滴加ECL显色液显色, 在蛋白印迹成像仪中拍照检测。

3.6 细胞凋亡测定 将Huh-7细胞以每孔7×10⁵个细胞的密度接种到12孔板中并生长24 h后进行转染, 继续培养24 h, 用0.25%胰蛋白酶消化细胞, 预冷的PBS洗涤2次, 重悬于100 μL 1×结合缓冲液中。向每个样品中加入5 μL FITC和5 μL PI, 将细胞在室温下避光孵育20 min。然后通过流式细胞仪测定染色样品。

3.7 统计学方法 所有分析均使用GraphPad Prism 8.0软件, 所有数据都是至少3个独立重复实验的平均值, 误差线代表标准偏差。两组独立数据使用单因素 t 检验, 多组独立数据使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

作者贡献: 高宇晴完成了生化、细胞实验及数据分析处理和论文撰写; 王玺贤完成了修饰序列设计合成及论文修改; 潘宇飞、汪全鑫完成了部分修饰序列siRNA的合成; 朱月洁、潘德林和关注参与了指导了实验数据分析和讨论; 杨振军负责实验设计、结果讨论及论文修改定稿。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Bruix J, Qin S, Merle P, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2017, 389: 56-66.
- [2] Ikeda M, Okusaka T, Mitsunaga S, et al. Safety and pharmacokinetics of lenvatinib inpatients with advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22: 1385-1394.
- [3] El Dika I, Lim HY, Yong WP, et al. An open-label, multicenter, phase I, dose escalation study with phase II expansion cohort to determine the safety, pharmacokinetics, and preliminary anti-

- tumor activity of intravenous TKM-080301 in subjects with advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Oncologist*, 2019, 24: 747-e218.
- [4] van de Weerd BC, Medema RH. Polo-like kinases: a team in control of the division [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5: 853-864.
- [5] Shi Y, Jiang Y, Cao J, et al. Boosting RNAi therapy for orthotopic glioblastoma with nontoxic brain-targeting chimaeric polymersomes [J]. *J Control Release*, 2018, 292: 163-171.
- [6] Xu L, Zhu Y, Shao J, et al. Dasatinib synergises with irinotecan to suppress hepatocellular carcinoma *via* inhibiting the protein synthesis of PLK1 [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116: 1027-1036.
- [7] Korn J, Liu X, Takiar V. A review of Plks: thinking outside the (polo) box [J]. *Mol Carcinog*, 2022, 61: 254-263.
- [8] Liu Z, Sun Q, Wang X. PLK1, a potential target for cancer therapy [J]. *Transl Oncol*, 2017, 10: 22-32.
- [9] Ramani P, Nash R, Sowa-Avugrah E, et al. High levels of polo-like kinase 1 and phosphorylated translationally controlled tumor protein indicate poor prognosis in neuroblastomas [J]. *J Neurooncol*, 2015, 125: 103-111.
- [10] Zhang R, Shi H, Ren F, et al. Misregulation of polo-like protein kinase 1, P53 and P21WAF1 in epithelial ovarian cancer suggests poor prognosis [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33: 1235-1242.
- [11] Dibb M, Han N, Choudhury J, et al. FOXM1 and polo-like kinase 1 are co-ordinately overexpressed in patients with gastric adenocarcinomas [J]. *BMC Res Notes*, 2015, 8: 676.
- [12] Chaisaingmongkol J, Budhu A, Dang H, et al. Common molecular subtypes among Asian hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2017, 32: 57-70.e53.
- [13] Cervantes A, Alsina M, Tabernero J, et al. Phase I dose-escalation study of ALN-VSP02, a novel RNAi therapeutic for solid tumors with liver involvement [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29: 3025.
- [14] Wissing MD, De Morrée ES, Dezentjé VO, et al. Nuclear Eg5 (kinesin spindle protein) expression predicts docetaxel response and prostate cancer aggressiveness [J]. *Oncotarget*, 2014, 5: 7357-7367.
- [15] Gonçalves IL, Rockenbach L, Göethel G, et al. New pharmacological findings linked to biphenyl DHPMs, kinesin Eg5 ligands: anticancer and antioxidant effects [J]. *Future Med Chem*, 2020, 12: 1137-1154.
- [16] Wu L, Ma X, Yang X, et al. Synthesis and biological evaluation of β -lapachone-monastrol hybrids as potential anticancer agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 203: 112594.
- [17] Sun D, Lu J, Ding K, et al. The expression of Eg5 predicts a poor outcome for patients with renal cell carcinoma [J]. *Med Oncol*, 2013, 30: 476.
- [18] Liu C, Zhou N, Li J, et al. Eg5 Overexpression is predictive of poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients [J]. *Dis Markers*, 2017, 2017: 2176460.
- [19] Prakash TP, Allerson CR, Dande P, et al. Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells [J]. *J Med Chem*, 2005, 48: 4247-4253.
- [20] Khvorova A, Watts JK. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 238-248.
- [21] Li L, Zheng YX, Ma CY, et al. Research progress in antisense drug mechanism and chemical modification strategies [J]. *Acta Pharm Sin (药 学 学 报)*, 2022, 57: 2709-2719.
- [22] Prakash TP, Allerson CR, Dande P, et al. Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells [J]. *J Med Chem*, 2005, 48: 4247-4253.
- [23] Li Q, Chen R, Hu B. Recent advances in pharmacokinetic characteristics and physiological pharmacokinetic modeling of small interfering RNA (siRNA) drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药 学 学 报)*, 2022, 57: 3146-3156.
- [24] Lamb YN. Inclisiran: first approval [J]. *Drugs*, 2021, 81: 389-395.
- [25] Ray KK, Wright RS, Kallend D, et al. Two phase 3 trials of inclisiran in patients with elevated LDL cholesterol [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382: 1507-1519.
- [26] Foster DJ, Brown CR, Shaikh S, et al. Advanced siRNA designs further improve *in vivo* performance of GalNAc-siRNA conjugates [J]. *Mol Ther*, 2018, 26: 708-717.
- [27] Setten RL, Rossi JJ, Han SP. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 421-446.
- [28] Judge AD, Robbins M, Tavakoli I, et al. Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119: 661-673.
- [29] Doan CC, Le LT, Hoang SN, et al. Simultaneous silencing of VEGF and KSP by siRNA cocktail inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma Hep3B cells [J]. *Biol Res*, 2014, 47: 70.
- [30] Ma Y, Zhu Y, Wang C, et al. Annealing novel nucleobase-lipids with oligonucleotides or plasmid DNA based on H-bonding or π - π interaction: assemblies and transfections [J]. *Biomaterials*, 2018, 178: 147-157.
- [31] Yu X, Yu J, Dai H, et al. Novel formulation of c-di-GMP with cytidinyl/cationic lipid reverses T cell exhaustion and activates stronger anti-tumor immunity [J]. *Theranostics*, 2022, 12: 6723-6739.
- [32] Guan J, Pan Y, Li H, et al. Activity and tissue distribution of antisense oligonucleotide CT102 encapsulated with cytidinyl/cationic lipid against hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Pharm*, 2022, 19: 4552-4564.
- [33] Zhou X, Pan Y, Li Z, et al. siRNA packaged with neutral cytidinyl/cationic/PEG lipids for enhanced antitumor efficiency and safety *in vitro* and *in vivo* [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2020, 3: 6297-6309.