

## 靶向IGF1R mRNA的反义寡核苷酸修饰物新型制剂体外抗肝癌活性研究

蒲洋<sup>1</sup>, 管静<sup>2,3</sup>, 何任一<sup>2</sup>, 朱月洁<sup>2</sup>, 潘德林<sup>1\*</sup>, 关注<sup>2</sup>, 杨振军<sup>2,3\*</sup>

(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全国重点实验室, 北京 100191; 3. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025)

**摘要:** 反义寡核苷酸是一类靶向沉默mRNA后抑制蛋白翻译的基因疗法, 已在多种疾病治疗中应用, 但依然缺乏合适的体内递送载体、存在酶稳定性差及使用剂量高等问题。胰岛素样生长因子1型受体(IGF1R)是一种具有酪氨酸激酶活性的细胞表面受体, 在多种恶性肿瘤中异常高表达, 通过多种途径介导肿瘤细胞的恶性增殖、迁移及侵袭。本研究设计合成了靶向IGF1R mRNA的反义寡核苷酸(N04), 利用中性胞苷脂材DNCA联合胱氨酸骨架阳离子脂材CLD对其进行包载递送, 并结合化学修饰策略(PS, 2'-OMOE), 得到稳定且高效的反义寡核苷酸修饰物新型制剂。制剂粒径理想(151 nm)、大小均一(多分散系数0.18)、呈近电中性( $\zeta$ 电位-3.9 mV)、可被肝癌细胞(HepG-2、Huh-7)高效摄取, 明显沉默靶mRNA、导致细胞S期阻滞、促进细胞凋亡, 进而抑制细胞增殖。本研究为抗肝细胞癌新型反义寡核苷酸制剂药物的研发提供了工作基础。

**关键词:** 反义寡核苷酸; 中性胞苷脂材; 胱氨酸骨架阳离子脂材; 胰岛素样生长因子1型受体; 肝细胞癌  
中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1441-08

## Investigation on efficacy against hepatocellular carcinoma of novel antisense oligonucleotide targeting IGF1R mRNA encapsulated with neutral cytidinyl/cationic lipid *in vitro*

PU Yang<sup>1</sup>, GUAN Jing<sup>2,3</sup>, HE Qian-yi<sup>2</sup>, ZHU Yue-jie<sup>2</sup>, PAN De-lin<sup>1\*</sup>, GUAN Zhu<sup>2</sup>, YANG Zhen-jun<sup>2,3\*</sup>

(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; 3. College of Pharmaceutical Sciences, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

**Abstract:** Antisense oligonucleotides are a type of gene therapy that targets mRNA and inhibits gene expression. They have been applied in the treatment of various diseases, but there are still problems with poor enzyme stability and high dosage *in vivo*, due to the shortage of appropriate delivery system. Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) is a cell surface receptor with tyrosine kinase activity. Its expression is abnormal in a variety of malignant tumors. It mediates the malignant proliferation, migration and invasion of tumor cells through a variety of ways. In this study, an antisense oligonucleotide (ASO, N04) targeting IGF1R mRNA was designed and chemically modified (PS, 2'-OMOE), then neutral cytidine lipid DNCA and cystine backbone cationic lipid CLD (Mix) were used to encapsulate ASOs. The particle size, polymer dispersity index and  $\zeta$  potential of the formulations were 151 nm, 0.18 and -3.9 mV. The nanoparticles entered liver cancer cells (HepG-2, Huh-7), silenced target mRNA, arrested cell cycle in S phase, promoted apoptosis, and inhibited the proliferation

收稿日期: 2023-11-14; 修回日期: 2024-04-07.

基金项目: 北大医学-哈药核酸药物协同创新实验室及国家科技部重大新药创制科技重大专项资助项目(2017ZX09303013).

\*通讯作者 E-mail: linfeng\_0130@163.com; yangzj@bjmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1285

efficiently. These results indicate that Mix/N04<sub>MOE5</sub> has great potential in tumor treatment, which provides a basis for further research on novel agents against hepatocellular carcinoma.

**Key words:** antisense oligonucleotide; neutral cytidine lipid; cystine backbone cationic lipid; insulin-like growth factor 1 receptor; hepatocellular carcinoma

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的原发性肝恶性肿瘤, 由于多数肝细胞癌在早期无明显症状, 首次确诊为晚期的比例超过 80%, 错过肝细胞癌的最佳治疗时间, 因此肝细胞癌 5 年的生存率仅约 18%<sup>[1,2]</sup>。目前治疗肝细胞癌的一线治疗药物主要有索拉非尼、瑞戈非尼等<sup>[3,4]</sup>, 但此类药物靶向性差、治疗效果有限, 且会产生较强的耐药性<sup>[5-9]</sup>, 因此仍需要研发肝细胞癌的精准靶向治疗药物。

反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO) 是一种单链寡核苷酸分子, 通常包含 15~25 个核苷酸。其进入细胞后通过碱基互补配对原则与其互补的靶 mRNA 结合, 在核糖核酸酶 H1 的作用下抑制靶基因的表达, 或通过空间位阻阻断 mRNA 的翻译<sup>[10,11]</sup>。然而由于未经修饰的 ASO 在进入细胞中被迅速降解、清除, 导致其作为治疗药物受到很大的限制<sup>[12]</sup>。为了解决以上问题, 对 ASO 进行修饰及运用载体进行包载递送。研究表明, 对 ASO 的磷酸二酯骨架进行磷硫代和对核糖的 2'-OMOE 修饰使 ASO 均能显著提高其酶稳定性及对靶 mRNA 的结合力<sup>[13]</sup>。递送 ASO 的载体能保护其在递送中及进入细胞后发挥作用之前免于核酸酶降解及巨噬细胞的清除<sup>[14]</sup>, 现常用的递送载体有脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticle, LNP), Alnylam 公司的 Patisiran 是第一款获得美国 FDA 批准上市的采用 LNP 的 siRNA 药物, 但由于静脉给药后产生炎症反应或引起组织损伤而限制了其广泛应用<sup>[15,16]</sup>。

胰岛素样生长因子 1 型受体 (insulin-like growth factor 1, IGF1R) 在乳腺癌、非小细胞肺癌、肝细胞癌等多种恶性肿瘤中过表达<sup>[17]</sup>。该信号通路的激活会通过激活磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶、GTP 结合蛋白和促分裂原活化蛋白激酶途径促进肿瘤细胞的恶性增殖、迁移和侵袭<sup>[18,19]</sup>。靶向 IGF1R mRNA 处于 II 期临床试验的反义寡核苷酸 CT102, 通过基因沉默机制治疗 HCC 取得了良好的抗肿瘤效果。

本课题组前期研发了中性胞苷脂材 (DNCA) 联合胱氨酸骨架阳离子脂材 (CLD) 递送系统 (Mix), 实现了 siRNA<sup>[20,21]</sup>、ASO<sup>[22,23]</sup>、环二鸟苷酸<sup>[24]</sup> 和核酸适配体<sup>[25]</sup> 的包载递送, 通过瘤内注射或静脉注射在胰腺癌、黑色素瘤、肝癌、乳腺癌和非小细胞肺癌中发挥显著药

效, 且体内安全性良好。机制研究表明, 此类纳米制剂主要通过巨胞饮作用或小窝蛋白途径介导内吞入胞, 避免或者减少了溶酶体途径, 从而有利于寡核苷酸药物高效发挥作用<sup>[25,26]</sup>。本研究中设计了靶向 IGF1R mRNA 的反义寡核苷酸 N04, 经 2'-OMOE 修饰得到了 N04<sub>MOE5</sub>, 完成了 Mix 包载 (DNCA/CLD/ASO 摩尔比为 20:20:1) (Mix/N04<sub>MOE5</sub>)<sup>[22]</sup> 及制剂的系统表征, 通过细胞增殖抑制、逆转录-实时定量聚合酶链式反应、细胞周期及凋亡检测等实验考察了抗 HCC 的体外生物活性。

## 材料与方法

**仪器** DNA/RNA H-8 合成仪 (德国, K&A LaborgeraeteGbR); 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); HiPrep™ 26/10 Desalting 凝胶柱 (美国, GE); 多功能酶标仪 (美国, Molecular Devices); 贝克曼流式细胞仪 (美国, BECKMAN COULTER); Real-time PCR 仪 (德国, Agilent Technologies); 激光散射粒度分布仪 (英国, Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern)。

**试剂与药品** GenOpti、DMEM 高糖培养基、PBS [批次: G2022M1、L2823M1、J1023M3, 迈晨科技 (北京) 有限公司]; FBS [批次: A2826128CP, Gibco (美国) 公司]; Cell Counting Kit-8、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、总 RNA 提取试剂盒 [批次: C9215980、A0331671、T8315150, 翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司]。

**寡核苷酸的合成** 称取适量 Universal-CPG 装入到合成柱中, 分别将各试剂装入到相应试剂瓶中。按照每 20 mL 含 1g 的 dA (rA)、dG (rG)、dC (rC)、dT (rU) 亚磷酸胺单体的浓度用超干乙腈进行稀释, 随后放入到合成仪上 A、G、C、T 单体瓶中; 化学修饰亚磷酸胺单体则放入到 5~8 号单体瓶中, 通过亚磷酸胺固相合成法合成相应的 DNA。开始合成时, DNA 亚磷酸胺单体、修饰亚磷酸胺单体偶联时间分别为每次 90、900 秒, 其他反应参数保持在默认值。通过 Deblock 颜色变化, 粗略判断每步偶联反应收率。采用其他常规条件及“DMTr-On”方式进行后续固相切割、脱保护和

分离纯化。

**DNCA/CLD 包载 ASO 的制剂工艺** 首先在 EP 管中加入制剂中总体积一半体积的 GenOpti 溶液, 随后分别依次加入计算好的 ASO、DNCA 和 CLD 至液面以下, 最后再加入另一半总体积的 GenOpti, 盖紧 EP 管, 在 100 Hz, 50 °C 条件下超声 20 min。

**脂质复合物表征检测** 使用激光散射粒度分布仪检测 Mix/N04<sub>MOE5</sub> 制剂的平均水合粒径、多分散系数 (polymer dispersity index, PDI) 和表面电位 (zeta 电位)。在 120 kV JEM-1400Plus 透射电子显微镜上用 10 μL 样品 (0.3 mg·mL<sup>-1</sup>) 对脂质形态进行成像。

**脂质复合物稳定性检测** Mix/N04<sub>MOE5</sub> 制剂后放置 4 °C 冰箱中保存, 分别在 0、8、24、48 h 时间点使用激光散射粒度仪检测该脂质复合物的平均水合粒径、PDI 和 zeta 电位。

**细胞培养** HCC 细胞系 HepG-2、Huh-7 细胞的培养条件为在 DMEM 高糖的培养基中加入 10% 胎牛血清 (FBS), 温度 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养。

**细胞增殖抑制试验 (Cell Counting Kit-8)** 将处于对数生长的 Huh-7、HepG-2 细胞分别以每孔 8×10<sup>3</sup>、1×10<sup>4</sup> 个细胞的密度铺在 96 孔板中, 恒温培养 18~24 h 给药, 然后继续培养 48 h。检测时吸弃孔中培养基, 加入 100 μL 含 10% CCK-8 工作液的培养基, 孵育 40 min 显色后, 使用酶标仪检测 450 nm 处吸光度 (A) 值。按照公式 (1) 计算细胞存活率 (V)。

$$V = (A_{RA} - A_{RB}) / (A_{RB} - A_{RE}) \times 100\% \quad (1)$$

其中, A<sub>RA</sub>、A<sub>RB</sub>、A<sub>RE</sub> 分别代表实验组、对照组及溶剂底色组的吸光度值。

**靶基因沉默活性 (RT-qPCR)** 将处于对数生长的 Huh-7、HepG-2 细胞分别以每孔 8×10<sup>4</sup>、1×10<sup>5</sup> 个细胞的密度铺在 12 孔板中, 然后放置孵箱中培养 18~24 h 给药, 然后 24 h 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, 再进行实时定量 PCR, 获得各个样品组的 Ct 值。RT-qPCR 实验涉及的引物序列如表 1 所示。

**细胞摄取实验** Huh-7、HepG-2 细胞分别以每孔 8×10<sup>4</sup>、1×10<sup>5</sup> 个细胞的密度铺在 12 孔板中, 放置孵箱培养 18~24 h 后进行转染 FAM 标记的 ASO, 避光孵育

**Table 1** The primer sequences involved in this study

Name	Sequence (5'-3')
IGF1R gene forward	CTG CCT CAT TAC CTG GCT CAC TA
IGF1R gene reverse	CAC CAT GCC ACT TTC CCT TGT
β-actin forward	CCA ACC GCG AGA AGA TGA
β-actin reverse	CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG

4 h 后, 用胰蛋白酶消化后离心收集细胞, 用预冷 PBS 进行洗涤两次, 然后离心用 300 μL 预冷 PBS 重悬细胞, 再用流式细胞仪检测细胞摄取情况。

**细胞凋亡实验** Huh-7、HepG-2 细胞铺于 12 孔板中 (铺板密度同细胞摄取实验), 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养 18~24 h 后进行转染 ASO。然后孵育 48 h, 弃去培养基, 使用预冷的 DMEM 润洗细胞表面, 加入无 EDTA 胰酶消化并收集细胞, 离心后重悬于 1×结合缓冲液中, 加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μL, 避光室温孵育 15~20 min。最后过筛, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

**细胞周期试验** Huh-7、HepG-2 细胞铺于 12 孔板中 (铺板密度同细胞摄取实验), 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养 18~24 h 后进行转染 ASO。孵育 48 h, 弃去培养基, 使用预冷的 DMEM 润洗细胞表面, 离心后重悬于 1×结合缓冲液中, 加入 2 μL PI, 避光孵育 15 min。使用 0.45 μm 筛网分散细胞团, 流式细胞仪检测细胞周期情况。

**统计学方法** 本研究中的所有数据都是来自至少 3 个独立重复实验的平均值, 误差线表示标准偏差。单因素方差分析多组独立数据, 得到 P 值确定显著性。GraphPad Prism 8.0、Origin 2022 软件用于所有统计分析。

## 结果

### 1 新序列 N04<sub>MOE5</sub> 具有优异的抗 HepG-2/Huh-7 活性

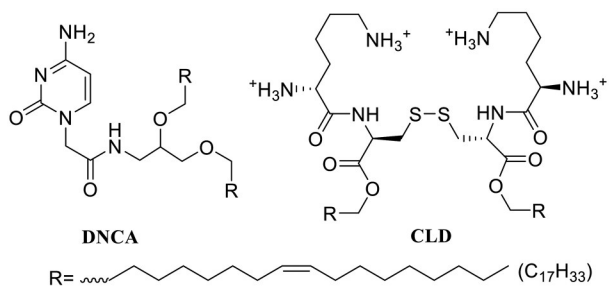
CT102 是靶向 IGF1R mRNA 的反义寡核苷酸, 可有效抑制肝细胞癌生长, 目前研究正处于临床 II 期试验。本项研究设计了靶向 IGF1R mRNA 的反义寡核苷酸新序列 N04, 并对其进行了 2'-OMOE 修饰 (表 2)。

**Table 2** Sequence information. <sup>m</sup>C: 5-Methylcytosine; e: 2'-OMOE; s: PS; NC: Negative control

Name	Sequence (5'-3')
CT102	Ts Cs Ts Cs Cs Gs Gs As Gs Cs Cs As Gs As Cs Ts Cs A
N04	Ts Ts Cs Ts Cs Cs As Cs Ts Cs Gs Ts Cs Gs Gs Cs Cs As Gs A
N04 <sub>MOE5</sub>	Tes Tes <sup>m</sup> Ces Tes <sup>m</sup> Ces <sup>m</sup> Cs As <sup>m</sup> Cs Ts <sup>m</sup> Cs Gs Ts <sup>m</sup> Cs Gs Gs <sup>m</sup> Ces <sup>m</sup> Ces Aes Ges Ae
NC	TCC TCG GCA GCC TGT CTA CA

以 CT102 作为阳性对照、negative control (NC) 序列作为阴性对照, DNCA/CLD (Mix) (图 1) 混合脂材分别包载 CT102、N04、N04<sub>MOE5</sub>、NC 后, 采用 CCK-8 实验考察各制剂对 HepG-2、Huh-7 细胞的增殖抑制能力, 采用 RT-qPCR 实验考察对 HepG-2、Huh-7 细胞中 IGF1R mRNA 的沉默情况。结果如图 2 所示, 在给药浓度均

为  $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  情况下, Mix/N04、Mix/N04<sub>MOE5</sub> 与 Mix/CT102 对 HepG-2、Huh-7 细胞的增殖抑制率均大于 65%, 对 IGF1R mRNA 的沉默效率均大于 55%, 且通过单因素方差分析三者无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 表明 Mix/N04、Mix/N04<sub>MOE5</sub> 均具有优异的抗肝癌作用。此外, Mix/NC 组对 HepG-2、Huh-7 细胞均没有显示出细胞毒性, 表明该制剂具有良好的细胞安全性, 后续均以 Mix/N04<sub>MOE5</sub> 作为研究对象。



**Figure 1** Schematic diagram of DNCA and CLD molecular structures

## 2 Mix/N04<sub>MOE5</sub> 脂质复合物的表现形态

为考察 Mix/N04<sub>MOE5</sub> 是否能形成稳定、均一的纳米颗粒, 使用动态光散射法检测了空脂材 Mix 和 Mix/N04<sub>MOE5</sub> 的粒径电位。结果如图 3 所示, 在 DNCA/CLD/N04<sub>MOE5</sub> = 20:20:1 的比例下, 该脂质复合物可形成圆球状、粒径约 151 nm 的脂质复合物, 且略大于空脂材

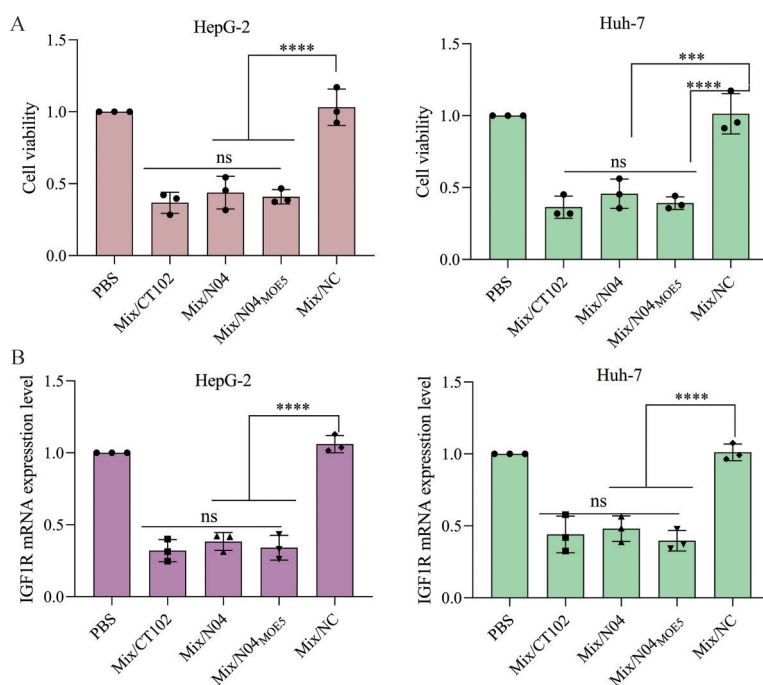
Mix 的粒径。Mix/N04<sub>MOE5</sub> 制剂粒径分布图呈单一峰形, PDI 为 0.18, 表明形成了较为均一的纳米颗粒, 其 zeta 电位为  $-3.9 \text{ mV}$ , 呈近电中性, 且具有良好的 zeta 电位分布。随后考察了 Mix/N04<sub>MOE5</sub> 制剂的稳定性, 在完成制剂 48 h 内 Mix/N04<sub>MOE5</sub> zeta 电位稳定维持在  $-4 \text{ mV}$  左右, 制剂粒径在 24 h 内较为稳定, 48 h 后略有增大, 因此后续实验均用现制剂。总体上 Mix/N04<sub>MOE5</sub> 能形成平均粒径约 151 nm、表面电位约为  $-3.9 \text{ mV}$  的均一圆球状纳米颗粒。

## 3 HepG-2/Huh-7 细胞高效摄取 Mix 载的 FAM-N04<sub>MOE5</sub>

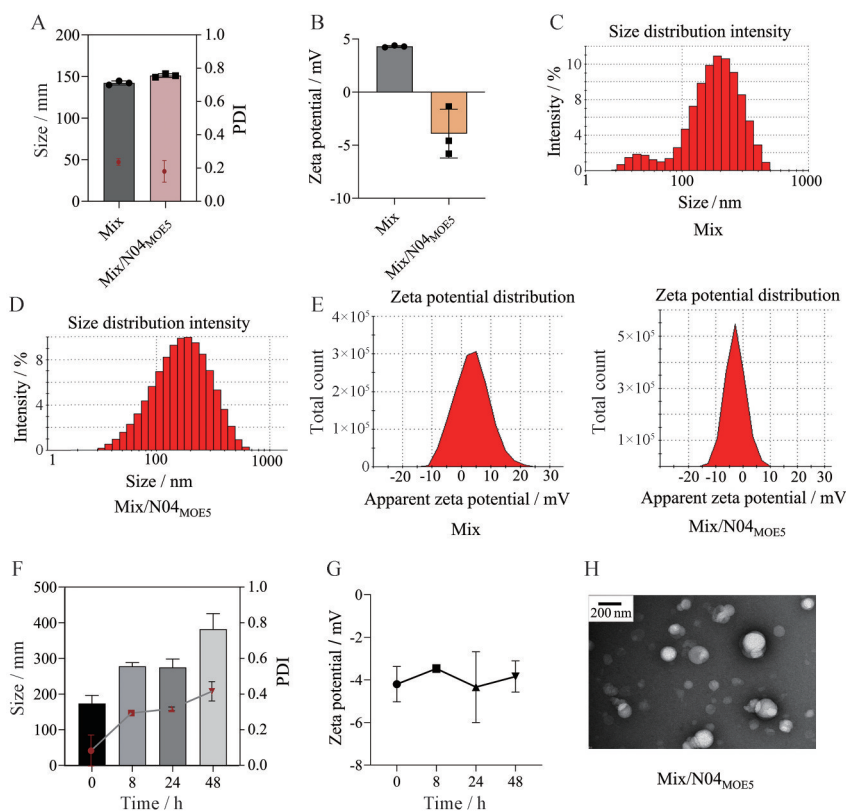
用流式细胞仪检测各制剂组给药后 4 h, 进入 Huh-7、HepG-2 细胞的情况 (使用荧光基团 FAM 标记 N04<sub>MOE5</sub>)。如图 4 所示, N04<sub>MOE5</sub> 组与 PBS 组的胞内荧光值无显著性差异, 表明裸反义寡核苷酸入胞困难, 而在 Mix/N04<sub>MOE5</sub> 组中检测到 HepG-2、Huh-7 细胞中有大量荧光, 且细胞摄取峰形图单一 (图 4A), 表明 Mix 可将 N04<sub>MOE5</sub> 高效转染入胞, 且入胞均一性高。进一步分析阳性细胞的比例可发现 (图 4B), N04<sub>MOE5</sub> 组 HepG-2、Huh-7 细胞的阳转率均在 2% 以下, 而 Mix/N04<sub>MOE5</sub> 组 HepG-2、Huh-7 细胞的阳转率可达 92% 以上, 表明 Mix/N04<sub>MOE5</sub> 高效进入绝大部分 HepG-2、Huh-7 细胞。

## 4 Mix/N04<sub>MOE5</sub> 促使 HepG-2/Huh-7 细胞凋亡

为进一步分析反义寡核苷酸制剂对 HepG-2、



**Figure 2** Anti-hepatocellular carcinoma activity of DNCA/CLD (Mix) encapsulated CT102 and N04 *in vitro*. A, B: Inhibition of HepG-2 and Huh-7 cells proliferation by Mix/CT102, Mix/N04, Mix/N04<sub>MOE5</sub> and silencing activity of IGF1R mRNA. Dosing concentration:  $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ , \*\*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ . ns: No significant difference



**Figure 3** Characterization of lipid complexes Mix vs Mix/N04<sub>MOE5</sub>. A: Particle size and PDI results; B: Zeta potential results; C, D: Distribution diagram of particle size results. E: Zeta potential distribution diagram. F, G: Size and zeta potential at different time points. H: TEM image. Scale = 200 nm. The molar ratio of DNCA/CLD/N04<sub>MOE5</sub> was 20:20:1. PDI: Polymer dispersity index; TEM: Transmission electron microscopy

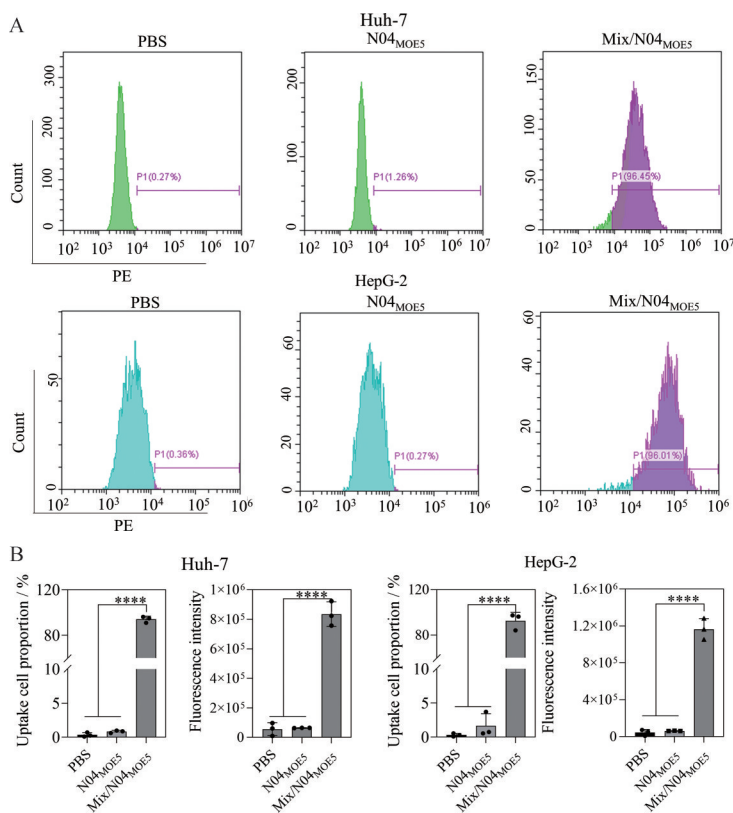
Huh-7 细胞增殖抑制的机制, 考察了其对 HCC 细胞凋亡的影响。使用流式细胞仪检测给药后 48 h HepG-2、Huh-7 细胞的凋亡情况, 结果如图 5 所示, Mix/NC 组与 PBS 组的细胞凋亡率均小于 10%, 说明 Mix/NC 没有促进细胞凋亡作用, 而 Mix/CT102、Mix/N04<sub>MOE5</sub> 分别能诱导约 35%、43% 的 Huh-7 细胞凋亡、约 37%、35% 的 HepG-2 细胞凋亡, 表现出显著的促进 HepG-2、Huh-7 细胞凋亡作用, 尤其是促进早期凋亡的作用, 且 Mix/N04<sub>MOE5</sub> 诱导 Huh-7 细胞凋亡能力优于 Mix/CT102。

### 5 Mix/N04<sub>MOE5</sub> 引起 HepG-2 细胞 S 期阻滞

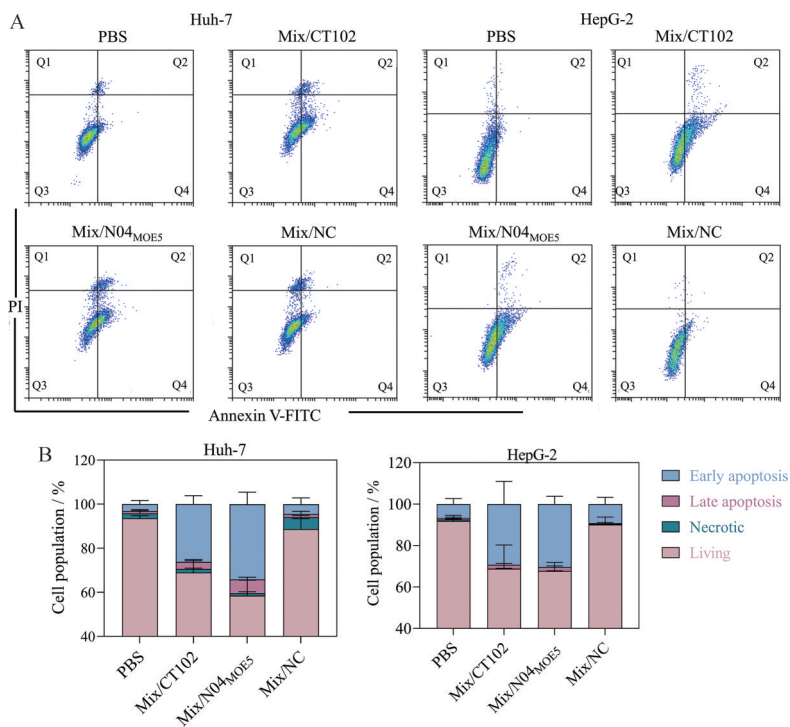
有研究<sup>[26]</sup>表明, 激活 IGF1R 信号通路会通过调节细胞周期蛋白和凋亡蛋白, 促进肿瘤细胞的生长和分裂。为探索 Mix/N04<sub>MOE5</sub> 对 HepG-2 细胞周期的影响情况, 使用流式细胞仪检测给药后 48 h 的 HepG-2 细胞周期。如图 6 所示, 与 PBS 组相比, Mix/N04<sub>MOE5</sub> 组中有超过 50% 的细胞处于 S 期, 远远高于 PBS 组的 S 期细胞比例 (30%), 说明 Mix/N04<sub>MOE5</sub> 可显著引起 HepG-2 细胞的 S 期阻滞。

### 讨论

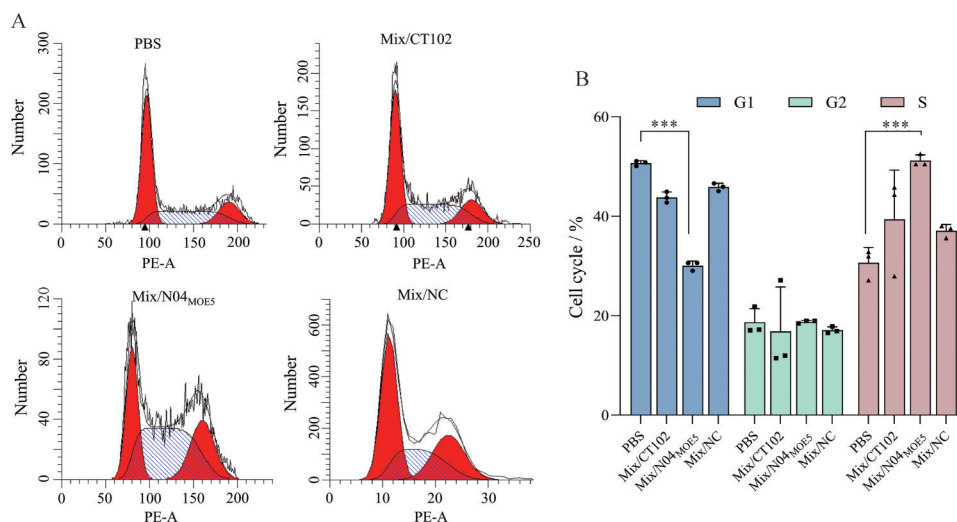
ASO 是一种优秀基因治疗方法, 目前已有 9 款 ASO 药物批准上市。但由于核酸酶稳定性及使用剂量高等问题, 极大的限制了 ASO 的临床应用。本研究利用成熟的 2'-OMOE 和 PS 修饰提高了 ASO 的血清稳定性, 使用自主研发的 DNCA/CLD (Mix) 混合脂材包载 ASO, 其中前者通过氢键、 $\pi$ - $\pi$  堆积作用, 而后者通过静电作用与 ASO 结合形成纳米颗粒, 能以非溶酶体途径高效转染入胞, 进一步在谷胱甘肽还原酶作用下断裂 CLD 的二硫键, 从而更高效释放 ASO 而发挥作用<sup>[26,27]</sup>。Mix 包载有效提高 ASO 的血清稳定性和跨膜转运能力, 从而使其可在低剂量下即表现出较好的药效。同时以 IGF1R mRNA 为靶标, 设计出新 ASO 序列 N04, 并对其进行合理化学修饰得到 N04<sub>MOE5</sub>, 利用 Mix 包载, 细胞水平实验表明, 其在 HepG-2、Huh-7 细胞中的摄取增加 95% 以上, 入胞后可显著沉默靶 mRNA, 使细胞周期停滞在 S 期, 促使细胞凋亡尤其是早期凋亡, 并高效抑制肿瘤细胞的恶性增殖。综合以上结果, 本研究获得了性质较好的体外抗肝癌细胞反义的核酸制剂 Mix/N04<sub>MOE5</sub>, 为抗肝癌细胞新型反义寡核苷酸制



**Figure 4** Flow cytometry was used to investigate the uptake of Mix/N04<sub>MOE5</sub> and N04<sub>MOE5</sub> by Huh-7 and HepG-2 cells after 4 h of administration. A: Flow cytometry peak shape of cells in different preparation groups after administration; B: Cell fluorescence intensity and cell uptake rate after administration in different preparation groups. FAM-N04<sub>MOE5</sub> conjugate, dosing concentration: 25 nmol·L<sup>-1</sup>, n = 3,  $\bar{x} \pm s$ , \*\*\*\*P < 0.000 1. PBS: Phosphate buffer saline



**Figure 5** Flow cytometry detection of the ability of Mix/N04<sub>MOE5</sub> and Mix/CT102 to induce apoptosis in HepG-2 and Huh-7 cells. A: Representative flow cytometry of apoptosis induced by Mix/N04<sub>MOE5</sub> and Mix/CT102 in Huh-7 and HepG-2 cells; B: Statistical histogram of apoptosis induced by Mix/N04<sub>MOE5</sub> and Mix/CT102. Dosing concentration: 50 nmol·L<sup>-1</sup>, detection time: 48 h after dosing, n = 3,  $\bar{x} \pm s$



**Figure 6** Flow cytometry to detect the effect of Mix/N04<sub>MOE5</sub> and Mix/CT102 on HepG-2 cell cycle. A: Representative flow cytometry of HepG-2 cell cycle induced by Mix/N04<sub>MOE5</sub> and Mix/CT102; B: Statistical histogram of HepG-2 cell cycle changes induced by each preparation. Dosing concentration:  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , detection time: 48 h after dosing,  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $***P < 0.001$

剂的研发提供了工作基础。

**作者贡献:** 蒲洋负责生化、细胞实验及数据分析处理和论文撰写; 管静负责新序列设计; 何任一负责序列合成; 朱月洁、潘德林和关注负责部分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:** 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

## References

- [1] Wang XZ, Zhao MH, Zhang CS, et al. Establishment and clinical application of the nomogram related to risk or prognosis of hepatocellular carcinoma: a review [J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2023, 10: 1389-1398.
- [2] Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7: 6.
- [3] Hartke J, Johnson M, Ghabril M. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Semin Diagn Pathol*, 2017, 34: 153-159.
- [4] Degasperi E, Colombo M. Distinctive features of hepatocellular carcinoma in non- alcoholic fatty liver disease [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2016, 1: 156-164.
- [5] Motomura K, Kuwano A, Tanaka K, et al. Potential predictive biomarkers of systemic drug therapy for hepatocellular carcinoma: anticipated usefulness in clinical practice [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15: 4345.
- [6] Imai K, Takai K, Unome S, et al. Lenvatinib or sorafenib treatment causing a decrease in skeletal muscle mass, an independent prognostic factor in hepatocellular carcinoma: a survival analysis using time-varying covariates [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15: 4223.
- [7] Saalfeld S, Kreher R, Hille G, et al. Prognostic role of radiomics-based body composition analysis for the 1-year survival for hepatocellular carcinoma patients [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2023, 14: 2301-2309.
- [8] Jilkova ZM, Kuyucu AZ, Kurma K, et al. Combination of akt inhibitor arq 092 and sorafenib potentiates inhibition of tumor progression in cirrhotic rat model of hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2018, 9: 11145-11158.
- [9] Faivre S, Rimassa L, Finn RS. Molecular therapies for HCC: looking outside the box [J]. *J Hepatol*, 2020, 72: 342-352.
- [10] Bennett CF. Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age [J]. *Annu Rev Med*, 2019, 70: 307-321.
- [11] Watts JK, Corey DR. Silencing disease genes in the laboratory and the clinic [J]. *J Pathol*, 2012, 226: 365-379.
- [12] Crooke ST, Liang XH, Baker BF, et al. Antisense technology: a review [J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100416.
- [13] Ramasamy T, Ruttala HB, Munusamy S, et al. Nano drug delivery systems for antisense oligonucleotides (ASO) therapeutics [J]. *J Control Release*, 2022, 352: 861-878.
- [14] Zhao YN, He W, Shao QL, et al. Research progress of ionizable lipid nanoparticles for siRNA delivery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 2292-2299.
- [15] Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 101-124.
- [16] Ganson NJ, Povsic TJ, Sullenger BA, et al. Pre-existing anti-polyethylene glycol antibody linked to first-exposure allergic reactions to pegnivacogin, a pegylated RNA aptamer [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137: 1610-1613.
- [17] Galal MA, Alouch SS, Alsultan BS, et al. Insulin receptor isoforms and insulin growth factor-like receptors: implications in cell signaling, carcinogenesis, and chemoresistance [J]. *Int J Mol*

- Sci, 2023, 24: 15006.
- [18] Wang Y, Deng BC. Hepatocellular carcinoma: molecular mechanism, targeted therapy, and biomarkers [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2023, 42: 629-652.
- [19] Enguita-Germán M, Fortes P. Targeting the insulin-like growth factor pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Hepatol*, 2014, 6: 716-737.
- [20] Li LY, Hou JJ, Liu XJ, et al. Nucleolin-targeting liposomes guided by aptamer as1411 for the delivery of siRNA for the treatment of malignant melanomas [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 3840-3850.
- [21] Gao YQ, Wang XX, Pan YF, et al. Synthesis and anti-HCC activity of full 2'-F/OME-siRNA encapsulated with neutral cytidinyl/cationic lipid [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 1634-1640.
- [22] Guan J, Pan YF, Li HT, 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.
- [23] Pan YF, Guan J, Gao YJ, et al. Modified ASO conjugates encapsulated with cytidinyl/cationic lipids exhibit more potent and longer-lasting anti-HCC effects [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2023, 32: 807-821.
- [24] Yu XT, 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.
- [25] Ma Y, Zhu YJ, Wang C, et al. Annealing novel nucleobase-lipids with oligonucleotides or plasmid DNA based on H-bonding or  $\pi$ - $\pi$  interaction: assemblies and transfections [J]. *Biomaterials*, 2018, 178: 147-157.
- [26] Sun J, Qiu C, Diao YP, et al. Delivery pathway regulation of 3', 3''-bis-peptide-siRNA conjugate *via* nanocarrier architecture engineering [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 10: 75-90.
- [27] Ma XF, Sun J, Qiu C, et al. The role of disulfide-bridge on the activities of h-shape gemini-like cationic lipid based siRNA delivery [J]. *J Control Release*, 2016, 235: 99-111.