

N-乙酰半乳糖胺/iRGD 肽共修饰核酸药物的构建及治疗肝细胞癌初步评价



杨雪华^{1,2}, 薛松^{1,2}, 刘正平^{1,2}, 毛楷凡¹, 张宏倩¹, 李大伟^{1,2}, 张岱州^{1,2}

1. 山东省药学院, 新型缓控释制剂与药物靶向递送系统山东省工程研究中心 (济南 250101)
2. 山东省靶向递药与高端制剂重点实验室 (济南 250101)

【摘要】目的 构建一种 N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 与环状 GRD 衍生肽 (iRGD 肽) 双配体共修饰的小干扰 RNA (siRNA) 药物, 并系统评价其理化性质及体外生物学功能。**方法** 以通用可控孔玻璃/GalNAc 为载体, 采用固相合成技术制备 GalNAc 单修饰的 siRNA 靶向 Polo 样激酶 1 (GalNAc-siPLK1); 进一步通过点击化学反应, 定点偶联 iRGD 肽段, 获得 GalNAc 与 iRGD 肽双配体共修饰的 siPLK1 (GalNAc-siPLK1-iRGD)。通过核酸酶稳定性实验、细胞摄取实验、细胞毒性实验、实时荧光定量 PCR 及 Western blotting 等技术, 对 GalNAc-siPLK1-iRGD 的稳定性、细胞内化能力、细胞杀伤能力及基因沉默效率进行综合评价。**结果** 成功合成 GalNAc-siPLK1-iRGD。该双配体修饰产物表现出良好的核酸酶抗性, 可有效保护 siPLK1 免受降解。与未修饰 siPLK1 及单修饰 GalNAc-siPLK1 相比, GalNAc-siPLK1-iRGD 在 HepG2 细胞中的摄取量显著提高, 细胞毒性明显增强, 并展现出更强的 PLK1 mRNA 及蛋白表达沉默能力。**结论** GalNAc 与 iRGD 肽双配体共修饰策略可显著提升 siPLK1 的稳定性、细胞摄取效率、细胞杀伤能力以及基因沉默效应, 表明该构建策略在肝细胞癌靶向治疗中具有良好应用前景。

【关键词】 N-乙酰半乳糖胺; iRGD; 核酸药物; 肝细胞癌; GalNAc-siPLK1-iRGD

【中图分类号】 R944.15

【文献标识码】 A

Construction and preliminary evaluation of N-acetylgalactosamine/cyclic peptide co-modified nucleic acid drugs for hepatocellular carcinoma treatment

YANG Xuehua^{1,2}, XUE Song^{1,2}, LIU Zhengping^{1,2}, MAO Kaifan¹, ZHANG Hongqian¹, LI Dawei^{1,2}, ZHANG Daizhou^{1,2}

1. Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Shandong Engineering Research Center of New Sustained and Controlled Release Formulations and Drug Targeted Delivery Systems, Jinan 250101, China

2. Shandong Key Laboratory of Targeted Drug Delivery and Advanced Pharmaceuticals, Jinan 250101, China

Corresponding authors: LI Dawei, Email: lidawei@sdaps.cn; ZHANG Daizhou, Email: zhangdaizhou@sdaps.cn

【Abstract】Objective To construct a small interfering RNA (siRNA) drug co-modified with N-acetylgalactosamine (GalNAc) and internalizing RGD peptide (iRGD peptide) dual ligands, and systematically evaluate its physicochemical properties and *in vitro* biological functions. **Methods** GalNAc-modified siRNA targeting Polo-like kinase 1 (GalNAc-siPLK1) was synthesized via solid-

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202603058

基金项目: 山东省自然科学基金青年项目 (ZR2025QC1718)

通信作者: 李大伟, 硕士, 主任药师, Email: lidawei@sdaps.cn

张岱州, 硕士, 主任药师, 硕士研究生导师, Email: zhangdaizhou@sdaps.cn

<https://yxqy.whuzhmedj.com>

phase synthesis using universal controlled pore glass/GalNAc as the support. Subsequently, the iRGD peptide was site-specifically conjugated through click reaction to obtain the siPLK1 co-modified with GalNAc and iRGD peptide (GalNAc-siPLK1-iRGD). The stability, cellular uptake, cytotoxicity and gene silencing efficiency of GalNAc-siPLK1-iRGD were systematically evaluated using nuclease stability assays, cellular uptake experiments, cytotoxicity experiments, quantitative real-time PCR, and Western blotting analysis. **Results** GalNAc-siPLK1-iRGD was successfully synthesized and exhibited enhanced resistance to nuclease degradation, effectively protecting siPLK1 from enzymatic cleavage. Compared to unmodified siPLK1 and GalNAc-siPLK1, GalNAc-siPLK1-iRGD showed significantly increased cellular uptake and markedly enhanced cytotoxicity in HepG2 cells. Moreover, GalNAc-siPLK1-iRGD resulted in more potent downregulation of PLK1 expression at both the mRNA and protein levels. **Conclusion** The dual-ligand conjugation strategy incorporating GalNAc and iRGD peptide markedly enhances the stability, cellular uptake, cytotoxicity, and gene silencing efficacy of siPLK1, underscoring its promising potential for targeted therapy in hepatocellular carcinoma.

【Keywords】 GalNAc; iRGD; Nucleic acid drug; Hepatocellular carcinoma; GalNAc-siPLK1-iRGD

肝细胞癌作为原发性肝癌最常见的病理类型，发病率和死亡率持续居高，临床治疗仍面临重大挑战^[1]。相较于手术切除、局部介入及传统全身治疗等现有手段，基因治疗在肝细胞癌治疗中展现出独特的理论优势与转化潜力^[2]。基因治疗具有高度特异性，有望显著降低对正常肝组织及全身系统的毒副作用^[3]。此外，基因治疗可通过理性设计突破索拉非尼等靶向药物的耐药困境，且作用不依赖于患者免疫状态，干预路径更为直接^[4-5]。基因治疗主要通过递送DNA、信使RNA (messenger RNA, mRNA)、小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA)、微小RNA (microRNA, miRNA) 及寡核苷酸等不同形式的核酸分子来实现其治疗目的^[6]。siRNA靶向Polo样激酶1 (siRNA targeting Polo-like kinase 1, siPLK1) 通过靶向并干扰丝氨酸/苏氨酸激酶PLK1的表达，进而抑制癌细胞增殖并诱导凋亡，因此有望实现对肝细胞癌的高效治疗^[7]。

尽管siPLK1在肝细胞癌治疗中前景广阔，但其体内应用受限于核酸稳定性差与细胞摄取难两大瓶颈^[8-9]。现有病毒及脂质体等纳米载体虽可部分改善递送效率，但普遍仍面临靶向性不足与生物安全性欠佳等共同挑战^[10-11]。N-乙酰半乳糖胺 (N-acetylgalactosamine, GalNAc) 作为当前核酸药物肝脏靶向递送的核心技术平台，广泛应用于临床前及临床研究，其通过特异性识别肝细胞表面高表达的去唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPR) 来实现核酸药物的高效肝脏递送^[12]。然而，在肝细胞癌治

疗场景中，GalNAc靶向策略面临重要挑战：肝细胞ASGPR表达水平较正常肝细胞显著下调，导致核酸药物在肿瘤部位的富集效率受限，进而影响疗效^[13-15]。为进一步优化GalNAc的肝癌递送效能，研究者正致力于开发双重靶向策略，该策略在保留GalNAc肝脏定向能力的同时，引入肿瘤特异性识别基团，构建可实现器官级富集与细胞级内化的复合递送系统。其中，iRGD肽是一种含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 序列的环状内化性靶向多肽，具有优异的肿瘤穿透能力，能特异性识别肿瘤血管内皮细胞表面高表达的整合素 $\alpha_v\beta_3$ ，介导iRGD肽穿透肿瘤组织的细胞外基质，深入肿瘤内部，实现肿瘤穿透功能^[16-17]。

为此，本研究在利用GalNAc实现肝脏初步富集的基础上，进一步引入iRGD肽作为第2个配体，共同修饰于siPLK1，构建了双重修饰的GalNAc-siPLK1-iRGD。该设计一方面通过ASGPR途径实现肝脏富集，另一方面借助iRGD肽增强肿瘤穿透与细胞摄取，从而弥补ASGPR在肝癌细胞中表达下调所导致的递送不足。通过二者的协同作用，有望提升核酸药物在肝癌病灶中的蓄积与疗效，为肝细胞癌的精准治疗提供新思路。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器

Oligo 48 合成仪 (美国ABI公司); DYCP-31B 水平电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); ProXima 280 化学发光成像系统 (荷兰Isogen公司); Eclipse Ti DS-Ri2 倒置荧光显微镜 (日本尼

康株式会社); V30R 台式高速冷冻离心机 [天美(中国)科学仪器有限公司]; Nano100 超微量紫外-可见分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司); QuantStudio 1 荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技有限公司); SVE-2 垂直电泳仪(武汉塞维尔生物科技有限公司); LTQ Orbitrap XL 高分辨质谱仪(美国 ThermoFisher 公司); 1260 Infinity II 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); MS204TS/02 电子天平(瑞士梅特勒-托利多国际有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

核苷亚磷酸酰胺单体(化学纯, 批号: IFDGP2 8A18) 和 Universal CPG (孔径: 1 000 Å, 批号: 20240803) 购自上海兆维科技发展有限公司; siPLK1 (苏州贝信生物技术有限公司, 正义链: 5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3'; 反义链: 5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUU-3', 批号: YKY0401); iRGD 肽(上海强耀生物科技有限公司, 序列: CRGDKGPDC, 批号: P240307-XT1139863); 三氯乙酸(批号: 2403124000)、5-乙硫基-1H-四氮唑(批号: 2401283000)、*N*-甲基咪唑(批号: 2311170600)、乙酸酐(批号: 2410090800)、氢化黄原素(批号: 2411084000)、THPTA(批号: 2408170500)、CuSO₄·5H₂O(批号: 2405180042)、维生素 C 钠(批号: 2409002405) 均购自苏州柯乐玛生物技术有限公司; 琼脂糖(上海阿拉丁试剂有限公司, 批号: G2320222); GelstainRed™ 核酸染料(美国 UE 公司, 批号: 220929L01-15); RNA 酶 A 溶液(美国赛默飞世尔科技有限公司, 批号: W9715); RNA 酶抑制剂(批号: 03112220712)、DAPI 染色液(批号: 072723240227)、4% 的多聚甲醛溶液(批号: A609250622)、胰酶细胞消化液(批号: A608250710)、CCK-8 试剂盒(批号: A664250716) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; HepG2 细胞专用培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司, 批号: WHAA24D048); TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂(天根生化科技有限公司, 批号: X1220); HiFiScript cDNA Synthesis Kit(批号: CW2569M) 和 UltraSYBY Mixture(批号: CW0957M) 购自北京康为世纪生物科技有限公司; PLK1 引物(正向引物: 5'-CTGGAGGTG AAAATAGGGGATTT-3', 反相引物: 5'-AGGTG

TTTTGCCCCACTAACA-3') 和 GAPDH 内参引物(正向引物: 5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACGG-3'; 反相引物: 5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGAGT-3') 购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; RIPA 裂解液(批号: G2002)、BCA 蛋白定量检测试剂盒(批号: G2026)、ECL 发光液(批号: G2161)、β-actin 兔抗体(批号: GB15003) 和 HRP-山羊抗兔二抗(批号: GB23303) 均购自武汉塞维尔生物科技有限公司; PLK1 兔抗体(Cell Signaling Technology, 批号: 4513); 氨水、三乙胺、二甲基亚砜、乙腈、吡啶、二氯甲烷、碳酸钠、异丙醇、无水乙醇、氯仿、冰乙酸、乙二胺四乙酸二钠二水合物(Na₂EDTA·2H₂O, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 细胞

HepG2 细胞来自中国科学院细胞库。

2 方法与结果

2.1 GalNAc-siPLK1-iRGD 的合成

参考相关文献^[18], 采用固相合成法进行 GalNAc-siPLK1-iRGD 的合成。在合成仪上导入需要合成的序列, 以 Universal CPG/GalNAc 为载体, 沿 3'→5' 方向依次偶联核苷单体。亚磷酸酰胺单体以 100 mmol/L 或 200 mmol/L 的浓度溶解于无水乙腈中, 并加入分子筛浸泡 24 h 以上, 以去除体系中微量水分。每连接 1 个亚磷酸酰胺单体均包含脱保护、偶联、盖帽、氧化(或硫代) 4 步反应。具体合成条件如下:

(1) 脱保护。使用含 3% 三氯乙酸的二氯甲烷溶液, 脱除固相载体上核苷酸 5'-OH 的保护基团, 反应时间 60 s。

(2) 偶联。使用 0.3 mol/L 的 5-乙硫基-1H-四氮唑的乙腈溶液, 使亚磷酸酰胺单体与暴露的 5'-OH 反应形成磷酸三酯键, 偶联时间 300 s。

(3) 盖帽。采用 CAP A 与 CAP B 的混合溶液(体积比 1:1)。CAP A 为含 20% *N*-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液, CAP B 为含 20% 乙酸酐的乙腈溶液。用于封闭未反应的 5'-OH 基团, 盖帽时间 20 s。

(4) 氧化/硫代。氧化反应使用 0.05 mol/L 的碘液, 反应时间 25 s; 硫代反应使用 0.2 mol/L 氢化黄原素的吡啶溶液, 反应时间 200 s。

(5) 待最后一个核苷单体连接完成后, 将干燥的固体支撑物加入 25% 的氨水溶液中, 在 55 °C

下反应 16 h, 固相载体用乙醇/水洗涤 2 次, 离心浓缩后用无 RNA 酶水溶解过滤后进行纯化。

(6) 采用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 进行纯化, 纯化条件: 色谱柱为 Waters XBridge C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm); 流动相为 0.1 mol/L 醋酸三乙胺 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~1 min, 0% B; 1~25 min, 0%→30% B; 25~26 min, 30%→65% B; 26~27 min, 65% B; 27~28 min, 65%→0% B); 流速为 0.8 mL/min; 检测波长为 260 nm; 柱温为 60 °C; 进样量为 10 μL。对纯化后收集的馏分分别进行 HPLC、质谱 (MS) 及 UV 检测。MS 参数设置如下: 加热温度为 40 °C, 喷雾电压为 4 kV; 鞘气、辅助气及吹扫气流量分别设定为 30、10、0 arb; 毛细管温度为 300 °C, 毛细管电压为 10 V, 管状透镜电压为

-150 V。UV 检测以 260 nm 为检测波长对核酸进行定量测定。根据检测结果筛选出合格的馏分, 合并后进行冻干处理, 最终获得经 2'-氟代修饰、2'-甲氧基修饰及硫代磷酸酯修饰的 GalNAc-siPLK1 单链骨架。

将 GalNAc-siPLK1 单链溶于缓冲盐溶液, 加入 iRGD 肽 [CRGDKGPDC, 20 当量 (eq), DMSO 溶解], 涡旋混匀。加入 THPTA/CuSO₄·5H₂O (5 : 1, 15 eq/3 eq), 40 °C 振荡 5 min; 随后迅速加入维生素 C 钠 (25 eq), 涡旋后于 40 °C 反应 2 h。经粗品检测与纯化, 得到目标单链。将目标单链与反义链按 1 : 1 摩尔比混合于退火缓冲液, 90 °C 变性 5 min, 缓慢降温至 20 °C, 冻干后获得 iRGD 肽修饰的 GalNAc-siPLK1-iRGD 双链核酸。合成路线见图 1。

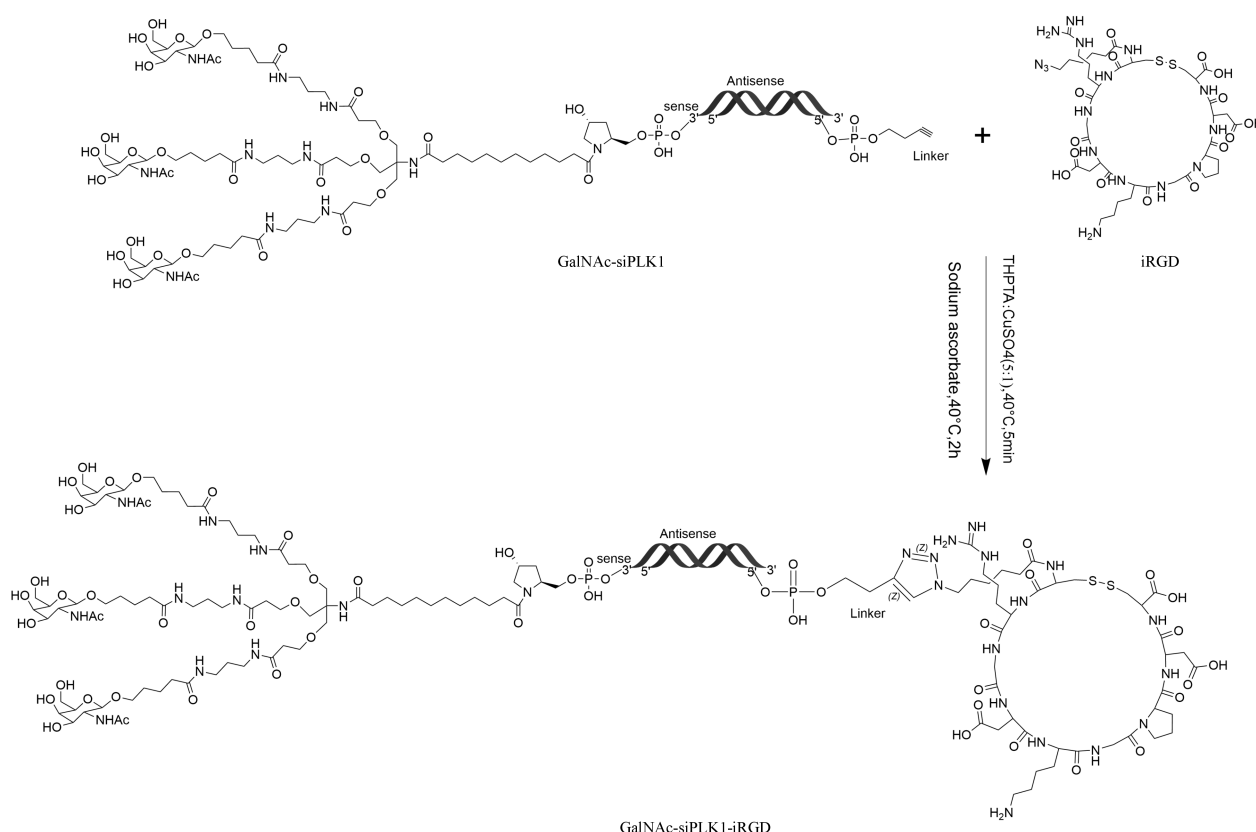


图 1 GalNAc-siPLK1-iRGD 的合成路线

Figure 1. Synthetic route of GalNAc-siPLK1-iRGD

HPLC 分析结果如图 2 所示, 终产物的洗脱峰形尖锐、对称, 且无明显的杂峰或非特异性聚集峰。与未修饰的 siPLK1 及 GalNAc-siPLK1 的色谱行为相比, 终产物呈现独特的保留时间偏移, 进一步证明结构修饰的成功。面积归一化法色谱分析结果显示, GalNAc-siPLK1-iRGD 的纯度均在

95% 以上, 表明目标产物纯度较高, 完全满足后续体外及体内实验的要求。

按照上述步骤成功合成了 GalNAc-siPLK1-iRGD。为了验证 GalNAc-siPLK1-iRGD 的正确合成并评估其纯度, 对终产物进行了 MS 和 HPLC 分析, 并以未修饰的 siPLK1 及 GalNAc-siPLK1 作为

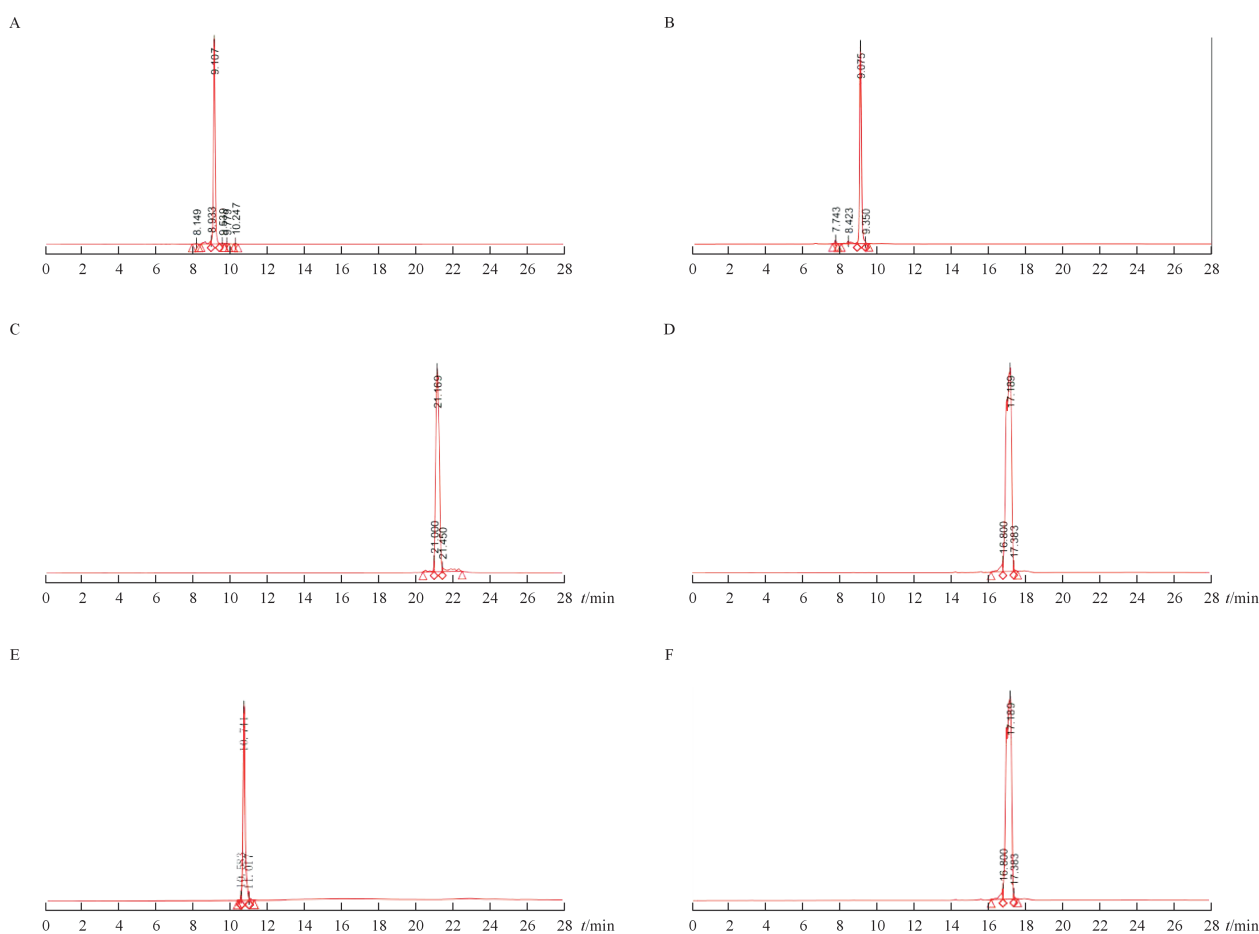


图2 GalNAc-siPLK1-iRGD的HPLC色谱图

Figure 2. HPLC chromatogram of GalNAc-siPLK1-iRGD

注: A. siPLK1 正义链; B. siPLK1 反义链; C. GalNAc-siPLK1 正义链; D. GalNAc-siPLK1 反义链; E. GalNAc-siPLK1-iRGD 正义链; F. GalNAc-siPLK1-iRGD 反义链。

对照。MS分析结果如图3所示, GalNAc-siPLK1-iRGD的正义链实测分子量为9 210.0 Da, 与未修饰的siPLK1及GalNAc-iRGD相比, 终产物的分子量显著增大, 且与理论分子量一致, 这证实了GalNAc与iRGD肽2个配体成功共价连接至了siPLK1的正义链上, 表明目标复合物GalNAc-siPLK1-iRGD的成功合成。

2.2 酶稳定性实验

参考相关文献^[19], 采用琼脂糖凝胶电泳试验对GalNAc-siPLK1-iRGD在核酸酶中的酶稳定性进行研究。将GalNAc-siPLK1-iRGD溶液稀释100倍, 取稀释后的溶液4 μ L, 加入0.1 mg/mL的RNA酶A溶液4 μ L, 然后在37 $^{\circ}$ C条件下孵育2 h后, 加入RNA酶抑制剂(40 U/ μ L)终止反应, GalNAc-siPLK1和未修饰的siPLK1同法操作作为对照, 最后用灭菌水将复合物稀释至适合浓度进行琼脂糖凝胶电泳实验。另外, 未经处理的

GalNAc-siPLK1-iRGD、GalNAc-siPLK1和未修饰的siPLK1也直接上样进行琼脂糖凝胶电泳, 通过成像仪观察其电泳条带。

酶稳定性实验结果如图4所示。在未与RNase孵育前, GalNAc-siPLK1-iRGD、GalNAc-siPLK1和未修饰的siPLK1均可观察到清晰的电泳条带。其中, siPLK1与GalNAc-siPLK1在凝胶中的条带位置不同, 主要归因于GalNAc偶联后分子表观分子量、空间构象及电泳迁移特性的改变。与RNase孵育后, 未修饰的siPLK1被完全降解, 电泳图中未见明显条带; 而经骨架修饰的GalNAc-siPLK1-iRGD和GalNAc-siPLK1仍可见清晰条带, 表明二者未被核酸酶降解。该抗降解能力主要源于2个方面: 一是siPLK1骨架上引入了2'-氟代修饰、2'-甲氧基修饰及硫代磷酸酯修饰; 二是共价连接的多肽(iRGD肽)和糖簇(GalNAc)位于siPLK1正义链末端, 其较大的分

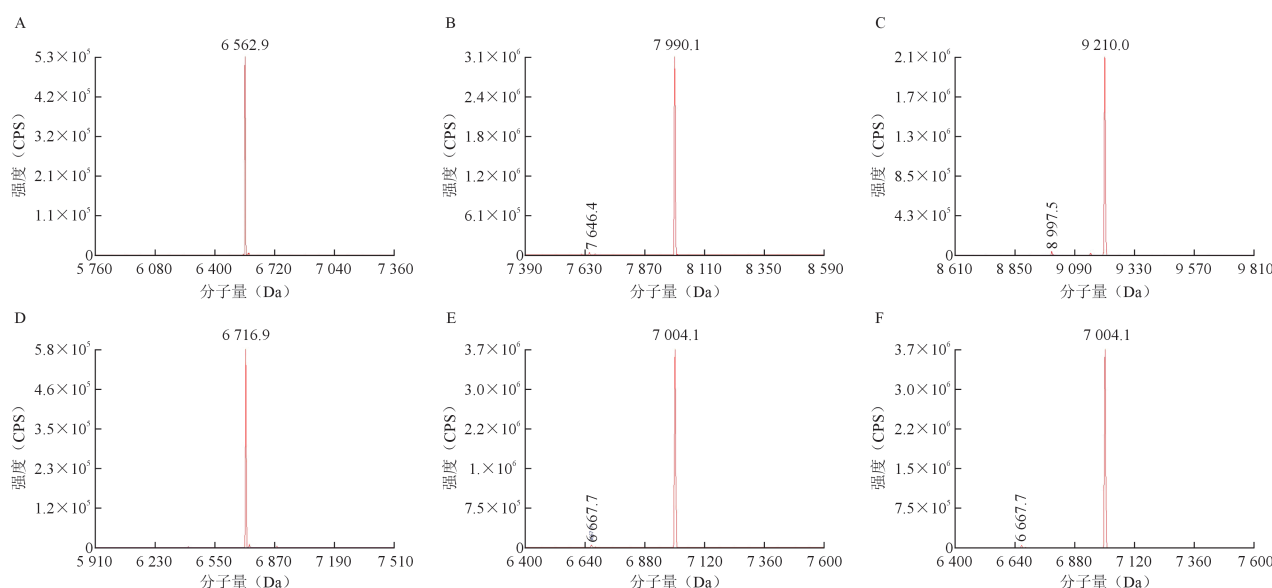


图3 GalNAc-siPLK1-iRGD的MS图

Figure 3. MS of GalNAc-siPLK1-iRGD

注：A. siPLK1 正义链；B. GalNAc-siPLK1 正义链；C. GalNAc-siPLK1-iRGD 正义链；D. siPLK1 反义链；E. GalNAc-siPLK1 反义链；F. GalNAc-siPLK1-iRGD 反义链。

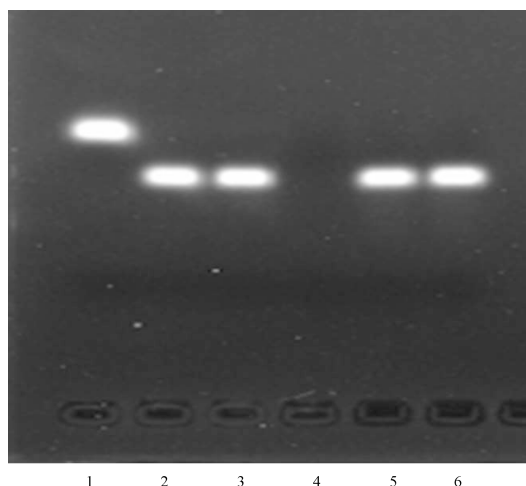


图4 GalNAc-siPLK1-iRGD的琼脂糖凝胶电泳图

Figure 4. Agarose gel electrophoresis of GalNAc-siPLK1-iRGD

注：1. siPLK1；2. GalNAc-siPLK1；3. GalNAc-siPLK1-iRGD；4. siPLK1+酶；5. GalNAc-siPLK1+酶；6. GalNAc-siPLK1-iRGD+酶。

子基团在空间上可物理性遮挡siPLK1末端的磷酸二酯键，从而有效保护核酸骨架免受酶切攻击。

2.3 细胞摄取实验

在固相合成反义链时，于其5'-端引入Cy5荧光基团。标记后的反义链经脱保护、RP-HPLC纯化并经MS确认后，与正义链按1:1摩尔比退火形成Cy5标记双链siPLK1，用于后续细胞摄取实验。通过荧光显微镜观察GalNAc-siPLK1-iRGD的入胞情况。将HepG2细胞以 5×10^4 个/孔的密度接种于24孔板中，在培养箱中培养24 h后，每孔

分别加入200 nmol/L的GalNAc-siPLK1-iRGD、GalNAc-siPLK1及siPLK1。培养4 h后，弃掉培养基，用500 μ L PBS洗涤3次，之后每孔加入500 μ L 4%的多聚甲醛溶液固定细胞15 min，固定结束后再向每孔加入500 μ L DAPI溶液（1 μ g/mL）染细胞核2~5 min，染色结束后同样用PBS洗涤3次。最后将24孔板置于荧光显微镜下观察。

细胞摄取实验结果如图5所示。Cy5荧光成像显示，未经修饰的siPLK1组细胞内红色荧光信号较弱，表明其被细胞摄取较少。相比之下，GalNAc-siPLK1组细胞中可观察到显著红色荧光聚集，证明GalNAc修饰能有效促进细胞对siRNA的内化。而双配体修饰组（GalNAc-siPLK1-iRGD）的荧光信号强度进一步显著增强，且在细胞质中分布更为广泛，说明iRGD肽的引入进一步提升了siRNA的细胞摄取效率。以上结果证实，GalNAc与iRGD肽的双重修饰策略可协同增强siPLK1的细胞内化能力，且GalNAc-siPLK1-iRGD具有最优的入胞效果。

2.4 细胞毒性实验

通过细胞毒性实验检测GalNAc-siPLK1-iRGD对肿瘤细胞的杀伤作用。将肝癌HepG2细胞以 5×10^3 个/孔接种于96孔板中，分别加入400 nmol/L的siPLK1、GalNAc-siPLK1和GalNAc-siPLK1-iRGD，在无血清无双抗的培养基中孵育4 h；然后用等体积的含血清培养基代替无血清培

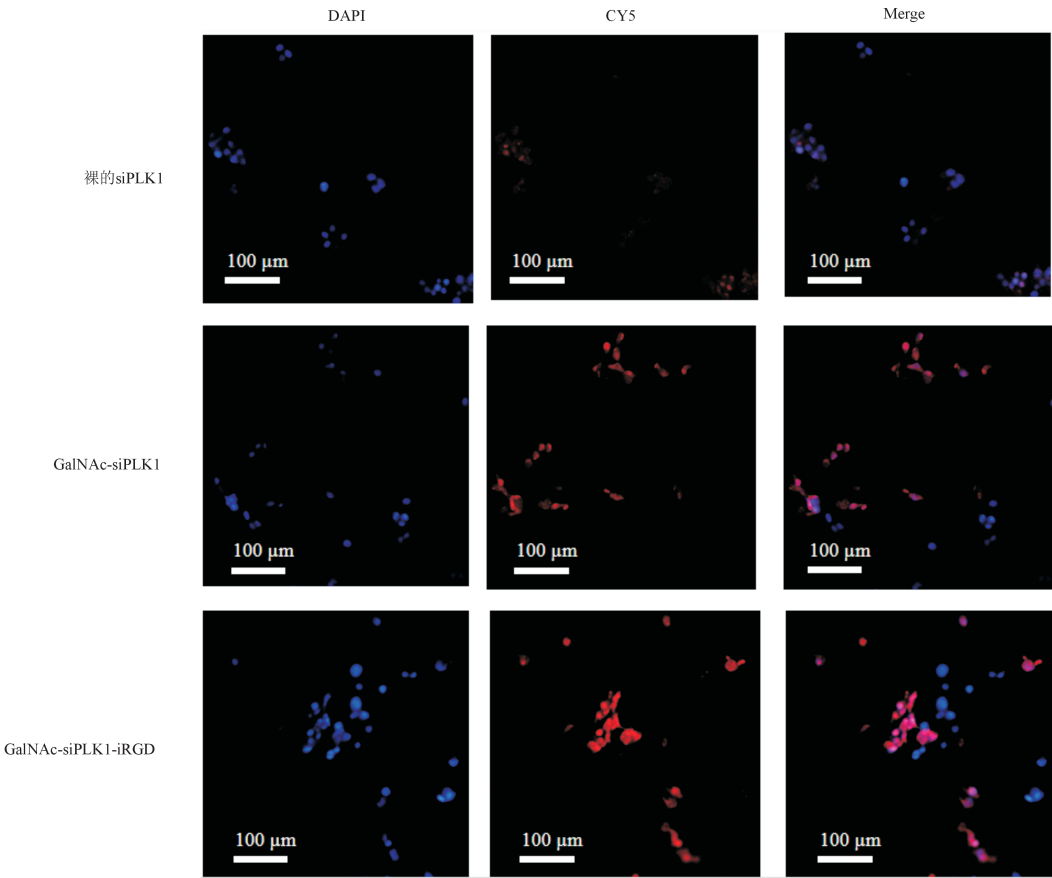


图5 GalNAc-siPLK1-iRGD 的细胞内吞图
Figure 5. Cellular uptake of GalNAc-siPLK1-iRGD

培养基，并继续孵育 48 h；向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液，于培养箱中孵育 2 h 后，使用多功能酶标仪测定各孔在 450 nm 处的吸光度 (A) 值。以空白孔调零，计算各孔扣除本底后的 A 值，并将实验组结果与未经药物处理的对照组细胞进行比较。按下式计算细胞存活率：

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

其中， $A_{\text{样品}}$ 为加药处理后的 A 值； $A_{\text{对照}}$ 为对照孔（加细胞，不加药物）的 A 值； $A_{\text{空白}}$ 为空白孔（不加细胞和药物）的 A 值。

每组设置 6 个复孔，实验独立重复 3 次。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用 GraphPad Prism 6.01 软件进行统计学分析，2 组间比较采用 t 检验，多组间比较采用方差分析 (ANOVA)， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

细胞毒性实验结果如图 6 所示。与 PBS 对照组相比，单独使用 siPLK1 的细胞存活率为 70%；经 GalNAc 修饰后，GalNAc-siPLK1 组的存活率进一步下降至 45%；而当采用 GalNAc 与 iRGD 肽进

行双配体共修饰后，GalNAc-siPLK1-iRGD 组的细胞存活率显著降低至 21%。结果证实，GalNAc 与 iRGD 肽双配体共修饰策略能显著增强 siPLK1 对肿瘤细胞的杀伤作用。

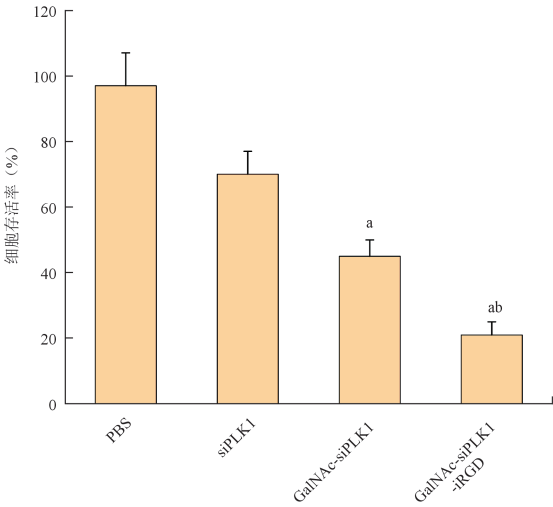


图6 GalNAc-siPLK1-iRGD 的细胞毒性实验 ($n=3$)
Figure 6. Cytotoxicity of GalNAc-siPLK1-iRGD ($n=3$)
注：与 siPLK1 组相比，^a $P < 0.01$ ；与 GalNAc-siPLK1 组相比，^b $P < 0.01$ 。

2.5 实时荧光定量PCR实验

通过实时荧光定量PCR (qPCR) 实验检测 GalNAc-siPLK1-iRGD 的沉默肿瘤基因的效果。将肝癌 HepG2 细胞以 3×10^5 个/孔接种至6孔板中, 分别加入 400 nmol/L 的 siPLK1、GalNAc-siPLK1 和 GalNAc-siPLK1-iRGD, 在无血清无双抗的培养基中孵育 4 h, 然后用等体积的含血清培养基代替无血清培养基, 并继续孵育 48 h; 随后, 收集转染过后的 HepG2 细胞, 并使用总 RNA 提取试剂提取 RNA, 之后进行总 RNA 的逆转录, 最后进行 qPCR 实验, 以 β -actin 为内参, 测定 PLK1 mRNA 表达水平的变化。每组设置6个复孔, 实验独立重复3次。

qPCR 实验结果如图 7 所示, siPLK1 组、GalNAc-siPLK1 组及 GalNAc-siPLK1-iRGD 组中 PLK1 mRNA 的相对表达水平分别为 0.54、0.35、0.15。与未修饰的 siPLK1 相比, GalNAc 修饰使 PLK1 mRNA 表达降低至 35%, 而 GalNAc 与 iRGD 肽双修饰进一步将表达量抑制至 15%, 较 siPLK1 组下降约 72%。该结果证实, GalNAc-siPLK1-iRGD 通过协同增强细胞靶向与内吞效率, 实现了对 PLK1 mRNA 的高效沉默, 显著优于单一修饰或未修饰组。

2.6 Western blotting 实验

通过 Western blotting 实验检测 GalNAc-siPLK1-iRGD 沉默 PLK1 蛋白的效果。将肝癌 HepG2 细胞以 3×10^5 个细胞/孔接种至6孔板中, 在培养箱中培养过夜后, 每孔分别加入 400 nmol/L

的 siPLK1、GalNAc-siPLK1 和 GalNAc-siPLK1-iRGD, 在无血清无双抗的培养基中孵育 4 h, 然后用等体积的含血清培养基代替无血清培养基, 并继续孵育 48 h; 随后收集细胞, 用预冷 PBS 洗涤 2 次, 通过 RIPA 裂解液提取总蛋白; 蛋白样品经 BCA 法定量、变性后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜至 PVDF 膜, 依次进行封闭、一抗孵育 (稀释比例 1 : 5 000)、二抗 (荧光标记) 孵育 (稀释比例 1 : 5 000) 及荧光成像检测。以 β -actin 为内参, 通过灰度分析评估 GalNAc-siPLK1-iRGD 的基因沉默效率。

结果如图 8 所示, 与空白细胞相比, GalNAc-siPLK1 能显著降低 HepG2 细胞中 PLK1 蛋白的表达水平 ($P < 0.01$), 表明 GalNAc-siPLK1 能进入细胞发挥蛋白沉默作用; 进一步引入 iRGD 肽后, GalNAc-siPLK1-iRGD 表现出更强的蛋白沉默效果, 其 PLK1 蛋白表达水平较 GalNAc-siPLK1 组进一步下降 (灰度值比值由 0.43 降低到 0.36, $P < 0.01$), 提示 iRGD 肽修饰可协同增强 GalNAc 介导的靶向递送与细胞摄取。上述结果表明, GalNAc 与 iRGD 肽的双重修饰策略可协同增强 siPLK1 的蛋白沉默效能。

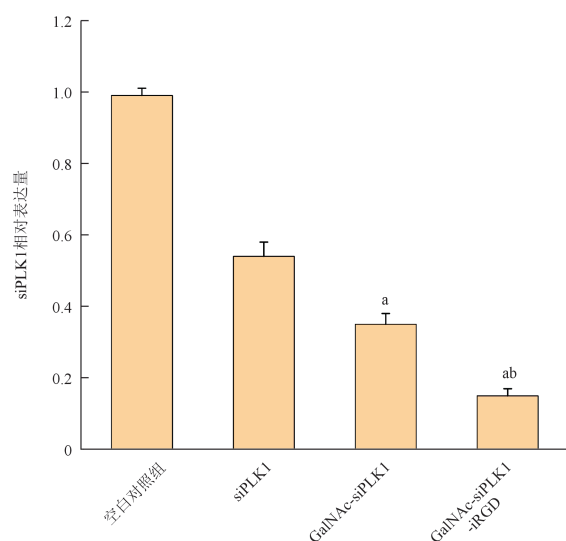


图 7 GalNAc-siPLK1-iRGD 的 qPCR 结果 ($n=3$)

Figure 7. qPCR results of GalNAc-siPLK1-iRGD ($n=3$)

注: 与 siPLK1 组相比, $^a P < 0.01$; 与 GalNAc-siPLK1 组相比, $^b P < 0.01$ 。

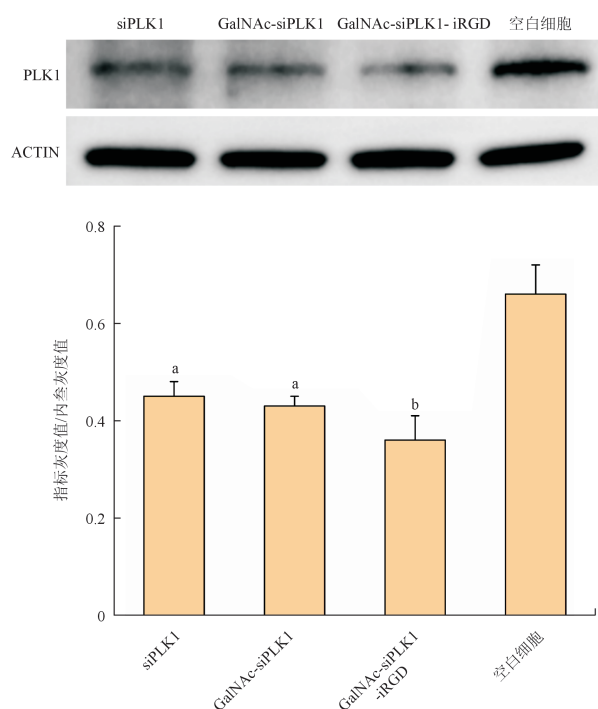


图 8 GalNAc-siPLK1-iRGD 的 Western blotting 结果

Figure 8. Western blotting analysis results of GalNAc-siPLK1-iRGD

注: 与空白细胞组相比, $^a P < 0.01$; 与 GalNAc-siPLK1 组相比, $^b P < 0.01$ 。

3 讨论

尽管 ASGPR 在正常肝细胞高表达,但在肝癌发生发展过程中,特别是在去分化的肝癌细胞中,ASGPR 表达水平显著下降,这正是传统 GalNAc-siRNA 系统治疗肝癌的瓶颈所在。为此,本研究设计了 GalNAc 与肿瘤穿透肽 iRGD 肽共修饰的新型 siRNA 递送系统,一方面保留 GalNAc 的肝脏定向能力;另一方面通过引入 iRGD 使 siRNA 穿透肿瘤组织的能力增强,从而同时实现器官靶向与增强肿瘤穿透。本研究结果表明,所构建的双配体修饰 siRNA 系统可有效抵抗核酸酶降解,为 siRNA 在体内复杂环境中的稳定存在奠定了基础。体外细胞实验进一步证实,相比于单独使用 GalNAc 修饰的 siRNA,采用 iRGD 肽介导的双配体修饰策略能显著提高细胞的内存效率,充分体现了 2 种内存途径之间的协同效应。此外,该双修饰策略通过增强 siRNA 的细胞摄取效率,不仅有效提升了其对肿瘤细胞的杀伤能力,也在基因和蛋白水平上实现了更显著的沉默效果。

另外,本研究目前仍存在一定局限性。首先,所有功能实验均基于体外 HepG2 细胞模型,缺乏体内生理微环境对递送系统行为的影响数据, GalNAc 与 iRGD 肽双重修饰策略的协同作用尚未在活体水平得到验证。其次,在安全性评价方面,本研究存在明显缺口:一是未检测该双修饰系统对正常肝细胞及其他重要器官来源细胞的体外毒性,无法排除其潜在的脱靶损伤;二是未评估其免疫原性,而 iRGD 肽作为肿瘤穿透肽可能非预期激活免疫反应,引发细胞因子释放等不良事件;三是硫代磷酸酯修饰虽能增强 siRNA 稳定性,但其在体内的累积毒性和长期安全性亦需关注。因此,后续研究亟需在动物模型中系统开展药动学、组织分布、抗肿瘤药效及全面安全性评价(包括一般毒性、靶器官毒性、免疫原性及脱靶效应),以更完整地评估该双修饰递送系统的临床应用前景。

综上所述,本研究为突破传统 GalNAc 系统的应用局限提供了新策略,该双配体协同递送系统展现出作为新型肝癌靶向治疗平台的潜力。

参考文献

1 Ladd AD, Duarte S, Sahin I, et al. Mechanisms of drug resistance

<https://yxqy.whuzhmedj.com>

- in HCC[J]. *Hepatology*, 2024, 79(4): 926–940. DOI: [10.1097/HEP.000000000000237](https://doi.org/10.1097/HEP.000000000000237).
- 2 Thalij KM, You HW, Aher KB, et al. Advances in lipid-based nanomedicine: pathway specific siRNA therapy and optimizing delivery for hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Nanomedicine*, 2025, 20(20): 10541–10566. DOI: [10.2147/IJN.S532246](https://doi.org/10.2147/IJN.S532246).
- 3 Ermi AG, Younis RM, Rodriguez K, et al. Gene therapy strategies for hepatocellular carcinoma (HCC): current landscape and future directions[J]. *Cancers*, 2025, 17(22): 3608. DOI: [10.3390/cancers17223608](https://doi.org/10.3390/cancers17223608).
- 4 Wang Y, Wang Y, Qin Z, et al. The role of non-coding RNAs in ABC transporters regulation and their clinical implications of multidrug resistance in cancer[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2021, 17(3): 291–306. DOI: [10.1080/17425255.2021.1887139](https://doi.org/10.1080/17425255.2021.1887139).
- 5 Peterson C, Denlinger N, Yang Y, et al. Recent advances and challenges in cancer immunotherapy[J]. *Cancers*, 2022, 14(16): 3972. DOI: [10.3390/cancers14163972](https://doi.org/10.3390/cancers14163972).
- 6 Jiang Y, Fan M, Yang Z, et al. Recent advances in nanotechnology approaches for non-viral gene therapy[J]. *Biomater Sci*, 2022, 10(24): 6862–6892. DOI: [10.1039/d2bm01001a](https://doi.org/10.1039/d2bm01001a).
- 7 Chiappa M, Petrella S, Damia G, et al. Present and future perspective on PLK1 inhibition in cancer treatment[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 903016. DOI: [10.3389/fonc.2022.903016](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.903016).
- 8 Zhu Y, Zhu L, Wang X, et al. RNA-based therapeutics: an overview and prospectus[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7): 644. DOI: [10.1038/s41419-022-05075-2](https://doi.org/10.1038/s41419-022-05075-2).
- 9 Winkeljann B, Keul DC, Merkel OM. Engineering poly- and micelleplexes for nucleic acid delivery—A reflection on their endosomal escape[J]. *J Control Release*, 2023, 353: 518–534. DOI: [10.1016/j.jconrel.2022.12.008](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.12.008).
- 10 Travieso T, Li J, Mahesh S, et al. The use of viral vectors in vaccine development[J]. *NPJ Vaccines*, 2022, 7(1): 75. DOI: [10.1038/s41541-022-00503-y](https://doi.org/10.1038/s41541-022-00503-y).
- 11 Yan Y, Liu XY, Lu A, et al. Non-viral vectors for RNA delivery[J]. *J Control Release*, 2022, 342: 241–279. DOI: [10.1016/j.jconrel.2022.01.008](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.01.008).
- 12 Schlegel MK, Matsuda S, Brown CR, et al. Overcoming GNA/ RNA base-pairing limitations using isonucleotides improves the pharmacodynamic activity of ESC+ GalNAc-siRNAs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(19): 10851–10867. DOI: [10.1093/nar/gkab916](https://doi.org/10.1093/nar/gkab916).
- 13 Willoughby JLS, Chan A, Sehgal A, et al. Evaluation of GalNAc-siRNA conjugate activity in pre-clinical animal models with reduced asialoglycoprotein receptor expression[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(1): 105–114. DOI: [10.1016/j.ymthe.2017.08.019](https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.08.019).
- 14 Kim Y, Jo M, Schmidt J, et al. Enhanced potency of GalNAc-conjugated antisense oligonucleotides in hepatocellular cancer models[J]. *Mol Ther*, 2019, 27(9): 1547–1557. DOI: [10.1016/j.ymthe.2019.06.009](https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.06.009).
- 15 Tanowitz M, Hettrick L, Revenko A, et al. Asialoglycoprotein receptor 1 mediates productive uptake of *N*-acetylgalactosamine-conjugated and unconjugated phosphorothioate antisense

- oligonucleotides into liver hepatocytes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(21): 12388–12400. DOI: [10.1093/nar/gkx960](https://doi.org/10.1093/nar/gkx960).
- 16 Thirumalai A, Girigoswami K, Pallavi P, et al. Cancer therapy with iRGD as a tumor-penetrating peptide[J]. *Bull Cancer*, 2023, 110(12): 1288–1300. DOI: [10.1016/j.bulcan.2023.08.009](https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2023.08.009).
- 17 Nikitovic D, Kukoviyakina E, Berdiaki A, et al. Enhancing tumor targeted therapy: the role of iRGD peptide in advanced drug delivery systems[J]. *Cancers*, 2024, 16(22): 3768. DOI: [10.3390/cancers16223768](https://doi.org/10.3390/cancers16223768).
- 18 Li Q, Dong M, Chen P, et al. Novel diamine-scaffold based *N*-acetylgalactosamine (GalNAc)-siRNA conjugate: synthesis and in vivo activities[J]. *RSC Adv*, 2024, 14(25): 17461–17466. DOI: [10.1039/d4ra03023k](https://doi.org/10.1039/d4ra03023k).
- 19 Chen A, Chen Y, Liu S, et al. Mesoporous silica nanoparticle-modified electrode arrays of cochlear implants for delivery of siRNA-TGFβ1 into the inner ear[J]. *Colloid Surface B*, 2022, 218: 112753. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2022.112753](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112753).

收稿日期: 2026 年 03 月 17 日 修回日期: 2026 年 06 月 01 日
本文编辑: 钟巧妮 洗静怡