



基于 AS1411 适配体的 DNA-RNA 杂交载体的抗肿瘤研究*

赵昌麒¹⁾ 葛科立²⁾ 贾子涵¹⁾ 白佳瑶¹⁾ 张金玉¹⁾ 葛银林^{1)**}

(¹⁾ 青岛大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 青岛 266071; ²⁾ 青岛大学基础医学院免疫学系, 青岛 266071)

摘要 目的 研究连接适配体的 DNA-RNA 分子作为杂交载体靶向肿瘤细胞并导入功能性 RNA 分子进入细胞的有效性, 以及对肿瘤细胞的影响。方法 设计合成短的互补 DNA、RNA 分子, 组装成 DNA-RNA 杂合链; 连接 AS1411 适配体为靶向分子, 再分别连接 *p21* saRNA 和 *TIGIT* siRNA 作为药物分子, 记为 P21 saRNA 和 TIGIT siRNA, 构成杂交载体, 通用结构式为 AS1411-DNA/RNA-sxRNA; 检测 AS1411-DNA/RNA-sxRNA 能否靶向结合并进入肿瘤细胞及其对瘤细胞生存、迁移、侵袭和凋亡的影响。结果 将设计的杂交载体各部分等摩尔加入杂交缓冲体系并于特定温度条件下孵育, TBM 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测到 AS1411-DNA/RNA-sxRNA 成功组装; AS1411-DNA/RNA-sxRNA 杂交载体在 10% 血清条件下也显示出良好的抗降解稳定性; 荧光显微镜和激光共聚焦显微镜下观察, SKOV3 细胞表面及胞内存在绿色大量荧光信号, 杂交载体成功进入肿瘤细胞。杂交载体孵育后: 在 mRNA 水平上, *p21* 基因表达 (2.14 ± 0.25) 是对照组 (1.02 ± 0.10) 2 倍以上, $P < 0.05$; *TIGIT* 基因表达 (0.63 ± 0.09) 低于对照组 (1.09 ± 0.15), $P < 0.05$; 在蛋白质水平上, *p21* 基因表达 (1.57 ± 0.16) 是对照组 (1.10 ± 0.09) 1.5 倍以上, $P < 0.05$; *TIGIT* 基因表达 (0.61 ± 0.12) 低于对照组 (1.01 ± 0.07), $P < 0.05$ 。CCK-8 实验显示, P21 saRNA (3.10 ± 0.13) 和 TIGIT siRNA (2.91 ± 0.13) 杂交载体孵育组与空白对照组 (3.67 ± 0.15) 相比, 卵巢癌细胞增殖能力显著下降 ($P < 0.05$); 划痕实验结果显示, P21 saRNA 孵育组愈合率 (42.53 ± 2.90)%、TIGIT siRNA 孵育组愈合率 (36.23 ± 3.43)%, 明显低于空白对照组 (76.47 ± 3.64)%, $P < 0.05$; Transwell 检测迁移能力发现: P21 saRNA 孵育组 (128.25 ± 5.36)、TIGIT siRNA 孵育组 (119.50 ± 8.79) 低于对照组 (186.5 ± 8.56); 侵袭能力: P21 saRNA 孵育组 (145.5 ± 9.45)、TIGIT siRNA 孵育组 (112.25 ± 5.63) 也显著低于对照组 (202.50 ± 10.12), $P < 0.05$; 细胞凋亡率: P21 saRNA 孵育组 ($11.74\% \pm 2.47\%$)、TIGIT siRNA 孵育组 ($17.12\% \pm 2.04\%$) 明显高于对照组 ($5.66\% \pm 1.44\%$), $P < 0.05$ 。结论 所制备的 AS1411-DNA/RNA-sxRNA 杂交载体能够有效靶向肿瘤细胞, 携带功能性小 RNA 靶向导入肿瘤细胞并调控目的基因表达, 使肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力受到抑制; 该结果为利用 DNA-RNA 偶联 AS1411 适配体作为靶向工具的杂交载体, 靶向杀伤表面表达 NCL 蛋白的肿瘤细胞提供了实验基础。

关键词 DNA-RNA 杂交载体, AS1411 适配体, 小 RNA, 肿瘤

中图分类号 O647, Q67

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0278

肿瘤的发生和发展与肿瘤细胞介导的免疫抑制息息相关^[1-3], 人体的免疫系统具有免疫监视的功能, 通常能够识别、杀伤并及时清除体内突变细胞以维持机体的稳定, 防止肿瘤的发生和发展。然而, 肿瘤细胞常常可以逃避机体免疫系统的识别和攻击, 在体内迅速增殖和转移, 从而形成肿瘤^[4]。肿瘤的免疫逃逸机制中, 肿瘤细胞大量表达的免疫检查点, 如 PD-L1^[5]、CTLA-4^[6]、B7-H4^[7] 等蛋白质因子可直接抑制免疫系统应答或招募分泌免疫抑制因子的调节性 T 细胞, 造成免疫抑制。

TIGIT^[8] (T cell Ig and ITIM domain) 是脊髓

灰质炎病毒受体 (poliovirus receptor, PVR) / Nectin 家族成员, 是一种新发现的免疫检查点。它由细胞外免疫球蛋白可变区 (IgV) 结构域、I 型跨膜结构域、具有经典免疫受体酪氨酸抑制基序 (ITIM) 和免疫球蛋白酪氨酸尾 (ITT) 基序的细

* 山东省科技计划 (2014GGH218023), 山东省重点研发项目 (2017GSF218084) 和青岛市应用基础研究项目 (19-6-2-31-cg) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 13780659749, E-mail: geyinlin@126.com

收稿日期: 2022-06-15, 接受日期: 2022-10-28

胞内结构域组成。TIGIT可以抑制NK细胞效应,减少NK细胞对肿瘤的杀伤。通常,在长期炎症反应或慢性抗原的反复刺激下^[9-10],T细胞功能失调或衰竭并上调许多免疫抑制性受体(IRs),包括程序性细胞死亡受体1(PD-1)和带有免疫球蛋白和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT),肿瘤细胞和抗原呈递细胞(APCs)在肿瘤微环境(TME)中表达IR配体,从而使肿瘤细胞具备了逃避免疫监视的能力。因此,若能有效降低肿瘤细胞TIGIT蛋白的表达,将有效降低肿瘤细胞的免疫耐受。*p21*基因是一种抑癌基因^[11],是细胞周期依赖性激酶抑制剂家族中的主要成员之一,*p21*受抑癌基因*p53*调控^[12],在抑制肿瘤发生中起调节作用;*p21*基因在肿瘤细胞内表达常维持在极低的水平^[13],可抑制肿瘤细胞的生长并诱导其凋亡,有效削弱肿瘤细胞的侵袭和迁移能力。此外,*p21*基因参与T细胞活化^[14]和先天性免疫反应的激活,并提高免疫系统对肿瘤细胞的有效杀伤。因此,若能有效促进肿瘤细胞的*p21*基因表达或抑制TIGIT基因的表达,便可抑制肿瘤的发生发展。近年来,核酸药物治疗发展迅速,核酸药物以其用量小、效率高、毒性低的优点备受青睐,这其中如小干扰RNA(siRNA)、小激活RNA(saRNA)、mRNA等^[15-19]是最常用的核酸药物。

然而,核酸药物的发展受到递送系统的严重限制^[20]。常用的RNA递送系统^[21]如脂质体、阳离子聚合物、可变电荷纳米聚合物和病毒载体等都存在细胞毒性大、无靶向性和生物安全性等问题。因此,若能构建一种低毒性高靶向性安全高效的RNA递送系统,将对核酸药物的发展提供新的思路。DNA/RNA杂交双链可以抵抗核酸酶降解,比较稳定,且对细胞无毒性。核酸适配体作为一种寡核苷酸分子^[22-26],具有复杂的二级结构,其性质类似抗体蛋白,可特异性结合靶标分子,被广泛应用于诊断、纳米探针、食品检测和药物开发等领域。核酸适配体较小,靶向性高,因此若能将适配体与RNA相连,并辅以适当的化学保护,即可实现小RNA药物的靶向递送。1999年,Bates等^[27]在研究G-四链体结构适配体GRO29A时发现,部分肿瘤细胞开始出现了凋亡现象,这种适配体经改进成为了今天的AS1411核酸适配体。AS1411适配体是一种G-四链体结构适配体,其靶蛋白是肿瘤细胞表面的核仁素(nucleolin, NCL),作为一种肿瘤细胞表面跨膜蛋白,核仁素每隔数小时将会内吞入

细胞,基于这一特性,AS1411核酸适配体被广泛应用于靶向药物的制备和靶向载体的构建。近年来,AS1411核酸适配体应用发展迅速,常常作为靶向递送工具适配体使用,Khatami等^[28]开发了一种新型靶向递送系统,将AS1411作为靶向分子,阿霉素(doxorubicin, DOX)结合到介孔二氧化硅纳米粒子(MSN)中,并应用壳聚糖覆盖MSN的表面,制备纳米复合物实现miR-21的靶向递送。Carvalho等^[29]用AS1411适配体优化了传统的脂质体递送系统,合成AS1411适配体修饰的脂质体递送系统,能够在含有Mg²⁺的溶液中形成纳米聚集体,应用于宫颈癌的治疗。此外,AS1411核酸适配体作为纳米探针被广泛使用,用于胶质瘤细胞的稳定检测^[30]和NCL蛋白的超分辨率纳米成像^[31]。

因此,本研究采用G-四链体结构核酸适配体AS1411作为靶向分子,通过DNA/RNA杂交双链连接小RNA药物*p21* saRNA和TIGIT siRNA,在特定缓冲体系的辅助下,组装构建成AS1411-DNA/RNA-sxRNA杂交载体,使之同时具靶向性和药物功能,并研究杂交载体的小RNA药物靶向递送和抗肿瘤效果。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

SKOV3人卵巢癌细胞由本实验室保存;氟代修饰RNA、siRNA、saRNA和AS1411适配体由生工生物(上海)股份有限公司合成提供;Trizol、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;Monarch RNA Cleanup Kit购自NEB公司;Tris-Glycine电泳液、电转液购自武汉赛维尔生物科技有限公司;DMEM(高糖)培养基购自上海逍鹏生物科技有限公司;1.5 mol/L Tris-HCl (pH=8.8), 1 mol/L Tris-HCl (pH=6.8), 10% SDS溶液购自北京索莱宝科技有限公司;5×TBM缓冲液(5.4 g Tris, 2.75 g 硼酸, 0.22 g 四水合乙酸镁加水定容至100 ml)(国药集团化学试剂有限公司);胰酶EDTA消化液(国药集团化学试剂有限公司);青链霉素混合液(100×)(国药集团化学试剂有限公司);PVDF膜Millipore 0.45 μm购自上海逍鹏生物科技有限公司;抗荧光猝灭封片剂、羊抗小鼠-HRP标记二抗、羊抗兔-HRP标记二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Anti-P21和anti-TIGIT均购自武汉艾博泰克生物科技有限公司。

1.2 AS1411-DNA-RNA-sxRNA纳米载体的制备

1.2.1 AS1411-DNA-RNA-sxRNA纳米载体的组装设计并合成目的序列, 将所需序列合成并添加

CTP、UTP 氟代化学修饰 (图 1), 单链 DNA 模板及单链硫代修饰 DNA 由生工生物 (上海) 股份有限公司提供, RNA 及 DNA 序列如表 1 所示。

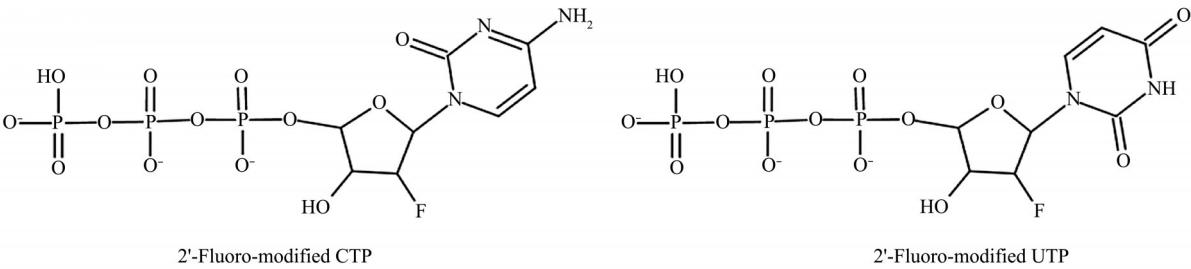


Fig. 1 Chemical formulas of 2'-fluoro-modified CTP and UTP in DNA-RNA hybrid nanocarriers

Table 1 Components and sequences of AS1411-DNA/RNA-sxRNA hybrid nanocarriers

Component	Sequence
AS1411-b	5'-GGATCAATCATGGCAAGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3'
NC-b (2'-F RNA)	5'-GGATCAATCATGG -3'
P21-a (2'-F RNA)	5'-fUfUGfCfCAfUfUGAfUfCfCAAfUfAfcfUfUGGAGAAfUGAGfUfUGGfUfU-3'
P21-c (2'-F RNA)	5'-GGGAAfCfCAAfCfUfCAfUfUfCfUfCfCAAGfUfAfuU-3'
TIGIT-a (2'-F RNA)	5'-fUfUGfCfCAfUGAfuUfUGAfuUfCfCAAAGfCfUGfCAfUGAfCfUfAfcfUfUfCAAfUGfUfU-3'
TIGIT-c (2'-F RNA)	5'-fCAfUfUGAAGfUAGfUfCAfUGfCAGfCfUfUfU-3'
NC-a (2'-F RNA)	5'-fUfUGfCfCAfUGAfuUfUGAfuUfCfCfUfUfCfUfCfCGAAfCGfUGfUfCAfCGfUfUfU-3'
NC-c (2'-F RNA)	5'-AfCGfUGAfCAfCGfUfUfCGGAGAAfUfU-3'

All fluorinated ribonucleotides are prefixed with f in front of their bases.

将b链与相应的a、c链等摩尔混合, 加入等体积MgCl₂杂交缓冲液 (2×PBS, 2 mmol/L MgCl₂), 于热循环仪加热 80℃ 3 min、50℃ 5 min、25℃ 15 min、4℃ 20 min, 完成DNA-RNA杂交载体的制备, 制备好的杂交载体可存于4℃低温环境备用。

1.2.2 AS1411-DNA-RNA-sxRNA纳米载体的组装分析

以携带P21 saRNA的杂交载体 (记为P21 saRNA) 为例, 携带TIGIT siRNA的杂交载体 (记

为TIGIT siRNA) 组装步骤相同。按照各组分两两排列组合进行分组, 最后一组为三组分等摩尔加入反应体系, 分别如下: P21-a (a)、AS1411-b (b)、P21-c (c)、P21-a+P21-c (ac)、P21-a+AS1411-b (ab)、AS1411-b+P21-c (bc)、P21-a+AS1411-b+P21-c (abc), TIGIT siRNA 和 AS1411-NC 杂交载体用同样的方法检测组装。按杂交步骤于热循环仪上反应, 反应后在每个体系内加入适量DNA/RNA上样缓冲液。其中, 各组分体积见表2。由于DNA-RNA杂交链的观察在特定缓冲体系下更为明

Table 2 Consumption of each component of DNA RNA hybrid nanocarriers

ssDNA/ssRNA	a/μl	b/μl	c/μl	ac/μl	ab/μl	bc/μl	abc/μl
P21/TIGIT-a (20 μmol/L)	5			5	5		5
AS1411-b		10			10	10	10
P21/TIGIT-c (20 μmol/L)			5	5		5	5
Hybridization buffer	5	10	5	10	15	15	20
RNA/RNA loading buffer	2	4	2	4	6	6	8
Total volume	12	24	12	24	36	36	48
Loading volume	6	12	6	12	18	18	24

a, P21/TIGIT-a; b, AS1411-b; c, P21/TIGIT-c.

显, 因此须配制8% TBM 聚丙烯酰胺凝胶并使用TBM电泳缓冲液(1×)进行电泳。凝胶配方见表3, 并在100 V恒压条件下电泳, 电泳完成后取下凝胶, 置于加入适量溴化乙锭的TBM电泳液中染色, 拍照、记录组装情况。

Table 3 Components of 8% TBM polyacrylamide gel

Component	Volume
40% Acrylamide (19 : 1)	2.4 ml
5×TBM buffer	1.2 ml
RNase-free ddH ₂ O	4.8 ml
10% Ammonium persulfate	5 μl
TEMED	5 μl

1.2.3 AS1411-DNA-RNA-sxRNA纳米载体的血清稳定性测试

制备1 nmol左右的AS1411-DNA-RNA-sxRNA杂交载体, 加入至含10 %胎牛血清的完全培养基, 37 °C 恒温孵育, 并在0、1、2、4、8、12、24、48、72、96 h取样, 每次取到的样品立即加入DNA或RNA上样缓冲液并冻存于-80°C超低温冰箱中进行TBM 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 观察, 拍照记录。

1.3 分析AS1411-DNA-RNA-sxRNA纳米载体进入细胞效果

1.3.1 显微镜检测纳米载体入胞情况

人卵巢癌SKOV3细胞正常培养, 随后接种于24孔板中(约 1×10^5 个细胞/孔)。用加FAM标记的P21-c (2'-F RNA)或TIGIT-c (2'-F RNA)替换不加荧光标记的RNA单链, 组装DNA-RNA杂交载体。加入培养板内至终浓度为1 μmol/L, 恒温培养48 h, 用PBS缓冲液反复漂洗3次, 并使用DAPI染色液对细胞核进行荧光染色, 使用荧光正置显微镜和激光共聚焦显微镜观察拍照。

1.3.2 CCK-8检测纳米载体对细胞生存率的影响

取状态良好的人卵巢癌SKOV3细胞, 将其接种于4个96孔细胞培养板过夜培养。实验组接种P21 saRNA、TIGIT siRNA杂交载体, 转染试剂实验组转染p21 siRNA、TIGIT saRNA(记为TF-P21和TF-TIGIT); 阴性对照组接种NC杂交载体(图2b)、含AS1411适配体和对照小RNA的杂交载体(记为AS1411-NC, 图2c); 转染试剂对照组转染空白小RNA(记为TF-NC); 其中转染试剂组在转染12 h后进行换液处理。按照0、24、48和72 h的时间梯度每隔24 h取出一块96孔细胞培养板。每

孔加入10 μl CCK-8溶液, 轻轻摇晃混匀, 并于恒温CO₂培养箱37°C孵育1 h; 使用酶标仪测定450 nm处的吸光度值, 记录数据并进行统计分析。

1.3.3 实时荧光定量PCR检测P21、TIGIT mRNA水平

SKOV3细胞接种于6孔细胞培养板过夜培养, 当细胞状态良好, 细胞汇合度为30%~40%时, 用AS1411-DNA-RNA-sxRNA杂交载体孵育细胞。按照实验组孵育P21 saRNA、TIGIT siRNA杂交载体(终浓度为1 μmol/L), 阴性对照组孵育NC杂交载体(终浓度为1 μmol/L)和AS1411-NC杂交载体, 空白对照组加入正常培养基, 孵育时间为48 h。随后将细胞取出培养箱并用PBS冲洗细胞, 每孔加入1 ml Trizol 裂解液裂解细胞, 进行细胞总RNA的提取。提取完成后, 测定提取总RNA浓度, 再进行反转录PCR和实时荧光定量PCR, 检测接种P21 saRNA及TIGIT siRNA纳米载体后目的基因的mRNA水平变化。

1.3.4 蛋白质印迹法(Western blot)检测P21、TIGIT蛋白变化

SKOV3细胞接种于6孔细胞培养板(密度为 2×10^5 /孔)后过夜培养, 按照实验组孵育组装好的P21 saRNA、TIGIT siRNA杂交载体(终浓度为1 μmol/L), 阴性对照组孵育NC杂交载体(终浓度为1 μmol/L), 空白对照组加入正常培养基, 孵育48 h后更换含杂交载体的培养基继续孵育24 h。用PBS缓冲液清洗细胞, RIPA组织细胞裂解液提取细胞总蛋白质。使用BCA法测定蛋白质浓度, 等浓度上样至各个细胞培养孔, 上样量为15~20 μl/孔, 电泳、电转后用5% BSA封闭液封闭2~4 h, 用TBST震荡冲洗PVDF膜, 孵育β-actin/P21/TIGIT蛋白一抗过夜, TBST冲洗后孵育二抗1 h, TBST再次冲洗膜后, 避光配制ECL发光液, 于显影仪上显影并记录。

1.3.5 划痕实验检测SKOV3细胞的迁移能力

在6孔板背部, 使用直尺和黑色记号笔均匀划线, 横穿过孔, 板内每孔5条直线, 并接种适量细胞。实验分为空白对照组、阴性对照组和实验组。实验组接种P21 saRNA、TIGIT siRNA杂交载体(终浓度均为1 μmol/L), 阴性对照组孵育NC杂交载体(图2b)和AS1411-NC杂交载体(图2c), 空白对照组正常培养。孵育48 h后, 更换含杂交载体的培养基继续孵育24 h。用10 μl移液器吸头使用直尺垂直于背后的横线划痕, 用PBS缓冲液冲洗细

胞3次,充分洗去划下的细胞,加入无血清DMEM培养基,并放入恒温CO₂培养箱37℃条件下培养,按照划线后0、24、48 h的时间顺序拍照记录,用Image J测定细胞的划痕愈合率。

1.3.6 Transwell检测细胞侵袭能力

首先,提前1 d对Transwell小室进行准备工作,在检测卵巢癌SKOV3细胞的侵袭能力时须使用基质胶。将基质胶均匀铺在Transwell小室上室中,35 μl/孔。将铺好基质胶的Transwell小室放在37℃恒温CO₂培养箱中过夜培养;次日使用前水化基质胶,操作步骤为每孔加入60 μl无血清培养基,培养箱培养40 min;当检测卵巢癌SKOV3细胞的迁移能力时,不使用基质胶。

接种细胞到6孔板,将细胞分为空白对照组、阴性对照组和实验组。实验组接种P21 saRNA、TIGIT siRNA杂交载体,阴性对照组孵育NC杂交载体(图2b)和AS1411-NC杂交载体(图2c),空白对照组正常培养。处理48 h后,更换含杂交载体的培养基继续孵育24 h。孵育完成后,用DMEM无血清培养基饥饿处理12 h;向Transwell小室上室中加入200 μl细胞悬液,下室中加入600 μl含10%胎牛血清的DMEM培养基,其中,检测肿瘤细胞的迁移能力在培养箱中培养4 h,检测肿瘤细胞的侵袭能力在培养箱中培养24 h;恒温培养后PBS清洗3次上室;甲醇固定20 min,0.1%结晶紫染色15 min,PBS清洗残留结晶紫,晾干;随机选取5个低倍镜(100×),在显微镜下进行细胞计数。

1.3.7 流式细胞仪检测细胞的凋亡

将细胞接种至6孔板,分为空白对照组和实验组。实验组接种P21 saRNA、TIGIT siRNA杂交载体,阴性对照组孵育NC杂交载体(图2b),空白对照组正常培养。孵育48 h后更换含杂交载体的培养基继续培养24 h。随后按照细胞凋亡检测试剂盒说明书进行流式细胞术实验,并记录实验数据。

1.4 统计学方法

采用GraphPad Prism v5.01 软件(La Jolla, CA, USA)进行分析作图,采用SPSS 12.0软件进行统计分析,数据均以独立3次重复实验的平均值±标准误(SEM)表示。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验均值的意义。两组间比较采用独立样本*t*检验和相关分析。假设检验水准按α=0.05判定,*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AS1411-DNA-RNA-sxRNA 杂交载体 组装成功

以组装P21 saRNA杂交载体为例,分别将DNA单链和两条RNA单链,记为b链及a、c链,等摩尔加入同一体系内,与等体积杂交缓冲液混合,孵育,然后进行TBM凝胶电泳(图2d)。图2a为AS1411-DNA-RNA-sxRNA杂交载体的完整结构,图2b为去掉AS1411适配体后阴性对照NC杂交载体的结构,图2c为携带阴性对照小RNA的DNA-RNA杂交载体。TBM凝胶电泳(图2d)从左至右为50 bp DNA ladder、AS1411-b、P21-a、

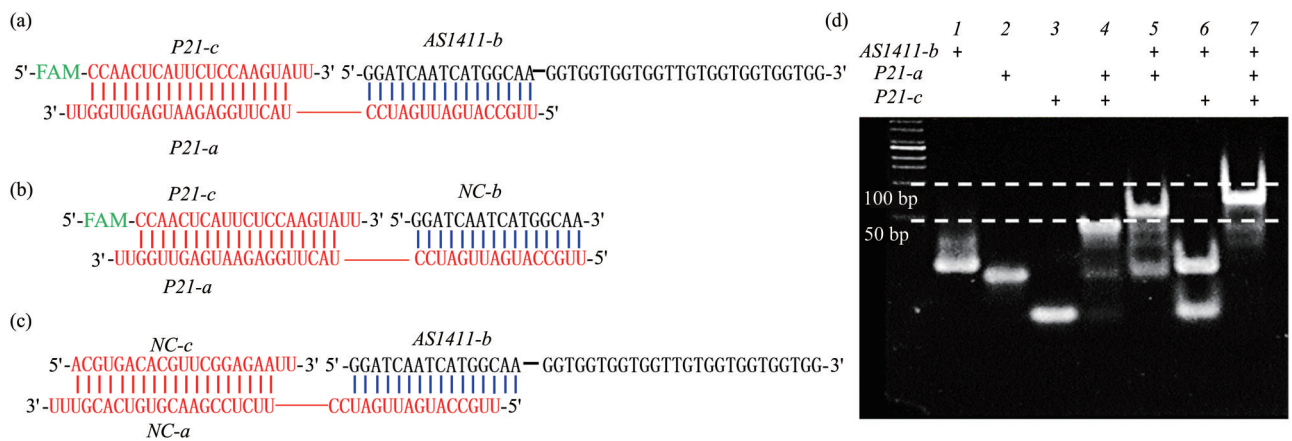


Fig. 2 Structure and assembly of DNA-RNA hybrid nanocarriers

(a) Taking P21 saRNA nanocarriers as an example, the structure of the entire hybrid nanocarrier, in which the black is DNA, the red is RNA, and the 5' end of the RNA short chain has FAM green fluorescent label. (b) The structure of NC DNA-RNA hybrid nanocarriers without ASI411 aptamer. (c) The structure of ASI411-NC DNA-RNA hybrid nanocarriers. (d) TBM polyacrylamide gel electrophoresis to test the assembly of DNA-RNA hybrid nanocarriers, it can be found that the three chains successfully assembled together in equimolar.

P21-c、P21-a+P21-c、P21-a+AS1411-b、AS1411-b+P21-c、P21-a+AS1411-b+P21-c, 结果说明 AS1411-DNA-RNA-sxRNA 杂交载体的组装成功。

2.2 AS1411-DNA-RNA-sxRNA 杂交载体可抵抗核酸酶的降解

裸核酸常受到核酸酶的降解, 其抗降解能力非常弱。因此, 本研究通过将 RNA 中的 CTP 和 UTP 进行 2'-F 修饰, 并对 DNA 链的 ATP 进行硫代修饰, 以提升裸核酸的抗降解能力。以 P21 saRNA 杂交载体为例, 取等摩尔的 AS1411-b、P21-a、P21-c, 并组装 1 nmol 的杂交载体, 向体系内添加胎牛血清至 10%, 37°C 恒温水浴, 按时间段分别取样并 -80°C 低温保存, 统一进行 TBM 凝胶电泳。结果显示, 在不同时间, DNA-RNA 杂交载体在血清中出现降解, 48 h 后杂交载体仍然稳定存在, 在 72 h 后开始出现明显降解, 杂交载体在凝胶中正确的位置仍存在清晰的条带, DNA-RNA 杂交载体具备优良的抗降解能力 (图 3)。

2.3 AS1411-DNA-RNA-sxRNA 杂交载体能靶向肿瘤细胞

为检测 AS1411-DNA-RNA-sxRNA 杂交载体是否能够靶向结合肿瘤细胞, 在杂交载体上添加了 FAM 绿色荧光标记 (标记位置见图 2), 随后将组装好的荧光标记杂交载体与 SKOV3 细胞共培养 48 h。可以发现, 杂交载体孵育后, 携带 AS1411 核酸适配体的杂交载体 P21 saRNA 成功结合卵巢癌 SKOV3 细胞, 细胞内外出现大量绿色荧光信号, 阴性对照杂交载体 NC 未能结合 SKOV3 细胞 (图 4)。激光共聚焦显微镜照片 (图 5) 显示, 细胞表

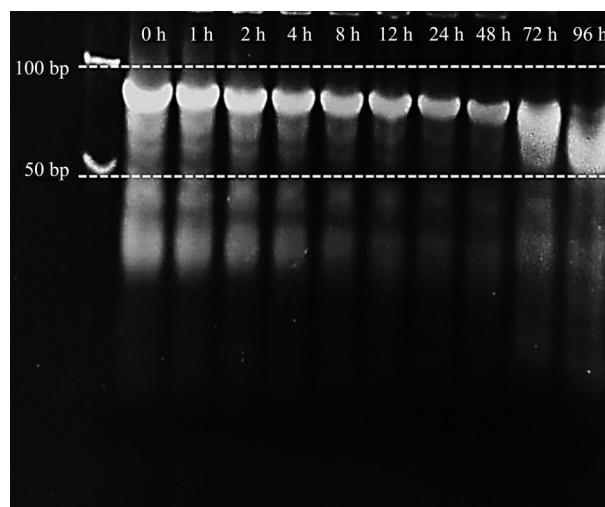


Fig. 3 Serum stability of DNA-RNA hybrid nanocarriers

By sampling in the time gradient, it was found that after 2'-F modification, a large number of hybrid structures still existed in the DNA-RNA hybrid nanocarriers, which showed excellent serum stability.

面及内部都出现了明显的绿色荧光, 对照组为不携带 AS1411 适配体的小 RNA, 细胞表面及其内部均无明显绿色荧光。

这一结果说明, AS1411-DNA-RNA-sxRNA 杂交载体存在靶向性, 杂交载体可与肿瘤细胞表面的 NCL 蛋白结合, 在细胞内吞作用下将 NCL 蛋白及其表面吸附的 DNA-RNA 杂交载体成功摄入。这一过程中, AS1411 适配体作为靶向工具将小 RNA 药物带入细胞, 随后与之相连的小 RNA 药物将与目的基因相互作用, 使肿瘤细胞的 *p21* 和 *TIGIT* 基因的表达得到调控。

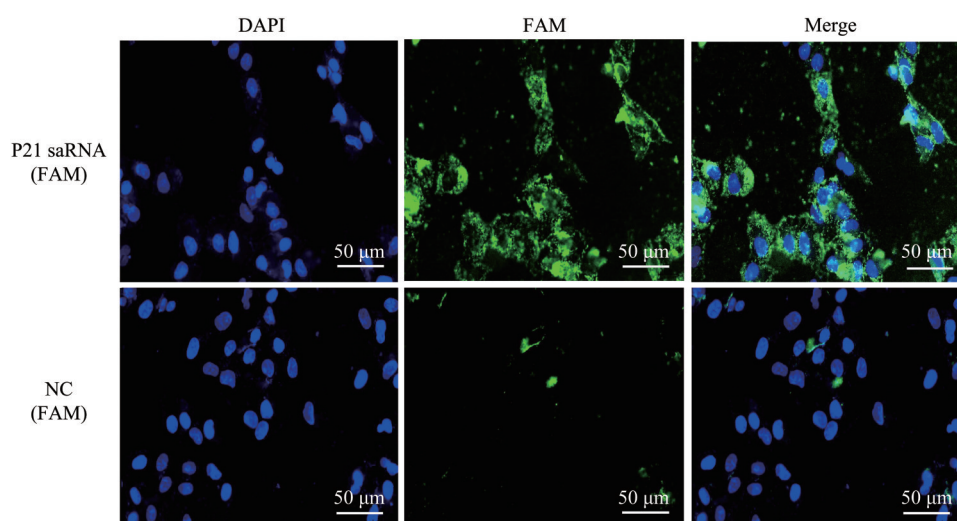


Fig. 4 Fluorescence microscopy verified that aptamers successfully bound and entered the cells

P21 saRNA: the cell bound P21 saRNA nanocarrier with FAM fluorescent label; NC: the cell bound P21 saRNA nanocarrier without aptamer.

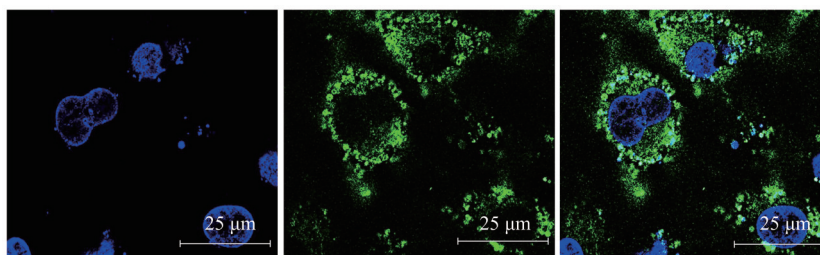


Fig. 5 Confocal laser microscopy verified that aptamers successfully bound and entered the cells

The green fluorescence is the DNA-RNA hybrid nanocarrier, and the blue fluorescence is the nucleus. It can be seen that the green fluorescence is evenly distributed around the nucleus and inside the cell, which proves that the hybrid nanocarrier can enter the cell.

2.4 AS1411-DNA-RNA-sxRNA细胞毒性低于转染试剂

相较于传统转染试剂存在较为严重的细胞毒性, AS1411-DNA-RNA-sxRNA杂交载体可有效避免转染试剂所带来的细胞毒性。由于大量的AS1411适配体会促进癌细胞的凋亡, 因此对于以AS1411适配体作为靶向载体的方案需要对其细胞毒性进行准确的评估。实验分为实验组和对照组。空白对照组为正常培养的SKOV3细胞, 阴性对照组为不含AS1411适配体的杂交载体(记为NC, 结构见图2b); 实验组为使用转染试剂转染 *p21* saRNA和 *TIGIT* siRNA的细胞, 记为TF-P21和

TF-TIGIT, 孵育携带P21 saRNA和TIGIT siRNA杂交载体的细胞记为P21 saRNA和TIGIT siRNA, 携带阴性对照小RNA的记为AS1411-NC(结构见图2c)。实验结果发现, DNA-RNA杂交载体在细胞毒性方面要优于传统转染试剂(图6a), AS1411-NC的细胞活力远大于TF-NC, 差异具统计学意义($P<0.05$)。同样, AS1411-DNA-RNA-sxRNA杂交载体孵育后SKOV3细胞的细胞活力下降(图6b), 孵育P21 saRNA和TIGIT siRNA后细胞活力相较于对照组下降显著, 差异具统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。

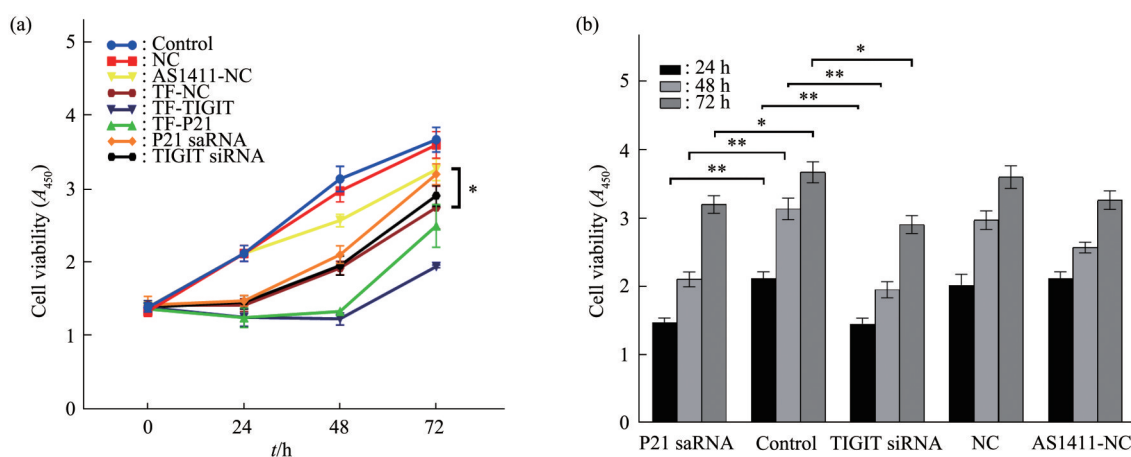


Fig. 6 CCK-8 detects the cytotoxicity of DNA-RNA hybrid nanocarriers

(a) Cell viability after using transfection reagent and hybrid nanocarriers. It can be found that the DNA-RNA hybrid nanocarrier has lower cytotoxicity than the traditional transfection reagent, and the A_{450} is significantly higher than that of the transfection reagent group, and the difference is statistically significant ($*P<0.05$). (b) After incubation with P21 saRNA and TIGIT siRNA, the cell viability decreased significantly compared with the control group at 24, 48, and 72 h, and the difference was statistically significant ($*P<0.05$, $**P<0.01$).

2.5 AS1411-DNA-RNA-sxRNA有效调控靶基因的转录

实时荧光定量PCR的结果显示,在mRNA水

平上,P21 saRNA有效升高了*p21*基因的表达,TIGIT siRNA有效降低了*TIGIT*基因的表达(图7),差异呈统计学意义(* $P<0.05$,** $P<0.01$)。

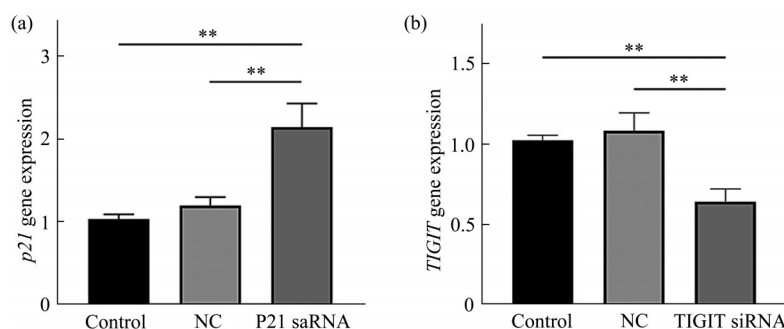


Fig. 7 Relative levels of *p21* mRNA and *TIGIT* mRNA after hybrid nanocarrier treatment

(a) The expression level of *p21* mRNA was significantly up-regulated in P21 saRNA treatment group; (b) The expression level of *TIGIT* mRNA was significantly down-regulated after TIGIT siRNA treatment.

2.6 AS1411-DNA-RNA-sxRNA有效调控靶蛋白的蛋白质表达

从P21 saRNA/TIGIT siRNA杂交载体孵育的细胞中提取总蛋白质。Western blot结果显示,P21 saRNA组与对照组相比,P21条带(18 ku左右)

灰度明显增加,TIGIT siRNA组与对照组相比,TIGIT条带(30 ku左右)明显变浅,符合预期(图8)。3次重复实验灰度值分析,具有统计学意义(* $P<0.05$,** $P<0.01$)。

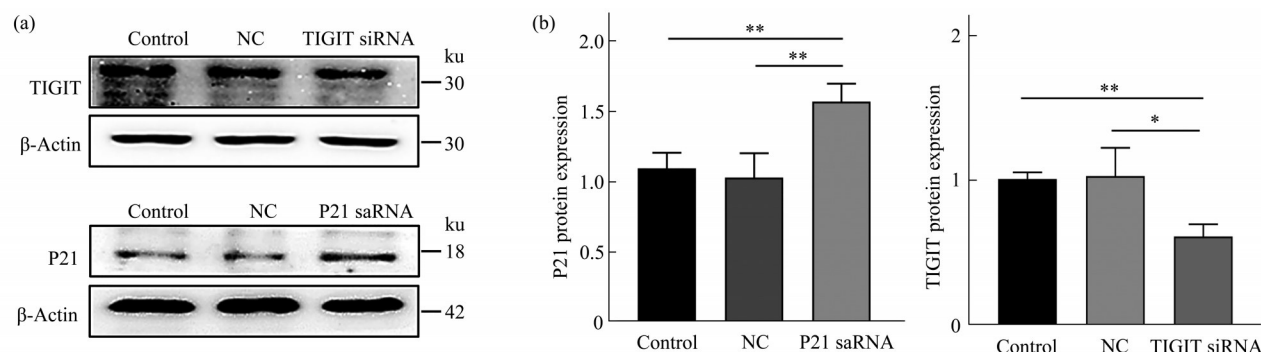


Fig. 8 Expression of P21 and TIGIT in tumor cells after treating with AS1411-DNA-RNA-sxRNA nanocarriers

(a) Western blot results of P21 and TIGIT in SKOV3 cells treated with AS1411-DNA-RNA-sxRNA nanocarrier. The expression of P21 was significantly up-regulated and TIGIT was down-regulated in the experimental group. (b) The gray value analysis of Western blot results in SKOV3 cells treated with hybrid nanocarrier, which showed that the expression of P21 was significantly increased(** $P<0.01$), and TIGIT was significantly decreased(* $P<0.05$,** $P<0.01$).

2.7 AS1411-DNA-RNA-sxRNA抑制肿瘤细胞的迁移能力

通过划痕实验检测孵育P21 saRNA和TIGIT siRNA后,细胞的迁移能力变化,划痕实验结果见图9a。P21 saRNA组和TIGIT siRNA组在24 h及48 h对SKOV3细胞的迁移能力影响显著,划痕愈

合速度明显低于对照组,其划痕闭合率如图9b所示,计算公式如下,差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。

$$\text{划痕闭合率} = [(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}) / A_{t=0h}] \times 100\%$$

$A_{t=0h}$: 划痕0 h后测量的闭合面积

$A_{t=\Delta h}$: 划痕 h 小时后测量的闭合面积

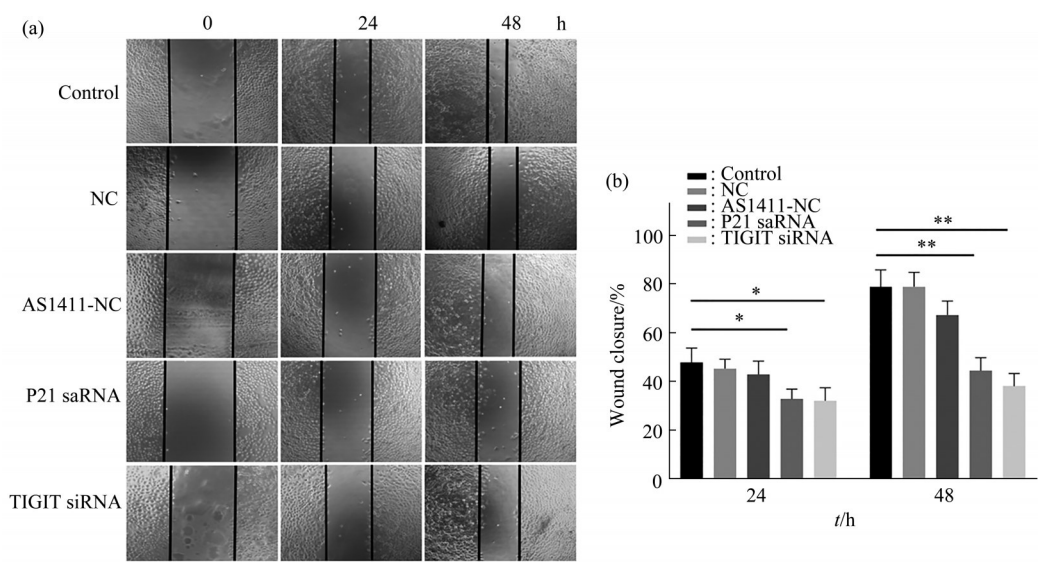


Fig. 9 Scratch assay to detect cell migration ability

(a) The migration ability of cells after treating with P21 saRNA and TIGIT siRNA. (b) The migration ability of cells treated with P21 saRNA or TIGIT siRNA was significantly decreased compared with the control group, and the difference was statistically significant (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

2.8 AS1411-DNA-RNA-sxRNA抑制肿瘤细胞的侵袭能力

通过Transwell实验检测孵育杂交载体后的细胞迁移与侵袭能力。实验分为实验组和对照组，对照组为正常培养的SKOV3细胞、孵育NC杂交载体

体的细胞，实验组为孵育P21 saRNA和TIGIT siRNA杂交载体的SKOV3细胞。随机选取5个低倍镜（100×），在显微镜下进行细胞计数的细胞数目并进行统计学分析（图10）。可以发现，使用P21 saRNA和TIGIT siRNA杂交载体分别孵育细

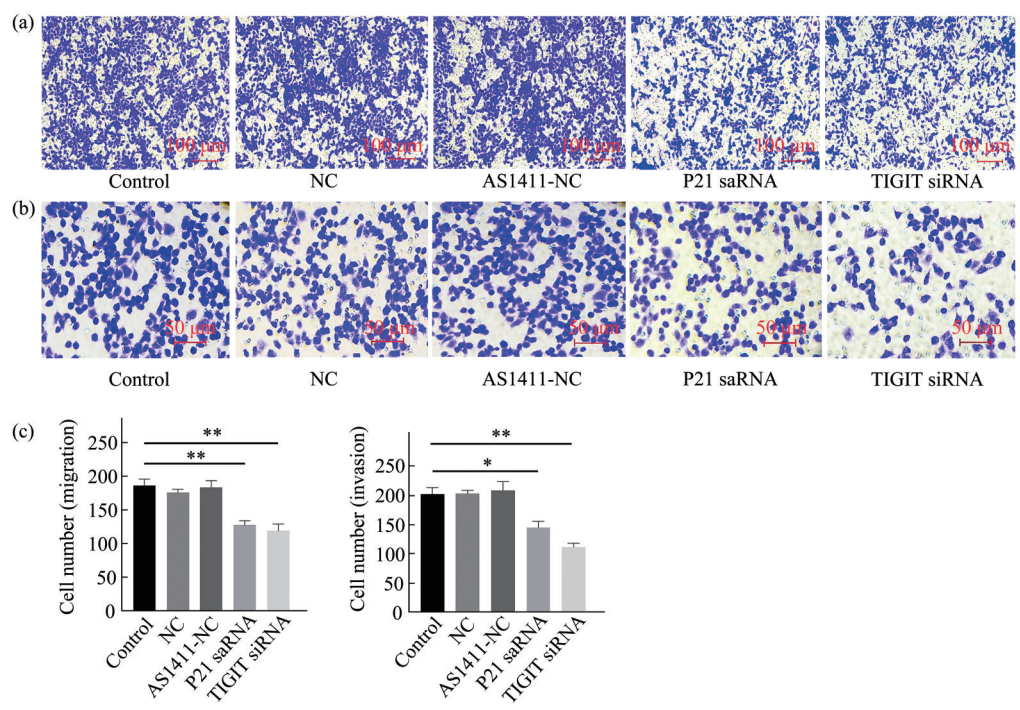


Fig. 10 Analysis of migration and invasion ability of cells by Transwell

(a) Cell invasion ability after treating with AS1411-DNA-RNA-sxRNA. (b) Cell migration ability after treating with AS1411-DNA-RNA-sxRNA. (c) Analysis of Transwell assay results, the tumor cells treated with P21 saRNA and TIGIT siRNA significantly decreased their ability to invade and migrate, among which TIGIT siRNA had a more significant effect (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

胞, 肿瘤细胞的侵袭 (图 10a) 和迁移能力 (图 10b) 显著下降, SKOV3 细胞穿过小室的数量明显减少, 差异具统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.9 AS1411-DNA-RNA-sxRNA 促进肿瘤细胞凋亡

将 AS1411-DNA-RNA-sxRNA 杂交载体和人卵巢癌 SKOV3 细胞共培养后, 对 SKOV3 细胞的凋亡

率进行流式细胞仪检测。结果发现, P21 saRNA 和 TIGIT siRNA 处理后肿瘤细胞的凋亡率显著上升 (图 11), 与空白对照组相比, 差异呈现统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中 TIGIT siRNA 处理肿瘤细胞的细胞凋亡率大于 P21 saRNA 处理后肿瘤细胞的凋亡率。

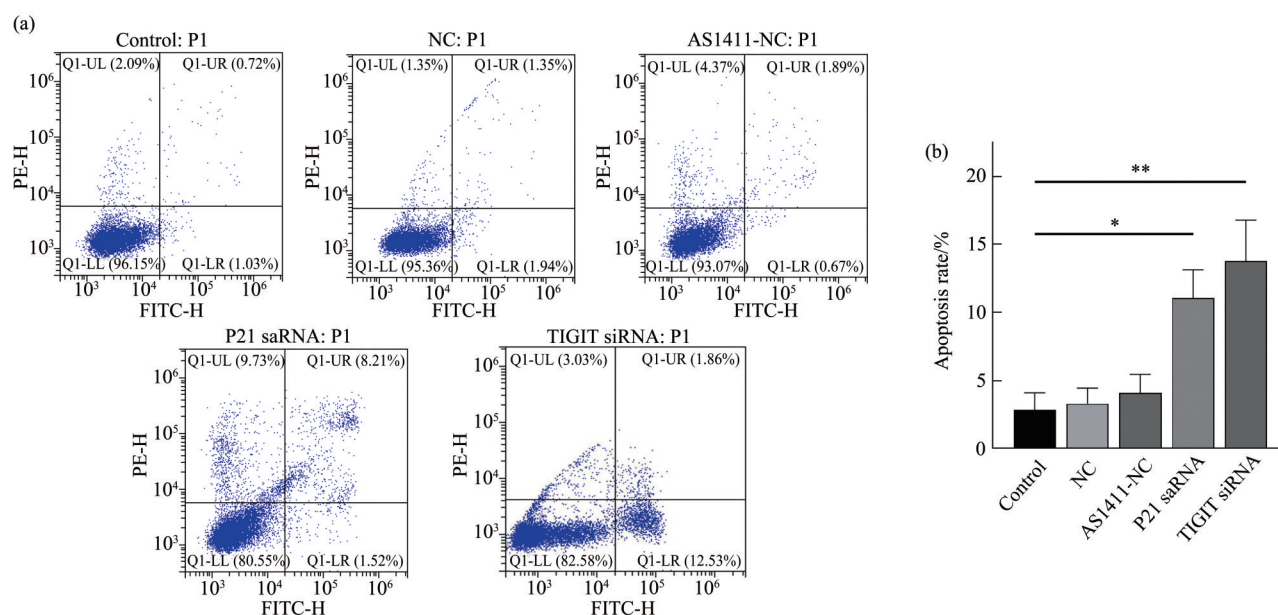


Fig. 11 The apoptosis rate of tumor cell was detected by flow cytometry after treating with AS1411-DNA-RNA-sxRNA

(a) The cell apoptosis rate of each group. (b) The statistical analysis of the apoptosis rate, the apoptosis rate of the P21-saRNA or TIGIT-siRNA group increased significantly, and the difference was statistically significant (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

3 讨 论

根据世界卫生组织国际癌症研究机构 (IARC) 发布的 2020 年全球癌症统计数据显示, 卵巢癌发病人数高达 31 万, 死亡人数高达 21 万。其中, 卵巢癌在女性总癌症发病率中占 5%, 为一种严重危害女性生命健康的癌症。卵巢癌的发展过程是一个复杂而多阶段的过程, 与重要基因改变的长期积累有着紧密的联系。抑癌基因的表达抑制及肿瘤免疫逃逸会使肿瘤的发生发展极为迅速, 常见肿瘤免疫抑制因子如 PD-L1、B7-H4、CTLA-4 等则会使肿瘤细胞免受免疫系统的攻击。

核酸既是遗传信息的储存者又是遗传信息的传递者, 其在生命活动中起着不可或缺的作用。肿瘤细胞的发生发展都与基因密码或基因表达的异常有关。因此, 从基因水平对基因的表达加以控制是治疗肿瘤的有效策略, 尤其是控制 mRNA 的水平。

控制 mRNA 的生成或降解, 利用双链小 RNA 如 saRNA 和 siRNA 是理想的方法。但是小 RNA 没有靶向性、易受核酸酶的降解且不易进入细胞内。如何克服上述问题将小 RNA 递送到细胞内, 是 RNA 药物研发的核心问题。现有的递送系统如脂质体载体、化学偶联载体、可变电荷转运体、脂质多聚复合物、聚合物纳米颗粒等, 虽成功将小 RNA 药物递送进入细胞, 但都存在一些缺陷, 如无靶向性、细胞毒性大、免疫原性高、转染效率差等, 这就需要研发一个低毒靶向高效的 RNA 递送系统。因此, 若能设计一种靶向肿瘤细胞而对正常细胞无害的递送载体, 对于癌症的治疗将有极大的临床意义。

核酸-配体结合物的裸核酸递送系统^[32-33], 是一种全新的递送系统研发思路, 这一递送系统常通过化学合成技术将小 RNA 药物与部分小分子化合物共价结合, 以赋予小 RNA 药物对于特定细胞或分子的靶向性, 这些化合物常为寡糖^[34]、叶酸等

低毒性小分子有机物并与细胞膜存在极高的亲和性, 部分化学配体如叶酸等^[35], 本就为细胞表面受体的配体分子。这些递送系统具有效果优良、细胞毒性低、靶向性强等优势。然而, 这些递送系统同样存在极高的化工技术难度、RNA与配体的共价结合效率差、纯化效率低等问题, 需要进行多次合成、纯化, 合成成本高昂。为解决这一问题, 本研究用核酸适配体替代化学配体分子, 用DNA-RNA杂交技术将配体分子与小RNA药物相连接, 降低技术难度和成本, 为裸核酸递送提供成本更低廉、操作更简便的方案。

核酸适配体作为靶向配体, 其优点是核酸适配体分子小、免疫原性低和可透过血脑屏障。其中, G-四链体结构核酸适配体具有广泛的应用优势。G-四链体主要由鸟嘌呤之间形成氢键, 组成一个稳定的立体结构^[36], 例如AS1411适配体^[31, 37]。AS1411对肿瘤细胞具有明显的靶向性, 其靶蛋白为肿瘤细胞表面核仁蛋白。本研究参考GalNAc^[38-39]技术中的4个组成要素——配体分子、连接臂、效应RNA和保护基团, 在此基础上创新, 替换化学配体分子为更廉价的核酸适配体, 并使用杂交双链连接小RNA药物, 设计了由AS1411适配体(工具配体)、DNA-RNA杂交链(连接臂)、3,5-磷酸二酯键连接的RNA(小RNA药物)和2'-F化学修饰保护4个部分组成的DNA-RNA杂交载体——AS1411-DNA-RNA-sxRNA杂交载体。

DNA-RNA杂交链相较于dsDNA和dsRNA, 存在着明显的特性^[40]: DNA-RNA杂交链难以被核酸酶降解且难解链; DNA-RNA杂交链的体外构建简单, 通过镁离子缓冲液和特定温度梯度即可实现。在血液内裸核酸易受到核酸酶的降解。常见的裸核酸保护基团是2'-O-Me修饰、2'-O-(2-甲氧基乙基)(MOE)修饰^[41-42]和2'-氟代化学修饰(2'-F修饰)^[43]。本研究采用2'-氟代修饰^[44]作为化学保护基团, 所以, AS1411-DNA-RNA-sxRNA杂交载体表现出良好的稳定性, 在含10%血清缓冲体系72 h后仍保持稳定。

作为一种G-四链体结构DNA核酸适配体, AS1411适配体具备良好的抗降解能力和NCL蛋白靶向性, G-四链体结构极为稳定, 离子环境依赖性低。抗降解能力强, 在2'-F修饰的保护下可在血清环境稳定存在48 h, AS1411适配体的靶蛋白NCL与核糖体活动密切相关, NCL仅在肿瘤细胞表面表达。本研究选用AS1411适配体作为配体分

子, 对肿瘤细胞表面表达的NCL蛋白精准结合, 赋予了AS1411-DNA-RNA-sxRNA杂交载体递送系统良好的肿瘤靶向性。

综合上述技术, 设计构建了一种AS1411-DNA-RNA-sxRNA杂交载体裸核酸靶向递送系统, 分别携带的小RNA药物为*p21* saRNA和*TIGIT* siRNA(命名为P21 saRNA和TIGIT siRNA的杂交载体)。为验证杂交载体是否能进入细胞发挥作用, 在其RNA短链的3'端添加FAM绿色荧光标记。各组分在体外成功组装后, 与细胞共孵育, 荧光正置显微镜和激光共聚焦显微镜对细胞进行观测。结果证明, 携带荧光标记的DNA-RNA杂交载体结合到SKOV3细胞表面, 同时还有杂交载体通过胞吞进入细胞, 在细胞核附近聚集。这说明DNA-RNA杂交载体能将小RNA药物导入肿瘤细胞。实时荧光定量PCR、Western Blot结果显示, DNA-RNA杂交载体进入细胞后, *p21*、*TIGIT*基因在mRNA和蛋白质水平上表达分别上调和下调。CCK-8实验、划痕和Transwell结果显示, 肿瘤细胞的生长、侵袭和迁移能力下降, 细胞凋亡率明显增加。这些结果充分说明了AS1411-DNA-RNA-sxRNA杂交载体良好的药物RNA分子携带能力和抗肿瘤作用。

总之, 基于AS1411适配体的DNA-RNA杂交载体对肿瘤细胞具有高靶向性, 能有效递送小RNA进入肿瘤细胞, 细胞毒性远优于传统的转染试剂。作为一个新的递送策略, DNA-RNA杂交载体具有良好的研发价值。

4 结 论

本研究很好地构建了一种以AS1411核酸适配体为靶向分子并携带*p21* saRNA或*TIGIT* siRNA核酸药物的DNA-RNA杂交载体, 同时赋予了其靶向性和药物功能, 成功递送目标小RNA进入细胞并调控靶基因的表达, 为RNA递送系统的研发提供了新的思路。

数据可用性声明 本篇论文的关联数据(DOI: 10.57760/sciencedb. 06229/CSTR: 31253.11.sciencedb.06229)可在科学数据银行(Science Data Bank, ScienceDB)中访问并开放获取, 访问链接为 <https://www.scidb.cn/detail?dataSetId=b1ddcc76c22e49a7a85e52c4d40cc136>。

参 考 文 献

- [1] Sledzinska A, Menger L, Bergerhoff K, *et al.* Negative immune checkpoints on T lymphocytes and their relevance to cancer immunotherapy. *Mol Oncol*, 2015, **9**(10):1936-1965
- [2] 肖宽诚. 肿瘤免疫与肿瘤免疫逃逸概述. *生物学教学*, 2020, **45**(9): 73-75
Xiao K C. *Biology Teaching*, 2020, **45**(9): 73-75
- [3] 李慧婷, 李桂源, 徐平, 等. B细胞与肿瘤免疫逃逸. *中南大学学报(医学版)*, 2022, **47**(3): 358-363
Li H T, Li G Y, Xu P, *et al.* *Journal of Central South University (Medical Edition)*, 2022, **47**(3): 358-363
- [4] 杨付卿, 庞博, 刘贵建. IFN- γ 介导肿瘤免疫逃逸分子机制的研究进展. *医学综述*, 2021, **27**(6): 1112-1117
Yang C Q, Pang B, Liu G J. *Med Rev*, 2021, **27**(6): 1112-1117
- [5] Zhu X, Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget*, 2017, **8**(57): 97671-97682
- [6] Hermanowicz J, Sieklucka B, Nosek K, *et al.* Intracellular mechanisms of tumor cells' immuno-resistance. *Acta Biochem Pol*, 2020, **67**(2): 143-148
- [7] Shi H, Ji M, Wu J, *et al.* Serum B7-H4 expression is a significant prognostic indicator for patients with gastric cancer. *World J Surg Oncol*, 2014, **12**(1): 188
- [8] Chauvin J M, Zarour H M. TIGIT in cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*, 2020, **8**(2): e000957
- [9] Yeo J, Ko M, Lee D H, *et al.* TIGIT/CD226 axis regulates anti-tumor immunity. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, **14**(3): 200
- [10] Manieri N A, Chiang E Y, Grogan J L. TIGIT: a key inhibitor of the cancer immunity cycle. *Trends Immunol*, 2017, **38**(1): 20-28
- [11] Georgakilas A G, Martin O A, Bonner W M. P21: a two-faced genome guardian. *Trends Mol Med*, 2017, **23**(4): 310-319
- [12] El-Deiry W S. p21(WAF1) Mediates cell-cycle inhibition, relevant to cancer suppression and therapy. *Cancer Res*, 2016, **76**(18): 5189-5191
- [13] 陈宏伟, 王春华, 李军良, 等. p21 活化蛋白激酶在肿瘤发生发展中的作用研究进展. *山东医药*, 2014, **54**(19): 99-101
Chen H W, Wang C H, Li J L, *et al.* *Shandong Medicine Journal*, 2014, **54**(19): 99-101
- [14] Xiao B D, Zhao Y J, Jia X Y, *et al.* Multifaceted p21 in carcinogenesis, stemness of tumor and tumor therapy. *World J Stem Cells*, 2020, **12**(6): 481-487
- [15] Gao M, Zhang Q, Feng X H, *et al.* Synthetic modified messenger RNA for therapeutic applications. *Acta Biomater*, 2021, **131**: 1-15
- [16] Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. *In vivo* siRNA delivery to tumor cells and its application to cancer gene therapy. *Yakugaku Zasshi*, 2007, **127**(10): 1525-1531
- [17] Kramps T, Probst J. Messenger RNA-based vaccines: progress, challenges, applications. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2013, **4**(6): 737-749
- [18] Blakney A K, Ip S, Geall A J. An update on self-amplifying mRNA vaccine development. *Vaccines (Basel)*, 2021, **9**(2): 97
- [19] DeSano J T, Xu L. MicroRNA regulation of cancer stem cells and therapeutic implications. *AAPS J*, 2009, **11**(4): 682-692
- [20] Guo P, Shu Y, Binzel D, *et al.* Synthesis, conjugation, and labeling of multifunctional pRNA nanoparticles for specific delivery of siRNA, drugs, and other therapeutics to target cells. *Methods Mol Biol*, 2012, **928**: 197-219
- [21] McKinlay C J, Vargas J R, Blake T R, *et al.* Charge-altering releasable transporters (CARTs) for the delivery and release of mRNA in living animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(4): E448-E456
- [22] Fu X, Peng F, Lee J, *et al.* Aptamer-functionalized DNA nanostructures for biological applications. *Top Curr Chem (Cham)*, 2020, **378**(2): 21
- [23] Lopez-Colon D, Jimenez E, You M, *et al.* Aptamers: turning the spotlight on cells. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2011, **3**(3): 328-340
- [24] Cerchia L, de Franciscis V. Targeting cancer cells with nucleic acid aptamers. *Trends Biotechnol*, 2010, **28**(10): 517-525
- [25] Levy-Nissenbaum E, Radovic-Moreno A F, Wang A Z, *et al.* Nanotechnology and aptamers: applications in drug delivery. *Trends Biotechnol*, 2008, **26**(8): 442-449
- [26] Malekzad H, Jouyban A, Hasanzadeh M, *et al.* Ensuring food safety using aptamer based assays: electroanalytical approach. *Trends Analyt Chem*, 2017, **94**: 77-94
- [27] Bates P J, Kahlon J B, Thomas S D, *et al.* Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding. *J Biol Chem*, 1999, **274**(37): 26369-26377
- [28] Khatami F, Matin M M, Danesh N M, *et al.* Targeted delivery system using silica nanoparticles coated with chitosan and AS1411 for combination therapy of doxorubicin and anti miR-21. *Carbohydr Polym*, 2021, **266**: 118111
- [29] Carvalho L S, Goncalves N, Fonseca N A, *et al.* Cancer stem cells and nucleolin as drivers of carcinogenesis. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, **14**(1): 60
- [30] Aravind A, Nair R, Raveendran S, *et al.* Aptamer conjugated paclitaxel and magnetic fluid loaded fluorescently tagged PLGA nanoparticles for targeted cancer therapy. *J Magn Mater*, 2013, **344**(5): 116-123
- [31] Jing Y, Cai M, Zhou L, *et al.* Aptamer AS1411 utilized for super-resolution imaging of nucleolin. *Talanta*, 2020, **217**: 121037
- [32] Binzel D W, Shu Y, Li H, *et al.* Specific delivery of miRNA for high efficient inhibition of prostate cancer by RNA nanotechnology. *Mol Ther*, 2016, **24**(7): 1267-1277
- [33] Croke S T, Witztum J L, Bennett C F, *et al.* RNA-targeted therapeutics. *Cell Metab*, 2018, **27**(4): 714-739
- [34] Springer A D, Dowdy S F. GalNAc-siRNA conjugates: leading the way for delivery of RNA therapeutics. *Nucleic Acid Ther*, 2018, **28**(3): 109-118
- [35] Yin H, Wang H, Li Z, *et al.* RNA micelles for the systemic delivery of anti-miRNA for cancer targeting and inhibition without ligand. *ACS Nano*, 2018, **13**(1): 706-717
- [36] Girvan A C, Teng Y, Casson L K, *et al.* AGRO100 inhibits activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) by forming a

- complex with NF-kappaB essential modulator (NEMO) and nucleolin. *Mol Cancer Ther*, 2006, **5**(7): 1790-1799
- [37] 周卫, 赵梓彤, 刘玲燕, 等. AS1411 对紫杉醇耐药肺癌 A549 细胞凋亡的影响. *中华医学杂志*, 2014, **94**(18): 1422-1426
Zhou W, Zhao Z T, Liu L Y, *et al*. *Natl Med J China*, 2014, **94**(18): 1422-1426
- [38] Yamamoto T, Mukai Y, Wada F, *et al*. Highly potent GalNac-conjugated tiny LNA anti-miRNA-122 antisense oligonucleotides. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(6): 817
- [39] Agarwal S, Allard R, Darcy J, *et al*. Impact of serum proteins on the uptake and RNAi activity of GalNac-conjugated siRNAs. *Nucleic Acid Ther*, 2021, **31**(4): 309-315
- [40] Tung J, Tew L S, Hsu Y M, *et al*. A novel 4-arm DNA/RNA nanoconstruct triggering rapid apoptosis of triple negative breast cancer cells within 24 hours. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 793
- [41] Dowdy S F. Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. *Nat Biotechnol*, 2017, **35**(3): 222-229
- [42] Juliano R L. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**(14): 6518-6548
- [43] Piao X, Wang H, Binzel D, *et al*. Assessment and comparison of thermal stability of phosphorothioate-DNA, DNA, RNA, 2'-F RNA, and LNA in the context of Phi29 pRNA 3WJ. *RNA*, 2018, **24**(1): 67-76
- [44] Pi F, Zhang H, Li H, *et al*. RNA nanoparticles harboring annexin A2 aptamer can target ovarian cancer for tumor-specific doxorubicin delivery. *Nanomedicine*, 2017, **13**(3): 1183-1193

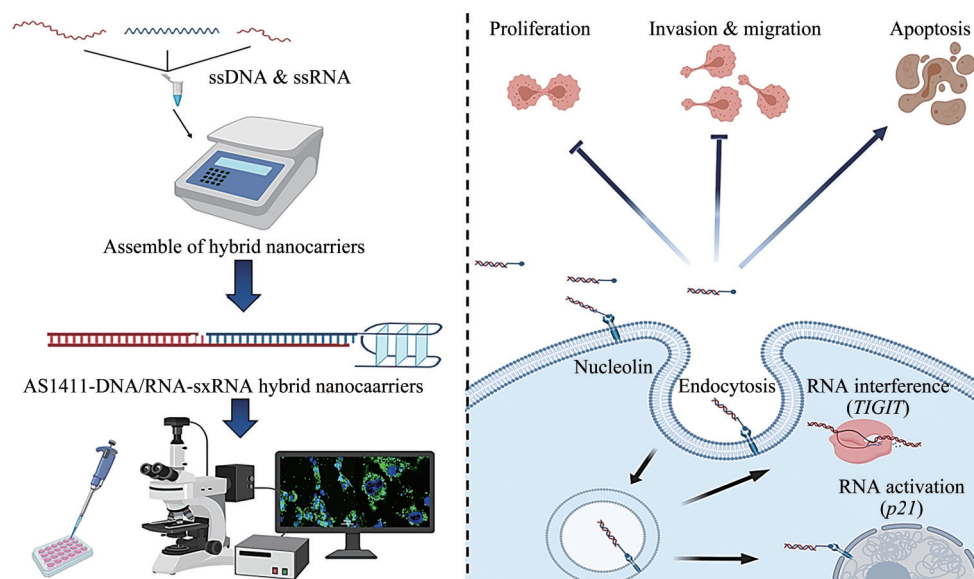
Anti-tumor Study of DNA-RNA Nanocarriers Linked to AS1411 Aptamer*

ZHAO Chang-Qi¹⁾, GE Ke-Li²⁾, JIA Zi-Han¹⁾, BAI Jia-Yao¹⁾, ZHANG Jin-Yu¹⁾, GE Yin-Lin^{1)**}

¹⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China;

²⁾Department of Immunology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

Graphical abstract



Abstract Objective To study the effectiveness of DNA-RNA molecules linked with aptamers as hybrid vectors to target tumor cells and introduce functional RNA molecules into cells, as well as their effects on tumor cells. **Methods** Design and synthesize short complementary DNA and RNA molecules, and assemble them into DNA-RNA hybrid chains; connect AS1411 aptamer as targeting molecule, and then connect *p21* saRNA and *TIGIT* siRNA as drug molecules, denoted as P21 saRNA and TIGIT siRNA, constitute a hybrid vector, the general structural formula is AS1411-DNA/RNA-sxRNA; detect whether AS1411-DNA/RNA-sxRNA can target and enter tumor cells and its effect on the survival, migration, invasion and apoptosis of tumor cells. **Results** Equimolar parts of the designed hybrid vector were added to the hybridization buffer system and incubated at a specific temperature. TBM polyacrylamide gel electrophoresis detected the successful assembly of AS1411-DNA/RNA-sxRNA; AS1411-DNA/RNA-sxRNA hybridized carriers are also showed good anti-degradation stability under the condition of 10% serum; observed under fluorescence microscope and laser confocal microscope, there were a large number of green fluorescent signals on the surface and in the cell of

* This work was supported by grants from Shandong Science and Technology Plan of Shandong Province (2014GGH218023), Shandong Province Key R&D Project (2017GSF218084), and Qingdao City Applied Basic Research Project (19-6-2-31-cg).

** Corresponding author.

Tel: 86-13780659749, E-mail: geyinlin@126.com

Received: June 15, 2022 Accepted: October 28, 2022

SKOV3 cells, and the hybrid carrier successfully entered the tumor cells. After the hybrid carrier incubated, at the mRNA level, the expression of *p21* gene (2.14 ± 0.25) was nearly 2 times that of the control group (1.02 ± 0.10), $P < 0.05$, the expression of *TIGIT* gene (0.63 ± 0.09) was lower than that of the control group (1.09 ± 0.15), $P < 0.05$, at the protein level, the expression of *p21* gene (1.57 ± 0.16) was more than 1.5 times that of the control group (1.10 ± 0.09), $P < 0.05$, the expression of *TIGIT* gene (0.61 ± 0.12) was lower than that of the control group (1.01 ± 0.07), $P < 0.05$. The CCK-8 experiment showed that the proliferation ability of ovarian cancer cells decreased significantly ($P < 0.05$) in the P21 saRNA (3.10 ± 0.13) and TIGIT siRNA (2.91 ± 0.13) groups, compared with the blank control group (3.67 ± 0.15); the experimental results showed that the healing rate of P21 saRNA group ($42.53 \pm 2.90\%$) and TIGIT siRNA group ($36.23 \pm 3.43\%$) were significantly lower than those of the blank control group ($76.47 \pm 3.64\%$), $P < 0.05$; Transwell assay showed that: P21 saRNA group (128.25 ± 5.36), TIGIT siRNA group (119.50 ± 8.79) were lower than the control group (186.5 ± 8.56), $P < 0.05$. And the invasion ability: P21 saRNA group (145.5 ± 9.45), TIGIT siRNA group (112.25 ± 5.63) were also significantly lower than the control group (202.50 ± 10.12), $P < 0.05$; apoptosis rate: P21 saRNA group ($11.74 \pm 2.47\%$) and TIGIT siRNA group ($17.12 \pm 2.04\%$) were significantly higher than the control group ($5.66 \pm 1.44\%$), $P < 0.05$. **Conclusion** The prepared AS1411-DNA/RNA-sxRNA hybrid vector can effectively target tumor cells, carry functional small RNAs into tumor cells, regulate the expression of target genes, and inhibit the proliferation, invasion and migration of tumor cells. The results provide an experimental basis for using DNA-RNA conjugated AS1411 aptamer as a hybrid carrier as a targeting tool to target and kill tumor cells expressing NCL protein on the surface.

Key words DNA/RNA hybrid vector, AS1411 aptamer, small RNA, tumor

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0278