

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2020.02.025

# 磷硫代 siRNA 的抗肿瘤基因沉默活性研究

王均, 黄震

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

**摘要:** 由于目前尚无高效合成立体特异性磷硫代 siRNAs(PS-siRNAs)的化学体系,本研究针对潜在的癌症治疗靶点 PLK1,用  $\alpha$ -磷硫代三磷酸腺苷(ATPaS)、 $\alpha$ -磷硫代三磷酸胞苷(CTPaS)和  $\alpha$ -磷硫代三磷酸尿苷(UTPaS)通过 T7 RNA 聚合酶转录合成了部分磷硫代修饰的 Rp-磷硫代 siRNAs(Rp-PS-siRNAs),探究了 nat-siRNAs 和 PS-siRNAs 血清稳定性和基因沉默活性的差异性。发现酶促合成的磷硫代 siRNA 几乎不影响 siRNA 的基因沉默效率,但却显著提高 siRNA 的血清稳定性。因此,酶促转录合成的 Rp-PS-siRNA 可望作为 siRNA 的修饰形式,以延长 siRNA 的生物活性半衰期,使 siRNA 广泛应用于生物医学临床研究领域。

**关键词:** 小干扰 RNA; 磷硫代修饰; 酶促合成; 抗肿瘤

**中图分类号:** Q52 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2020)02-0364-07

## Anti-cancer gene silencing of phosphorothioate siRNAs

WANG Jun, HUANG Zhen

(Key Laboratory Bio-resources and Eco-environment of Ministry Education,  
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** At present, there is no chemical system for efficient synthesis of stereospecific phosphorothioate siRNAs (PS-siRNAs), this research designed the modified siRNA to target PLK1 for cancer therapy, enzymatically synthesized Rp phosphorothioate siRNAs (Rp-PS-siRNAs) with ATPaS, CTPaS, UTPaS by T7 RNA polymerase, and studied the differences between the nat-siRNAs and PS-siRNAs in serum stability and gene silencing activities. The data showed that the phosphorothioate modification introduced by the enzymatic catalysis could significantly improve the serum stability of siRNA while conserving the siRNA interference efficiency. Therefore, the Rp-PS-siRNA via enzymatic synthesis is of potential properties for developing siRNAs as biomedical research tools with a longer half-life in gene silencing.

**Keywords:** Small interfering RNA; Phosphorothioate; Enzymatic synthesis; Anti-cancer

## 1 引言

2018年8月11日,在RNA干扰现象被发现20周年之际,首例siRNA药物Patisiran通过美国FDA审批并正式上市<sup>[1-2]</sup>。功能核酸在疾病治疗,

预防和诊断领域中掀起医药革命的浪潮。虽然未修饰的功能核酸(例如 siRNA)介导的基因沉默具有无限潜力,但化学修饰通常被用来改善 siRNA 的代谢稳定性,体内递送和药代动力学特性,主要包括 2'-甲氧基修饰(2'-O-Me)、2'-氟基化修饰(2'-

收稿日期: 2019-05-24

基金项目: 国家自然科学基金(21761132029, 21572146); 中央大学基础研究基金

作者简介: 王均(1995-), 女, 四川广元人, 硕士生, 研究方向: 核酸分子生物学. E-mail: wangjun\_scu@163.com

通讯作者: 黄震. E-mail: zhen\_huang@scu.edu.cn

F)、2'-氧烯丙基修饰(2'-O-allyl)、2,4-二硝基苯基醚修饰(2'-O-DNP)、4'-硫代修饰(4'-S)、硫磷代修饰(phosphorothioate linkages, PS)和 5-溴尿嘧啶修饰(5-bromouracil)<sup>[3]</sup>等。其中,磷硫代修饰(硫原子取代磷酸位点的非桥键氧原子,即磷酸酯基 PO 变为硫代磷酸酯基 PS)因能有效提高 siRNA 的核酸酶抗性而被广泛应用于基因功能鉴定和临床试验等研究领域<sup>[4]</sup>。目前,硫磷代 siRNA (PS-siRNA)的合成方式主要有两种:化学合成和体外酶促转录合成,由于硫代磷酸酯基(PS)是具有手性的,其可产生 Sp 和 Rp 两种不同的非对映异构体<sup>[5]</sup>,因此,化学合成 PS-siRNA 时,如不控制底物单体的立体特异性,通常会得到具有不同生化性质的 PS-siRNA 混合物,且目前尚无高效合成立体特异性硫磷代寡聚核苷酸的化学合成体系<sup>[6]</sup>。此外,相关研究发现化学合成得到的 PS-siRNA 的基因敲除活性与天然 siRNA 相当<sup>[7]</sup>或更低<sup>[8]</sup>,且具有较明显的细胞毒性<sup>[9]</sup>。与化学合成相比,Griffiths 等人发现:用 T7 RNA 聚合酶体外转录合成磷硫代 RNA 时,T7 RNA 聚合酶能特异性识别并结合  $\alpha$ -磷硫代核苷三磷酸(NTPaS)的 Sp 异构体,在 RNA 延伸过程中,其发生构型翻转,最终得到 Rp 型的磷硫代 RNA 纯净物<sup>[10]</sup>。同时,与富含 Sp 手性中心的 PS-siRNA 相比,富含 Rp 手性中心的 PS-siRNA 具有更大的血清稳定性和更有效的基因沉默活性<sup>[6]</sup>,因此,用 T7 RNA 聚合酶转录合成的 Rp 型 PS-siRNA 可能具有更高的核酸酶抗性和生物学活性。

另外近年来,实验研究发现 PLK1 基因过表达于多种类型的人类肿瘤组织中,如神经胶质瘤<sup>[11]</sup>、甲状腺癌<sup>[12]</sup>、头颈部鳞状细胞癌<sup>[13]</sup>、黑色素瘤<sup>[14]</sup>、结直肠癌<sup>[15]</sup>、食管癌<sup>[16]</sup>、卵巢癌<sup>[17]</sup>、乳腺癌<sup>[18]</sup>和前列腺癌<sup>[19]</sup>。自然,它被认为是肿瘤性疾病和病毒性疾病的潜在治疗靶点<sup>[20-21]</sup>。为了进一步探索磷硫代修饰的潜在应用价值,本文针对癌症治疗靶点 PLK1,设计了 3 条特异性 siRNA 序列,并用 T7 RNA 聚合酶和 NTPaS 体外转录合成了 PS-siRNAs,探究了 PLK1 nat-siRNAs 和 PLK1 PS-siRNAs 血清稳定性和基因沉默活性的差异性。实验发现酶促合成的 PS-siRNAs 能在不影响 siRNA 基因沉默活性的基础上,显著提高 siRNA 的血清稳定性。因此,酶促合成的 PS-siRNA 可作为 siR-

NA 的应用形式,以延长 siRNA 的生物活性半衰期,使其基因干扰效果持续时间更长,为肿瘤性疾病和病毒性疾病等疑难杂症的治疗带来新的希望。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材 料

2.1.1 细胞株 肝癌细胞株 HepG2 购自于 ATCC 细胞库

2.1.2 主要试剂 胎牛血清(FBS)购自于 Gibco 生物公司;高糖培养基 DMEM 和胰蛋白酶购自于 Hyclone 生物公司;核酸 siRNA marker, cDNA 合成试剂盒和 ECL 显色液购自全式金公司;RNA 提取试剂盒购自于 promega 公司;Rfect 小核酸转染试剂购自于百代生物公司;qRT-PCR 试剂购自于 Takara 生物公司;苯甲磺酰氟化物(PMSF)和 RIPA 裂解液均购自于索莱宝生物公司;BCA 蛋白质定量试剂盒购自于康为世纪生物公司;anti-PLK1 抗体和 anti-GAPDH 抗体购自于 abcam 公司;山羊抗兔 IgG-HRP 抗体和山羊抗鼠 IgG-HRP 抗体购自于 Proteintech 生物公司。

### 2.2 方 法

2.2.1 PLK1 siRNAs 和 PLK1 PS-siRNAs 的体外转录合成及纯化 以 PLK1 的 mRNA 序列为模板(GenBank 序号为 NM\_005030),设计靶向性敲除 PLK1 的 siRNA 序列(表 1 和 2,其中,\* 表示该核苷酸位点为磷硫代核苷酸)。如图 1 所示,由于 NTPaS 的合成及应用挑战,本文使用  $\alpha$ -磷硫代三磷酸腺苷(ATPaS)、 $\alpha$ -磷硫代三磷酸胞苷(CTPaS)和  $\alpha$ -磷硫代三磷酸尿苷(UTPaS)<sup>[22]</sup>和 T7 聚合酶体外转录合成了部分磷硫代修饰的 Rp-PS-siRNA<sup>[23]</sup>。首先,在生工生物公司订购合成 PLK1-siRNAs 的 DNA 单链模板(表 1)。在保证 DNA 模板纯度极高的基础上,将互补的 100  $\mu$ mol/L DNA 单链退火成 20  $\mu$ mol/L 的 DNA 双链。依据转录体系加入各组分和两组双链 DNA,混合均匀并轻微离心后,置于 37  $^{\circ}$ C 水浴锅中过夜孵育(同时合成正义链 RNA 和反义链 RNA,合成的 RNA 可形成双链)。随后用 DNA 酶 I 消化 DNA 模板,RNase T1 分解 RNA 一条链的 GGG 部分,并用苯酚-氯仿-异戊醇抽提法、乙醇沉淀法和超滤法进行样品纯化。最后,用 12.5%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测样品的纯度和完整性。

表 1 合成 siRNA 的 DNA 模板序列

Tab. 1 Sequence of DNA template for siRNA synthesis

PLK1 siRNA 1	oligo-1	5'-GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAGATCACCCCTCTTAAATATT-3'
	oligo-2	3'-CTAGTGATTATGCTGAGTGATATCCCTCTAGTGGGAGGAATTTATAA-5'
	oligo-3	5'-AAAGATCACCCCTCTTAAATACCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC-3'
	oligo-4	3'-TTTCTAGTGGGAGGAATTTATGGGATATCACTCAGCATAATCACTAG-5'
PLK1 siRNA 2	oligo-1	5'-GATCACTAATACGACTCACTATAGGGGGATCAAGAAGAATGAATATT-3'
	oligo-2	3'-CTAGTGATTATGCTGAGTGATATCCCCCTAGTTCTTCTTACTTATAA-5'
	oligo-3	5'-AAGGATCAAGAAGAATGAATACCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC-3'
	oligo-4	3'-TTCTAGTTCTTCTTACTTATGGGATATCACTCAGCATAATCACTAG-5'
PLK1 siRNA 3	oligo-1	5'-GATCACTAATACGACTCACTATAGGGGGAGAAGATGTCCATGGAATT-3'
	oligo-2	3'-CTAGTGATTATGCTGAGTGATATCCCCCTTCTTACAGGTACCTTAA-5'
	oligo-3	5'-AAGGAGAAGATGTCCATGGAACCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC-3'
	oligo-4	3'-TTCTCTTCTTACAGGTACCTTGGGATATCACTCAGCATAATCACTAG-5'
Negative control siRNA	oligo-1	5'-GATCACTAATACGACTCACTATAGGGTTCTCCGAACGTGTACGTTT-3'
	oligo-2	3'-CTAGTGATTATGCTGAGTGATATCCCAAGAGGCTTGCACAGTGCAAA-5'
	oligo-3	5'-AATTCTCCGAACGTGTACAGTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC-3'
	oligo-4	3'-TTAAGAGGCTTGCACAGTGCAGGGATATCACTCAGCATAATCACTAG-5'

表 2 siRNA 序列

Tab. 2 Sequence of siRNA

		Nat-siRNAs	PS-siRNAs
PLK1 siRNA 1	正义链	5'-AGAUCACCCUUAUAAUUAUU-3'	5'-A*GA*U*C*A*C*C*U*C*U*U*A*A*U*A*U*U*-3'
	反义链	3'-UUUCUAGUGGGAGAAUUUAU-5'	3'-U*U*U*C*U*A*GU*GGGA*GGA*A*U*U*U*A*U*-5'
PLK1 siRNA 2	正义链	5'-GGAUCAAGAAGAAUGAAUUAUU-3'	5'-GGA*U*C*A*A*G*A*A*GA*A*U*GA*A*U*A*U*U*-3'
	反义链	3'-UUCUAGUUCUUCUUAUUAU-5'	3'-U*U*C*C*U*A*GU*U*C*U*U*C*U*U*A*C*U*U*A*U*-5'
PLK1 siRNA 3	正义链	5'-GGAGAAGAUGUCCAUGGAAUU-3'	5'-GGA*GA*A*GA*U*GU*C*C*A*U*GGA*A*U*U*-3'
	反义链	3'-UUCUCUUCUACAGGUACCUU-5'	3'-U*U*C*C*U*C*U*U*C*U*A*C*A*GGU*A*C*C*U*U*-5'
Negative control siRNA	正义链	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUUU-3'	5'-U*U*C*U*C*C*GA*A*C*GU*GU*C*A*C*GU*U*U*-3'
	反义链	3'-UUAAGAGCUUGCACAGUGCA-5'	3'-U*U*A*A*GA*GGC*U*U*GC*A*C*A*GU*GC*A*-5'

(\* 表示该核苷酸的 a 磷酸位点氧原子被硫原子所取代)

2.2.2 PLK1 siRNAs 和 PLK1 PS-siRNAs 的血清稳定性试验 5 μmol/L nat-siRNA 或 PS-siRNA 分别与 50% 胎牛血清(FBS)等体积混合均匀,放置于 37 °C 水域锅中孵育. 0、1、2、4、6、8、12 和 24 h 小时后取 2 μL 样品上样,用 12.5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 siRNA 或 PS-siRNA 的剩余量. Image J 软件分析三次独立试验的灰度值,并用 Origin 软件制图.

2.2.3 细胞培养与转染试剂的筛选 将 HepG2 细胞(ATCC 细胞库)以 5×10<sup>3</sup> 细胞/孔的密度接种于 96 孔组织培养板中,用含 10% 胎牛血清(FBS, Gibco)的高糖培养基(DMEM, Hyclone)在 37 °C

和 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 12 h. 根据 Lipofectamine 2000、Lipofectamine 3000、Ribofect 转染试剂和 Rfect 小核酸转染试剂的厂家说明书,将带荧光 FAM 基团的 siRNA(转染终浓度为 10 nmol/L)与四种不同的转染试剂混合均匀后,孵育 HepG2 细胞 4 h,更换培养基,用荧光显微镜观察其转染效率的差异性.

2.2.4 qRT-PCR 分析 在 qRT-PCR 分析中,用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA 后,使用反转录试剂盒合成 cDNA. 根据人类 PLK1 mRNA (GenBank 序号为 NM\_005030) 和 GAPDH mRNA (GenBank 序号为 NM\_002046) 的序列,设计

PLK1 和 GAPDH 基因的 PCR 引物(表 3). 随后, 以 1  $\mu$ L cDNA 作为模板, 用 Ex-Taq 酶(Takara) 对 PLK1 和 GAPDH 进行 PCR 扩增. 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 s; 95  $^{\circ}$ C  $\times$  5 s, 55  $^{\circ}$ C  $\times$  10 s, 72  $^{\circ}$ C  $\times$  10 s 扩增 40 个周期; 95  $^{\circ}$ C  $\times$  10 s, 60  $^{\circ}$ C  $\times$  60 s, 97  $^{\circ}$ C  $\times$  1 s 一个周

表 3 引物序列

Tab. 3 Primer sequence

名称	正向引物	反向引物
PLK1	5'-ACCTACGGCAAATTGTGCTT-3'	5'-CTCTCCCCGTACATATTCGACT-3'
GAPDH	5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3'	5'-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3'

2.2.5 蛋白质印迹分析 在蛋白质印迹分析中, 用含 PMSF 的 RIPA 裂解液提取总蛋白后, 使用 BCA 蛋白质定量试剂盒测定各样品的总蛋白浓度. 用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离 15  $\mu$ g 总蛋白样品(200 V 电泳 1h), 将 36 kD GAPDH 蛋白和 68 kD PLK1 从 SDS-PAGE 凝胶中转移到 0.2  $\mu$ m PVDF 膜上(冰浴条件下, 200 mA 转膜 2 h). 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 4  $^{\circ}$ C 过夜孵育 anti-PLK1 抗体(兔单克隆抗体, 1 : 2 000 稀释)和 anti-GAPDH 抗体(鼠单克隆抗体, 1 : 5 000 稀释). 用 TBST 缓冲液以 1 : 2 000 的稀释比例分别稀释山羊抗兔 IgG-HRP 抗体和山羊抗鼠 IgG-HRP 抗体, 室温孵育二抗 1 h. 最后用 ECL 化学发光法进行显色, 以管家基因 GAPDH 的蛋白作为内源参考标准, 归一化后得到靶基因 PLK1 蛋白的相对表达量.

### 3 结果与讨论

#### 3.1 nat-siRNAs 和 PS-siRNAs 的体外转录合成

如图 1 所示, 利用 T7 聚合酶体外转录合成 siRNAs, 用 12.5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测样品的纯度和完整性, 得到了纯度较高的 PLK1 nat-siRNAs 和 PLK1 PS-siRNAs.

#### 3.2 PS-siRNA 血清稳定性试验

不同的化学修饰能不同程度地提高 siRNA 核酸酶稳定性, 使其进入生物体后不易被核酸水解酶降解并可持久发挥药效, 为了验证酶促合成的 PS-siRNAs 是否能增强 siRNA 的核酸酶抗性, 比较 nat-siRNAs 和 PS-siRNAs 血清稳定性的差异是至关重要的. 如图 2 所示, 随着时间的延长, PS-siRNAs 的剩余量明显高于 nat-siRNAs 的剩余量. 与 FBS 孵育 24 h 后, 当剩余天然 siRNA1 含量为 21.51% 时, 剩余的 PS-siRNA1 含量为 71.6% ( $P < 0.01$ ), 同时, PS-siRNA2 和 PS-siRNA3 的剩

期后得到荧光曲线. 利用罗氏 LC96 软件, 以管家基因 GAPDH mRNA 作为内源参考标准, 采用  $\Delta$ CT 法测定 PLK1 mRNA 的相对表达量. 通过熔融曲线分析验证了 PCR 产物的特异性.

余量也显著性高于相对应的 nat- siRNAs(68.37%

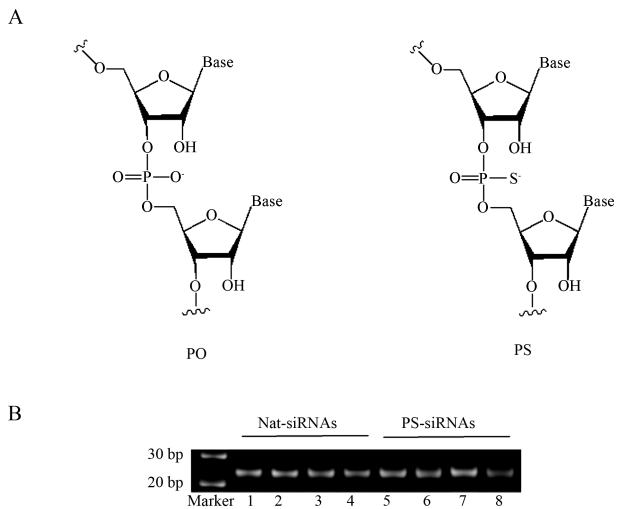


图 1 PLK1 nat-siRNAs 和 PS-siRNAs 的转录合成

1. 磷硫代修饰寡聚核糖核苷酸结构示意图; B. PLK1 siRNAs 长度为 25bp; 泳道 1,5 为非特异 siRNA 序列; 泳道 2,6 为 siRNA1 序列; 泳道 3,7 为 siRNA2 序列; 泳道 4,8 为 siRNA3 序列.

Fig. 1 Synthesis of PLK1 nat-siRNAs 和 PS-siRNAs

Structure of phosphorothioate oligonucleotides; B. The length of PLK1 siRNAs supposed to be 25 bp; lane 1 and 5 are non-specific siRNA; lane 2 and 6 are siRNA1; lane 3 and 7 are siRNA2; lane 4 and 8 are siRNA3.

versus 32.27%,  $P < 0.01$ ; 63.99% versus 19.05%,  $P < 0.01$ ). 这表明酶促合成的 PS-siRNA 能显著性增强 siRNA 的血清稳定性, 从而可作为 siRNA 的储存形式以延长 siRNA 的半衰期, 为 siRNA 实现低剂量高效果提供可能性, 为 siRNA 临床应用和新药研发领域奠定理论基础.

#### 3.3 转染试剂的筛选

由于不同转染试剂有着不同的化学性质和递送机制, 不同细胞株对不同的转染试剂的敏感程度各不相同. 为了筛选出肝癌细胞株 HepG2 的最佳转染试剂, 对常见的四种转染试剂 Lipofectamine

2000、Lipofectamine 3000、Ribofect 转染试剂和 Rfect 小核酸转染试剂的转染效率进行了分析和比较. 结果如图 3 所示, 与 Lipofectamine 2000、Lipofectamine 3000、ribofect 转染试剂的转染效率相

比, Rfect 小核酸转染试剂的转染效率最大. 因此, 在后续的基因沉默试验中, 采用 Rfect 转染试剂来递送 nat-siRNAs 和 PS-siRNAs.

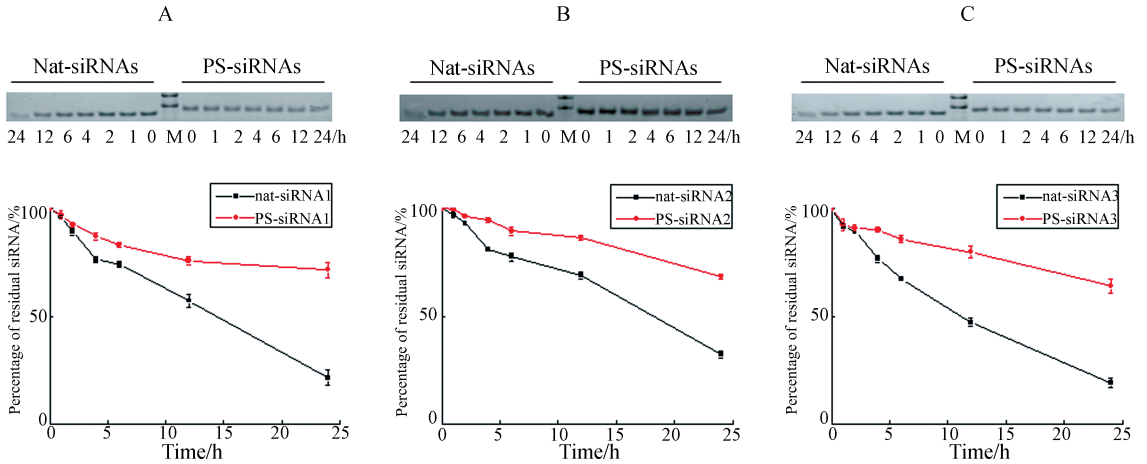


图 2 nat-siRNAs 与 PS-siRNAs 的血清稳定性

A. nat-siRNA1 与 PS-siRNA1 的血清稳定性; B. nat-siRNA2 与 PS-siRNA2 的血清稳定性; C. nat-siRNA3 与 PS-siRNA3 的血清稳定性. 条形代表标准偏差, 数据收集于三次独立试验.

Fig. 2 Serum stability of nat-siRNAs and PS-siRNAs

A. Serum stability of nat-siRNA1 and PS-siRNA1; B. Serum stability of nat-siRNA2 and PS-siRNA2; C. Serum stability of nat-siRNA3 and PS-siRNA3. Bars represent the standard deviation, Data collected from three independent experiments.

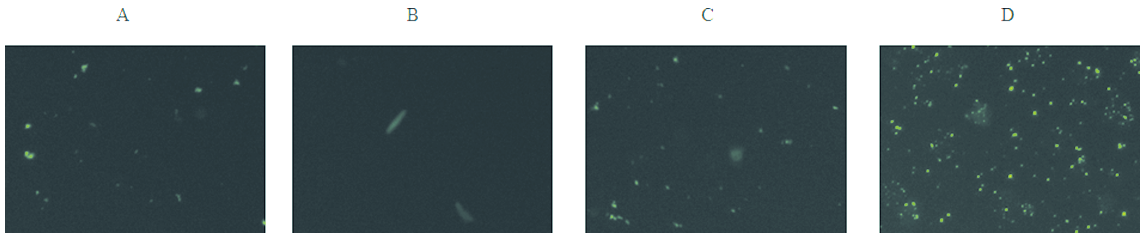


图 3 不同转染试剂的转染效率对比

A. Lipofectamine 2000; B. Lipofectamine 3000; C. Ribofect 转染试剂; D. Rfect 小核酸转染试剂.

Fig. 3 Comparison of different transfection reagents

A. Lipofectamine 2000; B. Lipofectamine 3000; C. ribofect transfection reagent; D. rfect small nucleic acid transfection

### 3.4 nat-siRNAs 和 PS-siRNAs 的基因沉默效果

过去相关研究表明: 化学合成得到的 PS-siRNA 通常为混合物, 且其基因敲除活性与天然 siRNA 相当或更低. 为了探究酶促合成的 PS-siRNA 在显著提高 siRNA 血清稳定性的同时, 是否影响 siRNA 的生物学功能, 采用 qRT-PCR 和 Western blotting 等半定量办法分析比较了 nat-siRNA 和 PS-siRNA 的基因沉默效果. 结果如图 4 所示, 在 mRNA 水平上, 以 PBS 组作为对照组, 当 25 nmol/L siRNA1 使 PLK1 的 mRNA 表达量降低 45% 时, 等剂量的 PS-siRNA1 敲降了 43.2% 的 PLK1 mRNA; 同时, PS-siRNA2 和 PS-siRNA3 的基因沉默活性也相似于对应的 nat-siRNAs (38.7% versus 46.2%; 20% versus 27%). 在蛋

白质水平上, PS-siRNA1、PS-siRNA2 与 PS-siRNA3 的干扰活性均相似于对应的 nat-siRNAs, (61.1% versus 61.9%; 63.06% versus 55.2%; 20.3% versus 25.6%). 经分析对比发现: 序列特异性的 siRNAs 或 PS-siRNAs 使 PLK1 mRNA 和 PLK1 蛋白质的相对表达量均显著下降. 其中, 等剂量情况下, 特异性序列 1 与序列 2 的基因沉默活性相似, 且显著性高于特异序列 3 的 RNA 干扰效率, 这表明了同一基因的不同敲除靶点具有不同的基因沉默效率, 进而印证了 siRNA 序列设计的重要性. 此外, 与 nat-siRNAs 相比, PS-siRNAs 的特异性干扰效果没有明显的变化. 因此, 通过酶促生物合成的方式, 硫磷代修饰能在不影响 siRNA 基因沉默活性的基础上, 显著性增加 siRNA 的血清

稳定性, 延长 PS-siRNAs 的半衰期, 使其干扰效果持续时间更长, 为 PS-siRNAs 用于肿瘤性疾病和

病毒性治疗提供可能性.

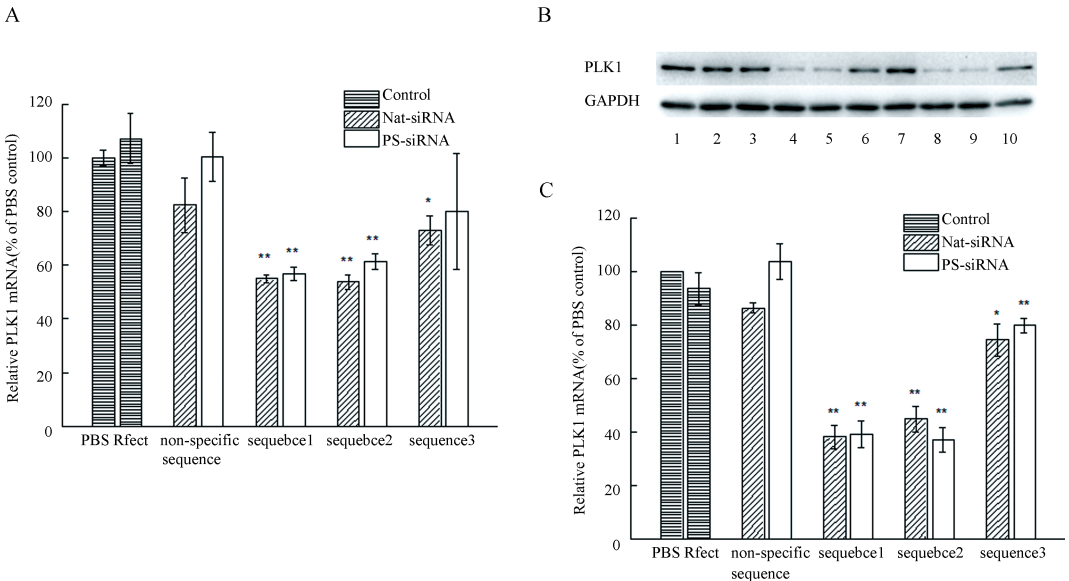


图 4 PLK1 nat-siRNAs 和 PLK1 PS-siRNAs 的基因沉默效果

A. mRNA 水平上, PLK1 nat-siRNAs 和 PLK1 PS-siRNAs 的基因沉默效果; B, C. 蛋白水平上, PLK1 nat-siRNAs 和 PLK1 PS-siRNAs 的基因沉默效果; 1. PBS; 2. Rfect 转染试剂; 3. 非特异性 nat-siRNA; 4. nat-siRNA1; 5. nat-siRNA2; 6. nat-siRNA3; 7. 非特异性 PS-siRNA; 8. PS-siRNA1; 9. PS-siRNA2; 10. PS-siRNA3. 数据收集于 3 次独立实验, \* :  $P < 0.05$ ; \* \* :  $P < 0.01$ .

Fig. 4 Gene silencing effects of PLK1 nat-siRNA and PLK1 PS-siRNA

A. Gene silencing effects of PLK1 nat-siRNAs and PLK1 PS-siRNAs at the level of RNA; B, C. Gene silencing effects of PLK1 nat-siRNAs and PLK1 PS-siRNAs at protein level; 1. PBS; 2. Rfect reagent; 3. non-specific nat-siRNA; 4. nat-siRNA1; 5. nat-siRNA2; 6. nat-siRNA3; 7. non-specific PS-siRNA; 8. PS-siRNA1; 9. PS-siRNA2; 10. PS-siRNA3; Data were collected from three independent experiments; \*  $P < 0.05$ ; \* \* :  $P < 0.01$ .

## 4 讨论

随着首例 siRNA 药物 Patisiran 的正式上市, 具有基因沉默活性的天然 siRNA 和修饰性 siRNA 广泛应用于疾病治疗、预防和诊断相关领域. 研究表明, 对 nat-siRNA 不同基团进行不同的化学修饰可不同程度上增加或降低 siRNA 的核酸酶抗性, 同时, 过多的或不当的化学修饰会使其不被 RNA 干扰机制所识别, 从而降低 siRNA 的基因沉默活性. 其中, 磷硫代修饰因能有效提高 siRNA 的核酸酶抗性而被广泛应用于基因功能鉴定和临床试验等研究领域. 由于硫代磷酸酯基(PS)是具有手性的, 其可产生 Sp 和 Rp 两种不同的非对映异构体, 因此, 化学合成 PS-siRNA 时, 通常会得到具有不同生化性质的 PS-siRNA 混合物, 从而影响 RNA 干扰机制, 使其基因敲除活性与天然 siRNA 相当或更低. 与化学合成相比, 酶促合成可得到具有更高核酸酶抗性和生物学活性的 Rp-PS-siRNA 纯净物. 为了进一步探究磷硫代修饰的潜在应用价值, 本文针对癌症治疗靶点 PLK1, 设计了 3 条特异性 siRNA 序列, 用 ATPaS、CTPaS、UTPaS 和

T7 聚合酶体外转录合成了部分磷硫代修饰的 Rp-PS-siRNA, 探究了 PLK1 nat-siRNAs 和 PLK1 PS-siRNAs 血清稳定性和基因沉默活性的差异性. 结果发现, 通过酶促生物合成的方式, 磷硫代修饰能在不影响 siRNA 基因沉默活性的基础上, 显著性提高 siRNA 的血清稳定性. 因此, 酶促合成的 PS-siRNA 可作为 siRNA 的应用形式, 以延长 siRNA 的生物活性半衰期, 并为 siRNA 以及其它功能核酸的生物药物创新和临床医学临床研究奠定理论和应用的一个新基础. 目前, 尽管 siRNA 药物研发领域中充满难题和挑战, 针对越来越多的疾病表征多变性, 只有从基因水平进行靶向性治疗才能达到“治标治本”的效果. 随着相关技术的不断改良、完善与进步, siRNA 药物的其它弱点(如脱靶性, 免疫原性和低递送率等)也终将被克服, siRNA 将成为以基因表达调控为导向的第三代医药产业革命的中坚力量.

## 参考文献:

[1] Heather W. FDA approves patisiran to treat hereditary transthyretin amyloidosis [J]. Nat Rev Neurol

- ogy, 2018, 14: 570.
- [2] 黄文慧,董江萍,等. 首款基于 RNA 疗法的罕见病治疗药物 patisiran[J]. 中国新药与临床杂志, 2018, 37: 560.
- [3] Watts J K, Deleavey G F, Damha M J, *et al.* Chemically modified siRNA: tools and applications [J]. *Drug Discovery Today*, 2008, 13: 842.
- [4] Braasch D A, Susan J, Yinghui L, *et al.* RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA [J]. *Biochemistry*, 2003, 42: 7967.
- [5] Jinyan T, Allysen R, Ying L, *et al.* Enzymatic synthesis of stereoregular (all Rp) oligonucleotide phosphorothioate and its properties [J]. *Nucleosides and Nucleotides*, 1995, 14: 985.
- [6] Jahns H, Roos M, Imig J, *et al.* Stereochemical bias introduced during RNA synthesis modulates the activity of phosphorothioate siRNAs [J]. *Nat Communications*, 2015, 6: 6317.
- [7] Mohammed A, Torgeir H, Eshrat B, *et al.* Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 589.
- [8] Hall A H S, Jing W, Shaughnessy E E, *et al.* RNA interference using boranophosphate siRNAs; structure-activity relationships [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 5991.
- [9] Braasch D A, Paroo Z, Constantinescu A, *et al.* Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14: 1139.
- [10] Griffiths A D, Potter B V L, Eperon I C, *et al.* Stereospecificity of nucleases towards phosphorothioate-substituted RNA: stereochemistry of transcription by T7 RNA polymerase [J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15: 4145.
- [11] Cheng M W, Wang B C, Weng Z Q, *et al.* Clinicopathological significance of Polo-like kinase 1 (PLK1) expression in human malignant glioma [J]. *Acta Histochemica*, 2012, 114: 503.
- [12] Ito Y, Miyoshi E N, Kakudo K, *et al.* Polo-like kinase 1 overexpression is an early event in the progression of papillary carcinoma [J]. *British J Cancer*, 2004, 90: 414.
- [13] Knecht R, Elez R, Oechler M, *et al.* Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck [J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 2794.
- [14] Kneisel L, Strebhardt K, Bernd A, *et al.* Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease [J]. *J Cutaneous Pathology*, 2010, 29: 354.
- [15] Takahashi T, Sano B T, Kato H, *et al.* Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers [J]. *Cancer Sci*, 2010, 94: 148.
- [16] Tokumitsu Y, Mori M, Tanaka S, *et al.* Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma [J]. *Inter J Oncology*, 1999, 15: 687.
- [17] Weichert W, Denkert C, Schmidt M, *et al.* Polo-like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma [J]. *Bri J Cancer*, 2004, 90: 815.
- [18] Weichert W, Kristiansen G, Winzer K, *et al.* Polo-like kinase isoforms in breast cancer: expression patterns and prognostic implications [J]. *Virchows Archiv*, 2005, 446: 442.
- [19] Weichert W. Polo-like kinase 1 is overexpressed in prostate cancer and linked to higher tumor grades [J]. *Prostate*, 2010, 60: 240.
- [20] Degenhardt Y, Lampkin T. Targeting Polo-like kinase in cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16: 384.
- [21] Klaus S. Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy [J]. *Nat Rev Drug Discovery*, 2010, 9: 643.
- [22] Caton-Williams J, Fiaz B, Hoxhaj R, *et al.* Convenient synthesis of nucleoside 5'-( $\alpha$ -P-thio)triphosphates and phosphorothioate nucleic acids (DNA and RNA) [J]. *Sci Chin Chem*, 2012, 55: 80.
- [23] Julianne C, Rudiona H, Bilal F, *et al.* Use of anovel 5'-regioselective phosphitylating reagent for onepot synthesis of nucleoside 5'-triphosphates from unprotected nucleosides [J]. *Curr Protocols in Nucleic Acid Chem*, 2013, 1: 1.

#### 引用本文格式:

中文: 王均, 黄震. 磷硫代 siRNA 的抗肿瘤基因沉默活性研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2020, 57: 364.

英文: Wang J, Huang Z. Anti-cancer gene silencing of phosphorothioate siRNAs [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2020, 57: 364.