



无载体 RNA 纳米颗粒在肝癌细胞 RNAi 治疗中的应用

陆明冬^{1,2}, 杨川川¹, 吴方丽¹, 金伟波^{1,2}

(1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018;

2. 浙江理工大学绍兴生物医药研究院有限公司, 浙江绍兴 312366)

摘要: RNA 干扰(RNA interference, RNAi)疗法在遗传病及癌症等疾病治疗中应用潜力巨大,但 RNAi 递送体系存在稳定性差和潜在毒性等风险,限制了其临床应用。为提升 RNAi 递送效果,将靶向人端粒酶逆转录酶(Human telomerase reverse transcriptase, hTERT)的 4 个小干扰 RNA 串联,使其能自组装形成正方形;利用大肠埃希菌制备 hTERT-square 纳米颗粒,采用动态光散射、透射电镜、实时定量 PCR 等技术,表征 hTERT-square 的理化特征、细胞摄取效率及驻留时长、抗肿瘤效果和 RNAi 效率。结果表明:hTERT-square 的粒径为 50~100 nm,具有较高的热稳定性和 RNase A 耐受性;无需额外转染试剂,hTERT-square 也可进入 Hep3B 肝癌细胞,驻留时长超过 36 h,在 24 h 内下调 hTERT 基因表达约 50%,显著降低 Hep3B 细胞的存活率。该研究可为开发安全、高效的 RNAi 抗癌策略提供有力依据。

关键词: siRNA 药物;人端粒酶逆转录酶;RNA 纳米颗粒;理化性质;肿瘤治疗

中图分类号: Q936

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2026) 09-0670-10

引文格式: 陆明冬,杨川川,吴方丽,等. 无载体 RNA 纳米颗粒在肝癌细胞 RNAi 治疗中的应用[J]. 浙江理工大学学报(自然科学),2026,55(5):670-679.

Reference Format: LU Mingdong, YANG Chuanchuan, WU Fangli, et al. Carrier-free RNA nanoparticles for RNAi-based therapy in hepatocellular carcinoma cells[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2026, 55(5): 670-679.

Carrier-free RNA nanoparticles for RNAi-based therapy in hepatocellular carcinoma cells

LU Mingdong^{1,2}, YANG Chuanchuan¹, WU Fangli¹, JIN Weibo^{1,2}

(1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Zhejiang Sci-Tech University Shaoxing Academy of Biomedicine, Shaoxing 312366, China)

Abstract: RNA interference (RNAi) therapy enables precise targeting of pathogenic genes and holds great potential for treating genetic disorders, cancers, and viral infections. However, its clinical application is limited by the instability, low targeting efficiency, and potential toxicity of current RNAi delivery systems. To address these issues, four small interfering RNAs (siRNAs) targeting human telomerase reverse transcriptase (hTERT) were linked in tandem to self-assemble into a square-shaped RNA nanoparticle, termed hTERT-square. After expression and purification in *Escherichia coli*, the physicochemical properties, cellular uptake and retention, antitumor activity, and RNAi efficiency of hTERT-square were systematically characterized using dynamic light scattering, transmission electron microscopy, and quantitative real-time PCR. The results showed that hTERT-square had a particle size of 50-100 nm, exhibited high thermal stability and RNase A resistance, and could enter Hep3B hepatocellular carcinoma cells without transfection reagents. The particles remained in cells for over 36 h, downregulated

收稿日期: 2025-04-21 网络出版日期: 2026-04-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172496)

作者简介: 陆明冬(1998—),男,安徽滁州人,硕士研究生,主要从事 RNA 纳米表征及生物学功能方面的研究。

通信作者: 金伟波, E-mail: jwb@zstu.edu.cn

hTERT expression by approximately 50% within 24 h, and significantly reduced Hep3B cell viability. These findings provide strong evidence supporting the development of safe and efficient RNAi-based anticancer strategies.

Key words: siRNA drugs; hTERT; RNA nanoparticles; physicochemical properties; tumor treatment

0 引 言

RNA 干扰技术因其高度的特异性和有效性,近年来在癌症治疗领域受到广泛关注^[1]。RNAi 通过小干扰 RNA (Small interfering RNA, siRNA) 介导 mRNA 降解,抑制特定癌基因的表达^[2],在调控肿瘤细胞增殖、促进凋亡及影响肿瘤微环境方面展现出巨大潜力^[3]。近年来, RNAi 疗法正逐步转化为有效的疾病治疗手段,如 2018 年美国食品药品监督管理局 (Food and drug administration, FDA) 批准用于治疗转甲状腺素蛋白相关的淀粉样变性的首个 siRNA 药物帕提西兰 (Patisiran),标志着 RNAi 疗法正式进入临床阶段^[4]。目前已有多种 siRNA 药物获批上市^[5],但由于其递送效率低、易被核酸酶降解、细胞摄取率低及潜在毒性等问题,严重限制了其在临床中的应用转化。

近年来,多种 RNA 纳米颗粒被用于 siRNA 的体内递送,如脂质纳米颗粒 (Lipid nanoparticles, LNPs)、聚合物纳米颗粒 (Polymeric nanoparticles, PNPs) 和病毒载体等^[6],显著提升了 siRNA 在体内的递送效率和稳定性,但这些用于递送 siRNA 的纳米颗粒存在制备复杂、成本高和毒副作用的问题^[7-8],亟待开发更安全、简便、低免疫原性的新型递送策略以提升 RNAi 疗法的临床疗效。RNA 折纸技术的快速发展为 RNAi 疗法提供了新的解决方案,通过分子自组装或折叠,可构建具有明确拓扑结构的 RNA 纳米颗粒,实现多位点、多靶点的精准调控^[9-10]。应用 RNA 折纸纳米技术,可将多条功能 RNA 链通过可编程的结构设计精确折叠成二维或三维纳米结构,提高 RNA 的稳定性和抗降解能力,并改善其生物相容性^[11],实现无载体递送进入细胞,为 RNAi 药物的安全递送开辟了新途径。研究表明,不同结构的 RNA 纳米颗粒 (如三向连接结构、三角形和正方形) 都可用于 siRNA 的封装与递送,在肺癌、前列腺癌等模型中表现出较高的沉默效率与较低的毒性^[12]。此外, RNA 纳米颗粒在胞内解构后也能作为 Dicer 底物诱导 RNAi 通路,调控特定靶基因的表达^[13]。

人端粒酶逆转录酶 (Human telomerase reverse

transcriptase, hTERT) 作为端粒酶复合物的关键催化亚基,在维持染色体端粒长度和细胞无限增殖能力中发挥核心作用^[14]。在正常体细胞中, hTERT 表达受严格调控,而在包括肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 在内的多种恶性肿瘤中,其异常高表达被认为是肿瘤细胞获得永生表型的重要分子基础^[15]。研究表明, hTERT 在肝细胞癌细胞中高表达^[16],与肿瘤分化程度低、侵袭性强及预后不良密切相关^[17],抑制 hTERT 表达被视为肝癌 RNA 干扰治疗的重要策略之一,可有效诱导肿瘤细胞凋亡并降低其增殖能力^[18]。

针对 hTERT 的 RNAi 研究已在多种模型中证实,其可显著抑制肝癌生长并增强抗癌药物敏感性,为精准靶向治疗提供了可行的分子基础^[19]。基于此,本文构建了一种靶向 hTERT 的正方形 RNA 纳米颗粒 (hTERT-square),并使其在大肠埃希菌中实现稳定表达;分析 RNA 纳米颗粒的理化特性、酶降解与热稳定性及其对肝癌细胞的基因沉默和抑制作用,以期开发新型安全的 RNAi 抗癌药物提供新思路和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料

人肝癌细胞系 Hep3B 和大肠杆菌 HT115 (DE3) 均为实验室提供,酚、氯仿及氯化锂 (北京索莱宝科技有限公司), DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司), TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) (碧云天生物科技有限公司), 体外转录试剂盒及逆转录试剂盒 (宝日医生物技术 (北京) 有限公司), Cy3-UTP 荧光染料 (美国 Promega 公司) 和乙酸双氧铀 (上海吉雅生物科技有限公司)。

1.1.2 主要实验仪器

ECLIPSE Ts2 倒置显微镜 (日本尼康公司)、NanoDrop 微量分光光度计 (美国赛默飞公司)、动态光散射仪 (英国 Malvern Panalytical 公司) 和 120 kV 透射电镜 (日本 JEOL 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 RNA 纳米颗粒的设计

以 hTERT 的编码序列为靶标分子,采用在线工具 DSIR (<http://biodev.extra.cea.fr/DSIR/DSIR.html>)设计并筛选高效、特异的 siRNA 序列,筛选出得分较高、连续相同碱基小于 4 且靶点互不重叠的 4

条 siRNA 用于 RNA 纳米颗粒的构建(见表 1);利用 Hairpin-loop、Kissing-loop 及 Tetra-U 等 RNA 连接元件,将 4 条 siRNA 按特定顺序串联,合成一条长单链 RNA(lssRNA),该 lssRNA 遵循局部碱基互补配对原则,可自组装形成拓扑结构稳定的正方形 RNA 纳米颗粒,命名为 hTERT-square。

表 1 siRNA 及 RNA 纳米颗粒 hTERT-square 的序列

siRNA 名称	siRNA 序列(方向:5'→3')	hTERT-square 序列(方向:5'→3')
hTERT_siR1	UUGCUC CAGACACUCU UCCGG	GGGCAGAGUGGACCAUCAU UCCUUUUGCCAUAGCUGGAGUAG UCGCUCUGCACC GCAAGGUGCAGAGCGACUACUCCAGCUAUG GCUUUUGCUACCGGAAGAGUGUCUGGAGCAAGAGUGGACCAU CAUUCCUUUUGCCUAGAUGUUGGUGCACACCGUCUGGCUC CG GCCAGACGGUGUGCACCAACAUCUAGGCUUUUUGUCCCCCGGU GUACGCCGAGACCAAGAGUGGACCAUCAU UCCUUUUGCCUAG UUGAGCACGCUGAACAGUGCCC GCAAGGGCACUGUUCAGCGU GCUCAACUAGGCUUUUGCCUCAGGAACACCAAGAAGUUCAAA GGAGGCAUGAACUUCUUGGUGU UCCUGAGGCUUUUGGAAUG AUGGUCCACUCUUGGUCUCG GCGUACACCGGGGGACUUUUG GAAUGAUGGUCCACUCUUGC UCCAGACACUCU UCCGGUAGCU UUUGGAAUGAUGGUCCACUCUG CCCGGAUGGUCCACUCCUUA CACUUUUGGAAUGAUGGUCAAGCCUCCAGACCAUCAU UCCUU UUGCCUUCUAUUCGCUC CUCACACUGU UCCUUCGGGAACAGU GUGAGGAGCGAAUAGAAGGCUUUUGUGUAAGGAGUGGACCA UCC
hTERT_siR4	AUAGCUGGAGUAGUCGCUCUG	
hTERT_siR5	UAGAUGUUGGUGCACACCGUC	
hTERT_siR6	UAGUUGAGCACGCUGAACAGU	

1.2.2 RNA 纳米颗粒的样品制备

将化学合成 hTERT-square 序列克隆到 pET-28a 质粒,重组质粒转入大肠埃希菌 HT115(DE3)感受态细胞,挑取阳性克隆培养至 OD₆₀₀ 达 0.4~0.6,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 3~4 h;诱导后经离心收集菌体,采用酚-氯仿法提取细菌表达的 RNA 纳米颗粒,获得 hTERT-square 的初提物;使用 5 mol/L 的氯化锂对 RNA 纳米颗粒初提物进行纯化。采用 2%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,并采用 NanoDrop 微量分光光度计检测其纯度。

1.2.3 hTERT-square 纳米颗粒的理化性质分析

采用动态光散射仪测定 hTERT-square 纳米颗粒的粒径分布和 Zeta 电位。将 hTERT-square 纳米颗粒溶液稀释至 0.1 mg/mL,轻轻振荡混匀,使颗粒充分分散,避免聚集,确保样品透明、无明显悬浮物和气泡;取 1~2 mL 上述处理好的样品置于动态光散射仪的样品池中进行测量;温度、散射角和工作电压分别设置为 25 ℃、90°和 100 mV。每个样品设立 3 次重复,取平均值作为最终粒径结果。

1.2.4 hTERT-square 纳米颗粒的电镜检测

取 10 μL 质量浓度为 500 ng/μL 的 RNA 纳米颗粒溶液,垂直滴加于预处理铜网的中心区域,静置 1 min,使用滤纸以约 45°角轻触液滴边缘,缓慢吸除

多余液体;重复相同步骤滴加 10 μL 相同样品,以增强颗粒在载网表面的分散性,静置 1 min 并吸除多余液体。

负载完成后进行负染色处理:向铜网中央滴加 10 μL 质量分数 2%乙酸双氧铀染色液,在室温避光条件下染色 60 s,随后用滤纸吸除染色液并静置 30 s 以促使残余染色剂自然挥发;为优化图像对比度,重复染色一次,彻底吸除残余染液;将铜网置于恒温培养箱 37 ℃中干燥 12 h,以完成样品固化。使用透射电子显微镜在加速电压 120 kV 条件下进行观察,随机选取 5 个不同视野,放大倍数为 50000,采集图像用于形貌分析。

1.2.5 hTERT-square 纳米颗粒的热稳定性表征

取 40 μL 质量浓度为 100 ng/μL 的 hTERT-square 纳米颗粒溶液,分别置于 0、25、37、52 ℃和 70 ℃条件下孵育 30 min,以等量的 hTERT-siRNA 在相同温度条件下孵育 30 min 作为对照;孵育结束后,采用质量分数 2% 琼脂糖凝胶电泳分析 hTERT-square 纳米颗粒的完整性,使用质量分数 15%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 hTERT-siRNA 的热稳定性,通过 ImageJ 软件对电泳图进行灰度分析,计算各温度条件下样品的降解率,评估其热稳定性。

1.2.6 hTERT-square 纳米颗粒的酶学稳定性分析

取 40 μL 质量浓度为 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 hTERT-square 纳米颗粒,向各实验组分别加入不同体积的 RNase A 溶液,并以相应体积的缓冲液补足,使各组反应体系的总体积保持一致,各组反应体系中 RNase A 的终质量浓度分别为 0、100、200、300、400 ng/mL 和 500 ng/mL 。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 10 min,采用质量分数 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 hTERT-square 纳米颗粒的完整性,使用质量分数 15% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 hTERT-siRNA 的完整性,电泳结果利用 ImageJ 软件进行灰度分析,通过计算不同处理条件下样品的降解率,评估 hTERT-square 在 RNase A 溶液中的稳定性。

1.2.7 hTERT-square 纳米颗粒的细胞内吸收与保留特性分析

用 6 孔细胞培养板传代培养 Hep3B 肝癌细胞 24 h,加入 100 μL Cy3 荧光标记的 hTERT-square 纳米颗粒至培养液中,使其终浓度达到 300 $\text{ng}/\mu\text{L}$;以加入等量 Cy3 标记的 hTERT-siRNA 的细胞培养液为对照,分别于处理后 12、24 h 和 36 h,通过倒置荧光显微镜检测细胞中的荧光信号,确定 hTERT-square 和 hTERT-siRNA 的细胞摄取效率。

1.2.8 hTERT-square 纳米颗粒的基因调控的定量分析

采用 TRIzol 试剂提取 Hep3B 细胞中的总 RNA,用 DNase I 处理去除基因组 DNA,使用 RT-PCR 技术检测每个时间点的靶基因的表达水平,确定 hTERT-square 纳米颗粒对靶基因的沉默效率。反转录反应体系如下:在 1 mL 的离心管中分别加入总 RNA、反应缓冲液、RNase 抑制剂、dNTPs 和反转录引物各 1 μL 、MMLV 反转录酶 0.5 μL 、超纯水 5.5 μL ,混匀后放入 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 15 min,随后放入 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min 以失活反转录酶,制备 cDNA。qPCR 反应体系如下:在 200 μL 离心管中加入 2 $\times$ Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL 、cDNA、引物 hTERT-qp-F (5'-GCCGATTGTGAACATGGACTACG -3') 和 hTERT-qp-R (5'-GCTCGTAGTTGAGCACGCTGAA-3') 各 1 μL 、超纯水 7 μL ,混匀后在荧光定量 PCR 仪上进行扩增反应。内参基因为 GAPDH,上下游引物序列分别为 GAPDH-F: 5'-GCACTGGAACCTTCAACAC-3' 和 GAPDH-R: 5'-GGAGAGCCTTTCAGAGAAG-3'。反应结束后,根据扩增曲线及 C_t

值,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算靶基因在处理样本中的相对表达量。

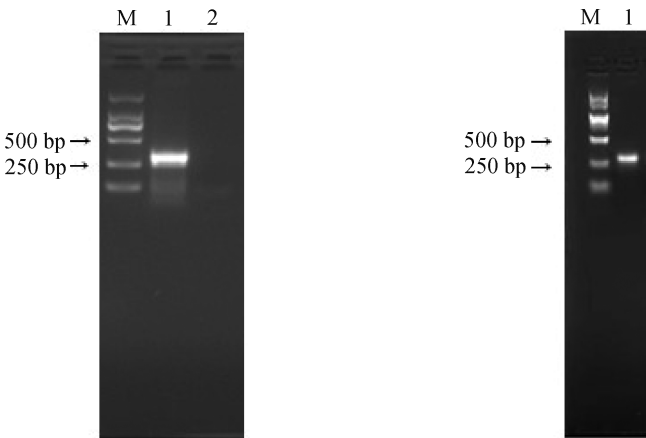
2 结果与讨论

2.1 hTERT-square 纳米颗粒的设计及制备

为实现对 hTERT 基因的高效沉默,基于 RNA 折纸设计原理,将 4 条靶向 hTERT 的 siRNA 通过特定连接元件(包括 Hairpin-loop、Kissing-loop 及 Tetra-U)组装为正方形 RNA 纳米颗粒 hTERT-square,将编码 siRNA 功能链的序列克隆至 pET-28a 载体,经 IPTG 诱导表达后,从大肠埃希菌中提取的 RNA 在 250 bp 处出现单一特异性条带,大小与理论值一致,表明 hTERT-square 在大肠埃希菌中成功表达(见图 1(a))。经 LiCl 纯化后电泳条带清晰,无明显杂质,表明制备的 hTERT-square 纯度较高。RNA 折纸结构可在大肠埃希菌系统中高效转录并自组装为稳定的纳米颗粒^[20],Shu 等^[21]利用类似的三向连接结构实现了 siRNA 的无载体表达与稳定折叠,验证了 RNA 结构在细胞环境中的自组装可行性。本文获得的单一特异性条带与上述文献报道结果一致,说明所设计的 hTERT-square 结构在原核系统中具有良好的折叠稳定性与可复制性,为后续生物学功能研究提供了可靠基础。

2.2 hTERT-square 纳米颗粒的形貌与尺寸特性

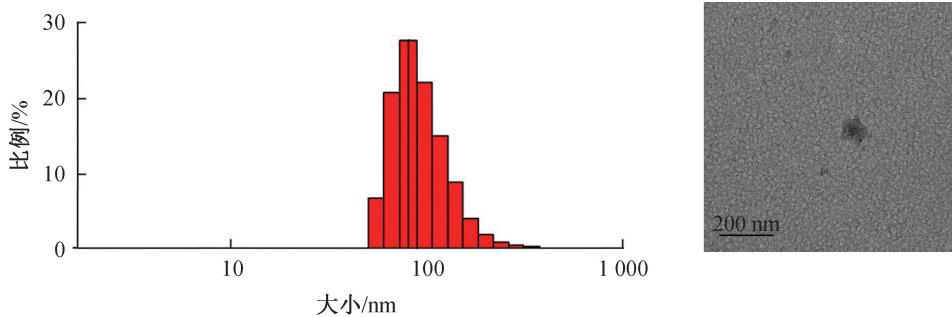
纳米颗粒的粒径分布对于细胞摄取及生物利用至关重要,粒径较小且分布均一的纳米颗粒更易被细胞摄取并实现高效递送,粒径不均则可能引起颗粒聚集,降低生物学效应^[22]。为了表征 hTERT-square 纳米颗粒的理化特征,通过动态光散射仪检测 hTERT-square 纳米颗粒的粒径大小及分布,结果如图 2(a)所示。从图 2 中可以看出:hTERT-square 纳米颗粒的粒径大小为 50~100 nm,分布均匀一致,表明制备的 hTERT-square 纳米颗粒稳定且不易聚集、质量较高。采用透射电镜对 hTERT-square 纳米颗粒的结构特征进行表征,hTERT-square 纳米颗粒呈致密片层状结构,部分区域显示类网状聚集(见图 2(b)),推测与 RNA 分子在干燥及染色过程中发生二次自组装有关^[23]。纳米颗粒的粒径和形态对细胞摄取和体内行为具有决定性作用,50~100 nm 的粒径范围被认为最有利于细胞内吞^[24-25],较低的 Zeta 电位减少了静电吸附和非特异结合,本文制备的 hTERT-square 具有适宜的理化特性,为后续高效的细胞摄取提供了结构基础。



(a) hTERT-square粗提取物凝胶电泳图 (b) hTERT-square纯化后凝胶电泳图

图 1 hTERT-square 纳米颗粒在大肠埃希菌中的诱导表达及纯化的电泳图

注:M 为 2000 bp Marker;图 1(a)中,泳道 1 为 hTERT-square 诱导表达,泳道 2 为未诱导对照。



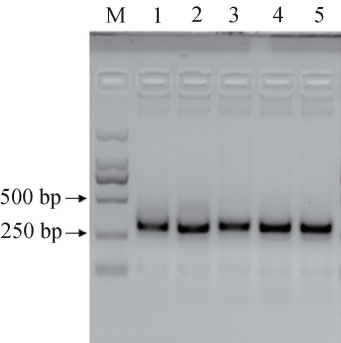
(a) hTERT-square纳米颗粒的粒径分布图 (b) hTERT-square结构的电镜照片

图 2 hTERT-square 纳米颗粒的粒径分析及结构表征

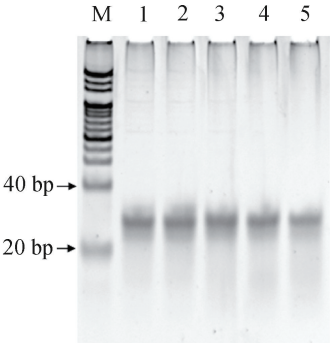
2.3 温度对 hTERT-square 纳米颗粒稳定性的影响

为了分析 hTERT-square 纳米颗粒的热稳定性,将样品置于不同温度(0~70 ℃)孵育 30 min,在 52 ℃以下未观察到明显降解,70 ℃条带略有减弱,整体结构仍保持完整(见图 3(a)),对照 hTERT-siRNA 在 52 ℃处理下出现了明显的降解(见图 3(b))。hTERT-square 纳米颗粒的降解率在 70 ℃条件下仅为 15%,明显低于对照 hTERT-siRNA 的 30%以上(见图 3(c)),说明 RNA 纳米颗粒比 hTERT-siRNA

具有更强的热稳定性。RNA 纳米结构的热稳定性与其内部的自组装拓扑密度及二级结构密切相关^[26],多螺旋交联或发卡环连接等结构单元可通过分子内氢键和碱基堆叠相互作用显著提升 RNA 的熔解温度,增强其抗热降解性能^[27-28]。本文制备的 hTERT-square 纳米颗粒在高温条件下仍能保持较低降解率,推测与其有序折叠及发卡环区域形成的稳固氢键网络有关,其结构特征为 RNA 折纸类纳米颗粒在生理环境中的稳定递送提供了理论依据。



(a) 不同温度下的hTERT-square凝胶电泳图



(b) 不同温度下的hTERT-siRNA凝胶电泳图

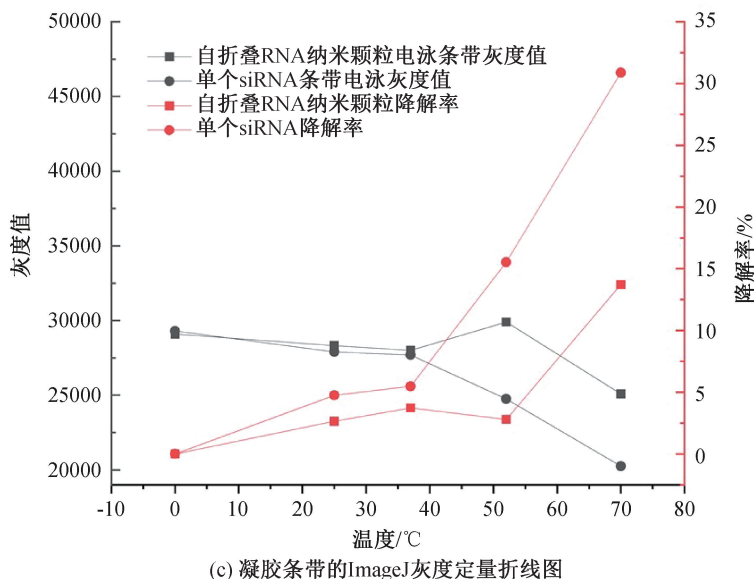


图 3 hTERT-square 纳米颗粒的热稳定性分析

注:M 为 2000 bp Marker;泳道 1~5 分别为 0、25、37、52 °C 和 70 °C 孵育的样品。

2.4 RNase A 对 hTERT-square 纳米颗粒稳定性的影响

核酸类纳米材料在体内应用过程中易受到核酸酶的降解作用,为评估 hTERT-square 对 RNase A 的耐受性及其递送稳定性,对其降解情况进行分析。在 300 ng/mL 与 400 ng/mL 条件下条带逐渐出现不同程度弥散,在 500 ng/mL 时完全降解(见图 4(a))。灰度定量显示,其在 300、400 ng/mL 与 500 ng/mL 条件下的降解率分别约为 16%、42% 和 95%(见图 4(c))。相比之下,hTERT-siRNA 在质量浓度为 100 ng/mL 的 RNase A 中即出现明显降解(见图 4(b)),降解率约 20%,显著高于 hTERT-square 在相同条件下的稳定性。RNA 折纸结构的抗酶性能与其自组装密度、环状封闭结构及多螺旋交联有关,这些特征可减少暴露的切割位点并通过氢键与堆叠作用提升稳定性^[29-30]。hTERT-square 在较高 RNase A 浓度下仍能保持部分完整结构,推测与其高度有序的三维拓扑结构形成的空间屏蔽效应有关,为其在复杂生理环境中的稳定存在提供了必要基础。

2.5 hTERT-square 纳米颗粒在 Hep3B 肝癌细胞中的内化效率及驻留时长

为验证 hTERT-square 纳米颗粒在无转染试剂条件下的细胞摄取能力,将 Cy3 荧光标记的 hTERT-square 纳米颗粒直接加入 Hep3B 肝癌细胞培养液中继续培养,采用荧光显微镜观察不同时间点 Hep3B 肝癌细胞内的荧光信号,结果如图 5 所示。从图 5 可以看出:对照 hTERT-siRNA 在所有

时间点均未观察到荧光信号,表明游离的 siRNA 在没有递送载体的情况下无法穿透细胞膜进入细胞内;经 Cy3 荧光标记的 hTERT-square 在处理细胞 12 h 后,Hep3B 肝癌细胞内出现明显的荧光信号;在处理 24 h,细胞内的荧光强度有所减弱;至 36 h,Hep3B 细胞内的荧光信号全部消失,表明 hTERT-square 纳米颗粒可以在不借助任何转染试剂的情况下直接进入细胞,在 Hep3B 肝癌细胞内至少可以驻留 24 h,在细胞内可稳定存在超过 24 h。粒径大小在 50~200 nm 范围内的纳米颗粒可通过网格蛋白介导的内吞途径高效进入细胞^[31],RNA 折纸结构的有序空间折叠与均一粒径可有效促进内体摄取与逃逸^[21],并减少溶酶体滞留风险^[32]。hTERT-square 可在无载体条件下高效进入细胞并维持较长的胞内驻留时间,说明其表面结构与带电特性适合与细胞膜相互作用,裸 siRNA 因负电荷排斥和快速降解难以进入细胞,进一步验证了 RNA 纳米结构设计的重要性。

2.6 hTERT-square 纳米颗粒对 Hep3B 肝癌细胞增殖的抑制效果

为了评估 hTERT-square 纳米颗粒在肝癌模型中的生物学活性,通过 CCK-8 法检测其对 Hep3B 细胞增殖的影响。以 PBS 处理组的细胞存活率作为 100% 的参照,结果如图 6 所示。从图 6 可以看出:Hep3B 细胞在 hTERT-square 作用 24、48 h 和 72 h 时的平均存活率分别下降至约 80%、60% 和 50%;随着处理时间延长,细胞活性呈时间依赖性下降,提示 hTERT-square 具有持续增强的增殖抑制

效应。靶向 hTERT 的 siRNA 可通过下调端粒酶活性、诱导细胞周期阻滞并促进肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤生长^[19,33]。本文制备的 hTERT-square 纳米

颗粒在无外源转染试剂的条件下即可显著降低 Hep3B 细胞活性,说明其具有良好的生物活性及高效递送潜力,为后续探索其抗肿瘤机制奠定基础。

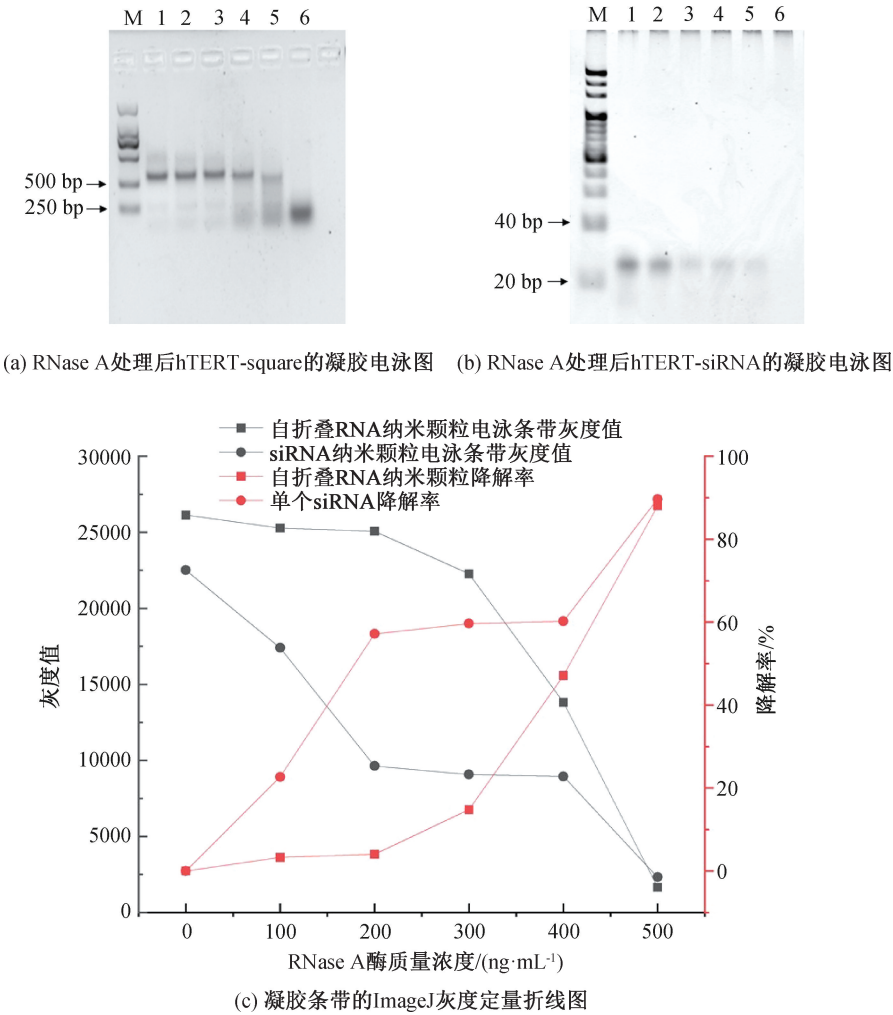
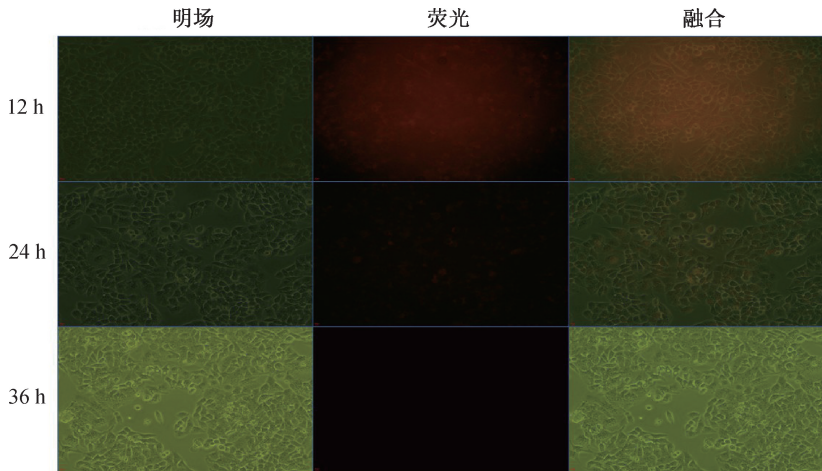


图 4 hTERT-square 纳米颗粒在不同质量浓度的 RNase A 中的耐受性

注: M 为 2000 bp Marker;泳道 1,无 RNase A 处理;泳道 2~6,RNase A 质量浓度分别为 100、200、300、400 ng/mL 和 500 ng/mL。



(a) hTERT-square纳米颗粒在不同时间点的荧光显微图

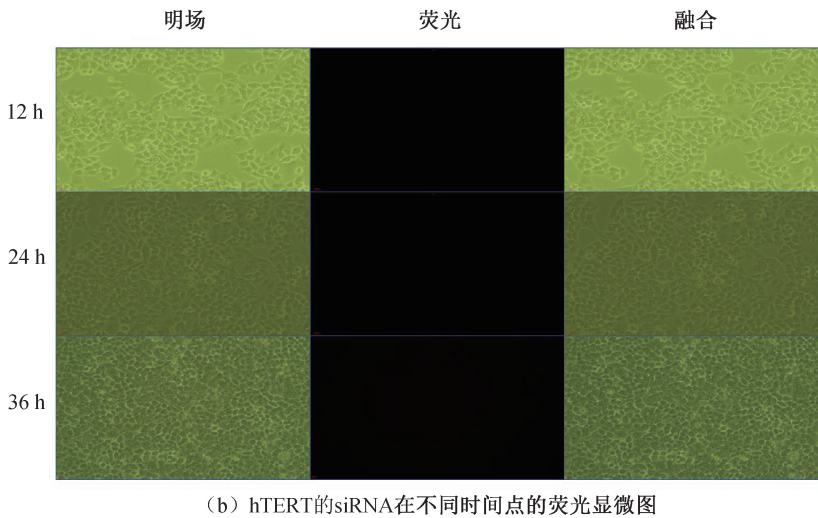


图 5 hTERT-square 纳米颗粒在 Hep3B 肝癌细胞内的摄取效率及驻留时长

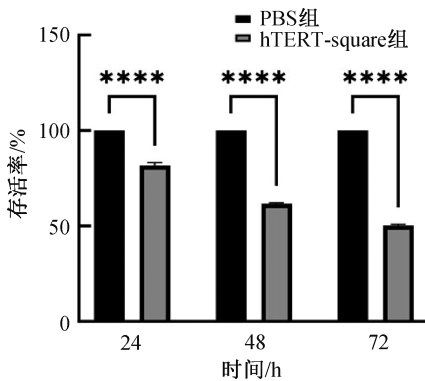


图 6 Hep3B 细胞增殖的 CCK-8 测定结果统计图

注:3 个生物学重复,以 mean±SEMs 表示;*** 表示显著差异($P<0.001$),**** 表示极显著差异($P<0.0001$)。

2.7 hTERT-square 纳米颗粒抑制肝癌基因 mRNA 表达的分析

为了评估 hTERT-square 纳米颗粒对靶基因的调控效果,采用 qRT-PCR 检测其在 Hep3B 细胞中对 hTERT mRNA 水平的影响,结果如图 7 所示。图 7 显示:与对照组相比,细胞在经 hTERT-

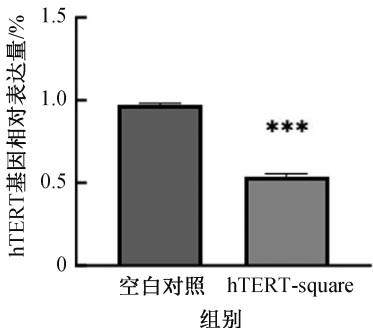


图 7 Hep3B 细胞中 hTERT 基因 mRNA 的 qRT-PCR 检测图

注:3 个生物学重复,以 mean±SEMs 表示;*** 表示显著差异($P<0.001$),**** 表示极显著差异($P<0.0001$)。

square 处理 24 h 后,hTERT 的 mRNA 表达量下降约 50%,表明该纳米颗粒能够有效诱导 RNAi 过程并实现靶基因沉默,与增殖抑制结果一致,提示细胞活性下降与 hTERT 表达减少具有一致性关联。已有研究表明,hTERT 是调控肿瘤细胞无限增殖能力的关键分子,其下调可引发细胞周期阻滞并抑制肿瘤生长^[34]。hTERT-square 依赖自身结构即可进入细胞并触发 RNAi 通路,在无任何外源递送体系条件下仍能实现显著的基因沉默作用。

3 结 论

本文基于 RNA 折纸纳米技术,构建了一种靶向 hTERT 的正方形 RNA 纳米颗粒 hTERT-square,并分析了其理化性质、生物学活性及抗肿瘤作用机制,主要结论如下:

- a)hTERT-square 纳米颗粒的粒径范围为 50~100 nm,形态均一;
- b)该结构在不同温度处理及 RNase A 处理条件下保持较高完整性;
- c)hTERT-square 可在无外源转染试剂条件下进入 Hep3B 细胞,并在胞内维持超过 36 h;
- d)处理后可降低 Hep3B 细胞活性,并在 24 h 时下调 hTERT 的 mRNA 水平。

本文制备的 hTERT-square 纳米颗粒在结构稳定性、自主递送及 RNAi 效率方面均表现出显著优势,为开发新一代安全、高效的 RNA 干扰治疗药物提供了新思路与技术支撑。未来可进一步探索其在动物体内的长期分布、免疫反应及多靶点癌症治疗中的应用潜力。

参考文献:

- [1] Kim D H, Rossi J J. RNAi mechanisms and applications[J]. *BioTechniques*, 2008, 44(5): 613-616.
- [2] Setten R L, Rossi J J, Han S P. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2019, 18(6): 421-446.
- [3] Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2015, 16(9): 543-552.
- [4] Adams D, Gonzalez-Duarte A, O' Riordan W D, et al. Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2018, 379(1): 11-21.
- [5] Scott L J. Givosiran: first approval[J]. *Drugs*, 2020, 80(3): 335-339.
- [6] Hou X, Zaks T, Langer R, et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery[J]. *Nature Reviews Materials*, 2021, 6(12): 1078-1094.
- [7] Kedmi R, Ben-Arie N, Peer D. The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(26): 6867-6875.
- [8] Van Der Meel R, Sulheim E, Shi Y, et al. Smart cancer nanomedicine[J]. *Nature Nanotechnology*, 2019, 14(11): 1007-1017.
- [9] Geary C, Grossi G, Mcrae E K S, et al. RNA origami design tools enable cotranscriptional folding of kilobase-sized nanoscaffolds[J]. *Nature Chemistry*, 2021, 13(6): 549-558.
- [10] Yip T, Qi X, Yan H, et al. Therapeutic applications of RNA nanostructures[J]. *RSC Advances*, 2024, 14(39): 28807-28821.
- [11] Zhao M, Wang R, Yang K, et al. Nucleic acid nanoassembly-enhanced RNA therapeutics and diagnosis [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2023, 13(3): 916-941.
- [12] Afonin K A, Bindewald E, Yaghoubian A J, et al. In vitro assembly of cubic RNA-based scaffolds designed in silico[J]. *Nature Nanotechnology*, 2010, 5(9): 676-682.
- [13] Afonin K A, Grabow W W, Walker F M, et al. Design and self-assembly of siRNA-functionalized RNA nanoparticles for use in automated nanomedicine[J]. *Nature Protocols*, 2011, 6(12): 2022-2034.
- [14] Shay J W, Wright W E. Role of telomeres and telomerase in cancer[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2011, 21(6): 349-353.
- [15] Liu J P. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity[J]. *The FASEB Journal*, 1999, 13(15): 2091-2104.
- [16] Choi S H, Cho K J, Yun S H, et al. HKR3 regulates cell cycle through the inhibition of hTERT in hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Journal of Cancer*, 2020, 11(9): 2442-2452.
- [17] Huang F W, Hodis E, Xu M J, et al. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma[J]. *Science*, 2013, 339(6122): 957-959.
- [18] Zhang P H, Zou L, Tu Z G. RNAi-hTERT inhibition hepatocellular carcinoma cell proliferation via decreasing telomerase activity[J]. *Journal of Surgical Research*, 2006, 131(1): 143-149.
- [19] Gou X, Wang W, Zhou F, et al. siRNA-mediated inhibition of hTERT enhances chemosensitivity of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2008, 7(10): 1555-1560.
- [20] Li M, Zheng M, Wu S, et al. In vivo production of RNA nanostructures via programmed folding of single-stranded RNAs[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2196.
- [21] Shu D, Shu Y, Haque F, et al. Thermodynamically stable RNA three-way junction for constructing multifunctional nanoparticles for delivery of therapeutics [J]. *Nature Nanotechnology*, 2011, 6(10): 658-667.
- [22] Li H, Lee T, Dziubla T, et al. RNA as a stable polymer to build controllable and defined nanostructures for material and biomedical applications[J]. *Nano Today*, 2015, 10(5): 631-655.
- [23] Tarapore P, Shu Y, Guo P, et al. Application of phi29 motor pRNA for targeted therapeutic delivery of siRNA silencing metallothionein- II A and survivin in ovarian cancers [J]. *Molecular Therapy*, 2011, 19(2): 386-394.
- [24] Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, et al. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell [J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(14): 4218-4244.
- [25] Geary C, Rothmund P W K, Andersen E S. A single-stranded architecture for cotranscriptional folding of RNA nanostructures[J]. *Science*, 2014, 345(6198): 799-804.
- [26] Afonin K A, Kasprzak W, Bindewald E, et al. Computational and experimental characterization of RNA cubic nanoscaffolds [J]. *Methods*, 2014, 67(2): 256-265.
- [27] Onizuka K, Hazemi M E, Thomas J M, et al. Synthesis of native-like crosslinked duplex RNA and study of its properties [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2017, 25(7): 2191-2199.
- [28] Grabow W W, Jaeger L. RNA self-assembly and RNA nanotechnology[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2014, 47(6): 1871-1880.
- [29] Guo P. The emerging field of RNA nanotechnology[J]. *Nature Nanotechnology*, 2010, 5(12): 833-842.
- [30] Liu J, Guo S, Cinier M, et al. Fabrication of stable and RNase-resistant RNA nanoparticles active in gearing the nanomotors for viral DNA packaging[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(1): 237-246.
- [31] Albanese A, Tang P S, Chan W C W. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2012, 14: 1-16.
- [32] Revia R A, Stephen Z R, Zhang M. Theranostic nanoparticles for RNA-Based cancer treatment [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(6): 1496-1506.
- [33] Cong Y S, Wright W E, Shay J W. Human telomerase and its

regulation[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 407-425.

[34] Shay J W, Wright W E. Telomerase: a target for cancer therapeutics[J]. Cancer Cell, 2002, 2(4): 257-265.

团队介绍

金伟波教授团队专注于核酸药物的开发和递送研究,主要研究方向包括核酸药物的分子设计以及递送系统的开发和优化等。团队包括教授 1 名、副教授 1 名、讲师 1 名、硕士研究生 10 余名。金伟波,博士,教授,浙江理工大学“521 青年拔尖人才”,嘉兴市科技创新创业领军人才,浙江省生物化学与分子生物学学会理事。曾在美国加州大学和英国伍斯特大学访学一年。吴方丽,副教授,2008 年 6 月获西北农林科技大学微生物学专业博士学位,2023 年 10 月—2024 年 10 月任英国伍斯特大学科学与环境学院访问学者。团队先后承担国家自然科学基金 4 项、浙江省自然科学基金项目 4 项、企业合作项目 5 项;发表 SCI 论文 40 余篇,获得授权发明专利 13 项。团队已建立 RNA 药物的生物信息学设计分析平台和应用技术平台,近期在 RNA 纳米载体领域取得突破性进展,已开发多种新型 RNA 纳米递送载体,并成功应用于动物疫苗、动物抗病毒以及植物病害防治领域,相关研究水平处于国际前列。

(责任编辑:张会巍)