



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.03.016

<http://xbyx.xysm.net/xbwk/fileup/PDF/201403320.pdf>

## 核酸适配子在疾病诊断研究中的应用

张攀 综述 张焜和 审校

(南昌大学第一附属医院消化内科, 南昌 330006)

[摘要]核酸适配子是通过指数富集的配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术从单链随机寡核苷酸文库中筛选得到的单链寡核苷酸配体, 其与靶标的结合具有高特异性及高亲和力等优点, 使其能广泛地应用于疾病诊断研究。适配子在生化检测、新肿瘤标志物发现、分子成像、病原微生物检测等领域的研究应用中均有报道, 并显示出良好的应用前景。

[关键词] 适配子; 指数富集的配体系统进化; 靶标; 诊断

## Nucleic acid aptamers in diagnosis of diseases

ZHANG Pan, ZHANG Kunhe

(Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

### ABSTRACT

Aptamers are single-stranded oligonucleotide ligands selected from a random pool of oligonucleotide sequences by systematic evolution of ligands by exponential enrichment. With the advantages of binding to targets with high specificity and affinity, aptamers have been used in the diagnosis widely, such as biochemistry detection, discovery of new tumor markers, molecular imaging, pathogenic and microorganism detection, showing a good application prospect.

### KEY WORDS

aptamer; systematic evolution of ligand by exponential enrichment; target; diagnosis

1990年Tuerk等<sup>[1]</sup>和Ellington等<sup>[2]</sup>通过指数富集的配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术筛选出能与噬

菌体T4 DNA聚合酶和有机染料分子特异结合的寡核苷酸, 即适配子。随着科学技术的不断发展, 适配子在医学领域的应用更加宽广, 为疾病诊断

收稿日期(Date of reception): 2013-06-30

作者简介(Biography): 张攀, 硕士研究生, 主要从事核酸适配子的临床诊断研究。

通信作者(Corresponding author): 张焜和, Email: yfyzkh@sina.com

基金项目(Foundation item): 江西省科技支撑计划项目(20133BBG70025); 江西省教育厅科技落地计划项目(KJLD13014)。This work was supported by the Science and Technology Pillar Program of Jiangxi Province (20133BBG70025), the Science and Technology Landing Program of Department of Education of Jiangxi Province (KJLD13014), P. R. China.

研究提供了许多新的思路。

## 1 SELEX技术及适配子特征

SELEX技术是利用人工合成的随机单链寡核苷酸文库, 并将其与靶标进行结合反应, 然后分离与靶标结合的核酸, 并以其模板进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增制备出新的文库, 用于下一轮的筛选。经过8~20次筛选之后, 文库与靶标的结合率不再升高。最后一次筛选得到的文库与靶标的结合具有高度亲和性, 对其进行克隆、测序和鉴定后, 选择有价值的适配子用于靶标识别的相关研究。

单链寡核苷酸, 尤其是RNA分子, 常形成发夹、假节、茎环、G-四聚体等二级结构, 以及各种三维空间立体结构。适配子主要通过分子构象匹配与靶分子特异性结合。用于适配子筛选的随机文库的容量高达 $10^{14}$ 个以上, 理论上自然界所有存在的分子都能从中找到构象匹配的核酸序列(适配子)。SELEX技术经过多年发展, 已衍生出复合靶SELEX, 活细胞SELEX, 基因组SELEX, 组织切片SELEX等多种形式。

适配子的功能与抗体类似, 主要用于所针对的靶分子的识别与分析, 但其具有独特的优势: 1) 靶标范围广。适配子所能结合的靶标远远多于抗体, 除了蛋白质、核苷酸分子外, 还可以是金属离子、有机染料, 甚至可以是细菌、病毒、寄生虫等; 2) 亲和力高、特异性强。适配子与靶标相互作用形成稳定的复合物, 其解离常数(dissociation constant, Kd)一般在nmol/L~pmol/L之间, 且能分辨靶标结构上的细微差别, 如金葡菌能分泌多种类型的肠毒素(staphylococcal enterotoxins, SEs)。DeGrasse等<sup>[3]</sup>筛选出一种适配子, 能选择性地与SEB结合, 而和其他SEs并无反应, 其亲和力及特异性均优于抗体; 3) 分子质量小、稳定性高。适配子易于通过细胞膜, 能更简便地检测细胞内靶分子, 经过适当的化学修饰后, 半衰期延长, 稳定性提高, 可长期保存并常温下运输, 利于科学实验及临床疾病诊治的开展; 4) 标记和修饰方便。适配子在保持原有生物学活性基础上能进行精确的位点修饰(如生物素及荧光素标记等), 可用于分子成像等疾病诊断方法。

## 2 核酸适配子在血液生化检测研究中的应用

血液生化检测是临床上诊断疾病和评估预后

的重要手段, 利用适配子与血液中的靶分子进行高敏感性、高亲和力结合的方法相对于传统的方法具有一定的优势。

脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)是由心室肌细胞合成和分泌的一种神经激素。BNP浓度的检测在临床上广泛地应用于急性呼吸困难患者以及急性心力衰竭患者的预后评估。Lin等<sup>[4]</sup>运用SELEX技术筛选出一组DNA适配子, 能与BNP紧密结合, 其中适配子8-12与靶标亲和力最高; 利用荧光标记的适配子结合微流体实验芯片技术可以快速定量血液中的BNP浓度, 相比传统的检测方法(如免疫分析法和放射免疫分析法), 费用更低而可靠性更高, 具有良好的应用前景。

C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是机体炎症、感染或组织损伤时产生的一种非特异性的急性时相蛋白。CRP由5个完全相同的亚基组成, 称五聚体结构CRP(pentameric structure CRP, pCRP)。研究<sup>[5]</sup>表明CRP和冠心病、动脉粥样硬化、心肌梗死等心血管相关疾病有着密切的关系。Bini等<sup>[6]</sup>构建了一种光学RNA适配子传感器用于CRP检测, 其检测下限可达0.005 mg/L, 远低于正常血清中CRP的平均浓度0.8 mg/L, 具有高度的敏感性。而且, 他们还对传感器设计过程中各种参数(如适配子的固定条件、结合条件等)进行评估优化, 为随后的临床应用奠定了基础。单一亚基型CRP(monomeric subunits of CRP, mCRP)在炎症及动脉粥样硬化评估中占主要作用。Wang等<sup>[7]</sup>筛选出只与mCRP特异性结合的适配子, 对pCRP无反应, 且具有较好的亲和力(Kd值为187.7 nmol/L), 不仅可以检测出纳摩尔级浓度的mCRP, 还能有效区分CRP不同的亚型, 对于心血管疾病风险评估有重要意义。

## 3 核酸适配子在肿瘤诊断中的应用

以肿瘤标志物为靶标筛选相关的适配子并应用于肿瘤诊断研究, 使不少肿瘤标志物的适配子相继被筛选出来。Lupold等<sup>[8]</sup>使用SELEX技术, 首次筛选出两种前列腺特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen, PSMA)的RNA适配子。随后以此为基础研发出一种新显像剂应用于影像学检查, 在动物实验中取得了良好的效果<sup>[9]</sup>。Lee等<sup>[10]</sup>筛选出甲胎蛋白( $\alpha$ -fetoprotein, AFP)的适配子, 并发现其能抑制AFP阳性肝癌细胞的增殖和扩散。更重要的是, 研究者们利用适配子发现了许多新的肿瘤标志物。

### 3.1 新肿瘤标志物的发现

发现新的肿瘤标志物以进一步提高肿瘤的临床诊断水平,一直是近年来的研究热点。基于适配子寻找肿瘤标志物是一种发现肿瘤标志物的新策略。Ray等<sup>[11]</sup>分别以胰腺癌细胞及正常胰腺导管上皮细胞的分泌蛋白为靶标,使用细胞SELEX技术,经过多次正面及负面筛选步骤,筛选出亲和力最高的适配子M9-5,用于小样本血清检测(其中胰腺癌患者血清、健康人血清分别为24例),其检测胰腺癌的敏感度和特异度分别达到92%和96%。质谱分析证实M9-5的靶标为亲环素B,亲环素B的发现有可能成为早期胰腺癌一个新肿瘤标志物。Dua等<sup>[12]</sup>也通过类似方法筛选出适配子SQ-2,捕获到一种胎盘碱性磷酸酶样蛋白(alkaline phosphatase placental-like 2, ALPPL-2),该蛋白被认为是胰腺癌的一个具有潜在应用价值的新标志物。

传统的适配子筛选方法一般都在试管内进行, Mi等<sup>[13]</sup>则将一组随机RNA文库注射入肿瘤负荷的小鼠体内,在小鼠血清中筛选出一组与肿瘤蛋白结合紧密的适配子,其中适配子14-16和肿瘤蛋白亲和力最高(Kd值为30.8 nmol/L)。后证实适配子14-16的靶标是一种RNA解螺旋酶P68,而P68蛋白在大肠癌存在过度表达。这种在活体内直接筛选适配子的方法具有更高的特异性,使得适配子与不相关靶物质结合的概率减少,也为研究者发现新肿瘤标志物提供了一种新的方法。

### 3.2 肿瘤分子成像

适配子在肿瘤分子成像中的应用极其广泛,特别是与纳米材料的联合,进一步推动了其向临床应用的方向发展。CT成像造影剂一般使用碘分子化合物,无肿瘤靶向成像功能。Kim等<sup>[14]</sup>使用金纳米材料与PSMA的特异性适配子形成共轭物,能够特异识别表达PSMA的前列腺癌细胞,而且具有无毒、成像时间相对较长等优点,使其作为新的造影剂用于前列腺癌的CT诊断有较大的临床应用价值。Bagalkot等<sup>[15]</sup>把PMSA的适配子A10与量子点(quantum dot, QD)以及阿霉素(doxorubicin, Dox)结合形成复合物QD-Apt(Dox),根据荧光共振能量转移原理,不仅可以靶向投递化学治疗药物,而且能同时进行肿瘤荧光成像,具有诊断和治疗双功能。适配子和纳米材料的结合为肿瘤分子成像研究开辟了新途径。

已设计出一种可激活适配子的探针(activatable aptamer probe, AAP),当探针处于自由态时,表现出荧光淬灭,而当探针与癌细胞结合时,会引发其构象的自发性改变,从而激活荧光信号。Shi

等<sup>[16]</sup>据此原理,将AAP应用于活体肿瘤分子成像,能有效地减少非靶向组织发射荧光信号所产生的干扰,并使用急性淋巴细胞白血病的特异性适配子sgc8设计出相应探针来诊断小鼠急性淋巴细胞白血病取得了成功。随着肿瘤相关适配子的不断发现, AAP的应用范围也会更加广泛。

## 4 核酸适配子在病原微生物检测中的应用

临床上,传统的方法检测病原微生物并不难,但由于敏感度及特异性等问题通常导致假阳性或假阴性,并且部分检测方法(如结核分枝杆菌痰培养等)耗时较长,适配子的应用可以通过改良传统检测方法而有助于解决上述问题。

### 4.1 病毒和细菌检测

丙型肝炎(丙肝)病毒(hepatitis C virus, HCV)感染通常导致肝硬化或者肝癌。Chen等<sup>[17]</sup>使用细胞SELEX技术筛选出一组适配子,能与HCV包膜糖蛋白E2紧密结合。基于适配子独特的优势,利用酶联免疫吸附法即可用类似乙肝病毒表面抗原检测的方法检测出HCV的E2表面抗原,这种新方法可以跳过常规丙肝抗体检测的窗口期,对丙肝进行早期检测。其中与E2亲和力最高的适配子ZE2[Kd值为(1.05±1.00) nmol/L]还能与E2蛋白竞争HCV的重要受体CD81,对于丙肝的治疗也有一定的临床意义。有趣的是, Park等<sup>[18]</sup>也利用类似的方法并在此基础上加以改进,前者使用E2抗原的抗体来捕获HCV,而适配子只起检测作用;后者把用以捕获HCV的抗体也替换成适配子,因此,2个适配子在其模型中起到两种不同的作用。他称此方法为“酶联适配子吸附法”(enzyme linked aptosorbent assay, ELASA),并初步阐述了HCV感染率与分析值之间的关系,为其临床应用又迈出了前进的一步。

适配子同样可应用于细菌学检测。肺结核(tuberculosis, TB)病例的及时诊断对于该疾病传播途径的控制起到至关重要的作用,传统的痰涂片及痰培养的检测方法存在一定的局限性,如痰涂片法的敏感度较低,而痰培养的方法耗时过长等。特异性抗原(10 kD culture filtrate protein, CFP10)和(6 kD early secreted antigen target, ESAT6)是两个被认为较好的TB生物标志物, Rotherham等<sup>[19]</sup>筛选出异质二聚体CFP10.ESAT6的适配子CSRI2.11,通过一种称为“酶联寡核苷酸吸附试验”(enzyme-linked oligonucleotide assay, ELONA)的方法,检测了一组小样本TB病人(n=20)

和非TB病人的痰液( $n=48$ ), 其诊断TB的敏感度达100%, 特异性达68.75%, 相比传统的检测方法具有一定的优势。当然, 由于ELONA法检测TB的过程需要数个小时才能完成, 并存在抗原交叉反应等因素的局限, 尚需要对适配子进行进一步的优化才能更好地应用于临床。

#### 4.2 寄生虫检测

适配子靶标范围广泛, 对寄生虫也有良好的亲和力。查加斯病是由克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*)引起的一种人兽共患的寄生原虫病, 可侵犯患者多种器官甚至导致猝死, 其血清学检测容易因疾病某一时相体内抗体滴度较低而呈假阴性。Nagarkatti等<sup>[20]</sup>筛选出相关特异性适配子能与活的*T. cruzi*结合(Kd值为8~25 nmol/L), 将链霉亲和素磁珠结合与*T. cruzi*亲和力最高的适配子Apt68用于捕获活的锥虫, 便于显微镜下观察, 同时应用磁分离技术可以对血样本中适配子锥虫复合物进行提取, 用于实时PCR检测。

疟疾是一种在热带及亚热带广泛传播的疾病。Lee等<sup>[21]</sup>筛选出疟原虫乳酸脱氢酶(plasmodium lactate dehydrogenase, pLDH)的适配子PL1, 利用电化学阻抗光谱学设计出一种简单的适配子传感器, 能有效地检测间日疟原虫和恶性疟原虫, 其检测下限达1 pmol/L。同时, 该适配子传感器还应用于实际的临床血标本检测, 发现设计出来的传感器能很好地区分感染和非感染的病人。但美中不足的是, 此传感器目前只能检测出两种最主要疟原虫。而随后利用PL1与金纳米材料及阳离子聚合物又设计出一种比色适配子传感器<sup>[22]</sup>, 可以随着pLDH的浓度变化而发生颜色的改变, 便于肉眼观察, 可用于相关试剂盒的开发。上述两种适配子相关的检测技术都具有简便、快速、高度敏感的优点, 对于开辟新的寄生虫检测方法具有潜在的指导意义。

## 5 结论及展望

SELEX技术及适配子经过20多年的探索与发展, 已在诸多领域中受到越来越多研究者的重视。适配子独特的生物学优势决定其在医学领域的应用极为广泛。基于适配子的疾病诊断方法优于一些传统的诊断方法, 从而提供了许多新的诊断思路及模式, 特别是联合纳米技术等现代科学的应用, 可进一步提升疾病诊断的水平。

当然, 目前适配子在疾病诊断中的研究主要还处于基础实验及动物实验阶段, 要实现真正意义上

的临床应用, 还面临诸多的挑战。首先大部分的适配子都是在实验室特定环境之下筛选而来, 其与靶标的结合特性可能会受到多种因素的影响, 有研究<sup>[23]</sup>称某些适配子在不同的温度条件下和靶标的亲和力存在较为明显的差异。在变化的环境中, 某一适配子能否保持其高度的敏感性及特异性还有待验证; 其次适配子在生物体内易被核酸酶降解, 人体复杂的生理环境对于适配子实际应用于临床诊断提出了很高的要求。对适配子进行化学修饰在某种程度上能解决上述问题, 但修饰方法种类繁多, 如何选择简单、有效的修饰方式, 也是需要面临的问题。虽然基于适配子的疾病诊断与实际的临床应用还有一段距离, 但伴随研究的不断深入, 可以预见其将为疾病的临床诊断开辟一条全新的道路。

#### 参考文献

1. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to Bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. *Science*, 1990, 249(4968): 505-510.
2. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. *Nature*, 1990, 346(30): 818-822.
3. De Grasse JA. A single-stranded DNA aptamer that selectively binds to Staphylococcus aureus enterotoxin B[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): 33410.
4. Lin MC, Nawarak J, Chen TY, et al. Rapid detection of natriuretic peptides by a microfluidic LabChip analyzer with DNA aptamers: Application of natriuretic peptides detection[J]. *Biomicrofluidics*, 2009, 3(3): 33410.
5. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update[J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(12): 1805-1812.
6. Bini A, Centi S, Tombelli S, et al. Development of an optical RNA-based aptasensor for C-reactive protein[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 390(4): 1077-1086.
7. Wang MS, Black JC, Knowles MK, et al. C-reactive protein(CRP) aptamer binds to monomeric but not pentameric form of CRP[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401(4): 1309-1318.
8. Lupold SE, Hicke BJ, Lin Y, et al. Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(14): 4029-4033.
9. Chen Y, Foss CA, Byun Y, et al. Radiohalogenated prostate-specific membrane antigen (PSMA)-based ureas as imaging agents for prostate cancer[J]. *J Med Chem*, 2008, 51(24): 7933-7943.
10. Lee YJ, Lee SW. Regression of hepatocarcinoma cells using RNA

- aptamer specific to alpha-fetoprotein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(1): 521-527.
11. Ray P, Rialon-Guevara KL, Veras E, et al. Comparing human pancreatic cell secretomes by in vitro aptamer selection identifies cyclophilin B as a candidate pancreatic cancer biomarker[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(5): 1734-1741.
  12. Dua P, Kang HS, Hong SM, et al. Alkaline phosphatase ALPPL-2 is a novel pancreatic carcinoma-associated protein[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(6): 1934-1945.
  13. Mi J, Liu Y, Rabbani ZN, et al. In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs[J]. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(1): 22-24.
  14. Kim D, Jeong YY, Jon S. A drug-loaded aptamer-gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer[J]. *ACS Nano*, 2010, 4(7): 3689-3696.
  15. Bagalkot V, Zhang L, Levy-Nissenbaum E, et al. Quantum dot-aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer[J]. *Nano Lett*, 2007, 7(10): 3065-3070.
  16. Shi H, He X, Wang K, et al. Activatable aptamer probe for contrast-enhanced in vivo cancer imaging based on cell membrane protein-triggered conformation alteration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(10): 3900-3905.
  17. Chen F, Hu Y, Li D, et al. CS-SELEX generates high-affinity ssDNA aptamers as molecular probes for hepatitis C virus envelope glycoprotein E2[J]. *PLoS One*, 2009, 4 (12): 8142.
  18. Park JH, Jee MH, Kwon OS, et al. Infectivity of hepatitis C virus correlates with the amount of envelope protein E2: development of a new aptamer-based assay system suitable for measuring the infectious titer of HCV[J]. *Virology*, 2013, 439(1): 13-22.
  19. Rotherham LS, Maserumule C, Dheda K, et al. Selection and application of ssDNA aptamers to detect active TB from sputum samples[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): 46862.
  20. Nagarkatti R, Bist V, Sun S, et al. Development of an aptamer-based concentration method for the detection of *Trypanosoma cruzi* in blood[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): 43533.
  21. Lee S, Song KM, Jeon W, et al. A highly sensitive aptasensor towards *Plasmodium lactate dehydrogenase* for the diagnosis of malaria[J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 35(1): 291-296.
  22. Jeon W, Lee S, Dh M, et al. A colorimetric apta-sensor for the diagnosis of malaria based on cationic polymers and gold nanoparticles[J]. *Anal Biochem*, 2013, 439(1): 11-16.
  23. Zhou J, Soontornworajit B, Wang Y. A temperature-responsive antibody-like nanostructure[J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11(8): 2087-2093.

(本文编辑 傅希文)

本文引用: 张攀, 张焜和. 核酸适配子在疾病诊断研究中的应用 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2014, 39(3): 320-324. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.03.016

**Cite this article as:** ZHANG Pan, ZHANG Kunhe. Nucleic acid aptamers in diagnosis of diseases[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2014, 39(3): 320-324. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.03.016