

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.05.019

肿瘤细胞特异性适配子筛选技术及其应用的研究进展

Tumor cell-specific aptamers selected by cell-SELEX and its applications

张瑞秀, 徐文 综述; 殷正丰 审阅(第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室, 上海 200438)

[摘要] 指数富集的配基系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)应用人工合成的随机寡核苷酸文库,通过筛选、分离、富集获得能与各种配体特异结合的寡核苷酸适配子(aptamer)。适配子能特异性结合多肽、蛋白质等多种靶分子,且具有高亲和力。细胞-SELEX技术在SELEX基础上发展起来,它以活细胞为基础,可以在对肿瘤细胞分子标志物一无所知的情况下有效地筛选出肿瘤细胞特异性适配子,是一个潜在的发现肿瘤细胞新标志物的理想策略。肿瘤细胞特异性适配子作为分子探针,在肿瘤基础研究、早期诊断,以及靶向治疗方面展示了巨大的应用前景。目前已筛选出淋巴细胞白血病、肝癌等多种肿瘤细胞的适配子,这些适配子已应用在肿瘤细胞检测,肿瘤早期发现、诊断、游离肿瘤细胞的分选和富集,以及肿瘤细胞靶向药物递送等方面,并且由于适配子适用范围广泛、易于修饰等特点,显示出良好的敏感性、特异性和其他独特的优越性。适配子在肿瘤研究中受到越来越多的关注,在肿瘤检测、诊断和治疗等方面发挥重要作用。

[关键词] 细胞-SELEX;适配子;肿瘤细胞

[中图分类号] R730.54; R730.4; R392-33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)05-0561-04

随着核酸结合蛋白研究的深入,人们发现DNA或RNA不仅在遗传信息的储存、传递中发挥重要作用,而且可通过自身特有的结构与其他分子相互识别和作用。因此,20世纪90年代Tuerk等^[1]以此为基础发展了一种研究核酸结构、功能及进化的新组合化学方法——指数富集的配基系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)。SELEX技术建立人工合成的单链随机寡核苷酸文库,并在体外筛选能高亲和性和高特异性结合各种靶分子的寡核苷酸片段。这些短单链DNA或RNA分子被称之为“适配子”(aptamer)。适配子虽然在本质上不同于抗体,但其识别模式和功能特性类似于抗体,可形成合适的三维结构,满足分子识别的需要^[2],加之其靶标分子非常广泛,因此适配子在药物研发、基础研究等领域中有着良好的应用前景^[3,4]。近年来,适配子在肿瘤研究中的应用进展很快,不仅发展了以活细胞为基础的细胞-SELEX技术,而且筛选出一些针对肿瘤细胞表面分子的适配子。开发这些适配子将有助于进一步提高肿瘤检测、诊断和治疗水平。本文综述有关细胞-SELEX技术以及靶向肿瘤细胞的适配子的应用研究进展。

1 细胞-SELEX技术及其特点

SELEX技术的基本原理是利用大容量的随机寡核苷酸文库与靶分子相互作用,从中筛选出与靶

分子特异结合的寡核苷酸,并结合体外PCR扩增技术,使其得到指数级富集,如此循环数轮最终筛选出高亲和力和高特异性的寡核苷酸配体。SELEX开始于化学合成的随机寡核苷酸文库,包括单链RNA文库、单链DNA文库和含有修饰基团的核苷酸文库。通常文库是由中间的一定长度的随机序列和5'、3'端两端用于PCR扩增的固定序列构成^[1,5]。细胞-SELEX技术在SELEX技术的基础上发展起来,其核心是利用任意两种完整活细胞膜表面分子水平之间的差异(而不是单个或几个纯化的靶分子)来筛选能特异性识别靶细胞的适配子,以准确地区分正常细胞和靶细胞。

适配子的靶标分子非常广泛,蛋白质、核酸、肽段、氨基酸及金属离子等都可以成为适配子的靶标,在药物研发、基础研究等领域中的应用越来越广泛^[6-7]。不仅如此,应用细胞-SELEX技术获得靶向活细胞表面分子的适配子比筛选针对纯化靶蛋白的适配子具有更多优势,可以不需要预先知道靶细胞

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30801342)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30801342)

[作者简介] 张瑞秀(1981-),女,山东省临沂市人,硕士,助理研究员,主要从事肝癌转移、复发方面的研究。E-mail: crossecho@yahoo.com.cn

[通信作者] 殷正丰(YIN Zheng-feng, corresponding author), E-mail: yinzfk@yahoo.com.cn

相关分子的变化或差异信息,也不需要纯化特定的靶分子,就可以利用完整细胞筛选出结合细胞表面特异性蛋白的探针,从而准确的区分正常细胞和靶细胞^[8-10]。细胞-SELEX 技术及适配子的这些特点使其在肿瘤研究中发挥越来越重要的作用。

2 细胞-SELEX 技术用于筛选肿瘤细胞特异性适配子

肿瘤标志物在肿瘤的辅助诊断、肿瘤类型的鉴别、疗效观察、预后判断等方面起重要作用。细胞-SELEX 技术可被直接用来进行肿瘤细胞标志物的筛选,细胞-SELEX 筛选出的适配子对肿瘤细胞具有较高的特异性和亲和力。不仅如此,该方法可以不需要预先知道肿瘤细胞相关分子的变化或差异信息,也不需要纯化特定的靶分子,就可以利用完整细胞筛选出结合肿瘤细胞表面特异性蛋白的探针。另外,适配子可以和肿瘤细胞表面不同的生物标志物结合,这样一次筛选过程可能产生几个不同的适配子序列,提高了识别肿瘤细胞的特异性。肿瘤细胞特异性适配子作为分子探针,在肿瘤早期诊断、靶向治疗以及基础研究方面展示了巨大的应用前景。已有的实验^[11-14]已证实,细胞-SELEX 是一个发现肿瘤细胞新标志物的理想策略。

细胞-SELEX 技术同样是先化学合成随机单链 DNA 文库,然后将文库与肿瘤细胞及对照细胞在一定温度下孵育,然后洗涤细胞,去除非特异性结合的部分,收集与靶细胞结合的序列。分离得到的序列经过 PCR 扩增产生次级文库,用于下一轮筛选,由此进入一个反复筛选富集的过程。大约经过 15~20 轮的筛选富集,分离得到的随机序列与靶物质亲和力不再提高,即可进行克隆、测序,并进一步对单个核酸分子进行亲和力、特异性等生物活性的检测及其分子识别、三级结构分析等研究^[15]。采用这种方法已经筛选出淋巴细胞白血病、髓性白血病、肝癌、小细胞肺癌和结直肠癌等多种肿瘤细胞特异性适配子^[16-18]。筛选出的适配子不仅具有较高的特异性和亲和力,可以特异性识别肿瘤细胞,甚至可以识别同种肿瘤细胞的不同细胞亚型。

3 适配子用于肿瘤细胞检测

肿瘤细胞的分子特征,特别是肿瘤特异性蛋白特征的鉴定,对肿瘤早期诊断具有重要意义。近年来已筛选出很多肿瘤相关蛋白的适配子。这些适配子可以识别肿瘤细胞特异性蛋白,能准确区分不同的肿瘤细胞甚至肿瘤细胞的不同亚型,并且只需要

较少数量的肿瘤细胞^[19-20],因此在肿瘤早期发现、准确诊断方面已显示出较高的特异性和敏感性。黏蛋白 1(mucoprotein-1, MUC1)是分布于腺上皮细胞的跨膜蛋白,在肿瘤细胞表面表达量较高,且肿瘤细胞表面 MUC1 的糖基化与正常细胞存在差异。与 MUC1 特异性结合的适配子可用于上皮性肿瘤的诊断与治疗。比如,放射性标记 MUC1 适配子可以对上皮性肿瘤进行显像和治疗等^[21]。腱糖蛋白(Tenascin-C)是细胞外基质中一种大分子细胞外基质糖蛋白,在肿瘤组织特别是神经胶质瘤中高表达。Hicke 等^[22]以人神经胶质细胞瘤细胞 U251 为模型,筛选了 Tenascin-C 特异性适配子,标记后用于肿瘤成像检测。此外,针对血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、NF- κ B、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、前列腺特异性膜抗原 PSMA 等肿瘤相关蛋白的特异性适配子也相继被筛选出来^[23-25]。

另外, DNA 适配子易于化学修饰,可以在合成时精确、定点连接其他功能基团和分子,如巯基、氨基和荧光素、生物素、酶或金属微粒等,并且可以预测其二、三级结构,从而有利于信号富集和细胞检测。Medley 等^[26]把细胞特异性适配子连接到 5~100 nm 的金微粒上,与靶细胞结合后富集带有金颗粒的细胞,反应液会呈现出颜色变化,如使用 50 nm 的金颗粒可呈现红色,并在 600 nm 波长处具有最高吸光值。这种方法很敏感,可检测到 90 个细胞。而 1 000 个标记细胞则可以通过肉眼观察到颜色变化。Huang 等^[27]合成了 12 nm \times 56 nm 的金-银微粒,可以连接约 80 个荧光标记的适配子分子,从而大大增强适配子与靶细胞的亲和力与荧光信号。可见,基于适配子的细胞检测方法简单、快速、直接和敏感,具有临床应用的潜能。

不仅如此,适配子还可以用来检测肿瘤细胞膜上某些蛋白的分布、密度等特点,借以了解肿瘤细胞的特性和生物学功能。Chen 等^[28]采用细胞-SELEX 方法筛选出酪氨酸激酶特异性适配子,荧光标记后与人白血病 CCRF-CEM 细胞系及宫颈癌 Hela 细胞系反应,最后通过荧光相关光谱学方法检测。根据细胞膜上的荧光分布特点即可分析细胞膜上酪氨酸蛋白激酶受体的分布情况。

4 适配子用于循环肿瘤细胞分选和富集

根据肿瘤细胞转移的途径,在血液或淋巴管中循环的肿瘤细胞被定义为循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)。肿瘤患者 CTC 的检测在诊断及

预后评估中的价值已得到越来越多研究者的关注。体内肿瘤通常每天释放约 10^6 个肿瘤细胞到血液中,但在整个循环系统中肿瘤细胞的含量很低,每 10 ml 血液中可能仅含少数几个 CTC。因此,检测血液或其他体液中很少的游离肿瘤细胞一直是一个很大的挑战^[29-30]。现有的富集方法通常是基于 CTC 的物理性质(密度和大小)或免疫学特性,但由于循环肿瘤细胞含量非常少并缺乏有效的肿瘤细胞特异性标志物,加上技术本身的缺陷,使有关 CTC 的研究进展比较缓慢,现有的分离、检测技术方法有较高的假阳性或假阴性结果,至今尚未有一个统一的实验方案和标准。

微流控细胞亲和装置可以从患者血样本中捕获数量很少的肿瘤细胞,在一定程度上可以应对这个问题。Dharmasiri 等^[31]设计了一个用 PSMA 抗体适配子捕获前列腺癌细胞的微芯片装置。把 PSMA 抗体适配子固定在微芯片装置的聚甲基丙烯酸甲酯表面。当前列腺癌细胞经过连接有 PSMA 适配子抗体的通道时就会被捕获下来,捕获率高达 90%。Xu 等^[32]也报道了基于适配子的微流控系统捕获细胞,该装置在 S 型的通道里设计了 3 个细胞捕获区域,将不同的肿瘤细胞特异性适配子固定在不同的区域,当细胞通过该装置时,特定细胞就可以被其特异性适配子捕获。捕获的细胞纯度可达 80% 以上,并且对细胞的形态和活性影响较小,有利于进行后续的研究。

5 适配子用于肿瘤细胞靶向药物递送

肿瘤化疗药物本身对肿瘤细胞缺乏特异性,在杀伤肿瘤细胞的同时也杀伤正常细胞。如将细胞毒性药物连接肿瘤细胞特异性分子探针,则可以介导药物特异性杀伤肿瘤细胞,减少毒性作用。由于具有高度敏感性和亲和力、易于合成以及没有免疫原性等优点,适配子在这方面显示出独特的优越性。Huang 等^[33]报道了急性 T 淋巴细胞白血病细胞的适配子与多柔比星(doxorubicin)连接后具有更有效的肿瘤细胞杀伤作用。Min 等^[34]把针对 PSMA(+)和 PSMA(-)的适配子与多柔比星连接,共同作用于前列腺癌细胞系,不仅可以选择性递送到 PSMA(+)细胞,而且可以作用于 PSMA(-)细胞,极大地提高了药物特异性和疗效。

为了使适配子介导的药物能更好地进入细胞内部发挥作用,可将纳米胶粒分子连接到适配子上。胶粒疏水基团在内部,亲水基团在外面,可发挥表面活性物质的作用。Cao 等^[35]把连接顺铂的适配子-

聚乙二醇与多功能脂质体相连,由于细胞膜的基本骨架是磷脂双分层,以及脂质体结构上可以连接多个适配子,与靶细胞的结合能力增强,药物复合物更容易穿过细胞膜进入细胞内部。

6 结 语

细胞-SELEX 技术自产生以来,已经在肿瘤研究的不同领域得到广泛应用。细胞-SELEX 可以在不了解肿瘤细胞标志物的情况下筛选出肿瘤细胞特异性适配子,是一种发现肿瘤细胞特异性分子探针的有效途径。随着适配体筛选技术研究水平的进一步提高,以及与分子信标、纳米技术、生物芯片等技术结合应用的发展,适配体以其高特异性、高亲和力、可修饰、易于制备等特点,可以更加快速、灵敏、特异、自动化地进行肿瘤标志物的筛选,新的特异肿瘤标志物的发现,将大大促进肿瘤的早期诊断。此外,适配子与肿瘤细胞结合的特异性可以用于化疗药物的靶向递送,增强化疗效果的同时减轻对正常细胞的毒性损伤。相信随着该技术的不断发展,适配子在肿瘤研究和应用中的诸多优势会得到研究者更多的关注,在肿瘤检测、诊断和治疗等方面发挥更重要的作用。

[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(5): 505-510.
- [2] Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX-a revolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands [J]. *Biomol Eng*, 2007, 24(4): 381-403.
- [3] Kulbachinskiy AV. Methods for selection of aptamers to protein targets [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2007, 72(13): 1505-1518.
- [4] Kaur G, Roy I. Therapeutic applications of aptamers [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008, 17(1): 43-60.
- [5] Hicke BJ, Stephens AW. Escort aptamers: A delivery service for diagnosis and therapy [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(8): 923-928.
- [6] Osborne SE, Matsumura I, Ellington AD. Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: Problems and prospects [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 1997, 1(1): 5-9.
- [7] Famulok M, Hartig JS, Mayer G. Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics and therapy [J]. *Chem Rev*, 2007, 107(9): 3715-3743.
- [8] Shanguan D, Li Y, Tang Z, et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(32): 11838-11843.
- [9] Xiao Z, Shanguan D, Cao Z, et al. Cell-specific internalization study of an aptamer from whole cell selection [J]. *Chemistry*,

- 2008, 14(6): 1769-1775.
- [10] Sefah K, Shangguan D, Xiong X, et al. Development of DNA aptamers using cell-SELEX [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(6): 1169-1185.
- [11] Phillips JA, Lopez-Colon D, Zhu Z, et al. Applications of aptamers in cancer cell biology [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 621(2): 101-108.
- [12] Kunii T, Ogura S, Mie M, Kobatake E. Selection of DNA aptamers recognizing small cell lung cancer using living cell-SELEX [J]. *Analyst*, 2011, 136(7): 1310-1312.
- [13] Van Simaey D, López-Colón D, Sefah K, et al. Study of the molecular recognition of aptamers selected through ovarian cancer cell-SELEX [J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e13770.
- [14] Berezovski MV, Lechmann M, Mushevich MU, et al. Aptamer-facilitated biomarker discovery (AptaBiD) [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(28): 9137-9143.
- [15] Zhang Y, Chen Y, Han D, et al. Aptamers selected by cell-SELEX for application in cancer studies [J]. *Bioanalysis*, 2010, 2(5): 907-918.
- [16] Sefah K, Tang Z, Shangguan D, et al. Molecular recognition of acute myeloid leukemia using aptamers [J]. *Leukemia*, 2009, 23(4): 235-244.
- [17] Chen H, Medley C, Sefah K, et al. Molecular recognition of small-cell lung cancer cells using aptamers [J]. *Chem Med Chem*, 2008, 3(6): 991-1001.
- [18] Sefah K, Meng L, Lopez-Colon D, et al. DNA aptamers as molecular probes for colorectal cancer study [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e14269.
- [19] Zhao Z, Xu L, Shi X, et al. Recognition of subtype non-small cell lung cancer by DNA aptamers selected from living cells [J]. *Analyst*, 2009, 134(9): 1808-1814.
- [20] Pu Y, Zhu Z, Liu H, et al. Using aptamers to visualize and capture cancer cells [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(8): 3225-3233.
- [21] Ferreira CS, Cheung MC, Missailidis S, et al. Phototoxic aptamers selectively enter and kill epithelial cancer cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(3): 866-876.
- [22] Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, et al. Tumor targeting by an aptamer [J]. *J Nucl Med*, 2006, 47(4): 668-678.
- [23] Ireson CR, Kelland LR. Discovery and development of anticancer aptamers [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(12): 2957-2962.
- [24] Sennino B. Two is better than one: Benefits of VEGF and PDGF inhibition in ovarian cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(3): 183-185.
- [25] Nonaka Y, Sode K, Ikebukuro K. Screening and improvement of an anti-VEGF DNA aptamer [J]. *Molecules*, 2010, 15(1): 215-225.
- [26] Medley C, Smith J, Tang Z, et al. Gold nanoparticle-based colorimetric assay for the direct detection of cancerous cells [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(4): 1067-1072.
- [27] Huang Y, Chang H, Tan W. Cancer cell targeting using multiple aptamers conjugated on nanorods [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(3): 567-572.
- [28] Chen Y, Munteanu AC, Huang YF, et al. Mapping receptor density on live cells by using fluorescence correlation spectroscopy [J]. *Chemistry*, 2009, 15(21): 5327-5336.
- [29] Liotta L, Saitel M, Kleinerman J. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process [J]. *Cancer Res*, 1976, 36(3): 889-894.
- [30] Nagrath S, Sequist L, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology [J]. *Nature*, 2007, 450(7173): 1235-1239.
- [31] Dharmasiri U, Balamurugan S, Adams A, et al. Highly efficient capture and enumeration of low abundance prostate cancer cells using prostate-specific membrane antigen aptamers immobilized to a polymeric microfluidic device [J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(18): 3289-3300.
- [32] Xu Y, Phillips JA, Yan J, et al. Aptamer-based microfluidic device for enrichment, sorting, and detection of multiple cancer cells [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(17): 7436-7442.
- [33] Huang Y, Shangguan D, Liu H, et al. Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells [J]. *Chem Bio Chem*, 2009, 10(5): 862-868.
- [34] Min K, Jo H, Song K, et al. Dual-aptamer-based delivery vehicle of doxorubicin to both PSMA (+) and PSMA (-) prostate cancers [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(8): 2124-2132.
- [35] Cao Z, Tong R, Mishra A, et al. Reversible cell-specific drug delivery with aptamer-functionalized liposomes [J]. *Angew Chem Int Engl*, 2009, 48(35): 6494-6498.

[收稿日期] 2011-06-15 [修回日期] 2011-09-20

[本文编辑] 韩丹

本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司	封二
上海医元生物基因发展有限公司	封三
碧迪医疗器械有限公司	封四