

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.07.046

## 适配子在肿瘤研究中的应用进展\*

甘晓云<sup>1</sup>, 伍锡栋<sup>2</sup>, 刘涛<sup>1</sup>综述, 张五萍<sup>1△</sup>审校

(1. 江西省人民医院药剂科, 南昌 330006; 2. 江西省药物研究所药理室, 南昌 330006)

[关键词] 适配子; Cell-SELEX; 肿瘤; 应用

[中图分类号] R73

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)07-0979-03

在 20 世纪 90 年代初, 美国的 Tuerk 等<sup>[1-2]</sup>在实验室中发明了一种叫做指数富集配基的系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术, 由此技术筛选出来的寡核苷酸命名为适配子(aptamers)。适配子可以和抗体媲美, 甚至优于抗体。具有以下特点<sup>[3]</sup>: (1)可以保持蛋白的天然结构属性, 性能稳定, 可以常温运输、长期保存; (2)筛选适配子过程简单, 周期短(一般 2 个月左右); (3)相对分子质量比抗体分子小, 具有快速的血浆清除率、高组织穿透力、免疫原性低、变性可逆(数分钟内可以再生, 因此可以反复使用); (4)可在适配子中插入基因组或化学合成修饰(镜像异构适配子、糖基化、连接在大分子载体等方法)实现多层次调控, 可直接用于生物检测、诊断及肿瘤靶向治疗。现结合肿瘤方面阐述细胞 SELEX(Cell-SELEX)及其适配子在肿瘤研究中的应用及意义。

### 1 采用 Cell-SELEX 技术筛选适配子

Cell-SELEX 技术是将整个细胞作为靶标筛选出特异性结合的寡核苷酸适配子的方法, 该技术可以不需要了解靶细胞的分子组成、蛋白结构及其他差异性信息, 其核心技术是利用任意 2 种完整的活细胞膜表面分子水平之间的差异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。具体方法: 将体外用组合化学的方法合成随机寡核苷酸序列 DNA/RNA 作为筛选的原库, 与靶细胞(一般选择过表达细胞)孵育以筛掉不与靶细胞结合的序列, 再与同源细胞系为对照细胞(一般选择低表达/不表达细胞)孵育以筛掉与靶细胞和对照细胞都结合的序列, 得到的特异性序列经过体外 PCR/RT-PCR 扩增技术, 得到的双链 PCR 样品, 经过 8% 尿素胶/链霉亲和素磁珠分离等方法得到单链 DNA/RNA 用于下一轮筛选的次文库。经过多轮筛选(一般 5~20 轮), 最终获得的单链 DNA/RNA 进行克隆测序, 分析序列同源性得到与靶细胞高亲和力、特异性强结合的适配子。

### 2 在标志物发现上的应用

**2.1 在肿瘤标志物上的应用** 由于在癌变的过程中, 相关的基因表达异常导致了癌细胞各种表面分子尤其是蛋白水平的改变。陈文学等<sup>[4]</sup>应用荧光标记适配子, 与流式细胞技术结合, 对正常鼻咽癌上皮细胞株与鼻咽癌细胞株进行 Cell-SELEX 消减筛选出特异性适配子。目前, 应用 Cell-SELEX 技术筛选得到了针对肿瘤相关蛋白血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factors, PDGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、HER<sub>3</sub>、NF-κB、Tenascin-C、Nucleolin 以及甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)<sup>[5]</sup>、黏蛋白 1

(mucin1, MUC1)等核酸适配子已广泛应用于肿瘤的診断和靶向治疗研究<sup>[6]</sup>。

**2.2 在病毒、细菌标志物上的应用<sup>[7]</sup>** 近年来, 在人类免疫缺陷病毒(HIV)gag 相关蛋白、大肠杆菌以及抗菌药物(四环素、新霉素和青霉素类抗菌药物等)等方面多有报道。Handy 等<sup>[8]</sup>用毒素-蛋白联合物的方法筛选出首个海洋毒素 STX 的适配体, 并且能运用到食源性毒素检测中。适配子与靶分子结合能力强, 解离度常数(kd)常在 pmol/L~nmol/L 之间。Hamula 等<sup>[9]</sup>运用改良 Cell-SELEX 筛选出嗜酸乳酸菌的完整活细胞的适配体, 其平均解离系数为(13±3)nmol/L, 并得到 hemag1P 特异性和亲和力最高。Khati 等针对变异株病毒 gp120 部分保守区域(结合细胞因子)筛选得到 2'F-RNA 适配子不但能高亲和力结合 gp120, 而且将抑制 HIV-1 感染人外周血单核细胞(PBMCs)的活性提高了 1 000 倍。Wang 等<sup>[10]</sup>筛选出朊病毒蛋白的适配子, 可以特异识别不同构象的朊蛋白, 避免了抗体的局限性, 因而有可能用于疯牛病等疾病的诊断。

### 3 在肿瘤诊断中的应用

**3.1 适配子与生物工具结合性诊断应用** 目前, Cell-SELEX 筛选得到的适配子应用在诊断上主要有流式细胞分析法、生物/压电生物传感器、物质谱、表面增强拉曼散射等。核酸适配子具有优越于抗体独特的性质, 结合现代细胞遗传学以及分子生物学的 MICM 等技术, 使得诊断手段由细胞水平上升到亚细胞水平及分子水平。诸如生物传感器技术的发展, 核酸适配子-生物芯片复合物等在临床诊断上的应用, 与 Cell-SELEX 技术在临床诊断上取得了较好效果, 如刘星等<sup>[11]</sup>用生物传感器-SELEX 技术对弓形虫(TOX)等进行了多通道间检测, 检测系统稳定性良好, 线性检测范围理想。有报道核酸适配子也可以制成生物芯片, 用于体内分子成像研究, 能特异地同时定量检出 3 种混于血清和细胞提取物中肿瘤相关蛋白(次黄嘌呤单磷酸脱氢酶 II、血管内皮生长因子和碱性成纤维生长因子)。

**3.2 适配子作为探针性诊断应用** 基于适配子的特异性识别功能, 可以设计出很多应用在临床上检测诊断的新方法, 如以荧光染料<sup>[12]</sup>、纳米粒子及电化学活性探针等多种探针性应用形式增加检测灵敏度。Shi 等<sup>[13]</sup>利用 TD05 与荧光染料 Cy5 组成 Cy5-TD05 探针成功用于 B 细胞性淋巴瘤移植小鼠的体内分子成像, 可以更准确地靶向诊断肿瘤; Gao 等<sup>[14]</sup>合成的适配子 GMT8-纳米粒子能有效定位于恶性胶质瘤移植小鼠的肿瘤位点; Chen 等<sup>[15]</sup>用连有抗肝癌细胞核酸适配体的荧光共振能量转移(FRET)纳米粒实现了对不同肿瘤细胞的检测; Avci-Adali 等<sup>[16]</sup>设计了一个可激活的核酸适配体荧光探针用于体

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260406)。 作者简介: 甘晓云(1972—), 主管药师, 本科, 主要从事肿瘤靶向治疗研究。

△ 通讯作者, Tel: 13755614930; E-mail: zhangwupingbest@163.com。

内肿瘤成像,这种探针只有在与细胞膜表面蛋白结合后,才会引起探针上的荧光分子激发,从而用于肿瘤早期组织的检测诊断。诸多适配子的探针性检测方法不仅灵敏度高,而且特异性强,对肿瘤发生的早期诊断和防治具有积极的意义。

#### 4 在肿瘤治疗中的应用

近来研究发现,第 1 个通过美国食品药品监督管理局(FDA)批准的适配子药物 Macugen<sup>[17]</sup>对糖尿病性黄斑水肿、增生性糖尿病视网膜病和视网膜静脉狭窄也有一定的治疗效果<sup>[18]</sup>。目前,针对核仁蛋白的 AS1411 适配子已经进入临床试验。靶向药物可以提高肿瘤的治疗效率,降低药物治疗产生的毒副作用,适配子与细胞的结合具有很好的靶向性,常与现代生物技术结合应用于肿瘤靶向治疗中,本身作为靶向材料/运输工具与化疗药物耦联形成轭合物,以及应用于纳米脂质体、小分子干扰 RNA 等技术。

适配子具有相对安全、血浆清除率快、组织穿透力强、价格适中等优点。Meng 等<sup>[19]</sup>将适配子 TLS11a-GC 与多柔比星组成 TLS11a-GC-Dox 轭合物能特异性结合肝癌细胞 LH86 并抑制肝癌细胞增长;Gao 等<sup>[14]</sup>借助纳米分子生物化学技术,合成适配子 GMT8-多西紫杉醇-纳米粒子靶向药物提呈系统以诱导恶性胶质瘤细胞凋亡和抑制肿瘤生长;Rao 等<sup>[20]</sup>通过脂质体法将抗 HPV16-E6 核酶、空载体质粒分别导入宫颈癌 CaSki 细胞,对照发现转染核酶的 CaSki 细胞 E6 基因的表达明显减少,对化疗药物顺铂敏感性增加了 2 128 倍,细胞凋亡率明显增加;Zhang 等<sup>[21]</sup>以乳腺癌细胞 MCF-10ATI 为靶细胞筛选出的适配子 KMF2-1a 能特异运送大分子链霉亲和素进入靶细胞,若将 KMF2-1a 结合其他介质如化疗药物用于乳腺癌诊治或许能产生靶向治疗的作用;Kurosaki 等<sup>[22]</sup>研发出一种由质粒 DNA、聚乙烯亚胺和 MUC1 组成的肿瘤靶向基因输送系统,显著抑制表达 MUC1 人类肺癌细胞株 A549 细胞的生长。

#### 5 适配子的应用前景

目前,适配子实际应用仍受诸多限制,在人体内使用的安全性以及稳定性等评价尚需做很多工作。近 20 年来,Cell-SELEX 技术在不断地革新,尤其是新型的分子生物技术以及材料等高科技技术的不断发展,如流式细胞分析技术、原子力显微镜技术、小分子 RNA 干扰技术以及生物芯片、纳米技术等前沿技术的发展,适配子筛选技术将能很好地促进肿瘤标志物的发现、早期诊断以及靶向治疗。Cell-SELEX 筛选技术与分子生物学技术组合的新技术也在不断出现,诸如与光学适体传感器的结合、生物共振、免疫组织化学荧光等多重组合。相信随着针对适配子在肿瘤研究的不断深入,越来越多针对肿瘤、病毒以及细菌等靶分子筛选的适配子将被更多地应用于临床,对肿瘤的临床诊断治疗及药物的研究开发都将带来更广阔的前景。

#### 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(6287):818-822.  
 [3] Sefah K,Shangguan D,Xiong X,et al. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX[J]. *Nat Protoc*,2010,5(6):1169-1185.

[4] 陈文学,张焜和,邹学森,等. SELEX 法筛选鼻咽癌核酸适配子的研究[J]. *山东医药*,2012,52(23):31-33.  
 [5] 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.  
 [6] Syed MA, Pervaiz S. Advances in aptamers[J]. *Oligonucleotides*,2010,20(5):215-224.  
 [7] Ni X, Castanares M, Mukherjee A, et al. Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons[J]. *Curr Med Chem*,2011,18(27):4206-4214.  
 [8] Handy SM, Yakes BJ, DeGrasse JA, et al. First report of the use of a saxitoxin-protein conjugate to develop a DNA aptamer to a small molecule toxin[J]. *J Int Soc Toxinol*,2013,61:30-37.  
 [9] Hamula CL, Zhang H, Guan LL, et al. Selection of aptamers against live bacterial cells[J]. *Anal Chem*,2008,80(20):7812-7819.  
 [10] Wang P, Hatcher KL, Bartz JC, et al. Selection and characterization of DNA aptamers against PrP(Sc)[J]. *Exp Biol Med(Maywood)*,2011,236(4):466-476.  
 [11] 刘星,秦莲花,罗阳,等. 快速检测 TOX、CM VlgG 抗体的适配子型 SPR 传感器微阵列的初步构建[J]. *第三军医大学学报*,2012,34(8):765-767.  
 [12] 王丽,张存政,刘媛,等. 基于分子信标的有机磷农药适配体活性位点分析及改造[J]. *分析化学*,2012,40(6):940-944.  
 [13] Shi H, Tang ZW, Kim YM, et al. In vivo fluorescence imaging of tumors using molecular aptamers generated by cell-SELEX[J]. *Chemistry-An Asian J*,2010,5(10):2209-2213.  
 [14] Gao H, Qian J, Yang Z, et al. Whole-cell SELEX aptamer-functionalised poly(ethyleneglycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles for enhanced targeted glioblastoma therapy[J]. *Biomaterials*,2012,33(26):6264-6272.  
 [15] Chen X, Estévez MC, Zhu Z, et al. Using aptamer-conjugated fluorescence resonance energy transfer nanoparticles for multiplexed cancer cell monitoring[J]. *Anal Chem*,2009,81(16):7009-7014.  
 [16] Avcı-Adalı M, Paul A, Wilhelm N, et al. Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for single-stranded DNA generation[J]. *Molecules*,2009,15(1):1-11.  
 [17] Ng EW, Shima DT, Calias P, et al. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2006,5(2):123-132.  
 [18] Zechmeister-Koss I, Huic M. Vascular endothelial growth factor inhibitors(anti-VEGF) in the management of diabetic macular oedema: a systematic review[J]. *Br J Ophthalmol*,2012,96(2):167-178.  
 [19] Meng L, Yang L, Zhao XX, et al. Targeted delivery of chemotherapy agents using a liver cancer-specific aptamer[J]. *PLoS One*,2012,7(4):e33434.  
 [20] Rao ZG, Gao JF, Zhang BC, et al. Cisplatin sensitivity and mechanisms of anti-HPV16E6-ribozyme on cervical carci-

noma CaSKi cell line[J]. Chinese-German J Clin Oncol, 2012, 11(4): 237-242.

[21] Zhang K, Sefah K, Tang L, et al. A novel aptamer developed for breast cancer cell internalization[J]. Chem Med Chem, 2012, 7(1): 79-84.

[22] Kurosaki T, Higuchi N, Kawakami S, et al. Self-assembled gene delivery system for molecular targeting using nucleic acid aptamer[J]. Gene, 2012, 491(2): 205-209.

(收稿日期: 2014-10-18 修回日期: 2014-12-01)

• 综述 • doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2015.07.047

## GLP-1 受体激动剂与糖尿病肾病\*

姚迪, 张红综述, 陆卫平<sup>△</sup>审校

(南京医科大学附属淮安第一医院内分泌科, 江苏淮安 223300)

[关键词] GLP-1 受体激动剂; 糖尿病肾病; 发病机制

[中图分类号] R587.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)07-0981-03

糖尿病肾病是糖尿病微血管主要并发症之一, 早期表现为肾小球肥大、基底膜增厚、系膜扩张, 逐渐发展为肾小球、肾小管间质纤维化, 最终导致肾衰竭<sup>[1]</sup>。糖尿病肾病的发病机制尚未完全阐明。目前认为其主要机制有高血糖、肾脏血流动力学改变、氧化应激和炎症反应等。临床上用于治疗糖尿病肾病的药物如 ACE I 类及 ARB 类对其虽有一定疗效, 但对延缓糖尿病肾病的进展却不十分理想。GLP-1 受体激动剂作为一种新型降糖药物, 因其特殊的生理作用引起了广泛关注, GLP-1 受体激动剂能通过多种机制延缓糖尿病肾病的发生、发展, 为糖尿病肾病的治疗提供了全新的选择方案。本文就近年来 GLP-1 受体激动剂改善糖尿病肾病的研究进展综述如下。

### 1 GLP-1 及其受体

GLP-1 是由位于回肠末端和结肠肠黏膜的 L 细胞分泌的一种含有 30 个残基的肽类激素<sup>[2]</sup>, GLP-1 的分泌与进食刺激及机体内营养消耗有关, 并通过与其受体 (GLP-1R) 结合来发挥作用, 这种受体不仅大量存在于胰岛细胞中, 还在肾脏细胞、神经细胞、胃肠道细胞、心脏、血管平滑肌细胞和内皮细胞中表达<sup>[3]</sup>。GLP-1 作用于多个器官发挥多种功能: 在胰腺中, 能够通过促进胰岛素分泌和抑制胰高血糖素来调节血糖, 而且这种作用呈葡萄糖依赖性, 除此之外, 它还具有刺激  $\beta$  细胞增殖、减少  $\beta$  细胞凋亡的能力; 作用于中枢, 可以增加饱腹感、降低食欲, 减少食物摄入和延迟胃排空; 在肝脏中, GLP-1 可以促进肝糖原合成, 抑制肝糖原分解和输出; 它具有保护血管内皮, 调节血压、血脂, 以此改善心血管功能的作用。正因为 GLP-1 的这些效应, GLP-1 被应用于治疗糖尿病。而体内产生的内源性 GLP-1 半衰期很短, 具有活性的 GLP-1 (7-36) 会被二肽基肽酶-4 (DPP-4) 迅速降解为无活性的 GLP-1 (9-36), 成为限制 GLP-1 治疗糖尿病及其并发症的瓶颈, 因此, GLP-1 类似物及其激动剂应运而生。目前, 已上市的 GLP-1 受体激动剂主要有, (1) 艾塞那肽: 一种从希拉毒蜥唾液中分离的含有 39 个氨基酸残基的多肽激素, 与 GLP-1 有 53% 的同源性<sup>[4]</sup>。(2) 利拉鲁肽: 为一种长效的 GLP-1 受体激动剂, 与天然 GLP-1 有 97% 的同源性。近年来, 研究发现在肾脏组织中存在 GLP-1 受体, GLP-1 可以通过这些受体对肾脏产生保护作用<sup>[5]</sup>。

### 2 GLP-1 受体激动剂改善糖基化终末产物 (AGEs) 引起的肾

### 脏损害

无论是 1 型或是 2 型糖尿病所致的糖尿病肾病, 慢性高血糖是导致其发生、发展的主要机制<sup>[6]</sup>。而在高糖环境中产生的 AGEs 在糖尿病肾病的发生、发展中扮演着重要角色。AGEs 是葡萄糖和蛋白质氨基基团、脂质、核酸之间非酶促反应产生的一种稳定的交联产物, 随着糖尿病患者患病年限的增加和高血糖状态的持续, AGEs 不断积聚, 并沉积于糖尿病伴或不伴有终末期肾衰竭患者的肾小球基底膜、系膜细胞、内皮细胞和足细胞中, 并与其受体 RAGE 相互作用, 引起一系列炎症反应和产生氧化应激, 导致血管通透性增加、滤过膜功能损伤、肾小球高滤过、基底膜增厚、肾小球和肾小管间质硬化, 蛋白尿的产生。有研究发现终末期肾病的糖尿病患者肾脏组织中 AGEs 浓度几乎是无肾病糖尿病患者的 2 倍, 提示 AGEs 水平与糖尿病肾病的严重程度相平行<sup>[7-8]</sup>。Ojima 等<sup>[5]</sup>研究发现肾小管上有 GLP-1 受体存在, 且 exendin-4 能作用于这些受体, 显著抑制肾小管细胞中 AGEs 介导的 RAGE mRNA 水平和过氧化物的产生。Ishibashi 等<sup>[9]</sup>观察到 GLP-1 通过激活 cAMP 通路来抑制系膜细胞中 RAGE 的基因表达, 并抑制 AGEs 与 RAGE 相互作用引起的炎症反应, 而且这种效应能够被 GLP-1R 特异性小分子干扰 RNA 阻断。GLP-1 能够降低暴露于 AGEs 的系膜细胞中活性氧 (ROS) 的生成和单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 基因及蛋白表达, 减弱氧化应激及炎症反应, 从而产生肾脏保护作用。

### 3 GLP-1 受体激动剂对肾脏血流动力学的影响

糖尿病肾病肾脏血流动力学改变首先以肾小球高滤过、高灌注和肾小球毛细血管内高压为特征。Kutina 等<sup>[10]</sup>研究发现, 艾塞那肽能够通过刺激前列腺素  $E_2$  的释放和增加近端肾小管向肾单位和集合管远端的血流来增加水负荷大鼠体内自由水清除率, 并且这种效应能够被 GLP-1R 拮抗剂所阻断。另外, 高血压也是导致肾小球高滤过和加速糖尿病肾病进展的一个非常重要的因素, 血压和肾小球囊内压升高与糖尿病肾病的发病密切相关, 高血压会促进全身的小动脉包括肾小动脉硬化, 高收缩压和高肾小球囊内压能够促使蛋白尿产生, 并诱发局部炎症反应和促纤维化细胞因子释放, 导致肾脏损伤<sup>[11]</sup>。Okerson 等<sup>[12]</sup>进行了为期 6 个月关于艾塞那肽和胰岛素对糖

\* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81200595)。 作者简介: 姚迪 (1989-), 医师, 在读硕士, 主要从事糖尿病肾病临床诊断与治疗的研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, Tel: 13511556318; E-mail: hyhalwp@sina.com。