

• 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.02.035

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20191204.1701.012.html>(2019-12-06)

# 核酸适配体在前列腺癌诊断应用的研究进展<sup>\*</sup>

雷 容<sup>1</sup>, 刘杨文易<sup>1</sup>综述, 平秦榕<sup>2</sup>, 颜汝平<sup>1△</sup> 审校

(1. 昆明医科大学第二附属医院/云南省泌尿外科研究所泌尿外科, 昆明 650101;

2. 云南省昆明市延安医院泌尿外科 650051)

**[摘要]** 前列腺癌是男性常见的泌尿生殖系肿瘤, 现常用直肠指检联合血清前列腺特异性抗原(PSA)对其进行诊断。但直肠指检对早期前列腺癌灵敏度低、且 PSA 缺乏前列腺癌特异性, 因此寻找一种高敏度、高特异度的检测手段显得尤为必要。核酸适配体是一种具有独特三维构象的寡核苷酸, 能特异性识别靶点, 并以高亲和力与之结合。国内外研究表明, 核酸适配体能特异性地识别前列腺癌细胞, 其在前列腺癌诊断中具有广阔的前景。现就核酸适配体在前列腺癌诊断中的应用前景作一综述。

**[关键词]** 核酸适配体; 前列腺肿瘤; 诊断; 生物标记, 肿瘤

**[中图分类号]** R737.25

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2020)02-0315-04

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Advances in application prospect of aptamer in the diagnosis of prostate cancer<sup>\*</sup>

LEI Rong<sup>1</sup>, LIU Yangwenyi<sup>1</sup>, PING Qinrong<sup>2</sup>, YAN Ruping<sup>1△</sup>

(1. Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University/Yunnan

Institute of Urology, Kunming, Yunnan 650101, China; 2. Department of Urology,

Yan'an Hospital of Kunming City, Kunming, Yunnan 650051, China)

**[Abstract]** Prostate cancer is male common urogenital germ tumor, currently, digital rectal examination combined with serum prostate specific antigen (PSA) are used for prostate cancer diagnosis. However, digital rectal examination is less sensitive to early prostate cancer, while PSA lacks prostate cancer specificity. Therefore, it is necessary to find a diagnosis method with high sensitivity and specificity. Aptamer is an oligonucleotide with unique three-dimensional conformation that specifically recognizes targets and binds it with high affinity. Related studies have shown that aptamer can identify prostate cancer cells specifically, and it has broad prospects in the diagnosis of prostate cancer. This article mainly reviews the application of aptamer in prostate cancer diagnosis.

**[Key words]** aptamer; prostatic neoplasms; diagnosis; biomarkers, tumor

前列腺癌是一种上皮性恶性肿瘤, 是男性泌尿生殖系统发病率较高的恶性肿瘤之一。从全球来看, 我国发病率低于欧美地区<sup>[1]</sup>, 但由于人口老龄化加速及饮食结构等改变, 我国前列腺癌发病率也呈现逐年上升的趋势, 严重威胁男性健康。在一些发达国家, 前列腺癌已位居男性恶性肿瘤发病率的第 1 位<sup>[2]</sup>。临床上对于前列腺癌的诊断常采用直肠指检联合血清前列腺特异性抗原(PSA)检测。其中直肠指检是最

快速简便的方法, 具有经济、安全的特点。但直肠指检发现前列腺有异常的, 通常已到了前列腺癌中晚期, 且直肠指检的结论很大程度上依赖于医生的个人经验和判断<sup>[3]</sup>。自 1994 年美国食品药品监督管理局(FDA)批准 PSA 用于前列腺癌检测已二十多年, 但对于 PSA 的使用仍存在争议。主要原因是其灵敏度和特异度还不够高, 尤其是当血清 PSA 处于诊断灰区 4~10 μg/L 时, 用 PSA 值区分前列腺增生和前列

<sup>\*</sup> 基金项目: 云南省高新技术产业发展项目计划(云高新产业发展 201601); 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项(2017FE467); 2018 云南省科技厅重大项目(2018ZF009)。 作者简介: 雷容(1993—), 在读硕士研究生, 主要从事泌尿生殖系肿瘤治疗研究。 △ 通信作者, E-mail: yanruping2002@126.com。

腺癌是不可靠的<sup>[4]</sup>。所以寻找一种高灵敏度、高特异度的检测手段就显得尤为重要。

## 1 核酸适配体简介

1990 年 3 个独立的研究团队陆续通过配体指数富集法进化系统(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术分离出 3 种核酸适配体,核酸适配体是一种具有特定三维构象的单链寡核苷酸(DNA 或 RNA),通常由 20~60 个核苷酸组成。核酸适配体具有分子量小、低免疫原性、低毒性、高组织穿透力及较好的热/化学稳定性等特点,且能形成特定的三维结构与多种靶标(蛋白质、金属离子、病毒、细菌、细胞等)特异性结合,解离常数(Kd)能达到皮摩尔至纳摩尔。由于其与靶标的识别模式和抗原、抗体的识别十分类似,因此也被称为“化学抗体”<sup>[5]</sup>。

## 2 核酸适配体在前列腺癌诊断中的应用前景

核酸适配体发展迅速,目前研究热点主要在靶向识别、靶向运输、靶向治疗,以及多功能复合体的构建和运用。对于前列腺癌而言,借助核酸适配体进行诊断大有可为,主要有血液学和尿液检测及影像学显像等。

### 2.1 血液学检测中的应用

血液作为机体物质交换的重要媒介,其中不仅包含各种血细胞,还有细胞代谢、分泌的各种物质。血液流经前列腺癌组织时,癌组织的代谢产物、表面的特异性蛋白、甚至脱落的癌细胞进入血液,对前列腺癌的诊断具有重要作用。

传统的 PSA 就是一种前列腺组织特异性糖蛋白,能在血清中被检测到。而核酸适配体具有很强的靶向结合能力,基于 PSA 的核酸适配体能提高 PSA 的检测效力,但存在核酸适配体在体内易被核酸酶水解这一问题。SVOBODOVA 等<sup>[6]</sup>通过氟元素修饰核酸适配体,使其在含有核酸酶的人血清环境中仍有很好的稳定性,表现为 6 h 内无衰减,12 h 后仅有部分衰减,甚至 48 h 后仍能被检测到。

近年来研究发现的前列腺特异膜抗原(PSMA)是一种特异性的 II 型跨膜蛋白,其在前列腺癌患者中呈过表达,具有前列腺癌特异性,与前列腺癌的转移和致死密切相关。KIM 等<sup>[7]</sup>构建了一种能特异性识别 PSMA 阳性细胞的核酸适配体生物芯片,将核酸适配体固定在玻璃芯片上,通过 1 h 的孵育和简单的荧光染色,就能做到对前列腺癌细胞的识别及定量。其检测极限低至  $1 \times 10^3$  个细胞,检测效能优于传统抗体法。此外,基于核酸适配体生物芯片的方法,其稳定性、再现性、可重复性也强于抗体法。

前列腺酸性磷酸酶(PAP)是一种与前列腺癌的危险程度相关的特异性酶,对前列腺癌的分期具有参考价值<sup>[8]</sup>。KONG 等<sup>[9]</sup>成功构建了一种 2-FY RNA 核酸适配体,能特异地与 PAP 结合。通过实时反转录酶-聚合酶链式反应(RT-PCR)分析、电泳迁移率变动分析、哺乳动物细胞结合分析等方法证实其特异地和 PAP 结合,解离系数为 118 nM。系统的最小化和删除分析揭示其二级结构形成的两个茎环与其特异性结合能力密切相关,但 PAP 上的 3 个糖基化位点可能会影响其与核酸适配体的结合。利用核酸适配体去识别前列腺癌的特异性血清标志物,将是以后的研究重点。

前列腺癌是一种转移性很高的肿瘤,肿瘤细胞脱离癌组织进入血液播散到全身,尤以骨转移最为常见。因此通过循环肿瘤细胞(CTCs)检测能对前列腺癌转移进行有效监测,目前的方法多采用基于上皮细胞黏附分子(EpCAM)抗体的检测方法,但由于 CTCs 经常会丢失其抗体结合区域致使检测结果并不理想<sup>[10]</sup>。VIRAKA 等<sup>[11]</sup>利用氧化石墨烯与核酸适配体共价结合构建出一种 3D 氧化石墨烯膜,能特异性俘获前列腺癌 LNCaP 细胞,俘获效率高达 98%。其原理是原本被淬灭的荧光信号遇到前列腺癌 LNCaP 细胞时,染料与石墨烯的距离增加致使荧光信号再次出现,从而实现前列腺癌 CTCs 的检测。

### 2.2 尿液检测中的应用

尿液是由肾脏代谢产生的代谢废物,经输尿管排出体外。解剖学上前列腺与尿道毗邻,且有射精管开口于尿道,前列腺液能通过射精管进入尿液。尿液中含有多种无机盐和有机物及脱落细胞,对疾病的诊断很有价值<sup>[12]</sup>。此外与其他体液相比,尿液成分构成相对简单,量大易获取,不需要侵入性的操作。对于前列腺癌患者而言,其尿液成分会发生改变,尿液中会出现一些特异性的基因片段,如长链非编码 RNA(lncRNA)、融合基因片段、甲基化的基因片段、微小 RNA(miRNAs);同时尿液的蛋白组学也会发生变化,某些特异性的蛋白和多肽呈过表达;此外尿液中还存在脱落的前列腺癌细胞,对前列腺癌的分型和分期都大有帮助。

目前已有团队将核酸适配体与纳米磁珠、荧光基团、量子点等装配起来,充分发挥核酸适配体的靶向识别功能,实现了在尿液中对可卡因、双酚 A、腺苷酸这些小分子物质的快速检测<sup>[13]</sup>。此外归功于分子生物学及表观遗传学的迅速发展,与前列腺癌发生、发展的相关基因被大量发现。通过筛选与前列腺癌基因特异性结合的核酸适配体,并对其进行加工修饰及与多功能基团的装配,提高了核酸适配体的稳定性和检测效能,为前列腺癌的基因诊断提供了强有力的支持<sup>[14]</sup>。蛋白组学是当下的热点领域,WELTON 等<sup>[15]</sup>利用核酸适配体的方法对前列腺癌患者的血清和尿

液进行了蛋白组学分析,发现了多达 1 000 种蛋白,而其中约有 400 种比较具有意义。不同分期分型的前列腺癌蛋白表达水平不同,利用核酸适配体来检测其在尿液中的差异,对前列腺癌的分期和分型将大有裨益<sup>[16]</sup>。再者,由于核酸适配体与前列腺癌细胞特异性结合的能力<sup>[17]</sup>,对尿液进行浓缩离心处理后,利用核酸适配体的靶向识别能力可快速准确识别尿液中的脱落细胞。如果将这一方法应用于临床,可减少不必要的前列腺穿刺活检,大大减少患者的痛苦,也为后期的治疗提供依据。

### 2.3 影像学显像中的应用

影像学诊断是前列腺癌诊断的重要组成部分,影像学能很好地显示肿瘤的形状、大小、位置、与周围组织的关系,以及是否有远处转移等。临床上对于前列腺癌的显像常用的方法有超声、CT、磁共振成像(MRI)、正电子发射断层显像/X 射线计算机体层成像仪(PET/CT)等方法,这些方法常常需要造影剂,而核酸适配体亦是一种有前景的造影剂<sup>[18]</sup>。这是由于核酸适配体能被肿瘤摄取或特异性结合,同时其容易被改造,可以和金属离子、放射元素等偶联发挥造影剂的功能。

WANG 等<sup>[19]</sup>构建了一种与核酸适配体共价结合的纳米微泡,在血流中拥有更快的结合速率及靶区积累优势,以及优良的靶向显像的能力。核酸适配体不仅可以应用在超声成像,还能联合靶向超声进行靶向治疗<sup>[20]</sup>。WU 等<sup>[21]</sup>成功构建了一种负载有紫杉醇的 A10-3.2 适配体,其能特异地与 PSMA 阳性的前列腺癌 LNCaP 细胞结合,获得很好的前列腺癌超声图像,且能诱导前列腺癌细胞凋亡。虽然碘剂广泛运用于 CT 成像,但碘剂的肾毒性、缺乏靶向分子成像等问题仍然困扰着影像医生。KIM 等<sup>[22]</sup>利用金纳米颗粒(GNPs)与 PSMA 核酸适配体成功构建出具有 CT 造影剂作用的复合纳米颗粒,完美弥补了碘剂的不足。该适配体造影剂显示靶向前列腺癌 LNCaP 细胞的 CT 强度比未靶向的前列腺癌 PC3 细胞高 4 倍以上,并能运载多柔比星达到靶向治疗前列腺癌的作用。LI 等<sup>[23]</sup>利用荧光与核酸适配体双重偶联的金纳米颗粒来作为 CT 增强对比剂,实现同时进行 CT 成像与荧光成像,更好地判断肿瘤的形状、位置、大小及边缘。且成功地对荷瘤小鼠体内肿瘤进行切除,提示了其作为临床荧光引导手术成像剂的潜在应用价值。KESHTKAR 等<sup>[24]</sup>构建出一种与磁性纳米颗粒相结合的适配体,实验发现该核酸适配体在癌细胞和正常细胞的积累有明显差异,癌细胞表现出与对照组不同的暗信号和低信号,表明其具有 MRI 显像剂的潜力。核酸适配体作为 PET 造影剂同样极具潜力,PARK 等<sup>[25]</sup>建立了一个互补的寡核苷酸的平台,用杂交的方法使其与适配体结合,进一步耦联放射性同位素,通过 microPET 成像可清晰观察到荷瘤小鼠体内的肿

瘤。此外,通过杂交法构建的核酸适配体放射性同位素造影剂具有更高的组织摄取能力、良好的血清稳定性及对靶细胞特异性的亲和力。利用核酸适配体的识别与结合功能,将推进传统的影像方法,为前列腺癌的诊断提供强有力的支持。

### 3 小 结

我国前列腺癌发病率逐年上升,严重威胁人民健康,给社会带来巨大的经济负担。如果能早期检测并进行干预,将大大提高前列腺癌患者的生存时间和生活质量,减轻前列腺癌给患者及社会带来的经济负担。所以,寻找有效的检测方法尤为重要,而核酸适配体就是一个具有前景的研究方向。

核酸适配体具有高灵敏度、高特异度、合成迅速且成本相对廉价等优势。此外,核酸适配体能与多种多功能复合体结合,大大丰富了核酸适配体的功能。虽然其具有诸多优势,但稳定性差及靶标不明确等缺陷成为亟待解决的问题。相信随着 SELEX 技术的不断进步与发展,其存在的缺陷终能逐一解决,优势必将日益凸显。因此,充分利用核酸适配体的靶向识别能力,多手段、多层面、多方法联合检测,必将造福前列腺癌患者。

### 参考文献

- [1] ZHOU C K,CHECK D P,LORTET-TIEULENT J,et al. Prostate cancer incidence in 43 populations worldwide:an analysis of time trends overall and by age group[J]. Int J Cancer,2016,138(6):1388-1400.
- [2] SIEGEL R L,MILLER K D,JEMAL A. Cancer Statistics,2017[J]. CA Cancer J Clin,2017,67(1):7-30.
- [3] 王跃,戴波. 中国抗癌协会 2017 版《前列腺癌筛查专家共识》解读[J]. 临床外科杂志,2018,26(1):15-18.
- [4] 中华医学会泌尿外科学分会前列腺癌联盟. 中国前列腺癌早期诊断专家共识[J]. 中华泌尿外科杂志,2015,36(8):561-564.
- [5] MARANGONI K,NEVES A F,ROCHA R M,et al. Prostate-specific RNA aptamer:promising nucleic acid antibody-like cancer detection[J]. Sci Rep,2015,5:12090.
- [6] SVOBODOVA M,BUNKA D H,NADAL P,et al. Selection of 2'F-modified RNA aptamers against prostate-specific antigen and their evaluation for diagnostic and therapeutic applications [J]. Anal Bioanal Chem,2013,405(28):9149-

- 9157.
- [7] KIM J, LEE G H, JUNG W, et al. Selective and quantitative cell detection based both on aptamers and the conventional cell-staining methods [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 43(1): 362-365.
  - [8] GUNIA S, KOCH S, MAY M, et al. Expression of prostatic acid phosphatase (PSAP) in transurethral resection specimens of the prostate is predictive of histopathologic tumor stage in subsequent radical prostatectomies [J]. *Virchows Archiv*, 2009, 454(5): 573-579.
  - [9] KONG H Y, BYUN J. Screening and characterization of a novel RNA aptamer that specifically binds to human prostatic acid phosphatase and human prostate cancer cells [J]. *Mol Cell*, 2015, 38(2): 171-179.
  - [10] WICHA M S, HAYES D F. Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(12): 1508-1511.
  - [11] VIRAKA NELLORE B P, KANCHANAPALLY R, PRAMANIK A, et al. Aptamer-conjugated graphene oxide membranes for highly efficient capture and accurate identification of multiple types of circulating tumor cells [J]. *Bioconjug Chem*, 2015, 26(2): 235-242.
  - [12] FERNANDEZ-SERRA A, CASANOVA-SALAS I, RUBIO L, et al. Update on the diagnosis of PCa in urine. The current role of urine markers [J]. *Arch Esp Urol*, 2015, 68(3): 240-249.
  - [13] SU Y, SHAO C, HUANG X, et al. Extraction and detection of bisphenol A in human serum and urine by aptamer-functionalized magnetic nanoparticles [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(7): 1885-1891.
  - [14] KIM J, LEE E, KANG Y Y, et al. Multivalent aptamer-RNA based fluorescent probes for carrier-free detection of cellular microRNA-34a in mucin1-expressing cancer cells [J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(43): 9038-9041.
  - [15] WELTON J L, BRENNAN P, GURNEY M, et al. Proteomics analysis of vesicles isolated from plasma and urine of prostate cancer patients using a multiplex, aptamer-based protein array [J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5: 31209.
  - [16] CRULHAS B P, KARPIK A E, DELELLA F K, et al. Electrochemical aptamer-based biosensor developed to monitor PSA and VEGF released by prostate cancer cells [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(29): 6771-6780.
  - [17] GEDI V, KIM Y P. Detection and characterization of cancer cells and pathogenic bacteria using aptamer-based nano-conjugates [J]. *Sensors (Basel)*, 2014, 14(10): 18302-18327.
  - [18] DOUGHERTY C A, CAI W, HONG H. Applications of aptamers in targeted imaging: state of the art [J]. *Curr Top Med Chem*, 2015, 15(12): 1138-1152.
  - [19] WANG C H, HUANG Y, YE H C K. Aptamer-conjugated nanobubbles for targeted ultrasound molecular imaging [J]. *Langmuir*, 2011, 27(11): 6971-6976.
  - [20] WU M, ZHAO H Y, GUO L, et al. Ultrasound-mediated nanobubble destruction (UMND) facilitates the delivery of A10-3. 2 aptamer targeted and siRNA-loaded cationic nanobubbles for therapy of prostate cancer [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 226-240.
  - [21] WU M, WANG Y, WANG Y R, et al. Paclitaxel-loaded and A10-3. 2 aptamer-targeted poly (lactide-co-glycolic acid) nanobubbles for ultrasound imaging and therapy of prostate cancer [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 5313-5330.
  - [22] KIM D, JEONG Y Y, 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.
  - [23] LI C H, KUO T R, SU H J, et al. Fluorescence-guided probes of aptamer-targeted gold nanoparticles with computed tomography imaging accesses for in vivo tumor resection [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15675.
  - [24] KESHTKAR M, SHAHBAZI-GAHROUEI D, KHOSHFETRAT S M, et al. Aptamer-conjugated magnetic nanoparticles as targeted magnetic resonance imaging contrast agent for breast cancer [J]. *J Med Signals Sens*, 2016, 6(4): 243-247.
  - [25] PARK J Y, LEE T S, SONG I H, et al. Hybridization-based aptamer labeling using complementary oligonucleotide platform for PET and optical imaging [J]. *Biomaterials*, 2016, 100: 143-151.