



核酸适配体在膀胱癌诊疗中的应用*

冯树维^{1,2)} 张明鑫^{1,2)} 武晓秋²⁾ 林恒伊²⁾ 邴涛^{2)**}⁽¹⁾ 浙江工业大学药学院, 杭州 310014;⁽²⁾ 中国科学院杭州医学研究所, 浙江省肿瘤医院, 浙江省核酸适配体与临床诊治重点实验室, 杭州 310022)

摘要 膀胱癌是全球最常见的癌症之一, 具有很高的复发率和死亡率。膀胱镜检查是临床诊断膀胱癌的金标准, 但其侵入性会造成细菌感染引发炎症; 尿细胞学检查虽具有无创和操作简便的优点, 但对低级别膀胱癌的敏感性较低, 容易产生假阴性。因此, 寻找理想的诊断和预后生物标志物对于膀胱癌的精准诊疗具有重要价值。核酸适配体是具有特定三维构象的单链 DNA 或 RNA 片段, 可以识别从小分子到肿瘤细胞在内的多种靶标类型。目前发现了多个能识别膀胱癌的核酸适配体, 作为分子探针已在膀胱癌的早期诊断和治疗中发挥重要作用。本文将综述基于膀胱癌相关的核酸适配体筛选、表征以及核酸适配体在膀胱癌诊断和治疗应用方面的研究进展。

关键词 核酸适配体, 膀胱癌, 肿瘤诊断, 肿瘤治疗

中图分类号 Q7, R73

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0485

膀胱癌 (bladder cancer, BCa) 是泌尿系统最常见的恶性肿瘤, 在男性中比女性更为常见。世界范围内, 膀胱癌发病率位居恶性肿瘤的第 9 位^[1-2], 且易复发、侵袭及转移。手术切除是膀胱癌治疗的主要手段, 辅以膀胱灌注化疗和膀胱灌注免疫治疗。膀胱癌根据肿瘤浸润深度分为非肌层浸润性膀胱癌 (non-muscle-invasive bladder cancer, NMIBC) 和肌层浸润性膀胱癌 (muscle-invasive bladder cancer, MIBC), 为高度异质性疾病^[3]。膀胱癌的诊断包括膀胱镜检查、影像学检查、尿脱落细胞学检查及尿膀胱癌相关的生物标志物辅助诊断等。膀胱镜检查是诊断膀胱肿瘤的金标准, 但其对扁平肿瘤的检出率低, 并且容易对黏膜造成磨擦损伤、加重炎症^[4]。尿液细胞学检查简便、无创、特异性高, 但对低级别癌症的敏感性较低^[5]。尿液生物标志物可以让临床医生避免侵入性操作并可能降低监测成本。目前仅有核基质蛋白 22、膀胱肿瘤相关抗原、膀胱癌黏蛋白抗原 (M344 和 LDQ10)、糖基化癌胚抗原 (19A211) 等经美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准用于膀胱癌的诊断或监测^[6]。然而, 这些生物标志物依然存在高的假阳性率和假阴性

率、低特异性等缺陷, 只能作为膀胱镜检查和细胞学检查的辅助手段来监测膀胱癌。因此, 目前膀胱癌仍然缺少理想的诊断和预后标志物。

核酸适配体是一类可形成特定的三维结构, 与靶标分子高亲和力和高特异性结合的单链 DNA/RNA 分子, 它们可以作为“化学抗体”发挥着和传统抗体相当的作用^[7]。另外, 其具有许多抗体不具备的优点, 作为核酸分子其易于修饰、免疫原性低, 且具有快速的组织穿透和细胞内化的能力, 可用于生物分子的识别检测。核酸适配体优越的靶向性也使得其可以用于制备药物递送系统, 实现药物的靶向递送, 从而提高药物疗效。除此之外, 核酸适配体在基因调控方面也起到一定作用, 通过结合特定基因的启动子区域来调节基因表达, 从而实现疾病治疗。核酸适配体是针对特定的纯分子或复合靶标 (例如细胞、组织等) 通过指数富集的配体系统进化技术 (systematic evolution of ligands by

* 浙江省自然科学基金 (YXD24B0401), 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划 (2023SDYXS0002) 和国家卫生健康委科学研究基金-浙江省卫生健康重大科技计划 (WKJ-ZJ-2424) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0571-88122625, E-mail: bingtao@him.cas.cn

收稿日期: 2023-12-11, 接受日期: 2024-01-17

exponential enrichment, SELEX) 从随机核酸文库中筛选得到的^[8]。SELEX 的步骤主要包括: 随机文库的合成及变复性处理、随机文库与靶标在特定条件下孵育结合、去除非特异性结合的序列、序列的扩增、单链制备等(图1)。根据 SELEX 对象的不同, 传统的筛选方法可以分为: 小分子筛选、细

胞筛选、蛋白质筛选、组织筛选、活体筛选等。体外筛选获得的核酸适配体可以特异性结合膀胱癌细胞, 以区分正常细胞和癌细胞, 在膀胱癌生物标志物的发现及膀胱癌早期诊断和治疗中发挥了至关重要的作用, 本文对核酸适配体在膀胱癌领域的筛选和应用进展进行了综述。

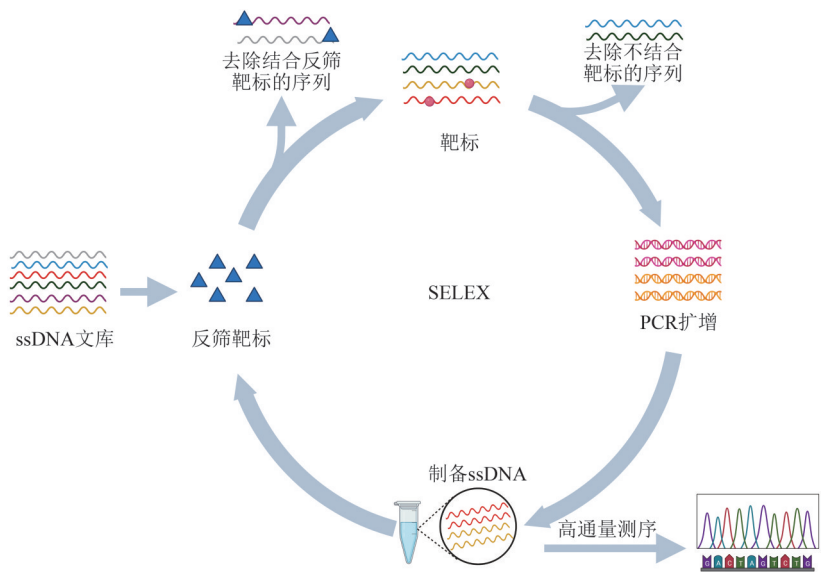


Fig. 1 Flow chart of aptamer SELEX
图1 核酸适配体SELEX筛选流程图

1 膀胱癌相关核酸适配体

目前已有系列膀胱癌相关的核酸适配体报道, 包括基于膀胱癌已知生物标志物、膀胱癌细胞、组织及其他癌症筛选得到的核酸适配体(表1), 这些核酸适配体为膀胱癌的诊断和治疗提供了新的策略。

1.1 基于膀胱癌已知标志物筛选获得的核酸适配体

肿瘤标志物的发现和检测与实现癌症早期诊断、良好预后等息息相关。核酸适配体作为“科学家的抗体”, 可以发挥与抗体类似的识别检测作用, 并避免发生免疫反应, 实现体内外检测。膀胱癌的发生多伴有复杂的基因改变, 如 *DDR* 基因缺陷、*erbB2* 基因扩增等^[8]。通过针对膀胱癌特定标志物分子筛选获得特异性核酸适配体, 有利于膀胱癌患者的早筛早诊, 实现基于患者个体基因特征的治疗。

研究发现, Engrailed-2 蛋白是膀胱癌早期及复发诊断的重要生物标志物^[9-10]。Kim 等^[11] 将 Engrailed-2 蛋白固定在磁珠上, 经过 12 轮筛选后得到平衡解离常数 K_d 值为 8.26 nmol/L 的核酸适配体, 利用杂交链式反应技术构建了与 Engrailed-2 结合同时放大信号的 DNA 纳米结构。该结构对 Engrailed-2 显示高特异性, 不受其他尿蛋白的影响, 并且具有很好的化学稳定性。MUC1 黏蛋白在癌细胞表面过表达并异常糖基化, 与不良预后相关, 目前已经成功用作膀胱癌的肿瘤标志物^[12-14]。Ferreira 等^[15] 筛选得到对 MUC1-5TR 蛋白有高亲和力的适配体 ($K_d=47.3$ nmol/L)。由于 MUC1-5TR 蛋白含有 C595 抗体和对应核酸适配体的一个以上的表位, 它适用于双位点免疫测定。在此基础上设计了核酸适配体-抗体夹心 ELISA 法, 用于检测和定量缓冲溶液中的 MUC1。这种方法的检测限为 1 mg/L, 线性范围在 8~100 mg/L, 证明了核酸适配体在膀胱癌诊断分析中存在应用价值, 有望成为原

发型或转移型膀胱上皮肿瘤诊断的新工具。但是，目前临床应用的核基质蛋白 22、膀胱肿瘤相关抗原、膀胱癌黏蛋白抗原（M344 和 LDQ10）、糖基化癌胚抗原（19A211）等靶标的核酸适配体尚未有报道。针对特定的已知标志物分子可以筛选获得

特异性识别的核酸适配体，但是由于体外表达的蛋白质分子可能与天然靶标分子的构象、翻译后修饰等存在差异，造成筛选获得的核酸适配体无法识别天然状态的靶标分子，这亦是造成核酸适配体实际应用的瓶颈问题之一。

Table 1 Aptamers used in bladder cancer
表1 膀胱癌相关核酸适配体

筛选方法	核酸适配体	序列（5'→3'）	靶标蛋白	靶细胞	解离常数/ （nmol·L ⁻¹ ）	应用场景	参考文献
Protein-SELEX	EBA	AGCGGATCCGAGGTGAGGAGCGCCGGT- GAGACTCCTTCATTCTATCTGCT	Engrailed-2	/	8.26	癌症检测	[11]
Protein-SELEX	MUC1-5TR	GAAGTGAAAATGACAGAACACAACA	MUC1	/	47.3	癌症检测	[15]
Cell-SELEX	SPL3C	AGCCCTCGGGATTAT CGGTGTTTATGGT- GTCTGTCT ATC ACG TGG AGC T	CKAP4	5637	21.3±6.6	癌细胞转 移机制	[16]
Cell-SELEX	BC-3	TTTTTAACACGGACCGATGTTGGGCA- CAGAATGCGCATGTGGGCCCATG	RPS7	5637	155.1±43.02	癌症分型	[17]
Tissue-SELEX	TB-5	TTTTTAAGCCCACTCCTCTGTGGGGGGC- GAACAACAAGGCAGTCGTGCCATG	核仁蛋白 （nucleolin）	/	165.9±28.85	癌症检测	[18]
Tissue-SELEX	LYY-3	AAGCCCACTCCTCTGTGGGGGGCGAA- CAACAAGGCAGTCGTG	/	/	154.8±7.82	癌症检测	[19]
Tissue-SELEX	LYY-6	AACACGGACCGATGTTGGGCACAGAAT- GCGCATGTGGGC	/	/	162.6±41.67	癌症检测	[19]
Cell-SELEX	Sgc8	ATCTAACTGTGCGCCGCC- GGGAAAATACTGTACGGTTAGA	PTK7	CCRF-CEM	0.80±0.09	靶向治疗	[20]
Protein-SELEX	SYL3C	CACTACAGAGGTTGCGTCTGTCCCAC- GTTGTCATGGGGGGTTGGCCTG	EpCAM	/	38±9	靶向治疗	[21]
Cell-SELEX	XQ-P3	ACCGACCGTGCTGGACTCATCTC- GCTTTTTTCACGGTCCACACTACTAT- GAGCGAGCCTGGCG	PD-L1	MDA-MB-231 PD-L1过表达 细胞	15.36±1.74	免疫治疗	[22]
Protein-SELEX	uPAapt-02	CAAGCGGGGGTGAGAGATCTGTCAG- TACGAGCTGGGTTTGCG	uPA	/	14	癌症检测	[23]
Cell-SELEX	Aptamer-B1	CCAGUGAAGCGUCCUGGAGAUG- GAUGUUGUGAUGG	AP2B1	T24	/	靶向治疗	[24]

1.2 基于膀胱癌未知标志物筛选获得的核酸适配体

基于细胞的 SELEX 技术（cell-SELEX）已广泛应用于生物标志物发现、早期诊断和靶向治疗等领域。该技术是将整个细胞作为靶标筛选特异性核酸适配体的技术，可在靶标未知、生理条件下筛选出特异性识别天然构象靶标蛋白的核酸适配体，进而实现新的生物标志物发现^[25]（图2）。
Sun 等^[16]利用 cell-SELEX 技术，以膀胱癌 5637 细胞为靶细胞，以正常人尿路上皮 SV-HUC-1 细胞为阴性对照进行适配体筛选，13 轮筛选后进

行序列分析和序列截短，得到了具有最佳性能的适配体 spl3c（ K_d =(21.3±6.6) nmol/L），利用 spl3c 偶联珠捕获相互作用的蛋白质，发现核酸适配体 spl3c 的靶标是在膀胱癌细胞上特异性过表达的细胞骨架相关蛋白 4（CKAP4），明确了其作为细胞膜张力调控关键因子，能重塑细胞膜中心-边缘的张力梯度，促进膀胱癌细胞的迁移。同时，还能通过外泌体实现细胞间的力学信号传递，从而加剧膀胱癌在体内的转移。这项基于核酸适配体的工作不仅发现了重要生物标志物，还利用核酸适配体揭示了重塑膀胱癌细胞膜表面张力的关键蛋白质，并阐明了其

促进癌细胞转移相关的生物功能, 为膀胱癌的防治提供了新思路。传统的 cell-SELEX 耗时耗力, 需要多次筛选和酶扩增反应, Liu 等^[17] 将 X-核酸适配体筛选技术用于 cell-SELEX, 它是基于偶联多个拷贝的修饰核酸适配体文库微球的筛选技术, 能够有效地提高文库与靶标结合的机会。筛选过程包括首先去除与正常细胞 SV-HUC-1 结合的文库微球, 然后将不结合正常细胞的文库微球与靶细胞膀胱癌细胞 5637 孵育, 洗涤除去不结合靶细胞的核酸文库, 最后结合靶细胞的序列进行 PCR 扩增、测序。仅需要两轮筛选即可得到在膀胱癌细胞中表现出良好亲和力的核酸适配体 BC-3 ($K_d=(155.1\pm 43.02)$ nmol/L), 经鉴定得到 BC-3 特异性识别膀胱癌标志物核糖体蛋白 S7 (RPS7), 并且 BC-3 与正常细胞和癌旁组织没有结合, 说明 RPS7 是膀胱癌潜在的标志物。进一步研究发现, 核酸适配体 BC-3 可通过网格蛋白介导的内吞作用内化到膀胱癌细胞中, 在体外、小鼠和患者肿瘤组织样本中 BC-3 对肿瘤细胞表现出良好的选择性。此外, 核酸适配体 BC-3 还能区分膀胱癌和肾癌, 可以作为尿液细胞学检测的潜在特异性分子探针。细胞筛选技术局限于细胞表面分子的筛选, 并且特定的肿瘤细胞系不能反映整体肿瘤的状况, 这使得通过 cell-SELEX 筛选得到的核酸适配体难以应用到病理组织。组织筛选技术 (tissue-SELEX) 在 cell-SELEX 的基础上进行了优化。组织筛选以临床病理组织切片为筛选对象, 包括膜成分和细胞内物质, 可望筛选出更符合临床需要的核酸适配体。Liu 等^[18] 利用单轮的 tissue-SELEX 技术筛选出与膀胱癌组织结合的核酸适配体 TB-5 并鉴定出其靶标为核仁蛋白 (nucleolin)。核仁蛋白是核仁中含量最丰富的非核糖体蛋白之一, 影响恶性肿瘤的存活、增殖和转移。与之前发现的靶标同为核仁蛋白的核酸适配体 AS1411 相比, TB-5 在核仁蛋白上的结合区域不同, 并且 TB-5 形成非 G-四链体结构, 主要参与基因转录调节, 通过扰乱癌细胞的 RNA 转录使癌细胞自噬并抑制其迁移和侵袭^[26]。而 AS1411 形成 G-四链体结构, 通过抑制细胞周期和炎症参与细胞凋亡^[18]。膀胱癌组织中核仁蛋白的 mRNA 表达较高, 它的表达高低与膀胱癌的恶性程度相关。相较于 AS1411, TB-5 分子具有更强的血清稳定性, 可与 AS1411 协同作用, 结合核仁蛋白不同部位以增强抗癌疗效。胡小晓等^[19] 采用 tissue-SELEX 方法, 以临床膀胱癌组织为正筛样本, 膀胱癌癌旁组织为

负筛样本, 经过两轮筛选挑选得到了与膀胱癌细胞膜蛋白结合的适配体 LYY-3 和 LYY-6, 用于膀胱癌上皮细胞及早期临床膀胱癌组织样本的检测, 并可以制备形成快速检测试剂盒, 用于膀胱癌的快速诊断。

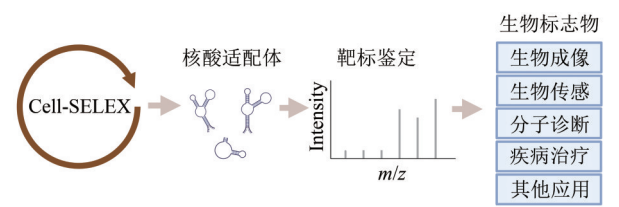


Fig. 2 Aptamers facilitate biomarker discovery^[25]
图2 核酸适配体促进生物标志物发现^[25]

1.3 其他与膀胱癌相关的核酸适配体

在其他肿瘤细胞或组织中筛选得到的核酸适配体, 若其作用靶标蛋白在膀胱癌中过表达, 亦可用于膀胱癌的诊断治疗。目前已经筛选得到许多肿瘤细胞的核酸适配体, 比如特异性识别乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、白血病等。尽管通过特定癌症筛选得到了许多核酸适配体, 但研究发现某些核酸适配体的靶标蛋白在多种癌症细胞中高表达, 可以作为广谱的癌症生物标志物, 如 Shangguan 等^[20] 发现的 sgc8, 靶向人急性淋巴细胞白血病细胞 CCRF-CEM 细胞表面蛋白受体蛋白酪氨酸激酶 (PTK7)。除了 CCRF-CEM 细胞, 在膀胱癌组织及多种膀胱癌细胞中, PTK7 的 mRNA 和蛋白质水平高于正常膀胱尿路细胞^[27]。因此, PTK7 也可作为一种潜在的膀胱癌生物标志物。上皮细胞黏附因子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 在大多数实体瘤中过表达, 在癌症诊断、预后、成像以及治疗中发挥重要作用。Song 等^[21] 成功筛选出结合人重组 EpCAM 蛋白的 DNA 核酸适配体 SYL3C, 该核酸适配体可以特异性识别来自乳腺癌、胃癌、结直肠癌、膀胱癌等患者的癌细胞, 不与 EpCAM 阴性细胞结合。该研究结果显示, SYL3C 适配体能够从细胞培养基中的混合细胞中识别靶癌细胞。当用于捕获癌细胞时, 在纯度约为 80% 的情况下, 获得了高达 63% 的癌细胞捕获效率。程序性死亡受体配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 蛋白表达水平已被证明与膀胱癌的严重程度和预后相关, 在肿瘤细胞上表达较高水平 PD-L1 的肿瘤可能被认为是高级别的^[28-30]。Wu 等^[22] 通过转染构

建了三阴性乳腺癌MDA-MB-231 PD-L1过表达细胞,筛选得到了靶向PD-L1的适配体XQ-P3 ($K_d = (15.36 \pm 1.74) \text{ nmol/L}$)。核酸适配体XQ-P3不仅能够抑制PD-1/PD-L1相互作用,还能恢复T细胞功能,对癌症的免疫调节和靶向治疗有潜在价值。诸如此类的核酸适配体虽然最初的筛选目的不是针对膀胱癌,但仍在膀胱癌的诊治方面具有良好的应用潜力。

2 核酸适配体在膀胱癌诊断中的应用

液体活检是使用人体的体液作为标本进行检测和分析的体外诊断技术,包括血液、尿液、脑脊液、唾液等。在癌症进展过程中,携带有肿瘤细胞相关信息的DNA/RNA等物质会被释放进入体液,通过检测这些物质可以对肿瘤进行早期诊断、复发监控、癌症分型及辅助治疗。相较于组织活检,液体活检属于无创检查,避免穿刺或组织切除,患者依从性好。液体活检能够实现个体化癌症实时监控,克服肿瘤异质性,提供全面检测信息等独特优势。

2.1 血液检测中的应用

血液作为重要媒介在人体各部分进行物质交换。在血液循环过程中,许多携带有肿瘤信息的物质也被释放出来。通过检测膀胱癌患者的血液,可以发现与肿瘤指标相关的生物标志物,对膀胱癌的诊断具有重要作用。血浆中尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)浓度的高低与患者在进行根治性膀胱切除术后侵袭性疾病特征和较差的生存结果有关^[31]。Dreymann等^[23, 32]利用夹心法构建了基于核酸适配体的检测以及区分人高分子质量和低分子质量uPA的方法。uPA核酸适配体作为替代抗体的特异性识别元件进行uPA检测,核酸适配体和抗体联合使用还可以对高分子质量uPA进行很好地区分,这种方法相对经济有效。

2.2 尿液检测中的应用

目前,美国癌症学会把尿液液体活检作为膀胱癌筛查的首选方式列出,包括尿液分析、尿细胞学检查和尿液肿瘤标志物。核酸适配体上可以修饰荧光基团、纳米载体、量子点等,检测尿液中的物质包括离子、小分子、病毒,如三聚氰胺^[33]、腺苷^[34]、可卡因^[35]、生物毒素^[36]等。Vanarsa等^[37]基于核酸适配体筛选分析了1317种蛋白质在膀胱癌中的表达情况,并与泌尿外科临床对照进行了比

较,并在68名受试者中对30种尿蛋白进行酶联免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)验证,用于膀胱癌诊断和分期的尿生物标志物的综合蛋白质组学和平台验证。结果表明,尿D-二聚体、载脂蛋白A1、基质金属蛋白酶1(metal matrix protease-1, MMP-1)、备解素(properdin)和钙结合蛋白B(calgranylin B)为区分膀胱癌和对照组的尿液标志物,尿D-二聚体(97%灵敏度、80%特异性)可用于膀胱癌初步诊断及在随访阶段监测膀胱癌复发。此外,8种尿蛋白显著区分了MIBC和NMIBC ($AUC = 0.75 \sim 0.99$),其中IL-8和IgA表现最好,它们可望用于监测膀胱癌患者癌症进展。这些新的膀胱癌尿液生物标志物在膀胱癌诊断与疗效监控等方面展现出了良好的应用潜力,但仍需更多临床样本进行系统验证。

Gogalic等^[38]设计了一个BCa芯片,用于复发性NMIBC非侵入性检测的蛋白质组验证。包含用于蛋白质标记的基质金属蛋白酶9(metal matrix protease-9, MMP9)、核心蛋白聚糖(decorin, DCN)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、IL-8、IL-6、基质金属蛋白酶7(metal matrix protease-7, MMP7)、E-钙黏蛋白(E-cadherin, Ecadh)、人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, ERBB2)、内皮生长因子受体(endothelial growth factor receptor, EGFR)抗体和用于Engrailed-2标记的核酸适配体。核酸适配体替代抗体,节约成本的同时保持检测的灵敏度和特异性。Engrailed-2适配体与抗体相比,增加了6倍测定灵敏度($LOD = 130 \text{ ng/L}$)和更高的动态范围。这项研究收集了125名膀胱癌患者尿液样本进行多重蛋白质标志物的快速检测,其检测方法简便、准确性高且不具有侵入性, AUC 为0.96。这种BCa芯片可用于快速检测复发性NMIBC,监测癌症患者的术后状况,但其仅使用了一种EN2核酸适配体,更多靶标的核酸适配体仍有待筛选与应用。

3 核酸适配体在膀胱癌治疗中的应用

3.1 基于核酸适配体的膀胱癌靶向治疗

膀胱癌的治疗以手术治疗为主,联合放疗、化疗和免疫治疗。传统的化疗由于缺乏靶向性,常常会对机体的其他细胞和器官造成严重的创伤,引起一系列不良反应。利用核酸适配体作为靶向分子与药物相连接,既保证了药物发挥有效治疗效果,也

可以提高药物的靶向性,使其精准到达作用部位,避免药物“不分敌我”,伤及正常细胞。

谭蔚泓等^[39-40]创造性地提出了核酸适配体-药物偶联物 (aptamer-drug conjugate, ApDC) 的概念,通过连接子共价或非共价连接核酸适配体和癌症化疗药物,利用核酸适配体对其特异性靶点的亲和性,实现药物的靶向递送,从而实现肿瘤的精准治疗,目前已经成为研究热点领域。其中,谭蔚泓团队^[41]研发出一种能向肿瘤部位靶向输送大量抗癌药物的DNA纳米火车,靶向肿瘤的核酸适配体作为“车头”,通过DNA自组装装载抗癌药物作为“车尾”,将药物精准送至癌变位置,并显著提高抗癌药物的载药量,有助于缩短癌症治疗周期、降低治疗成本(图3)。Wang等^[24]筛选获得了一种独特的化学修饰核酸适配体 Aptamer-B1,以特定的茎环结构与膀胱癌细胞系 T24 结合,并将纳米火车结构运用到膀胱癌靶向治疗中。他们将核酸适配体 Aptamer-B1 与临床常用的膀胱癌灌注化疗药物表柔比星组装,用于人膀胱肿瘤的小鼠原位异位移植模型治疗。Aptamer-B1-纳米链-表柔比星纳米火车通过网格蛋白介导的内吞作用和大胞饮作用内化到膀胱癌细胞中,对膀胱癌细胞有特异性细胞毒性,并且效果优于单独使用表柔比星。这种基于核酸适配体的递送系统可实现膀胱癌的靶向化疗,为临床开发提供了强有力的数据支持。

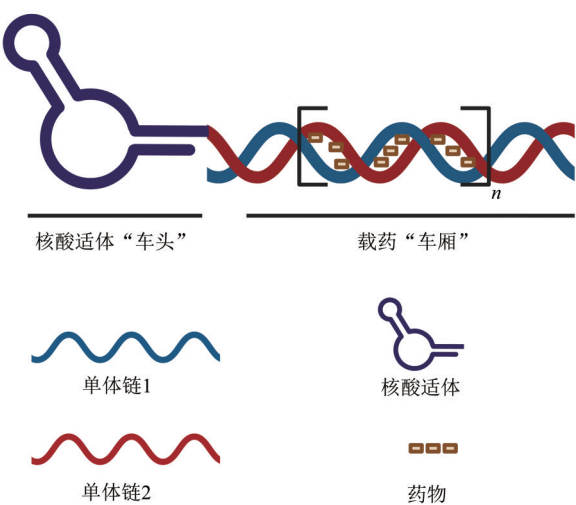


Fig. 3 Schematic of aptamer-tethered DNA nanotrains for drug delivery^[41]

图3 用于药物递送的核酸适配体-DNA纳米火车结构示意图^[41]

吉西他滨是膀胱癌治疗的一线化疗药物,但由于其稳定性差、靶向性差导致严重的骨髓抑制和消化系统毒性。Xiang等^[27]利用靶向PTK7蛋白的核酸适配体sgc8构建了PTK7-吉西他滨药物偶联物(PTK7-GEMs)。这种药物偶联物可以特异性结合并进入膀胱癌细胞5637中诱导细胞毒性。对照实验中,PTK7-GEMs与正常的膀胱上皮细胞SV-HUC-1并不结合,表现出很好的抗肿瘤功效和优异的生物安全性。刘建业等^[42]选择了靶向EpCAM的适配体SYL3C,构建了EpCAM-吉西他滨药物偶联物(EpCAM-GEMs)。并在膀胱癌细胞系、膀胱组织样本、小鼠皮下移植瘤中验证了EpCAM-GEMs对癌症的杀伤作用。

除了以上以单个核酸适配体偶联药物用于癌症治疗,Liu等^[43]设计并验证了多核酸适配体药物递送系统。利用分别靶向膀胱癌CD71蛋白和靶向肿瘤干细胞CD44蛋白的核酸适配体构建了双适配体-吉西他滨偶联物,用来双重靶向膀胱癌细胞。一系列体内体外实验表明,这种双功能纳米载体比单个适配体靶向递送的吉西他滨有更高的结合亲和力、更好杀伤肿瘤的能力以及防止肿瘤再生的作用,有望成为膀胱癌治疗新策略。

3.2 基于核酸适配体的膀胱癌免疫治疗

免疫治疗是通过调整患者自身免疫系统来攻击和消灭癌细胞,主要以免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 为代表,特别是程序性死亡受体1 (programmed death-1, PD-1) / PD-L1 检查点抑制剂。PD-1和PD-L1结合启动T细胞的程序性死亡,使肿瘤细胞获得免疫逃逸。

据报道,靶向PD-L1适配体和抗癌药结合可以通过阻断癌细胞表面的PD-L1和T淋巴细胞表面的PD-1之间的结合而具有很强的抗肿瘤活性,通过抑制肿瘤细胞的免疫逃逸和恢复免疫细胞的正常功能,从而发挥肿瘤细胞发挥杀伤作用^[22, 44-45]。Hu等^[46]将PD-L1适配体与化疗药物联合使用。一方面,磷酸二酯键连接吉西他滨与PD-L1适配体(PD-L1-GEMs),注射给药将吉西他滨转运至肿瘤组织,然后在磷酸酶的作用下释放吉西他滨。另一方面,PD-L1适配体也可以特异性结合膀胱癌表面的PD-L1蛋白,此竞争性结合能够抑制T淋巴细胞表面的PD-1与PD-L1结合,从而恢复T淋巴细胞的功能。研究人员采用两种人肿瘤移植小鼠模型

(皮下肿瘤和膀胱原位肿瘤)在体内验证了PD-L1-GEMs的生物安全性和抗肿瘤作用。

4 总结与展望

膀胱癌是源于膀胱细胞的常见肿瘤。在中国,膀胱癌是泌尿生殖系统中发病率第一的疾病,严重威胁了患者的健康。如果能实现膀胱癌的早期诊断,第一时间将癌症的“种子”扼杀在摇篮中,将极大提高患者的生存质量。自20世纪90年代被发现以来,核酸适配体凭借着自身的优势被广泛应用于生化分析、新药研发、疾病检测、临床治疗等领域。核酸适配体作为一种生物探针能够特异性识别并结合生物标志物,在膀胱癌的诊疗中发挥了重要的作用。核酸适配体可以作为分子识别探针,与各种纳米材料、荧光染料、放射性物质等联合使用应用于肿瘤成像、癌症检测、癌症治疗、靶向递送等领域。但是,由于核酸适配体在体内代谢较快,在临床转化中仍然面临着巨大挑战。膀胱癌灌注治疗无需体内循环,且无特殊的药剂学要求,可借助导管直接将药物灌注到膀胱中进行治疗,是一个非常适合核酸适配体药物治疗的临床适应症。另外,膀胱癌可以通过收集患者的尿液样本来进行检测与疗效监控。因此,膀胱癌可能是核酸适配体实现临床转化的优先选择的疾病。

尽管核酸适配体在应用前景上展现出了巨大的潜力,但与抗体相比,仍然存在一定发展空间。虽然已有许多识别膀胱癌的核酸适配体报道,并且在膀胱癌的早期诊断和靶向药物治疗方面展现出很好的应用前景,但是针对临床应用的癌症标志物的核酸适配体仍然非常匮乏,无法满足临床转化的需求。再者,膀胱癌肿瘤具有高度异质性,单一肿瘤标志物无法满足膀胱癌的精准诊断或临床监控需求,因此需针对不同来源的临床样本,在真实条件下(如尿液中)筛选获得高特异性、高亲和力的核酸适配体,提高癌症检测的灵敏度和准确性。核酸适配体领域迫切需要成功的商业化产品来推动其发展,而针对膀胱癌的居家快速检测/监测、膀胱癌成像以及膀胱癌灌注靶向治疗可能是未来核酸适配体应用的突破口。

参 考 文 献

- [1] Dobruch J, Oszczudlowski M. Bladder cancer: current challenges and future directions. *Medicina (Kaunas)*, 2021, **57**(8): 749
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, **71**(3): 209-249
- [3] Lavallee E, Sfakianos J P, Mulholland D J. Tumor heterogeneity and consequences for bladder cancer treatment. *Cancers*, 2021, **13**(21): 5297
- [4] Hu X, Li G, Wu S. Advances in diagnosis and therapy for bladder cancer. *Cancers*, 2022, **14**(13): 3181
- [5] Becker G J, Garigali G, Fogazzi G B. Advances in urine microscopy. *Am J Kidney Dis*, 2016, **67**(6): 954-964
- [6] Ng K, Stenzl A, Sharma A, *et al.* Urinary biomarkers in bladder cancer: a review of the current landscape and future directions. *Urol Oncol*, 2021, **39**(1): 41-51
- [7] Sun H, Zhu X, Lu P Y, *et al.* Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, **3**(8): e182
- [8] Cheng S, Jiang Z, Xiao J, *et al.* The prognostic value of six survival-related genes in bladder cancer. *Cell Death Discov*, 2020, **6**: 58
- [9] Morgan R, Bryan R T, Javed S, *et al.* Expression of engrailed-2 (EN2) protein in bladder cancer and its potential utility as a urinary diagnostic biomarker. *Eur J Cancer*, 2013, **49**(9): 2214-2222
- [10] Li Y, Liu H, Lai C, *et al.* Repression of engrailed 2 inhibits the proliferation and invasion of human bladder cancer *in vitro* and *in vivo*. *Oncol Rep*, 2015, **33**(5): 2319-2330
- [11] Kim E, Kang M, Ban C. Aptamer-antibody hybrid ELONA that uses hybridization chain reaction to detect a urinary biomarker EN2 for bladder and prostate cancer. *Sci Rep*, 2022, **12**(1): 11523
- [12] Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles D W, *et al.* MUC1 and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1455**(2-3): 301-313
- [13] Ahmad S, Lam T B, N'dow J. Significance of MUC1 in bladder cancer. *BJU Int*, 2015, **115**(1): 161-162
- [14] Ferreira C S, Matthews C S, Missailidis S. DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers. *Tumour Biol*, 2006, **27**(6): 289-301
- [15] Ferreira C S, Papamichael K, Guilbault G, *et al.* DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours. *Anal Bioanal Chem*, 2008, **390**(4): 1039-1050
- [16] Sun X, Xie L, Qiu S, *et al.* Elucidation of CKAP4-remodeled cell mechanics in driving metastasis of bladder cancer through aptamer-based target discovery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, **119**(16): e2110500119
- [17] Liu Y, Li J, Ou H, *et al.* Identification of new aptamer BC-3 targeting RPS7 from rapid screening for bladder carcinoma. *Genes Dis*, 2022, **10**(5): 2137-2150
- [18] Liu Y, Hu B, Pei X, *et al.* A non-g-quadruplex DNA aptamer targeting NCL for diagnosis and therapy in bladder cancer. *Adv Healthc Mater*, 2023, **12**(20): e2300791
- [19] 胡小晓, 谭蔚泓, 刘匀毅, 等. 一种膀胱癌核酸适体的组织样本快速筛选及其在检测制剂中的应用: 中国, 202010139631.7. 2020-11-17

- Hu X X, Tan W H, Liu Y Y, *et al.* A Rapid Screening of Tissue Samples for Bladder Cancer Aptamers and Its Application in Detection: China, 202010139631.7. 2020-11-17
- [20] Shangguan D, Li Y, Tang Z, *et al.* Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(32): 11838-11843
- [21] Song Y, Zhu Z, An Y, *et al.* Selection of DNA aptamers against epithelial cell adhesion molecule for cancer cell imaging and circulating tumor cell capture. *Anal Chem*, 2013, **85**(8): 4141-4149
- [22] Wu X, Li F, Li Y, *et al.* APD-L1 aptamer selected by loss-gain cell-SELEX conjugated with paclitaxel for treating triple-negative breast cancer. *Med Sci Monit*, 2020, **26**: e925583
- [23] Dreyman N, Wuensch J, Sabrowski W, *et al.* Inhibition of human urokinase-type plasminogen activator (upa) enzyme activity and receptor binding by DNA aptamers as potential therapeutics through binding to the different forms of upa. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(9): 4890
- [24] Wang Y, Zhang Y, Li P C, *et al.* Development of novel aptamer-based targeted chemotherapy for bladder cancer. *Cancer Res*, 2022, **82**(6): 1128-1139
- [25] Bing T, Zhang N, Shangguan D. Cell-SELEX, an effective way to the discovery of biomarkers and unexpected molecular events. *Adv Biosyst*, 2019, **3**(12): e1900193
- [26] Bates P J, Laber D A, Miller D M, *et al.* Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp Mol Pathol*, 2009, **86**(3): 151-164
- [27] Xiang W, Peng Y, Zeng H, *et al.* Targeting treatment of bladder cancer using PTK7 aptamer-gemcitabine conjugate. *Biomater Res*, 2022, **26**(1): 74
- [28] Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, *et al.* Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, **56**(8): 1173-1182
- [29] Inman B A, Sebo T J, Frigola X, *et al.* PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and bcg-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer*, 2007, **109**(8): 1499-1505
- [30] Bellmunt J, Powles T, Vogelzang N J. A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now. *Cancer Treat Rev*, 2017, **54**: 58-67
- [31] Schuettfort V M, Pradere B, D'andrea D, *et al.* Prognostic impact of preoperative plasma levels of urokinase plasminogen activator proteins on disease outcomes after radical cystectomy. *J Urol*, 2021, **206**(5): 1122-1131
- [32] Dreyman N, Sabrowski W, Danso J, *et al.* Aptamer-based sandwich assay formats for detection and discrimination of human high- and low-molecular-weight upa for cancer prognosis and diagnosis. *Cancers (Basel)*, 2022, **14**(21): 5222
- [33] Gu C, Xiang Y, Guo H, *et al.* Label-free fluorescence detection of melamine with a truncated aptamer. *Analyst*, 2016, **141**(14): 4511-4517
- [34] Hu Y, Liu J, You X, *et al.* A light-up probe for detection of adenosine in urine samples by a combination of an aie molecule and an aptamer. *Sensors (Basel)*, 2017, **17**(10): 2246
- [35] Guler E, Bozokalfa G, Demir B, *et al.* An aptamer folding-based sensory platform decorated with nanoparticles for simple cocaine testing. *Drug Test Anal*, 2017, **9**(4): 578-587
- [36] Santovito E, Greco D, D'ascanio V, *et al.* Development of a DNA-based biosensor for the fast and sensitive detection of ochratoxin a in urine. *Anal Chim Acta*, 2020, **1133**: 20-29
- [37] Vanarsa K, Castillo J, Wang L, *et al.* Comprehensive proteomics and platform validation of urinary biomarkers for bladder cancer diagnosis and staging. *BMC Med*, 2023, **21**(1): 133
- [38] Gogalic S, Sauer U, Doppler S, *et al.* Validation of a protein panel for the noninvasive detection of recurrent non-muscle invasive bladder cancer. *Biomarkers*, 2017, **22**(7): 674-681
- [39] Huang Y F, Shangguan D, Liu H, *et al.* Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. *Chembiochem*, 2009, **10**(5): 862-868
- [40] He J, Duan Q, Ran C, *et al.* Recent progress of aptamer-drug conjugates in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*, 2023, **13**(4): 1358-1370
- [41] Zhu G, Zheng J, Song E, *et al.* Self-assembled, aptamer-tethered DNA nanotrains for targeted transport of molecular drugs in cancer theranostics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(20): 7998-8003
- [42] 刘建业, 刘镓浩, 刘彪, 等. 核酸适配体-药物结合物 EpCAM-GEMs 在制备治疗膀胱癌药物中的应用: 中国, 202210708650.6. 2022-09-13
- Liu J Y, Liu J H, Liu B, *et al.* Application of Aptamer-drug Conjugate EpCAM-GEMs in The Preparation of Drugs for The Treatment of Bladder Cancer: China, 202210708650.6. 2022-09-13
- [43] Liu B, Wang J, Peng Y, *et al.* CD71/CD44 dual-aptamer-gemcitabine conjugate for tumor co-targeting treatment of bladder cancer. *Chem Eng J*, 2023, **464**: 142597
- [44] Camorani S, Passariello M, Agnello L, *et al.* Aptamer targeted therapy potentiates immune checkpoint blockade in triple-negative breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, **39**(1): 180
- [45] Gao T, Mao Z, Li W, *et al.* Anti-PD-L1 DNA aptamer antagonizes the interaction of PD-1/PD-L1 with antitumor effect. *J Mater Chem B*, 2021, **9**(3): 746-756
- [46] Hu X, Zeng H, Peng Y, *et al.* Targeting PD-L1 with DNA aptamers and conjugated with gemcitabine as a novel therapeutic strategy for bladder cancer chemotherapy combined with immunotherapy. *Small Science*, 2023, **3**(12): 2300104

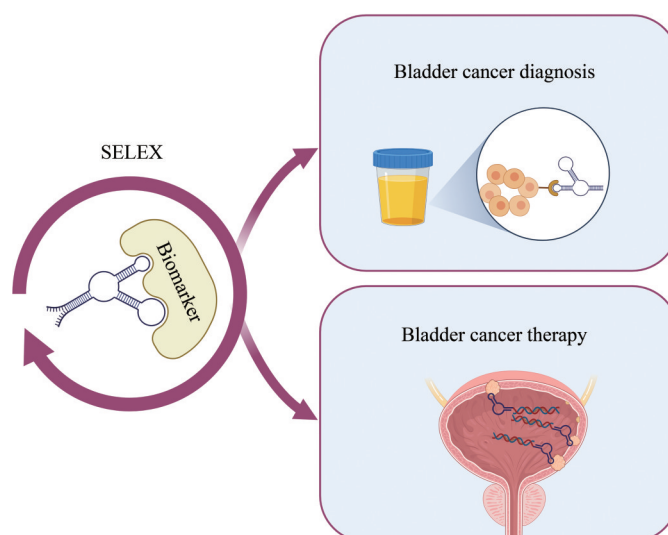
The Application of Aptamers in The Diagnosis and Therapy of Bladder Cancer*

FENG Shu-Wei^{1,2)}, ZHANG Min-Xin^{1,2)}, WU Xiao-Qiu²⁾, LIN Heng-Yi²⁾, BING Tao^{2)**}

¹⁾College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

²⁾The Key Laboratory of Zhejiang Province for Aptamers and Theranostics, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou Institute of Medicine Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310022, China)

Graphical abstract



Abstract Bladder cancer is one of the most prevalent cancers worldwide, with a high rate of recurrence and mortality, which is the ninth most common malignancy globally. Cystoscopy remains the gold standard for clinical bladder cancer diagnosis, but its invasive nature can lead to bacterial infection and inflammation. Urine cytology is a non-invasive and simple diagnostic method, but it has lower sensitivity in detecting low-grade bladder cancer and may yield false negative results. Therefore, identifying ideal diagnostic and prognostic biomarkers is crucial for accurate diagnosis and effective treatment of bladder cancer. Aptamers, characterized as single-stranded DNA or RNA with unique three-dimensional conformations, exhibit the ability to identify various targets, ranging from small molecules to tumor cells. Aptamers, also known as chemical antibodies, are generated by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) process and can function similarly to traditional antibodies. They hold numerous advantages over antibodies, such as ease of modification, low immunogenicity, and rapid tissue penetration and cell internalization due to their nucleic acid molecule structure.

* This work was supported by grants from Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (YXD24B0401), Pioneer R&D Program of Zhejiang (2023SDYXS0002), and National Health Commission Science Research Fund-Zhejiang Provincial Health Key Science and Technology Plan Project (WKJ-ZJ-2424).

** Corresponding author.

Tel: 86-571-88122625, E-mail: bingtao@him.cas.cn

Received: December 11, 2023 Accepted: January 17, 2024

Since their discovery in the 1990s, aptamers have been widely used in biochemical analysis, disease detection, new drug research and other fields. This article provides an overview of aptamer selection and characterization for bladder cancer, discussing the research advancements involving aptamers in diagnosing and treating this disease. It covers aptamers obtained through different SELEX methods, including protein-SELEX, cell-SELEX, tissue-SELEX, and aptamers from other cancer SELEX; the detection in blood samples and urine samples; and application in targeted therapy and immunotherapy for bladder cancer. Currently, several aptamers capable of identifying bladder cancer have been generated, serving as molecular probes that have played a pivotal role in the early detection and treatment of bladder cancer. Bladder cancer perfusion therapy is well-suited for aptamer drug therapy because it does not require internal circulation, making it a suitable clinical indication for aptamer drug development. In addition, bladder cancer can be detected and monitored by collecting urine samples from patients, making it a preferred disease for clinical conversion of aptamers. While aptamers show promise, there is still much room for development compared with antibodies. There are still many clinically applied cancer biomarkers without corresponding aptamers, and more aptamers targeting different biomarkers should be selected and optimized to improve the sensitivity and accuracy for cancer detection and therapy. The field of aptamers urgently needs successful commercial products to promote its development, and home rapid detection/monitoring, imaging and targeted therapy of bladder cancer by infusion may be the breakthrough point for future application of aptamers.

Key words aptamer, bladder cancer, tumor diagnosis, tumor therapy

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0485