

• 基础研究 •

SELEX 技术筛选乳腺癌亚型组织细胞的 DNA 适配子

潘先均¹, 刘 美¹, 李光新², 徐发良^{1*}

¹重庆大学附属肿瘤医院乳腺肿瘤中心, ²病理科, 重庆 400030

[摘要] 目的: 获取结合于不同亚型乳腺癌组织细胞的 DNA 适配子。方法: 采用 PCR 法建立随机双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 文库, 用卵白素包被的琼脂糖珠从 dsDNA 库获取单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 文库; 以消减细胞-指数富集的配体进化系统 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 技术为基础, 将体外培养的乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 交替作为靶标进行正筛选, 以相同组织来源的乳腺上皮细胞 MCF-10A 进行负筛选, 琼脂糖电泳法检测 PCR 扩增和适配子回收、温度梯度实验优化 PCR 条件、流式细胞术监测适配子与靶细胞的亲和力, 采用常规分子生物学技术完成适配子的克隆和测序, 通过序列分析初步筛选适配子; 综合采用流式细胞术、激光共聚焦和免疫荧光染色等实验优选 DNA 适配子。结果: 成功建立 ssDNA 文库, 优化了 SELEX 筛选条件, 通过 20 轮交叉串联的细胞-SELEX 筛选获取了特异性结合乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的 DNA 适配子, 随机挑选 100 个阳性克隆测序, 鉴定出 72 个 DNA 适配子, 采用 Blastn 程序进行精确比对未发现相似序列。通过序列分析初步筛选出适配子 5 个, 经优选实验获取了可结合乳腺癌亚型组织细胞的适配子 2 个。结论: 采用交叉串联的细胞-SELEX 技术, 可在较短时间获取结合不同临床乳腺癌亚型组织细胞的 DNA 适配子, 为乳腺癌靶向递药系统的探索研究提供了可能。

[关键词] 乳腺癌; SELEX; 适配子; 交叉串联; 广谱

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2025)02-147-10

doi: 10.7655/NYDXBNSN240809

Screening of DNA aptamers for subtype of breast cancer cells by using SELEX

PAN Xianjun¹, LIU Mei¹, LI Guangxin², XU Faliang^{1*}

¹Breast Cancer Center, ²Department of Pathology, Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing 400030, China

[Abstract] **Objective:** To get DNA aptamers binding to different subtypes of breast cancer cells. **Methods:** A random double-stranded DNA (dsDNA) pool was established by PCR, and single-stranded DNA (ssDNA) library was separated from the dsDNA pool by coated sepharose. Based on subtractive cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX), the *in vitro* cultured breast cancer cells, MCF-7 and MDA-MB-231, were alternately used as positive screening targets while normal mammary gland cell MCF-10A as negative. The effect of PCR amplification and the recovery of aptamer were confirmed by agarose electrophoresis. The PCR conditions were optimized through temperature gradient experiment, while the affinity of aptamers for target cells was monitored by using flow cytometry (FCM). Cloning and sequencing of aptamers were carried out by conventional molecular biology techniques. The aptamers were preliminarily screened by sequence analysis, and DNA aptamers were selected by FCM, laser confocal and immunofluorescence staining. **Results:** A random ssDNA library was successfully established, and the screening conditions of SELEX were optimized. Specific DNA aptamers for MCF-7 and MDA-MB-231 cells were obtained after 20 runs' tandem crossed cell-SELEX. Of 100 positive sequenced clones, 72 aptamers were identified. Accurate alignment of Blastn implied no similar sequence to the 72 submitted aptamers. Five aptamers were preliminarily screened by sequence analysis, and two aptamers which could bind to breast cancer subtype tissue cells were obtained by optimization experiment. **Conclusion:** By using the tandem crossed cell-SELEX, DNA aptamers of broad-spectrum combing with clinical breast cancer subtypes can be obtained in a short time, which may be helpful for the targeted drug delivery system of breast cancer.

[Key words] breast cancer; SELEX; aptamer; tandem crossed; broad spectrum

[J Nanjing Med Univ, 2025, 45(02): 147-156]

[基金项目] 重庆市自然科学基金(cstc2020jcyj-zdxmX0030); 重庆市社会事业与民生保障专项课题(cstc2015shmszx120051)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xufaliang@cqu.edu.cn (ORCID: 0000-0003-2954-4709)

乳腺癌是全球女性发病率和病死率最高的恶性肿瘤^[1-2],严重威胁患者生命健康。乳腺癌具有明显的异质性^[3-5]:可分为多个分子亚型,不同亚型之间的临床和病理特征各不相同,在治疗敏感性、基因表达、浸润转移、生存预后等方面存在很大差异。目前临床将乳腺癌分为Luminal A、Luminal B、HER2型和三阴性型等分子亚型,并根据各亚型的特征进行个体化治疗,包括手术、化疗、放疗、内分泌治疗和分子靶向治疗。乳腺癌的异质性增加了诊断治疗的难度,探究能够同时结合乳腺癌细胞多个分子亚型的抗体类似物,将有助于进一步提高肿瘤识别和分子治疗的效率。

近年来,采用指数富集的配体进化系统(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术成功筛选了肿瘤细胞特异性的核酸适配子^[6-8],有望用于肿瘤筛查、诊断、治疗、监测和研究等。研究发现,采用细胞-SELEX筛选的乳腺癌细胞特异性DNA适配子具有识别乳腺癌亚型细胞的功能^[9],这提示采用细胞-SELEX技术获取的适配子具有细胞水平的特异性;如果以多种亚型的乳腺癌细胞为靶标进行SELEX筛选,就可能获取同时识别一种以上乳腺癌亚型细胞的适配子,从而有利于提高乳腺癌的诊断和治疗效率。另一方面,不同分子亚型的乳腺癌有相应的细胞株^[10-11],也为筛选识别多种乳腺癌细胞的适配子研究提供了可能。

近年来,尽管细胞-SELEX技术本身取得了较大发展、建立了多种复杂的SELEX筛选方法^[12-13],但目前尚未发现与本研究方法类似的报道。本研究以细胞-SELEX技术为基础,采用不同分子亚型乳腺癌对应的细胞株作为靶标,进行交叉串联细胞-SELEX筛选,最终获取能与不同亚型乳腺癌细胞高特异性、高亲和力结合的DNA适配子,为乳腺癌的诊断和治疗研究提供一种新的思路和方法。

1 材料和方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231以及正常乳腺上皮细胞MCF-10A(ATCC,美国);大肠杆菌DH5 α 菌株由第三军医大学实验中心提供;卵白素包被的琼脂糖珠(Amersham Pharmacia Biosciences公司,美国);PCR试剂盒及相关酶(TaKaRa公司,日本);pUC-T simple TA连接试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);酵母tRNA、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、胎牛血清(fetal bovine

serum, FBS)、PRIM 1640和PBS(Sigma公司,美国)。

乳腺组织标本源于重庆大学附属肿瘤医院住院患者(入院时统一签署知情同意书,经医院伦理委员会批准),其中乳腺癌20例(Luminal A、Luminal B、HER2、三阴性乳腺癌,每个亚型5例)、乳腺纤维腺瘤2例、正常乳腺组织2例。

1.2 方法

1.2.1 DNA序列合成与纯化

随机DNA库序列(5'-ATACCAGCTTATTCAATT-52-NT-AGATAGTAAGTGCAATCT-3');异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记引物(5'-FITC-ATACCAGCTTATTCAATT-3');生物素标记引物(5'-trB-AGATTGCACTTACTATCT-3')。以上DNA序列由上海生工公司进行人工合成、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)纯化和DNA定量分析。

1.2.2 dsDNA库和ssDNA库的制备

参考文献[14],以FITC标记引物和生物素标记引物进行PCR扩增,PCR产物即为双链DNA(double-stranded DNA, dsDNA)库。将dsDNA库置于碱性环境(0.2 mol/L NaOH)经95℃变性5 min后;再用卵白素包被的琼脂糖珠分离,以去除生物素化引物所在的反义DNA单链,保留FITC标记引物所在的正义单链,从而获得单链DNA(single-stranded DNA, ssDNA)库,即原始库。PCR的扩增效果通过3%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,并以此来优化PCR反应的条件。

1.2.3 细胞培养

人乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231,以及正常人乳腺上皮细胞MCF-10A,采用常规细胞培养液(PRIM 1640+10%FBS+100 U/mL青-链霉素)培养于37℃、5%CO₂孵箱;细胞生长至对数生长期时,用洗脱液(PBS+5 g/L糖+5 mmol/L MgCl₂)洗涤3次,并进行靶细胞和对照细胞的计数、活力检测,备筛选之用。

1.2.4 交叉进行的乳腺细胞-SELEX筛选

采用常规细胞培养技术,大量培养乳腺癌细胞株和正常乳腺上皮细胞株;待细胞进入对数生长期后,用于交叉串联细胞-SELEX筛选。每次筛选前,需注意细胞状态良好、清除死细胞和确保细胞无污染。

筛选流程:通过预实验确定3种细胞交叉串联SELEX筛选方法,包括2种乳腺癌细胞的交叉正筛选、1种正常乳腺细胞的负筛选;正筛选部分,每个

小循环的筛选流程均进行2轮筛选,之后进入下一个小循环的筛选;所有正筛选流程进行完毕,最后完成2轮负筛选。

正筛选:取200 pmol单链ssDNA库溶于400 μ L结合液[洗脱液+0.1 mg/mL酵母tRNA+1 mg/mL BSA];95 $^{\circ}$ C 5 min变性,冰上放置10 min;将ssDNA库与 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个第1种靶细胞(MCF-7)共孵育于冰上60 min;洗涤细胞、离心后,用300 μ L结合液重悬细胞,95 $^{\circ}$ C加热5 min以便将结合于靶细胞的ssDNA充分洗脱;共完成2轮筛选。采用同样的方法进行第2种靶细胞(MDA-MB-231)的正筛选。

负筛选:将洗脱的ssDNA与乳腺正常对照细胞(MCF-10A,数量为靶细胞的5倍)共孵育于冰上60 min;离心、取上清液,对获得的ssDNA进行脱盐处理。

富集库的PCR扩增及条件优化:以经过正、负筛选获取的ssDNA为模板,以生物素及FITC标记的引物进行PCR扩增(10~20个循环94 $^{\circ}$ C 0.5 min;46 $^{\circ}$ C 0.5 min;72 $^{\circ}$ C 0.5 min;72 $^{\circ}$ C 5 min);扩增后的PCR产物用卵白素包被的琼脂糖珠去除生物素标记的反义链ssDNA,从而获得FITC标记的正义链ssDNA,即所谓富集库(适配子),用于后续筛选。按常规PCR退火温度条件不能获得预期PCR产物,需采用温度梯度PCR实验确定最适温度,温度梯度为0.5 $^{\circ}$ C,确定最适退火温度。

重复筛选:以富集库进行下一轮筛选,方法同上,重复筛选20轮;其中第1轮筛选以原始库ssDNA为10 nmol溶于1 mL结合液开始,不进行反向筛选(旨在将结合库放大)。为获取高特异性、高亲和力适配子,可采用以下策略:逐渐延长洗涤时间(1 \rightarrow 10 min)、增加洗涤液体积(0.5 \rightarrow 5 mL)、增加洗涤次数(3 \rightarrow 5次);此外,孵育液中还可加入20%FBS及50~100倍摩尔数的基因组DNA;其中最后一轮筛选后,所获ssDNA进行PCR时采用非标记引物,扩增产物以TA载体克隆到大肠杆菌,进行克隆测序分析。

1.2.5 适配子富集效率的监测

FITC标记的ssDNA富集库(适配子)与两种乳腺癌细胞(2×10^5 个,作为靶细胞)、对照细胞共孵育于200 μ L含20%FBS的结合液;冰上放置50 min令其充分结合;以0.7 mL结合液(含0.1%的NaN₃)洗涤2次;以0.4 mL结合液(含0.1%的NaN₃)重悬;经流式细胞术(flow cytometry, FCM)计数30 000个细胞的平均荧光强度;以FITC标记的ssDNA初始库与靶细胞结合作为背景荧光,计算每一轮筛选所获适配

子的富集效率。

1.2.6 适配子与乳腺癌细胞的亲和力分析

人乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231,以及正常人乳腺上皮细胞MCF-10A消化处理、置12孔板爬片,37 $^{\circ}$ C 5%CO₂温箱培养24 h;PBS漂洗细胞2次,每次5 min;5%多聚甲醛室温固定15 min;PBS漂洗2次,每次5 min;取10 μ g(原始库34 μ L、22级库28 μ L)ssDNA与爬片4 $^{\circ}$ C结合过夜(ssDNA处理:95 $^{\circ}$ C变性5 min,冰上放置10 min);PBS漂洗细胞2次,每次5 min;DAPI染色10 min,封片,激光共聚焦显微镜观察。

1.2.7 适配子的TA克隆、测序、序列分析与初步筛选

第22轮筛选所获的适配子经PCR扩增、产物回收纯化;按照pUC-T simple TA连接试剂盒的说明书进行适配子的TA载体克隆;随机挑选100个阳性克隆送上海生工公司测序;用DNASTAR.Lasergene.v7.1软件识别和查找有效序列;采用精确比对法,在NCBI网站提供的Blastn程序比对人、小鼠的编码核酸数据库和其他非编码数据库。

1.2.8 适配子的肿瘤特异性分析与优选研究

采用FCM进行分析,参照1.2.5。观察对比适配子与各细胞结合的荧光强度:人乳腺癌细胞SKBR3、MCF-7和MDA-MB-231,正常人乳腺细胞MCF-10A,以及非乳腺来源的腺癌细胞SGC-7901、A549、SW480、A2780、HepG2和PANC-1。

1.2.9 适配子与乳腺癌细胞的结合

采用激光共聚焦显微分析法,参照1.2.6。特异性最高的优选适配子经FITC标记,激光共聚焦显微观察与乳腺癌细胞株的体外结合情况。

1.2.10 适配子与临床乳腺癌组织的结合

采用免疫荧光染色方法,取乳腺癌组织、乳腺显微腺瘤组织和乳腺正常组织蜡块,常规切片、3 μ m连续切片、防脱片,60 $^{\circ}$ C过夜烤片、抗原修复、恢复至室温,PBS洗涤3次,每次5 min;封闭60 min(含鲑鱼精DNA 0.1 mg/mL,tRNA 0.1 mg/mL,BAS 1%,0.02% Tween-20的PBS封闭液),加50 μ L 250 nmol/L荧光适配子探针(FITC标记的目标探针和对照探针)、避光4 $^{\circ}$ C 1 h;PBS洗涤5次;盖玻片封片,荧光显微镜观察适配子与临床组织标本的结合情况。

2 结果

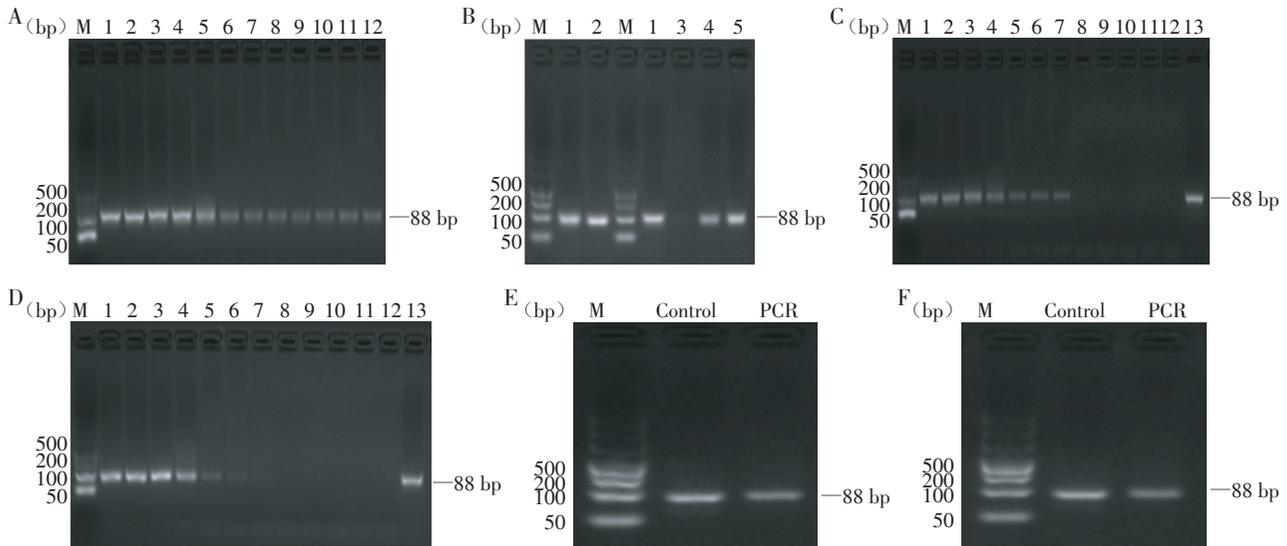
2.1 DNA库及PCR扩增条件的优化

通过PCR扩增建立初始dsDNA文库,扩增产物

相对分子量符合设计要求(图1),通过梯度实验确定PCR扩增条件。初始dsDNA库经卵白素包被的琼脂糖珠分离、去掉生物素化引物所在的反义单链,保留FITC标记引物所在的正义单链,从而建立初始ssDNA库,用于后续的筛选实验。

梯度实验琼脂糖电泳:原始DNA库最佳退火温度为51~52.7 °C(图1A);以ssDNA为模板PCR扩增

10个循环的产物条带清晰、单一,扩增30个循环时,电泳没有检测到预期的目标条带(图1B),提示PCR扩增的循环次数不能高于30;第1轮筛选的次级库ssDNA稀释10倍后PCR产物条带更清晰、更特异(图1C、D)。因此,退火温度52.7 °C时原始库PCR扩增条带清晰(图1E)、一级库ssDNA条带基本清晰(图1F)。



A: Temperature gradient experiment for original DNA library (M: DNA marker; 1-12: Temperature gradient from 49.0 °C to 67.0 °C). B: PCR product from different cycle-index of amplification (M: DNA marker; 1: control; 2: ssDNA template; 3: 30 cycles; 4-5: 10 cycles). C, D: Original ssDNA (C) vs. ten fold diluted original ssDNA (D) as PCR template (M: DNA marker; 1-12: Temperature gradient from 49.0 °C to 67.0 °C; 13: Control). E: dsDNA amplified by PCR of original library. F: ssDNA amplified by PCR of first round screening library.

图1 DNA随机文库的建立及PCR扩增条件优化

Figure 1 Establishment of DNA random library and optimization of PCR amplification conditions

2.2 交叉串联细胞-SELEX 筛选流程

预实验发现,如果采用MCF-7、MDA-MB-231、MCF-10A依次顺序筛选,DNA适配子得率非常低(数据未发表);改用MCF-7和MDA-MB-231两个靶细胞交叉、串联筛选,可以提高DNA适配子得率;最后进行乳腺细胞MCF-10A负筛选。交叉串联细胞-SELEX筛选流程:每种细胞进行连续2轮筛选后更换成另外一种细胞继续筛选(图2,表1)。

2.3 交叉串联细胞-CELEX法筛选乳腺癌细胞的DNA适配子

交叉串联细胞-SELEX筛选有3个关键点。①PCR退火温度(T_m):常规细胞-SELEX筛选过程一般具有相同 T_m 值,本研究原始DNA文库扩增以及每一轮筛选所需 T_m 并不完全一致,需通过温度梯度实验逐一确定,前10轮筛选 T_m 波动较大,10轮以后 T_m 相对稳定(图3A),可能与适配子特异性逐渐升高有关;②PCR产物电泳:随着筛选不断进行,PCR电泳条带

有逐渐清晰、集中的趋势,但并不明显(图3B);③适配子亲和力监测:采用MCF-7、MDA-MB-231、MCF-10A细胞进行交叉串联细胞-SELEX筛选,每一轮筛选后经FCM检测适配子平均荧光强度(即富集效率、亲和力),随着筛选不断进行,平均荧光强度出现逐渐增高趋势;采用MCF-7和MDA-MB-231各完成10轮筛选后,平均荧光强度曲线出现交叉点(图3C),继续筛选虽可进一步提高适配子对MDA-MB-231细胞的亲和力,但适配子对MCF-7细胞的亲和力可能下降,提示如果继续筛选,适配子对2种细胞的亲和力将出现分离,遂停止筛选。

2.4 初筛的DNA适配子与乳腺细胞的亲和力检测

完成20轮正筛选和2轮负筛选后,取荧光标记适配子与细胞结合。激光共聚焦显示适配子(22级库ssDNA)与乳腺癌细胞MDA-MB-231和MCF-7的结合明显强于0级库,与乳腺细胞MCF-10A结合弱于0级库(图4)。

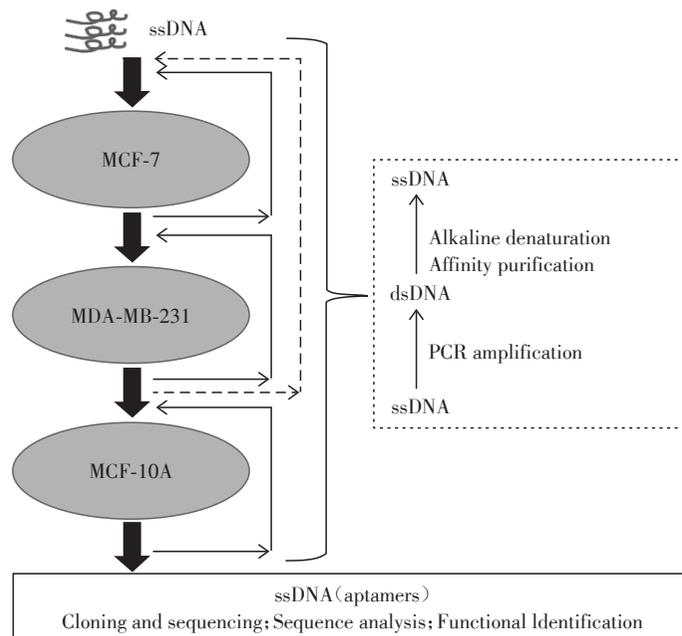


图2 交叉串联细胞-SELEX 筛选的流程图

Figure 2 Flow chart for tandem crossed cell-SELEX screening

表1 交叉串联细胞-SELEX 筛选的情况

Table 1 Details of screening by tandem crossed cell-SELEX

Cell Line	Screening round	Screening state
MCF-7	1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18	Positive
MDA-MB-231	3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 19, 20	Positive
MCF-10A	21, 22	Negative

2.5 适配子的克隆、测序与序列分析

完成20轮人乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231的交叉串联的正筛选,继以2轮正常人乳腺上皮细胞MCF-10A的负筛选;之后,回收适配子行PCR扩增,经TA克隆,随机挑选100个克隆进行测序和序列分析。其中有72个适配子序列符合设计要求,全长88 bp,上下游引物正确,中间52 bp为随机序列(表2);Blastn精确比对提示,所提交的72个DNA适配子均未发现相同序列。72个适配子中编号为ABC-2者重复22次,ABC-17、18、56、82重复2次,其他适配子均无重复;采用出现重复序列的5个适配子进行后续研究。

2.6 DNA适配子的细胞特异性分析

流式细胞分析显示,FITC标记的5个DNA适配子与乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231结合,不与乳腺癌细胞SKBR3结合,也不与正常人乳腺细胞MCF-10A以及非乳腺来源的各种腺癌细胞SGC-7901、A549、SW480、A2780、HepG2和PANC-1结合;

提示本研究获取的DNA适配子对乳腺癌细胞具有较好的特异性。在与乳腺癌细胞特异性结合过程中,按亲和力大小排序为ABC-18、ABC-56、ABC-2、ABC-17、ABC-82,其中ABC-18、ABC-56与乳腺癌2个亚型细胞具有最大的亲和力(图5),可以优选后续研究。

2.7 DNA适配子与乳腺癌细胞株的结合

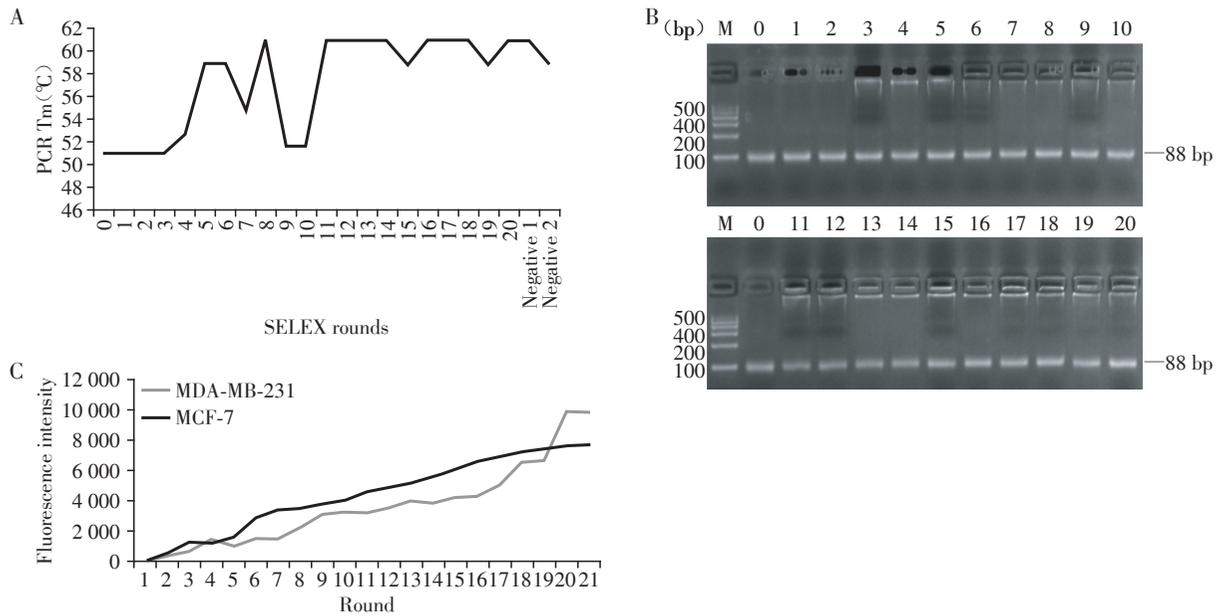
激光共聚焦显微分析提示,适配子ABC-18和ABC-56均可与乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231结合;初步证实这两个适配子可能具有同时结合2个乳腺癌细胞亚型的功能(图6)。

2.8 DNA适配子与临床乳腺癌组织切片的结合

免疫荧光染色显示(图7),DNA适配子ABC-56可以结合3种乳腺癌亚型组织(Luminal A、Luminal B、HER2),不与三阴性乳腺癌组织、乳腺良性肿瘤及正常乳腺组织结合。ABC-18可与2个乳腺癌亚型组织(Luminal B、HER2)结合,不与其他乳腺癌亚型、乳腺良性肿瘤或正常乳腺组织结合。因此,ABC-56适配子可能具有较好的功能。

3 讨论

近年来SELEX技术取得较大发展,以活细胞为靶标的细胞-SELEX技术在肿瘤领域的研究逐年增多^[6,15]。本课题组建立了细胞-SELEX技术平台^[16-17],以胃癌细胞进行SELEX筛选,继以正常胃黏



A: Temperature gradient PCR test for optimizing of cell-SELEX conditions. B: PCR product of ssDNA corresponding to 0–20 round positive cell-SELEX screening. C: The affinity of aptamers during tandem crossed cell-SELEX screening.

图3 乳腺癌细胞DNA适配子的交叉串联细胞-SELEX筛选

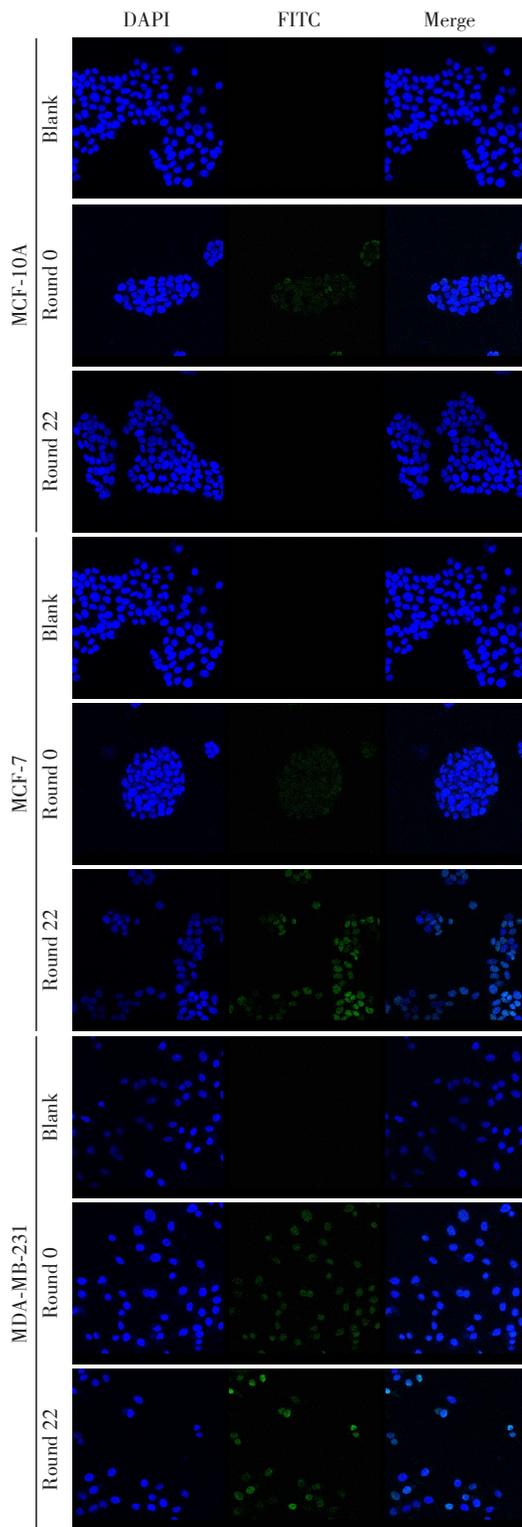
Figure 3 Cross-tandem screening of DNA aptmers to breast cancer by cells-SELEX

膜细胞负筛选,成功获取了胃癌细胞特异性DNA适配子,证实了一个含52个随机碱基序列的DNA文库在细胞-SELEX筛选中的可靠性^[17-20]。

乳腺癌分为多个分子亚型,如果个体化诊断治疗措施能同时兼顾多种亚型,就可能提高效率、使更多人群获益。为此,国内外学者在乳腺癌细胞-SELEX筛选方面完成了较多研究:王芹芹等^[21]对三阴性乳腺癌细胞SELEX筛选PCR扩增条件进行了优化;Moosavian等^[22]采用细胞-SELEX法筛选了高表达HER2的乳腺癌细胞RNA适配子;Liu等^[9,23]通过21轮细胞-SELEX筛选,获取了乳腺癌细胞株SK-BR-3的特异性核酸适配子,可区分SK-BR-3细胞和其他乳腺癌细胞,也可将SK-BR-3与正常乳腺细胞区分开、具有潜在亚型识别功能;Li等^[24]以高转移乳腺癌细胞MDA-MB-231正筛选、低转移乳腺癌细胞MCF-7为负筛选,通过消减细胞-SELEX法获取的适配子有望用于循环肿瘤细胞捕获和肿瘤转移预测;Civit等^[25]则在细胞-SELEX技术中引入高通量测序、放射活性和qPCR分析,获取了具有广谱识别特征的乳腺癌细胞适配子。此外,采用细胞-SELEX技术获取的核酸适配子既可用于肿瘤细胞的识别与检测,还可能获得全新的乳腺癌细胞特异性分子标志^[26]。然而,这些研究多采用1种癌细胞作为靶标完成SELEX正筛选,获取的核酸适配子虽

能结合该亚型乳腺癌细胞,但不能识别和结合其他亚型的乳腺癌细胞。本研究采用交叉串联的细胞-SELEX法,获取了72个完全符合设计要求的DNA适配子,通过序列分析初步筛选了5个候选适配子;通过流式细胞术、共聚焦显微分析和免疫荧光染色分析等优选实验,最终获取了2个DNA适配子,能同时结合MCF-7和MDA-MB-231乳腺癌细胞,但不与正常乳腺细胞及其他腺癌细胞结合;采用该方法可获取同时结合2种亚型乳腺癌细胞的DNA适配子,通过优选实验的适配子可以结合临床乳腺癌组织切片。

与常规细胞-SELEX技术比较^[27-28],本研究设计的交叉串联细胞-SELEX筛选法,具有以下特点。
①靶细胞选择:临床乳腺癌分子亚型与乳腺癌细胞株之间存在大致的对应关系^[10-11,29-30],可以此选择相应的靶细胞进行研究;本研究在靶细胞遴选中重点关注乳腺癌细胞株与乳腺癌常规分子分型密切相关的标志性分子表达情况;最终选择人乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231作为正筛选细胞,以正常乳腺上皮细胞MCF-10A作为负筛选细胞,希望所获取的DNA适配子能够识别更多亚型的乳腺癌细胞。
②靶细胞交叉串联的设计:笔者最初采用2种乳腺癌细胞株直接串联筛选(即MCF-7细胞序贯MDA-MB-231细胞筛选)、继以正常细胞负筛选,发



After round 22 selecting, FITC labelled ssDNA binding to MDA-MB-231 and MCF-7 cells while not binding to MCF10A cells. Simultaneously, the round 0 ssDNA hardly binded to MDA-MB-231, MCF-7 or MCF10A cells.

图4 激光共聚焦显微镜观察22级ssDNA库(适配子)与细胞的结合($\times 200$)

Figure 4 Round 22 ssDNA (aptamers) binding to target cells by confocal laser microscope($\times 200$)

表2 随机抽取100个克隆的适配子测序情况

Table 2 Aptamer sequencing from randomly selected 100 clones

Upstream/ downstream primers	Bases in random region	Subsequences of aptamer(<i>n</i>)
incorrect	-	9
correct	=52	72
correct	>52	2
correct	<52	17
Total	-	100

现适配子的得率很低、难以进行后续筛选(数据未发表);本研究尝试先以MCF-7细胞进行2轮正筛选、再串联以MDA-MB-231细胞进行2轮正筛选;之后重复再进行上述筛选,即交叉-串联的筛选;最后完成2轮负筛选。从理论上讲,这种筛选方法虽然可以获得同时识别2种亚型乳腺癌细胞的DNA适配子,但也可能降低适配子的特异性。③PCR条件不稳定、需反复优化确定:交叉串联细胞-SELEX筛选过程中,原始DNA文库扩增以及每一轮筛选所需的退火温度并不完全一致,本研究通过温度梯度PCR实验以确定每次筛选的退火温度($\Delta T=0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$)^[31],发现在前10轮筛选过程中PCR退火温度波动幅度较大,10轮以后相对稳定,推测可能是与2种靶细胞结合的适配子的结构差异较大,导致退火温度波动比较明显;随着筛选的进行,2种细胞的适配子相似度越来越大,它们之间的退火温度差异可能逐渐缩小、最终趋于稳定;同时,每轮筛选PCR的循环次数不需调整即可满足实验要求;此外,每次回收的ssDNA稀释10倍后用作PCR模板,比不稀释的扩增效果更好,可能跟稀释后减少了回收过程产生的杂质对PCR体系的影响有关。④筛选次数与亲和力监测的矛盾:筛选过程中MCF-7和MDA-MB-231细胞对应的亲和力曲线呈现交叉趋势,提示继续进行SELEX筛选可能导致适配子对MDA-MB-231细胞的亲和力进一步升高,但对MCF-7细胞的亲和力可能降低。因此,这种方法筛选DNA适配子,需要兼顾2种靶细胞的特性,虽然可以同时识别2种肿瘤细胞,但它们的亲和力也可能因此受到影响。

尽管如此,采用本研究方法获取的DNA适配子还存在一些不足,比如获取的适配子不能结合体外培养的乳腺癌SKBR3细胞,这可能在应用研究中产生漏诊、治疗无响应等不利影响;适配子与乳腺癌细胞结合的亚细胞定位还不明确,适配子作用的靶标还不清楚;适配子对三阴性乳腺癌的结合情况还

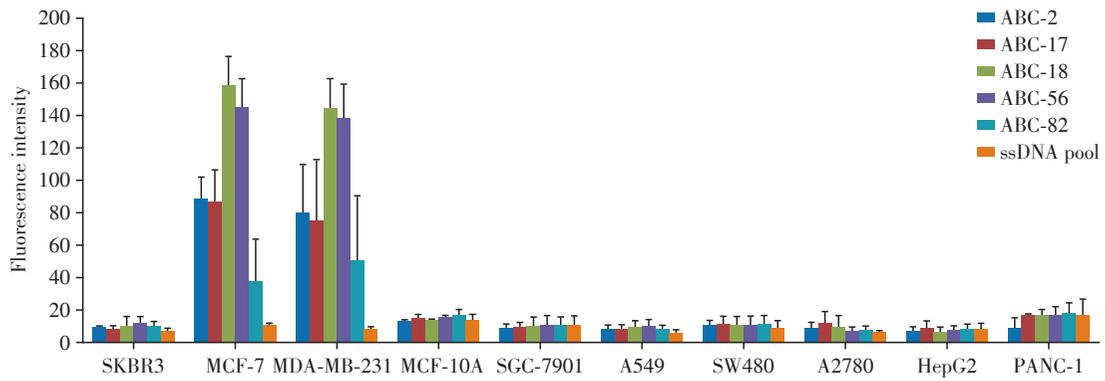


图5 DNA 适配子与各种腺癌细胞的结合情况

Figure 5 The binding of DNA aptamers to various adenocarcinoma cells

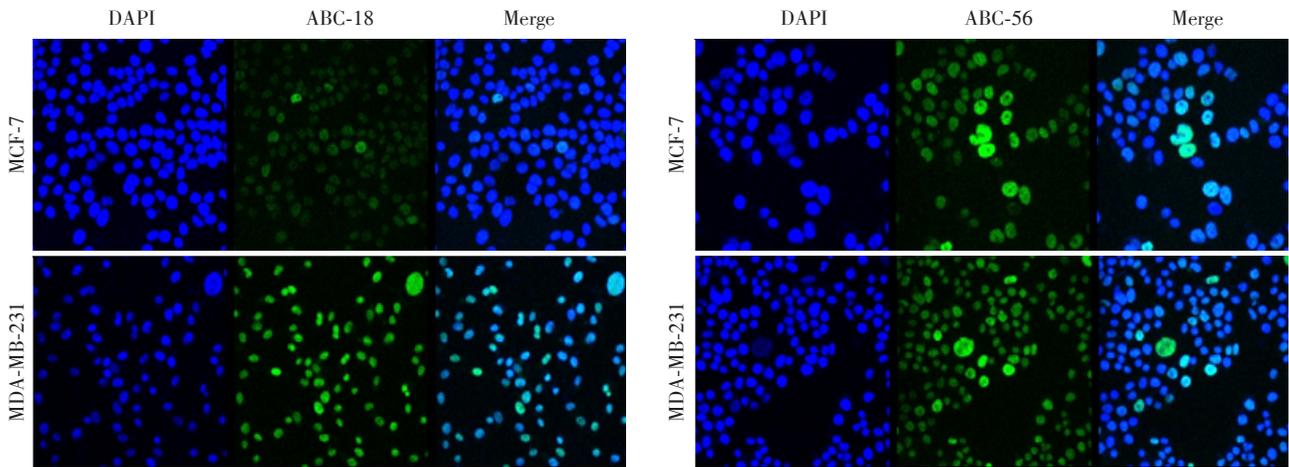
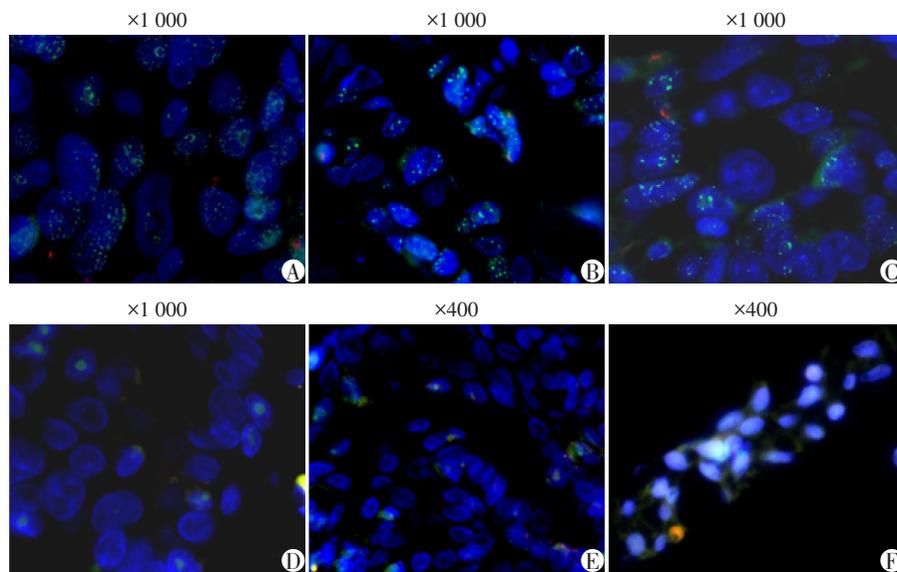


图6 激光共聚焦显微镜观察DNA 适配子与乳腺癌细胞株的结合(×200)

Figure 6 DNA aptamers bind to breast cancer cell lines by confocal laser microscope(×200)



Analysis of immunofluorescence staining. A-C: Breast cancer tissues with positive binding, showing Luminal A(A), Luminal B(B)and HER2(C) subtype, respectively. D: Breast cancer tissues with negative binding (triple negative subtype). E, F: Breast fibroadenoma tissues(E) and normal breast tissues(F) with low or negative binding.

图7 免疫荧光显微镜观察适配子ABC-56与乳腺来源的各种组织的结合

Figure 7 Binding of aptamer ABC-56 to tissues from breast by immunofluorescence microscope

需进一步验证。

综上,本研究初步建立了一种新的细胞-SELEX法,用于获取特异性识别2种肿瘤细胞亚型的DNA适配子;采用这种方法获取的适配子可同时识别2种肿瘤细胞,可能有利于提高肿瘤诊断、治疗和研究的效率,以及发现新的肿瘤标志物。有关该方法的潜在推广价值、所获适配子的亲和力测定及其与常规细胞-SELEX的比较,还需要进一步研究。

利益冲突声明:

所有作者声明无利益冲突。

Conflict of Interests:

All authors declare no conflict of interest.

作者贡献声明:

潘先均负责数据收集、文献查阅、论文初稿撰写;刘美负责数据收集、统计分析、文献查阅;李光新负责数据收集、分子病理实验;徐发良负责研究设计、数据解读、论文修改,提供基金项目支持。

Authors Contributions:

PAN Xianjun was responsible for data collection, literature review, and writing the draft of the manuscripts; LIU Mei was responsible for data collection, statistical analysis, and literature review; LI Guangxin was responsible for data collection and molecular pathology experiments; XU Faliang was responsible for research design, data interpretation, manuscripts revision, and fund support.

[参考文献]

- [1] MOMENIMOVAHED Z, SALEHINIYA H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world[J]. *Breast Cancer*, 2019, 11: 151-164
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424
- [3] CHU P Y, HOU M F, LAI J C, et al. Cell reprogramming in tumorigenesis and its therapeutic implications for breast cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1827
- [4] ROULOT A, HÉQUET D, GUINEBRETIERE J M, et al. Tumoral heterogeneity of breast cancer [J]. *Ann Biol Clin*, 2016, 74(6): 653-660
- [5] YEO S K, GUAN J L. Breast cancer: multiple subtypes within a tumor? [J]. *Trends Cancer*, 2017, 3(11): 753-760
- [6] MAIMAITIYIMING Y, HONG D F, YANG C, et al. Novel insights into the role of aptamers in the fight against cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(4): 797-810
- [7] MORITA Y, LESLIE M, KAMEYAMA H, et al. Aptamer therapeutics in cancer: current and future [J]. *Cancers*, 2018, 10(3): 80
- [8] LIU M, YU X C, CHEN Z, et al. Aptamer selection and applications for breast cancer diagnostics and therapy [J]. *J Nanobiotechnology*, 2017, 15(1): 81
- [9] LIU M, WANG Z F, TAN T, et al. An aptamer-based probe for molecular subtyping of breast cancer [J]. *Theranostics*, 2018, 8(20): 5772-5783
- [10] PRAT A, KARGINOVA O, PARKER J S, et al. Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 142(2): 237-255
- [11] DAI X F, CHENG H Y, BAI Z H, et al. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping [J]. *J Cancer*, 2017, 8(16): 3131-3141
- [12] CATUOGNO S, ESPOSITO C L. Aptamer cell-based selection: overview and advances [J]. *Biomedicines*, 2017, 5(3): 49
- [13] PANG X H, CUI C, WAN S, et al. Bioapplications of cell-SELEX-generated aptamers in cancer diagnostics, therapeutics, theranostics and biomarker discovery: a comprehensive review [J]. *Cancers*, 2018, 10(2): 47
- [14] SEFAH K, SHANGGUAN D H, XIONG X L, et al. Development of DNA aptamers using cell-SELEX [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(6): 1169-1185
- [15] XIONG H J, YAN J H, CAI S D, et al. Cancer protein biomarker discovery based on nucleic acid aptamers [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 132: 190-202
- [16] 徐发良, 周琦, 匡毅, 等. 利用细胞-指数式富集的配体系统进化技术筛选肿瘤细胞DNA适配子 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2013, 33(12): 1684-1688
XU F L, ZHOU Q, KUANG Y, et al. Screening of DNA aptamers for recognizing tumor cells by using cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment [J]. *Journal of Shanghai Jiao tong University (Medical Science)*, 2013, 33(12): 1684-1688
- [17] 徐发良, 陈小乐. 特异性识别胃癌细胞的DNA适配子GCA-5及其应用: CN103320445A [P]. 2013-09-25
XU F L, CHEN X L. DNA aptamer GCA-5 for specific recognition of gastric cancer cells and its application: CN103320445A [P]. 2013-09-25
- [18] 邵可可, 史新惠, 崔蕾蕾, 等. 乳液单引物PCR构建随机ssDNA文库方法的建立及优化 [J]. *临床检验杂志*, 2016, 34(11): 823-826
SHAO K K, SHI X H, CUI L L, et al. Establishment and optimization of emulsion single-primer PCR for constructing random ss DNA library [J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 2016, 34(11): 823-826
- [19] SHAO K K, DING W F, WANG F, et al. Emulsion PCR: a

- high efficient way of PCR amplification of random DNA libraries in aptamer selection[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24910
- [20] GRAHAM J C, ZARBL H. Use of cell-SELEX to generate DNA aptamers as molecular probes of HPV - associated cervical cancer cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e36103
- [21] 王芹芹, 胡 慧, 崔军威, 等. 指数富集配基系统进化技术筛选三阴乳腺癌适配子中聚合酶链反应扩增条件的优化及单链 DNA 的制备[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(12): 2732-2734
- WANG Q Q, HU H, CUI J W, et al. Selecting aptamers of triple negative breast cancer by systematic evaluation of ligands by exponential enrichment: addressing the polymerase chain reaction and single-stranded DNA generation issues[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2014, 31(12): 2732-2734
- [22] MOOSAVIAN S A, JAAFARI M R, TAGHDISI S M, et al. Development of RNA aptamers as molecular probes for HER2(+) breast cancer study using cell-SELEX[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2015, 18(6): 576-586
- [23] LIU M, YANG T, CHEN Z S, et al. Differentiating breast cancer molecular subtypes using a DNA aptamer selected against MCF - 7 cells [J]. *Biomater Sci*, 2018, 6 (12) : 3152-3159
- [24] LI W M, ZHOU L L, ZHENG M, et al. Selection of metastatic breast cancer cell-specific aptamers for the capture of CTCs with a metastatic phenotype by cell-SELEX [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 12: 707-717
- [25] CIVIT L, TAGHDISI S M, JONCZYK A, et al. Systematic evaluation of cell-SELEX enriched aptamers binding to breast cancer cells[J]. *Biochimie*, 2018, 145: 53-62
- [26] LU M, ZHOU L, ZHENG X H, et al. A novel molecular marker of breast cancer stem cells identified by cell - SELEX method[J]. *Cancer Biomark*, 2015, 15(2): 163-170
- [27] RAHIMIZADEH K, ALSHAMAILEH H, FRATINI M, et al. Development of cell-specific aptamers: recent advances and insight into the selection procedures [J]. *Molecules*, 2017, 22(12): 2070
- [28] KAUR H. Recent developments in cell-SELEX technology for aptamer selection [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018, 1862(10): 2323-2329
- [29] NEVE R M, CHIN K, FRIDLYAND J, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(6): 515-527
- [30] PARK B J, WHICHARD Z L, COREY S J. Dasatinib synergizes with both cytotoxic and signal transduction inhibitors in heterogeneous breast cancer cell lines: lessons for design of combination targeted therapy [J]. *Cancer Lett*, 2012, 320(1): 104-110
- [31] CHADALAVADA D M, BEVILACQUA P C. Analyzing RNA and DNA folding using temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) with application to in vitro selections[J]. *Methods Enzymol*, 2009, 468: 389-408

[收稿日期] 2024-08-01

(本文编辑: 陈汐敏)