

# 指数富集的配基系统进化技术及其在血管研究中的应用

汪江波, 张 慧 综述, 严鹏科 审校

( 南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 指数富集的配基系统进化技术; 综述; 随机寡核苷酸文库; 适配子

[摘要] 指数富集的配基系统进化技术是一种生物文库技术, 它利用人工合成的、容量约为  $10^{14} \sim 10^{15}$  的随机寡核苷酸文库与靶物质结合, 经过多轮筛选获得靶物质的 DNA 或 RNA 适配子, 具有实用范围广、筛选过程简便、适配子有高特异性和高亲和性等特点。在血管研究方面主要是针对血管内膜增生和新生血管形成开展的, 在该领域发展潜力巨大。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

指数富集的配基系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 是科学家们受组合化学、抗体库、随机噬菌体肽库技术的启发, 在 DNA 和组合蛋白的研究过程中建立的一种筛选有特异结合能力的配基生物文库技术。1990 年, Tuerk 等<sup>[1]</sup> 和 Ellington 等<sup>[2]</sup> 分别利用该技术筛选到与噬菌体 T4 DNA 聚合酶和有机染料高特异性、高亲和性结合的 RNA 适配子。随后该技术越来越受到科研工作者的青睐, 逐渐发展, 应用于多种靶物质如蛋白、核酸、氨基酸、染料等的筛选。本文就 SELEX 技术筛选适配子的原理及其在血管研究中的应用予以综述。

机文库中, 单链随机寡核苷酸分子易形成多种三维空间立体结构, 几乎能与自然界所有存在的种类分子作用。尤其是 RNA 分子易形成发夹、假节、鼓包、茎环、G-四聚体等二级结构, 更容易与蛋白质、核酸等物质特异性结合, 但在体内易被核酸酶降解, 必须进行修饰如嘧啶环的 2'-F 和 2'-NH<sub>2</sub> 修饰、嘌呤核苷酸的 2'-O-CH<sub>3</sub> 修饰、在配基的 3' 端加帽(capping) 等。DNA 相对 RNA 生产成本低, 体内较稳定, 不易被降解, 所构建的文库筛选出的适配子更适合体外诊断和体内治疗。

## 1 指数富集的配基系统进化技术的原理和特点

### 1.1 指数富集的配基系统进化技术的原理

指数富集的配基系统进化技术模拟自然界进化规则, 通过施加一定压力, 经过一个逐级进化过程, 从一个大的寡核苷酸文库中获得与靶物质严格匹配的配基, 又称适配子 (aptamer)。

指数富集的配基系统进化技术筛选的主要过程有: 人工建造随机寡核苷酸文库。④文库与靶标在一定条件下孵育。⑤将适配子-靶标复合物从反应体系中分离出来。从适配子-靶标复合物中分离出适配子。通过 PCR 或 RT-PCR 及体外转录对适配子进行复制, 反复构建次级文库, 反复进行筛选。对最终的适配子进行克隆、测序。如图 1。SELEX 首先根据分子生物学技术, 人工合成单链随机寡核苷酸文库。文库容量是指文库中所包含一定长度的不同核苷酸的组合数, 容量的大小由文库随机序列数决定。从理论上来说, 一个随机序列为  $n$  的文库容量约为  $4^n$ 。通常文库容量为  $10^{14} \sim 10^{15}$  就可以满足筛选的需要。文库可以是 DNA 文库, 也可以是 RNA 文库, 还可以是修饰化的 RNA 文库。在随

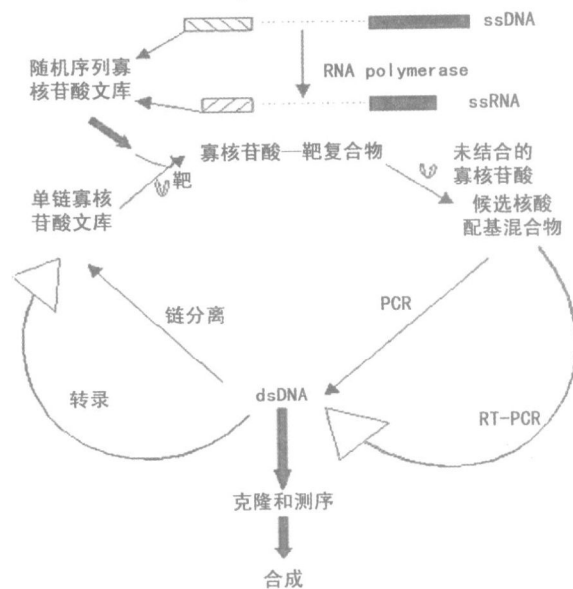


图 1. 指数富集的配基系统进化技术筛选适配子流程图

随机单链寡核苷酸文库的长度一般在 70~80 bp 左右。如果太短, 会引起同靶物质结合的二级结构减少; 如果太长, 则可能由于文库寡核苷酸链的一定导致分离出适配子的可能性下降。文库的中间为随机序列, 长度为 20~40 bp 左右, 目的在于增加文库的稳定性和为以后的扩增作准备。两侧

[收稿日期] 2005-10-21 [修回日期] 2006-02-25

[作者简介] 汪江波, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理学, 联系电话 13875777638。张慧, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理学。通讯作者严鹏科, 副教授, 硕士研究生导师, 从事动脉粥样硬化病理生理学研究, 联系电话 0734-8281408, E-mail 为 yanpengke67@163.net。

为固定序列,往往含较多的G、C碱基,有利于提高以后PCR退火温度,用来与引物结合,对适配子的功能不重要。技术的发展使随机文库的固定序列在SELEX筛选中不再需要。

在SELEX筛选过程中,分离与靶物质结合的寡核苷酸是SELEX筛选成功与否的关键,常用硝酸纤维素滤膜法<sup>[3]</sup>、变性凝胶电泳法和层析法等。研究<sup>[4]</sup>表明液相筛选法获得适配子的成功率明显高于固-液相筛选改良法,前者能保证蛋白、核酸分子的自然构象,同时溶液中的核酸与蛋白分子之间的运动接触碰撞可全方位进行。此外,反应温度、反应体系的pH值、文库与靶物质浓度之比等也影响筛选效果。高亲和性的适配子的富集效率取决于筛选过程中每个循环的严谨性。近几年,SELEX筛选过程实现了自动化,既降低了人为干扰又节省了筛选时间,增强了筛选效果。

## 1.2 指数富集的配基系统进化技术的特点

(1) 适用范围广。随机文库的大容量及其形成的空间结构的多样性决定了其筛选分子的范围广。无论是核酸、非结合蛋白,还是小分子有机物,甚至是金属离子、多糖类等均可与随机寡核苷酸文库结合,而且筛选出的适配子基本无毒、无免疫原性,因此可广泛用于工业、农业、医疗卫生等。

(2) 筛选过程相对简便、快速、经济。一般,完成一个SELEX循环只需2天,一个典型的SELEX筛选过程只需2~3个月即可完成,筛选出的适配子的小规模合成和纯化不超过3天。无需特殊的仪器和试剂,一般实验室均可完成。而筛选抗体至少也要3~6个月,且费力、成本高。筛选的自动化和规模化使适配子的生产更多、更快、更经济。

(3) 适配子具有高亲和性和高特异性。适配子与靶物质结合的解离常数多在皮摩尔每升至纳摩尔每升之间,明显强于其他物质,甚至强于天然配基<sup>[5,6]</sup>。且适配子有很强的分辨能力,能分辨出靶标上的细微结构,如一个甲基或羟基的区别,核苷酸、氨基酸的适配子能将它们与突变体、镜像体区分开来。而且,其特异性和亲和性不受组织或样品中的非靶蛋白的干扰。

(4) 筛选的机动性。筛选的条件可根据筛选的适配子的不同特性而进行人为设置,并且在合成时可随意精确地、定点地与其它功能基团或分子相连(如生物素、巯基、甲基)以满足使用者的需要。

(5) 筛选的实用性。筛选适配子可定时、定量且保质,且适配子的变性和复性快速、可逆,因而可重复使用、长期保存和室温运输,相对抗体和其它蛋白分子具有很强的实用性。

## 2 指数富集的配基系统进化技术在血管研究中的应用

自1990年发明以来,SELEX技术在基因与核酸研究、病原微生物研究、肿瘤研究等方面得到了广泛应用,然而,在血管研究中的应用文献报道的并不多,而且主要针对血管内膜增生和新生血管形成开展的。

### 2.1 针对血管内膜增生的研究

血管内膜增生是指当血管受损伤刺激时,局部大量释放生长因子诱导血管壁平滑肌细胞从血管中层迁移至内膜层,

使内膜增生,引起血管狭窄。一些手术如经皮腔内冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)的术后复发就与血管内膜增生有关<sup>[7]</sup>。

2.1.1 碱性成纤维细胞生长因子的研究 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)能促进血管内皮细胞增生和新生血管生长及心肌细胞增殖与分化,在体外能刺激血管平滑肌细胞增殖、迁移并诱导纤溶酶原激活剂的产生和胶原酶活性的发挥,在血管受伤后细胞损害发展中起重要作用,加重一些与病理性血管增生有关的疾病如肿瘤增殖和转移。bFGF是高血压时肾素-血管紧张素高功能状态发生、维持的一个重要因素,参与了心肌肥厚与肺动脉高压的形成。Golden等<sup>[8]</sup>以人重组的bFGF为靶,首次应用光化学SELEX技术进行筛选,获得高特异性、高亲和性的DNA适配子。它与bFGF结合的解离常数(Kd)达到了0.016 nmol/L,能灵敏地检测到血液中微量的bFGF,并且可以抑制血管内膜增生和血管新生,具有潜在的临床诊断及药物开发意义。

2.1.2 内皮生长因子的研究 内皮生长因子(endothelial growth factor, EGF)是一种与细胞周期调节有关的转录因子,通过与DP基因家族编码的蛋白形成异源二聚体,调节靶基因的转录影响细胞DNA的合成,促进细胞增殖。文献<sup>[9,10]</sup>报道,EGF的竞争性寡聚脱氧核糖核酸抑制肾小球系膜细胞、血管内皮细胞以及血管平滑肌细胞的增生,在肾炎、动脉硬化等异常增生的疾病中显示了一定的应用前景。Ishizaki等<sup>[11]</sup>于1996年利用SELEX技术从一个RNA文库中筛选出EGF的适配子,注射到纤维原细胞内后能高特异性、高亲和性结合EGF,通过调节该细胞的转录抑制其增殖。

2.1.3 血小板源生长因子的研究 血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是血清中主要的细胞有丝分裂源,有A、B两种亚基,形成AA、AB、BB三种二聚体。它主要存在于血小板 $\alpha$ 颗粒内,血小板激活时被释放到血浆中,可以促进平滑肌细胞增殖,使血管内膜增生并收缩血管。此外,还可促进泡沫细胞形成,在动脉硬化的发生、发展过程中起非常重要的作用<sup>[12]</sup>。Green等<sup>[13]</sup>利用SELEX技术从一个随机单链DNA文库中获得了与PDGF B链高特异性、高亲和性结合的适配子,与聚乙烯醇交联后称为NX1975,注入血管损伤模型鼠体内能明显抑制血管内膜增生,1周后,内膜与中间层厚度的比值比未用NX1975的对照组下降50%。Jürgen Floege等<sup>[14]</sup>将NX1975用2'-F嘧啶和2'-O-CH<sub>3</sub>嘌呤修饰后,发现注射到肾炎模型鼠体内后其半衰期明显延长,由0.6 h增加至8 h,能显著抑制肾小球基底膜细胞增殖。在体外也可以特异性抑制PDGF B链诱导的大鼠和人的肾小球基底膜细胞增殖,对EGF、FGF诱导的增殖无效。然而,在这些研究中NX1975作用维持的时间有限。2000年Olli Leppänen等<sup>[15]</sup>将NX1975注射到用球囊扩张术造成的颈总动脉损伤的大鼠体内,发现注射2周后血管内膜增生受到抑制,损伤面积比对照组减小50%,但6周后这种作用消失了,血管损伤部位重新出现内膜增生。

### 2.2 针对新生血管形成的研究

新生血管形成是在多种细胞因子的作用下原有血管以

出芽形式产生新血管的过程。人类的许多疾病如肿瘤的生长与转移、系膜增生性肾小球肾炎、视网膜病变等均与新生血管形成有关。早已证明,在动脉粥样硬化斑块存在新生血管。有研究<sup>[16,17]</sup>表明,新生血管可能是动脉粥样硬化斑块形成与发展过程中的一个关键环节。血管生成抑制剂可以抑制动脉粥样硬化斑块内新生血管的形成,减缓斑块的发展,使斑块稳定<sup>[18,19]</sup>。

**2.2.1 血管内皮生长因子的研究** 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是 Ferrara 等于 1989 年发现的一种糖蛋白,与内皮细胞膜上的受体结合后导致内皮的酪氨酸磷酸化,调节细胞生长、增殖,促进新生血管形成,增加血管的通透性。这在某些疾病如系膜增生性肾小球肾炎、肿瘤的增殖与转移、视网膜病变中是主要的病理改变。因此,VEGF 越来越引起人们的注意,并成为抑制血管新生的重要靶标之一。1998 年, Ruckman 等<sup>[20]</sup>从一个 2'-F 修饰的 RNA 文库中获得了 VEGF165 的适配子——NX1838,这种 2'-F 修饰的 RNA 适配子与 VEGF165 结合的亲和性比 VEGF165 2'-NH<sub>2</sub> 修饰的 RNA 适配子更强,而且,稳定性更高,合成更经济、方便,能显著抑制 VEGF165 与人的具有酪氨酸激酶的受体结合,阻止 VEGF 引起的血管通透性升高及血管细胞的增殖。1999 年, Ostendorf 等<sup>[21]</sup>将 NX1838 注射到系膜增生性肾小球肾炎模型鼠体内,发现能显著地抑制 VEGF 诱导的肾小球内皮细胞增生、坏死,降低血管通透性。正是由于良好的抗 VEGF 的功能,2000 年, NX1838-Macugen 成为首个获得美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)批准进入 iv 期临床实验的治疗性适配子,用于治疗老年型视网膜黄斑变性。2002 年, Kim 等<sup>[22]</sup>对 NX1838 在肿瘤治疗中的作用进行了研究,将 NX1838 注入左肾长有神经细胞瘤的新生雌性小鼠体内,结果肿瘤血管消退,瘤细胞生长受到抑制。这再次证实了 NX1838 可以有效地抑制 VEGF 促进肿瘤血管内皮细胞生长、新生血管形成的功能,对于控制肿瘤的增生和转移有着重要的意义。同年,通过 SELEX 技术筛选,一种新的 VEGF 适配子——EYE001<sup>[23]</sup>诞生了。动物实验中,它能完全抑制 Miles assay 的血管通透性,明显抑制角膜血管生成模型鼠和早熟儿网膜病模型鼠的血管生成。将其通过玻璃体注入脉络膜新生血管的病人眼内,可以明显提高视力,而无任何不良反应,目前正在进行与年龄相关的黄斑变性疾病的临床治疗实验。Carrasquillo 等<sup>[24]</sup>研究认为将 EYE001 冻干后包被于聚乳酸-羟乙酸微球体,可控性通过巩膜表面长期稳定地释放、进入眼内,能更安全有效地抑制 VEGF 诱导的眼血管细胞增殖和血管新生,治疗脉络膜和视网膜疾病。

**2.2.2 内皮受体酪氨酸激酶的研究** 内皮受体酪氨酸激酶(Tie2)是一种重要的血管稳定调节剂,血管生成素 2(angiotensin2, Ang2)是它的天然拮抗剂,能使血管在成熟过程中不稳定,加强促血管生成因子如 VEGF、bFGF 的作用。内源性的 Ang2 能增强 VEGF 介导的角膜新生血管形成。在肿瘤细胞中的异位表达能产生更大、更丰富的肿瘤血管<sup>[25]</sup>。White 等<sup>[25]</sup>应用 SELEX 技术,以重组人的 Ang2 为靶标,Ang1 为反筛对象,从一个随机 RNA 文库中获得了 Ang2 特异性亲和的

适配子,并进行 2'-F 嘧啶修饰和在 3' 端连接一个反向的核苷酸帽。它可以显著抑制 Ang2 与 Tie2 结合以及 bFGF 诱导的角膜新生血管形成,具有潜在的临床治疗意义。

### 2.3 针对血管扩张的研究

增强适配子耐核酸作用除了对其进行修饰,如 2'-F 嘧啶、2'-NH<sub>2</sub>、2'-O-CH<sub>3</sub> 嘌呤修饰外,筛选镜像适配子也是一种方法。镜像适配子具有很好的耐核酸作用,在生物体液中能稳定存在多个小时。降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide 1,  $\alpha$ CGRP)是一种重要的血管扩张剂,作为治疗偏头痛的新靶标,已经引起了人们的关注<sup>[26]</sup>。Vater 等<sup>[27]</sup>以合成的大鼠  $\alpha$ CGRP 的镜像体为靶标,经过 15 轮筛选,成功地从一个只有 50 个核苷酸(随机序列 40 个,固定序列 10 个)的 RNA 文库中获得了  $\alpha$ CGRP 的镜像适配子,能显著地抑制大鼠  $\alpha$ CGRP 诱导的环磷酸腺苷形成,抑制脑血管扩张,对研究偏头痛的治疗有重要的意义。

### 2.4 针对血管靶向剂的研究

适配子除了能作为蛋白功能阻断剂外,还能充当靶向剂,可以将一些药物、显影剂、放射性同位素带入病变部位而用于临床诊断和治疗。Blank 等<sup>[28]</sup>利用 SELEX 技术通过 6 轮筛选,得到了特异性结合血管内皮细胞 YPEN-1 的荧光 DNA 适配子,它只识别肿瘤微血管的内皮细胞,并选择性地对鼠脑神经纤维瘤的微血管进行染色,而不识别 N9 小胶质细胞,为研究肿瘤诊断和血管形成开辟了新的思路。

## 3 指数富集的配基系统进化技术的发展、问题和展望

指数富集的配基系统进化技术(SELEX)诞生于以人类基因组计划(human genome program, HGP)为代表的分子生物学理论和技术快速发展时期。十余年以来,SELEX 技术随着基因组计划的完成而不断地发展、完善,一些新的 SELEX 技术已应用于实验中。如 White 等<sup>[29]</sup>应用套索 SELEX 技术筛选出既能与人的凝血酶又能与猪的凝血酶特异性结合的适配子,对于基因诊断和治疗有重要意义;Wang 等<sup>[30]</sup>用减数 SELEX 技术得到了能区分异常和正常 PC12 细胞的 DNA 适配子。此外,还有剪裁 SELEX<sup>[27]</sup>、复合靶 SELEX<sup>[28]</sup>等。近几年来,科研工作者已经成功地实现了 SELEX 技术与其他技术的有机结合,推动了该技术的应用和发展,如将 SELEX 技术与基因芯片技术结合对肝炎免疫应答中特异性标志物及相关蛋白进行分析,结合 SELEX 技术与定量检测的方法研究蛋白质与 DNA 的相互作用<sup>[31]</sup>。

当然,SELEX 技术仍存在一些问题: SELEX 技术到目前为止还没有建立一个完整的计算机三维模拟系统,不能对适配子的结构进行深入研究;④适配子体内作用时间短,不稳定,修饰后可能具有毒性;⑤适配子难免透细胞膜与靶分子接近; 适配子生产成本仍较高; 适配子的高特异性使针对动物靶物质的特异性适配子不能用于人体,如与牛凝血酶高特异性结合的寡核苷酸配基不能识别人凝血酶<sup>[32]</sup>; SELEX 的筛选条件与天然条件不可能完全相同,因此,获得的适配子的结合位点与天然条件下的结合位点可能不一

致<sup>[33]</sup>。

尽管目前 SELEX 技术在血管研究中还未得到广泛应用,但在该领域发展潜力巨大。例如,将肝 X 受体适配子<sup>[34]</sup>用于胆固醇流出的研究和动脉粥样硬化的治疗,及开发针对动脉粥样硬化斑块内新生血管的适配子,将对动脉粥样硬化的诊断和治疗产生深远的影响。SELEX 技术的研究和应用虽然还处在初期阶段,但现代计算机技术和生物技术的发展将使它有着更广阔的前景——无论在医疗、科研、商品生产上,SELEX 技术都蕴藏着巨大的价值。

#### [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] Hu CX, Di YF, Zhu XD, Gu CG, Li L, Lv FL. Comparison of two enrichment methods in SELEX [J]. *J Trauma Surg*, 2003, **5** (4): 316-317

[4] Zhan LS, Shao NS, Peng JC, Sun HY, Wang QL. A procedure for SELEX screening aptamers from ssDNA random library [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (1): 151-155

[5] Hicke BJ, Stephens AW. Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy [J]. *J Clin Invest*, 2000, **106** (8): 923-928

[6] Clark SL, Remcho VT. Aptamers as analytical reagents [J]. *Electrophoresis*, 2002, **23** (9): 1335-340

[7] 刘启功, 陆再英, 周洪莲, 张卫东, 颜进. 血管内皮生长因子预防血管成形术后再狭窄的机理 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (3): 209-212

[8] Golden MC, Collins BD, Willis MC, Koch TH. Diagnostic potential of photo-SELEX-evolved ssDNA aptamers [J]. *J Biotechnol*, 2000, **81**: 167-178

[9] 许顶立, 汪明慧, 刘煜. 血小板源生长因子和血管紧张素Ⅱ对血管平滑肌细胞中细胞周期相关基因表达的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2001, **17** (6): 506-509

[10] Ehsan A, Mann MJ, Del' AG, Dzau VJ. Long-term stabilization of vein graft wall architecture and prolonged resistance to experimental atherosclerosis after EGF decoy oligonucleotide gene therapy [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, **121**: 714-722

[11] Ishizaki J, Nevins JR, Sullenger BA. Inhibition of cell proliferation by a RNA ligand that selectively blocks EGF function [J]. *Nat Med*, 1996, **2**: 1386-398

[12] Gui L, Cao MY, Ren JH. Experimental study on changes of platelet-derived growth factor  $\beta$ -chain in atherosclerosis [J]. *Med J Wuhan Uni*, 2004, **25**: 32-33

[13] Green LS, Jellinek D, Jenison R, Ostman A, Heldin CH, Janjic N. Inhibitory DNA ligands to platelet-derived growth factor  $\beta$ -chain [J]. *Biochemistry*, 1996, **35** (45): 14413-424

[14] Jürgen Floege, Tammo Ostendorf, Ulf Janssen, Michael Burg, Heinfried H, Radeke, et al. Novel approach to specific growth factor inhibition in vivo [J]. *Am J Pathol*, 1999, **154**: 169-179

[15] Olli Leppänen, Nebojsa Janjic, Mari-Anne Carlsson. Intimal hyperplasia recurs after removal of PDGF-AB and -BB inhibition in the rat carotid artery injury model [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: e89-e95

[16] Hayden MR, Tyagi SC. Vasa vasorum in plaque angiogenesis, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atherosclerosis: a malignant transformation [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2004, **3**: 125-140

[17] Moulton K, Vakili K, Zarakowski D, Soliman M, Butterfield C, Sylvan E. In-

hibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 4736-741

- [18] Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP2470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E deficient mice [J]. *Circulation*, 1999, **99**: 1726-732
- [19] Bonetti PO, Wilson SH, Rodriguez-Portel M, Holmes DR Jr, Lemman LO, Lerman A. Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasculature in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering [J]. *Circulation*, 2002, **105**: 415-421
- [20] Ruckman J, Green LS, Beeson J, Waugh S, Gillette WL, Henninger DD. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165) [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273** (32): 20556-567
- [21] Ostendorf Tammo, Kunter Uta, Eitner Frank, Loos Anneke, Regele Heinz, Kerjaschki Dotscho. VEGF165 mediates glomerular endothelial repair [J]. *J Clin Invest*, 1999, **104**: 913-923
- [22] Kim ES, Serur A, Huang JZ, Manley CA, McCrudden KW, Frischer JS. Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (17): 11399-404
- [23] Retina. Preclinical and phase IA clinical evaluation of an anti-VEGF PEGylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related Macular degeneration [J]. *Retina*, 2002, **22** (2): 143-152
- [24] Carrasquillo KG, Ricker JA, Rigas IK, Miller JW, Gragoudas ES, Adamis AP. Controlled delivery of the anti-VEGF aptamer EYE001 with poly (lactic-co-glycolic) acid microspheres [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, **44**: 290-299
- [25] White RR, Shan SQ, Rusconi CP, Shetty G, Dewhirst MW, Kontos CD, et al. Inhibition of rat corneal angiogenesis by nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin 2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (9): 5028-033
- [26] Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. CGRP may play a causative role in migraine [J]. *Cephalgia*, 2002, **22**: 54-61
- [27] Vater A, Jarosch F, Buchner K, Klusmann S. Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored SELEX [J]. *Nuc Aci Res*, 2003, **31** (21): e130
- [28] Blank Michael, Weinschenk Toni, Priemer Martin, Schluesener Hermann. Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (19): 16464-468
- [29] White R, Rusconi C, Scardino E, Wolberg A, Lawson J, Hoffman M, et al. Generation of species cross-reactive aptamers using "toggle" SELEX [J]. *Mol Ther*, 2001, **4** (6): 567-573
- [30] Wang C, Zhang M, Yang G, Zhang D, Ding H, Wang H, et al. Single-stranded DNA aptamers that bind differentiated but not parental cells: subtractive systematic evolution of ligands by exponential enrichment [J]. *J Biotechnol*, 2003, **102** (1): 15-22
- [31] Liu JJ, Stormo GD. Combining SELEX with quantitative assays to rapidly obtain accurate models of protein-DNA interactions [J]. *Nuc Aci Res*, 2005, **33** (17): e141
- [32] Liu XM, Zhang DJ, Cao GJ, Yang G, Liu N, Fan M, et al. RNA aptamers specific for bovine thrombin [J]. *J Mol Recognit*, 2003, **16** (1): 23-27
- [33] Shultzaberger RK, Schneider TD. Using sequence logos and information analysis of Lrp DNA binding sites to investigate discrepancies between natural selection and SELEX [J]. *Nuc Aci Res*, 1999, **27**: 882-887
- [34] Surugiu-Warmark I, Warmark A, Toresson G, Gustafsson JA, Bulow L. Selection of DNA aptamers against rat liver X receptors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **332** (2): 512-517

(此文编辑 许雪梅)