

本文引用: 陈健民, 石志棉, 李艳红, 等. Tissue-SELEX 技术筛选靶向动脉粥样硬化组织的核酸适配体[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(11): 937-943. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.11.003.

[文章编号] 1007-3949(2025)33-11-0937-07

· 实验研究 ·

Tissue-SELEX 技术筛选靶向动脉粥样硬化组织的核酸适配体

陈健民¹, 石志棉¹, 李艳红², 赵海清¹, 粱文旺¹, 莫中成³, 汪江波¹

广西壮族自治区南溪山医院(广西壮族自治区第二人民医院)1. 药学部, 2. 医保科, 广西桂林市 541002;
3. 桂林医科大学基础医学院, 广西桂林市 541199

[摘要] [目的] 采用指数富集的配体系统进化技术(SELEX)筛选并鉴定特异性结合小鼠动脉粥样硬化(As)病理组织的核酸适配体,为开发 As 发生早期的分子靶标及诊断试剂提供研究基础。[方法] 构建库容量为 $10^{15} \sim 10^{16}$ 的单链 DNA(ssDNA)文库,与小鼠正常血管组织切片结合-洗脱(反筛),洗脱后的文库再与小鼠 As 血管冰冻切片结合-洗脱(正筛)。PCR 扩增正筛和反筛产物,琼脂糖凝胶电泳验证扩增产物。筛选结束后对 PCR 扩增产物进行 T-A 克隆及测序,获得核酸适配体的一级结构,Mfold 在线软件预测二级结构。将筛选出的核酸适配体 5'-端标记 FAM 荧光基团,与正筛和反筛冰冻切片结合,荧光显微镜观察荧光强度,Image Pro Plus 6.0 计算相对平均荧光强度,评价核酸适配体结合的特异性。[结果] 经过 8 轮筛选,琼脂糖凝胶电泳成像显示正筛产物泳道出现 PCR 扩增产物,而反筛产物泳道并无 PCR 扩增产物,表明成功获得特异性结合 As 组织的核酸适配体;经 T-A 克隆及测序鉴定出 5 条核酸适配体,预测的二级结构均具有茎-环结构;免疫荧光染色验证 5 条核酸适配体与 As 血管均有不同程度的结合,相对平均荧光强度定量结果显示核酸适配体 No. 11 的相对平均荧光强度数值最高,可作为候选核酸适配体用于后续研究。[结论] 成功获得特异性结合 As 血管的核酸适配体,为下一步筛选 As 发生早期的分子靶点,以及开发体内早期诊断试剂提供研究基础。

[关键词] 动脉粥样硬化; 指数富集的配体系统进化技术; 核酸适配体

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

Tissue-SELEX for screening nucleic acid aptamers targeting atherosclerotic tissue

CHEN Jianmin¹, SHI Zhimian¹, LI Yanhong², ZHAO Haiqing¹, LANG Wenwang¹, MO Zhongcheng³, WANG Jiangbo¹

1. Department of Pharmacy, 2. Department of Medical Insurance, Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region (the Second People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region), Guilin, Guangxi 541002, China; 3. School of Basic Medicine, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541199, China

[ABSTRACT] **Aim** Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) technique was employed to screen and identify nucleic acid aptamers that specifically bind to mouse atherosclerotic pathological tissues, aiming to provide a research foundation for the development of molecular targets and diagnostic reagents for early atherosclerosis.

Methods A single-stranded DNA (ssDNA) library with a capacity of $10^{15} \sim 10^{16}$ was constructed, which was then subjected to binding-elution (negative selection) with normal mouse vascular tissue slices. The eluted library was subsequently bound to atherosclerotic tissue slices for binding-elution (positive selection). PCR was used to amplify the positive and negative screening products, and agarose gel electrophoresis was used to verify the amplified products. The ssDNA library after multiple rounds of selection was sequenced using T-A cloning and sequencing to obtain the primary structure of the nucleic acid aptamers, and the secondary structure was predicted using the Mfold online software. The selected nucleic acid aptamers were labeled with a FAM fluorescent group at the 5'-end and were bound to both positive and negative selection tissue slices, with fluorescence intensity observed under a fluorescence microscope. Image Pro Plus 6.0 was used to calculate the relative average fluorescence intensity to evaluate the binding specificity of nucleic acid aptamers.

Results

After 8 rounds of selection, agarose gel electrophoresis imaging showed PCR amplification products in the positive selection

[收稿日期] 2025-05-06

[修回日期] 2025-07-23

[基金项目] 桂林市科技计划项目(2020011206-3); 广西自然科学基金项目(2024GXNSFBA010210)

[作者简介] 陈健民, 博士, 主管药师, 研究方向为认知功能障碍及认知增强, E-mail: 86939669@qq.com。通信作者汪江波, 硕士, 副主任药师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及干预靶点研究, E-mail: wjblyh730220@qq.com。

lanes, while no PCR amplification products were observed in the negative selection lanes, indicating the successful acquisition of a nucleic acid aptamer library that specifically binds to atherosclerotic tissues. Five nucleic acid aptamers were identified by T-A cloning and sequencing, and their predicted secondary structures all had stem-loop structures. Immunofluorescence staining verified that five nucleic acid aptamers had different degrees of binding with As blood vessels, and the quantitative results of the relative average fluorescence intensity showed that nucleic acid aptamer No. 11 had the highest relative average fluorescence intensity value, which can be used as a candidate nucleic acid aptamer for subsequent research.

Conclusion Specific nucleic acid aptamers that bind to atherosclerotic vessels were successfully obtained, providing a research foundation for further screening of early molecular targets of As and developing *in vivo* early diagnostic reagents.

[KEY WORDS] atherosclerosis; systematic evolution of ligands by exponential enrichment; nucleic acid aptamers

动脉粥样硬化性心血管疾病(atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD)已成为全球最主要死亡原因^[1]。我国约有3.3亿人受到包括ASCVD在内的心血管疾病影响^[2]。ASCVD多隐匿起病,早期无明显临床症状,极易受到忽略,而一旦斑块破裂则会诱发血栓形成,导致心血管意外事件发生,对患者的生命造成极大的威胁。因此,对动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块的早期识别和干预对于降低心血管意外事件发生具有重要意义^[3],但令人遗憾的是As斑块发生早期的分子靶点尚未完全解析,导致目前仍缺乏As早期诊断以及有效延缓疾病发展的干预措施。因此,建立能够挖掘或筛选As斑块形成早期分子靶标的方法可为研发诊断试剂和治疗药物提供关键的研究基础。指数富集的配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)是由Gold和Szostak于1990年首次提出并用于筛选靶标特异性核酸适配体的技术^[4]。核酸适配体是长度较短的单链DNA或RNA分子,通常为20~100 nt。与普通的抗体相比,核酸适配体具有较低的免疫原性,几乎不诱导或仅轻微诱发机体产生免疫反应^[5]。核酸适配体分子通过修饰可实现不同的生物学功能,在诊断试剂以及治疗药物研发领域具有广阔的应用前景^[6-7]。课题组前期以巨噬细胞源性泡沫细胞为对象,利用细胞-SELEX(cell-SELEX)技术筛选获得了高特异性和高亲和力的核酸适配体^[8-9]。由于As动物模型相较于体外细胞培养更能模拟疾病的发生发展进程,本研究在前期研究的基础上,采用SELEX技术筛选特异性结合小鼠As斑块的核酸适配体,为进一步筛选As斑块形成早期的分子靶标,开发体内诊断试剂以及治疗药物提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

5周龄雄性载脂蛋白E基因敲除(apolipoprotein E knockout, ApoE^{-/-})小鼠(SPF级)20只,体重22~25 g,适应性喂养1周后开始造模。

1.2 单链DNA模板及引物的构建

构建一个长度为81 nt,5'-和3'-端固定序列,中间含35个随机序列的单链DNA(single strand DNA, ssDNA)文库以及相应的上下游引物,各核苷酸序列如表1所示。

表1. ssDNA模板及引物的序列

Table 1. The sequences of ssDNA template and primers

名称	核苷酸序列
ssDNA模板	5'-CCC CTG CAG GTG ATT TTG CTC AAG TN (35) AGT ATC GCT AAT CAG GCG GAT-3'
上游引物 F1	5'-CCC CTG CAG GTG ATT TTG CTC AAG T-3'
下游引物 R1	5' -ATC CGC CTG ATT AGC GAT ACT-3'
生物素标记的下 游引物 R2	5'-biotinp3-ATC CGC CTG ATT AGC GAT ACT-3'

1.3 主要试剂及仪器

普通PCR反应试剂盒(D7233,Beyotime),高效链霉亲和素磁珠(V7820,promega),DNA浓缩纯化试剂盒(D2146-03,Magen),琼脂糖(BY-R0100,Bio-west);普通PCR反应仪(杭州晶格),DYCP-31DN型琼脂糖水平电泳仪及WD-94138凝胶成像分析仪(北京六一生物科技有限公司),微量核酸蛋白检测仪(ThermoFisher)。

1.4 As小鼠模型的复制及As血管冰冻切片的制备

ApoE^{-/-}小鼠(SPF级)饲养于桂林医科大学动物实验中心屏障环境饲养室(SPF级,12 h 光照、

12 h 黑暗环境交替进行, 湿度控制在 40% ~ 60% 之间, 温度控制在 22 ~ 26 ℃ 之间)。给予普通饲料适应性喂养 1 周, 使小鼠适应新环境, 1 周后更换为 As 模型专用饲料(日粮型, 含 10% 猪油 + 4% 奶粉 + 1.5% 胆固醇 + 0.5% 胆酸钠, 每 2 天更换一次饲料, 弃去笼盒内残余饲料)复制 As 小鼠模型。12 周后处死小鼠, 取主动脉根部进行冰冻切片。对照组以正常小鼠为研究对象, 给予 As 组小鼠同样的饲养环境和饲养周期, 并于 12 周后取主动脉根部进行冰冻切片。

1.5 双链 DNA 的扩增

根据生工说明书用适量 RNAase-free 的无酶水溶解 1.2 中 ssDNA 文库, 配制成 25 μg/L; 将上游引物 F1 和带有生物素标记的下游引物 R2 配制成为 10 μmol/L 用于 PCR 反应。PCR 扩增体系为: ssDNA 模板 0.4 μL, 10X PCR Buffer 5 μL, dNTP 4 μL, 上下游引物 4 μL, TaqDNAPolymerase 0.25 μL, 加超纯水至 50 μL。PCR 反应程序设置为: 95 ℃ 预变性 180 s → 35 次循环数摸索最佳退火温度 (52 ~ 70 ℃) → 72 ℃ 60 s → 72 ℃ 延伸 10 min → 立即降温至 4 ℃ 保存。

1.6 ssDNA 文库的制备

根据链霉亲和素磁珠试剂盒说明书处理好磁珠样品, 加入 1.5 合成的 PCR 产物, 室温下孵育 60 min, 期间使用旋转混匀器保持磁珠处于分散状态, 促进磁珠与双链 DNA (double strand DNA, dsDNA) 的结合, 随后弃上清, 用 1 mL 超纯水洗磁珠 3 次, 加入 0.2 mol/L 的 NaOH 300 μL 混匀, 室温摇匀 15 min, 该步骤重复 3 次保证 dsDNA 双链间氢键断裂完全, 根据 DNA 浓缩纯化试剂盒说明书, 柱式纯化浓缩 ssDNA。采用微量蛋白核酸检测仪检测 ssDNA 文库浓度。

1.7 核酸适配体筛选过程

取 1.6 获得的 ssDNA 1500 pmol 放置在 95 ℃ 的水浴中 5 min, 随后立即放置于冰上 10 min, 此时 ssDNA 能形成不同形状的二级结构, 用于与冰冻切片结合。SELEX 筛选的第 1 ~ 2 轮只进行正筛, 即只与 As 血管冰冻切片结合, 从第 3 轮开始先进行反筛, 即先与正常血管冰冻切片结合, 后进行正筛。正筛阶段, 将 ssDNA 文库滴加至 As 血管冰冻切片上, 于 36.5 ℃ 温箱孵育 60 min, 随后用 PBS 洗涤切片。用 200 μL 的枪头将玻片上的 As 血管冰冻切片收集到离心管中, 随后向离心管中加入 1 mL 超纯水, 100 ℃ 水浴热变性 5 min, 随后 12 000 r/min 离心 10 min, 吸出上清液, 用 DNA 浓缩纯化试剂盒纯

化、浓缩 ssDNA, 微量蛋白核酸检测仪检测 ssDNA 浓度。反筛阶段, 将 ssDNA 文库滴到正常动脉冰冻切片上, 于 36.5 ℃ 温箱孵育 60 min 后吸取上清, 上清液中含不与正常血管组织结合的 ssDNA, 将上清液滴加至 As 血管冰冻切片, 后续操作同正筛阶段。各轮筛选采用梯度压力进行。各轮梯度压力参数如表 1。由于每轮获得的模板浓度不一致, 因此需进行琼脂糖凝胶电泳确定下一轮最佳的循环数。

表 2. 梯度压力筛选法主要参数

Table 2. Main parameters of the gradient pressure screening method

筛选轮数	反筛切片数	反筛时间/min	正筛切片数	正筛时间/min	PCR 扩增轮数
1	—	—	2	60	35
2	—	—	2	30	35
3	1	30	2	30	30
4	1	30	1	30	25
5	1	60	1	25	20
6	2	60	1	25	16
7	2	60	1	20	20
8	2	90	1	20	24

注: “—”表示无法获取。

1.8 T-A 测序及二级结构预测

最后一轮筛选结束后将获得的 ssDNA 进行 PCR 反应, 此时使用的上游引物 (F1) 和下游引物 (R1) 均不含生物素标记。将 PCR 产物进行克隆和 T-A 测序, 获得核酸适配体的一级序列。应用 the Mfold Web Server 在线软件对获得的核酸适配体进行二级结构预测。设定温度为 26 ℃, Na⁺ 浓度为 150 mmol/L, Mg²⁺ 浓度为 1 mmol/L。

1.9 核酸适配体特异性检测

正常血管冰冻切片以及 As 血管冰冻切片的制备同 1.4。用 PBS 洗涤 As 血管冰冻切片 3 次, 洗脱切片上的包埋剂。根据序列信息合成 5'-端带有 FAM 荧光基团的核酸适配体, 将各条核酸适配体置于 95 ℃ 水浴中孵育 5 min, 随后立即放置在冰上, 以便形成二级结构。取 1 500 pmol 的核酸适配体分别与正常血管冰冻切片和 As 血管冰冻切片在 37 ℃ 下孵育 20 min, PBS 洗涤切片 3 次后用封片剂进行封片处理。荧光显微镜下选择 495 nm 波长观察拍片, 采用 Image Pro Plus 6.0 计算相对荧光强度 (As 组平均荧光强度 / 正常组平均荧光强度 × 100%), 评估各核酸适配体的特异性。

2 结 果

2.1 ssDNA 模板扩增最佳退火温度的优化

将 ssDNA 模板进行 PCR 扩增反应。循环数设置为 35 次循环,退火温度依次设置为 52、55、57、60、62、65、67、70 ℃,将扩增后的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳成像,结果如图 1 所示。当退火温度设置在 60 ℃ 时,PCR 扩增产物条带的亮度最好。因此,确定 60 ℃ 作为后续 PCR 扩增体系的最佳退火温度。

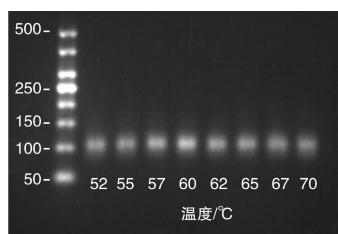


图 1. ssDNA 模板扩增退火温度的优化

Figure 1. Optimization of annealing temperature for ssDNA template amplification

2.2 SELEX 筛选过程最佳循环数的优化

由于每轮筛选结束后获得的 ssDNA 文库浓度不同,因此每轮筛选结束后均需摸索 PCR 反应的最佳循环数,确保下一轮筛选所用的 ssDNA 文库的质量最佳。结果显示,随着筛选轮数的增加,与 As 血管组织结合特异性和亲和力较低的 ssDNA 被筛选除,高特异性和亲和力的 ssDNA 在一定程度上被富集,此时所需的 PCR 反应循环数越少。当筛选接近终点时,由于富集的 ssDNA 纯度进一步提高,模板的数量可能较前减少,因此观察到 PCR 反应的循环数在一定程度上有所增加。

图 2A-C 所示的是第 4、第 6 和第 8 轮筛选结束后获得的 ssDNA 文库 PCR 扩增反应循环数的琼脂糖凝胶电泳成像结果。结果表明,第 4 轮筛选后的循环数超过 27 次会出现明显的非特异性扩增条带,循环数为 25 次时条带清晰且无明显非特异性扩增;第 6 轮筛选后的循环数为 18 次时,条带清晰明亮,且无非特异性扩增条带;第 8 轮筛选循环数为 24 次时,条带清晰且明亮,且无非特异性扩增条带。

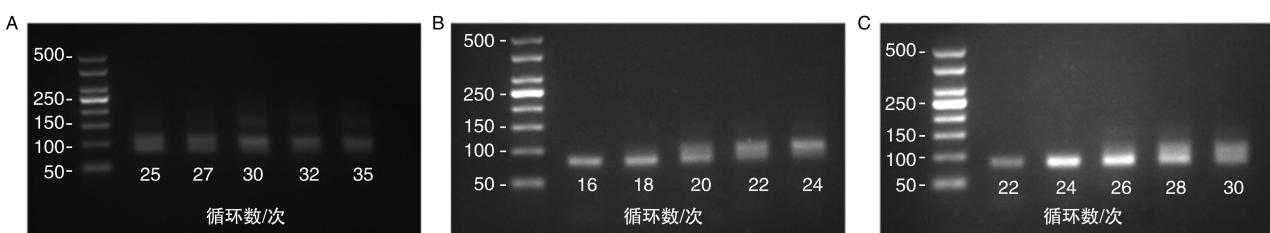


图 2. 各轮筛选后 ssDNA 文库最佳循环数摸索优化结果

A、B 和 C 依次为第 4、第 6 和第 8 轮筛选后 PCR 反应循环数琼脂糖凝胶电泳成像。

Figure 2. Results of exploring and optimizing the optimal cycles for ssDNA library after each round of selection

2.3 第 8 轮筛选结束后 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳成像结果

将第 8 轮正筛(与 As 血管冰冻切片结合)和反筛(与正常血管冰冻切片结合)结束获得的 ssDNA 进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳成像,结果如图 3 所示。经过 8 轮筛选后,正筛电泳栏出现单一且明亮的条带,反筛电泳栏未出现任何条带,表明经过 8 轮筛选后获得了与 As 血管特异性结合的核酸适配体。

2.4 T-A 克隆测序

将 2.3 获得的核酸适配体进行 T-A 克隆测序,最终获得 5 条核酸适配体序列。其一级结构如表 3 所示,预测的二级结构如图 4 所示。

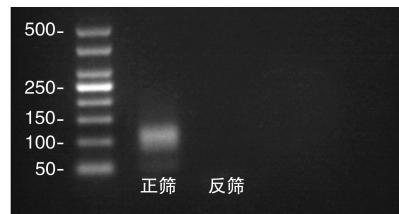


图 3. 第 8 轮筛选后正筛和反筛 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳成像

Figure 3. Agarose gel electrophoresis imaging of PCR products from positive and negative screening after the 8th selection

2.5 核酸适配体与 As 血管结合特异性

分别将 5'-端标记 FAM 荧光的 5 条核酸适配体与正常血管冰冻切片(对照组)和 As 血管冰冻切片

结合,结果发现 5 条核酸适配体与正常血管的管腔均无明显荧光,而与 As 血管管腔内的 As 斑块有不同程度的结合(红色虚线区域)(图 5A-D)。进一步对各核酸适配体结合 As 斑块的相对平均荧光强度进行定量分析,以正常血管组织为参比, No. 5

(123.16%)、No. 6(123.16%)和 No. 11(133.70%) 的相对平均荧光强度相对较高,其中核酸适配体 No. 11 与 As 血管的相对荧光强度最高,提示其特异性相对最好,可作为本研究筛选出的最佳核酸适配体用于后续研究。

表 3. 核酸适配体一级结构

Table 3. The primary structure of nucleic acid aptamers

序号	一级结构(核苷酸序列)
No. 1	5'-CCCCTGCAGGTGATTTGCTCAAGTTGGCAATCAAATAGCAACITCAAATGTACCGCACAGTATCGCTAACAGGCGGAT-3'
No. 2	5'-CCCCTGCAGGTGATTTGCTCAAGTGTGGAACAGATTCATCAACCTTTCGAACACCTACAGTATCGCTAACAGGCGGAT-3'
No. 5	5'-CCCCTGCAGGTGATTTGCTCAAGTACCAATGCGCTATTCTCCAACTAACCGCACGCCAGTATCGCTAACAGGCGGAT-3'
No. 6	5'-CCCCTGCAGGTGATTTGCTCAAGTTGCACGCAATTGATTCTAAACAACTGCCACCTTAAGTATCGCTAACAGGCGGAT-3'
No. 11	5'-CCCCTGCAGGTGATTTGCTCAAGTCCACATCGATCAACTTGAGTGCAACCATAAGATGAAGTATCGCTAACAGGCGGAT-3'

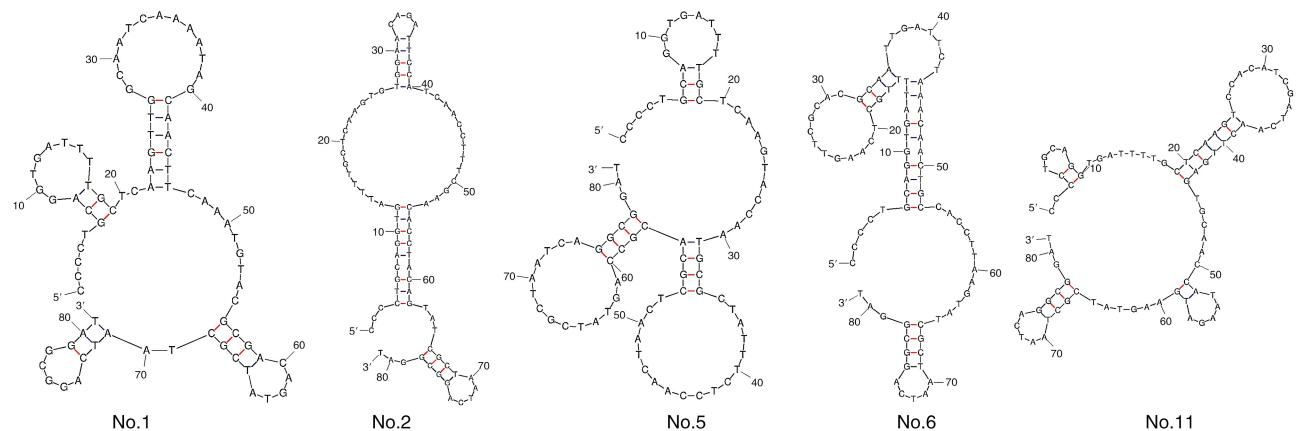


图 4. Mfold 预测核酸适配体二级结构

Figure 4. Predicted secondary structures of nucleic acid aptamers by Mfold

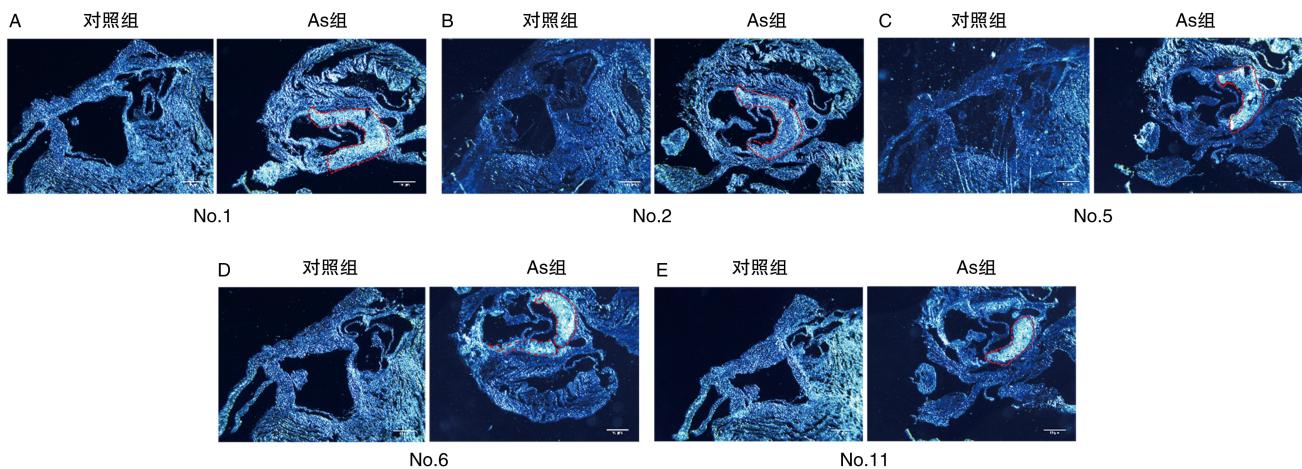


图 5. 核酸适配体结合 As 血管的特异性

A 为核酸适配体 No. 1 与对照组和 As 血管结合的荧光结果;B 为核酸适配体 No. 2 与对照组和 As 血管结合的荧光结果;
C 为核酸适配体 No. 5 与对照组和 As 血管结合的荧光结果;D 为核酸适配体 No. 6 与对照组和 As 血管结合的荧光结果;
E 为核酸适配体 No. 11 与对照组和 As 血管结合的荧光结果。

Figure 5. Specificity of nucleic acid aptamers binding to As vessels

3 讨 论

本研究基于小鼠 As 模型,利用 tissue-SELEX 技术,通过 8 轮筛选成功获得特异性结合 As 血管的 5 条候选 ssDNA,进一步经荧光染色确定 As 血管结合特异性最佳的核酸适配体 No. 11,为后续筛选药物靶点以及治疗药物,开发体内诊断试剂提供重要的研究基础。

SELEX 技术是近年发展起来的新型组合化学技术^[10],利用短链寡核苷酸对靶物质空间结构具有特异性识别和高度亲和力的特性,经过多轮筛选最终获得高特异性和亲和力的核酸适配体^[11]。经过 SELEX 技术筛选出的核酸适配体具有免疫原性低、特异性强、穿透力好等优点^[12-13],目前已经广泛用于生物标志物发现^[14]、循环肿瘤细胞捕获^[15]以及药物靶点研发^[16]等领域。在筛选过程中,获取高质量核酸适配体的关键因素在于提高筛选过程中核酸适配体与组织的亲和力和特异性。目前解决该问题的方法包括减少投入的核酸适配体的摩尔量,减少与病理组织的孵育时间,以及延长与对照组织的孵育时间等^[17]。基于此,本研究采用压力梯度法,同时改变多个筛选条件以进一步提高特异性和亲和力。在孵育的前 2 轮只采取正筛选,即只与 As 血管结合,此时部分不能与组织结合的 ssDNA 会被洗脱。从第 3 轮开始引入正常组织切片,先进行反筛选,并收集上清液,此时上清液中含有不与正常组织结合的 ssDNA,再将上清液进行反筛选。随着筛选次数的增加,从第 3 ~ 8 轮逐步增加 ssDNA 与反筛选切片的孵育时间和投入的切片数量,同时减少与正筛选切片的孵育时间和投入的切片数量,这样做能提高 ssDNA 与 As 血管结合的特异性;此外,在 PBS 洗脱 As 血管冰冻切片的过程中,逐渐增加了 PBS 的洗脱时间,亲和力较弱的容易被洗脱下来,这样可以提高 ssDNA 与 As 血管的亲和力。

经过 8 轮筛选后进行琼脂糖凝胶电泳成像确证获得特异性结合 As 血管的 ssDNA 文库。随后对这些文库进行 T-A 克隆测序,初步获得 12 条序列的信息,通过与初级 ssDNA 文库 5'-端和 3'-端序列对比,最终获得 5 条 ssDNA 序列。分别对这 5 条序列进行 5'-端 FAM 荧光修饰,通过荧光染色以及荧光定量分析后发现核酸适配体 No. 11 与 As 血管的结合特异性较好,可作为候选核酸适配体进行后续研究。后续研究主要从两方面开展:一方面,以该核酸适配体作为 DNA 探针,利用 DNA pull-down 技术富集 DNA-靶标分子复合物,通过质谱技术鉴定靶

标分子的相关信息,为筛选 As 斑块形成早期的分子靶点提供研究基础;基于分子靶点采用分子对接等计算机辅助技术筛选具有潜在活性的小分子化合物,为开发延缓疾病进展的治疗药物提供研究依据;另一方面,由于荧光成像技术在 As 斑块检测中的优势和应用前景^[18],本研究后续通过对核酸适配体进行荧光基团修饰,采用小动物成像技术研究其在体内的分布以及与 As 斑块的结合情况,为开发体内诊断试剂提供研究基础。

As 斑块的形成涉及内皮细胞损伤、免疫细胞激活以及炎症反应等多种病理生理过程^[19]。前期研究主要围绕特定细胞或蛋白质开展核酸适配体筛选的工作。例如,巨噬细胞源性泡沫细胞与胆固醇的合成、摄取和流出密切相关,被认为是 As 起始的标志^[20]。因此课题组前期以巨噬细胞源性泡沫细胞为靶标,利用 cell-SELEX 技术筛选获得了高特异性和高亲和力的核酸适配体^[8-9],为筛选靶向泡沫细胞形成以及功能调控的分子靶点提供重要的研究基础。此外,Ji 等^[21-22]利用 cell-SELEX 技术筛选出针对炎症内皮细胞以及血小板反应素 1 的 DNA 核酸适配体。但随着研究的深入,发现不同病理生理机制之间并不是平行关系,而是互相影响、相互促进,共同促进 As 的形成和发展。因此,为了更全面且客观地挖掘 As 斑块形成早期的分子靶点,本研究采用小鼠 As 模型,基于 As 斑块的发生发展进程,利用 tissue-SELEX 技术从头开始创新性筛选核酸适配体。与针对体外细胞和蛋白质的核酸适配体筛选相比,本研究能为识别 As 斑块形成早期的分子靶点、开发 As 早期体内诊断试剂及治疗药物奠定前瞻性研究基础,具有重要的临床意义和科研价值。

[参考文献]

- [1] MATSUMOTO Y, KATANO Y. Cardiovascular protective effects of polyphenols contained in passion fruit seeds namely piceatannol and scirpusin B: a review[J]. Tokai J Exp Clin Med, 2021, 46(3): 151-161.
- [2] HU S S, Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Epidemiology and current management of cardiovascular disease in China [J]. J Geriatr Cardiol, 2024, 21(4): 387-406.
- [3] PATIL S, TEICHNER E M, SUBTIRELU R C, et al. Bilateral carotid artery molecular calcification assessed by [¹⁸F] fluoride PET/CT: correlation with cardiovascular and thromboembolic risk factors[J]. Life (Basel), 2070, 13(10): 2070.
- [4] RÖTHLISBERGER P, GASSE C, HOLLENSTEIN M. Nu-

- cleic acid aptamers: emerging applications in medical imaging, nanotechnology, neurosciences, and drug delivery [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): 2430.
- [5] FENG L J, SUN Y, JIA W S, et al. Advancements in SELEX technology for aptamers and emerging applications in therapeutics and drug delivery [J]. *Biomolecules*, 2025, 15(6): 818.
- [6] MAHMOUDIAN F, AHMARI A, SHABANI S, et al. Aptamers as an approach to targeted cancer therapy [J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 108.
- [7] LIU C, JIANG W, TIAN X, et al. Identification of vigilin as a potential ischemia biomarker by brain slice-based systematic evolution of ligands by exponential enrichment [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(10): 6675-6681.
- [8] 汪江波, 李艳红, 严鹏科. Cell SELEX 技术筛选巨噬细胞源性泡沫细胞适配子的初步研究 [J]. 中国医药科学, 2012, 2(24): 25-28.
WANG J B, LI Y H, YAN P K. Preliminary study on screening aptamers of macrophage-derived foam cells by Cell SELEX [J]. *China Med Pharm*, 2012, 2(24): 25-28.
- [9] 钟文飞, 汪江波, 吴仲洪, 等. 动脉粥样硬化靶向适配子的亲和力筛选 [J]. 中国医药导报, 2015(26): 12-15, 24.
ZHONG W F, WANG J B, WU Z H, et al. Affinity screening of targeting aptamers for atherosclerosis [J]. *China Med Her*, 2015(26): 12-15, 24.
- [10] AVCI-ADALI 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.
- [11] ZHUO Z, YU Y, WANG M, et al. Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10): 2142.
- [12] PERKINS A C, MISSAILIDIS S. Radiolabelled aptamers for tumour imaging and therapy [J]. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2007, 51(4): 292-296.
- [13] PAN W, CLAWSON GA. Primer-free aptamer selection using a random DNA library [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 629: 369-385.
- [14] LI Y, TAM W W, YU Y, et al. The application of aptamer in biomarker discovery [J]. *Biomark Res*, 2023, 11(1): 70.
- [15] 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.
- [16] XIANG J, ZHANG W, CAI X F, et al. DNA aptamers targeting BACE1 reduce amyloid levels and rescue neuronal deficiency in cultured cells [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16: 302-312.
- [17] ZHU C, FENG Z, QIN H, et al. Recent progress of SEL-EX methods for screening nucleic acid aptamers [J]. *Talanta*, 2024, 266 (Pt 1): 124998.
- [18] 曾佳玉, 程丹, 何隆薇. 荧光成像在动脉粥样硬化中的研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(5): 375-385.
ZENG J Y, CHENG D, HE L W. Research progress of fluorescence imaging in atherosclerosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(5): 375-385.
- [19] QIAN C, YOU X, GAO B, et al. The role of ROS in atherosclerosis and ROS-based nanotherapeutics for atherosclerosis: atherosclerotic lesion targeting, ROS scavenging, and ROS-responsive activity [J]. *ACS Omega*, 2025, 10(22): 22366-22381.
- [20] 朱容蓉, 陈梦娇, 赵真旺, 等. 葛花提取物通过激活 PPAR γ 上调 ABCA1 的表达而抑制 THP-1 源性泡沫细胞形成 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(5): 395-401.
ZHU R R, CHEN M J, ZHAO Z W, et al. Pueraria lobata flowers extract inhibits THP-1-derived foam cell formation by activating PPAR γ to upregulate the expression of ABCA1 [J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(5): 395-401.
- [21] JI K, LIM W S, LI S F, et al. A two-step stimulus-response cell-SELEX method to generate a DNA aptamer to recognize inflamed human aortic endothelial cells as a potential *in vivo* molecular probe for atherosclerosis plaque detection [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(21): 6853-6861.
- [22] JI K, DE CARVALHO L P, BI X, et al. Highly sensitive and quantitative human thrombospondin-1 detection by an M55 aptasensor and clinical validation in patients with atherosclerotic disease [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 55: 405-411.

(此文编辑 许雪梅)