

含聚多价适配体的长链 DNA 用于抗肿瘤药物的靶向传输

张志庆*, 王芳, 周亭, 张国栋, 王秀凤, 李昀泽

(中国石油大学(华东)理学院, 青岛 266580)

摘要 采用滚环扩增(RCA)方法合成含聚多价适配体的长链DNA(polyaptamer),并负载抗肿瘤药物多柔比星(Dox),用于靶向治疗白血病肿瘤细胞。研究结果表明,含聚多价适配体的polyaptamer载药能力比单价适配体(monoaptamer)提高了10倍以上,而其对急性淋巴白血病细胞(CCRF-CEM)的靶向效率比单价适配体提高了约35倍,极大降低了Dox对正常体细胞的不良反应。药物释放实验和肿瘤细胞杀灭实验同时证明,在酶的作用下,polyaptamer/Dox复合物进入肿瘤细胞后能够短时间内释放出Dox,从而高效地杀灭肿瘤细胞。

关键词 滚环扩增; 适配体; 多价; 靶向输送; 肿瘤细胞

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)04-0431-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150408

A DNA polyaptamer system as a targeted antitumor drug delivery

ZHANG Zhiqing*, WANG Fang, ZHOU Ting, ZHANG Guodong, WANG Xiufeng, LI Yunze

College of Science, China University of Petroleum, Qingdao 266580, China

Abstract A long chain structure of DNA (polyaptamer) composed of multiple aptamer units was synthesized by rolling circle amplification and used for the construction of polyaptamer-doxorubicin system in the treatment of leukemia cells. It was found that the system was significantly more effective than monoaptamer in targeting and killing leukemia cells as it provided 35-fold enhanced binding affinity and 10-fold greater drug loading via multi-valent effects. Drug release and cell viability also proved that the conjugates could gain entrance into the cells and rapidly release doxorubicin under the action of lysosome, leading to the tumoricidal effect.

Key words rolling circle amplification; aptamer; polyvalent; targeted delivery; tumor cells

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 51103179); the Scientific Research Foundation for Returning Overseas Chinese Scholars, Ministry of Education; Qingdao Science and Technology Project (No. 14-2-4-7-jch); the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 15CX05027A, No. 15CX02067A, No. 15CX02052A)

白血病约占肿瘤总发病率的3%,是儿童和青年中最常见的一种恶性肿瘤,化疗是各种白血病的主要治疗方法。然而,化疗经常伴随着严重的不良反应,有时不良反应的危害甚至超过了治疗本身。目前,靶向治疗已经成为该领域的主要研究热点,例如利用抗体-药物结合体、纳米靶向载体选择性的将药物靶向至白血病细胞,以提高药效及降低其非特异的不良反应。然而,这些靶分子的单价分子识别白血病细胞受体,仍存在载药量小、靶向效率

低、选择性差等缺点^[1-3]。因此,如何发展一种简便、高效、特异性识别并杀灭肿瘤细胞的靶向载体分子成为肿瘤化疗领域的当务之急。

多价靶向结合是改善药物传输的靶效率和选择性最有效的途径。适配体是一小段经体外筛选得到的寡核苷酸序列,能与相应的受体进行高亲和力和强特异性的结合^[4-6]。文献[7]报道将细胞适配体固定在聚合物分子骨架或纳米颗粒表面上,得到的多价配体与细胞受体之间存在多个靶点,既能

提高键合力,又能增强特异性,并有利于促进细胞的内吞作用。然而,目前构建多价适配体的过程中毫无例外地采取了复杂的化学反应和繁琐的工艺处理,造成应用上难以实现。

滚环扩增(RCA)是一种新兴的制备多个DNA重复单元的便利方法^[8-9],它是借鉴自然界中环状病原微生物DNA分子的滚环式复制方式而建立的一种核酸恒温扩增技术。在RCA反应中,当有环形DNA模板和聚合酶时,通过DNA聚合酶的作用,以环形DNA为模板进行复制,最后形成了一条与环形DNA模板互补的重复序列的DNA单链。因此,可以将特异性靶向白血病细胞的适配体的互补序列设计到环状模板之中,通过RCA反应就可以得到含多个适配体的长链DNA,其对白血病细胞具有高特异性和高亲合力地靶向结合,因而能用

于白血病的诊断和治疗。

1 材 料

1.1 药品与试剂

多柔比星(Dox,美国Selleckchem公司);实验中所用的各DNA均采购自美国Integrated DNA Technologies公司,其序列见表1。人急性淋巴白血病细胞(CCRF-CEM)和人B淋巴瘤细胞(Ramos)(美国ATCC公司);Phi29聚合酶、T4 DNA连接酶和dNTP(美国Thermo Scientific公司)。

1.2 仪 器

Synergy HT酶标仪(美国BioTek公司);FV10i共聚焦显微镜(日本Olympus公司);LSR II流式细胞仪(美国BD公司)。

Table 1 DNA sequences used in this work (Italic: aptamer domain)

DNA	Sequence
Monoaptamer	5'-ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTC CGG TTA GAT TTT TTT TTT GCG CGC TTT TTG CGC GCT TTT TTT TTT-3'
Aptamer circular template	5'-GCG CAG CAG TTA GAT AAA AAA AAA AGC GCG CAA AAA GCG CGC AAA AAA AAA ATC TAA CCG TAC AGT ATT TTC CCG GCG-3'
Scramble circular template	5'-CAT CGG ACA TAG CTC AAA AAA AAA AGC GCG CAA AAA GCG CGC AAA AAA AAA AGC CAC TTG ACC TAT TCG GAT AGT TGC-3'
Aptamer RCA primer	5'-AAC TGC TGC GCC GCC GGG AAA ATA-3'
Scramble RCA primer	5'-CTA TGT CCG ATG GCA ACT ATC CGA-3'

2 方 法

2.1 RCA 反应

RCA的详细实验步骤见文献[10]。将引物50 pmol、环形DNA模板(带有适配体的互补序列)40 pmol、10×RCA缓冲液20 μL以及dNTPs 10 μL,补水至总体积为200 μL,加入Phi29聚合酶引发反应,30 °C反应10 min后升温至60 °C终止反应。含多价适配体的RCA产品(polyaptamer)及不含适配体的对照RCA产品(poly scramble)均用0.5%琼脂糖胶表征,并通过离心管进行分离纯化。

2.2 DNA负载抗肿瘤药物实验

由于设计的各DNA分子(monoaptamer, polyaptamer以及poly scramble)链上都可通过碱基配对方式部分形成双链结构,而抗肿瘤药物阿霉素(Dox)有嵌入DNA双螺旋结构中的特性。因此,在96孔板中,将100 nmol/L Dox与各加量的上述DNA溶液室温共孵30 min进行负载,然后通过酶标

仪对Dox荧光的检测来表征DNA对药物的负载情况,激发和发射波长分别为485和590 nm。向负载后的DNA/Dox复合物中加入1 U/μL DNase I 3 μL切断DNA长链研究药物释放情况。

2.3 DNA链上的荧光标记

向各DNA溶液中加入微量SYBR Green,由于SYBR Green是一种可结合于所有DNA双螺旋小沟区域的发绿色荧光的染料,故其可用来标记DNA。DNA与SYBR Green室温结合10 min后,离心洗涤3次,去除游离染料。荧光信号可通过共聚焦显微镜和流式细胞仪进行检测。

2.4 细胞培养实验

CCRF-CEM细胞和Ramos细胞培养在含有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素的RPMI-1640的培养液中。实验开始前,先用PBS缓冲液洗涤细胞。

2.5 DNA/Dox复合物靶向结合肿瘤细胞实验

将每毫升1×10⁶个细胞的CCRF-CEM和

Ramos 细胞与 DNA/Dox 复合物在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 1 h, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤, 用多聚甲醛对细胞进行固定, 制片后在共聚焦显微镜下进行观察。同时, 采用流式细胞仪定量分析细胞对 DNA/Dox 复合物的靶向结合能力。

2.6 细胞凋亡实验

将 200 nmol/L Dox, 各 DNA/Dox 复合物 (20 nmol/L DNA 和 200 nmol/L Dox) 与 CCRF-CEM 或 Ramos 细胞在培养箱中培养 24 h, 分别采用 XTT 和 FITC annexin V/PI 试剂研究细胞凋亡情况。

3 结果与讨论

3.1 RCA 长链对药物 Dox 的负载与释放

本研究中选择的适配体(5'-ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA-3')对CCRF-CEM上的PTK7蛋白有特异的靶向性^[7,11]。每个适配体单元中的ATC TAA C-TAG ATT G片段及GCG CGC-CGC GCG片段可通过碱基配对的方式分别形成两个小双螺旋结构,可作为载药区及荧光染色区(图1)。

图 2 所示谱图显示：每个 RCA 长链产物上约含有 30~40 个适配体的重复单元，并且含聚多价适配体的 polyaptamer 与不含适配体的对比 DNA 分子 polyscramble 链长相当。

从图3可见,抗肿瘤药物Dox加入到各DNA分子(monoaptamer,polyaptamer以及polyscramble)后,会通过疏水作用进入到双螺旋区域,造成荧光

光强度下降。实验结果表明：单价适配体与 Dox 形成 1:1 的复合物，而每条带有适配体和不带有适配体的 RCA 长链上（包括 polyaptamer 及 poly-scramble）均能负载约 10 个 Dox 分子，这说明 RCA 长链具有较强的载药能力。如果向各 DNA/Dox 复合物中加入内切酶后，30 min 内绝大多数药物均会被释放出来。

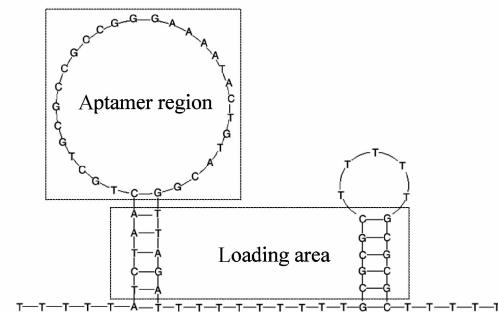


Figure 1 Scheme of a repeat unit of polyaptamer

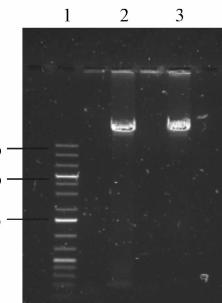


Figure 2 Agarose gel electrophoresis of RCA products

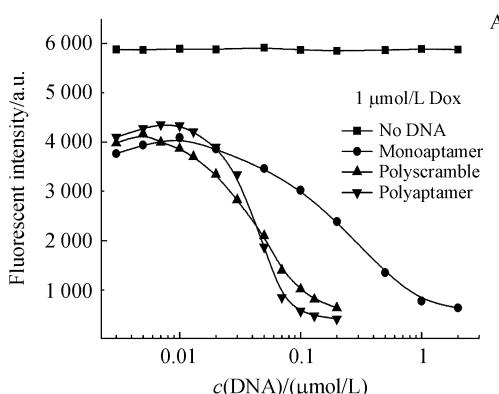
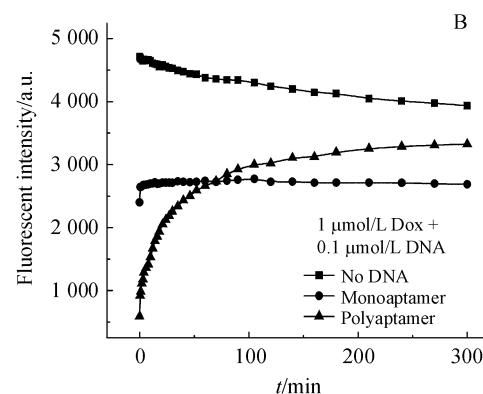


Figure 3 Experiments of doxorubicin (Dox) loading and release

A: Monitoring Dox loading to monoaptamer, polyaptamer and polyacramble based on fluorescence quenching of Dox; B: Dox released from monoaptamer/Dox, polyaptamer/Dox in the presence of DNase I



3.2 聚多价适配体有效提高对肿瘤细胞的靶向能力

将 CCRF-CEM 或 Ramos 细胞与各 DNA/Dox 复合物共孵后, 可通过 DNA 载药区的 SYBR Green 荧光基团检测复合物对细胞的靶向能力。从图 4 可见, 不带 PTK7 的 Ramos 细胞与带多价适配体的 polyaptamer/Dox 复合物没有明显的相互作用, 而对于有 PTK7 的 CCRF-CEM 细胞来说, monoaptamer/Dox 复合物和 polyscramble/Dox 复合物与细胞的相互作用很弱, 在显微镜图上没有观察到明显的荧光, 而 polyaptamer/Dox 复合物在细胞上显示出较明显的 FITC 荧光, 说明细胞与复合物之间有强烈的相互作用, 该复合物对有 CCRF-CEM 细胞有特异的靶向能力。

将 CCRF-CEM 或 Ramos 细胞与各 DNA/Dox 复合物共孵后, 可通过 DNA 载药区的 SYBR Green 荧光基团检测复合物对细胞的靶向能力。从图 4 可见, 不带 PTK7 的 Ramos 细胞与带多价适配体的 polyaptamer/Dox 复合物没有明显的相互作用, 而对于有 PTK7 的 CCRF-CEM 细胞来说, monoaptamer/Dox 复合物和 polyscramble/Dox 复合物与细胞的相互作用很弱, 在显微镜图上没有观察到明显的荧光, 而 polyaptamer/Dox 复合物在细胞上显示出明显的 FITC 荧光, 说明细胞与复合物之间有强烈的相互作用, 该复合物对 CCRF-CEM 细胞特异的靶向能力。

为了定量比较 monoaptamer/Dox 复合物与

polyaptamer/Dox 复合物对 CCRF-CEM 细胞的靶向能力, 采用流式细胞仪研究了不同 DNA 浓度下 CCRF-CEM 细胞的荧光强度。从图 5-A 中可见 10 nmol/L 的多价适配体的荧光强度显著高于单价适配体, 图 5-B 结果表明含聚多价适配体的 polyaptamer ($K_d = 6.5 \text{ nmol/L}$) 对 CCRF-CEM 细胞的靶向能力比单价适配体 ($K_d = 230 \text{ nmol/L}$) 高约 35 倍。

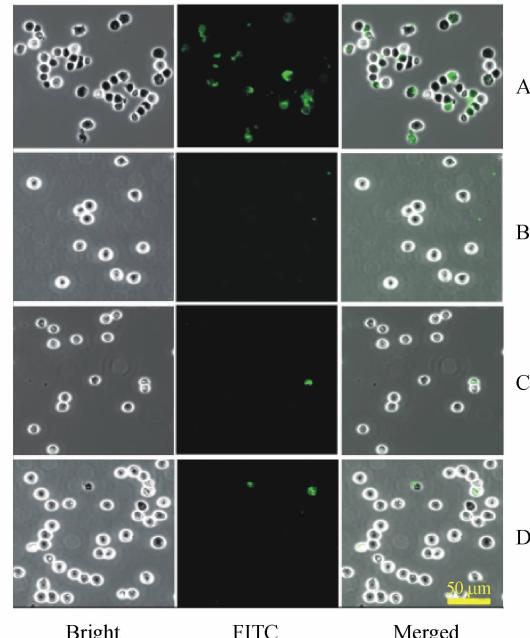


Figure 4 Polyaptamer/Dox specifically binds to target CCRF-CEM cells. Confocal images of CCRF-CEM/polyaptamer (A), CCRF-CEM/monoaptamer (B), CCRF-CEM/polyscramble (C), and Ramos/polyaptamer (D)

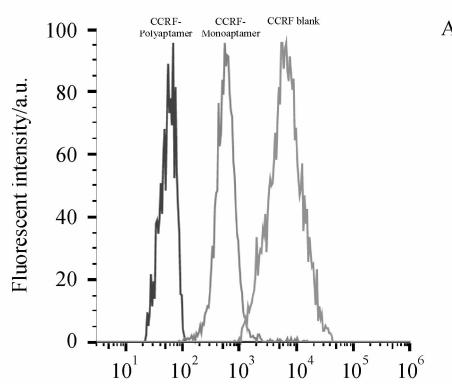
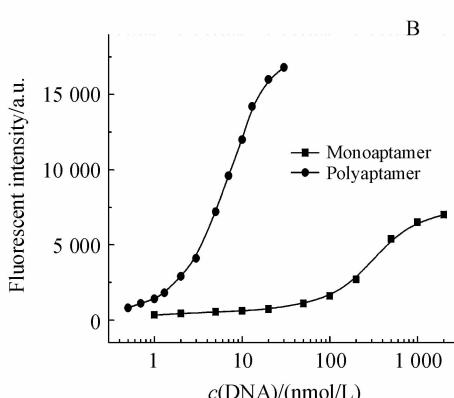


Figure 5 Flow cytometry analysis of DNA/Dox binding to target CCRF-CEM cells

A: Comparison of monoaptamer and polyaptamer; B: Effect of DNA concentration

用荧光染料标记的 polyaptamer/Dox 复合物溶液与 CCRF-CEM 细胞共孵后, 5 min 时的共聚焦显



微照片可见大量的 polyaptamer/Dox 均匀地靶向到肿瘤细胞的表面(图 6), 充分证明了多价适配体对

目标细胞高特异的靶向能力。共孵2 h后,显微照片清楚地表明 polyaptamer/Dox 复合物已内吞到 CCRF-CEM 的细胞液内,说明该体系能有效地进行细胞内化,24 h后聚适配体的荧光信号基本消失,说明此时载体已被溶酶体降解,Dox 药物被完全释放。

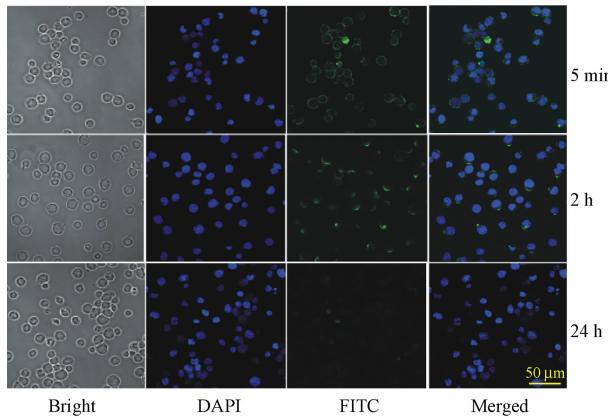


Figure 6 Endocytosis process of polyaptamer/Dox monitored by confocal microscopy

3.3 聚多价适配体提高药物对肿瘤细胞的杀灭能力

从图7可见:polyaptamer/Dox 复合物具有比 Dox、monoaptamer/Dox 复合物以及 polyscramble/Dox 复合物更强的肿瘤细胞杀灭率,24 h 杀灭率约 50%。FITC annexin V/PI 的细胞凋亡实验也印证了类似的结果。肿瘤细胞杀灭实验证明 polyaptamer/Dox 复合物在进入细胞后,药物 Dox 能够有效释放,从而高效靶向地杀灭 CCRF-CEM 细胞。

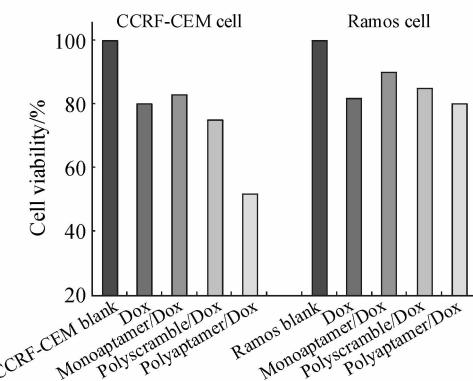


Figure 7 Cell viability of target CCRF-CEM and control Ramos cells after 24 h-incubation with DNA/Dox studied by XTT assay

的长链 DNA,该聚合 DNA 能够有效负载抗肿瘤药物 Dox 形成 polyaptamer/Dox 复合物,其对 CCRF-CEM 细胞不仅具有高度的特异靶向能力,能极大地降低药物 Dox 对正常细胞的不良反应;而且相对于单价适配体 DNA 来说,载药效率大为提高,进而有效增强了对肿瘤细胞的杀灭能力。该体系的构建将为肿瘤治疗的靶向给药提供一种新的选择。

参考文献

- Wang J, Chen C. Present status of individualized therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *J Exp Hematol* (中国实验血液学杂志), 2013, 21(6): 1617–1622.
- Peer D, Karp JM, Hong S, et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy [J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2 (12): 751–760.
- Hubbell JA, Chilkoti A. Nanomaterials for drug delivery [J]. *Science*, 2012, 337 (6092): 303–305.
- Mammen M, Choi SK, Whitesides GM. Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors [J]. *Angew Chem Int Ed*, 1998, 37 (20): 2754–2794.
- Kolonko EM, Kiessling LL. A polymeric domain that promotes cellular internalization [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130 (17): 5626–5627.
- Tong GJ, Hsiao SC, Carrico ZM, et al. Viral capsid DNA aptamer conjugates as multivalent cell-targeting vehicles [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131 (31): 11174–11178.
- Yang L, Meng L, Zhang X, et al. Engineering polymeric aptamers for selective cytotoxicity [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133 (34): 13380–13386.
- Amiram M, Quiroz FG, Callahan DJ, et al. A highly parallel method for synthesizing DNA repeats enables the discovery of ‘smart’ protein polymers [J]. *Nat Mater*, 2011, 10 (2): 141–148.
- Lee JB, Peng S, Yang D, et al. A mechanical metamaterial made from a DNA hydrogel [J]. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7 (12): 816–820.
- Zhao W, Brook MA, Li Y. Periodic assembly of nanospecies on repetitive DNA sequences generated on gold nanoparticles by rolling circle amplification [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 474: 79–90.
- Shangguan D, Li Y, Tang Z, et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 (32): 11838–11843.

4 结论

采用 RCA 法合成了含多个适配体重复单元