

基于核酸适体 L4 的转移性结直肠癌的靶向成像

李欣岩¹, 孙诗涵¹, 苗滋伟², 耿文倩¹, 蒋彬¹, 孙志英¹, 李婉明¹

(1. 中国医科大学生命科学院, 医学细胞生物学教育部重点实验室暨卫生部细胞生物学重点实验室,
2. 生命科学院, 沈阳 110122)

摘要 研究了核酸适体 L4 的靶向结合特性, 并探讨了其作为分子探针针对临床结直肠癌患者组织的靶向成像能力, 旨在为转移性结直肠癌的靶向诊断提供潜在的分子工具. 采用流式细胞术分析了核酸适体 L4 的结合特异性、亲和性、温度稳定性和细胞选择性; 通过酶处理实验探讨了核酸适体 L4 结合靶分子的性质; 基于生物素-链霉亲和素的结合原理, 将核酸适体 L4 与量子点(Quantum dots, QDs)偶联形成了 L4-QD 探针, 对临床结直肠癌患者组织进行了靶向成像, 并分析了组织靶向性及与患者病理特征的相关性. 结果表明, 核酸适体 L4 可高特异性和高亲和力地结合靶细胞 HCT116, 解离常数(K_d)值为(10.4±1.7) nmol/L, 且具有良好的温度稳定性. 临床组织成像结果显示, L4-QD 探针能够对结直肠癌组织实现靶向成像, 且荧光强度与患者美国癌症联合委员会(American joint committee on cancer, AJCC)临床分期和生存预后不良呈显著正相关. 核酸适体 L4 对转移性结直肠癌细胞具有高特异性和高亲和力, 与量子点偶联可实现结直肠癌组织的靶向成像, 有望成为评估结直肠癌进展程度的潜在分子探针及转移性结直肠癌靶向诊断的新型工具.

关键词 转移性结直肠癌; 核酸适体; 靶向成像; 量子点

中图分类号 O652.7; R735.3+5

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20260080

Targeted Imaging of Metastatic Colorectal Cancer Based on Aptamer L4

LI Xinyan¹, SUN Shihan¹, MIAO Ziwei², GENG Wenqian¹,

JIANG Bin¹, SUN Zhiying¹, LI Wanming^{1*}

(1. School of Life Sciences, Key Laboratory of Cell Biology of Ministry of Education and Key Laboratory of Cell Biology of Ministry of Health, 2. School of Life Sciences, China Medical University, Shenyang 110122, China)

Abstract To investigate the targeting and binding characteristics of aptamer L4 and evaluate its potential as a molecular probe for targeted imaging of colorectal cancer tissues in clinical samples, this study aimed to provide a novel tool for targeted diagnosis of metastatic colorectal cancer. Flow cytometry was employed to assess the binding specificity, affinity, thermal stability and cellular selectivity of aptamer L4. Enzymatic digestion assays were performed to determine the biochemical nature of the target molecule recognized by aptamer L4. Based on the biotin-streptavidin interaction, aptamer L4 was conjugated with quantum dots (QDs) to construct L4-QD probes, which were subsequently applied for targeted imaging of colorectal cancer tissues from clinical patients. The targeting specificity of the probes and their correlations with clinicopathological features were further analyzed. Aptamer L4 exhibited strong and specific binding to HCT116 cells, with a dissociation constant (K_d , nmol/L) of (10.4±1.7) nmol/L, and demonstrated favorable thermal stability. Aptamer L4 preferentially bound to tumor cells with metastatic potential, indicating that its target is likely a membrane-associated protein. Imaging of clinical specimens showed that L4-QD probes enabled specific visualization of colorectal cancer tissues, and the fluorescence intensity was

收稿日期: 2026-02-13. 网络首发日期: 2026-05-09.

联系人简介: 李婉明, 女, 博士, 教授, 主要从事核酸适体与肿瘤靶向诊疗方面的研究. E-mail: wml@cmu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 82373445)和辽宁省科学技术计划项目(批准号: 2023JH2/20200155)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.82373445) and the Liaoning Provincial Science and Technology Plan, China (No.2023JH2/20200155).

significantly positively correlated with American joint committee on cancer (AJCC) stage and poor patient prognosis. In conclusion, aptamer L4 displays high specificity and affinity for metastatic colorectal cancer cells. Its conjugation with quantum dots allows effective targeted imaging of colorectal cancer tissues, highlighting its potential as a molecular probe for evaluating disease progression and as a novel tool for the targeted diagnosis of metastatic colorectal cancer.

Keywords Metastatic colorectal cancer; Aptamer; Targeted imaging; Quantum dots

结直肠癌是全球范围内发病率和死亡率均居前列的恶性肿瘤,转移是患者死亡的主要原因^[1-3]。据统计,约90%的结直肠癌患者的相关死亡与肿瘤转移密切相关,转移性结直肠癌患者的5年生存率显著降低^[4-6]。因此,早期识别具有转移潜能的结直肠癌细胞、精准评估肿瘤进展程度,对改善患者预后具有重要临床意义^[7-9]。

传统的结直肠癌诊断及转移评估方法主要依赖于影像学检查、血清肿瘤标志物检测及病理活检,但存在特异性不足及无法早期识别转移潜能细胞等局限性^[10-15]。近年来,核酸适体作为一种通过指数富集配体系统进化技术(Cell-systematic evolution of ligands through exponential enrichment, Cell-SELEX)筛选获得的寡核苷酸序列(ssDNA或RNA),因具有高特异性、高亲和力、分子量小、易于化学修饰和稳定性好等优势,被广泛应用于肿瘤靶向诊断与治疗研究,被誉为“化学抗体”^[16,17]。Cell-SELEX技术以活细胞为筛选对象,可直接针对肿瘤细胞特有的表型特征进行筛选,使获得的核酸适体能够特异性识别靶细胞表面处于天然构象的靶标分子,更有可能实现成像诊断。即便在核酸适体靶分子未知的情况下,由于其在筛选时具有特定细胞表型的识别特性,因此核酸适体作为分子探针仍然能实现靶细胞的特异性识别^[18]。这种天然构象的识别优势避免了靶标分子在分离、纯化过程中可能发生的结构改变,更贴近肿瘤细胞在体内的生理状态,为靶向成像诊断的准确性提供了核心保障。

量子点(Quantum dots, QDs)是一种尺寸在1~10 nm之间的半导体纳米晶体,因其独特的光学特性,已成为生物医学成像领域的重要工具,尤其在肿瘤靶向成像、分子识别及细胞追踪等方面发挥关键作用^[19,20]。量子点具有高信号亮度和抗光漂白能力,且其体积小、荧光寿命长,有较好的光源稳定性,基于量子点的组织化学具有高灵敏度,可避免过多依靠主观判断从而干扰诊断结果^[21]。核酸适体介导的组织切片成像技术是一种基于适体的特异性分子识别能力与成像载体的信号放大特性,具有穿透性强、特异性高及稳定性好等优势,可实现肿瘤组织精准定位与量化分析的新型生物成像方法^[22-24]。

本课题组^[25]采用消减 Cell-SELEX 技术,以转移性结直肠癌细胞 HCT116 为靶细胞,非转移性结直肠癌细胞 CL187 为阴性细胞,筛选获得了多个候选核酸适体。本文聚焦其中一个核酸适体 L4,系统探究了其靶向结合特性,并探讨了其作为分子探针在临床结直肠癌患者组织中的靶向成像能力,建立了 L4-QD 探针成像信号与患者美国癌症联合委员会(American joint committee on cancer, AJCC)分期及预后的量化关联,旨在为转移性结直肠癌的精准靶向诊断提供新的分子工具和理论依据。

伦理声明:本文使用的结直肠癌组织芯片(HRec-Ade180Sur-03)购自上海芯超生物科技有限公司,该公司的相关伦理审查批件号为[YB M-05-02]。所有患者均签署了知情同意书,实验方案符合《赫尔辛基宣言》的伦理准则。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

链霉亲和素标记的量子点 605(QD-SA),武汉珈源量子点技术有限公司;核酸适体序列、原文库(Library)序列和非酶消化液,上海生工生物公司;DMEM培养基和RPMI1640培养基,美国Gibco公司;胎牛血清(FBS)和胰蛋白酶,美国HyClone公司;4%多聚甲醛(质量分数≥95%)和4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,质量分数≥98%),上海碧云天生物技术公司;其它试剂均为国产分析纯;实验用水为纯净水(电阻率18.2 MΩ·cm)。

FACScalibur型流式细胞仪(FCM),美国BD公司;CX41型荧光显微镜(FM),日本Olympus公司。

1.2 实验过程

1.2.1 细胞系和细胞培养 实验所用的人结直肠癌细胞系 HCT116, CL187, SW620, SW480, COLO205, Clone A, HCT-8 和 HT29、非洲绿猴肾成纤维细胞株 COS-7、人正常胃上皮细胞 GES-1、中国仓鼠卵巢细胞株 CHO、人胚肾细胞株 HEK293、人肺癌细胞株 A549、人胃腺癌细胞株 BGC-823、人乳腺癌细胞株 MCF-7 和人肝癌细胞株 SMMC7721 均为本实验室细胞库冻存。其中, CL187, HEK293 和 BGC-823 细胞使用的培养基为含 10% (体积分数) FBS 和 100 units/mL 青霉素-链霉素的高糖 DMEM 培养基。其余细胞所用培养基为含 10% (体积分数) FBS 和 100 units/mL 青霉素链霉素的 RPMI 1640 培养液。所有细胞均在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养。

1.2.2 序列分析 核酸适体和原文库序列由中国上海生工生物工程有限公司合成, 核酸适体 L4 和 ssDNA 原文库 (Library) 包含 FAM 荧光基团和生物素 (Biotin) 修饰 2 种形式。后续流式细胞术和荧光实验所用核酸适体用 FAM 标记, QD 探针所用核酸适体用 Biotin 标记。原文库 Library 的序列为 5'-AAGGAGCAGCGTGGATA-45N-TTAGGGTGTGTCGTCGTGCT-3', 其中 45N 代表 45 个核苷酸的随机序列; 核酸适体 L4 的序列为 5'-AGAGCAGCGTGGAGGATATCGGGCGGTTCGGTATCTTGTCTTCGTTTCGGGTAGTCTGC-3'。

1.2.3 核酸适体 L4 的结合特异性分析 取对数生长期的 HCT116 和 CL187 细胞, 利用非酶消化液消化细胞制成单细胞悬液, 以 1000 r/min 的转速离心 5 min, 弃去上层清液; 分别加入 FAM-L4 或 FAM-Library (终浓度 250 nmol/L) 于 4 °C 孵育 30 min; 以 1000 r/min 的转速离心 5 min, 弃去上层清液, 用 300 μL 磷酸盐 (PBS) 缓冲液重悬细胞; 利用流式细胞仪检测每组细胞的 FAM 荧光信号。FAM 的激发波长为 488 nm, 收集 FL1 通道 [(530±15) nm] 的荧光信号。每次分析收集 1×10⁴ 个细胞, 采用 CellQuest Pro 软件进行数据采集与分析。

将 5×10⁴ 个对数生长期的 HCT116 和 CL187 细胞接种于共聚焦小皿中, 培养 12 h; 加入 FAM-L4 或 FAM-Library (终浓度 250 nmol/L) 于 4 °C 避光孵育 30 min; 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次; 加入 4% 多聚甲醛于室温固定 30 min, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次; 加入 DAPI 于室温染色 10 min, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次; 通过荧光显微镜观察并拍照。

1.2.4 核酸适体 L4 的亲和性分析 将 FAM-L4 干粉用结合缓冲液 (含 1 mg/mL BSA+0.1 mg/mL 鲑鱼精 DNA 的 PBS 缓冲液) 溶解并稀释至母液浓度为 1 μmol/L。通过 2 倍比稀释法 (体积比), 依次配制浓度为 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 和 512 nmol/L 的 FAM-L4 工作液。将 HCT116 细胞制成单细胞悬液, 加入不同浓度 (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 和 512 nmol/L) 的 FAM-L4 工作液, 于 4 °C 孵育 30 min, 采用流式细胞术分析不同细胞组的 FAM 荧光信号。利用 Sigma Plot 软件根据公式 $Y = B_{\max} \times X / (K_d + X)$ 计算得到核酸适体 L4 的解离常数 (K_d , nmol/L) 值 [其中, $B_{\max}$ (MFI) 为饱和结合量; Y (MFI) 为荧光强度; X (nmol/L) 为适体浓度]。

1.2.5 核酸适体 L4 的温度稳定性分析 将核酸适体 FAM-L4 与 HCT116 细胞分别在 4, 25 和 37 °C 下孵育 30 min, 通过流式细胞仪检测不同温度下细胞的 FAM 荧光信号。

1.2.6 核酸适体 L4 结合靶分子的性质分析 取对数生长期的 HCT116 细胞制成单细胞悬液, 分别加入 0.5 mg/mL 的胰蛋白酶和 0.1 mg/mL 的蛋白酶 K, 于 37 °C 分别作用 2, 5 或 10 min, 再加入 FBS 缓冲液终止消化反应, 以 1000 r/min 的转速离心 5 min, 弃去上层清液; 加入 100 μL 活化后的 FAM-L4 于 4 °C 孵育 30 min; 通过流式细胞仪检测每组细胞的 FAM 荧光信号。

1.2.7 核酸适体 L4 的细胞选择性分析 取对数生长期的 HCT116, CL187, SW480, SW620, Clone A, HCT-8, HT29, COS-7, GES-1, CHO, HEK293, A549, COLO205, BGC-823, MCF-7 和 SMMC7721 细胞, 加入 100 μL 活化后的 FAM-L4 于 4 °C 孵育 30 min, 通过流式细胞仪检测不同细胞的 FAM 荧光信号。

1.2.8 核酸适体 L4 偶联量子点形成 L4-QD 探针对靶细胞的成像分析 取对数生长期的 HCT116 细胞制成单细胞悬液, 接种于共聚焦小皿中, 培养 12 h; 分别加入 Biotin-L4 或 Biotin-Library (终浓度为 250 nmol/L) 于 4 °C 孵育 30 min, 用 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次; 加入链霉亲和素标记的量子点 QD605 于室温

孵育 20 min, 用 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次; 同时设置阴性对照组, 加入 Biotin-Library, 以评估探针的非特异性结合; 用 4% 多聚甲醛于室温固定细胞后, 加入 DAPI 染液于室温孵育 10 min, 通过荧光显微镜观察 QD-SA 的红色荧光并拍照; 将 QD-SA 用 488 nm 波长光激发, 收集 585~615 nm 发射光; 将 DAPI 用 405 nm 波长光激发, 收集 420~480 nm 发射光; 曝光时间统一设置为 QD-SA 通道 500 ms, DAPI 通道 100 ms; 所有图像在相同参数下采集, 并使用 ImageJ 软件进行荧光半定量分析。

1.2.9 L4-QD 探针临床结直肠癌患者组织的靶向成像分析 将组织芯片(HRec-Ade180Sur-03)于 60 °C 烘烤 4 h, 用纯二甲苯脱蜡(15 min×2 次); 用无水乙醇清洗 2 次×10 min, 用 95%, 90%, 85%, 75% 和 50% (体积分数) 乙醇各清洗 5 min; 用 PBS 清洗 3 次×5 min; 将切片置于 0.01 mol/L 柠檬酸钠修复液中高压修复 100 s, 自然冷却至室温; 用 PBS 清洗 3 次×5 min; 加入封闭液[洗涤缓冲液+10 g/L BSA+10% FBS (体积分数)]于 4 °C 孵育 60 min; 加入 Biotin-L4 (终浓度为 250 nmol/L) 于 4 °C 孵育 60 min; 用 PBS 洗涤 2 次后, 加入 QD-SA 于室温孵育 20 min; 通过荧光显微镜观察并拍照。在 200× 和 400× 显微镜视野下观察两组组织的荧光信号分布, 统计 L4-QD 阳性率。进一步收集患者的临床病理资料, 分析患者年龄、性别、肿瘤大小、AJCC 临床分期等特征以及生存期与 L4-QD 荧光强度的相关性。

1.2.10 统计学分析 采用 Graph Pad Prism 软件进行统计学分析, 结果为平均值±标准差表示, 采用非配对或配对双尾 Student's *t* 检验方法进行统计。

2 结果与讨论

2.1 核酸适体 L4 与 HCT116 细胞的特异性结合

在前期筛选验证中, 核酸适体 L4 经截短优化, 从长度 85 nt 截短到 62 nt, 其二级结构如图 1(A) 所示。为了明确核酸适体 L4 与靶细胞 HCT116 的结合特性, 利用流式细胞术分析了核酸适体 L4 与细胞的结合情况。由图 1(B) 可见, 与对照 Library 相比, 核酸适体 L4 与靶细胞 HCT116 的荧光结合强度明显增加, 而非靶细胞 CL187 的荧光强度几乎未发生变化, 表明核酸适体 L4 能够特异性结合靶细胞 HCT116。荧光显微镜观察也证实了此结果, 在核酸适体 L4 组的 HCT116 细胞上可以观察到明显的绿色荧光信号, 主要定位在细胞膜上[图 1(C)]。以上结果表明, 核酸适体 L4 对 HCT116 细胞具有结合特异性。

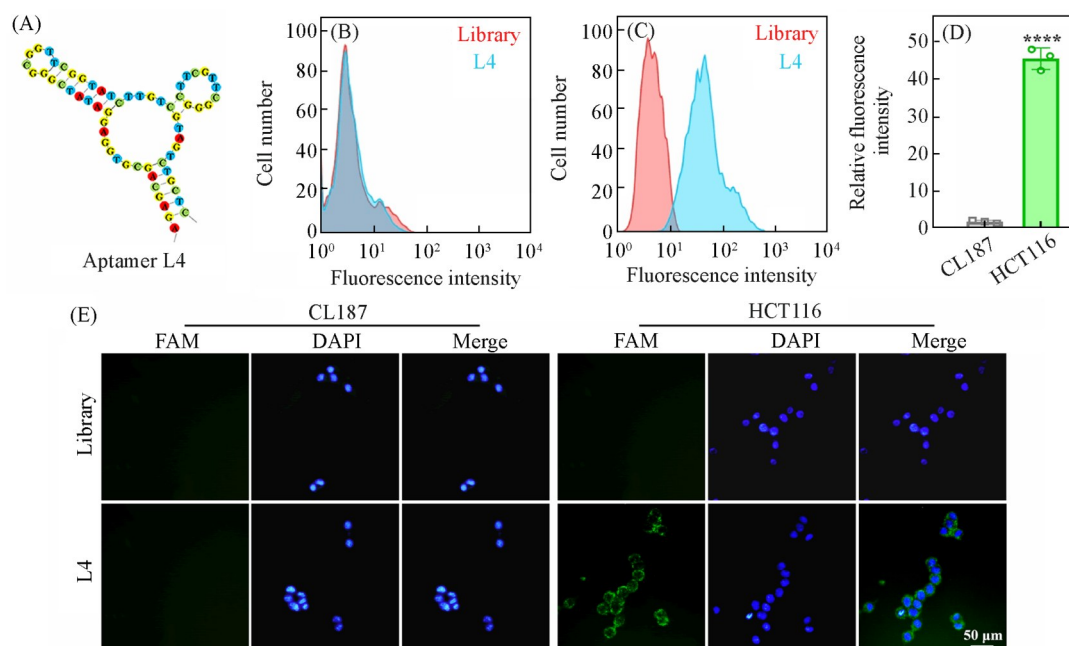


Fig. 1 Analysis of binding specificity of aptamer L4 to the target HCT116 cells

(A) Secondary structure of aptamer L4; (B, C) flow cytometry analysis of aptamer L4 binding to HCT116(B) and CL187(C) cells; (D) quantitative analysis of mean fluorescence intensity, *****P*<0.0001, *n*=3; (E) fluorescence microscopy images of aptamer L4 binding to the target HCT116 or non-target CL187 cells.

2.2 核酸适体 L4 与靶细胞 HCT116 的高亲和力结合

在明确核酸适体 L4 对靶细胞的特异性结合后, 进一步探究了其对于靶细胞的结合亲和力. 流式细胞术结果[图 2(A)]显示, 随着核酸适体 L4 浓度的增大, 对应的细胞荧光强度逐渐增强; 当核酸适体 L4 浓度增加到 16 nmol/L 时, 荧光强度增加幅度变小, 荧光信号趋于饱和. 同时, Library 组的细胞荧光强度增加较少. 根据荧光信号强度值制定拟合曲线, 计算得到 K_d 值. 由图 2(B) 可见, 核酸适体 L4 的 K_d 值为 (10.4 ± 1.7) nmol/L, 具有良好的亲和力, 这为核酸适体 L4 的进一步临床应用提供了实验依据. 靶向特异性是分子探针用于临床诊断的核心前提^[26-31], 本文从细胞与组织两个层面证实了核酸适体 L4 的靶向优势. 在细胞层面, 核酸适体 L4 对转移性结直肠癌细胞 HCT116 表现出高度特异性结合, $K_d = (10.4 \pm 1.7)$ nmol/L, 属于高亲和力范畴; 而对非转移性结直肠癌细胞 CL187 则无明显结合活性.

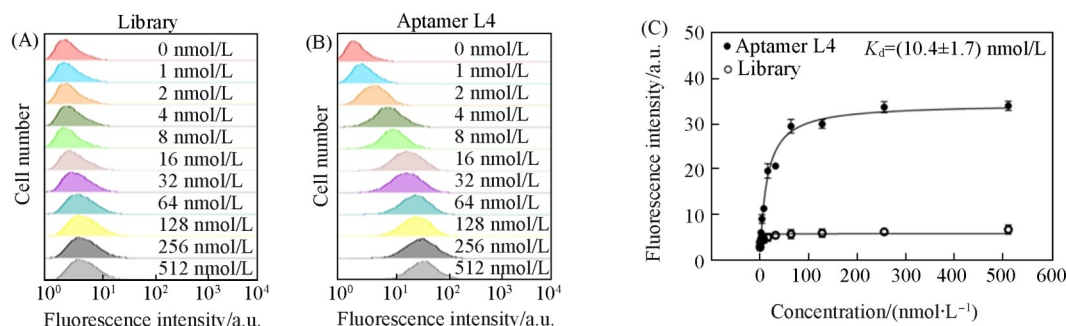


Fig. 2 Affinity analysis of aptamer L4 binding to HCT116 cells

(A, B) Flow cytometry histograms showing the binding of different concentrations (0—512 nmol/L) of aptamer Library (A) or aptamer L4 (B) to HCT116 cells; (C) saturation binding curve of aptamer L4 to HCT116 cells with increasing concentrations of aptamer L4, and calculated K_d value, data are presented as mean $\pm$ SD ($n=3$ independent experiments).

2.3 核酸适体 L4 靶标与细胞膜表面蛋白的结合

由图 1(C) 可见, 核酸适体 L4 的结合主要在细胞膜上, 为了进一步探讨其结合靶标的性质, 利用胰酶和蛋白酶 K 处理细胞不同时间, 进行了流式细胞术分析. 由图 3 可见, 与无胰酶处理组相比, 胰酶处理 2 min 后细胞荧光强度明显下降, 处理 5 和 10 min 的细胞荧光结合峰几乎与对照 Library 组重合, 表明胰酶处理后细胞失去了与核酸适体 L4 结合的能力, 提示核酸适体 L4 结合的靶标分子能够被胰酶降解. 同样, 用蛋白酶 K 处理细胞时也观察到相同结果. 根据以上结果推测, 核酸适体 L4 结合的靶标分子可能是细胞表面的膜蛋白.

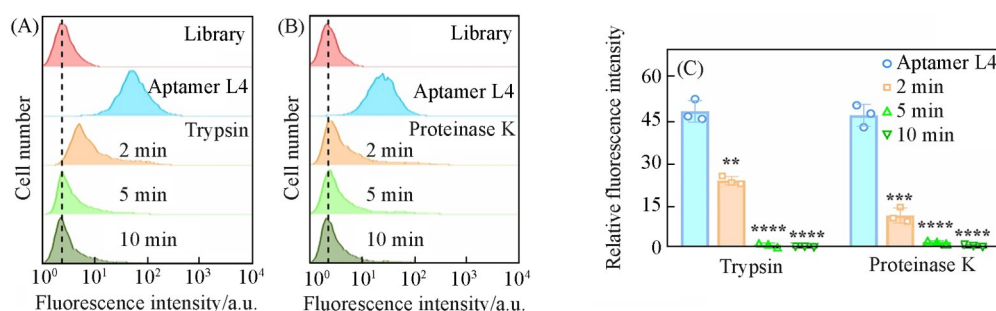


Fig. 3 Flow cytometry analysis of aptamer L4 binding to HCT116 cells before and after trypsin/proteinase K treatment

Histograms of trypsin (A) and proteinase K (B) treated cells with 2, 5 and 10 min; (C) quantitative analysis of mean fluorescence intensity (MFI) showing the relative binding of aptamer L4 after enzyme treatments; data are presented as mean $\pm$ SD, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, $n=3$.

2.4 核酸适体 L4 与靶细胞结合的温度稳定性

在筛选核酸适体时, 为了防止细胞对核酸链的内吞作用, 采用的筛选温度为 4 °C, 从而降低了非特异性结合. 为了进一步探讨核酸适体 L4 在体内应用的可能性, 利用流式细胞术检测了核酸适体 L4 在室温 (25 °C) 或体内温度 (37 °C) 下与靶细胞的结合情况. 由图 4 可见, 与对照 Library 相比, 在 25 °C 或 37 °C 孵育时, 细胞荧光强度的增加程度与 4 °C 时几乎一样, 表明核酸适体 L4 在室温或体内温度下仍保

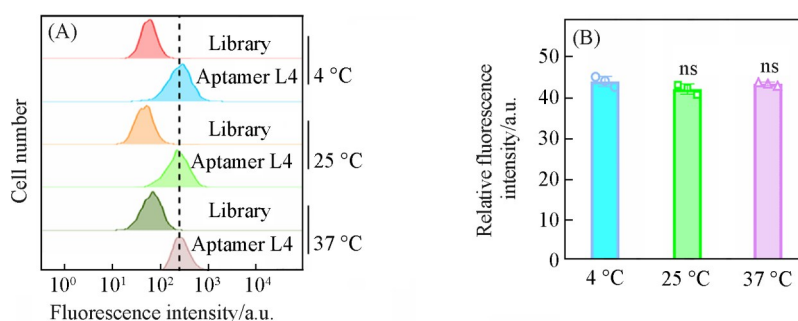


Fig. 4 Flow cytometry analysis of aptamer L4 binding to HCT116 cells at different temperatures

(A) Histograms; (B) quantitative analysis of mean fluorescence intensity, ^{ns} $P>0.05$, $n=3$.

留其与靶细胞的结合能力, 具有体内应用潜力.

2.5 核酸适体 L4 结合转移性肿瘤细胞的特异性

为了进一步明确核酸适体 L4 的细胞选择性, 选择结直肠癌其它细胞系和不同组织来源的正常细胞和肿瘤细胞进行了核酸适体 L4 的细胞结合实验. 流式细胞术结果显示, 核酸适体 L4 与 4 种正常细胞系 COS-7, GES-1, CHO 和 HEK293 均不结合[图 5(A—D)], 提示其具有肿瘤结合特异性. 此外, 核酸

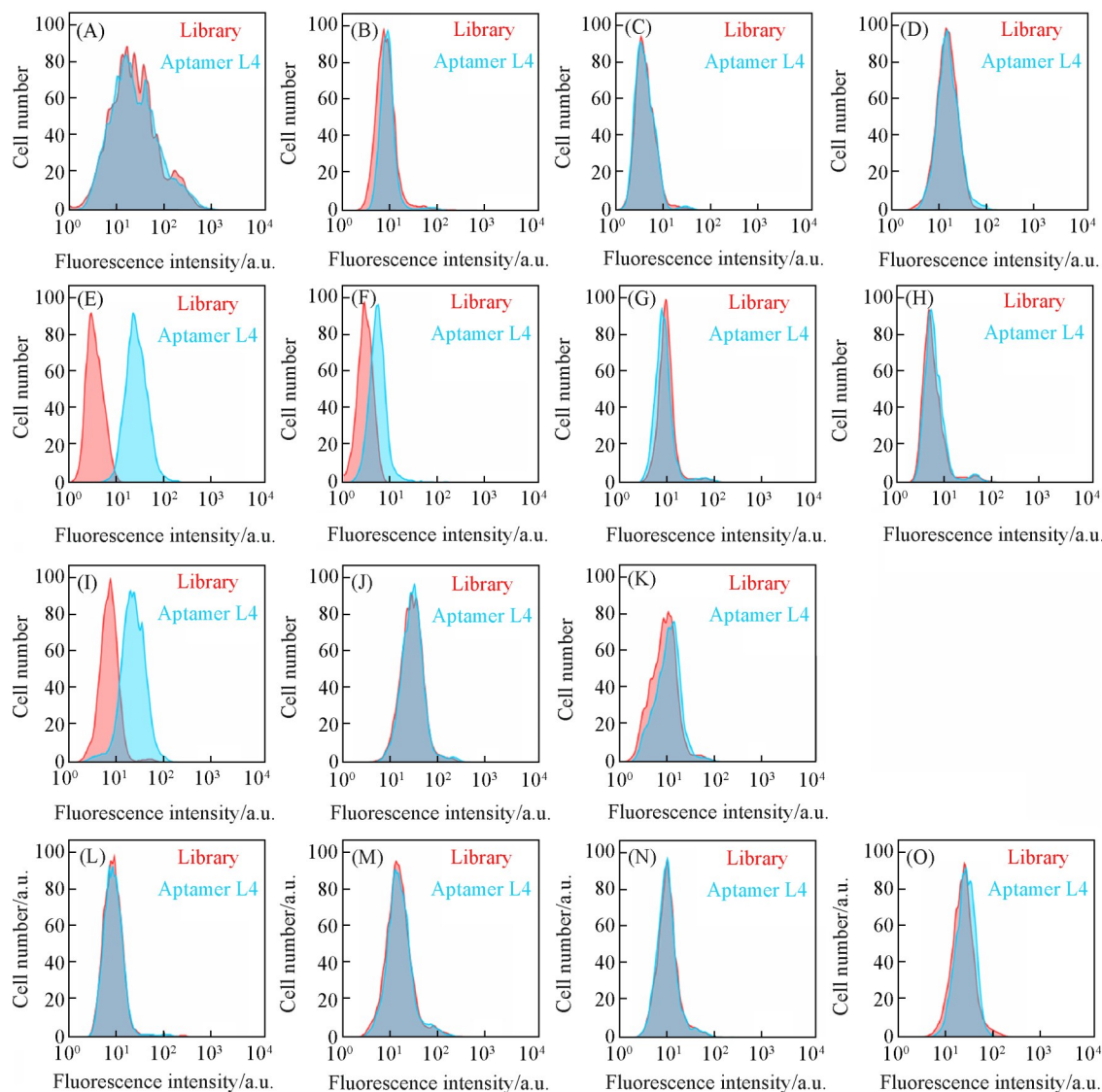


Fig. 5 Flow cytometry analysis of aptamer L4 binding to various normal(A—D) and tumor(E—R) cell lines

(A) COS-7; (B) GES-1; (C) CHO; (D) HEK293; (E) CHT116; (F) SW620; (G) SW480; (H) HT29; (I) COLO 205; (J) HCT-8; (K) CloneA; (L) MCF-7; (M) BGC-823; (N) SMMC7721; (O) A549.

适体L4除了与靶细胞HCT116结合之外,也与结直肠癌细胞系SW620和COLO 205结合[图5(E—K)],而与其它结直肠癌细胞系和不同组织来源的其它肿瘤细胞均不结合[图5(L—O)].以上结果表明,核酸适体L4具有对转移性结直肠癌的结合特异性,且提示其靶向识别的核心是肿瘤细胞的“转移表型”,而非特定组织来源,这一特性使其具备成为广谱转移性肿瘤靶向探针的潜力^[29,31].这种靶向性优势可有效减少诊断过程中的假阳性信号,提高诊断特异性,这也是核酸适体相较于传统肿瘤标志物的突出优势之一^[32,33].

2.6 核酸适体L4偶联量子点实现靶细胞成像

量子点凭借高信号亮度、抗光漂白及荧光寿命长等独特光学特性,已成为生物医学成像领域的理想载体.细胞膜蛋白作为细胞间信号传导、物质转运及细胞识别的关键分子,常被用作肿瘤靶向诊断与治疗的理想靶点^[34].核酸适体易被功能性修饰,与不同的纳米材料结合后能够提高分子靶向成像的灵敏度,从而提高临床诊断的准确性.为评估核酸适体L4作为分子探针进行靶向成像的可行性,本文基于生物素-链霉亲和素系统将生物素标记的核酸适体L4与QD-SA偶联,构建了L4-QD荧光探针[图6(A)].经与L4-QD探针共孵育后,HCT116细胞膜表面呈现清晰、明亮的红色荧光信号(QD, 605 nm),且荧光定位与L4结合的细胞膜分布特征一致[图6(B)].与之相比,阴性对照组则未在HCT116细胞上观察到明显的红色荧光信号.以上结果表明,L4-QD探针能够特异性识别靶细胞HCT116并实现细胞膜水平的靶向成像,且QD-SA本身不产生明显的非特异性背景信号.

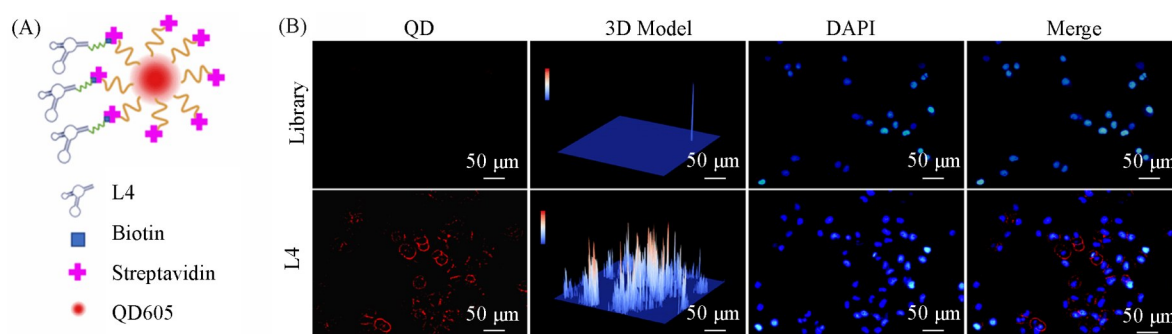


Fig. 6 Targeted imaging of HCT116 cells by L4-QD probe

(A) Schematic diagram of L4-QD probe; (B) fluorescence images of HCT116 cells attained by L4-QD probe.

2.7 L4-QD探针特异性识别临床结直肠癌组织

在细胞水平验证的基础上,进一步探究了L4-QD探针对临床结直肠癌患者组织的靶向成像能力.利用L4-QD探针对包含90例结直肠癌患者癌组织及90例相应癌旁组织的组织芯片进行了染色成像.由图7(A)可见,在90例结直肠癌组织中,56例呈现L4-QD阳性荧光信号,阳性率为62.2%(56/90);而

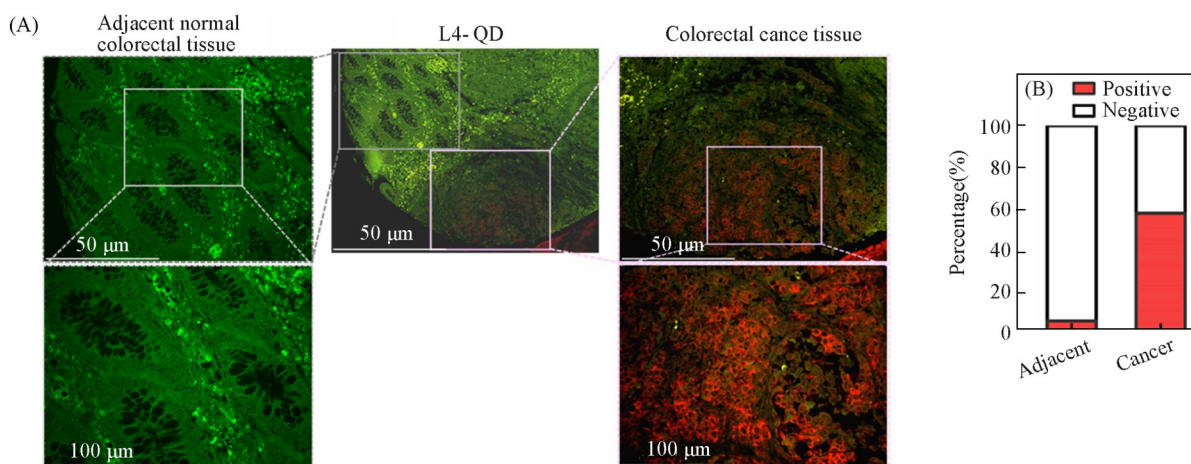


Fig. 7 Imaging analysis of colorectal cancer tissues and adjacent normal tissues by L4-QD probe

(A) Fluorescence imaging of L4-QD; (B) comparison of L4-QD positivity rates.

在90例癌旁正常组织中,仅5例呈现弱阳性信号,阳性率仅为5.6%(5/90)。L4-QD探针对接组织检测的阳性率显著高于癌旁组织,表明其具有良好的肿瘤组织结合特异性。为进一步直观比较L4-QD探针对接组织与癌旁组织的识别差异,选取一个同时包含癌组织和癌旁组织的组织芯点进行了成像分析。由图7(B)可见,在癌组织区域可观察到清晰、明亮的红色QD荧光信号,荧光主要定位于肿瘤细胞区域;而在相邻的癌旁正常组织区域,则未观察到明显的红色荧光信号,仅见DAPI染色的细胞核。此结果从同一组织芯点的角度直观证实了L4-QD探针能够精准区分结直肠癌组织与癌旁正常组织。综上,L4-QD探针能够在临床组织切片水平上实现对结直肠癌组织的特异性靶向成像,具有良好的临床应用潜力。

2.8 L4-QD荧光信号强度与临床分期和转移密切相关

为探究L4-QD荧光信号强度与结直肠癌患者临床病理特征的关联,将组织芯片上90个癌组织点上的L4-QD荧光信号强度分为3个不同的组别:阴性组(Negative,无荧光或平均荧光强度 $\leq$ 背景值的1.2倍)、弱-中度阳性组(Weak-moderate positive,平均荧光强度为背景值的1.2~3倍)和强阳性组(Strong positive,平均荧光强度 $>$ 背景值的3倍)。图8示出了3个等级的代表性免疫荧光图像:阴性组几乎未见红色荧光;弱-中度阳性组呈现弥散的弱至中等强度红色荧光;强阳性组则显示明亮、强烈的红色荧光信号,且阳性细胞密度较高。进一步对L4-QD信号强度与结直肠癌患者的病理特征进行了统计分析,结果列于表1。由表1可见,L4-QD荧光强度在不同年龄组和不同肿瘤大小组中的分布无显著差异,而与性别和AJCC分期有统计学意义。具体表现为在女性患者中L4-QD荧光强度为“Strong”的比例高于男性患者,Spearman相关性分析显示性别与荧光强度呈显著弱相关。在I~II期患者中,L4-QD荧光强度以“Negative”为主,III期患者中“Strong”荧光比例升至36.9%(14/38),IV期患者中L4-QD荧光强度均为“Strong”。

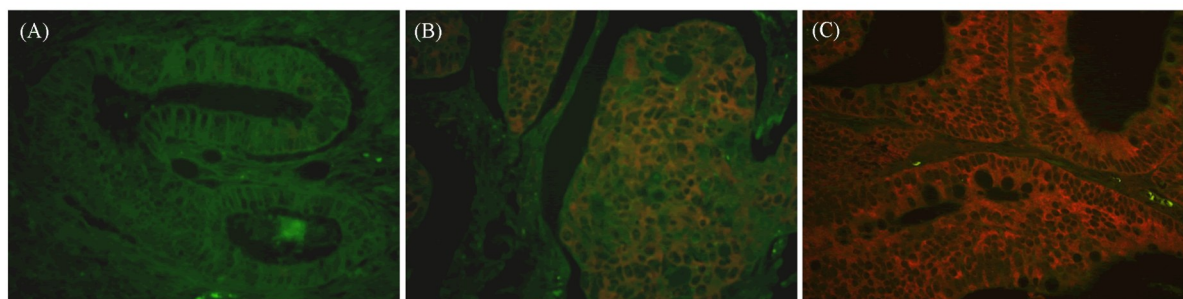


Fig. 8 Representative immunofluorescence images of L4-QD probe staining in colorectal cancer tissues

(A) Negative; (B) weak-moderate positive; (C) strong positive.

Table 1 Correlation analysis of clinical and pathological characteristics of 90 patients with colorectal cancer and fluorescence intensity of L4-QD probe*

Feature		L4-QD fluorescence intensity, <i>n</i> (%)			Spearman's correlation	
		Negative	Weak-moderate	Strong	<i>r</i>	<i>P</i> -value
		34(37.8%)	34(37.8%)	22(24.4%)		
Age	≤ 70	22(39.29)	19(33.93)	15(26.78)	-0.02248	0.8353
	> 70	10(31.25)	15(46.88)	7(21.87)		
Gender	Male	26(44.8)	21(36.2)	11(19)	0.2170	0.0400
	Female	8(25)	13(40.6)	11(34.4)		
Tumor size	≤ 5 cm	21(38.2)	19(34.5)	15(27.3)	-0.03909	0.7145
	> 5 cm	13(37.1)	15(42.9)	7(20)		
AJCC clinical stage	I	7(77.8)	1(11.1)	1(11.1)	0.5675	< 0.0001
	II	23(61.5)	13(30.8)	3(7.7)		
	III	4(10.5)	20(52.6)	14(36.9)		
	IV	0(0)	0(0)	4(100)		

* A statistically significant($P < 0.05$); age information was missing for two patients in the original data.

图9示出L4-QD探针对非转移性与转移性结直肠癌组织在不同放大倍数下的染色结果. 由图9可见, 转移性结直肠癌组织的QD红色荧光信号强度显著高于非转移性组织. 此结果表明, 随着临床分期的进展, 当肿瘤发生转移时, 核酸适体L4的靶向荧光信号显著增强, 说明核酸适体L4能有效识别具有转移风险的中晚期患者. 核酸适体L4的荧光信号与患者年龄、肿瘤大小无显著相关性, 仅与性别弱相关, 评估结果更具可靠性. 核酸适体L4分子量小、易于修饰且稳定性好, 便于开发为快速检测试剂.

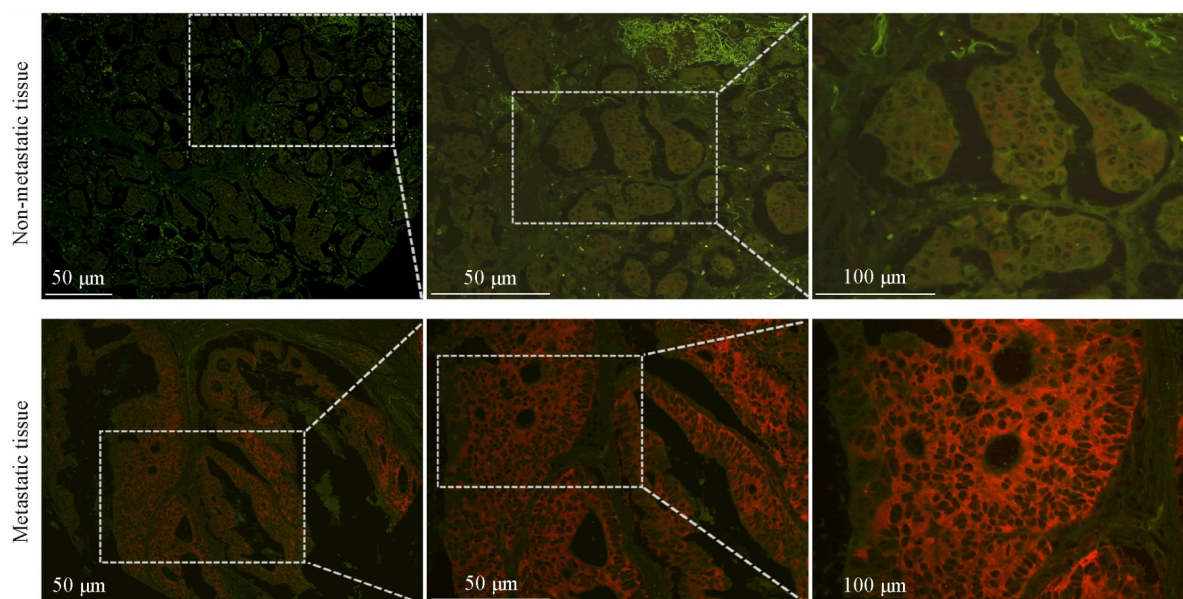


Fig. 9 Representative immunofluorescence images of L4-QD probe staining in non-metastatic and metastatic colorectal cancer tissues at different magnifications

2.9 L4-QD 探针荧光信号强度与不良预后的相关性

在临床靶向性验证的基础上, 进一步分析了L4-QD探针荧光信号强度与90例结直肠癌患者生存预后的关联性. 根据L4-QD探针荧光强度将患者分为高荧光组(图10谱线a)与低荧光组(图10谱线b), Kaplan-Meier生存分析显示, 高荧光组患者的总生存期显著短于低荧光组($P < 0.001$), 提示L4-QD探针可作为结直肠癌患者不良预后的潜在预测指标.

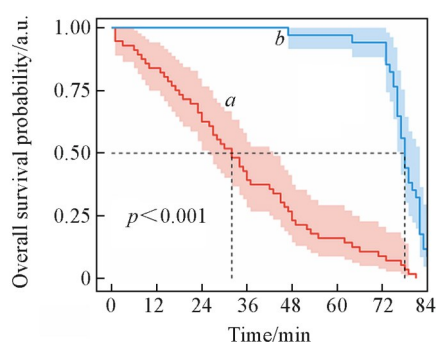


Fig. 10 Overall survival curves of colorectal cancer patients with high(a) and low(b) aptamer L4 fluorescence intensities

3 结 论

本文通过消减 Cell-SELEX 技术筛选获得了核酸适体L4, 经细胞实验与临床组织验证, 明确了其对转移性结直肠癌细胞及临床组织的高靶向结合能力, 且与患者预后密切相关, 为转移性结直肠癌的精准诊断与进展评估提供了新型分子工具.

核酸适体L4兼具高特异性、高亲和力及良好稳定性等优势, 其与量子点偶联形成的探针能够实现转移性结直肠癌的精准靶向成像, 并为评估肿瘤进展状态及患者预后提供重要参考. 未来通过明确核酸适体L4的特异性靶蛋白身份、扩大临床样本验证规模、开发诊断试剂盒或“诊疗一体化”平台, 将进一步推动核酸适体L4的临床转化应用, 为转移性结直肠癌的精准诊疗提供新的解决方案.

参 考 文 献

- [1] Cooray P. D., Cooper N. J., *Med. Oncol.*, **2025**, 42(4), 95
- [2] Kiri S., Ryba T., *Mol. Cancer*, **2024**, 23(1), 154
- [3] Ciraci P., Studiale V., Taravella A., Antoniotti C., Cremolini C., *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2025**, 22(1), 28—45
- [4] André T., Shiu K. K., Kim T. W., Jensen B. V., Jensen L. H., Punt C. J. A., Smith D., Garcia-Carbonero R., Alcaide-Garcia J., Gibbs P., de la Fouchardiere C., Rivera F., Elez E., Le D. T., Yoshino T., Zuo Y., Fogelman D., Adelberg D., Diaz L. A., *Ann. Oncol.*, **2025**, 36(3), 277—284
- [5] Strickler J. H., Bekaii-Saab T., Cercek A., Heinemann V., Nakamura Y., Raghav K., Siena S., Tabernero J., van Cutsem E., Yoshino T., Ramos J., Guan X. S., Andre T., *Future Oncol.*, **2025**, 21(3), 303—311
- [6] Yaqub S., Longva A., Angelsen J. H., Brudvik K. W., Carling U., Edwin B., Fretland Å. A., Grünhagen D. J., Line P. D., Røsok B. I., Smedman T. M., Sparrelid E., Syversveen T., Villanger O., Lassen K., *Scand. J. Surg.*, **2025**, 114(2), 126—134
- [7] Zhai F. H., Yun B. F., Ming J., Yu T. Y., Li B. H., Liu X., Wang X. S., Chen Z. H., Song C. F., Zhao M. Y., Li W. L., Liu Z. B., Liang A. B., Li J. Y., Zhang F., *Adv. Mater.*, **2025**, 37(18), 2501378
- [8] Tonini V., Zanni M., *World J. Gastroenterol.*, **2024**, 30(3), 211—224
- [9] Zygulska A. L., Pierzchalski P., *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, 23(2), 852
- [10] Sur D. K. C., Brown P. C., *Am. Fam. Physician*, **2025**, 112(3), 278—283
- [11] Dong Q., Li Z. Q., Peng T. H., Chen Z., Tan W. H., *Chem. J. Chinese Universities*, **2020**, 41(12), 2648—2657(董倩, 李兆倩, 彭天欢, 陈卓, 谭蔚泓. 高等学校化学学报, **2020**, 41(12), 2648—2657)
- [12] Jin Z., Li Y., Yi H., Wang M. H., Wang C. F., Du S. K., Zeng W. J., Zong Z., *Int. J. Oncol.*, **2025**, 66(3), 22
- [13] Zhang Y., Wang Y., Zhang B. Q., Li P. F., Zhao Y., *Biomed. Pharmacother.*, **2023**, 163, 114786
- [14] Wu Z. W., Li Y., Zhang Y. B., Hu H., Wu T. W., Liu S. Y., Chen W. Q., Xie S. G., Lu Z. X., *Technol. Cancer Res. Treat.*, **2020**, 19, 1533033820980426
- [15] Liu S. C., Zhang H., *World J. Gastroenterol.*, **2024**, 30(33), 3818—3822
- [16] Li W. M., Fang J., *Chem. J. Chinese Universities*, **2016**, 37(7), 1262—1268(李婉明, 方瑾. 高等学校化学学报, **2016**, 37(7), 1262—1268)
- [17] Tang J. L., Shi H., He X. X., Wang K. M., Li D., Yan L. A., Lei Y. L., Liu J. B., *Chem. J. Chinese Universities*, **2014**, 35(10), 2093—2100(汤进录, 石慧, 何晓晓, 王柯敏, 李朵, 颜律安, 雷艳丽, 刘剑波. 高等学校化学学报, **2014**, 35(10), 2093—2100)
- [18] Lin N. Q., Wu L., Xu X., Wu Q. Y., Wang Y. Z., Shen H. C., Song Y. L., Wang H. Y., Zhu Z., Kang D. Z., Yang C. Y., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, 13(8), 9306—9315
- [19] Loskutova A., Seitkali A., Aliyev D., Bukasov R., *Int. J. Mol. Sci.*, **2025**, 26(14), 6674
- [20] Liang H. X., Wang M., Zhang Y. C., Bai L., Li X. M., Yu F. B., Cheng Z. Y., Zhao L. L., *Chem. J. Chinese Universities*, **2025**, 46(1), 20240154(梁惠闲, 王淼, 张雨璨, 白丽, 李雪妹, 于法标, 程子译, 赵琳璐. 高等学校化学学报, **2025**, 46(1), 20240154)
- [21] Bao Z. H., Lu L. X., Wang J. Y., Zhu H. T., Dang X. L., Chen Y. C., Yin X. Z., Song Y. H., Wen X. J., *J. Fluoresc.*, **2025**, 36, 785—816
- [22] Stephens C., Goodey N. M., Gubler U., *Anal. Biochem.*, **2025**, 703, 115890
- [23] Feng L. J., Sun Y., Jia W. S., Yu Y., Liu C., Yang J., Luan Y. X., Chen J., Wang F. C., *Biomolecules*, **2025**, 15(6), 818
- [24] Chen C., Zhou S., Cai Y. Q., Tang F. Q., *NPJ Precis. Oncol.*, **2017**, 1, 37
- [25] Li W. M., Bing T., Wang Q., Li Y. X., Sun S. H., Li X. Y., Ma Y. N., Wang R., Ba W., Li X. Y., Shanguan D. H., Fang J., *Bioorg. Chem.*, **2025**, 165, 108989
- [26] Zhu G. Z., Chen X. Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2018**, 134, 65—78
- [27] Ji C. L., Wei J. Y., Zhang L., Hou X. R., Tan J., Yuan Q., Tan W. H., *Chem. Rev.*, **2023**, 123(22), 12471—12506
- [28] Ochoa S., Milam V. T., *ACS Synth. Biol.*, **2025**, 14(8), 3049—3064
- [29] Ishizu K., Sunose N., Yamazaki K., Tsuruo T., Sadahiro S., Makuuchi H., Yamori T., *Biol. Pharm. Bull.*, **2007**, 30(9), 1779—1783
- [30] Yang Z., Wu D. J., Chen Y. S., Min Z. J., Quan Y. J., *Cancer Biol. Ther.*, **2019**, 20(9), 1195—1205
- [31] Vincent Z., Urakami K., Maruyama K., Yamaguchi K., Kusuha M., *Genes Cancer*, **2014**, 5(7-8), 250—60
- [32] Ji D. Y., Feng H. X., Liew S. W., Kwok C. K., *Trends Biotechnol.*, **2023**, 41(11), 1360—1384
- [33] Kordasht H. K., Hasanzadeh M., *Talanta*, **2020**, 220, 121436
- [34] Chen S. Y., Cui J. L., Chen H. Y., Yu B., Long S. H., *Eur. J. Med. Chem.*, **2023**, 262, 115911

(Ed.: L, W, K)