

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.12.015

适配子纤维蛋白靶向性验证及其抗凝活性测定 *

李晓东^{1,2} 刘家云³ 屈园利¹ 何林全¹ 屈玲³ 龙钢^{1Δ}

(1 空军军医大学西京医院中医科 陕西 西安 710032; 2 火箭军广州特勤疗养中心疗养一科 广东 广州 510400;

3 空军军医大学西京医院检验科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:验证适配子 G81 的纤维蛋白靶向性,评估适配子对凝血系统的影响。**方法:**以复钙法制备鼠源、人源体外纤维蛋白,将不同浓度 Cy5.5 标记的适配子溶液与之孵育,置于激光共聚焦显微镜下以固定的参数成像,用 ImageJ 软件进行相对荧光强度分析;将适配子 G81 溶液加入血浆中,通过倍比稀释法得到含浓度梯度适配子的血浆,采用 SYSMEX CS-5100 全自动血凝仪检测 PT、APTT、TT,评估适配子 G81 对凝血功能的影响。**结果:**激光共聚焦显微镜显示适配子能与纤维蛋白结合,随着加入适配子量的增加其相对荧光强度逐渐增强,表明适配子可与纤维蛋白结合,统计分析提示荧光强度与适配子存在量效关系;人源、鼠源纤维蛋白结合的荧光强度无统计学差异($P>0.05$)。在抗凝活性检测中,血浆中适配子 G81 浓度达到 200 pmol/mL 时,各浓度统计分析结果均显示 $P>0.05$,表明适配子对 PT、APTT、TT 的测量均没有统计学差异上的影响。**结论:**适配子 G81 具有纤维蛋白靶向性,且当加入的适配子剂量低于 200 pmol/mL 时对内、外源性凝血功能、凝血酶时间均无明显影响。

关键词:血栓性疾病;适配子;纤维蛋白;荧光强度;抗凝活性

中图分类号:R-33;Q75;R331 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)12-2272-06

Fibrin-targeting Validation of Aptamer and its Anticoagulant Activity Determination*

LI Xiao-dong^{1,2}, LIU Jia-yun³, QU Yuan-li¹, HE Lin-quan¹, QU Ling³, LONG Yin^{1Δ}

(1 Department of Traditional Chinese Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Guangzhou Special Service Recuperation Center of PLA Rocket Force, Guangzhou, Guangdong, 510400, China;

3 Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To verify the fibrin-targeting of aptamer G81 and evaluate its effects on the coagulation system. **Methods:** Fibrin was prepared in vitro and the aptamer labeled with Cy5.5 at different concentrations was incubated with it. Fluorescence intensity was observed under the laser confocal microscope and analyzed by ImageJ software. Then, the plasma containing the gradient concentration aptamer was obtained by the multiple dilution method and the aptamer G81 was added into the plasma. The prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and thrombin time (TT) were detected by the automatic coagulometer to evaluate the effects on the coagulation function. **Results:** Confocal laser microscopy showed that the aptamer could bind to fibrin, and the fluorescence intensity increased with the rise of the aptamer. Statistical analysis indicated that there was a dose-effect relationship between relative fluorescence intensity and aptamers. And there was no significance in the fluorescence intensity between human and mouse fibrin($P>0.05$). In the detection of anticoagulant activity, there was no statistically significant difference between the concentration of aptamer G81 in plasma below 200 pmol/mL($P>0.05$). **Conclusion:** The aptamer G81 is fibrin-targeting and has no obvious effects on endogenous and exogenous coagulation functions and thrombin time when below 200 pmol/mL of aptamer.

Key words: Thrombotic disease; Aptamer; Fibrin; Fluorescence intensity; Anticoagulant activity

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q75; R331 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)12-2272-06

前言

心血管病是全球性的重大公共卫生问题,其高发病率是人类健康的严重威胁,资料估计美国有 9210 万成年人至少有一种心血管疾病,到 2030 年 43.9 % 的美国成年人预计患有某种

形式的心血管疾病^[1]。《中国心血管病报告》推算中国心血管病现患人数 2.9 亿^[2],高发病率、致死率对医疗支出和经济产生了重大影响^[3]。随着人口老龄化及城镇化进程的加速,心脑血管病负担持续加重。血栓形成是心脑血管疾病最核心的病理过程,而不管是动脉血栓还是静脉血栓,都富含纤维蛋白^[4]。适配子是

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81073095)

作者简介:李晓东(1983-),硕士研究生,主治医师,主要研究方向:心脑血管病的中西医结合防治, E-mail: 174607744@qq.com

Δ 通讯作者:龙钢,医学博士,硕士研究生导师,副主任医师,副教授,主要研究方向:心脑血管病的中西医结合防治,

E-mail: longyin@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2019-01-27 接受日期:2019-02-23)

体外筛选的具有高度亲和力及特异性的单链寡聚核苷酸分子^[9],通过静电相互作用、氢键、范德华力、碱基堆积或这些的组合与目标分子相互作用,靶标可从小分子到大蛋白^[9],可以进行修饰^[7],也能连接各种荧光基团或不同载体、纳米颗粒,或其他生物分子^[9]。STLEX 技术的发展,在传统适配子的基础上,还可获得针对病毒颗粒和单细胞生物的适配体,核酸适配体还可应用于新型检测系统和抗菌抗病毒药物开发^[9],如艾滋病诊断和治疗^[10]。本实验组前期工作以纤维蛋白作为靶物质,筛选出与纤维蛋白高亲和力、高特异性结合的适配子 G81^[11]。本实验从体外验证适配子 G81 的纤维蛋白靶向性,并通过检测凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)观察适配子 G81 对凝血功能的影响,为下一步通过动物实验进一步验证其靶向性、特异性打下坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

纤维蛋白适配子 G81,昆明小鼠血浆、人血浆,5 %水合氯醛,1M CaCl₂ 溶液,3.2 %枸橼酸钠,PBS 溶液;PT、APTT、TT 试剂盒,均为 SIEMENS 公司产品,批号分别为:562867、557275、47995。Nikon A1R 型激光共聚焦显微镜,SYSMEX CS-5100 全自动血凝分析仪,Beckman Coulter Allegra X-15R 台式冷冻离心机。96 孔板,载玻片、盖玻片。

1.2 体外血栓及分组

参考文献^[12,13],在 96 孔板中加入 100 μ L 血浆,再加入 2 μ L 1M CaCl₂ 溶液,重新启动凝血途径,其凝集物即视为纤维蛋白。小鼠血浆以昆明小鼠深度麻醉后心脏采血,按 9:1 的比例将全血与 3.2 %枸橼酸钠抗凝剂混合均匀后 3000 rpm 离心 25 min 所得。适配子溶于 PBS 中,储存浓度为 100 pmol/ μ L。

分组:实验组:100 μ L 血浆加入 2 μ L 1M CaCl₂ 溶液,静置形成纤维蛋白后转移至 1.5 mL 避光 EP 管中,加入 10 μ L 适配子溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,弃适配子溶液,加入 1 mL PBS 置于摇床上,130rpm 震荡 5 min,洗涤三次。设置 0.25-0.5-1 pmol/10 μ L 浓度梯度组。空白组:100 μ L 血浆加入 2 μ L 1M CaCl₂ 溶液,形成纤维蛋白。将各组纤维蛋白置于载玻片上,盖玻片小心压平,激光共聚焦显微镜下观察,以固定的参数(HV 167,Offset 0, Laser 44.5)扫描成像。

人源性纤维蛋白靶向性实验参照鼠源纤维蛋白方法进行。

1.3 ImageJ 图片分析

参考文献^[14,15],将结合不同浓度适配子的纤维蛋白共聚焦图片,用 ImageJ 图片分析软件进行相对荧光强度分析,并进行统计学分析。

1.4 抗凝血活性测定

按 9:1 的比例将人静脉全血与 3.2 %枸橼酸钠混合均匀,3000 rpm 离心 25 min,取 10 份离心后血浆上清混匀备用。

分组:实验组:将 G81 适配子用 PBS 稀释成 20 pmol/ μ L,取 20 μ L 加入 980 μ L 的血浆中,混匀后取 500 μ L 测定 PT、APTT、TT。剩下的 500 μ L 再加入 500 μ L 血浆,混匀后取 500 μ L 测量。以倍比稀释法将血浆中 G81 适配子浓度不断稀释,最终为 400 pmol/mL、200 pmol/mL、100 pmol/mL、50 pmol/mL。对照组:将 20 μ L PBS 加入 980 μ L 的血浆中,其余操作同实验组。

SYSMEX CS-5100 全自动血凝分析仪测定 PT、APTT、TT 数值。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 版本软件分析统计数据,正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,适配子不同浓度组纤维蛋白相对荧光强度分析采用单因素方差分析,相同浓度的适配子、PBS 组间各指标差异的比较均采用独立样本 t 检验,适配子不同浓度组血浆抗凝活性各指标差异的比较采用单因素方差分析;方差分析中两两比较采用 Bonferroni 方法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 适配子的合成及标记

适配子 3 端连接 CY5.5 荧光基团,由生工生物工程公司(上海)股份有限公司合成。如图 1 所示,合成的 G81 适配子为单峰,纯度较高,分子量约 20392.3 Da。

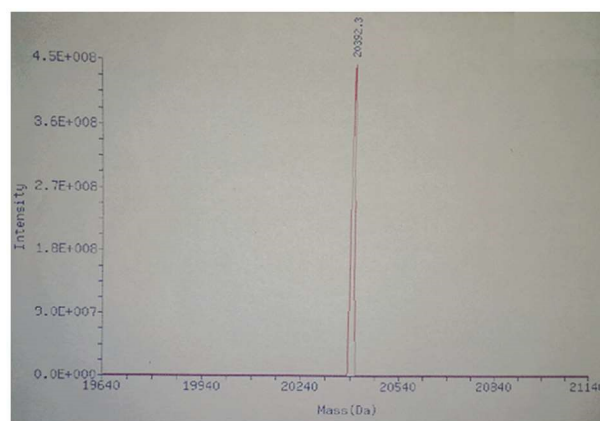


图 1 Cy5.5 标记的 G81 适配子质谱图

Fig.1 Mass spectrum of G81 aptamer labeled with Cy5.5

2.2 适配子具有纤维蛋白靶向性

体外鼠源、人源纤维蛋白实验中,不同浓度的适配子 G81 均能与之结合,如图 2、图 3 所示。且随着加入适配子浓度的增加,荧光强度随之增强,荧光强度与适配子浓度存在量效关系。

2.3 相对荧光强度分析

使用 ImageJ 图片分析软件对结合有不同浓度适配子 G81 的鼠源纤维蛋白成像图片进行相对荧光强度分析,并进行统计学分析。分别将鼠源、人源纤维蛋白相对荧光强度组间比较,均 $P < 0.001$,差异有统计学意义,表明不同浓度组纤维蛋白所结合的 G81 适配子相对荧光强度均具备差异性。将同等浓度的鼠源、人源相对荧光强度两两比较,均 $P > 0.05$,差异无统计学意义,表明适配子结合纤维蛋白能力无种属差异。随着加入适配子浓度的增加,纤维蛋白相对荧光强度随之增强,相对荧光强度与适配子浓度存在量效关系(图 4),表明纤维蛋白与适配子可特异结合。鼠源、人源纤维蛋白的相对荧光强度变化,表明适配子 G81 具备体外纤维蛋白靶向性。

2.4 适配子对 PT、APTT、TT 的影响

采用倍比稀释的方法检测适配子对凝血功能的影响,结果如表 1、图 5 所示。

PT 值中,各浓度统计分析结果显示,均 $P > 0.05$,实验组和对照组测得的 PT 值差异均无统计学意义;即加入 G81 后血浆

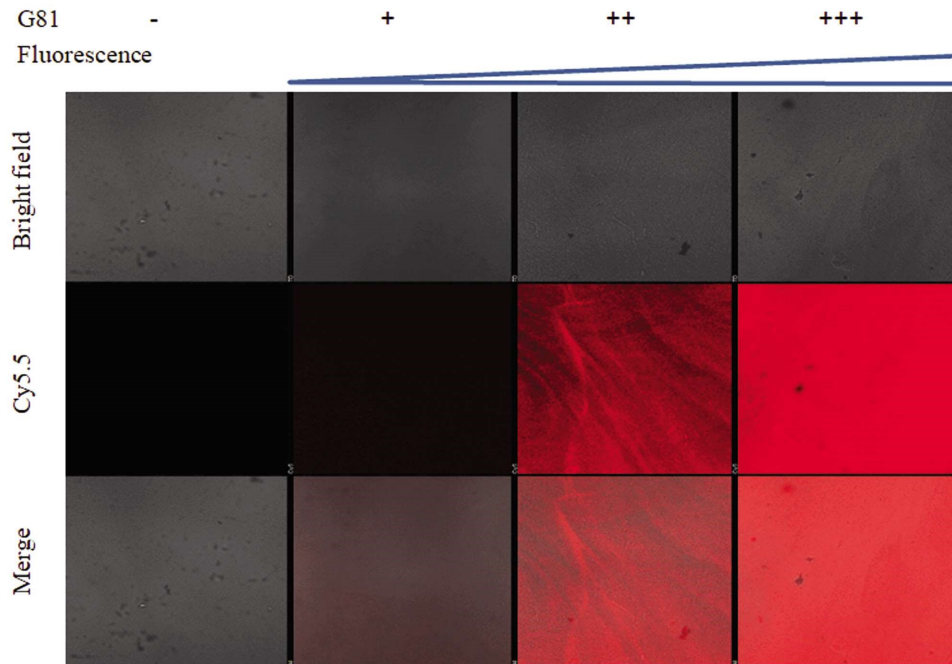


图 2 激光共聚焦显微镜下适配子与鼠源纤维蛋白的结合

Fig.2 Fluorescence imaging of aptamer and mouse fibrin combination under the laser confocal microscopy

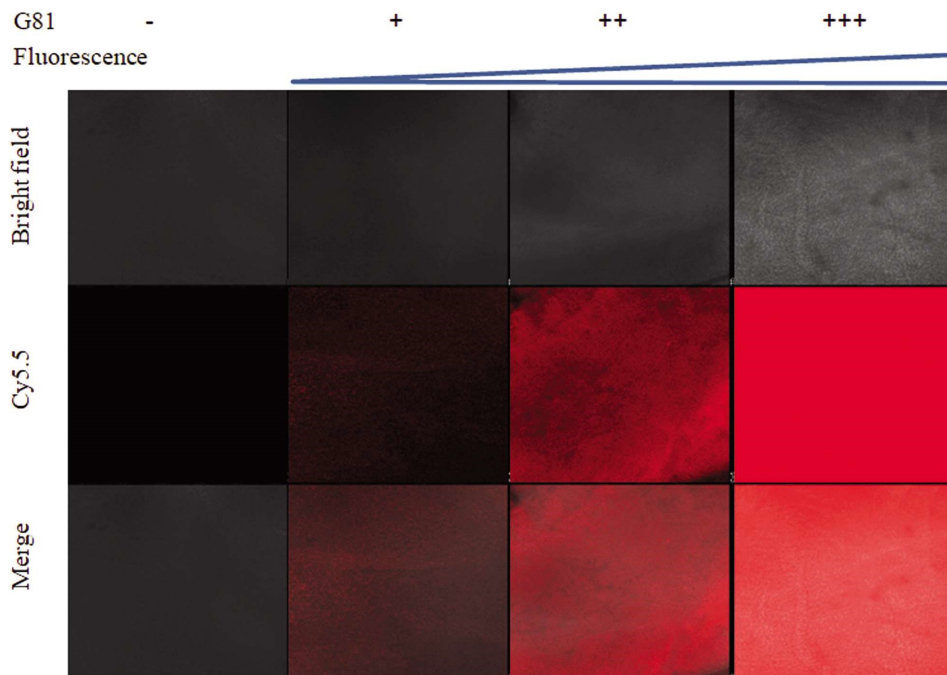


图 3 激光共聚焦显微镜下适配子的荧光成像 - 人源纤维蛋白

Fig.3 Fluorescence imaging of aptamer and human fibrin combination under the laser confocal microscopy

中的 PT 值无显著变化。APTT 值中, 各浓度统计分析结果显示, 均 $P > 0.05$, 实验组和对照组测得的 APTT 值差异均无统计学意义; 即加入 G81 后血浆中的 APTT 值无显著变化。TT 值中, 分析结果显示, 血浆中 G81 浓度为 400 pmol/mL 时, $P = 0.004 < 0.05$, 实验组和对照组测得的 TT 值差异有统计学意义; 浓度为 50 pmol/mL、100 pmol/mL 和 200 pmol/mL 时, 均 $P > 0.05$, 实验组和对照组测得的 TT 值差异无统计学意义; 即当加入 G81 的浓度低于 200 pmol/mL 之间时, 血浆中的 TT 值无显著变化。

适配子不同浓度组血浆抗凝活性各指标差异的方差分析显示 $F_{PT} = 0.77$, $F_{APTT} = 0.014$, $F_{TT} = 0.865$, 均 $P > 0.05$, 各指标

差异无统计学意义。将不同浓度适配子组血浆抗凝活性进行两两比较, 均 $P > 0.05$, 差异无统计学意义, 表明不同浓度适配子组内 PT、APTT、TT 测量值无明显变化。

综上所述, 血浆中适配子 G81 的浓度低于 200 pmol/mL 时, 对外源性凝血系统、内源性凝血系统、凝血酶时间均无明显影响。

3 讨论

血栓形成是缺血性心脏病、缺血性脑卒中和静脉血栓栓塞 (VTE) 的常见病理基础^[16]。尽管各种抗血栓药物广泛用于动脉

和静脉血栓的预防和治疗,血栓栓塞性疾病仍然是全世界死亡和残疾的主要原因。如 2010 年,因缺血性心脏病和中风死亡人数占全球死亡人数的四分之一^[17]。血栓栓塞性疾病,临床上因部位、血栓大小等的差异而出现不同的主症,症状多端,缺乏特异性。随着我国社会人口老龄化的进展,相关疾病的发生将更

加频繁,临床上对此类疾病的快速诊断、有效治疗的需求更加强烈。

鉴于血栓栓塞性疾病的严重危害,许多抗血栓形成、溶栓的药物被开发出来并在临床应用中不断加以改进,这些药物针对的大部分是凝血因子以及激活血小板的蛋白质和受体。虽然此类相关药物在临床上预防和治疗血栓方面效果不错,但存在不同程度的意外出血、血小板减少等副作用,可引起其它并发症,严重的会导致死亡。而不管是动脉血栓还是静脉血栓,纤维蛋白都是其中的主要成分。适配子是体外筛选的单链寡核苷酸分子,靶分子范围广泛,具备高特异性与亲和性,易合成,易修饰^[18]。SELEX 技术的发展,使得多种适配子被开发出来^[19-21]。其研究应用前景广阔,如 2004 年第 1 个适配子药物 Macugen 被美国 FDA 批准用于治疗老年性黄斑变性(AMD)^[22]。适配子可通过识别特定的结合位点来抑制或控制目标的活性,利用其高亲和力和特异性,药物可以靶向于所特定的细胞或组织,从而提高其局部浓度和疗效^[23]。特定适配子的结合能力可以通过添加具有互补序列的寡核苷酸来限制或消除^[24,25],也可将两种

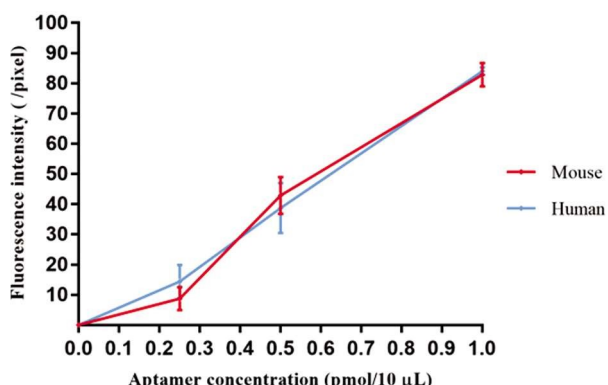


图 4 纤维蛋白共聚焦相对荧光强度分析

Fig.4 Analysis of fibrin confocal fluorescence intensity

表 1 浓度梯度的 G81 溶液对 PT、APTT、TT 的影响

Table 1 Effects of aptamer on PT, APTT and TT

Concentration(pmol/mL)	Groups	PT(s)	APTT(s)	TT(s)
0	G81	10.68± 0.33	28.26± 3.63	18.50± 0.28
	PBS	10.58± 0.11	27.82± 2.84	18.44± 0.22
50	G81	10.70± 0.35	27.78± 3.16	18.54± 0.27
	PBS	10.62± 0.13	27.54± 3.21	18.54± 0.24
100	G81	10.84± 0.38	28.90± 3.92	18.66± 0.25
	PBS	10.62± 0.15	27.92± 2.71	18.42± 0.29
200	G81	10.62± 0.31	29.08± 3.93	18.84± 0.22
	PBS	10.68± 0.16	27.82± 3.19	18.66± 0.26
400	G81	10.40± 0.41	28.82± 4.61	19.56± 0.36*
	PBS	10.72± 0.15	27.62± 3.16	18.66± 0.36*

Note: * $P < 0.05$.

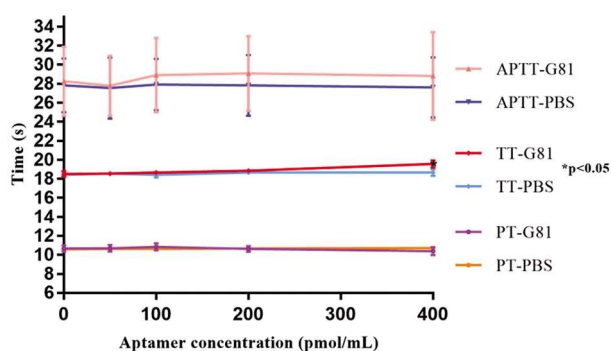


图 5 适配子抗凝血活性测定结果

Fig.5 Determination of the anticoagulant activity of aptamer

适配子连接到一起以增强其功能^[26];适配子可在序列上连接各种荧光基团或不同载体用于相关疾病的诊断和治疗^[8]。有鉴于此,促使研究者不断尝试立足于适配子靶向血栓形成各个阶段及产物来开发新的药物,如靶向血小板^[27]、凝血酶^[28,29]、凝血因子^[30]等。凝血途径的最后阶段,是溶于血浆中的纤维蛋白原被

凝血酶酶解为纤维蛋白单体,进而交联形成不溶的、稳定的纤维蛋白凝块,将血细胞网罗在内,形成血凝块。从目前的适配子研究中,未见从纤维蛋白适配子的角度开发相关抗凝、溶栓类的药物。本实验组前期在中药归经理论的启发下,通过 SELEX 技术筛选出具备纤维蛋白高亲和力、高特异性的适配子 G81^[11]。近红外荧光光学成像灵敏度高、无电离辐射,其成像技术的发展,提供便捷、直观、安全地观察 G81 适配子与纤维蛋白的结合情况的方法。Cy5.5 荧光染料,激发光波长 675 nm,发射光波长 694 nm,可穿透软组织,用于组织或细胞的激光共聚焦成像及小动物活体成像。参考文献^[31-33],我们委托生工生物工程公司在适配子序列 3 端连接 Cy5.5 荧光基团,将适配子稀释成不同浓度在体外与纤维蛋白孵育,充分洗涤后通过激光共聚焦显微镜观察荧光成像情况。在预实验中,我们摸索出适配子溶液为 10 μ L 时,纤维蛋白形成后转移到 EP 管中可与适配子溶液充分接触,且放置于摇床上能震荡起进一步结合的作用。为了客观比较成像的强弱,我们通过不断尝试,以固定的参数(HV 167,

Offset 0, Laser 44.5)扫描成像,每次均提取相同的成像标准,观察到随着加入适配子量的增加纤维蛋白之荧光强度逐渐增强,使用 ImageJ 图片分析软件对结合有不同浓度适配子 G81 的纤维蛋白成像图片进行相对荧光强度分析,并进行统计学分析,差异有统计学意义,说明不同浓度组纤维蛋白所结合的 G81 适配子相对荧光强度均具备差异性。将同等浓度的人源、鼠源相对荧光强度两两比较,均 $P > 0.05$,差异无统计学意义,表明适配子结合纤维蛋白能力无种属差异。随着加入适配子浓度的增加,相对荧光强度随之增强,表明适配子能与纤维蛋白结合,且存在量效关系。

针对凝血途径设计的适配子,可能会影响到凝血功能,如已经进入临床实验的凝血酶抑制剂核酸适配子 ARC-183,体外抗凝血酶活性的分析表明,输注适配子后,以浓度依赖的方式延长 PT、APTT^[34]。适配子 Nu172 亦呈现类似结果,静脉注射后 PT、APTT 呈剂量依赖性增加^[35]。在适配子 G81 开展体内实验前,本实验拟通过在血浆中加入梯度浓度的 G81 并检测分析 PT、APTT、TT 来评估其对凝血功能的影响,避免后续在适配子上偶联抗凝、溶栓蛋白后产生的应用效能评价问题,同时也为后续体内实验提供应用剂量参照。文献^[34-36]提示适配子静脉给药后以浓度依赖的方式延长相关抗凝指标,本实验通过倍比稀释的方式设置 50-100-200-400 pmol/mL 浓度梯度,以 SYS-MEX CS-5100 全自动凝血分析仪测定 PT、APTT、TT,通过统计学分析血浆中不同浓度适配子对 PT、APTT、TT 的影响,以此评价适配子对凝血功能的影响。从数据分析来看,当加入的适配子剂量低于 200 pmol/mL 时对外源性凝血系统、内源性凝血系统、凝血酶时间均无明显影响。当剂量达到 400 pmol/mL 时可能对凝血酶时间存在统计学差异的影响。

本研究立足于适配子,着重从体外纤维蛋白结合性方面证实前期所合成的适配子 G81 具备高亲和力的纤维蛋白靶向性,且未对凝血功能造成明显影响。本实验的局限在于是从体外以全自动凝血分析仪的角度测定并分析血浆中不同浓度适配子 G81 对 PT、APTT、TT 的影响,与文献中静脉注射的给药途径上有所不同,尚需经体内实验继续验证。由于纤维蛋白适配子未见其它文献报道,其功能如何证实及应用、剂量如何选择,均需参考其它文献慢慢探索。不可否认的是,本实验为下步偶联抗凝溶栓药物^[37]的动物实验提供有力的剂量应用参考,为进一步实现对血栓的精准靶向治疗,开发安全、高效抗凝溶栓药物打下坚实基础,也为将来可能的临床应用奠定了良好基础。

参考文献(References)

- [1] Benjamin E J, Virani S S, Callaway C W, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2018, 137(12): 67-492
- [2] 马丽媛,吴亚哲,王文,等.《中国心血管病报告 2017》要点解读[J]. *中国心血管杂志*, 2018, 23(1): 3-6
- [3] Liu L, Wang D, Wong K S L, et al. Stroke and Stroke Care in China: Huge Burden, Significant Workload, and a National Priority [J]. *Stroke*, 2011, 42(12): 3651-3654
- [4] Litvinov R, Weisel J. What Is the Biological and Clinical Relevance of Fibrin? [J]. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2016, 42(04): 333-343
- [5] Ma H, Liu J, Ali M M, et al. Nucleic acid aptamers in cancer research, diagnosis and therapy [J]. *Chemical Society reviews*, 2015, 44(5): 1240-1256
- [6] Rozenblum G T, Lopez V G, Vitullo A D, et al. Aptamers: current challenges and future prospects[J]. *Expert opinion on drug discovery*, 2016, 11(2): 127
- [7] Ni S, Yao H, Wang L, et al. Chemical Modifications of Nucleic Acid Aptamers for Therapeutic Purposes [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(8): 1683
- [8] Musumeci D, Platella C, Riccardi C, et al. Fluorescence Sensing Using DNA Aptamers in Cancer Research and Clinical Diagnostics[J]. *Cancers*, 2017, 9(12): 174-217
- [9] Davydova A, Vorobjeva M, Pyshnyi D, et al. Aptamers against pathogenic microorganisms [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2016, 42(6): 847-865
- [10] Bala J, Chinnapaiyan S, Dutta R K, et al. Aptamers in HIV research diagnosis and therapy[J]. *RNA Biology*, 2018, 15(3): 327-337
- [11] 李保玉,刘家云,屈园利,等. SELEX 技术筛选纤维蛋白适配子的研究[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(11): 2037-2041
- [12] Buys A V, Pretorius E. Comparing different preparation methods to study human fibrin fibers and platelets using TEM[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2012, 75(6): 801-806
- [13] Stief T W. The Recalcified Coagulation Activity[J]. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 2007, 14(4): 447-453
- [14] Ramanathan S P, Helenius J, Stewart M P, et al. Cdk1-dependent mitotic enrichment of cortical myosin II promotes cell rounding against confinement[J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(2): 148-159
- [15] 邢晨,孙岩,王文龙,等. 检测前列腺癌细胞 PC3 溶酶体膜通透性模型的构建[J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(6): 1497-1500
- [16] Raskob G E, Anchaisuksiri P, Blanco A N, et al. Thrombosis A Major Contributor to Global Disease Burden[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2014, 34(11): 2363-2371
- [17] Lozano R P, Naghavi M P, Foreman K M, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2095-2128
- [18] Zhu G, Ye M, Donovan M J, et al. Nucleic acid aptamers: an emerging frontier in cancer therapy[J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(85): 10472-10480
- [19] Kim M, Kim D, Kim K, et al. Applications of Cancer Cell-Specific Aptamers in Targeted Delivery of Anticancer Therapeutic Agents[J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 830-850
- [20] Li F, Wang Q, Zhang H, et al. Characterization of a DNA Aptamer for Ovarian Cancer Clinical Tissue Recognition and in Vivo Imaging [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 6(51): 2564-2574
- [21] Liu M, Wang Z, Tan T, et al. An Aptamer-Based Probe for Molecular Subtyping of Breast Cancer[J]. *Theranostics*, 2018, 8(20): 5772-5783
- [22] WM E, PA A. Anti-VEGF Aptamer (Pegaptanib) Therapy for Ocular Vascular Diseases[J]. *New York Academy of Sciences*, 2006, (1082): 151-171
- [23] Zhou J, Rossi J J. Cell-type-specific, Aptamer-functionalized Agents

- for Targeted Disease Therapy[J]. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2014, (3): 169-186
- [24] Stoll H, Steinle H, Wilhelm N, et al. Rapid Complexation of Aptamers by Their Specific Antidotes [J]. *Molecules*, 2017, 22 (6): 954-967
- [25] Stoll H, Steinle H, Wilhelm N, et al. Rapid Complexation of Aptamers by Their Specific Antidotes[J]. *Molecules*, 2017, 22(6): 954
- [26] Soule E E, Bompiani K M, Woodruff R S, et al. Targeting Two Coagulation Cascade Proteases with a Bivalent Aptamer Yields a Potent and Antidote-Controllable Anticoagulant[J]. *Nucleic Acid Therapeutics*, 2016, 26(1): 1-9
- [27] Bae O. Targeting von Willebrand factor as a novel anti-platelet therapy; Application of ARC1779, an Anti-vWF aptamer, against thrombotic risk [J]. *Archives of Pharmacol Research*, 2012, 35 (10): 1693-1699
- [28] Troisi R, Napolitano V, Spiridonova V, et al. Several structural motifs cooperate in determining the highly effective anti-thrombin activity of NU172 aptamer [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46 (22): 12177-12185
- [29] Zavyalova E, Samoylenkova N, Revishchin A, et al. The Evaluation of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Anti-thrombin DNA Aptamer RA-36[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8: 922-934
- [30] Donkor D A, Bhakta V, Eltringham-Smith L J, et al. Selection and characterization of a DNA aptamer inhibiting coagulation factor XIa [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 2102-2115
- [31] Meng Q, Liu Z, Li F, et al. An HDAC-Targeted Imaging Probe LBH589-Cy5.5 for Tumor Detection and Therapy Evaluation [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2015, 12(7): 2469-2476
- [32] Liu N, Yao Y. Analysis of in situ and ex vivo α V β 3 integrin expression during experimental carotid atherogenesis[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, 7: 641-649
- [33] Kitagawa T, Kosuge H, Uchida M, et al. RGD-Conjugated Human Ferritin Nanoparticles for Imaging Vascular Inflammation and Angiogenesis in Experimental Carotid and Aortic Disease [J]. *Molecular Imaging and Biology*, 2012, 14(3): 315-324
- [34] Nimjee S M, Sullenger C P R, Harrington R A, et al. The potential of aptamers as anticoagulants [J]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2005, 15(1): 41-45
- [35] Becker R C, Povsic T, Cohen M G, et al. Nucleic acid aptamers as antithrombotic agents: Opportunities in extracellular therapeutics [J]. *Thrombosis and haemostasis*, 2010, 103(3): 586-595
- [36] Woodruff R S, Xu Y, Layzer J, et al. Inhibiting the intrinsic pathway of coagulation with a factor XII-targeting RNA aptamer[J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2013, 11(7): 1364-1373
- [37] 屈国利, 刘家云, 何林全, 等. 水蛭素融合蛋白的表达及其与靶向适配子的偶联[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 11(15): 3610-3614

(上接第 2251 页)

- [13] Korolev YN, Bobrovnikskii IP, Geniatulina MS, et al. The ultrastructure of Sertoli cells and spermatogonia in the rats exposed to radiation under conditions of therapeutic and prophylactic application of low-intensity electromagnetic emission [J]. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult*, 2018, 95(1): 35-40
- [14] Korolev YN, Mihajlik LV, Nikulina LA, et al. The specific features of the development of metabolic and regenerative processes under the action of low-intensity electromagnetic radiation in radiation exposure conditions (an experimental study)[J]. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult*, 2017, 94(4): 54-58
- [15] Somashekar ST, Sammour I, Huang J, et al. Intra-Amniotic Soluble Endoglin Impairs Lung Development in Neonatal Rats [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 57(4): 468-476
- [16] Pelizzo G, Calcaterra V, Lombardi C, et al. Fetal Cardiac Impairment in Nitrofen-Induced Congenital Diaphragmatic Hernia: Postmortem Microcomputed Tomography Imaging Study [J]. *Fetal Pediatr Pathol*, 2017, 36(4): 282-293
- [17] Ginsberg Y, Khatib N, Weiss B, et al. Magnesium sulfate (MG) prevents maternal inflammation induced offspring cerebral injury evident on MRI but not via IL-1 β [J]. *Neuroscience*, 2017, 14(353): 98-105
- [18] Gibbs RB, Nelson D, Hammond R. Role of GPR30 in mediating estradiol effects on acetylcholine release in the hippocampus[J]. *Horm Behav*, 2014, 66(2): 339-345
- [19] Janickova H, Prado VF, Prado MAM, et al. Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) over-expression induces major modifications of striatal cholinergic interneuron morphology and function [J]. *J Neurochem*, 2017[Epub ahead of print]
- [20] 翟丽静, 王婧, 秦卓, 等. 电针三阴交对 AD 小鼠学习记忆能力及海马区 Ach、AchE、ChAT 的影响 [J]. *长春中医药大学学报*, 2017, 33(2): 181-184