

· 专论 ·

基于滚环扩增反应的智能 DNA 水凝胶构建 及其生物医用进展

张 睿¹ 沈星宏¹ 姚 池^{2*} 仰大勇^{1,2*}

(¹复旦大学化学系 聚合物分子工程全国重点实验室 上海 200438)

(²天津大学 合成生物技术全国重点实验室 合成生物学前沿科学中心 系统生物工程教育部重点实验室
合成生物与生物制造学院 天津 300350)

摘要: DNA 水凝胶具有序列可编程性、分子识别能力、刺激响应性、生物相容性和生物降解性等独特性质,广泛应用于材料科学与生物医用领域。滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)反应是一种简单高效的等温酶促扩增策略,可合成具有大量重复功能单元的超长 DNA 单链。基于 RCA 技术,研究人员构建了一系列智能 DNA 水凝胶材料,具有广阔的生物医学应用前景。本文综述了通过 RCA 反应制备具有多功能的智能 DNA 水凝胶的方法,含多聚适配体的 DNA 水凝胶和生物颗粒的特异性识别与分离,及其后续在疾病诊疗领域的应用研究。

关键词: DNA 水凝胶; 滚环扩增反应; 多聚适配体; 生物颗粒识别; 肿瘤诊疗

Rolling Circle Amplification Based Smart DNA Hydrogels: From Fabrication to Biomedical Applications

ZHANG Rui¹, SHEN Xing-hong¹, YAO Chi^{2*}, YANG Da-yong^{1,2*}

(¹Department of Chemistry, State Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers,
Fudan University, Shanghai 200438)

(²State Key Laboratory of Synthetic Biology, Frontiers Science Center for Synthetic Biology,
Key Laboratory of Systems Bioengineering (MOE), School of Synthetic Biology and
Biomufacturing, Tianjin University, Tianjin 300350)

Abstract: DNA hydrogels exhibit unique properties such as sequence programmability, molecular recognition capability, stimuli-responsiveness, biocompatibility, and biodegradability, which have enabled their extensive applications in materials science and biomedical fields. Rolling circle amplification (RCA), a simple and efficient isothermal enzymatic amplification strategy, can synthesize ultra-long single-stranded DNA with numerous repeated functional units. Leveraging RCA technology, researchers have developed a series of smart DNA hydrogel materials with promising potential for biomedical applications. This review summarizes the methodologies for fabricating multifunctional DNA hydrogels *via* RCA reaction, discusses the interactions between polyvalent aptamer-incorporated DNA hydrogels and biological particles upon specific recognition, and highlights their applications in the field of disease therapy and diagnosis.

Keywords: DNA hydrogel; Rolling circle amplification; Polyvalent aptamer; Biological particles recognition; Cancer therapy and diagnosis

高分子水凝胶专题; 2025-09-12 收稿, 2025-10-19 录用, 2025-12-10 网络出版

基金项目: 国家自然科学基金(基金号 22225505, 22322407, 22535002), 中国博士后科学基金(基金号 2025M771099, GZC20250744)

* 通信联系人: 姚池, E-mail: chi.yao@tju.edu.cn; 仰大勇, E-mail: dayongyang@fudan.edu.cn

doi: 10.14028/j.cnki.1003-3726.2025.25.273

引用:张睿,沈星宏,姚池,仰大勇. 基于滚环扩增反应的智能DNA水凝胶构建及其生物医用进展. 高分子通报, 2026, 39(1), 20–38.

Citation: Zhang, R.; Shen, X. H.; Yao, C.; Yang, D. Y. Rolling circle amplification based smart DNA hydrogels: from fabrication to biomedical applications. *Polym. Bull.* (in Chinese), 2026, 39(1), 20–38.

水凝胶材料是由聚合物链通过物理或化学交联构成的三维网络结构,具有高含水特性,常被设计用于模拟细胞外基质等生物组织^[1]。由于水凝胶材料物理与化学性质的可调控性,水凝胶已被广泛应用于生物医学领域,如细胞与组织工程、生物传感^[2,3]及疾病治疗等。脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)是生命主要的遗传物质,其基本结构单元是脱氧核糖核苷酸,每个核苷酸由3部分组成:1个含氮碱基(腺嘌呤A、胸腺嘧啶T、胞嘧啶C、鸟嘌呤G)、1个脱氧核糖(五碳糖)和1个磷酸基团。DNA的独特性源于其2个核心特征:首先,是严格的碱基互补配对原则(A与T配对,C与G配对),这为通过分子识别进行精确的自组装提供了基础;其次,是序列的可编程性,通过A、T、C、G 4种碱基的有序排列,实现预先设定DNA链分子结构的精准可控与生物功能的精确可调。其精准的碱基互补配对原则极大地拓展了DNA在纳米技术及序列可编程材料设计中的应用^[4]。从高分子科学的视角看,DNA本质上是一种天然存在的线性聚阴离子生物高分子。作为材料构建单元,DNA相较于其他聚合物具备诸多独特优势,如序列可编程性、高特异性的分子识别能力、纳米级结构可控性、单个核苷酸可化学修饰、天然的生物相容性与生物可降解性等,并且DNA能够通过包括酶在内的多种分子工具进行操纵。这些优势使得DNA可作为一种多功能可编程支架,与其他合成或生物聚合物构成的水凝胶系统类似,DNA水凝胶除具备高含水率、可调节力学强度和形态可塑性外,还融合了DNA特有的化学结构与生物功能。

面向生命健康的重大需求,研究精准可控且生物活性可调的生物材料,成为生物医用材料发展的关键所在,亦是国际前沿领域的重要方向。智能DNA水凝胶作为新一代生物材料,具有优异的序列可编程性、精准的分子识别能力和可调控的刺激响应特性,在生物医学领域展现出巨大潜力。传统化学交联方法往往难以实现对材料结构和功能的精准调控,而滚环扩增(rolling circle

amplification, RCA)技术的引入为DNA水凝胶的可控制备提供了革命性策略。RCA作为一种简单而高效的等温酶促扩增方法,能够合成具有重复单元的超长DNA链,为构建结构规整、功能集成的智能水凝胶奠定了材料基础。基于RCA反应制备DNA水凝胶的核心优势在于其高效性、可编程性及温和的反应条件。通过设计环形模板的序列,可精确控制产物的功能域分布,进而通过物理缠结、碱基互补配对或与非DNA材料(如纳米粒子、聚合物)杂化交联,形成具有多维功能的智能水凝胶网络。这些策略不仅实现了水凝胶力学性能和微观结构的灵活调控,还为其赋予了靶向识别、环境响应和信号转换等能力,极大拓展了其在复杂生物环境中的应用适应性。

近年来,基于RCA反应构建的智能DNA水凝胶在生物医学领域取得了系列重要进展,包括用于高灵敏度生物标志物检测、可控药物递送、细胞三维培养、组织工程构建以及智能诊疗系统集成等。其良好的生物相容性和可降解性进一步提升了临床转化潜力。本综述将系统总结基于RCA反应构建智能DNA水凝胶的方法及其在生物医学领域的最新研究成果,深入探讨材料设计原理与生物功能实现的构效关系,并展望其在精准医学等方向的未来发展趋势与挑战。

1 基于RCA反应的DNA水凝胶制备

随着对DNA的深入理解以及DNA纳米技术^[5]的迅猛发展,目前,已有多种技术手段用于合成DNA水凝胶,包括枝状DNA自组装与酶催化交联^[6]、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)^[7]、杂交链式反应(hybridization chain reaction, HCR)^[8]以及滚环扩增反应^[9]等。这些方法都可以合成DNA链,例如,枝状DNA之间通过黏性末端的碱基互补与DNA连接酶酶联后形成DNA长链,多为短链通过定点杂交形成的刚性、静态网络;PCR用于扩增特定双链DNA片段,需要温度循环(变性—退火—延伸),不适合生

物应用；HCR产物的长度增长是线性且有限的，其长度受引发链和发夹浓度的严格控制，并且增长动力学较慢，最终形成长度在几百到几千碱基对的双链DNA。

滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)是一种利用环状DNA模板和Phi29 DNA聚合酶合成超长DNA单链的方法^[10]。Phi29 DNA聚合酶结合到环状模板的引物上后，会沿着环状模板进行复制。当它复制完一圈回到起点时，由于Phi29 DNA聚合酶的链置换特性，反应不会停止，而是将已复制完成的链置换下来，同时继续沿着模板进行新一轮的复制。这个过程可以无限循环下去，从而产生一条由成千上万个模板互补序列串联而成的、长度均一的超长单链DNA。其长度理论上只受反应时间和底物浓度的限制，可达数万甚至数十万个碱基。由于RCA反应在温和条件下，如可以在生理环境(如细胞表面^[11]和活细胞内^[12])中高效、稳定地实施，这为生物医学应用开辟了广阔前景。DNA的功能本质上由其序列决定，通过对环状模板的设计，可实现对RCA产物的序列精确调控、预测与定制。这些由RCA产生的超长DNA链可被进一步操控，用于构建多种DNA水凝胶。基于RCA反应的宏观DNA水凝胶构建策略，主要包括多级RCA反应，双RCA反应以及结合其他材料的杂化RCA反应。

1.1 多级RCA反应

Luo等^[13]于2012年首次报道了一种基于多级滚环扩增反应(multiple circle amplification, MCA)构建DNA水凝胶的策略。该过程中使用到一个环状模板(包含引物1)和两条单链引物(引物2与引物3)，其中引物3序列与引物1完全一致。首先，引物1与环状模板结合并在Phi29 DNA聚合酶作用下进行扩增；随后向体系中加入可与初代超长DNA链互补结合的引物2，触发次级扩增反应；类似地，引物3也被引入体系参与反应。通过3条超长DNA链的形成，链间杂交与物理缠结最终共同构建出三维DNA水凝胶网络(图1a)。与以往通过DNA连接酶共价交联DNA链形成化学水凝胶的策略不同，该方法通过DNA聚合酶延伸形成的DNA链间以非共价键方式将其编织成物理水凝胶。与其他共价交联的化学水凝胶相比，该物理DNA水凝胶表现出非凡的超力学性能：离水时呈液体行为，而

在水中仍保持类固体特性，更重要的是，在添加水后，即使经过完全变形，该水凝胶也能恢复原始形状(图1b)。从物理学角度，作者将这种液-固双态特性归因于DNA水凝胶的超低弹性模量。当水凝胶曝露于空气中时，表面张力和重力会使凝胶变形，而弹性变形导致的应变能会造成能量损耗。对于大多数固体材料而言，由于弹性模量 E 值较大(kPa~GPa)，应变能损耗过高，表面张力和重力引起的变形可忽略不计。然而，这种DNA水凝胶具有极软的特性($E \approx 10$ Pa)，其表面能和重力能完全超过应变能。因此，在空气中凝胶形态主要受表面张力与重力支配，呈现类液体行为。而当凝胶浸入水中时，表面张力基本消失，浮力与重力相互抵消，水凝胶即表现出类固体特性并保持其原始形态。

MCA反应实现了DNA链的层次化可控扩增。该策略可在单一反应体系中依次触发多个RCA过程，生成具有分支结构或序列模块化的超长DNA链。这些链通过碱基互补配对、物理缠结及动态交联作用，自发组装成具有精细拓扑结构和可编程功能位点的DNA水凝胶。MCA不仅显著提高了水凝胶的合成效率与结构稳定性，还通过序列设计实现了孔径分布、力学性能及生物功能的精准调控，为构建高性能智能DNA水凝胶提供了强有力的技术平台。

1.2 双RCA反应

在MCA反应合成DNA水凝胶的基础上，Yao等^[14]进一步提出了双滚环扩增(double rolling circle amplification, double-RCA)策略合成物理交联的DNA水凝胶(图2a)。通过同时使用2种序列不同的环状DNA模板，并在环状DNA模板中设计部分互补的序列，在等温条件下分别进行扩增，产生含有互补序列的超长DNA链。将两条DNA长单链溶液混合后，DNA链间可通过碱基互补配对与物理缠结在短时间内自组装形成具有三维网络结构的DNA水凝胶(图2b)。这种通过双RCA形成的物理交联DNA水凝胶不仅可提高水凝胶形成的效率与可控性，还可通过序列设计精准调控网络交联密度(互补序列长度)与功能位点分布，为后续构建具有高生物相容性和功能可编程性的DNA水凝胶提供了高效策略。

1.3 杂化RCA反应

通过MCA与双RCA反应生成的DNA水凝

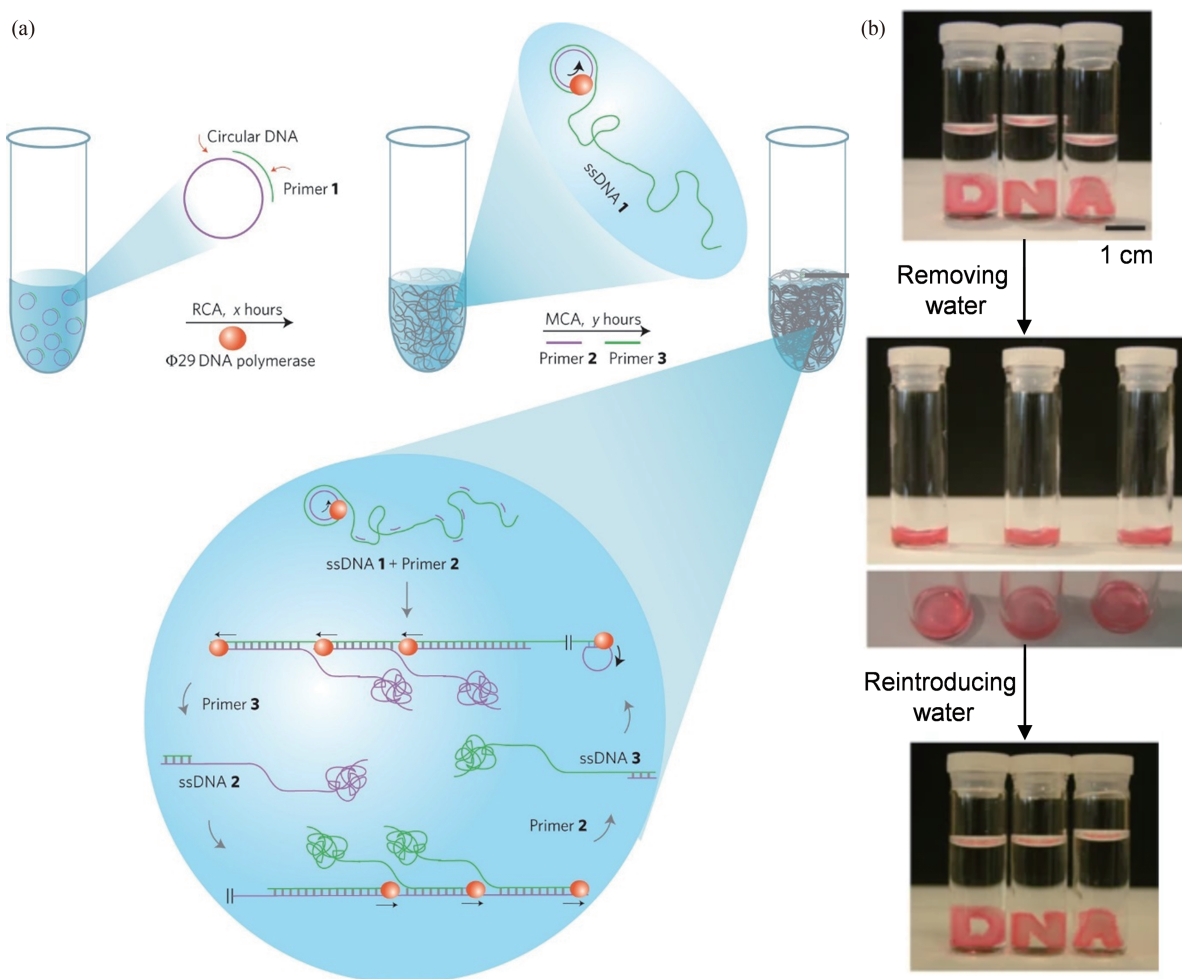


图 1 (a) MCA 反应过程示意图; (b) 基于 MCA 的 DNA 水凝胶的类液体与类固体特性^[13] (2012 Springer Nature 版权许可)
Figure 1 (a) Schematic illustration of MCA process; (b) Liquid- and solid-like properties of MCA-based DNA hydrogel (Reprinted with permission from Ref. [13]; Copyright (2012) Springer Nature)

胶仅有 DNA 分子这一单一的功能成分, 极大地限制了其应用范围。杂化滚环扩增 (hybrid rolling circle amplification, hybrid RCA) 通过将 RCA 产生的超长 DNA 链与其他功能材料 (如无机纳米粒子、有机聚合物或蛋白质) 进行协同组装, 构建出具有多维功能的杂化 DNA 水凝胶。该策略利用 DNA 的序列功能多样性, 将功能单元通过碱基互补配对、静电作用或共价偶联等方式定向整合至水凝胶网络中。杂化 RCA 不仅保留了 DNA 水凝胶的高生物相容性与可编程性, 还引入了光、电、磁等外源特性, 显著拓展了其在生物传感、靶向递送和智能诊疗等领域的应用潜力。

Tang 等^[15] 合成了一种超软超弹的磁性杂化 DNA 水凝胶作为可磁导航的 DNA 软体机器人。该 DNA 水凝胶合成策略基于 MCA 反应, 初级 RCA 的环状 DNA 模板由线性 DNA 模板与引物 1

形成, 在 Phi29 DNA 聚合酶催化下形成 DNA 长链并作为二级 RCA 反应模板。二级 RCA 引物为磁性纳米颗粒 (MNPs) 修饰的单链 DNA, 继续进行扩增, 最终形成包含有磁性纳米颗粒的杂化 DNA 水凝胶 (图 3a)。其中通过 MNPs 与 DNA 杂交作为稳定交联点, 而 DNA 链的物理缠结则在水凝胶网络中形成动态交联, 此类交联点可随超长 ssDNA 的链滑动而发生位置变化。这种磁性 DNA 水凝胶的弹性模量低于 1 Pa, 表现出超软特性; 且可被拉伸 13 倍, 表现出超弹特性。MNPs 的引入赋予了 DNA 水凝胶磁导航的特性, 并且其具有超软超弹的特性, 在远程磁控条件下, 该水凝胶可充当 DNA 机器人, 实现在受限与非结构化环境中的运动, 并凭借其三维多孔结构和优异生物相容性实现活细胞的负载与递送, 有望用于可植入医疗设备和微创手术等重要生物医学相关领域。

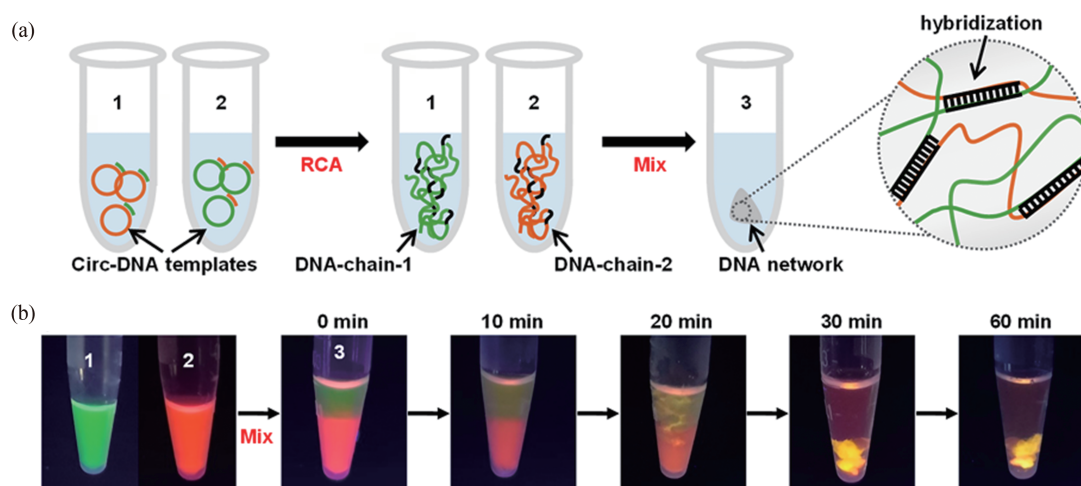


图2 (a)双 RCA 反应合成超长 DNA 链并形成 DNA 水凝胶的流程示意图;(b) DNA 网络形成过程中分子扩散与相转化行为的 DNA 链混合体系照片,其中 DNA 链-1 和 DNA 链-2 分别经 SYBR Green II 与 Gel Red 荧光染料标记^[14] (2020 American Chemical Society 版权许可)

Figure 2 (a) Schematic illustration of the formation of DNA hydrogel *via* the crosslinking of DNA chains generated by double-RCA; (b) Photos of the mixed DNA chain system for observing molecular diffusion and phase inversion behavior during DNA hydrogel formation. DNA-chain-1 and DNA-chain-2 were stained by SYBR Green II and Gel Red, respectively (Reprinted with permission from Ref. [14]; Copyright (2020) American Chemical Society)

DNA 的序列与其功能密切相关,具有自互补性的 DNA 链可形成发夹结构;富胞嘧啶(C)链在适当 pH 条件下组装成 i-motif 结构;而富含鸟嘌呤(G)序列在 K^+ 或 NH_4^+ 离子存在时可自组装为 G-四链体纳米结构。此外,特定碱基域(如 T-A·T 或 C-G·C)允许形成三链 DNA 结构。金属离子可桥接核苷酸碱基形成 T-Hg²⁺-T 或 C-Ag⁺-C 复合物,不同嵌入剂也能与双链 DNA 结合。这些复合物可协同稳定 DNA 双链或其他核酸纳米结构。通过在 RCA 反应的 DNA 模板中设计这些序列,可实现其他功能单元的引入^[17]。Geng 等^[16]充分利用 DNA 分子的可编程性,设计合成了具有特殊序列的环状 DNA 和单链 DNA 作为酶聚合反应的模板和形成银纳米团簇的支架,成功将 DNA 水凝胶和银纳米团簇(AgNCs)结构融合,制备了一种多功能复合的杂化 DNA 水凝胶(图 3b)。作者在该水凝胶中设计富含 C 的 DNA 序列,对 Ag⁺ 具有高亲和力,形成 C-Ag⁺-C 复合物,从而将 Ag⁺ 富集于特定的 DNA 位点,并在 NaBH₄ 还原作用下形成银纳米簇。AgNCs 在 550 nm 激发光下可发射 630 nm 的强荧光,使 DNA 水凝胶具备荧光功能。由于 AgNCs 的存在,该杂化水凝胶还具备抗菌活性等多种功能,这一杂化 DNA 水凝胶的制备为组织工程、伤口敷料、生物传感等生物医学领域应

用提供了更大的潜力。

Tang 等^[18]发展了一种 RCA 反应产生的 DNA 长链与上转化纳米颗粒(upconversion nanoparticle, UCNP)的新组装策略,将 UCNP 引入到 DNA 水凝胶中。UCNP 富含稀土离子,表面呈正电荷,与 DNA 的磷酸基团之间有很强的静电相互作用和配位作用。利用 DNA 与 UCNP 之间独特的相互作用,可在 1 s 内闪速合成 UCNP 杂化 DNA 水凝胶。闪速成胶的分子机制是由带负电的 DNA 链与带正电的 UCNP 通过静电吸引作用,缩短空间距离;然后, DNA 的磷酸基团与 UCNP 表面的钇离子(Y³⁺)通过配位作用,驱动 DNA 链在 UCNP 表面发生界面组装;最终, DNA 链以 UCNP 为交联点,形成三维 DNA 水凝胶网络(图 4)。其中, DNA 链的长度和 UCNP 的晶体形式是调控水凝胶网络构建的重要因素。在 DNA 分子中设计适配体序列,可以使水凝胶具有精确识别和分离特定细胞的功能。除此之外,利用 UCNP 的反斯托克斯发光过程,将长波长的光转换为短波长的光,有效保护细胞免受近红外辐照造成的热损伤。这种水凝胶合成策略不依赖 DNA 序列,具有很好的通用性和扩展性,有望用于生物涂层和 3D 打印等场景。

虽然 DNA 水凝胶具有生物可降解性,但是其在含核酸酶的培养基中稳定性较差,保存时间

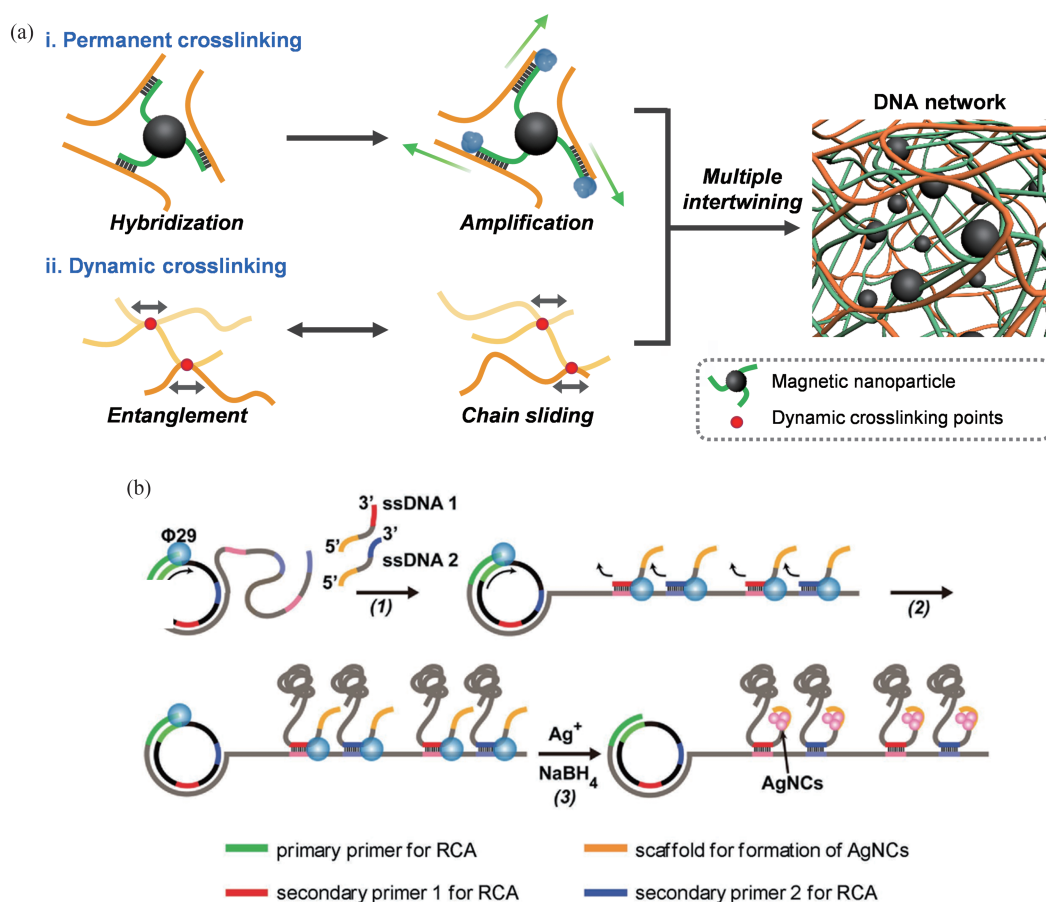


图3 (a)磁性DNA水凝胶合成过程示意图^[15] (2020 Wiley-VCH GmbH 版权许可); (b)银纳米簇/DNA水凝胶合成过程示意图^[16] (2018 Wiley-VCH GmbH 版权许可)

Figure 3 Schematic illustration of (a) the synthesis process of magnetic DNA hydrogel (Reprinted with permission from Ref. [15]; Copyright (2020) Wiley-VCH GmbH) and (b) the synthesis process of silver nanocluster/DNA hydrogel (Reprinted with permission from Ref. [16]; Copyright (2018) Wiley-VCH GmbH)

短,这一难题严重限制了其在长期细胞三维培养中的应用。为此, Tang等^[19]报道了一种具有长保存期限的DNA水凝胶。该体系首先通过RCA反应合成DNA长链,之后引入聚-L-赖氨酸(PLL)作为交联剂与保护剂,PLL与DNA长链之间的静电相互作用驱动DNA/PLL水凝胶形成,同时PLL在DNA表面的包覆增加了DNA与核酸酶之间的空间位阻,从而减弱了核酸酶对磷酸二酯键的消化作用(图5)。因此, DNA/PLL水凝胶在三维细胞培养中的保存期限从通常的1天延长至15天以上。研究还将AS1411适配体集成至DNA/PLL水凝胶中用于特异性锚定肿瘤细胞,含适配体的水凝胶其细胞封装效率相比无适配体组提高了4倍。该DNA/PLL水凝胶为细胞增殖提供了良好的微环境,并在15天内促使细胞形成球体。这一保护性涂层策略解决了DNA水凝胶保存期限方面的

长期难题,有望推动DNA水凝胶在细胞工程领域的应用发展。

2 生物医用领域发展现状

RCA技术凭借其高效的等温核酸扩增特性、精确的序列可编程性及良好的生物相容性,已成为构建功能化DNA水凝胶的重要工具。基于RCA合成的超长DNA链可通过物理缠结、碱基互补配对或杂化交联等方式形成具有三维网络结构的水凝胶,不仅具备高含水率与可调的力学性能,还继承了DNA分子的分子识别与刺激响应能力。近年来,此类DNA水凝胶在生物传感、组织工程和疾病诊疗等生物医学领域展现出显著潜力,推动着精准医疗与智能递送系统的发展。其中,生物材料与生物颗粒之间的相互作用是决定检测效果与治疗效果的关键,因此,开发具有特异性识

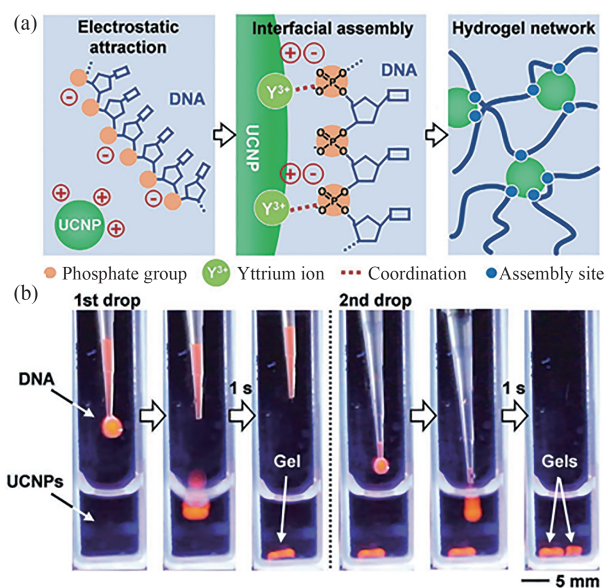


图4 (a) UCNPs 杂化 DNA 水凝胶合成机制示意图; (b) 杂化 DNA 水凝胶快速合成过程照片。DNA 溶液经 GelRed 染色, 并在紫外照射下成像^[18] (2021 Wiley-VCH GmbH 版权许可)

Figure 4 (a) Schematic illustration of synthesis mechanism of UCNPs/DNA hybrid hydrogel; (b) Photos of flash synthesis process of hybrid DNA hydrogel. DNA solution was stained with GelRed, and imaged at UV irradiation (Reprinted with permission from Ref. [18]; Copyright (2021) Wiley-VCH GmbH)

别功能并具有促进细胞功能的智能 DNA 水凝胶, 是生物医学应用发展的需求。

2.1 生物颗粒特异性识别与分离

生物系统中的活细胞和细胞外囊泡

(extracellular vesicles, EVs) 等生物颗粒是生命活动的重要执行者与调控者, 在生理过程及疾病进展中扮演着不可替代的角色。维持生物囊泡的高活性与结构完整性, 并实现其从复杂生物体系中的选择性分离, 对重大疾病的早期诊断、治疗及预后监测等下游应用具有重要意义。DNA 适配体通过指数富集配体系统进化技术 (SELEX) 筛选获得, 对特定靶标具有高亲和力^[20]。借助 DNA 适配体独特的分子识别能力与 DNA 序列可编程的特性, 通过分子设计与功能单元整合, 利用 RCA 反应可构建出具有靶向囊泡识别、捕获、封装及分离一体化功能的 DNA 水凝胶。

干细胞具有自我更新及多向分化的能力。在各类干细胞中, 骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 具有向损伤组织归巢、多向分化、分泌多种生物活性分子及免疫调节等重要生物学功能, 在过去数十年间已成为细胞生物学和多种疾病细胞治疗领域的重要研究对象^[21]。然而, BMSCs 在骨髓中的含量极低, 仅占单核细胞总数的 0.001%~0.01%。因此, 实现 BMSCs 的可控捕获与释放对其下游生物医学应用具有重要意义。Yao 等^[14]通过超长 DNA 链的杂交与缠结双重作用, 构建了基于双 RCA 的物理交联水凝胶, 用于 BMSCs 的特异性捕获、三维包覆及酶促释放 (图 6)。ALPL 蛋白在多能干细胞膜上过度表达, 适配体 Apt19S 与 ALPL 蛋白之间具有高亲和力, 可实现 BMSCs 的高特异性靶向^[22]。因此, 他们选用 Apt19S 的适配体序列首

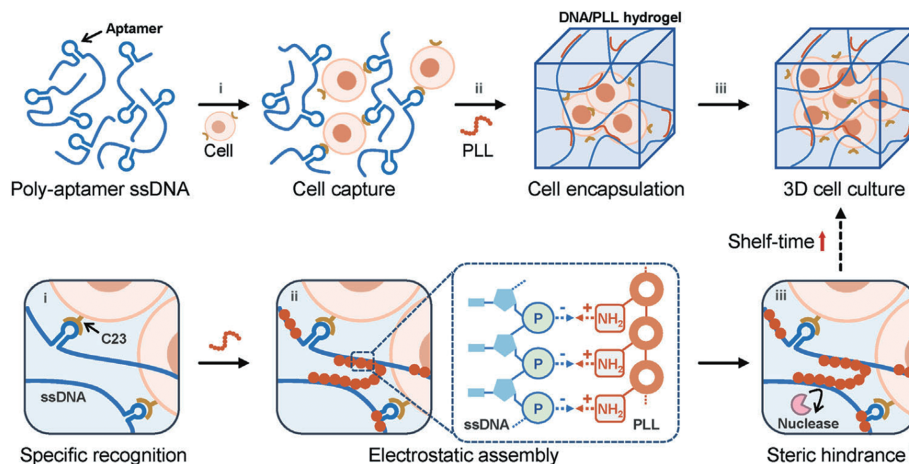


图5 PLL/DNA 水凝胶的分子设计及其在 3D 细胞培养中延长保存时间的应用示意图^[19] (2024 Wiley-VCH GmbH 版权许可)

Figure 5 Schematic illustration of the molecular design of a PLL/DNA hydrogel for extended shelf-time in 3D cell culture application (Reprinted with permission from Ref. [19]; Copyright (2024) Wiley-VCH GmbH)

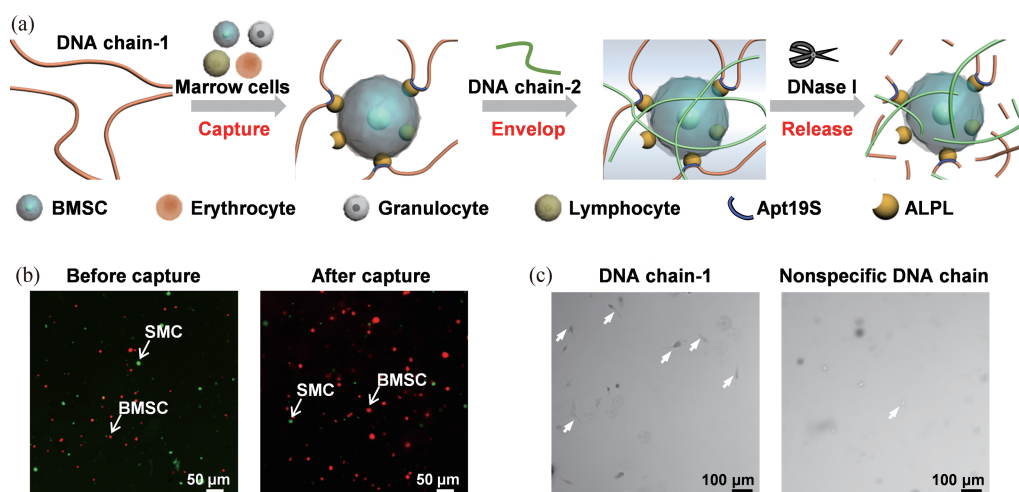


图6 (a)从含BMSCs与非靶细胞的混合物中选择性捕获并可控制释放BMSCs的示意图;(b)靶向BMSCs(红色)与非靶向SMCs(绿色)的细胞混合物在捕获前与捕获后的荧光显微镜图像;(c)基于特异性DNA链-1的水凝胶与非特异性DNA链的水凝胶选择性捕获细胞的显微镜图像^[14] (2020 American Chemical Society 版权许可)

Figure 6 (a) Schematic illustration of selective capture and controlled release of BMSCs from cell mixture containing non-target cells and BMSCs; (b) Fluorescent microscopy images of cell mixture before and after capture by DNA hydrogel; (c) Microscopy images of selective capture of cells by DNA hydrogel containing specific DNA chain-1 and nonspecific DNA chain-1 (Reprinted with permission from Ref. [14]; Copyright (2020) American Chemical Society)

先合成含有多聚适配体Apt19S的DNA链-1,从而实现了BMSCs的特异性锚定。进一步加入DNA链-2后,含有与DNA链-1部分互补序列的DNA链-2可引发细胞锚定DNA链-1与DNA链-2之间的交联,进而构建三维DNA水凝胶网络,实现BMSCs的选择性包封,可从骨髓中特异性捕获并分离BMSCs。DNA水凝胶的高含水率、多孔性和柔软基质为细胞培养提供了良好的三维微环境。由于此水凝胶只含有DNA这一组分,因此DNA网络可通过核酸酶实现按需可控消化降解,实现内部包封的BMSCs的无损释放。

免疫细胞作为生物体内的一类重要细胞,承担着免疫监视、免疫防御和免疫自稳的作用,参与免疫应答。肿瘤免疫治疗是新兴的肿瘤治疗方法,主要通过激活自体免疫促使免疫细胞直接杀伤肿瘤细胞或触发适应性免疫反应抑制肿瘤进展,其中肿瘤微环境中的肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)与肿瘤进程密切相关^[23],并且TILs具有体内抗肿瘤活性。由于TILs表面高表达PD-1蛋白,因此Yao等^[24]凭借PD-1适配体对T细胞的特异性识别与锚定作用,以及DNA链间的杂交反应形成DNA水凝胶,成功从肿瘤组织的细胞悬液中封装分离TILs(图7a)。为原位监测T细胞的捕获过程,本研究分别通过倒置荧光显微镜对T细胞在溶液及DNA网络中的

运动轨迹进行了追踪。结果显示,溶液中T细胞的运动轨迹呈现随机分布特征;与之相反,DNA网络形成后T细胞的运动明显受限(图7b)。荧光显微镜三维堆叠图像显示了T细胞在DNA网络中的空间分布,证实了T细胞的成功捕获以及水凝胶网络结构对细胞的良好支持性(图7c)。

上述的2种DNA水凝胶,通过在RCA反应的环状DNA模板上设计靶标细胞特异性蛋白对应的适配体序列,生成含有多聚适配体的DNA水凝胶,成功实现从复杂生物体系中高效识别、捕获与分离靶标细胞,并且为细胞提供具有生物相容性的三维支架,保持封装细胞的生物活性,构建了一种细胞特异性无损分离的新方法,具有广阔的应用前景。

根据类似的设计原理,基于双RCA反应构建的DNA水凝胶进一步被应用于从复杂生物体系中识别与分离尺寸更小的生物颗粒,如外泌体、细菌外膜囊泡等。Tang等^[25]在环状模板上设计可以与外泌体膜表面生物标志物CD63蛋白特异性结合的CD63适配体序列,通过RCA反应产生含有多聚CD63适配体的DNA长单链,在液体环境中特异性识别与捕获外泌体,再与DNA链2互补缠结形成DNA水凝胶,实现对外泌体的三维包封,进而实现高效分离(图8a~8c)。Zhang等^[26]借

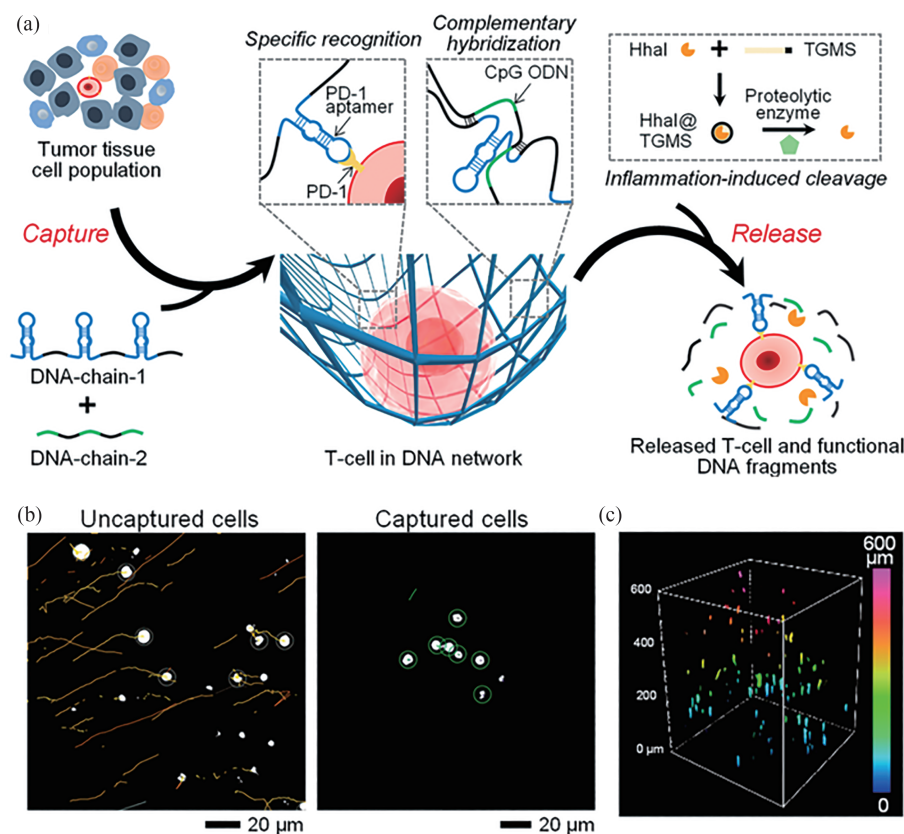


图 7 (a) DNA 水凝胶的构建及肿瘤浸润 T 淋巴细胞捕获过程的示意图; (b) DNA 水凝胶中细胞运动轨迹的监测; (c) 被捕获的 T 细胞在 DNA 水凝胶中空间分布的三维堆叠图像^[24] (2021 American Chemical Society 版权许可)

Figure 7 (a) Schematic illustration of construction of DNA hydrogel and capture process of tumor-infiltrating T-cells; (b) Monitoring of cell motion track of captured cells in the DNA hydrogel; (c) Three-dimensional stacking image of captured T-cells spatially distributed in the DNA hydrogel (Reprinted with permission from Ref. [24]; Copyright (2021) American Chemical Society)

助可与细菌外膜囊泡(OMVs)表面OmpA蛋白特异性结合的GN6适配体,实现对OMVs的高效识别、捕获与分离,在使用核酸酶降解DNA水凝胶后,OMVs的结构、组成与生物功能都未受影响,证明此分离方法的无损特性,这有利于后续检测与治疗的应用(图8d和8e)。

2.2 肿瘤治疗

肿瘤的高发病率和死亡率使其成为一个长期且严峻的全球健康问题。DNA水凝胶作为一种多功能药物递送平台,能够可控地装载并持续释放治疗剂,尤其对核酸药物具有良好效果^[27]。随着材料化学的发展以及与医学等学科的交叉,DNA水凝胶已被应用于化学治疗^[28]、基因治疗^[29]、光动力治疗和免疫治疗,其中在肿瘤治疗中的应用尤为突出,并取得了极具前景的成果。

免疫治疗是一种利用机体免疫系统对抗肿瘤的治疗方法,通过增强和调节抗肿瘤免疫反

应来主动攻击和杀死异常细胞。免疫检查点阻断(immune checkpoint blockade, ICB)是一种通过抑制免疫细胞表面特定受体与其相应配体相互作用,从而提升免疫细胞(尤其是T细胞)对肿瘤细胞杀伤能力的肿瘤免疫治疗策略,其治疗效果高度依赖于免疫检查点抑制剂的高效负载和可控释放,以及T细胞的有效激活^[30]。研究表明,在一定程度上阻断细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4(CTLA-4)/B7通路和程序性死亡受体-1(PD-1)/程序性细胞死亡配体-1(PD-L1)通路可抑制肿瘤的进展。然而,单一类型的检查点抑制剂只能特异性识别一个靶点,限制了对肿瘤的抑制效果。将2种特异性的检查点抑制剂联合使用,可同时识别两个靶点,从而介导多重抗肿瘤通路中分子-细胞的协同作用,提升肿瘤治疗效果。

核酸适配体与靶点的特异性和亲和力高,可作为潜在的免疫检查点抑制剂。然而,核酸适配

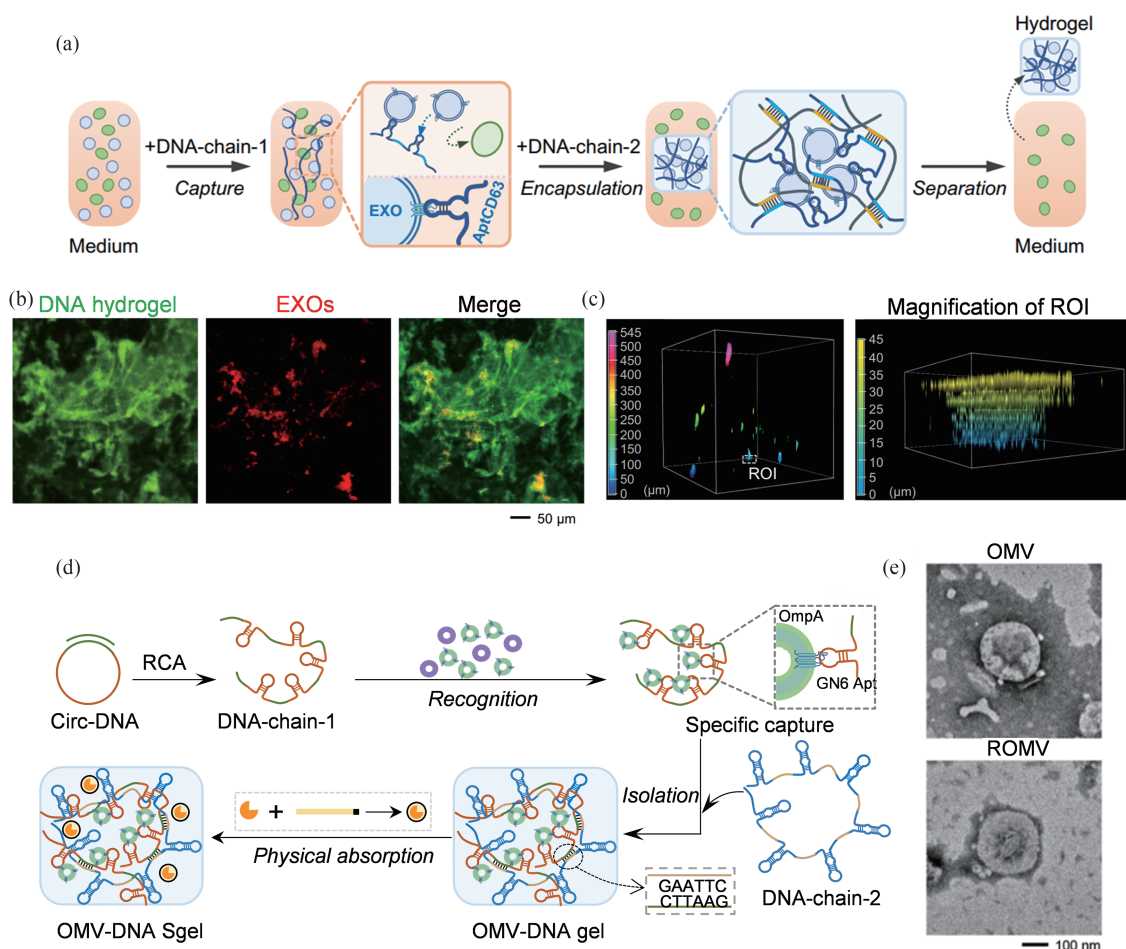


图 8 (a) DNA 水凝胶特异性分离外泌体过程示意图; (b) DNA 水凝胶包封外泌体荧光显微镜图像; (c) DNA 水凝胶封装外泌体的三维堆叠图像^[25] (2023 the Authors Published by PNAS 版权许可); (d) DNA 水凝胶特异性分离细菌外膜囊泡过程示意图; (e) DNA 水凝胶分离前和释放后细菌外膜囊泡的透射电子显微镜图像^[26] (2024 Science China Press 版权许可)

Figure 8 (a) Schematic illustration of specific isolation of exosomes by DNA hydrogel (b) Fluorescent microscopy images of DNA hydrogel captured with exosomes; (c) Three-dimensional stacking images of DNA hydrogel encapsulated with exosomes (Reprinted with permission from Ref. [25]; Copyright (2023) the Authors Published by PNAS); (d) Schematic illustration of specific isolation of OMVs by DNA hydrogel; (e) TEM images of OMVs before isolation by DNA hydrogel and after release from DNA hydrogel (Reprinted with permission from Ref. [26]; Copyright (2024) Science China Press)

体在生理环境下易被核酸酶降解,且检查点抑制剂的释放难以控制。因此,发展一种对检查点抑制剂兼具高效负载和可控释放功能的载体至关重要。DNA水凝胶作为一种生物相容性良好的功能材料,既可作为药物本体,又可作为药物递送载体。因此,将核酸适配体作为检查点抑制剂整合到DNA水凝胶中,可同时提高核酸适配体的抗降解性和递送效率。Zhang等^[31]针对CTLA-4/B7以及PD-1/PD-L1通路设计了响应性双靶点DNA水凝胶(P-C gel-NP)。该DNA水凝胶由通过RCA反应生成的两条超长DNA链部分互补与缠结形成,包含多价CTLA-4和多价PD-1适配体,并负载有包封限制性核酸内切酶的炎症响应性纳米颗粒

(*EcoR I*@TGMS)(图9a和9b)。在肿瘤炎症微环境中,纳米颗粒的外壳三甘油单硬脂酸酯(TGMS)响应环境中的基质金属蛋白酶裂解,释放出限制性核酸内切酶*EcoR I*。随后,*EcoR I*特异性识别并切割双链互补位置,释放出多聚CTLA-4和PD-1适配体作为免疫检查点抑制剂,阻断免疫检查点,促进抗原呈递细胞对T细胞的激活,同时恢复T细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤(图9c)。在小鼠黑色素瘤原位模型中,双靶点DNA水凝胶成功激活了肿瘤组织的免疫反应,表现出显著的肿瘤抑制效果(约65%)。这种响应性DNA水凝胶为双靶点药物的开发提供了一种新策略,通过针对特定的靶点,设计替换DNA适配体序列,构建出可定制化

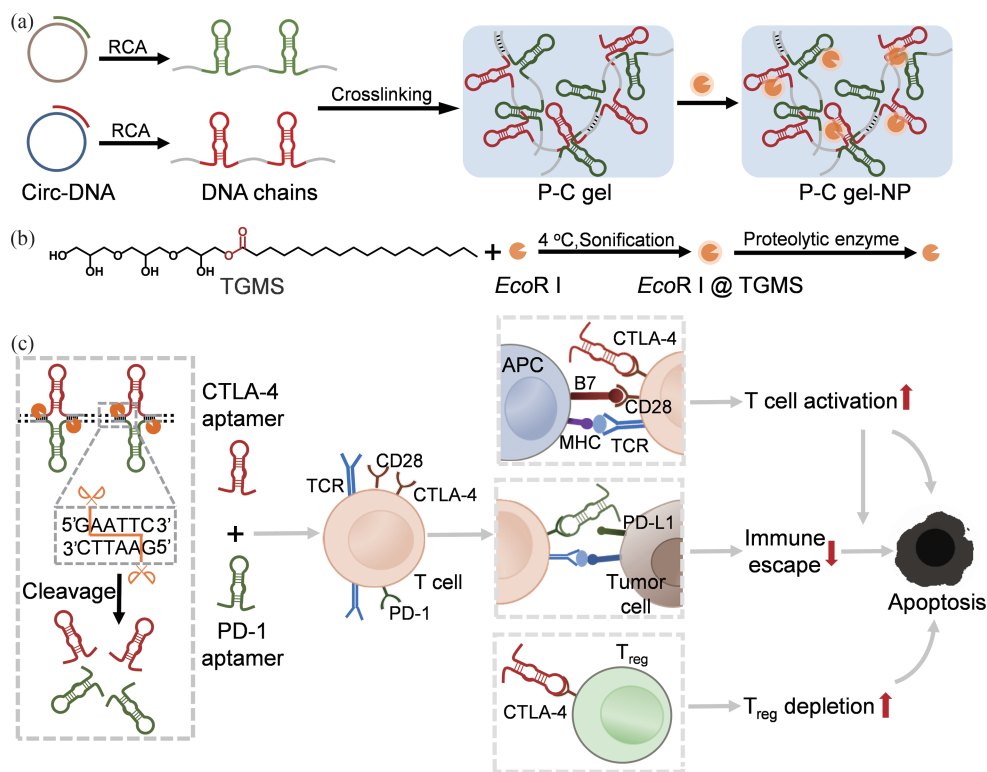


图9 (a)响应性DNA水凝胶的合成过程;(b)响应性纳米颗粒的合成过程;(c)响应性DNA水凝胶作为双靶点抑制剂用于肿瘤局部免疫治疗^[31] (2024 Wiley-VCH GmbH 版权许可)

Figure 9 (a) Synthesis process of responsive DNA hydrogel; (b) Synthesis process of responsive nanoparticles; (c) A responsive DNA hydrogel as a dual-target inhibitor for localized cancer immunotherapy (Reprinted with permission from Ref. [31]; Copyright (2024) Wiley-VCH GmbH)

且普适的响应性DNA水凝胶,有望成为一种通用的免疫治疗药物构建平台用于肿瘤免疫治疗。

针对肿瘤的细胞免疫疗法,也称为过继细胞疗法(adoptive cell therapy, ACT),是一种利用来自人体自身免疫系统的细胞来消除癌症的治疗方法^[32]。近年来,免疫细胞疗法在改善肿瘤患者的生活质量与延长生存期方面取得了显著的效果,例如, CAR-T细胞疗法^[33]、NK细胞疗法^[34]、肿瘤浸润T细胞疗法^[35]等。其中,肿瘤浸润T细胞疗法是将肿瘤组织中的T细胞分离出,在体外进行刺激扩增后,回输到患者体内,从而扩大免疫应答,治疗原发或继发肿瘤的方法。但目前存在的细胞分离方法存在对细胞损伤大、易引入污染物等局限性,因此,亟需发展一种高效无损的细胞分离手段。

Yao等^[24]通过DNA序列的精巧设计,构建了含有多种功能模块的DNA水凝胶网络,包括PD-1适配体模块、CpG寡核苷酸模块、互补序列模块和限制性核酸内切酶模块。多聚PD-1适配体可以从复杂生物体系中特异性识别和捕获T细胞,同时封闭T细胞表面的免疫检查点;多聚CpG寡

核苷酸模块可作为免疫佐剂激活抗原呈递细胞,增强免疫效果;2条链间设计的互补序列可介导DNA水凝胶网络形成,实现T细胞封装,并提供酶切割位点;限制酶模块的引入可使DNA水凝胶响应肿瘤炎症环境,切割DNA网络。这些功能模块序列集成在DNA模板链中,通过高效的酶促扩增反应,串联集成在超长DNA单链中,形成DNA水凝胶网络,实现肿瘤浸润T细胞的高效、特异性和无损分离。获得的T细胞纯度达到98%,存活率达到90%。携带T细胞的DNA水凝胶注射至肿瘤病灶后,响应肿瘤炎症环境,实现T细胞的释放和激活,对小鼠黑色素瘤的局部免疫治疗效果显著。该研究为分离免疫细胞提供了新的策略,为重大疾病的免疫治疗开拓了新的路径。

目前,免疫疗法仍面临着免疫激活不足和免疫效力有限等挑战,将免疫疗法与其他疗法相结合,有望成为解决这些挑战的有效策略。光动力疗法是一种新兴的非侵入性肿瘤治疗策略,不仅能直接杀死肿瘤细胞,还能通过释放肿瘤特异性抗原,激活抗原递呈细胞来增强免疫反应。因此,

开发一种整合光动力治疗单元的智能DNA水凝胶系统来调节免疫环境,有助于实现高效的肿瘤免疫治疗。基于此, Yang等^[36]开发了一种由多价光动力单元、免疫激活单元和外泌体杀伤单元组成的智能DNA水凝胶,实现了肿瘤免疫治疗和光动力治疗的高效协同。这种智能DNA水凝胶由2种通过RCA反应合成的超长DNA单链组装而成。其中一条DNA链含有免疫佐剂寡核苷酸(CpG ODN),以及用于装载自然杀伤(NK)细胞外泌体的多聚适配体(AptCD63);另一条DNA链含有多价鸟嘌呤四联体(G4),用于装载光动力元件。智能DNA水凝胶在体外高效捕获NK细胞来源的外泌体;之后负载用单硬脂酸甘油三酯(TGMS)预包覆HhaI酶形成的响应性纳米颗粒。将智能DNA水凝胶注射到肿瘤部位,肿瘤区域炎症环境中含有的基质金属蛋白酶裂解TGMS的酯键释放出HhaI酶,降解水凝胶并释放出功能单元。NK细胞来源外泌体含有的穿孔素和凋亡相关蛋白发挥抗肿瘤作用。CpG ODN激活抗原递呈细胞发挥免疫疗效。在660 nm激光照射下,级联光动力过程启动,直接杀伤肿瘤细胞。杀伤过程产生的细胞碎片作为免疫抗原,进一步增强免疫疗效。上述方法通过在体外封装具有杀伤功能的NK细胞来源外泌体实现肿瘤杀伤功能,肿瘤来源的sEV与肿瘤的发生和发展密切相关,主要体现在抑制免疫系统、增强炎症反应以及加速肿瘤细胞的增殖和迁移。抑制肿瘤来源sEV有望成为抑制肿瘤发展的新途径。sEV发挥功能依赖于局部浓度,通过药理学手段可以抑制细胞间sEV的分泌和摄取,然而肿瘤特异性差等问题使这些手段在治疗应用中限制较大。Yang等^[37]进一步开发了一种基于DNA智能水凝胶网络的sEV陷阱(DNET),在肿瘤部位在体特异性捕获sEV,并通过光动力过程实现sEV破坏,抑制了sEV对肿瘤进程的促进作用。

然而,目前的光动力治疗方案大多依赖于外界光源,并受限于外界光在组织中有限的穿透能力。针对这一难题,Zhao等通过双RCA反应构建了智能储能杂化DNA水凝胶,该水凝胶整合了寡核苷酸药物CpG ODN和PD-1核酸适配体、肿瘤靶向AS1411适配体与光敏剂组成的肿瘤靶向储能光动力模块,并负载了储能长余辉纳米颗粒,储能后可以在无激发光条件下发光数小时甚至数天。这种基于储能DNA水凝胶的无需激发光、按

需激活的策略为肿瘤治疗提供了一种精准高效的方案,展现了DNA材料在推动精准医疗发展中的独特优势和潜力^[38,39]。

术后肿瘤复发与转移是导致肿瘤治疗失败的主要原因。为解决该问题,Zhang等^[40]开发了一种可局部植入的光动力免疫调节DNA水凝胶,用于早期预警并抑制术后肿瘤复发(图10)。该水凝胶设计了2类DNA环状模板,其一包含PD-L1适配体与CpG的互补序列,其二包含肿瘤复发传感器结合位点的互补序列。通过双RCA反应分别产生多聚PD-L1适配体以及多聚免疫佐剂CpG及光敏剂Ce6的负载序列,将这2种环状DNA模板与光敏剂Ce6-cDNA通过一锅法RCA反应合成光响应免疫调控水凝胶(CPDH-Ce6)。随后通过序列杂交将环状ATP传感器(cAS)负载于CPDH-Ce6上,最终获得CPDH-Ce6@cAS体系。其中,PD-L1适配体特异性捕获并原位富集复发的肿瘤细胞,引起局部ATP浓度升高,从而提供早期复发预警信号。当检测到阳性信号时,即可通过局部激光照射激活光动力治疗,有效清除所捕获的肿瘤细胞,并释放肿瘤相关抗原(TAA)。同时负载的Ce6产生活性氧可破坏水凝胶中的DNA链,释放PD-L1适配体及免疫佐剂CpG,二者与TAA协同作用,可激发强有力的全身性抗肿瘤免疫应答。在小鼠术后复发瘤模型中,此水凝胶对复发肿瘤的抑制率高达88.1%,并能有效抑制远端转移,为术后肿瘤复发的及时防治提供了创新性策略。

2.3 肿瘤检测

肿瘤检测是恶性肿瘤防控体系的核心环节,对早期发现、精准诊断、治疗决策及预后评估具有至关重要的意义。传统的组织活检具有侵入性强、时空局限性大且难以重复获取等缺点,而液体活检作为一种新兴的低侵入性、高灵活性的新型诊断技术,通过分析血液、尿液、唾液等体液中与肿瘤相关的生物标志物,能够全面反映肿瘤的异质性和动态变化,为实现肿瘤的动态监测提供了突破性手段^[41,42]。液体活检的检测种类主要包括循环肿瘤DNA(ctDNA)、循环肿瘤细胞(CTCs)、外泌体(exosomes, EXOs)及肿瘤相关核酸与蛋白质等。这些分析物共同构成了液体活检的多维检测体系,显著推动了肿瘤精准医学的发展。这些检测实现的首要前提是实现在复杂生物体系中精准识别与分离靶标生物颗粒,基于双RCA反应构

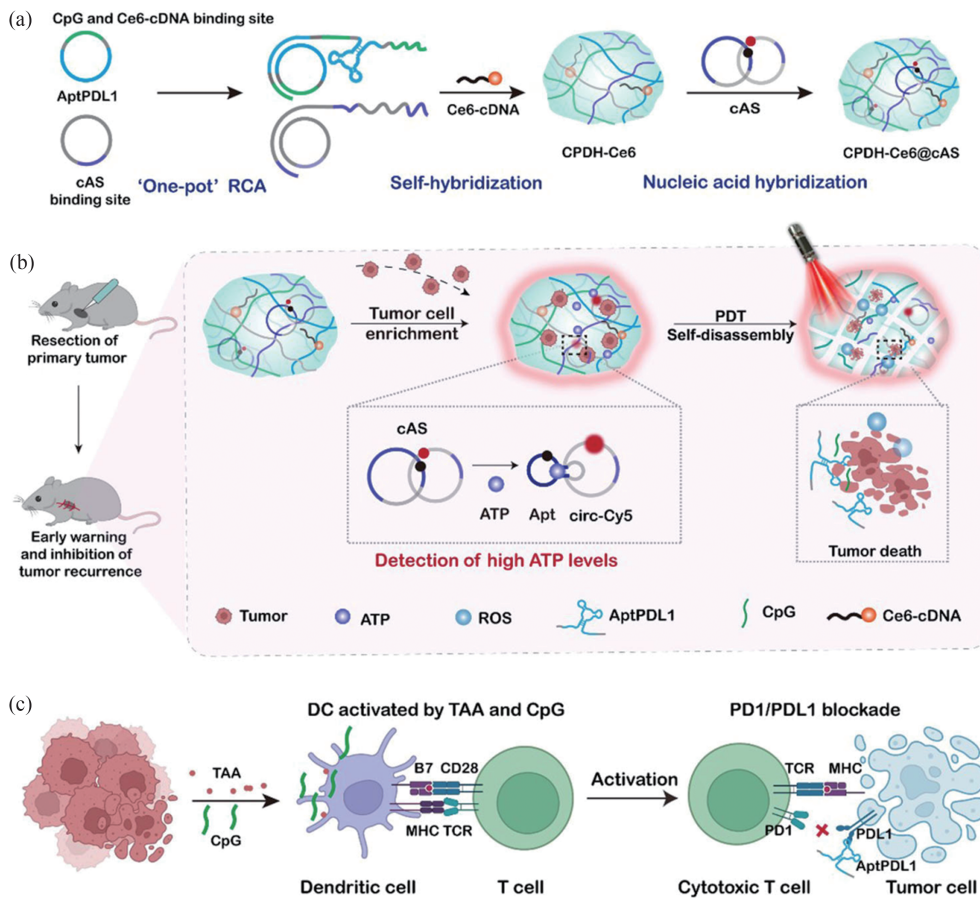


图 10 (a)光动力免疫调节 DNA 水凝胶的合成过程;(b)肿瘤术后复发模型中局部植入 CPDH-Ce6@cAS 发挥光动力治疗作用的示意图;(c)释放的 CpG 与肿瘤相关抗原(TAA)协同杀伤肿瘤细胞^[40] (2023 Springer Nature 版权许可)

Figure 10 (a) Synthesis process of photodynamic immunomodulatory DNA hydrogel; (b) Schematic illustration of photodynamic therapy mediated by locally implanted CPDH-Ce6@cAS in a post-surgical tumor recurrence model; (c) Synergistic tumor cell killing effect through released CpG and tumor-associated antigens (TAA) (Reprinted with permission from Ref. [40]; Copyright (2023) Springer Nature)

建的 DNA 水凝胶体系很好地解决了此问题, 为下游检测奠定了基础。

2.3.1 细胞外囊泡检测

细胞外囊泡 (EV) 是一类由细胞分泌的、具有脂质双分子层结构的囊泡, 尺寸通常在 $30\text{ nm}\sim 5\text{ }\mu\text{m}$ 之间^[43]。研究表明, EV 通过携带蛋白质、核酸等多种生物活性分子参与细胞间通讯, 并在肿瘤的发生、转移和耐药性形成等过程中发挥关键作用^[44,45]。EV 广泛存在于血液、尿液和唾液等多种体液中, 且丰度相对较高 (通常为 $10^6\sim 10^{12}/\text{mL}$), 样本采集便捷。EV 的脂质双分子层结构可有效保护内容物免受酶解, 确保标志物分子的完整性和活性, 可为后续分析提供高质量样本。EV 的内容物种类丰富, 且不同瘤细胞分泌的 EV 携带的信息存在差异, 可获得更丰富的肿瘤信息^[46,47]。因此, EV 已成为液体活检领域极具潜

力的生物标志物, 为疾病诊断和个性化治疗提供更全面、更可靠的临床依据。作为下游生物分析和治疗应用的关键前提, 从复杂生物介质中实现 EV 的高纯度、低损伤分离至关重要。利用 DNA 的精准识别和组装性能, 可望开发高效、精准、便捷的 EV 液体活检技术, 以推动其在肿瘤早期诊断和个性化治疗中的临床应用。

外泌体作为一类重要的 EV, 其内部的 miRNA 是一种可靠、无创的癌症早期诊断生物标志物, 然而, EXOs 的低丰度和繁琐的提取过程往往限制了外泌体 miRNA 检测的灵敏度。在上述 DNA 水凝胶特异性识别分离细胞外膜囊泡的基础上, Tang 等^[25]将寡核苷酸分子信标 (MB) 和单探针 (SP) 整合到 DNA 水凝胶中, 开发了一种检测乳腺癌生物标志物外泌体 microRNA-21 (miR-21) 的检测方法, 具有较高的特异性和准确性 (图 11)。在双 RCA 合

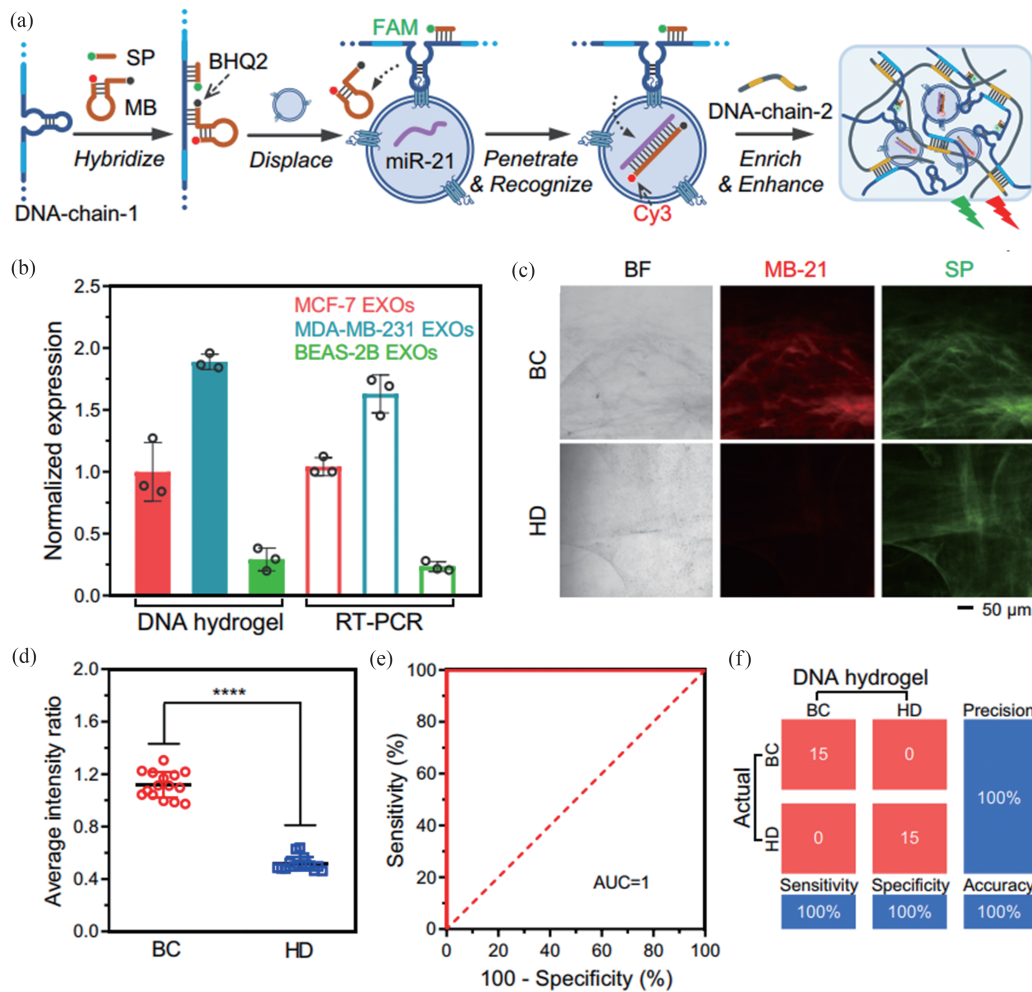


图 11 (a)基于 DNA 水凝胶系统检测外泌体 miRNA 示意图; (b) DNA 水凝胶技术与 RT-PCR 方法检测不同细胞系来源 EXOs 中外泌体 miR-21 的表达水平; (c)乳腺癌患者(BCs)与健康供者(HDs)血清中外泌体 miR-21 进行 DNA 水凝胶检测的荧光图像; (d)从 HD ($n=15$)与 BC ($n=15$)血清样本分离 EXOs 后 DNA 水凝胶荧光比值的散点图; (e)用于评估该检测技术在乳腺癌诊断中性能的受试者操作特征(ROC)曲线分析; AUC 表示曲线下面积; (f)基于 DNA 水凝胶检测技术对 HD 与 BC 进行分类判别的混淆矩阵^[25] (2023 the Authors Published by PNAS 版权许可)

Figure 11 (a) Schematic illustration of exosomal miRNA detection by DNA hydrogel-based detection system; (b) Detection of exosomal miR-21 expression levels from different cell line-derived EXOs using DNA hydrogel technology and RT-PCR method; (c) Fluorescent microscopy images of exosomal miR-21 detection in serum from breast cancer patients (BCs) and healthy donors (HDs) using DNA hydrogel assay; (d) Scatter plot of DNA hydrogel fluorescence ratio from EXOs isolated after serum samples of HD ($n=15$) and BC ($n=15$) (e) Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis evaluating the performance of this detection technology in breast cancer diagnosis; AUC indicates area under the curve; (f) Confusion matrix for classification discrimination between HD and BC based on DNA hydrogel detection technology (Reprinted with permission from Ref. [25]; Copyright (2023) the Authors Published by PNAS)

成 DNA 水凝胶的环状模板中引入可与外泌体表面生物标志物 CD63 蛋白特异性结合的 CD63 适配体, 该 DNA 水凝胶应用于细胞培养基和患者血清中 EXOs 的选择性分离, 分离得到的 EXOs 可以通过酶裂解或链置换从水凝胶中无损释放。在临床样本中, 可实现外泌体致病 microRNA(miRNA) 的检测以及肿瘤细胞衍生 EXOs 的分离, 受试者

工作特征分析表明该 DNA 水凝胶能够可靠区分癌症患者样本与健康供体样本(曲线下面积=1, 图 11), 分类具有 100% 敏感性和 100% 特异性, 显示出该方法在乳腺癌临床诊断中的应用潜力。

传统方法检测肿瘤来源外泌体(TEXs)操作繁琐, 无法实现定量检测。多数方法需要标记荧光基团或分离步骤, 不利于均相检测和便携化。

He 等^[48]使用特异性适配体分别识别 TEXs 上 2 种标志蛋白: Mucin 1 和 PD-L1, 2 个适配体分别作为引物参与 RCA 反应, 扩增出富含 T 或 C 的单链 DNA。富含 T 的 DNA 与 Hg^{2+} 形成 T-Hg²⁺-T 结构, 阻止 Hg^{2+} 与量子点 (QDs) 发生阳离子交换反应, 保护 QDs 荧光。富含 C 的 DNA 与亚甲蓝 (MB) 相互作用, 阻碍 MB 的电子跃迁并影响其发光。适配体与 TEXs 结合后会阻碍 RCA 反应, 从而使得 QDs 荧光减弱, MB 荧光增强 (图 12)。研究人员利用该方法设计出手持荧光计, 可以实现高灵敏检测, 最低可检测 30 particles/mL 的 TEXs。在 40 例临床样本的检测中, 该结果与实验室荧光仪的结果高度一致, 并与 CT 和病理结果吻合, 展现出该方法较好的临床实用性。

2.3.2 细胞检测

循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs) 作为液体活检中的关键生物标志物, 用于无创肿瘤诊断及癌症进展的实时监测^[49,50]。然而, 由于 CTCs 在外周血中含量极低, 在检测前通常需先对其进行分离富集。现有分离方法通常耗时长且易导致细胞损失, 限制了 CTC 液体活检的实际应用。Wang 等^[51]利用双 RCA 反应开发了一种基

于 DNA 水凝胶的 CTCs 智能检测诊断系统, 可直接从血液样本中实现 CTCs 的特异性识别、选择性富集与精准检测 (图 13a)。该 DNA 水凝胶由含有多聚适配体的超长 DNA 链与荧光检测模块构成。其中荧光检测模块包括分子信标与信号探针, 分子信标两端分别带有荧光基团 Cy3 与淬灭基团 BHQ2, 并且与适配体序列部分互补, 互补结合后整体荧光处于淬灭状态。信号探针一段带有荧光基团 FAM, 也同时结合在 DNA 长链上并被分子信标淬灭。DNA 链中的多聚适配体可特异性结合 CTCs 表面上皮细胞黏附分子 (EpCAM), 通过碱基配对驱动 DNA 水凝胶形成, 从而实现 CTCs 的高效富集。CTCs 与适配体结合时, 可将负载与 DNA 链上的分子信标置换下来并进入细胞, 使信号探针 FAM 基团荧光恢复, 当分子信标与细胞内的 miRNA 结合后, Cy3 基团的荧光也可恢复, 因此, 该系统基于 2 种荧光模块的化学组装, 可通过比率荧光成像法半定量检测 CTCs 内癌症相关 miRNA 的表达水平 (图 13b)。在临床血液样本测试中, 该系统在区分乳腺癌患者与健康供体方面实现了 100% 的精确度与 96% 的准确度, 展现出卓越的乳腺癌临床诊断潜力 (图 13c~13e)。

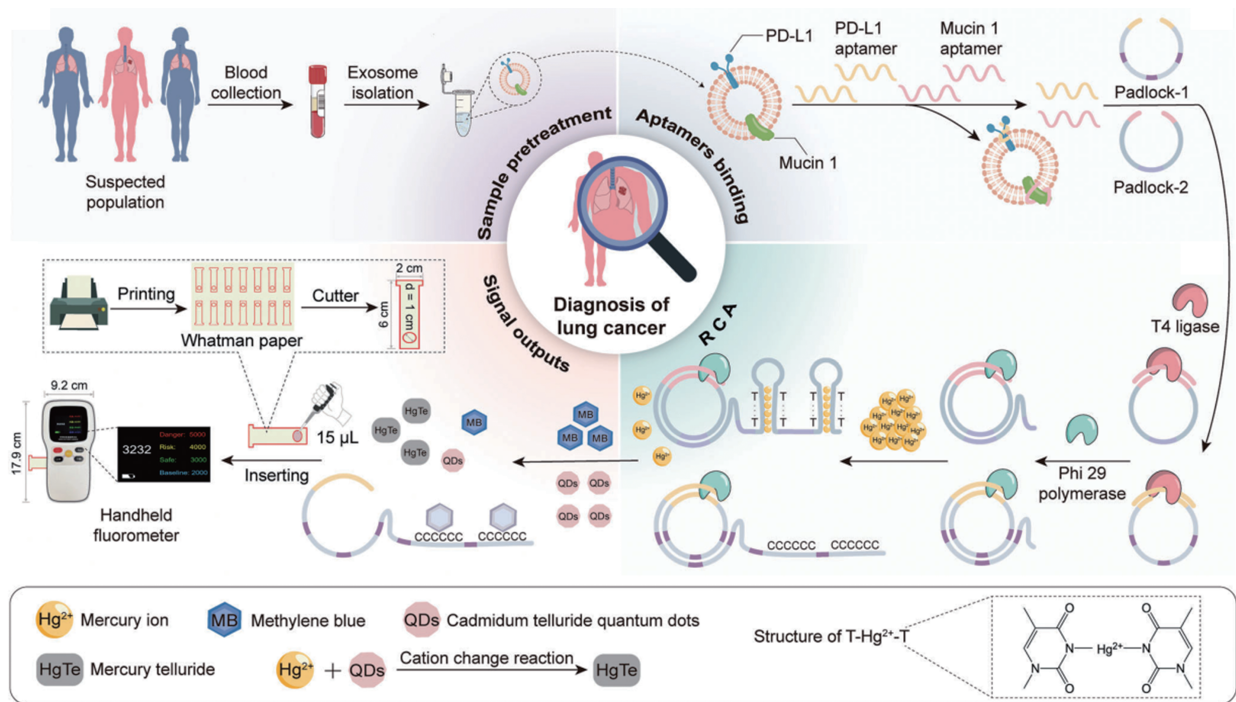


图 12 基于 RCA 的便携式适配体传感器用于肿瘤来源外泌体的液体活检示意图^[48] (2024 Wiley-VCH GmbH 版权许可)

Figure 12 Schematic illustration of a portable aptasensor based on RCA for separation and detection of tumor-derived exosomes (Reprinted with permission from Ref. [48]; Copyright (2024) Wiley-VCH GmbH)

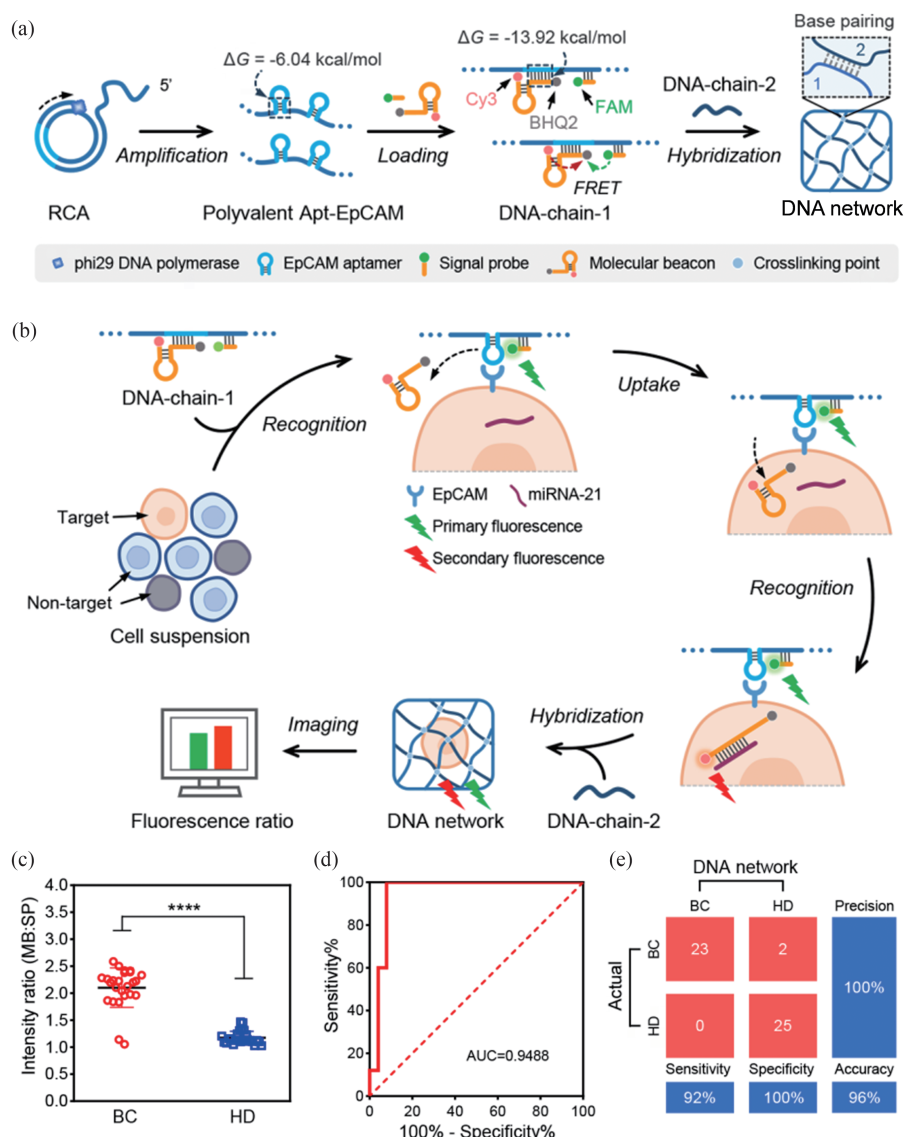


图 13 (a) DNA 水凝胶检测系统的构建示意图 (b) DNA 水凝胶检测 CTCs 的机制示意图; (c) 基于 DNA 水凝胶检测乳腺癌患者(BCs)与健康供体(HDs)血液样本中的 miRNA-21 水平的散点图; (d) 受试者工作特征曲线评估该诊断系统对乳腺癌的检测性能; (e) 混淆矩阵汇总诊断系统区分乳腺癌患者与健康供者的能力^[51] (2025 American Chemical Society 版权许可)

Figure 13 (a) Schematic illustration of construction of DNA hydrogel-based diagnostic system; (b) Schematic illustration of mechanism of DNA hydrogel-based diagnostic system; (c) DNA hydrogel-based detection of miR-21 levels in blood samples from breast cancer patients (BCs) and healthy donors (HDs), presented as a scatter plot; (d) Evaluation of the diagnostic system's performance for breast cancer detection using the receiver operating characteristic (ROC) curve; (e) Confusion matrix summarizing diagnostic system's ability to differentiate between BCs and HDs (Reprinted with permission from Ref. [51]; Copyright (2025) American Chemical Society)

3 结论与展望

近年来,随着DNA纳米技术的不断发展与持续突破,DNA功能材料在生物医学领域的应用探索日益深入。基于RCA的DNA链合成策略具有高度可控性,能够实现多价功能单元的精准设计与集成,其性能超越了传统纳米材料及单一DNA

结构。此类DNA材料不仅可作为载体,更兼具药物控释与生物调控等多重功能。其中,DNA水凝胶,特别是基于RCA技术构建的智能DNA水凝胶体系,凭借其可编程的分子识别能力、良好的生物相容性与可调控的刺激响应行为,已成为生物颗粒操纵和生物医学应用中的重要材料平台。

基于上述优势,DNA水凝胶的应用潜力远不

止肿瘤诊疗,还可针对不同疾病的特点,进行性能强化和功能拓展。例如,凭借其精准的分子识别与捕获能力,通过序列设计可引入针对特定病原体(如细菌表面蛋白、病毒刺突蛋白)的核酸适配体作为RCA环状模板的功能单元,可构建能够直接从血液、伤口渗出液等复杂体液中高效富集并抑制病原体的智能敷料或血液净化材料等。中枢神经系统损伤后的再生修复是医学难题,亟需提供神经保护、引导轴突再生且生物相容性优异的递送系统。DNA水凝胶具备与神经组织匹配的柔软力学性能、可控降解特性及精准释放能力,可作为理想的神经接口材料。在组织再生领域中,生长因子的时空精准控释是调控细胞增殖与分化的关键,DNA水凝胶针对特定生物信号可精准响应,如特定酶、pH值变化,实现生长因子控释、作为三维支架支持干细胞生长,更可通过集成细胞黏附肽的DNA模拟物和分化诱导信号,动态调控干细胞的自我更新和定向分化,用于软骨、心肌等多种组织的构建。总之,基于RCA的DNA水凝胶凭借其固有的生物相容性、高度可编程性的分子结构和灵活的多功能集成能力,正由一种高效的肿瘤诊疗平台,逐步发展为可应对多种人类重大疾病的通用型生物材料平台。将其应用范围向非肿瘤领域拓展,将是未来该领域发展的必然趋势和重要增长点,并有望在生物医学工程中发挥更广泛的集成功能。

尽管DNA水凝胶的研究已取得显著进展,但在实际生物应用中仍面临诸多挑战,包括机械强度相对较低、在动态生理环境中结构稳定性不足、体内降解行为难以预测以及存在潜在基因组干扰风险。目前仅有少量研究系统评估了DNA材料的生物安全性,例如,四面体DNA纳米结构与DNA聚合物纳米结构的药代动力学与免疫原性评价及免疫毒性,以及对DNA水凝胶短期内的免疫原性,包括血清中IgG、IgM等的测定。因此,针对DNA材料的长期生物安全性仍需开展系统、深入的考察。

未来的研究应聚焦于发展杂化交联策略,例如,引入合成聚合物或无机纳米材料以增强网络稳定性;构建刺激响应型智能水凝胶以实现时空精准的药物释放与材料降解;综合利用功能核酸数据库、SELEX技术拓展适配体库多样性,结合酶工程手段改造DNA聚合酶以提高修饰单核苷

酸的利用效率,以及进一步基于生物质DNA合成的DNA水凝胶降低生产成本等。通过模块化、标准化和仿生设计理念的引入,有望研制出新一代智能DNA水凝胶系统,实现在体环境下对目标生物颗粒的高效识别、富集与调控,最终推动其在实时监测、局部微环境干预和精准医疗等领域中的突破性应用。跨学科协作将进一步增强DNA材料在合成生物学和生物医学工程中的核心地位,为其临床转化奠定坚实基础。

参考文献

- 1 Caliari, S. R.; Burdick, J. A. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat. Methods*, **2016**, 13(5), 405–414.
- 2 Herrmann, A.; Haag, R.; Schedler, U. Hydrogels and their role in biosensing applications. *Adv. Healthc. Mater.*, **2021**, 10(11), 2100062.
- 3 Li, F. Y.; Lyu, D. Y.; Liu, S.; Guo, W. W. DNA hydrogels and microgels for biosensing and biomedical applications. *Adv. Mater.*, **2020**, 32(3), 1806538.
- 4 Seeman, N. C. DNA in a material world. *Nature*, **2003**, 421(6921), 427–431.
- 5 Seeman, N. C.; Sleiman, H. F. DNA nanotechnology. *Nat. Rev. Mater.*, **2017**, 3, 17068.
- 6 Um, S. H.; Lee, J. B.; Park, N.; Kwon, S. Y.; Umbach, C. C. Enzyme-catalysed assembly of DNA hydrogel. *Nat. Mater.*, **2006**, 5(10), 797–801.
- 7 Hartman, M. R.; Yang, D. Y.; Tran, T. N. N.; Lee, K.; Kahn, J. S.; Kiatwuthinon, P.; Yancey, K. G.; Trotsenko, O.; Minko, S.; Luo, D. Thermostable branched DNA nanostructures as modular primers for polymerase chain reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 8699–8702.
- 8 Wang, J. B.; Chao, J.; Liu, H. J.; Su, S.; Wang, L. H.; Huang, W.; Willner, I.; Fan, C. H. Clamped hybridization chain reactions for the self-assembly of patterned DNA hydrogels. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56(8), 2171–2175.
- 9 Yao, C.; Zhang, R.; Tang, J. P.; Yang, D. Y. Rolling circle amplification (RCA)-based DNA hydrogel. *Nat. Protoc.*, **2021**, 16(12), 5460–5483.
- 10 Ali, M. M.; Li, F.; Zhang, Z. Q.; Zhang, K. X.; Kang, D. K.; Ankrum, J. A.; Le, X. C.; Zhao, W. A. Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43(10), 3324–3341.
- 11 Gao, T.; Chen, T. S.; Feng, C.; He, X.; Mu, C. L.; Anzai, J. I.; Li, G. X. Design and fabrication of flexible

- DNA polymer cocoons to encapsulate live cells. *Nat. Commun.*, **2019**, 10, 2946.
- 12 Zhang, J.; He, M. Y.; Nie, C. P.; He, M. M.; Pan, Q. S.; Liu, C.; Hu, Y. L.; Yi, J. T.; Chen, T. T.; Chu, X. Biomaterialized metal-organic framework nanoparticles enable enzymatic rolling circle amplification in living cells for ultrasensitive microRNA imaging. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(14), 9049–9057.
 - 13 Lee, J. B.; Peng, S. M.; Yang, D. Y.; Roh, Y. H.; Funabashi, H.; Park, N.; Rice, E. J.; Chen, L. W.; Long, R.; Wu, M. M.; Luo, D. A mechanical metamaterial made from a DNA hydrogel. *Nat. Nanotechnol.*, **2012**, 7(12), 816–820.
 - 14 Yao, C.; Tang, H.; Wu, W. J.; Tang, J. P.; Guo, W. W.; Luo, D.; Yang, D. Y. Double rolling circle amplification generates physically cross-linked DNA network for stem cell fishing. *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142(7), 3422–3429.
 - 15 Tang, J. P.; Yao, C.; Gu, Z.; Jung, S.; Luo, D.; Yang, D. Y. Super-soft and super-elastic DNA robot with magnetically driven navigational locomotion for cell delivery in confined space. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59, 2490–2495.
 - 16 Geng, J. H.; Yao, C.; Kou, X. H.; Tang, J. P.; Luo, D.; Yang, D. Y. A fluorescent biofunctional DNA hydrogel prepared by enzymatic polymerization. *Adv. Healthc. Mater.*, **2018**, 7(5), 1700998.
 - 17 Lu, C. H.; Willner, I. Stimuli-responsive DNA-functionalized nano-/microcontainers for switchable and controlled release. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54(42), 12212–12235.
 - 18 Tang, J. P.; Ou, J. H.; Zhu, C. X.; Yao, C.; Yang, D. Y. Flash synthesis of DNA hydrogel via supramacromolecular assembly of DNA chains and upconversion nanoparticles for cell engineering. *Adv. Funct. Mater.*, **2022**, 32(12), 2107267.
 - 19 Tang, J. P.; Wang, J.; Ou, J. H.; Cui, Z.; Yao, C.; Yang, D. Y. A DNA/poly-(L-lysine) hydrogel with long shelf-time for 3D cell culture. *Small Meth.*, **2024**, 8(7), 2301236.
 - 20 Sefah, K.; Shanguan, D. H.; Xiong, X. L.; O'Donoghue, M. B.; Tan, W. H. Development of DNA aptamers using cell-SELEX. *Nat. Protoc.*, **2010**, 5(6), 1169–1185.
 - 21 De Luca, M.; Aiuti, A.; Cossu, G.; Parmar, M.; Pellegrini, G.; Robey, P. G. Advances in stem cell research and therapeutic development. *Nat. Cell Biol.*, **2019**, 21(7), 801–811.
 - 22 Hu, X. X.; Wang, Y. L.; Tan, Y. N.; Wang, J.; Liu, H. Y.; Wang, Y. Q.; Yang, S.; Shi, M. S.; Zhao, S. Y.; Zhang, Y. F.; Yuan, Q. A difunctional regeneration scaffold for knee repair based on aptamer-directed cell recruitment. *Adv. Mater.*, **2017**, 29(15), 1605235.
 - 23 Zhang, Y. Y.; Zhang, Z. M. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell. Mol. Immunol.*, **2020**, 17(8), 807–821.
 - 24 Yao, C.; Zhu, C. X.; Tang, J. P.; Ou, J. H.; Zhang, R.; Yang, D. Y. T lymphocyte-captured DNA network for localized immunotherapy. *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143(46), 19330–19340.
 - 25 Tang, J. P.; Jia, X. M.; Li, Q.; Cui, Z.; Liang, A. Q.; Ke, B.; Yang, D. Y.; Yao, C. A DNA-based hydrogel for exosome separation and biomedical applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2023**, 120(28), e2303822120.
 - 26 Zhang, R.; Chang, L. L.; Wang, J.; Huang, M. X.; Cui, Z.; Li, S. Q.; Zhao, J. W.; Yao, C.; Yang, D. Y. A smart DNA hydrogel for isolation of bacterial outer membrane vesicles and localized cancer immunotherapy. *Sci. China Mater.*, **2024**, 67(12), 3872–3884.
 - 27 Zhong, R. B.; Talebian, S.; Mendes, B. B.; Wallace, G.; Langer, R.; Conde, J.; Shi, J. J. Hydrogels for RNA delivery. *Nat. Mater.*, **2023**, 22(7), 818–831.
 - 28 Borum, R. M.; Moore, C.; Mantri, Y.; Xu, M.; Jokerst, J. V. Supramolecular loading of DNA hydrogels with dye-drug conjugates for real-time photoacoustic monitoring of chemotherapy. *Adv. Sci.*, **2023**, 10(1), 2204330.
 - 29 Mo, F. L.; Jiang, K.; Zhao, D.; Wang, Y. Q.; Song, J.; Tan, W. H. DNA hydrogel-based gene editing and drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2021**, 168, 79–98.
 - 30 Morad, G.; Helmink, B. A.; Sharma, P.; Wargo, J. A. Hallmarks of response, resistance, and toxicity to immune checkpoint blockade. *Cell*, **2021**, 184(21), 5309–5337.
 - 31 Zhang, R.; Lv, Z. Y.; Chang, L. L.; Wang, J.; Tang, J. P.; Wang, Z. Q.; Li, S. Q.; Guo, J. F.; Yao, C.; Yang, D. Y. A responsive DNA hydrogel containing poly-aptamers as dual-target inhibitors for localized cancer immunotherapy. *Adv. Funct. Mater.*, **2024**, 34(32), 2401563.
 - 32 Weber, E. W.; Maus, M. V.; MacKall, C. L. The emerging landscape of immune cell therapies. *Cell*, **2020**, 181(1), 46–62.
 - 33 Larson, R. C.; Maus, M. V. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells. *Nat. Rev. Cancer*, **2021**, 21(3), 145–161.
 - 34 Myers, J. A.; Miller, J. S. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2021**, 18(2), 85–100.
 - 35 Bremnes, R. M.; Busund, L. T.; Kilvær, T. L.; Andersen, S.; Richardsen, E.; Paulsen, E. E.; Hald, S.; Khanekhenari, M. R.; Cooper, W. A.; Kao, S. C.;

- Dønne, T. The role of tumor-infiltrating lymphocytes in development, progression, and prognosis of non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, **2016**, 11(6), 789–800.
- 36 Yang, S.; Wu, J. L.; Wang, Z. Y.; Cheng, Y.; Zhang, R.; Yao, C.; Yang, D. Y. A smart DNA hydrogel enables synergistic immunotherapy and photodynamic therapy of melanoma. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2024**, 63(14), e202319073.
- 37 Yang, S.; Tang, J. P.; Cheng, Y.; Liu, M. X.; Lv, Z. Y.; Zhang, R.; Zhang, C. Z.; Yao, C.; Yang, D. Y. Smart DNA network capturing and destructing tumor-derived small extracellular vesicles at tumor sites for localized cancer therapy. *Adv. Funct. Mater.*, **2024**, 34(44), 2404900.
- 38 Zhao, H. X.; Wang, Z. Y.; Yang, S.; Zhang, R.; Guo, J. F.; Yang, D. Y. Energy-storing DNA-based hydrogel remodels tumor microenvironments for laser-free photodynamic immunotherapy. *Biomaterials*, **2024**, 309, 122620.
- 39 Zhao, H. X.; Wang, L. J.; Yang, S.; Li, Z. Y.; Guo, X. C.; Zuo, C.; Xie, G. M.; Yao, C.; Yang, D. Y. Smart energy-storing DNA hydrogel for on-demand laser-free photoimmunotherapy of melanoma. *J. Am. Chem. Soc.*, **2025**, 147(24), 21194–21208.
- 40 Wang, D. Y.; Liu, J. W.; Duan, J.; Yi, H.; Liu, J. J.; Song, H. W.; Zhang, Z. Z.; Shi, J. J.; Zhang, K. X. Enrichment and sensing tumor cells by embedded immunomodulatory DNA hydrogel to inhibit postoperative tumor recurrence. *Nat. Commun.*, **2023**, 14(1), 4511.
- 41 Ignatiadis, M.; Sledge, G. W.; Jeffrey, S. S. Liquid biopsy enters the clinic: implementation issues and future challenges. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2021**, 18(5), 297–312.
- 42 Lone, S. N.; Nisar, S.; Masoodi, T.; Singh, M.; Rizwan, A.; Hashem, S.; El-Rifai, W.; Bedognetti, D.; Batra, S. K.; Haris, M.; Bhat, A. A.; Macha, M. A. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Mol. Cancer*, **2022**, 21(1), 79.
- 43 Dixon, A. C.; Dawson, T. R.; Di Vizio, D.; Weaver, A. M. Context-specific regulation of extracellular vesicle biogenesis and cargo selection. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2023**, 24(7), 454–476.
- 44 Kalluri, R.; LeBleu, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, **2020**, 367(6478), eaau6977.
- 45 Liu, J. Y.; Ren, L. W.; Li, S.; Li, W.; Zheng, X. J.; Yang, Y. H.; Fu, W. Q.; Yi, J.; Wang, J. H.; Du, G. H. The biology, function, and applications of exosomes in cancer. *Acta Pharm. Sin. B*, **2021**, 11(9), 2783–2797.
- 46 Li, Y. K.; Deng, J. Q.; Han, Z. W.; Liu, C.; Tian, F.; Xu, R.; Han, D.; Zhang, S. H.; Sun, J. S. Molecular identification of tumor-derived extracellular vesicles using thermophoresis-mediated DNA computation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143(3), 1290–1295.
- 47 Park, J.; Park, J. S.; Huang, C. H.; Jo, A.; Cook, K.; Wang, R.; Lin, H. Y.; van Deun, J.; Li, H. Y.; Min, J.; Wang, L.; Yoon, G.; Carter, B. S.; Balaj, L.; Choi, G. S.; Castro, C. M.; Weissleder, R.; Lee, H. An integrated magneto-electrochemical device for the rapid profiling of tumour extracellular vesicles from blood plasma. *Nat. Biomed. Eng.*, **2021**, 5(7), 678–689.
- 48 He, Y. Q.; Zeng, X. H.; Xiong, Y.; Shen, C. C.; Huang, K.; Chen, P. P. Portable aptasensor based on parallel rolling circle amplification for tumor-derived exosomes liquid biopsy. *Adv. Sci.*, **2024**, 11(32), 2403371.
- 49 Lin, D. F.; Shen, L. S.; Luo, M.; Zhang, K.; Li, J. F.; Yang, Q.; Zhu, F. F.; Zhou, D.; Zheng, S.; Chen, Y. D.; Zhou, J. J. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2021**, 6, 404.
- 50 Dive, C.; Brady, G. SnapShot: circulating tumor cells. *Cell*, **2017**, 168(4), 742–742.e1.
- 51 Wang, J.; Tang, J. P.; Liang, A. Q.; Cui, Z.; Huo, J. L.; Li, Q.; Ke, B.; Yang, D. Y.; Yao, C. A smart DNA network-based diagnostic system for enrichment and detection of circulating tumor cells in cancer liquid biopsy. *Anal. Chem.*, **2025**, 97(14), 8065–8072.