

基于DNA纳米限域平台的信号放大策略在活细胞miRNA成像中的研究进展

邱子玥, 黄诗诗, 侯雅婷, 张璐茵, 黄 婷, 陈 俊*

(南方医科大学 药学院, 广东 广州 510000)

摘要: 活细胞内低丰度microRNA (miRNA) 的原位、实时成像对于揭示疾病动态生物学机制至关重要。然而, 传统游离探针体系面临胞内核酸酶降解、分子碰撞效率低及背景干扰严重等瓶颈。基于DNA纳米限域平台的信号放大策略, 通过将等温核酸扩增组件精准锚定于DNA四面体、DNA纳米笼、DNA纳米球或DNA纳米机器等三维框架内, 将随机的自由扩散反应转化为高效的局域级联放大, 从而为突破上述瓶颈提供了创新性解决方案。该文系统综述了该类平台的核心机制与应用进展: 首先阐述DNA纳米结构的生物稳定性基础, 继而分析其细胞摄取与胞内递送途径, 并从物理机制角度解析限域空间内局部有效浓度提升与反应动力学加速的本质; 在此基础上, 归纳了基于DNA四面体、纳米笼、多重限域网络及纳米机器的设计策略及其在活细胞miRNA高灵敏、高特异性成像中的应用。最后, 文章讨论了该领域仍面临的挑战, 并展望了多技术融合的发展趋势, 以期为推动DNA纳米限域平台的临床转化提供参考。

关键词: microRNA (miRNA); DNA纳米结构; 活细胞成像; 核酸扩增; 空间限域效应

中图分类号: O629.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(XXXX)XX-0001-14

Advances in Signal Amplification Strategies Based on DNA Nano-confinement Platforms for microRNA Imaging in Living Cells

QIU Zi-yue, HUANG Shi-shi, HOU Ya-ting, ZHANG Lu-yin, HUANG Ting, CHEN Jun*

(School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510000, China)

Abstract: The in situ, real-time imaging of low-abundance microRNA (miRNA) in living cells is crucial for elucidating the dynamic biological mechanisms of diseases. However, conventional free-probe systems suffer critical bottlenecks, including intracellular nuclease degradation, low intermolecular collision efficiency, and severe background interference. Signal amplification strategies based on DNA nano-confinement platforms address these challenges by anchoring isothermal nucleic acid components within three-dimensional frameworks, such as DNA tetrahedra, nanocages, nanospheres, and nanomachines, thereby converting stochastic free-diffusion reactions into a highly efficient localized cascade amplification. This review summarizes the core mechanisms and advances in the application of such platforms. It first elaborates the biological stability basis of DNA nanostructures, and analyzes their cellular uptake and intracellular delivery pathways. Then, the physical mechanisms underlying the increase in the local effective concentration and the acceleration of reaction kinetics within confined spaces are discussed. On this basis, the review consolidates the design strategies for platforms based on DNA tetrahedra, nanocages, multiplex confinement networks, and nanomachines, as well as their applications in highly sensitive and specific miRNA imaging in living cells. Finally, the remaining challenges in this field are discussed and future trends toward integrating multiple technologies are envisioned to provide a reference for advancing the clinical translation of DNA nano-confinement platforms.

Key words: microRNA; DNA nanostructures; live-cell imaging; nucleic acid amplification; spatial confinement effect

MicroRNA (miRNA) 是一类长度约为18~25个核苷酸的内源性短链非编码RNA分子, 在基因表达

收稿日期: 2026-05-22; 修回日期: 2026-06-26

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金-面上项目 (2026A1515011706)

* 通讯作者: 陈 俊, 博士, 副教授, 研究方向: 生命科学分析, E-mail: chenj258@smu.edu.cn

的转录后调控中发挥着不可或缺的作用。自首次被发现以来, miRNA 已被公认为众多基本生物学过程的关键调控因子, 包括细胞分化、增殖、凋亡、代谢以及免疫反应^[1-2]。在机制上, miRNA 主要通过目标信使 RNA (mRNA) 的 3'-非翻译区 (3'-UTR) 内的互补序列结合, 导致翻译抑制或 mRNA 降解^[3]。由于单一 miRNA 种类能够同时调控数百个下游靶基因, miRNA 表达谱的失调与广泛疾病的发生和发展密切相关, 其中最突出的包括各类癌症、心血管疾病、神经系统疾病和代谢综合征^[4-5]。因此, miRNA 已成为用于早期疾病诊断、患者分层和治疗监测的极具潜力的生物标志物。

在活细胞中以高时空分辨率对 miRNA 进行成像, 对于揭示疾病进展中的动态生物学信息至关重要^[6]。与传统的体外分析方法 (如 Northern 印迹、实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (RT-qPCR) 和微阵列杂交) 相比, 活细胞 miRNA 成像能够在细胞水平实时监测 miRNA 表达的时空变化, 且无需裂解细胞, 避免了因细胞处理造成的生理状态干扰^[7-8]。miRNA 的表达不仅在不同细胞类型和组织之间存在异质性, 并且会随着环境刺激及病理状态而发生动态变化。在天然的细胞内环境中实时捕获这些动态特征, 为了解 miRNA 相关的调控网络提供了不可替代的视角, 并使得在分子水平上深入解析疾病机制成为可能。然而, 活细胞 miRNA 成像面临着常规检测方法难以克服的技术挑战。多数细胞中 miRNA 的丰度低, 家族成员序列同源性高, 胞内环境复杂、富含核酸酶且空间拥挤, 这会使未受保护的核酸探针被快速降解^[9-11]。同时, 在活细胞环境中, 将真实的 miRNA 信号与背景荧光噪声有效区分也极具挑战, 非特异性相互作用和自发荧光是常见的干扰因素。这些限制推动了研究人员开发更灵敏、更特异且具有更优生物相容性的细胞内成像平台。

目前, 信号放大策略已成为一种关键检测技术。其中, 等温核酸扩增技术, 包括杂交链式反应 (HCR)、催化发夹自组装 (CHA)、链置换扩增 (SDA) 以及熵驱动催化回路 (EDR)^[12-13], 因能在生理条件下产生信号放大且无需热循环而受到广泛关注。然而, 这些扩增系统若以自由扩散的形式存在于细胞质中, 其性能常受到多种因素制约: 细胞内核酸酶对探针的降解、细胞区室化引起的稀释效应, 以及低探针浓度下分子碰撞的随机性, 共同限制了扩增效率。

近年来广泛报道的将信号扩增元件组装于 DNA 纳米框架内部或表面, 从而产生限域效应的检测技术, 成为提升检测性能的重要方向。首先, 空间限域可缩短反应物组分的间距, 提高局部有效浓度并增大分子碰撞频率, 从而显著加快核酸扩增回路的反应动力学。其次, 空间限域还能有效降低探针间及探针与靶标相互作用过程中的熵罚, 提升杂交级联反应的热力学驱动力。第三, DNA 纳米框架的结构刚性与紧凑性可保护被封装的核酸探针, 使其免受酶促降解以及与细胞内蛋白质和 RNA 非特异性相互作用的影响, 大幅提升探针在复杂细胞环境中的稳定性和检测准确度。鉴于上述优势, 本文系统综述了基于 DNA 纳米限域平台的信号放大策略在活细胞 miRNA 成像中的研究进展, 以期为推动该领域技术创新与临床转化提供参考。

1 DNA 纳米限域平台的核心优势与作用机制

1.1 DNA 纳米结构的生物稳定性

DNA 纳米探针在活细胞内发挥功能的前提, 是在富含核酸酶、蛋白酶等降解因子的复杂胞内环境中维持结构完整性。单链 DNA (ssDNA) 在进入细胞后数分钟内即可被核酸酶降解, 而 DNA 序列、骨架几何构型、螺旋沟槽宽度、曲率及柔性等多种参数均可能影响其抗核酸酶性能。相比之下, 三维 DNA 纳米结构凭借其非天然的几何构型与物理尺寸, 可产生显著的空间位阻, 有效屏蔽核酸酶与底物结合位点的接触, 从而降低特异性或非特异性酶切的效率^[14-16]。此外, 结构内部紧密排列的双螺旋结构与频繁的链交叉亦可通过空间位阻进一步阻断核酸酶的结合与破坏^[15, 17]。

在各类用于活细胞成像的 DNA 纳米结构中, DNA 四面体 (TDN) 的抗核酸酶特性已被广泛表征。Keum 团队的研究表明^[18], 与相同序列的线性 DNA 相比, DNA 四面体因其特有的空间几何拓扑, 对多类核酸酶表现出显著的抗降解能力。在针对限制性内切酶 (如 DdeI)、非特异性内切酶 (如 DNase I) 以及含内/外切酶的胎牛血清 (FBS) 的降解实验中, DNA 四面体的降解时间常数均高于线性对照组。这种生物稳定性主要归因于以下机制: TDN 结构的位阻效应抑制了核酸酶与特定底物位点的有效结合; 顶点处的拓扑特征对其相邻的序列位点提供了固有的物理保护作用; 最后, 将 TDN 缺口进行共

价连接以封闭游离 3' 末端，不仅消除了外切酶的攻击位点，还大幅提升了结构刚性，从而有效抵抗了核酸酶水解反应所必需的过渡态 DNA 螺旋构象扭曲。

1.2 DNA 纳米结构的细胞摄取与胞内递送机制

DNA 纳米框架凭借独特的空间构型与物理尺寸，能够以无须转染试剂辅助的非侵入性方式高效穿透细胞膜，其细胞摄取是多种因素协同驱动的复杂生物界面相互作用过程。在理论模型中，TDN 结构尖锐的几何顶点可能使细胞膜表面电荷发生局部重排，减弱带负电的 DNA 骨架与磷脂双分子层间的静电排斥，有助于膜的弯曲与内化过程^[19]。另一方面，DNA 骨架富含磷酸基团，使球形核酸与 DNA 折纸结构表面呈现密集的负电荷，并作为配体，被细胞膜表面的 A 类清道夫受体特异性识别，进而通过脂筏或小窝蛋白介导的内吞作用完成跨膜摄取^[20-21]。单颗粒示踪及内吞抑制实验证实，DNA 纳米框架能够通过小窝蛋白或网格蛋白介导的内吞途径进入细胞，随后沿胞内微管网络动态运输，并最终聚集于溶酶体中。若在此基础上修饰核酸适配体或核定位信号，则可引导 DNA 框架实现溶酶体逃逸并靶向细胞质或细胞核^[22-25]。

然而，上述递送过程在生理环境中面临一个关键障碍：当 DNA 纳米框架暴露于含血清的复杂生物环境中时，表面会快速吸附血液蛋白形成非特异性蛋白冠，这一过程不仅可能掩蔽功能性修饰序列（如介导内体逃逸的多肽），导致摄取效率下降或溶酶体滞留，还会影响其在体内的代谢分布^[26]。针对这一挑战，Ahn 等^[27]提出将蛋白冠由于干扰因素转化为递送驱动力的策略：通过在 DNA 骨架上定点引入多价疏水修饰，特异性地招募血清中的靶向脂蛋白（如 ApoE），在原位构建具有生物活性的“脂蛋白冠”。该经过设计的功能性蛋白冠可直接与靶细胞（如肝细胞及纤维化组织细胞）表面的特异性受体发生高亲和力结合，将蛋白冠转化为介导受体特异性内吞的内源性驱动力，实现精准递送。

此外，溶酶体降解是胞内递送的另一核心障碍。为此，研究人员利用小窝蛋白介导内吞囊泡的物理尺寸限制（60~80 nm），将 CHA 与 DNA 瓦片（DNA tile）自组装技术相结合，构建了尺寸约 63 nm 的 9-tile DNA 纳米阵列。该阵列在空间上几乎占满了小窝囊泡的内部空间，所产生的“空间占位效应”有效阻碍了小窝囊泡与溶酶体的正常融合。内吞后，该阵列因此能够绕过内体-溶酶体途径，大量释放并富集于细胞质中，实现细胞质内的直接递送^[28]。由此可见，DNA 纳米结构的尺寸、形状和表面化学性质共同影响了其内吞途径，通过合理的纳米结构工程化设计，可提高胞内递送效率，提高检测的准确性。

1.3 限域空间内的探针杂交与信号放大机制

在传统的溶液相放大系统（如 CHA 或 HCR）中，发夹探针以游离分子形式分散于均相溶液中。在此条件下，互补发夹之间的有效碰撞完全依赖于随机的布朗扩散，导致反应动力学缓慢、放大循环不完全，非特异性探针相互作用也易引起背景信号升高。单纯提高游离底物浓度虽能加速反应，却不可避免地引发非特异性杂交，造成信号泄漏。为突破这一热力学与动力学瓶颈，DNA 纳米框架被广泛用于精准锚定亚稳态 DNA 发夹或催化探针。将信号放大组件定点固定于纳米框架上，可使反应模式由缓慢的、自由扩散的双分子反应转变为快速的局域化级联反应^[29-30]。

这一动力学增强源于分子间的邻近效应与局部有效浓度的提升。依据碰撞频率理论，将 DNA 探针限域在框架核酸的内部刚性空间或二维/三维界面上，可显著缩短探针间距，使局部有效浓度较自由扩散状态提高数个数量级。局部浓度的升高大幅增加了有效碰撞频率，从而克服了游离体系中低浓度所致的动力学瓶颈^[31-32]。动力学分析进一步表明，信号放大速率的提升高度依赖于探针的锚定密度与空间排布。当锚定探针间的平均物理距离小于自发杂交临界距离时，体系会优先以极高效率进行框架内的局域级联反应，而非低效的自由扩散反应^[33]。这不仅可成倍提升反应速率，显著降低检测限，还通过空间位阻有效屏蔽了复杂生物环境中的非特异性干扰，为在活细胞内实现低丰度靶标的超灵敏、实时精准成像奠定了理论基础。

在理解 DNA 纳米限域效应调控杂交反应动力学的基础层面，Zuo 等^[34]的工作提供了重要的机制参照。他们提出了一种基于四面体 DNA 框架（TDF）纳米结构（边长 37 bp，理论尺寸约 12.6 nm）的 ssDNA 纳米力学拉伸策略：将一对 TDF 分别通过独特的悬挂连接臂（UPL）结合于目标 ssDNA 两端，借助 TDF 的刚性尺寸效应与两结构间的静电排斥力，将原本随机卷曲的 ssDNA 强制拉伸至伸展构象，

其表观拉伸长度(约 21 nm)接近等碱基数双链 DNA 的轮廓长度。以该 ssDNA-TDF 复合体为核心构建的"桥式 DNA 传感器",在 500 nmol/L 目标浓度下可在 1 min 内完成杂交(较传统 ssDNA 快约 20 倍),杂交效率由约 26% 提升至约 98%,检测限低至 1 fmol/L,并能有效区分单碱基错配,同时在血清和全血等复杂生物基质中保持稳定性能。该工作的核心贡献在于从单分子层面阐明了框架刚性调控 ssDNA 构象进而影响杂交动力学的物理机制。作者明确指出,胞内 DNA 杂交反应本质上发生在张力状态下而非自由伸展态,受细胞内时空微环境的精确调控,表明 TDF 限域效应在体外体系中所呈现的动力学优势,在生理环境中具有内在合理性。

然而,限域效应对放大效率的调控并非单调正向的,其在实际体系中存在不可忽视的弊端。研究表明,随着探针锚定密度的增大,相邻探针之间的空间位阻与静电排斥效应会显著降低靶标对探针的可及性,导致杂交亲和常数随密度升高而单调下降,当密度超过临界阈值后,杂交效率甚至可降至极低水平^[35-37]。与此同时,密集排布所引发的构象受限一方面会阻碍亚稳态发夹结构的正常开放,另一方面可诱导相邻发夹探针在无靶标条件下发生自发性瞬态解链,产生非特异性信号泄漏^[38]。值得注意的是,局部浓度的过度提升在加速反应动力学的同时,也可能进一步加剧 CHA 与 HCR 体系的本底信号放大,降低信噪比。上述效应表明,探针锚定密度与放大效率之间存在非线性的最优窗口关系,过低的密度无法充分发挥邻近效应的动力学优势,过高的密度则因空间位阻、静电排斥与构象受限的共同作用导致级联效率下降甚至信号失真。针对这一内在矛盾,研究者已发展出若干工程化策略以寻求最优平衡:将发夹探针锚定于四价四面体 DNA 纳米结构(qTDN)四个相互分离的顶点,可在维持适当邻近效应的同时有效规避高密度排布引起的立体位阻,使 HCR 反应速率较传统自由扩散体系提升约 70 倍^[39];设计双层三维 DNA 纳米机器(UDDNM),将捕获发夹(H1)与信号发夹(H2)分置于外层与内层,可显著降低核酸层周围的空间位阻,在 3 min 内实现高效循环放大^[40]。由此可见,DNA 纳米限域策略的工程化设计需要在探针间距、锚定密度与空间构型之间寻求平衡,才能充分发挥限域动力学优势、同时规避过度限域抑制反应速率。

2 基于 DNA 纳米限域平台的信号放大策略及其应用

等温核酸扩增技术虽在活细胞 miRNA 成像领域展现出巨大潜力,但传统游离体系受限于分子碰撞效率低、反应动力学缓慢等固有缺陷,在复杂胞内环境中的实际性能有限。为此,研究者通过将信号放大组件整合至 DNA 四面体、DNA 纳米笼、DNA 纳米球及 DNA 纳米机器等不同类型的限域支架,开发了一系列性能各具特色的限域信号放大策略。以下按平台类型分类进行系统综述。

2.1 DNA 四面体

DNA 四面体(TDN)以其高度可编程的刚性骨架,为各类等温核酸扩增策略提供了理想的限域平台,并在动力学增强、靶标识别、灵敏度提升等多个维度展现出显著优势。

在无酶等温信号放大策略方面,TDN 的刚性骨架为探针的空间限域提供了精确可控的物理约束。Lin 等^[41]通过在 TDN 顶点组装由 miRNA 触发的 HCR 级联反应系统(T-probe),实现了细胞内的 miR-21 的高效检测(图 1A)。借助 TDN 的刚性骨架,参与级联反应的发夹探针被物理约束在 6.8 nm (20 bp)的距离内,有效增加了碰撞频率。相较于均相游离体系,T-probe 的反应动力学提升了 3 倍,对 miR-21 的检测限达到 0.1 nmol/L,并在活体小鼠成像评估中展现出快速响应能力(瘤内注射后 15 s、尾静脉注射后 10 min 即可产生显著荧光信号)。为满足复杂生物环境中的多重分析需求,Huang 等^[42]在 TDN 的不同顶点进行了模块化组装,分别引入了靶向肿瘤细胞膜的 AS1411 适配体、双靶标识别单元以及 CHA 扩增模块(图 1B),成功实现了对肿瘤细胞内 miRNA-21 与 miRNA-155 的同步灵敏成像,检测限分别低至 26 pmol/L 和 85 pmol/L。

然而,DNA 四面体的限域在增加探针浓度、缩短探针间距离的同时,也会不可避免地产生非特异性杂交,导致背景信号增加。为克服此局限性,Chen 等^[43]开发了一种基于 DNA 四面体和光控分子内催化发夹自组装(TCHA-P)的检测策略,通过光敏基团(PC-linker)封闭 toehold,仅在系统成功转染入细胞并施加特定的紫外光照射后,PC-linker 发生光解离,暴露 toehold 序列,触发 CHA 反应,消除了探针组装和转染过程中的非特异性扩增,从而大幅降低背景信号并提高成像对比度。而 Lu 等^[44]

提出了一种基于 TDN 并受内源性 GSH 和 APE1 双重控制的熵驱动催化 (EDC) 电路 (FEED) (图 1C), 由 TDN、燃料载体模块 (包含燃料链 F 和带有二硫键的阻断链 Ds) 和 miRNA 传感模块 (由报告链 Rs、带有 AP 位点的辅助链 As 和猝灭链 Qs 组成) 组成, 探针在到达靶细胞前缺乏燃料链和结合位点, 只有在肿瘤细胞中同时满足 GSH 和 APE1 双重触发条件时, 反应底物才会被原位释放, 进而发生 EDC 信号放大反应, 产生荧光输出, 减弱了体外组装及跨膜转染阶段因探针相互作用产生的背景信号。

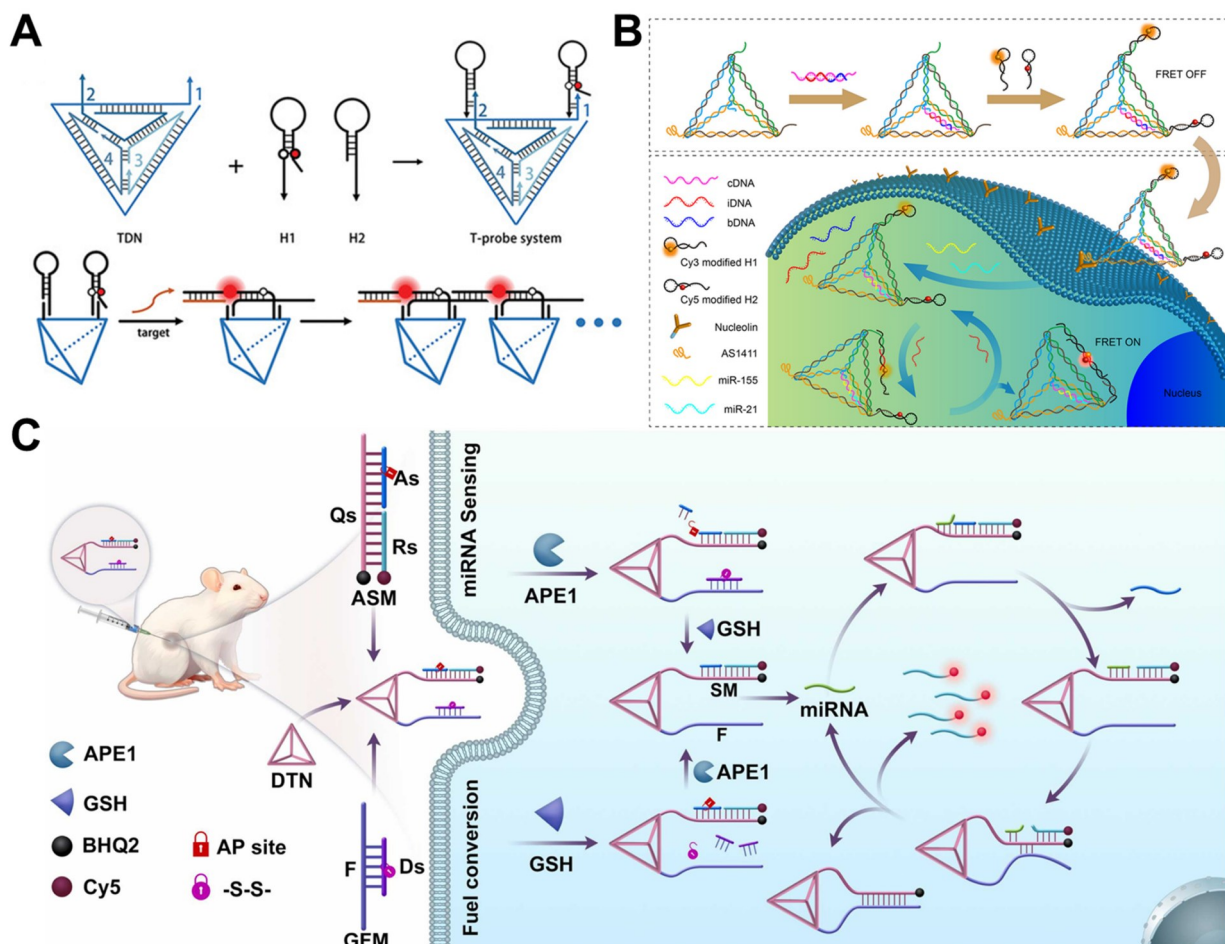


图 1 基于 TDN 的限域信号放大策略用于 miRNA 荧光成像

Fig. 1 Tetrahedral DNA nanostructure (TDN)-based confined signal amplification strategies for microRNA (miRNA) fluorescence imaging

A. T-probe system: A spatially confined hybridization chain reaction (HCR) accelerates the reaction kinetics for efficient in vivo miRNA imaging^[41]; B. intramolecular CHA platform: An aptamer-targeted delivery coupled with fluorescence resonance energy transfer (FRET) achieves the simultaneous dual imaging of miR-21 and miR-155^[42]; C. FEED circuit: glutathione (GSH) / apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) dual-activation enables highly specific in vivo imaging of miR-21^[44] (A. T-probe system: 利用空间限域 HCR 提升反应动力学, 实现活体 miRNA 高效成像^[41]; B. 分子内 CHA 平台: 通过适配体靶向递送, 结合 FRET 实现 miR-21/155 双重同步成像^[42]; C. FEED 电路: 经由 GSH/APE1 双重激活, 用于 miR-21 的高特异性成像^[44])

2.2 DNA 纳米笼

DNA 纳米笼是由 6 条 ssDNA 通过一步自组装制备的六面立方体骨架。DNA 纳米笼凭借其刚性可编程骨架、精确可调控的内部空腔、优异的生物相容性, 在限域信号放大领域展现出独特优势: 从分子筛分 (尺寸排阻前体干扰) 到反应加速 (局部有效浓度倍增), 再到抗酶解保护, 形成了一套多维度协同增效的传感平台。

在反应动力学增强方面, Chen 等^[31] 将局域催化发夹自组装 (L-CHA) 封装于 20 bp 的框架核酸 (FNA) 内腔中, 组装为空间限域扩增机器 (L-DNC) (图 2A)。空间限域效应将 L-CHA 的反应速率提升了 14.34 倍, 局部有效浓度提升 5000 倍, 检测限低至 40 pmol/L, 实现了活细胞内 miRNA 的灵敏检测。FNA 的刚性三维框架为内部的 CHA 探针提供了物理屏障, 通过空间位阻有效阻断了胞内蛋白及核酸酶的非特异性降解, 提升了探针在活细胞中的稳定性, 并抑制了由复杂细胞内环境引起的非特异性

信号泄漏与假阳性干扰。

在检测精准度提升方面, Zhang 等^[45]将限域策略与布尔逻辑运算结合, 设计了一种双激活 DNAzyme 传感器 (mDz), 将其封装在 DNA 纳米笼 (C-mDz) 中, 实现了对 miRNA 和金属离子的“与”门逻辑分子成像 (图 2C)。其工作原理为: mDz 经 miR-21 触发链置换反应激活 DNAzyme 活性, 再由 Zn^{2+} 催化切割产生荧光信号, 仅在两者共同存在时产生显著荧光信号, 检测限分别为 0.85 nmol/L (miR-21) 和 0.22 $\mu\text{mol/L}$ (Zn^{2+})。DNA 纳米笼的物理封装显著提升了 mDz 的生物稳定性与细胞递送效率 (在 10% FBS 中孵育 10 h 后仍保持结构完整), 有效降低了胞内背景信号, 信噪比明显优于表面锚定的对照探针, 减少了信号泄漏, 实现了体外及活体疾病模型中双靶标的高信噪比动态联合监测。

DNA 纳米笼的内腔不仅能封装被动扩散的反应网络, 亦可作为集成多源能量驱动模块的检测平台。Chen 等^[46]构建了内源性 mRNA 驱动的空间限域 DNA 纳米机器 (RL-cube) (图 2B), 在 20 bp DNA 纳米笼中封装局域目标链置换组件 (L-SD) 和 toehold-exchange 内源动力组件 (R-mRNA), 实现了对细胞内 miRNA Let-7a 的快速、高灵敏比率荧光成像。RL-cube 以细胞内高丰度的 GAPDH 作为生物“燃料”, 结合 DNA 框架的空间限域效应, 使内腔反应组件的局部浓度提升了 2240 倍, 反应速率增至约 4 倍, 响应时间缩短至 7 分钟, 检测限达 7.57 pmol/L (PBS 缓冲液中), 在稀释血清中检测限为 1.07 nmol/L, 表明该平台在复杂生物基质中仍具备良好的检测性能, 同时具备良好的核酸酶稳定性、生物相容性和细胞摄取效率。为实现更精准的时空控制, Li 等^[47]将外源性光驱动力引入该体系, 他们将含有光敏化学键 (PC-bond) 的发夹探针与 808 nm 近红外光激发的上转换纳米颗粒 (UCNPs) 偶联并封装于纳米笼内。近红外光照下, 光解离和 miR-21 识别协同触发腔内的 CHA 级联放大。DNA 纳米笼有效保护了内部探针免受核酸酶降解, 使 CHA 反应动力学提升了 10 倍, 局部浓度增加了 33.03 倍, 检测限低至 19.56 fmol/L。

在诊疗一体化应用方面, Dong 等^[48]开发了基于 DNA 纳米笼的诊疗一体化平台 HDN-CHA-TPP (图 2C), 将细胞内 miRNA 的分子识别信号转化为针对线粒体的物理干预。HDN-CHA-TPP 由 DNA 纳米笼为支架, 整合响应 miR-21 的 CHA 模块和用于亚细胞定位的线粒体靶向三苯基膦 (TPP) 基团。将 CHA 发夹结构限制在 HDN 框架内, 检测限低至 0.072 nmol/L, 灵敏度显著优于游离的 CHA 探针系统。探针发夹序列中引入的锁核酸 (LNA) 和硫代磷酸酯修饰, 配合刚性的 DNA 纳米笼, 使其在酸性缓冲液或含 10% 血清的生理环境中均能保持结构稳定, 有效抵抗核酸酶降解。在 miR-21 的触发下, HDN-CHA-TPP 在线粒体表面发生动态组装, 引发线粒体膜电位降低、活性氧生成以及钙离子超载。线粒体受损后会促使线粒体通透性转换孔 (mPTP) 持续开放, 使线粒体 DNA (mtDNA) 释放到细胞质中, 进而作为内源性免疫激动剂激活 cGAS-STING 免疫通路, 促进树突状细胞成熟和 CD8⁺ T 细胞浸润, 在无明显全身毒性的条件下实现了对原发性及转移性肿瘤生长的有效抑制。

另外, 在选择性识别方面, 肿瘤细胞内高丰度的前体 miRNA (pre-miRNA) 常因含有与成熟 miRNA 相同的识别序列而产生背景干扰。针对这一问题, Ke 与 Sun 等^[49-50]利用 DNA 纳米笼 (DNA cage/Acage) 构建了智能荧光传感平台, 利用其内部空腔的尺寸排阻效应, 允许短序列的成熟 miRNA 自由扩散进入内腔并触发分子识别, 同时将较长的 pre-miRNA 阻隔在外, 有效降低了前体分子的信号干扰, 实现了对成熟 miRNA 的高选择性检测。未来研究有望将该尺寸排阻机制与空间限域信号放大策略相结合, 构建兼具高靶标选择性与高信号增益的传感网络, 推进复杂生理环境下低丰度成熟 miRNA 的精准原位成像。

2.3 多重限域网络

利用多分支 DNA 单体自组装构建高密度 DNA 纳米球, 可在单位空间内大幅增加信号分子数量, 从而显著提升局部探针密度与检测灵敏度。然而, 高度致密的三维交联网络不可避免地增加了靶标分子向内渗透的传质阻力。引入响应性结构解组装机制, 是克服这一瓶颈的有效手段。

Huang 团队^[51]设计了一种由 Y 型 DNA 单体自组装形成的尺寸可调纳米球 (图 3A)。在内源性靶标 miRNA 的触发与 ATP 供能的协同作用下, DNA 纳米球发生动态循环解离, 逐级释放荧光标记链并输出 FRET 信号, 检测限低至 36.0 pmol/L。该纳米球可通过网格蛋白与巨胞饮途径高效内化并实现内体逃逸, 在活细胞及小鼠模型中展现出特异性的 miRNA 原位成像能力。在此基础上, 该团队进一步开发了

集成靶标识别、逻辑门控、信号放大和信号输出功能于一体的 DNA 纳米球平台 ADNS^[52] (图 3B)。ADNS 通过 Y 型和 I 型 DNA 基序的可编程自组装构建逻辑门控纳米球, 当靶标 miRNA (miR-21 和/或 miR-155) 触发 I 型模块内的链置换反应后, 释放出单链 DNA, 随即与 Y 型模块相互作用, 暴露 ATP 适配体区域, 内源性 ATP 与该适配体结合并诱导构象转换, 进而触发 Y 型模块解离和纳米球的熵驱动解体, 产生 FRET 信号。该平台在 10% FBS 孵育 10 h 后结构仍保持完整, 实现了癌细胞和活体内 miRNA 的特异性原位成像。

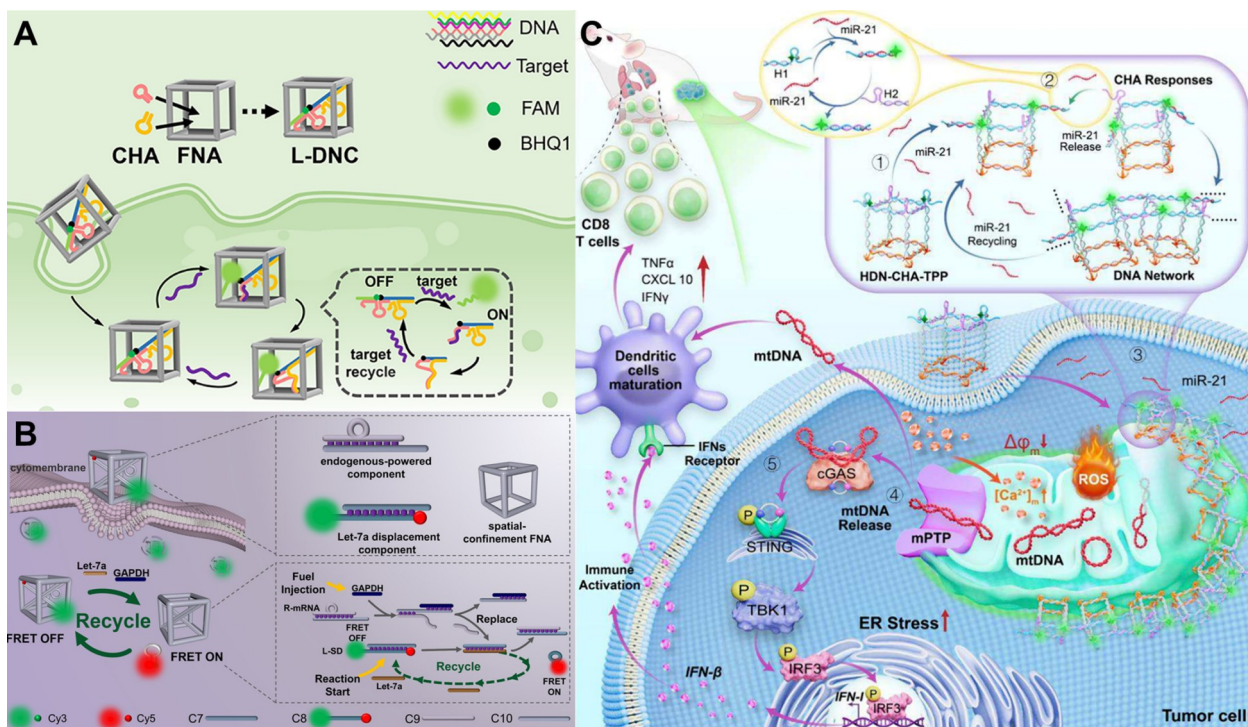


图2 基于DNA纳米笼的限域信号放大与成像平台

Fig. 2 DNA nanocage-based confined signal amplification and imaging platforms

A. Localized deoxynucleotide carrier (L-DNC) system utilizes spatial confinement to encapsulate catalytic hairpin assemblies (CHAs), enabling efficient fluorescence imaging of miRNA in living cells^[31]; B. RL-cube nanodevice relies on endogenous glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA to drive strand displacement and target recycling, achieving highly sensitive imaging of Let-7a^[46]; C. HDN-CHA-TPP platform: An organelle-targeted theranostic nano system^[48] (A. L-DNC system: 利用空间限域封装CHA发夹, 实现活细胞内 miRNA 的高效荧光成像^[31]; B. RL-cube 机器: 依托内源 GAPDH mRNA 驱动链置换与目标循环, 实现 Let-7a 高灵敏成像^[46]; C. HDN-CHA-TPP 平台: 靶向特定细胞器的诊疗一体化纳米系统^[48])

在级联放大策略方面, Lin 等^[53] 设计了两种 DNA 纳米球 (DS-13 和 DS-24), 分别负载 CHA 和 HCR 发夹 (图 3C): 靶标 miRNA 首先触发 CHA, 随后激活 HCR, 产生 FRET 信号。该系统将级联反应与空间限域效应相结合, 获得了更快的反应动力学, 检测限低至 0.24 pmol/L。DNA 纳米球的致密三维结构从物理层面保护了探针序列免受核酸酶降解, 使其在含有 10% FBS 或 DNase I 等复杂生物环境中仍能保持高度稳定, 且无需额外转染试剂即可实现活细胞有效内吞。

在递送途径调控方面, 随着组装体尺寸和复杂度的增加, 其进入活细胞时被内吞体-溶酶体途径捕获并降解的风险也随之升高。为改善溶酶体逃逸效率, 除被动增强结构刚性外, 研究者开始通过调节组装体的拓扑形貌主动干预细胞摄取途径。Wu 等^[28] 利用 DNA 瓦片自组装技术构建了约 50 nm 的二维平面纳米阵列 (图 3D): 与球形或不规则的大型三维网络不同, 该特定尺寸的二维刚性阵列主要通过小窝蛋白介导的内吞进入细胞。由于该摄取途径减少了与内体-溶酶体途径的共定位, 从而在物理路径上减少了探针的降解损耗, 限域反应网络在细胞质中的有效工作浓度显著提升, 从而实现了高灵敏、高特异性的活细胞 miRNA 信号放大成像。

2.4 DNA 纳米机器

DNA 纳米机器通过整合刚性支架、动态运动机制及多功能响应模块, 在信号放大效率、生物稳定性及多类型生物标志物检测等方面进一步拓展了 DNA 纳米限域平台的应用范围。

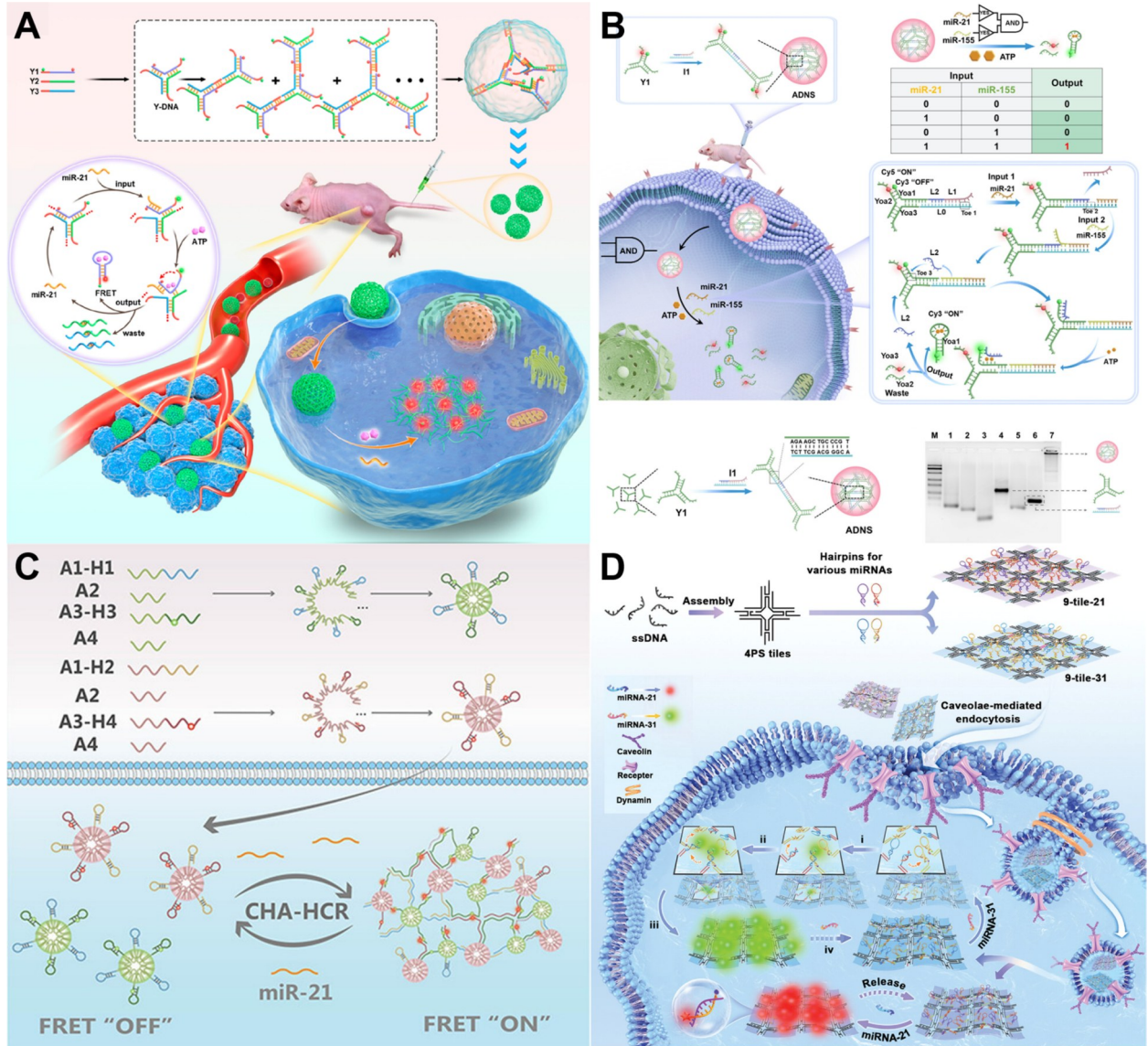


图3 基于多重限域网络的miRNA信号放大与成像平台

Fig. 3 Multi-confined network-based platforms for miRNA signal amplification and imaging

A. Y-shaped DNA nanospheres utilize endogenous ATP to drive target recycling for amplified miRNA imaging in vitro and in vivo [51]; B. Logic-gated nanospheres (ADNS) integrate a miR-21/155 "AND" logic gate and ATP-driven dissociation for precise multitarget diagnosis [52]; C. Three-dimensional (3D) CHA-HCR system: A target-triggered cascade crosslinking between the bifunctional nanospheres coupled with FRET achieves highly sensitive imaging [53]; D. Nine-tile DNA nanoarrays integrate caveolin-mediated cytosolic delivery and CHA network self-assembly for efficient live-cell imaging [28]. (A. Y形DNA纳米球: 利用内源ATP驱动目标循环, 实现活体内外miRNA放大成像 [51]; B. 逻辑门控纳米球 (ADNS): 集成miR-21/155 "与" 逻辑门及ATP驱动解离, 用于多靶点精准诊断 [52]; C. 三维CHA-HCR系统: 靶标触发双功能纳米球间级联交联与FRET, 实现高灵敏成像 [53]; D. 9-tile DNA纳米阵列: 整合小窝蛋白胞质递送与CHA网络自组装, 用于活细胞高效成像 [28])

基于金纳米颗粒 (AuNP) 等载体表面的DNA纳米限域平台, 因其局部高浓度的限域效应, 在核酸信号放大检测中展现出良好的检测性能。Le等 [54] 构建了一种DNAzyme纳米马达, 通过在AuNP表面装载底物链和被锁定链封闭的DNAzyme, 细胞内miR-10b通过链置换解锁DNAzyme的结合臂, 在 Mn^{2+} 辅助下, DNAzyme催化切割DNA-RNA嵌合底物, 释放荧光信号, 随后移动至下一底物实现自主行走, 进而输出扩增信号。然而, 针对截短型8-17E DNAzyme, 需依赖外部孵育补充 Mn^{2+} (优化浓度为 $500 \mu\text{mol/L}$) 才能激活其切割活性。因此, Ye等 [55] 开发了无酶驱动型DNA walker (图4A), 目标miRNA与行走链W结合后将其锚定至AuNP表面附近, W通过立足点介导的链置换反应置换出底物链B, 随后加入的燃料链F进一步通过链置换解体底物复合体, 释放带有FAM信号的链C, 同时将W置换出来, 使其能够继续向下一个底物复合体移动, 增强反应信号输出的稳定性与高效性。

传统基于AuNPs的3D DNA walker因轨道通过Au-S键随机修饰于纳米颗粒表面, 导致步行者 (如

DNAzyme) 与轨道 (如底物链) 的组装缺乏空间有序性。这种无序分布使得步行者运动路径随机, 无法实现沿预设轨迹的定向移动, 限制了执行效率和信号放大能力。Meng 等^[56] 开发了一种基于 DNA 树枝状大分子的定向 3D DNA walker 纳米机器 (图 4B), 以 DNA 树枝状大分子为轨道, 通过精确调控底物链 (S) 和 DNAzyme 步行器 (Dz-L) 的空间分布, Dz-L 的运动路径被严格约束并定向引导。该平台不仅有效避免了复杂胞内环境中巯基化合物的干扰, 提升了系统的结构稳定性, 并实现了对 miR-21 的高灵敏检测 (LOD=23 pmol/L), 以及对不同细胞系中 miRNA 动态表达水平的精准监测与区分。

除刚性的 DNA 轨道框架外, 柔性脂质纳米限域平台在反应动力学和细胞递送方面展现出独特的优势。Xue 等^[57] 将自驱动滚动马达 (3D RM) 与脂质纳米火炬 (RMNF) 相结合 (图 4C), 用于高效检测血清和活细胞中的癌症相关 miRNA。该系统通过胆固醇基脂质胶束表面的发夹状轨道与刚性四面体 DNA 滚动马达的协同作用, 利用催化发夹组装 (CHA) 实现自驱动滚动并激活荧光信号。脂质胶束的空间限域效应极大地加速了扩增效率, 使体系在 37 °C 下 1.5 h 内即可达到信号平台, 检测限低至 500 fmol/L; 同时, 四面体结构的刚性与“缺口隐藏”设计提升了生物稳定性, 在 10% 血清中孵育 24h 仍保持低背景, 有效抑制了假阳性信号。

溶酶体滞留以及生理环境中不可控的非特异性蛋白吸附, 仍是活细胞成像面临的严峻挑战。Wang 等^[58] 开发了一种时空可控的蛋白质冠 (PC) 装甲 DNA 纳米机器 (图 4D), 用于活细胞内多类型生物标志物成像。该纳米机器通过预组装紫外线响应的 PC 外壳, 保护核酸免受核酸酶降解, 减少非特异性蛋白质吸附, 增强细胞摄取; 内化后, PC 促进溶酶体逃逸, 随后光触发外壳解体, 实现细胞质内精准运作。该体系以 RNA 为轨道, 利用内源性的 RNase H 作为驱动力, 克服了序列限制, 成功在 U87 胶质瘤细胞中实现 miRNA 成像、在 A549 细胞中实现 ATP 成像。其模块化设计支持多类型生物标志物检测, 将蛋白质冠工程化引入 DNA 纳米机器, 实现了稳定性、靶向性与时空激活的一体化调控。

表 1 基于 DNA 纳米限域平台的信号放大检测策略总结

Table 1 Summary of signal amplification detection strategies based on DNA nanoconfinement platforms

Confinement platform type	Detection strategy	Key parameter	Advantage	Limitation	Reference
DNA 四面体	TDF 双手柄拉伸 ss-DNA, 桥式电化学传感	杂交速度极快 (1 min 内完成杂交), 杂交效率提升至 98%	策略具有普适性, 可推广至含二级结构的 ssDNA 序列; 在血清、全血等复杂基质中稳定有效	信号放大依赖 HRP 酶催化体系, 无内在信号放大回路, 在极低靶标丰度时放大倍数有限, 若应用于活细胞 miRNA 成像, 需结合荧光成像模块及胞内递送系统进一步改造	[34]
	TDN 增强 HCR 检测系统	miR-21 检测限 0.1 nmol/L, 检测速率提升约 3 倍	TDN 的空间限域效应使得 HCR 反应的信号扩增效率与稳定性显著优于传统的游离发夹探针	体内循环清除较快, 可能影响其在长期监测方面的应用	[41]
	TDN 增强 CHA 检测系统	miR-21/miR-155 检测限 26 pM/85 pmol/L	TDN 的空间限域效应提升了 CHA 反应的信号扩增效率与生物稳定性	组织穿透深度与体内应用潜力未验证	[42]
	基于 TDN 和光控的分子内催化发夹自组装平台	miR-10b 检测限 28 pmol/L	高时空分辨率: 反应开启受外部光源精确控制; 低背景: 消除探针组装与转染阶段的非特异性扩增	依赖外部紫外光激发, 因紫外光存在潜在光毒性且组织穿透深度有限, 难以直接拓展至深层组织的活体动物成像	[43]
	基于 TDN 和 GSH/APE1 双重控制的熵驱动催化 (EDC) 电路	miR-21 检测限 27 pmol/L	高特异性: 内源肿瘤标志物“双锁”原位激活, 从机制上显著降低非靶引起 (如正常细胞) 的信号泄漏	若肿瘤组织内这两类标志物表达存在时空异质性或丰度不足, 系统将无法完全激活, 可能产生假阴性	[44]
DNA 纳米笼	封装于 DNA 纳米笼空腔的 CHA 信号放大反应	miR-21 检测限 40 pmol/L, 反应速率增强 14.34 倍, 局部浓度增加约 5000 倍	将 CHA 反应限制在 DNA 框架内部, 在提高反应速率的同时有效屏蔽了核酸酶的降解	尺寸排阻色谱的结果表明, 虽然外部骨架的产率可达 73.20%, 但最终带有内部 CHA 反应探针的完整 L-DNC 产率仅为 64.62%。在后续需要大规模制备探针时易产生批次间差异	[31]

(续表)

Confinement platform type	Detection strategy	Key parameter	Advantage	Limitation	Reference
多重限域网络	基于 DNA 纳米笼限域的逻辑门双激活 DNA 酶成像技术	Zn^{2+} /miR-21 检测限 0.22 $\mu\text{mol/L}$ /0.85 nmol/L, 10% FBS 孵育 10 h 基本保持稳定	相比于暴露在外的探针 (C-DNAzyme 催化反应本身无 mDz-out), 笼内限制设计减少了非特异性降解导致的信号泄漏; 细胞实验显示其背景信号仅为对照组的 70%, 信噪比提升了 1.3 倍	环放大机制, 且 DNA 纳米笼的空间限域虽提供保护, 却在一定程度上限制了靶标的扩散速率与底物利用效率	[45]
	内源性 mRNA 驱动的 DNA 纳米笼空腔内限域链置换反应 (PBS), 用于成像细胞内 Let-7a	Let-7a 检测限 7.57 pmol/L (稀释血清)	空间限域 (2240 倍局部浓度) + 靶标循环利用 (GAPDH 驱动), 实现双重信号增益	RL-cube 组装产率约 35%, 有效负载效率约 38.89%, 规模化制备存在挑战	[46]
	基于 DNA 纳米笼的外源性光驱动的 CHA 信号放大反应	miR-21 检测限 19.56 fmol/L, CHA 反应动力学提升 10 倍	808 nm NIR 光驱动 UCL 裂解 PC 键, 传递阶段信号处于"锁定"状态, 有效抑制提前激活与背景泄漏	涉及 UCNPs 合成、PAA 修饰、EDC 偶联等多步制备, 工艺繁琐, 批次稳定性要求高	[47]
	靶标触发 CHA 形成 DNA 纳米笼网络	miR-21 检测限 0.072 nmol/L	通过特异性响应 miR-21 与靶向适配体修饰实现了癌症的诊疗一体化	多链修饰系统规模化制备成本高; 大尺寸 DNA 组装体易被网状内皮系统清除, 实体瘤深层组织渗透率低	[48]
	靶标与 ATP 驱动 Y 型 DNA 自组装纳米球解体	miR-21 检测限 36.0 pmol/L	Y 型 DNA 单体自组装简便且尺寸可控, 由内源性 ATP 驱动; 显著增强了细胞通透性, 通过网格蛋白和巨胞饮途径进入细胞, 实现溶酶体逃逸	信号响应存在数小时延迟且高度依赖细胞内 ATP 浓度, 同时 FRET 用于活体成像的组织穿透性较差, 需更换荧光基团	[51]
	经多重 miRNA 触发与内源 ATP 驱动解体并放大信号的逻辑门控 DNA 纳米球	ADNS 粒径约为 (135.62 ± 21.25) nm, ODNS 粒径约为 (125.96 ± 17.33) nm, 该尺寸范围有助于延长其在血液中的循环时间。	高局部浓度的空间排布, 使得上一步逻辑运算释放的核酸链能够迅速引发相邻 Y 型模块的链置换反应, 从而在无外源能量介入的情况下, 维持高效的级联放大循环	合成成本高, 难以保持各批次的均一性, 信号响应较慢	[52]
DNA 纳米机器	利用两种 DNA 纳米球介导三维 CHA-HCR 级联反应, 经靶标引发 FRET 荧光信号放大	miR-21 检测限 0.24 pmol/L, 20 min 内达到信号平台	三维 DNA 纳米球的空间位阻能有效抵抗核酸内切酶的降解; 可通过"一锅法"高效合成	温度对结构的稳定性影响较大	[53]
	尺寸可控的 DNA 瓦片阵列搭载 CHA 探针	血清中稳定时间延长至 8 h	成功避开了内体-溶酶体途径, 实现了高效的细胞质直接递送, 显著提高了探针在胞内的有效工作浓度; 纳米阵列的刚性与空间限域结构保护夹夹探针免受核酸酶降解	尚未验证在活体层面的递送能力与稳定性	[28]
	DNAzyme 驱动的 DNA walker	单碱基错配选择因子达 5.1 至 16.7。靶标 miRNA 检测限 1.0 pmol/L。	单目标可触发机器行走约 30 步并完成等量底物裂解	依赖高浓度 Mn^{2+} (最适 500 $\mu\text{mol/L}$) 作为催化辅因子, 活体长期干预存在扰乱细胞离子稳态的风险	[54]
	无酶驱动型 DNA walker	miR-21 检测限 8.0 pmol/L; 目标触发后的最大荧光信号与背景信号比值达到 16.8。	利用 AuNP 表面的高局部有效浓度, 将分子间碰撞转化为分子内反应, 显著加速链置换过程	反应依赖脂质体递送燃料链 (F) 和行走足 (W) 组件, 在胞内易被降解	[55]
	定向 3D DNA walker	miR-21 检测限 23 pmol/L	利用 DNA 树枝状大分子作为刚性骨架, 能够精准调控底物与 DNAzyme 的比例及空间分布, 为行走器规划了固定的移动路径	在活细胞实验中, 需要额外加入 1 mmol/L Mn^{2+} 孵育 1 h, 且引入高浓度 Mn^{2+} 离子可能会对细胞的天然生理状态产生潜在毒性或干扰	[56]

(续表)

Confinement platform type	Detection strategy	Key parameter	Advantage	Limitation	Reference
自驱动滚动马达 (3D RM) + 脂质纳米火炬 (RMNF)	miR-21 检测限 500 fmol/L		多价滚动避免了结构解离, 限域效应提高局部浓度; 疏水自组装克服了 AuNP 修饰耗时的问题	多靶标检测应用受限, 不同正交发夹与多个 3D 马达之间易产生空间位阻, 且多通道荧光成像易受荧光串扰的影响	[57]
内源性 RNase H 驱动的光响应蛋白冠包被 DNA 纳米机器	血清中检测限为 127 fmol/L, 保持了完整的线性范围; ApoE 蛋白冠的纳米机器在 6 h 内实现了溶酶体逃逸。		预组装的蛋白冠 (PC) 外壳形成物理屏障, 保护核酸免受核酸酶降解, 防止在生理环境中形成不可控的随机蛋白冠; 利用 UV 照射剥离蛋白冠, 时空可控; 在多类靶标 (TP53、miR-21、ATP) 中都展现了良好的检测性能	组装过程较复杂; UV 的组织穿透能力有限, 可能限制该系统在深层组织或动物活体水平的进一步应用	[58]

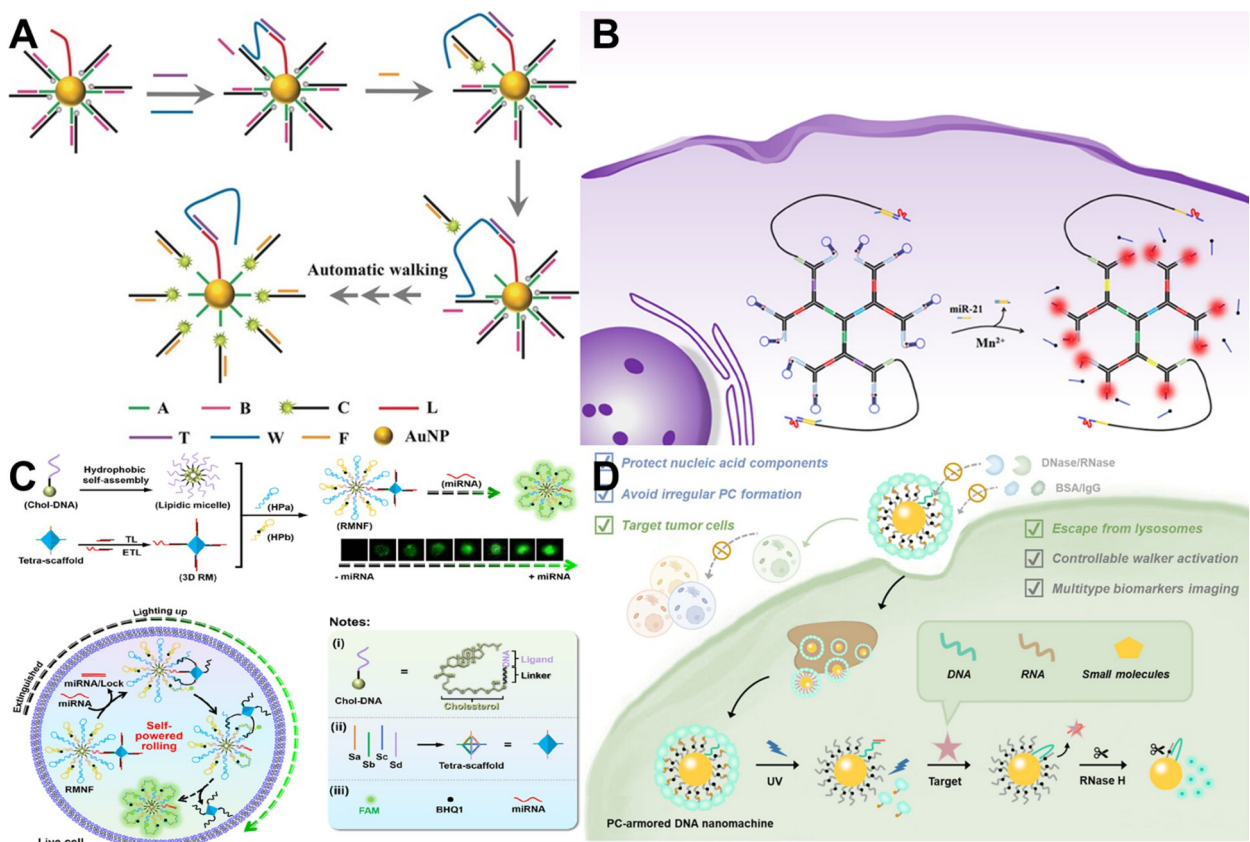


图4 基于动态DNA纳米机器的信号放大与活细胞成像平台

Fig. 4 Dynamic DNA nanomachine-based signal amplification and live-cell imaging platforms

A. Entropy-driven DNA nanomachine used for efficient intracellular fluorescence imaging of miRNA [55]; B. Dendritic 3D DNA walker: A target-triggered DNase cleaves substrates along a 3D track, achieving highly sensitive miRNA imaging [56]; C. 3D DNA rolling motor (RMNF): The target activates the motor to perform CHA-driven autonomous rolling on the micelle surface for efficient detection [57]; D. Schematic of a protein corona (PC)-coated DNA nanomachine that enables the spatiotemporally controlled imaging of multiple biomarkers (e.g., miRNA and ATP) in living cells via ultraviolet (UV) light-triggered PC dissociation and RNase H-driven walking along RNA tracks [58] (A. 熵驱动DNA纳米机器: 用于细胞内miRNA的高效荧光成像[55]; B. 树枝状3D DNA步行器: 靶标触发DNAzyme沿三维轨道连续切割底物, 实现miRNA高灵敏成像[56]; C. 3D DNA滚动马达(RMNF): 靶标激活马达在胶束表面进行CHA驱动的自主滚动, 用于高效检测[57]; D. 基于蛋白冠(PC)包覆的DNA纳米机器, 通过紫外光触发蛋白冠解离和RNase H驱动的RNA轨道行走, 实现活细胞内多种生物标志物(如miRNA和ATP)的时空可控成像的原理示意图[58])

3 未来发展趋势与展望

近年来, 基于DNA纳米限域平台的信号放大策略在活细胞miRNA成像中展现出较大的应用潜力。限域空间能够提高局部反应物浓度、加速反应动力学, 并为核酸探针提供空间位阻保护, 这有助于抵抗核酸酶降解。然而, 将这些平台推向生物医学应用与临床转化, 仍需克服一系列挑战。首先, 细胞

内高离子强度环境、丰富的核酸酶、复杂的蛋白背景以及高度动态的亚细胞空间异质性,均可能导致DNA纳米结构构象松散、降解加速和限域效应减弱,进而降低催化效率与信号稳定性,影响成像结果的可靠性。其次,递送效率仍是限制该类平台实际应用的关键因素。DNA纳米限域平台通常尺寸较大、表面电荷密集,跨膜进入细胞后还需克服内体滞留和溶酶体降解等障碍,致使能够到达目标miRNA所在亚细胞区室的有效探针浓度偏低。与此同时,限域结构的刚性、孔径、装载密度与释放动力学之间相互影响,设计不合理会降低靶标可及性,并削弱对低丰度miRNA的响应效率。此外,现有研究多依赖相对荧光强度进行判读,易受探针递送差异、局部浓度波动及自发荧光背景干扰。限域空间内的扩散受限、局部有效浓度变化以及探针与靶标杂交概率等微观动力学机制,尚缺乏完善的定量模型支撑。以DNA折纸为代表的复杂检测平台,其组装高度依赖大量短链DNA的精确退火,面临自组装门槛高、产率有限、纯化困难且成本较高等问题,限制了大规模应用与转化。

未来,该领域有望从单纯的结构构建转向面向活体复杂环境的精准定量、动态追踪与多维分析。其一,引入比率型荧光设计、荧光寿命成像(FILM)等内参校准手段,并结合动力学模型,有望提升miRNA检测的定量能力。其二,推动平台从单一miRNA检测向多生物标志物联合分析拓展,可通过多靶标同步成像更全面地反映细胞状态和疾病进程。其三,将DNA纳米平台与表面增强拉曼散射(SERS)、近红外二区(NIR-II)荧光、光声成像(PAI)或磁共振成像(MRI)等多模态成像技术结合,有望突破荧光成像穿透深度的局限,将应用拓展至深层组织、活体动物乃至临床样本。其四,结合单分子定位显微镜和DNA-PAINT等技术,有望进一步提升空间分辨率,实现亚细胞乃至单分子水平的miRNA原位成像。

此外,DNA纳米结构作为外源性核酸材料在体内应用时的先天免疫识别问题,是推动该类平台临床转化不可回避的生物安全性维度。cGAS(环鸟苷酸-腺苷酸合酶)-STING(干扰素基因刺激蛋白)通路能够以序列非依赖方式识别并结合胞质中的外源dsDNA,激活TBK1-IRF3级联,诱导I型干扰素与促炎细胞因子的大量分泌。近期研究系统考察了dsDNA片段、单链瓦片(SSTs)到DNA折纸等不同构型DNA纳米结构对cGAS-STING通路的激活差异,发现dsDNA的结构互联紧密度是决定免疫激活水平的核心参数:DNA折纸因减少了游离dsDNA末端的暴露,可显著抑制cGAS-STING激活;而线框型(wireframe)DNA纳米结构因其开放构型仍可引发一定程度的通路激活^[59]。与此同时,内体途径摄取的DNA纳米结构亦可能经TLR9(Toll样受体9)被识别,在含CpG基序的序列背景下尤为显著:研究表明,将CpG寡核苷酸多价展示于线框型DNA折纸表面,可引发显著的TLR9依赖性I型及III型干扰素应答^[60]。值得关注的是,上述免疫应答并非全然不利:在肿瘤免疫治疗中,研究者已将TDN与干扰素刺激性DNA(ISD)整合以主动激活cGAS-STING,协同化疗实现了显著的抗肿瘤效果^[61],展现出该通路的可利用性。然而,对于以miRNA成像与精准诊断为目的的限域平台而言,非预期的免疫激活则构成潜在的安全隐患与干扰因素。体内系统评估表明,TDN在小鼠模型中的血清半衰期约为9.88 min,主要经肝肾代谢,且仅诱发低水平弱促炎反应,具有低免疫原性与非免疫毒性^[62],提示TDN具备一定的体内安全性基础。尽管如此,现有数据多来自健康动物模型,在肿瘤、慢性炎症等免疫激活病理状态下的安全性与免疫调节效应仍待系统阐明。未来,通过序列设计层面规避CpG免疫刺激基序、在骨架层面引入磷硫代修饰以降低TLR9识别效率以及在结构层面优化dsDNA密度与几何构型以减少cGAS结合位点,有望在充分保留限域效应的前提下,将体内免疫激活风险控制在可接受范围,从而为DNA纳米限域平台的安全体内应用奠定基础。总体而言,基于DNA纳米限域平台的信号放大策略将靶标识别、空间限域与级联放大融为一体,具有独特优势。随着材料稳定性、胞内递送、亚细胞定位、定量校准及多模态成像等关键问题的持续突破,该类平台有望从机制研究工具进一步发展为面向疾病早期诊断、疗效评估和精准干预的检测分析体系。

4 结 论

基于DNA纳米限域平台的信号放大策略为活细胞内低丰度miRNA的原位、实时成像提供了创新且高效的技术前景。在方法学层面,该类策略通过将靶标识别、信号放大与生物稳定性提高三者统一于限域纳米空间的工程化设计中,在一定程度上改善了传统均相溶液体系在扩散动力学、信噪比和胞内

稳定性方面的局限。这一策略的方法学意义为生物分析化学从溶液均相检测向胞内纳米限域原位成像分析的转变提供了理论与技术上的支撑，也为其他低丰度胞内核酸靶标的检测、多生物标志物联合分析以及活细胞原位诊疗一体化平台的构建，提供了可推广的方法学启示。

尽管如此，该类平台在迈向深层生物学应用及临床转化时仍面临胞内动态微环境对构象的干扰、递送途径与亚细胞区室可及性的制约，微观反应动力学定量模型的缺失，以及体内应用中 DNA 纳米材料潜在免疫识别风险等方面的挑战。未来，通过引入比率型荧光校准与动力学定量模型以提升检测精度，结合多模态成像与超高分辨技术以拓展时空分辨能力，并系统评估与优化平台的免疫相容性，DNA 纳米限域平台有望在单细胞、单分子水平的动态检测及临床转化中发挥更大作用，为精准医学提供可靠的分析工具。

参考文献：

- [1] Bartel D P. *Cell*, **2004**, 116 (2): 281–297.
- [2] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. *Cell*, **1993**, 75 (5): 843–854.
- [3] Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. *Nature*, **2008**, 455 (7209): 58–63.
- [4] Acunzo M, Croce C M. *Clin. Chem.*, **2016**, 62 (4): 655–656.
- [5] Calin G A, Croce C M. *Nat. Rev. Cancer*, **2006**, 6 (11): 857–866.
- [6] Raj A, van den Bogaard P, Rifkin S A, van Oudenaarden A, Tyagi S. *Nat. Meth.*, **2008**, 5 (10): 877–879.
- [7] VanGuilder H D, Vrana K E, Freeman W M. *BioTechniques*, **2008**, 44 (5): 619–626.
- [8] Zhang X M, Chen W H, Wan S L, Qu B, Liao F, Cheng D, Zhang Y, Ding Z, Yang Y B, Yuan Q, University H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2025**, 147 (8): 6679–6687.
- [9] Yang F, Lu H T, Meng X D, Dong H F, Zhang X J. *Small*, **2022**, 18 (10): 2106281.
- [10] Pham T G, Wu J H. *Nanoscale*, **2024**, 16 (11): 5537–5545.
- [11] Peng H Y, Newbigging A M, Reid M S, Uppal J S, Xu J Y, Zhang H Q, Le X C. *Anal. Chem.*, **2020**, 92 (1): 292–308.
- [12] Zhao Y X, Chen F, Li Q, Wang L H, Fan C H. *Chem. Rev.*, **2015**, 115 (22): 12491–12545.
- [13] Li Y X, Luo Z W, Zhang C Y, Sun R, Zhou C, Sun C J. *Trac Trends Anal. Chem.*, **2021**, 134: 116142.
- [14] Ijäs H, Shen B X, Heuer-Jungemann A, Keller A, Kostianen M A, Liedl T, Ihalaenen J A, Linko V. *Nucleic Acids Res.*, **2021**, 49 (6): 3048–3062.
- [15] Ramakrishnan S, Shen B X, Kostianen M A, Grundmeier G, Keller A, Linko V. *ChemBioChem*, **2019**, 20 (22): 2801.
- [16] Mathur D, Rogers K E, Díaz S A, Muroski M E, Klein W P, Nag O K, Lee K, Field L D, Delehanty J B, Medintz I L. *Nano Lett.*, **2022**, 22 (12): 5037–5045.
- [17] Chandrasekaran A R, Vilcapoma J, Dey P, Wong-Deyrup S W, Dey B K, Halvorsen K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142 (14): 6814–6821.
- [18] Keum J W, Bermudez H. *Chem. Commun.*, **2009** (45): 7036.
- [19] Ding H, Li J, Chen N, Hu X, Yang X, Guo L, Li Q, Zuo X, Wang L, Ma Y, Fan C. *ACS Cent. Sci.*, **2018**, 4: 1344–1351.
- [20] Wang P F, Rahman M A, Zhao Z X, Weiss K, Zhang C, Chen Z J, Hurwitz S J, Chen Z G, Shin D M, Ke Y G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, 140 (7): 2478–2484.
- [21] Choi C H J, Hao L L, Narayan S P, Auyeung E, Mirkin C A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, 110 (19): 7625–7630.
- [22] Liang L, Li J, Li Q, Huang Q, Shi J Y, Yan H, Fan C H. *Angew. Chim. Int. Ed.*, **2014**, 53 (30): 7745–7750.
- [23] Zhang T, Tian T R, Zhou R H, Li S H, Ma W J, Zhang Y X, Liu N X, Shi S R, Li Q S, Xie X P, Ge Y C, Liu M T, Zhang Q, Lin S Y, Cai X X, Lin Y F. *Nat. Protoc.*, **2020**, 15 (8): 2728–2757.
- [24] Rajwar A, Shetty S R, Vaswani P, Morya V, Barai A, Sen S, Sonawane M, Bhatia D. *ACS Nano*, **2022**, 16 (7): 10496–10508.
- [25] Li J, Pei H, Zhu B, Liang L, Wei M, He Y, Chen N, Li D, Huang Q, Fan C H. *ACS Nano*, **2011**, 5 (11): 8783–8789.
- [26] Smolková B, MacCulloch T, Rockwood T F, Liu M H, Henry S J W, Frtús A, Uzhytychak M, Lunova M, Hof M, Jurkiewicz P, Dejneka A, Stephanopoulos N, Lunov O. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, 13 (39): 46375–46390.
- [27] Kim K R, Kim J, Back J H, Lee J E, Ahn D R. *ACS Nano*, **2022**, 16 (5): 7331–7343.
- [28] Peng Y N, Gao Z J, Qiao B, Li D X, Pang H J, Lai X D, Pu Q M, Zhang R, Zhao X, Zhao G Y, Xu D,

- Wang Y Y, Ji Y X, Pei H, Wu Q. *Adv. Sci.*, **2023**, 10 (21): 2300614.
- [29] Bui H, Shah S, Mokhtar R, Song T Q, Garg S, Reif J. *ACS Nano*, **2018**, 12 (2): 1146–1155.
- [30] Bui H, Miao V, Garg S, Mokhtar R, Song T Q, Reif J. *Small*, **2017**, 13 (12): 1602983.
- [31] Feng Y H, Liu Q, Zhao X Y, Chen M, Sun X T, Li H X, Chen X Q. *Anal. Chem.*, **2022**, 94 (6): 2934–2941.
- [32] Li B L, Jiang Y, Chen X, Ellington A D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134 (34): 13918–13921.
- [33] Oishi M, Juji S. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, 13 (30): 35533–35544.
- [34] Li F Q, Mao X H, Li F, Li M, Shen J L, Ge Z L, Fan C H, Zuo X L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142 (22): 9975–9981.
- [35] Cholko T, Chang C A. *J. Phys. Chem. B*, **2021**, 125 (7): 1746–1754.
- [36] Xu F, Pellino A M, Knoll W. *Thin Solid Films*, **2008**, 516 (23): 8634–8639.
- [37] Peterson A W. *Nucleic Acids Res.*, **2001**, 29 (24): 5163–5168.
- [38] Li S F, Li P, Ge M H, Wang H Z, Cheng Y Z, Li G, Huang Q, He H, Cao C T, Lin D Y, Yang L B. *Nucleic Acids Res.*, **2020**, 48 (5): 2220–2231.
- [39] Wang J, Wang D X, Ma J Y, Wang Y X, Kong D M. *Chem. Sci.*, **2019**, 10 (42): 9758–9767.
- [40] Meng R, Zhang X L, Liu J L, Zhou Y, Zhang P, Chai Y Q, Yuan R. *Biosens. Bioelectron.*, **2023**, 237: 115517.
- [41] Zhang B W, Tian T R, Xiao D X, Gao S, Cai X X, Lin Y F. *Adv. Funct. Mater.*, **2022**, 32 (16): 2109728.
- [42] Li C H, Lv W Y, Yang F F, Zhen S J, Huang C Z. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2022**, 14 (10): 12059–12067.
- [43] Peng J, Liu S M, Qiu Z Y, Zhang L Y, Dong Z Y, Zhou Q Y, Huang T, Zhang Y F, Shi J Y, Chen J X, Dai Z, Chen J. *Biosens. Bioelectron.*, **2025**, 284: 117565.
- [44] Li L, Gong Y R, Lin Q T, He S Y, Xing C, Lu C H. *Sens. Actuators B Chem.*, **2024**, 417: 136046.
- [45] Tu T T, Huan S Y, Feng X Y, Ke G L, Li L L, Zhang X B. *Angew. Chim. Int. Ed.*, **2025**, 64 (15): e202424684.
- [46] Feng Y, Liu S, Yao Y, Chen M, Liu Q, Chen X. *Anal. Chem.*, **2024**, 96 (1): 564–571.
- [47] Xin M K, Sun X M, Tang H W, Li C Y. *Anal. Chem.*, **2024**, 96 (18): 7101–7110.
- [48] Xiang Q, Huang J, Shuai L, Wen S, Zhang W, Wang X, Li J, Zhou Z, Gao Z, Wang Q, Li Y, Dong H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2026**, 148 (12): 13055 – 13068.
- [49] Gao Y Y, Gong C N, Chen M, Huan S Y, Zhang X B, Ke G L. *Anal. Chem.*, **2024**, 96 (23): 9453–9459.
- [50] Zhao S, Zhang S H, Hu H J, Cheng Y C, Zou K X, Song J, Deng J Q, Li L L, Zhang X B, Ke G L, Sun J S. *Angew. Chim.*, **2023**, 135 (24): e202303121.
- [51] Wang J L, Li J, Chen Y, Liu R T, Wu Y X, Liu J B, Yang X H, Wang K M, Huang J. *Nano Lett.*, **2022**, 22 (20): 8216–8223.
- [52] Wang J, Liu S, Liu X, Chen Y, Liu J, Wang K, Quan K, Huang J. *ACS Nano*, **2025**, 19 (45): 39420 – 39429.
- [53] Mo L T, Liang D L, Qin R H, Mo M X, Yang C, Lin W Y. *Anal. Chem.*, **2023**, 95 (31): 11777–11784.
- [54] Peng H Y, Li X F, Zhang H Q, Le X C. *Nat. Commun.*, **2017**, 8: 14378.
- [55] Liang C P, Ma P Q, Liu H, Guo X G, Yin B C, Ye B C. *Angew. Chim.*, **2017**, 129 (31): 9205–9209.
- [56] Wang X, Sun H Z, Liu B J, Jiang K M, Li Z H, Meng H M. *Anal. Chem.*, **2022**, 94 (49): 17232–17239.
- [57] Li C, Xue G H, Wu R, Zhang J, Cheng Y H, Huang G Q, Xu H, Song Q F, Cheng R Z, Shen Z F, Xue C. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2024**, 16 (1): 281–291.
- [58] Xu Z Q, Cheng X Q, Guo X Y, Li P L, Li J M, Zhao J, Wang Z Y. *Angew. Chim.*, **2025**, 137 (49): e202516456.
- [59] Zou K X, Zhang P F, Wang Y Q, Liu Y, Ji B, Zhan P F, Song J. *Small Methods*, **2025**, 9 (6): 2401041.
- [60] Du R R, Cedrone E, Romanov A, Falkovich R, Dobrovolskaia M A, Bathe M. *ACS Nano*, **2022**, 16 (12): 20340–20352.
- [61] Zhang L P, Wang Y Q, Karges J, Tang D S, Zhang H C, Zou K X, Song J, Xiao H H. *Adv. Mater.*, **2023**, 35 (8): 2210267.
- [62] Guo Y F, Huang Y, Liu M X, Liu J J, Liu J F, Yang D Y. *Small Methods*, **2025**, 9 (6): 2401007.

(责任编辑: 盛文彦)