网络出版时间:2019 - 9 - 3 17:26 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1434.016.html

探索人高转移胃癌细胞 HGC - 27 适配体的靶标蛋白

刘浩波[1],刘 涛[1],王亚雷[1],罗昭锋[2]

摘要 **目的** 探索可以特异性识别高转移胃癌细胞(HGC-27)的核酸适配体 LW-25 的靶标蛋白。**方法** 合成已知的可以特异性识别 HGC-27 而不识别无转移能力的胃腺癌细胞的 LW-25。首先,通过胰蛋白酶消化细胞来确定核酸适配体结合的靶标类型是蛋白质,然后通过裂解细胞提取出蛋白质。用核酸适配体介导的亲和富集实验富集出 LW-25 所结合的蛋白,经电泳分离后,找到潜在靶标蛋白所在的差异条带。最后利用质谱技术分析差异条带内的蛋白质,通过分析比对质谱结果得到潜在的靶标蛋白。**结果** 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)找到差异条带,经质谱分析,不含 POU 结构域的八聚核苷酸结合蛋白(p54nrb/NONO)在核酸适配体 LW-25 样品组中量极高,在文库对照样品组中蛋白量很少,在琼脂糖凝胶珠样品组中几乎没有,因此判定 NONO 是最明显的差异蛋白。**结论** NONO 是 LW-25 潜在的靶标蛋白并很可能是引起胃癌转移的重要蛋白。

关键词 cell-SELEX;核酸适配体;胃癌;转移;靶标蛋白
中图分类号 R 735.2
文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2019)10 - 1570 - 04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2019.10.015

胃癌(stomach cancer,SC)是世界上第四大常见的恶性肿瘤,发病率逐年上升[1],但其早期症状并不明显,大多数 SC 患者就诊时就已发生癌细胞转移,延误了最佳治疗时机。因此如果能鉴定出高转移性 SC 的肿瘤标志物将对早期监测 SC 转移和探索 SC 转移机制带来巨大前景。

目前,寻找肿瘤标志物一种方法是使用抗体,另一种是使用适配体,通过抗体寻找靶蛋白时,需要两种抗体形成一种特殊结构才能找到靶标蛋白[2],使用核酸适配体来寻找生物标志物的方法相对简单。核酸适配体是由随机寡核苷酸文库通过寡核苷酸与靶分子的重复结合演化而来的单链 DNA 或 RNA 分子。与抗体类似,适配体可以以高特异性和亲和力结合其靶分子。该研究旨在利用已经得到的可以特异性识别高转移 SC 细胞的适配体 LW-25 去探索其结合的靶标蛋白。

2019 - 06 - 03 接收
基金项目:安徽省公益性技术应用研究联动计划项目(编号:15011d04043)
作者单位:[1] 安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022
[2] 中国科学技术大学生命科学院,合肥 230022
作者简介:刘浩波,男,硕士研究生;
王亚雷,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:alei416@163.com

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 细胞株 人胃癌细胞系 HGC-27(高转移能力)获赠于中国科学技术大学生命科学院;生长于含 20 U/ml 的青霉素和链霉素以及 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,在 37 ℃、5% CO_2 条件下恒温恒湿培养箱内培养,实验均采用对数期细胞。

1.1.2 单链 DNA 序列名称及碱基组成 见表 1。

表 1 生物素修饰后的 LW-25 及随机文库 Lib 的碱基组成

序列名称	碱基组成(5′-3′)
Biotin-LW-25	biotin-TTCAGCACTCCACGCATAGCCAAGTT GCCGACAATACAACGGACCGATTATTTCCACC GACCTATGCGTGCTACCGTGAA
Biotin-Lib	biotin-GCAATGGTACGGTACTTCCNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAA AAGTGCACGCTACTTTGCTAA

以上两种适配体由上海生物工程公司合成

1.1.3 主要试剂和仪器 RMPI-1640 培养基、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;PBS 缓冲液购自上海慧颖生物科技有限公司;青霉素 - 链霉素溶液、PMSF、蛋白酶抑制剂混合物购自上海碧云天公司;酵母 tRNA 购自美国 Sigma 公司;葡萄糖、BSA 购自上海生物工程公司;洗涤缓冲液(washing buffer,WB)、结合缓冲液(binding buffer,BB)以及 DNA 封闭液由实验室自行配置;WB:含有 4.5 g/L 葡萄糖及 5 mmol/L $MgCl_2$ 的 DPBS;BB:含有 1 mg/ml BSA 和 0.1 mg/ml 酵母 tRNA 的 WB;DNA 封闭液:5 mg 鲑鱼精 DNA 和 1 ml 胎牛血清加入 4 ml 的 BB;链霉亲和素包被的琼脂糖凝胶珠、Q Exactive Plus 质谱仪购自美国赛默飞公司;Guava easyCyte 5 流式细胞仪购自美国 Merck Millipore 公司;CLM-170B-8-NF 型 CO_2 培养箱购自

上海 Esco 公司。

1.2 方法

1.2.1 LW-25 靶标类型的鉴定 核酸适配体的靶标类型通过胰蛋白酶消化细胞蛋白，然后将细胞与核酸适配体孵育，再用流式细胞仪检测其结合结果来确定。

1.2.2 SC 细胞的培养 将 HGC-27 细胞在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。

1.2.3 收集蛋白样品 收集 2×10^8 的 HGC27 细胞；洗涤消化后收集在离心管中，将细胞加入含有 PBS（pH 7.4）、2% Triton-X-100（*V/V*）、0.4% SDS（*W/V*）、5 mmol/L EDTA、1 mmol/L PMSF 以及蛋白酶抑制剂混合物的裂解液，于 4 ℃、水平摇床上孵育裂解 50 min，将细胞裂解液在 4 ℃、6 500 r/min 离心 5 min，保留上清液作为蛋白质样品。

1.2.4 蛋白上样样品的制备 通过适配体下拉实验技术，将适配体 LW-25 和文库分别与蛋白质样品孵育，进而分别与链霉亲和素包被的琼脂糖凝胶珠孵育，利用链酶亲和素和生物素的相互作用，通过高温变性洗脱 LW-25 和文库结合的蛋白质。

具体而言，分别取 90 μl 琼脂糖凝胶珠置于 3 个 EP 管中并用 WB 洗涤 3 次；用 5% 的 BSA 封闭珠子 1 h，封闭完成后用 WB 洗涤珠子 5 次。收集的蛋白质样品加入 DNA 封闭液孵育 1 h，封闭完取 100 μl 留作全蛋白样品组。将封闭后的蛋白质样品与 400 nmol/L 的 LW-25 在 4 ℃水平摇床上孵育 1 h，离心后的上清液与 0.9 mg（90 μl）琼脂糖凝胶珠在 4 ℃振荡器上孵育 1 h，用磁铁收集已经捕获蛋白质-LW-25 复合物的琼脂糖凝胶珠；将封闭后的蛋白质样品与 400 nmol/L 的 Lib 在 4 ℃摇床上孵育 1 h，离心后的上清液继续与 0.9 mg（90 μl）琼脂糖凝胶珠在 4 ℃振荡器上孵育 1 h，用磁铁收集已经捕获蛋白质-Lib 复合物的琼脂糖凝胶珠；将封闭的蛋白质样品直接与 0.9 mg（90 μl）琼脂糖凝胶珠在 4 ℃振荡器上孵育 1 h，用磁铁收集琼脂糖凝胶珠；收集的珠子用 WB 洗涤 5 次。

1.2.5 SDS-PAGE 向 3 组珠子中各加入 30 μl 1×上样缓冲液，向预留的 100 μl 全蛋白中加入 25 μl 5×上样缓冲液，100 ℃变性 10 min。将变性后的蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶（sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）电泳后，将其浸入考马斯亮蓝染液中 35 min，染色后用超纯水脱色，直至条带清晰可见。用凝胶成像仪扫描 SDS-PAGE 凝胶以获得图像，并分析图像结果找出差异条带。

1.2.6 质谱检测差异条带 切下 SDS-PAGE 凝胶中的差异条带并送质谱检测。

2 结果

2.1 LW-25 靶标类型分析 先用胰蛋白酶消化细胞，再将消化后的细胞与适配体孵育。未经胰酶处理的细胞与适配体有着很强的结合力，而经胰酶处理的细胞与适配体结合强度明显下降，说明核酸适配体 LW-25 的靶标是蛋白质。见图 1。

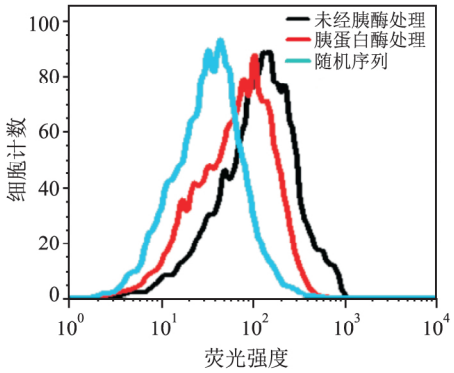

图 1 LW-25 的靶标类型图

2.2 SDS-PAGE 成功检测到差异条带 在用凝胶电泳扫描仪扫描后，获得扫描图，找到差异条带，即箭头所指蛋白条带，差异条带处可见 LW-25 组蛋白表达量要明显高于文库对照组。空白珠子组在相应位置则无明显条带。见图 2。

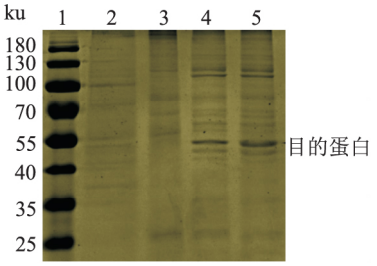

图 2 考马斯亮蓝染色的 10%SDS-PAGE 凝胶图

1：Marker；2：全蛋白；3：空白珠子样；4：文库珠子样；5：核酸适配体 LW-25 珠子样

2.3 液相色谱-质谱联用仪分析出最明显的差异蛋白 将切下的差异条带送去质谱检测，获得差异条带中的蛋白信息见图 3。图中可见不含 POU 结构域的八聚核苷酸结合蛋白（non-POU domain-containing octamer-binding protein，NONO）在适配体 LW-25 样

品组中量极高，在文库对照组中蛋白量很少，在空白珠子对照组中几乎没有，并且 NONO(54.2 ku) 的大小与从 SDS-PAGE 凝胶上切下条带的分子量正好相关。

A

Accession	Description	Coverage	# Peptides	# PSMs	Score
Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	63%	42	394	2 106.41
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	32%	26	31	68.39
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1	30%	23	22	52.06
Q9UMS4	Pre-mRNA-processing factor 19	20%	19	42	29.97
O43172	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	36%	25	19	21.04
O60832	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	42%	20	12	29.46
P02768	Serum albumin	8%	6	20	13.75
P08670	Vimentin	35%	26	18	16.66
P19338	Nucleolin	29%	19	23	15.55
O75131	Copine-3	37%	18	16	12.31
P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	51%	14	10	12.91
O43660	Pleiotropic regulator 1	41%	13	30	15.39
Q99829	Copine-1	29%	13	31	32.33
Q9Y3I0	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	46%	15	30	21.97
P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	28%	16	29	19.85
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	27%	16	24	16.46
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	36%	16	26	45.35
O95758	Polypyrimidine tract-binding protein 3	35%	14	23	28.62
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	33%	14	21	43.9

B

Accession	Description	Coverage	# Peptides	# PSMs	Score
P02768	Serum albumin	5%	4	72	244.63
Q9UMS4	Pre-mRNA-processing factor 19	47%	17	55	210.14
P19338	Nucleolin	23%	13	24	91.17
Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	26%	9	26	90.23
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	30%	11	21	72
O43660	Pleiotropic regulator 1	25%	8	20	68.13
O75131	Copine-3	23%	8	18	62.21
P08670	Vimentin	30%	11	17	54.8
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1	21%	5	10	38.09
Q9H6F5	Coiled-coil domain-containing protein 86	26%	7	11	35.12
O43172	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	18%	7	11	31.21
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	18%	7	8	24.59
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	11%	6	7	22.17
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	15%	4	5	20.27
Q9Y3I0	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	11%	5	6	18.74
Q5T3I0	G patch domain-containing protein 4	16%	4	6	18.54
Q99829	Copine-1	11%	3	4	15.45
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	7%	3	4	14.2
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	5%	4	5	13.74

C

Accession	Description	Coverage	# Peptides	# PSMs	Score
Q96A08	Histone H2B type 1-A	9%	1	1	2.19
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	2%	1	1	2.18
Q15907	Ras-related protein Rab-11B	6%	1	1	2.17
Q5RKV6	Exosome complex component MTR3	6%	1	1	2.16
P62753	40S ribosomal protein S6	5%	1	1	2.15
P61313	60S ribosomal protein L15	4%	1	1	2.15
Q9Y399	28S ribosomal protein S2, mitochondrial	4%	1	1	2.15
Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	3%	1	1	2.15
Q16594	Transcription initiation factor TFIID subunit 9	4%	1	1	2.09
O60762	Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1	4%	1	1	2.08
P78559	Microtubule-associated protein 1A	0%	1	1	2.07
Q9BYD2	39S ribosomal protein L9, mitochondrial	6%	1	1	2.07
P37108	Signal recognition particle 14 kDa protein	7%	1	1	2.07
Q01081	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	8%	1	1	2.06
P46781	40S ribosomal protein S9	8%	1	1	2.04
P61981	14-3-3 protein gamma	6%	1	1	2
Q8WUU5	GATA zinc finger domain-containing protein 1	7%	1	1	1.99
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	4%	1	1	1.98
Q00325	Phosphate carrier protein, mitochondrial	3%	1	1	1.97

D

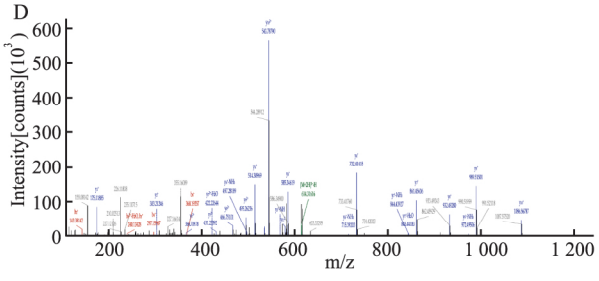

图3 差异蛋白条带质谱分析结果

A: LW-25 结合的蛋白质; B: 文库结合的蛋白质; C: 空白珠子结合的蛋白质; D: NONO 的肽指纹图谱

3 讨论

SC 是种致命的恶性肿瘤，转移与侵袭是患者死亡的主要原因。大约有 50% 患者在 SC 确诊时就已经发生了转移[3]。因此，早期发现肿瘤并预防其转移显得十分重要。特异性指示 SC 转移的肿瘤标志物的鉴定，可以实现对 SC 的早期检测，还可以深入了解 SC 的发生和发展机制，进而实现 SC 的预防和治疗。

寻找肿瘤标志物一直是医师和生物研究人员热衷的研究方向，如原发性肝癌患者血清中的甲胎蛋白被公认为是肝癌最具诊断价值的诊断指标[4]。然而像甲胎蛋白这种具有重要诊断价值并投入临床实践的标志物却很少，这种现象可以归因于两个主要方面: ① 缺乏用于肿瘤标志物发现的有效方法; ② 缺乏用于肿瘤标志物验证和应用的实际测定的分子工具。

核酸适配体具有无免疫原性、尺寸小、优异的化学稳定性以及容易生产的特性，能够通过折叠三维结构以高亲和力与靶标特异性结合，并且能在分子水平上区分恶性肿瘤细胞及其相应的正常细胞，在识别分子差异上具有很大优势[5]。因此，可以把适配体用作探索肿瘤标志物的理想分子探针，进而通过后期的质谱检测分析出核酸适配体所结合的靶标。此外利用细胞指数富集的配基系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment，SELEX) 筛选的适配体可以继续用于鉴定肿瘤新的标志物[6]。到目前为止，利用细胞 SELEX 技术筛选出来的适配体已经鉴定出了多种肿瘤标志物，如酪氨酸蛋白激酶 7[7]、免疫球蛋白重 μ 链[8]、应激诱导磷蛋白 1[9] 等。

寻找核酸适配体靶蛋白实验已存在许多年，但利用此种方法找到的肿瘤标志物却很少，说明此种方法还存在一些难点有待解决。比如靶蛋白分子量不清楚因而很难锁定电泳中的靶标所在的条带。从捕获蛋白-适配体的磁珠洗去非特异性蛋白时需要适当的洗涤条件，过度的洗涤有可能将靶蛋白一同洗掉，洗涤不足会存留大量的非特异性蛋白，导致质谱结果数据繁多复杂，很难判断哪个是靶蛋白。本实验中一些技术环节上的改进，如多次重复实验以确保结果的可靠性; 通过加大细胞量去避免靶标蛋白因浓度过低导致 SDS-PAGE 检测不出条带的问题; 在核酸适配体和蛋白孵育时通过加大盐浓度以促进适配体和靶蛋白的牢固结合，并通过严格的洗涤步骤以去除非特异性结合蛋白等。这使得在重复 SDS-PAGE 时可以稳定的得到相同的差异条带。

本研究显示 NONO 参与了多种肿瘤的发生和发展，有文献[10] 报道称在乳腺癌细胞系 SKBR3 (HER2/c-erb-2 过表达) 中敲除 P54nrb/NONO 可抑制癌细胞的增殖、侵袭和迁移，提示 p54nrb/NO-

NO 很可能是促进乳腺癌细胞增殖、侵袭和迁移的重要调控蛋白;同时许多的研究表明 NONO 也能促进黑色素瘤[11]、膀胱移行细胞癌[12]、鼻咽癌[13]的侵袭和转移。这与适配体 LW-25 可以特异性识别 SC 转移细胞的特性很好的吻合,综合以上结果推断 NONO 极有可能是 LW-25 的靶标蛋白,并很可能也是引起 SC 转移的重要蛋白,但其作用机制仍不清楚。相信 NONO 基因功能的深入研究将为临床预测癌症转移和治疗癌症带来巨大潜力。

参考文献

[1] 夏 英,严芝强,毕 瑩,等. 长链非编码 RNA GHET1 在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 实用医学杂志,2016,32(9):1418-21.

[2] Gold L,Ayers D,Bertino J,et al. Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery[J]. PLoS One,2010,5(12):e15004.

[3] Hanahan D,Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell,2011,144(5):646-74.

[4] Jiang S Y, Shyu R Y, Huang M F, et al. Detection of alphafetoprotein-expressing cells in the blood of patients with hepatoma and hepatitis[J]. Br J Cancer, 1997, 75(6): 928-33.

[5] Fang X, Tan W. Aptamers generated from cell-SELEX for molecular medicine: a chemical biology approach[J]. Acc Chem Res, 2010, 43(1):48-57.

[6] Berezovski M V, Lechmann M, Musheev M U,et al. Aptamer-facilitated biomarker discovery(AptaBiD)[J]. J Am Chem Soc, 2008,130(28):9137-43.

[7] Shangguan D,Cao Z,Meng L,et al. Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells[J]. J Proteome Res,2008,7(5): 2133-9.

[8] Mallikaratchy P,Tang Z, Kwame S,et al. Aptamer directly evolved from live cells recognizes membrane bound immunoglobin heavy mu chain in Burkitt's lymphoma cells[J]. Mol Cell Proteomics, 2007,6(12):2230-8.

[9] Van Simaeys D,Turek D,Champanhac C,et al. Identification of cell membrane protein stress-induced phosphoprotein 1 as a potential ovarian cancer biomarker using aptamers selected by cell systematic evolution of ligands by exponential enrichment[J]. Anal Chem,2014,86(9):4521-7.

[10] 熊 薇,闫吕彬,吴嫦丽,等. NONO 基因沉默对乳腺癌细胞生物学特性影响研究[J]. 中华肿瘤防治杂志,2016,23(13):844-8.

[11] Schiffner S,Zimara N,Schmid R,et al. p54nrb is a new regulator of progression of malignant melanoma[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(8):1176-82.

[12] Barboro P,Rubaqotti A,Orecchia P,et al. Differential proteomic analysis of nuclear matrix in muscle-invasive bladder cancer: potential to improve diagnosis and prognosis[J]. Cell Oncol, 2008, 30(1):13-26.

[13] 张秀娟,熊 薇,吴嫦丽,等. NONO 基因沉默抑制鼻咽癌细胞的体外增殖、迁移和侵袭能力[J]. 肿瘤,2016,36(5):504-11.

To explore the target protein of HGC-27 aptamer in human gastric cancer cells with high metastasis

Liu Haobo,Liu Tao,Wang Yalei, et al

(*Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230022)

Abstract ***Objective*** To explore the target protein of aptamer LW-25, which can specifically identify the highly metastatic gastric cancer cells (HGC-27). ***Methods*** The aptamer (LW-25) has been synthesized for the specific recognition of highly metastatic gastric cancer (HGC-27) cells but not for non-metastatic gastric cancer cells (AGS). Firstly the target type of aptamer of nucleic acid was identified as protein by trypsin digestion cell method. Then the protein was extracted by the method of protein extraction, and the target protein bound by LW-25 was enriched by the affinity enrichment experiment mediated by aptamer of nucleic acid. After isolation by SDS-PAGE, the differential bands of the potential target protein were found. At last, the protein in the differential bands were identified by biological mass spectrometry, and the potential target protein was obtained by correlation analysis. ***Results*** The differential bands were found by SDS-PAGE. By mass spectrometry, the amount of protein(NONO) in the aptamer LW-25 sample group was extremely high, and the amount of protein in the library control group was very small, and that in the agarose gel beads group was almost nothing. Therefore, NONO was the most obvious differential protein. ***Conclusion*** NONO is a potential target protein of LW-25 and may be an important protein causing metastasis of gastric cancer.

Key words cell-SELEX; aptamer; gastric cancer; metastasis; target protein