

网络出版时间: 2019-5-30 10:51 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190527.1648.014.html>

基于 cell-SELEX 技术筛选高转移胃癌细胞系 HGC-27 核酸适配体

刘涛¹, 王进军², 方晓娜², 何磊², 杨伟丽², 罗昭锋², 王亚雷¹

摘要 目的 筛选针对高转移胃癌细胞(HGC-27)的核酸适配体。方法 以 HGC-27 为靶细胞,以 AGS 为反筛细胞,利用 Cell-SELEX 技术逐轮次筛选,从文库中挑选能与 HGC-27 结合的核酸适配体 LW-25。用流式细胞术检测核酸适配体测富集程度,核酸适配体与 HGC-27 的亲和力及特异性。结果 流式细胞仪显示随着筛选轮数的增加,次级文库与靶细胞结合的荧光强度增强。从次级文库中成功挑选出一条能与 HGC-27 结合的核酸适配体 LW-25。并且 LW-25 能特异性识别 HGC-27。胰蛋白酶处理 HGC-27 后, LW-25 与 HGC-

27 的结合能力较处理前明显下降。结论 核酸适配体 LW-25 能特异性识别 HGC-27,是潜在具有诊断胃癌转移的分子探针。

关键词 核酸适配体;胃癌;转移

中图分类号 R 735

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)06-0933-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.020

胃癌是消化系统的常见的恶性肿瘤,转移与侵袭是患者死亡的主要原因。大约 50% 患者在胃癌确诊时已经发生了转移^[1]。由于胃癌主要通过淋巴结转移^[2],因此及时准确的判断有无淋巴结转移对于胃癌的治疗方式选择及预后评价至关重要。CT 及 MRI 是目前临床上判断胃癌是否发生转移最常用的检测手段。然而,这种诊断方法主要根据病变部位形态学特征,不能从分子水平早期判断是否发生转移。核酸适配体(apptamer)是一类人工合成

2019-03-05 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 230027

作者简介:刘涛,男,硕士研究生;

王亚雷,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: alei416@163.com

Effect of burned-rat serum on the permeability of vascular endothelial cells

Duan Shengliang¹, Hu Zijian², Meng Chengying¹, et al

(¹ Dept of Burn, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

² Dept of Clinical Medicine, First Clinical Medical College, Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of burned-rat serum on the vascular permeability and its mechanism. **Methods** Primary cultured rat aortic endothelial cells were divided into normal group and serum intervention group according to whether or not to apply burn serum intervention, serum intervention group was used to treat rat aortic endothelial cells for 24 h with burned 12 h serum. Cell permeability test was used to detect changes in monolayer cell membrane permeability. The expressions of the mRNA and protein of cell permeability-related genes ET-1, ETA, ETB and ZO-1 were detected by Real-time PCR and Western blot respectively. **Results** Compared with the normal group, the cell permeability coefficient in serum intervention group was significantly increased ($P < 0.01$), the expressions of the mRNA and protein of cell permeability-related genes ET-1, ETA and ETB in serum intervention group were significantly increased ($P < 0.01$), and the expression of the mRNA and protein of ZO-1 in serum intervention group was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** The serum of burned rats can increase the permeability of vascular endothelial cells, and the increase of permeability may be related to the increased expression of ET-1, ET-A, ET-B and the decrease of ZO-1 expression.

Key words burns; endothelial cells; vascular permeability; ET-1; ZO-1

的短链单链 DNA 或者 RNA ,可以与靶标特定结构结合产生类似“抗原-抗体”反应,故又称之为“化学抗体”。因此,该研究利用目前常用的细胞-配体指数富集系统进化^[3](systematic evolution of ligands by exponential enrichment, Cell-SELEX) 技术筛选特异性识别高转移性胃癌细胞株的核酸适配体,为胃癌早期转移的分子诊断提供基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 细胞系 人胃癌细胞株 HGC-27(高转移能力)、AGS(无转移能力)购自中国科学院上海细胞库;肺癌细胞 A549、肝癌细胞 Hep3B 及 HepG2、结肠癌细胞 SW480、乳腺癌细胞 MCF-7 均为本实验室保存;人胚肾细胞 HEK-293 为中国科学技术大学生命科学院惠赠;实验所用细胞均处于对数期。

1.1.2 随机 DNA 文库及引物 随机单链 DNA 文库(5'-TTCAGCACTCCACGCATAGC-N40-CCTATGCGTG-CTACCGTGAA-3'),引物:5'-FAM-TTCAGCACTCCACGCATAGC-3'(上游荧光素标记引物)、5'-48A-TTCACGGTAGCAGCATAGG-3'(上游 18 个碱基 A 加长标记引物)由上海生工生物工程公司合成。

1.1.3 主要试剂 Q5 高保真 DNA 聚合酶(英国 NEB 公司);PMI-1640 及 DMEM 培养基(美国 HyClone 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbecco's)、酵母 tRNA 购自美国 Sigma 公司;葡萄糖以及 BSA 购自上海生工生物工程公司;无酶消化液(北京普利莱基因技术有限公司);EM90 矿物油由中国科学技术大学生命科学院配置并提供。洗涤缓冲液以及结合缓冲液由实验室自行配置:洗涤缓冲液(含 4.5 g/L 葡萄糖及 5 mmol/L MgCl₂ 的杜氏磷酸盐缓冲液);结合缓冲液(含有 0.1 mg/ml 酵母 tRNA 和 1 mg/ml BSA 的洗涤缓冲液)。其他试剂均为国产分析纯,实验用水为过滤除菌的超纯水。

1.1.4 主要实验仪器 Guava easyCyte 5 流式细胞仪(美国 Merck Millipore 公司);ABI 7500 PCR 扩增仪(美国 Thermo 公司);CLM-170B-8-NF 型 CO₂ 培养箱(上海 Esco 公司)。

1.2 方法 参照文献^[4]采用 Cell-SELEX 技术。

1.2.1 核酸适配体筛选

1.2.1.1 文库处理 单链 DNA 文库 1.3 nmol 溶解于 1.3 ml 洗涤缓冲液中,95 °C 变性 10 min,冰浴 10 min 后,加入 200 μl 结合缓冲液。

1.2.1.2 消减筛选 将预处理文库与 HGC-27 细胞在 4 °C 振荡孵育 120 min,去上清液,加入 2 ml 洗涤缓冲液,洗涤 2 次。加入 200 μl 超纯水(ddH₂O),用细胞刮刀将细胞转移至离心管。100 °C 热变性 10 min,收集与 HGC-27 结合的单链 DNA(ssDNA)。

1.2.2 亚文库制备 将 ssDNA 与配置含有 FAM 修饰及碱基 A 加长的引物的 PCR 扩增体系涡旋混合,然后加入 6 ml EM90 矿物油振荡混匀,PCR 扩增,98 °C 变性 3 min,进行 15~25 个循环,98 °C 变性 10 s,68 °C 复性 20 s,72 °C 延伸 20 s,最后 72 °C 延伸 3 min。PCR 产物加入 16 ml 正丁醇振荡混匀,9 000 r/min,10 min。弃上清液,沉淀物利用 8% 变性 PAGE 胶电泳分离、浓缩得到 ssDNA 文库。从第 5 轮开始先将上一轮 ssDNA 文库与 AGS 细胞孵育 30~60 min,上层清液用于正筛。

1.2.3 高特异性及亲和力次级文库 为了提高筛选所得核酸适配体的亲和力和特异性,在筛选过程中改变部分筛选条件,反筛选的孵育时间由 30 min 逐渐增加至 60 min,正筛选的孵育时间由 120 min 逐渐减少至 60 min,提高正筛选的洗涤强度,包括洗涤次数和时间、洗涤液的体积,并在孵育过程中加入胎牛血清以降低非特异性结合。

1.2.4 文库富集程度分析 用流式细胞术监测 ssDNA 文库中核酸适配体的富集程度。PBS 洗涤靶细胞 HGC-27 两次,加入无酶消化液收集靶细胞。将终浓度为 200 nmol/L 的 ssDNA 文库与约 4 × 10⁶ 个靶细胞 4 °C 孵育 60 min,洗涤缓冲液洗 2 次后流式细胞仪检测荧光强度,以 FAM 标记的随机 DNA 序列做为对照。核酸适配体亲和力测定及细胞特异性考察时采用上述相同的实验操作方法。

1.2.5 筛选产物测序及分析 筛选产物的克隆和测序。经过 11 轮的筛选后,产物用不带标记的引物进行 PCR 扩增后,由天津诺禾致源生物信息科技有限公司进行高通量测序工作。用 Clustal X 软件进行序列同源性比对,从每个家族中挑出序列富集度最高进行 FAM 荧光修饰合成并进行亲和力鉴定。

1.2.6 核酸适配体与靶标亲和力分析 平行设置 6 个浓度梯度(50、100、200、300、400、500 nmol/L)的核酸适配体样品(重复 3 次)与靶细胞孵育,根据 $Y = B_{max} X / (K_d + X)$ 方程,用 GraphPad Prism 软件分析饱和结合曲线获得解离常数(K_d)。

1.2.7 核酸适配体与靶标特异性分析 核酸适配体对靶细胞株的特异性识别能力是其作为特异性分

子识别探针的关键。将挑选的核算适配体与胃癌细胞 HGC-27、肝癌细胞 HepG2、Hep3B、结肠癌细胞 SW480、肺癌细胞 A549、乳腺癌细胞 MCF-7 及人胚肾细胞 HEK-293 进行结合反应,操作同上,流式细胞术观察荧光强度。

1.2.8 核酸适配体与靶标结合位点化学性质初步分析 PBS 洗涤靶细胞 HGC-27 两次,然后分别加入 500 μ l 胰蛋白酶以及无酶消化液,室温消化 2 min 后迅速加入 2 ml PBS(含 10% FBS)终止消化,洗涤。然后按上述操作步骤进行亲和力测定。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高转移胃癌细胞株 HGC-27 核酸适配体筛选

采用流式细胞术监测筛选文库与靶细胞的亲和富集程度,结果如图 1 所示。随着筛选轮数的增加,次级文库与靶细胞株 HGC-27 结合的荧光强度逐渐增加,表明次级文库能与靶细胞株 HGC-27 结合的核酸适配体逐渐富集;而次级文库与对照细胞株 AGS 细胞株荧光强度无明显变化,表明次级文库具有较强特异性。同时,流式细胞术显示第 11 轮与第 9 轮荧光强度无明显变化并且达到最大值,因此将筛选文库进行克隆测序。对次级文库进行 PCR 扩增,高通量测序。根据测序结果及 Clustal X 分析,选择的同源性及富集程度最高的 7 条序列进行化学合成,流式细胞仪分析表明只有一条对靶细胞株 HGC-27 具有较强结合能力的核酸适配体 LW-25。见表 1。

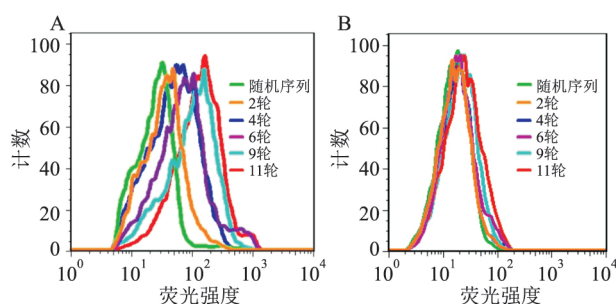


图 1 不同轮数的筛选产物与细胞结合的流式细胞术测定结果

A: 各轮文库与 HGC-27 细胞株结合荧光强度; B: 各轮文库与 AGS 细胞株结合荧光强度

2.2 核酸适配体的亲和力考察 通过 Graph-Pad Prism 7.0 软件分析得知, LW-25 的解离常数(Kd)为 121 nmol/L,见图 2。表明筛选得到的核酸适配体 LW-25 与靶细胞株有高的亲和性。

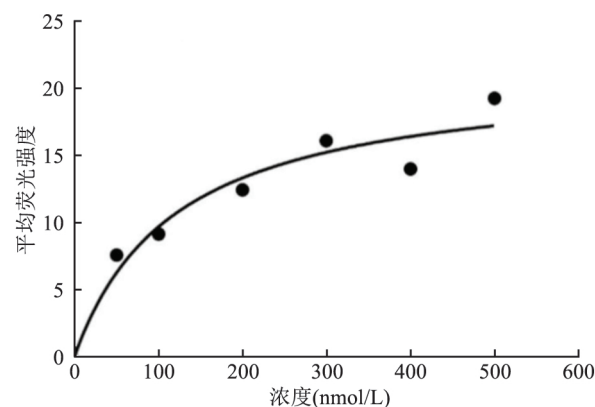


图 2 适配体 LW-25 与 HGC-27 亲和力分析

2.3 核酸适配体特异性考察 利用流式细胞术考察核酸适配体与靶细胞,其他肿瘤细胞系及人 HEK-293 细胞系的结合情况(核酸适配体终浓度 400 nmol/L)。如图 3 所示,筛选得到的核酸适配体 LW-25 特异性与靶细胞结合,可以很好地区分识别转移性胃癌细胞与其他类型肿瘤细胞株如乳腺癌、肝癌、结肠癌、肺癌以及 HEK-293,表现出对靶细胞株的高度特异性。

2.4 LW-25 与 HGC-27 结合位点化学性质初步分析 如图 4 所示,核酸适配体 LW-25 与经胰蛋白酶处理后 HGC-27 细胞株结合荧光强度(蓝色线条),明显低于其与未经胰蛋白酶处理的同种细胞(红色线条),表明其结合位点可能为蛋白质。

3 讨论

胃癌是继肺癌之后在全球癌症相关死因中排第 2 位,其预后与分期密切相关。由于胃癌主要通过淋巴结转移,因此术前准确评估有无淋巴结转移对于胃癌分期以及治疗方式选择至关重要。对于无淋巴结转移的早期胃癌可通过 ESD 术治疗,对于进展期胃癌可通过外科手术治疗或化疗。目前临床上手术前判断胃癌有无淋巴结转移主要依赖 CT、MRI 及 PET-CT。研究^[5]分析表明这些检测技术在诊断胃癌有无淋巴结转移存在一定不足。病理学上常利用

表 1 LW-25 与 HGC-27 细胞株的结合平衡解离常数

核酸适配体	序列(5'-3')	Kd(nmol/L)
LW-25	TTCAGCACTCCACGCATAGCCAAGTTGCCGACAATACAACGGACCGATTATTTCCACCGACCTATGCGTGCTACCGTGAA	121 \pm 28

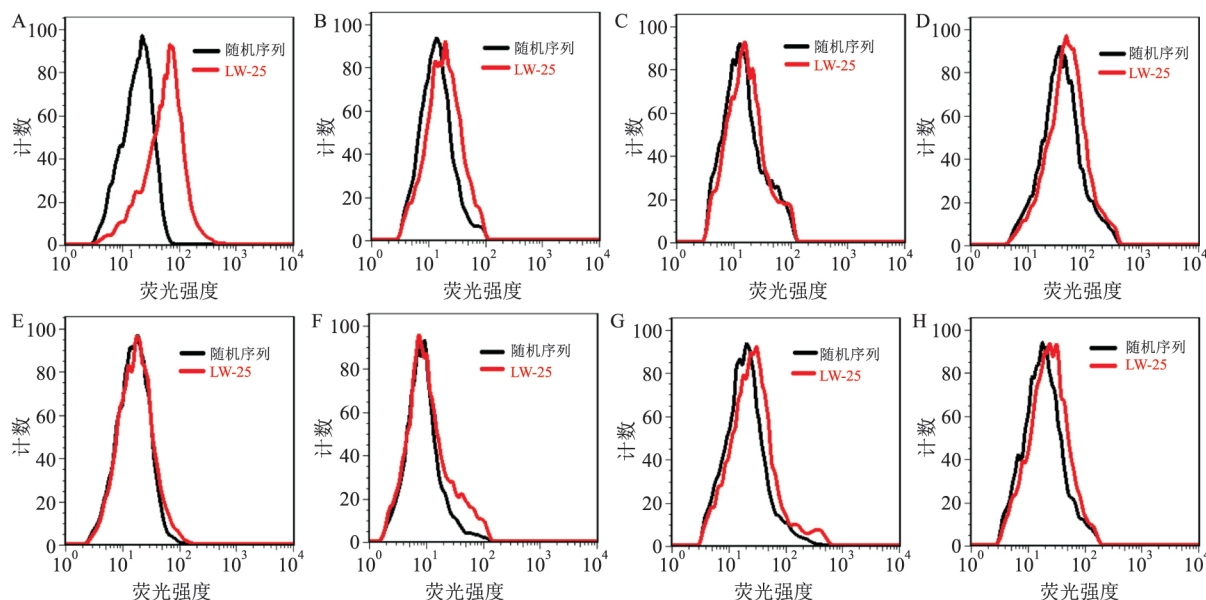


图3 核酸适配体 LW-25 与靶细胞株结合特异性分析

A: HGC-27; B: AGS; C: A549; D: Hep3B; E: SW480; F: MCF-7; G: HepG2; H: HEK-293

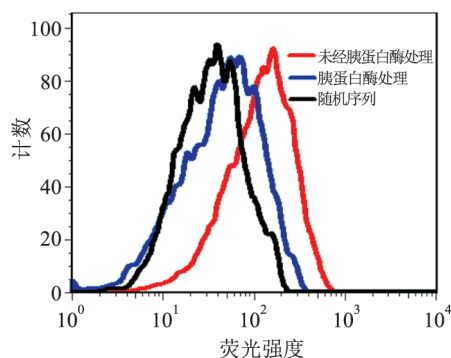


图4 胰蛋白酶处理对 LW-25 与 HGC-27 结合荧光强度的影响

连续切片技术,免疫组化以及逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术来检测胃癌是否有早期转移(淋巴结微转移),然而这些技术存在操作繁琐,准确率较低以及假阳性高等问题^[6]。

核酸适配体是继抗体之后又一类被广泛应用的生物靶向分子,具有很强的亲和力及特异性。2006年谭蔚泓院士课题组率先提出 Cell-SELEX 技术,通过该技术能在不清楚或不能区分完整细胞上的靶标的情况下,获得一组识别不同细胞的核酸适配体分子探针。其自身能够折叠形成特定的空间结构,通过氢键、疏水作用、范德华力等非共价作用力与靶标特异性、高亲和性结合^[7]。其与靶标的结合机制与抗体抗原的作用机制相类似,因此核酸适配体又被称为“化学抗体”。与传统的生物抗体相比,核酸适配体与靶标结合不仅具有较高特异性和亲和力,并且易于快速化学合成、低免疫原性、毒性小,稳定性

高,易穿透肿瘤组织,是一类具有重大应用潜能的分子研究工具^[8]。

近年来,Cell-SELEX 技术被广泛运用于筛选识别肿瘤细胞的分子探针-核酸适配体。Lu et al^[9]以肝癌细胞株 HepG2 为正筛细胞,肝实质细胞 HL-7702 为反筛细胞,成功筛选出识别特异性识别肝癌细胞 HepG2 的核酸适配体 HA09,并且能够区分肝癌组织与正常组织。Wu et al^[10]基于 Cell-SELEX 技术筛选出核酸适配体 XQ-2d 不仅能特异性识别胰腺导管癌细胞,而且在鉴别胰腺癌组织与正常胰腺组织上显示出较高的诊断价值。同时 XQ-2d 能够特异性识别小鼠体内被接种上胰腺导管癌的肿瘤组织。

目前已筛选的胃癌细胞核酸适配体多以 AGS 或 SGC-7901 为正筛细胞,胃正常上皮细胞 GES-1 为反筛细胞,这些核酸适配体只能用于胃癌早期诊断而对于胃癌转移没有诊断价值^[11-12]。因此,本研究以高转移胃癌细胞 HGC-27 为正筛细胞,无转移特性胃癌细胞 AGS 为反筛细胞,建立了细胞核酸适配体筛选平台,对筛选过程 PCR 方法进行改进,成功筛选出一条针对高转移胃癌细胞的核酸适配体并且具有较高亲和力及特异性。同时胰蛋白酶消化处理后, LW-25 与 HGC-27 几乎没有结合,初步提示靶标分子可能为蛋白。

在本研究中一些技术环节上的改进,如在 Cell-SELEX 过程中的扩增环节采用乳化液 PCR 技术。相对于传统的 RCP 扩增容易引起偏好扩增以及非

特异性扩增 乳化液 PCR 扩增的优势在于^[13]: ① 可以把不同的 DNA 片段分在不同的乳化液颗粒中单独进行 PCR 扩增, 避免了引物间以及不同种类产物间相互杂交, 消除了非特异性产物。② 能消除不同产物间的竞争抑制, 避免了传统 PCR 优先扩增短链 DNA 片段问题。③ 高通量, 能同时扩增多达 10^8 个不同的 DNA 模板, 且产物量多于传统 PCR。④ 灵敏度高, 能把文库中极微量 DNA 扩增出来, 解决了扩增中出现偏好扩增; 同时采用高保真 Q5 扩增酶, 能够有效减少实验过程的污染序列对扩增干扰。

参考文献

- [1] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell* 2011, 144(5): 646–74.
- [2] Shen Z, Ye Y, Xie Q, et al. Effect of the number of lymph nodes harvested on the long-term survival of gastric cancer patients according to tumor stage and location: a 12-year study of 1 637 cases[J]. *Am J Surg* 2015, 210(3): 431–3.
- [3] Shanguan D, Li Y, Tang Z W, et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study[J]. *P Natl Acad Sci USA* 2006, 103(32): 11838–43.
- [4] 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.
- [5] Seevaratnam R, Cardoso R, McGregor C, et al. How useful is pre-operative imaging for tumor, node, metastasis (TNM) staging of gastric cancer? A meta-analysis[J]. *Gastric Cancer* 2012, 15: S3–18.
- [6] Zhou Y, Zhang G J, Wang J, et al. Current status of lymph node micrometastasis in gastric cancer[J]. *Oncotarget* 2017, 8(31): 51963–9.
- [7] Romero-Lopez C, Berzal-Herranz A. Aptamers: biomedical interest and applications[J]. *Pharmaceuticals (Basel)* 2017, 10(1): 1–3.
- [8] Hori S I, Herrera A, Rossi J J, et al. Current advances in aptamers for cancer diagnosis and therapy[J]. *Cancers (Basel)* 2018, 10(1): 1–33.
- [9] Lu B, Wang J, Zhang J, et al. Screening and verification of ssDNA aptamers targeting human hepatocellular carcinoma[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2014, 46(2): 128–35.
- [10] Wu X, Zhao Z, Bai H, et al. DNA aptamer selected against pancreatic ductal adenocarcinoma for *in vivo* imaging and clinical tissue recognition[J]. *Theranostics* 2015, 5(9): 985–94.
- [11] Cao H Y, Yuan A H, Shi X S, et al. Evolution of a gastric carcinoma cell-specific DNA aptamer by live cell-SELEX[J]. *Oncol Rep* 2014, 32(5): 2054–60.
- [12] Ding F, Guo S, Xie M, et al. Diagnostic applications of gastric carcinoma cell aptamers *in vitro* and *in vivo* [J]. *Talanta* 2015, 134: 30–6.
- [13] Shao K, Ding W, Wang F, et al. Emulsion PCR: a high efficient way of PCR amplification of random DNA libraries in aptamer selection[J]. *PLoS One* 2011, 6(9): 1–7.

Cell – SELEX – based selection of aptamers for targeting high metastatic gastric cancer cells (HGC – 27)

Liu Tao¹, Wang Jinjun², Fang Xiaona², et al

(¹Division of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027)

Abstract Objective To screen aptamers binding highly metastatic gastric cancer cells(HGC-27) . **Methods** HGC-27 cells were selected as targeted cells and AGS cells were selected as negative cells. A DNA aptamer named LW-25 was successfully selected against HGC-27 cells by using the cell-based systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) method. Flow cytometry was used to monitor the enrichment of the selected DNA pool and to evaluate the selectivity and the binding affinities of LW-25. **Results** The subpools binding against HGC-27 cells increased along with selection rounds. We successfully selected a aptamer named LW-25 which could specifically bind against HGC-27 cells. Furthermore, trypsin treatment greatly reduced the binding of LW-25 to HGC-27 cells. **Conclusion** These studies demonstrated that this HGC-27 specific aptamer LW-25 may be a potential molecular probe to recognize metastatic gastric cancer cells.

Key words aptamer; gastric cancer; metastasis