

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.02.002

转移性大肠癌 LoVo 细胞特异性核酸适配子 W14 的生物活性和血浆稳定性

李婉明,周琳琳,方瑾(中国医科大学基础医学部 卫生部细胞生物学重点实验室,教育部医学细胞生物学重点实验室,细胞生物学教研室,辽宁 沈阳 110122)

[摘要] **目的:** 分析转移性大肠癌 LoVo 细胞特异性核酸适配子 W14 的生物活性和血浆稳定性。**方法:** 采用荧光显微镜流式细胞术分析 W14 在 25 °C 和 37 °C 下与靶细胞 LoVo 的特异结合活性;流式细胞术检测 W14 在血浆环境下对 LoVo 细胞的特异识别能力;37 °C 下 W14 分别在完全培养基和人血浆中孵育 0.5、1、1.5、2、3、4、6 h,琼脂糖凝胶电泳检测 W14 的生物稳定性;用 2、4、8、10 μmol/L 的 W14 处理 LoVo 细胞 24、48、72 h,MTS 实验测定 W14 的细胞毒性。**结果:** W14 在不同温度和血浆环境中以及不同温度条件下都能特异地识别和结合靶细胞 LoVo,能稳定地存在于血浆中 6 h 不发生降解,且对细胞没有明显的毒性作用。**结论:** 转移性大肠癌特异性核酸适配子 W14 具有良好的适应能力和特异性结合能力,有较好的生物稳定性和低毒性,适应于人体内应用。

[关键词] 核酸适配子;W14;大肠癌;LoVo 细胞;生物活性;稳定性

[中图分类号] R735.3⁺4; Q528.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)02-112-05

Biological activity and plasma stability of metastatic colorectal cancer LoVo cell specific aptamer W14

LI Wanming, ZHOU Linlin, FANG Jin (Department of Cell Biology, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health, and Key Laboratory of Medical Cell Biology, Ministry of Education, Foundation Department, China Medical University, Shenyang 110122, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the biological activity and plasma stability of specific aptamer W14 to metastatic colorectal cancer LoVo cell. **Methods:** Fluorescence microscopy was used to observe the specific binding activity of W14 to target LoVo cells under 25 °C and 37 °C; Flow cytometry was used to detect W14 recognition ability of LoVo cell in plasma environment. W14 was respectively incubated in complete culture medium and human plasma for 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4 and 6 h under 37 °C, and Agarose gel electrophoresis was used to observe the biological stability of aptamer W14; LoVo cells were treated with W14 at different concentrations (2, 4, 8, 10 μmol/L) for 24, 48 and 72 h, and MTS was used to investigate the cytotoxicity of aptamer W14. **Results:** The aptamer W14 could specifically recognize the target LoVo cells under different temperatures and plasma environments, and it could stably exist in plasma for 6 hours without degradation, in addition, it had no obvious toxic effect on cells. **Conclusion:** Metastatic colorectal cancer-specific aptamer W14 is suitable for *in vivo* use, with superior adaptability, good biological stability and low toxicity.

[Key words] aptamers; W14; colorectal cancer; LoVo cell; biologic activity; stability

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(2): 112-116. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.02.002]

大肠癌是常见的恶性肿瘤,在全球范围内发生率呈逐年上升趋势^[1]。对于有复发和转移的大肠癌患者,临床上常使用化疗的方式来提高其生存率^[2-3],但由于缺乏靶向性和选择性,其对正常组织和细胞产生很大的毒副作用^[4]。有研究^[5-8]证实,通过主动靶向递送系统将化疗药物释放至肿瘤组织和细胞,能够显著性地增加药物的功效并降低其毒副作用。目前,临床上主要使用单克隆抗体作为靶

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81502703)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81502703)

[作者简介] 李婉明(1984-),女,博士,讲师,主要从事肿瘤标志物的筛选鉴定及应用方面的研究,E-mail: liwanming125@sina.com

[通信作者] 方瑾(FANG Jin, corresponding author),女,博士,教授,主要从事肿瘤标志物的筛选鉴定及其功能研究,E-mail: jfang61@netease.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170120.1116.006.html>

向递送系统的载体,然而抗体分子质量大、具有免疫原性、制备复杂等缺点,极大地限制其适用范围。核酸适配子是一类经过指数富集的配基进化系统(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术筛选得到的寡核苷酸序列(ssDNA或RNA),自身能折叠成特定的空间结构从而与靶标特异性结合,常被称为“分子抗体”^[9-11]。核酸适配子作为靶向载体,与蛋白类抗体相比,具有特异性更高、亲和力更强、稳定性好、免疫原性和毒性低,以及易于合成、化学修饰及穿透肿瘤组织等优点^[12-13]。

本课题组前期利用消减 Cell-SELEX 技术针对转移性大肠癌 LoVo 细胞系进行筛选,成功获得一组与转移性大肠癌 LoVo 细胞高亲和结合的核酸适配子^[14]。其中酶处理实验证实核酸适配子 W14 结合的靶分子为细胞膜表面的受体,并可以受体介导的方式进入细胞内,具有成为靶向药物载体的潜能。本研究对 W14 在不同温度和生理环境下对靶细胞 LoVo 的识别能力进行检测,对 W14 在血浆中的稳定性及毒性进行研究,为其作为靶向载体进行体内应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人大肠癌 LoVo 细胞购自上海中科院细胞库,核酸适配子序列 W14:5'-AGGATACAGGTTGGCTTGTTGGCTATGGGTGGGTGTGGTGCGTATCC-3')和原文库序列[Library:5'-AGGAGCAGCGTGGAGGATA(45N)TTAGGCTGTCTCCTCGTGGT-3']购自上海生工生物公司,胎牛血清购自 HyClone 公司,牛血清白蛋白购自 Biosharp 公司,鲱鱼精 DNA 购自 Sigma 公司,胰蛋白酶购自 HyClone 公司,MTS 试剂盒购自 Promega 公司,DNA Marker 购自 TaKaRa 公司,人全血由中国医科大学附属一院提供(获得中国医科大学伦理委员会批准),RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司。FACScalibur 型流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 细胞培养

LoVo 细胞使用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养,取对数期生长细胞进行实验。

1.3 荧光显微镜观察 W14 与 LoVo 细胞的结合情况

取对数生长期 LoVo 细胞接种于 6 孔板中(内置盖玻片),过夜培养。PBS 洗涤细胞 2 次,加入 FITC 标记的 W14 或 Library,终浓度为 250 nmol/L,分别与细胞在 25 °C、37 °C 共同孵育 30 min。PBS 洗涤细胞,

利用荧光显微镜观察细胞的荧光信号。

1.4 流式细胞术检测 W14 与 LoVo 细胞的结合情况

取对数生长期 LoVo 细胞,无酶细胞消化液消化细胞,吹打成单细胞悬液。加入 FITC 标记的 W14 或 Library,终浓度为 250 nmol/L,与细胞共同孵育 30 min;1 000 × g 离心 5 min,弃上清,加入 300 μl PBS 重悬细胞,流式细胞术检测细胞的荧光信号。

1.5 琼脂糖凝胶电泳分析 W14 的稳定性

W14 加入 RPMI 1640 培养基(10% FBS)和人新鲜血浆中,37 °C 中分别孵育 0.5、1、1.5、2、3、4、6 h。配制 3% 的琼脂糖凝胶进行电泳分离,紫外分光光度计下检测核酸适配子的降解情况。流式细胞术检测孵育 6 h 后的 W14 与 LoVo 细胞的结合活性。

1.6 MTS 实验检测 W14 对 LoVo 细胞的毒性作用

LoVo 细胞培养至对数生长期后,胰蛋白酶消化后计数,调整细胞密度至 5 × 10⁴ 个/ml。细胞接种于 96 孔板,每孔 100 μl,37 °C 培养 24 h。分别加入不同浓度的 W14(2、4、8、10 μmol/L),未处理的细胞组设为对照组,分别培养 24、48、72 h;每孔加入 MTS 溶液 20 μl,继续 37 °C 孵育 1 h。选择 490 nm 波长,酶标仪测定光密度(D)值,计算各组细胞的存活率。细胞存活率(%)=(实验组 D 值 - 空白组 D 值)/(对照组 D 值 - 空白组 D 值) × 100%

1.7 统计学处理

采用 SPSS15.0 统计软件,细胞存活率数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 *t* 检验对不同浓度 W14 处理后的细胞存活率与没有加入 W14 的对照组细胞存活率进行统计分析。*P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 W14 在不同温度下均能与 LoVo 细胞特异性结合

不同温度下 W14 与靶细胞 LoVo 的结合实验后,荧光显微镜观察结果(图 1)显示,无论在室温 25 °C 或体内温度 37 °C 条件下,与 W14 一起孵育的 LoVo 细胞的细胞膜表面均能观察到明显的绿色荧光,而 Library 组的细胞未见有特异荧光。

2.2 W14 在血浆环境下能与 LoVo 细胞结合

将 W14 与 LoVo 细胞的孵育置于细胞培养基(10% FBS)或人新鲜血浆中进行细胞结合,流式细胞术结果(图 2)显示,无论孵育条件为细胞培养基或人血浆中,W14 与 LoVo 细胞的结合峰与 Library 相比均发生了明显的右移,且右移程度跟孵育条件为缓冲液时的基本一致。

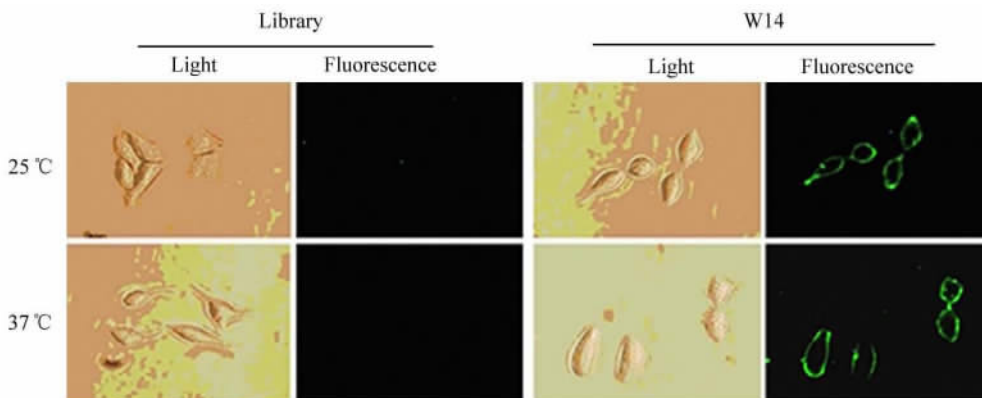


图 1 流式细胞术检测 W14 在不同温度下与 LoVo 细胞的结合能力(×200)

Fig. 1 The binding capacity of W14 to LoVo cells at different temperatures detected by Flow cytometry(×200)

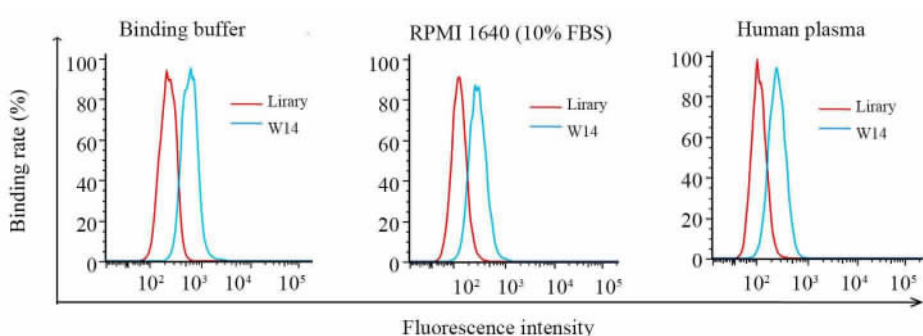


图 2 W14 在不同环境下与 LoVo 细胞的结合能力

Fig. 2 The binding capacity of aptamer W14 to LoVo cells in different mediums

2.3 W14 的生物稳定性较好

核酸适配子在体内可能会受到核酸酶的降解。为了考察核 W14 的体内稳定性,将 W14 置于细胞培养基(10% FBS)或人新鲜血浆中不同时间,然后利用琼脂糖凝胶电泳观察核酸适配子。结果(图 3)显示: W14 在 RPMI1640 培养基(10% FBS)或人新鲜血浆中持续孵育 6 h,其条带亮度没有明显改变,且无明显的弥散降解条带出现,表现出良好的稳定性。

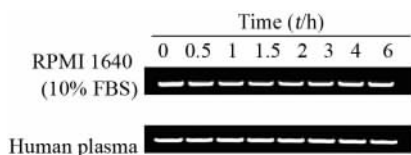


图 3 琼脂糖电泳分析 W14 在完全培养基和人血浆中孵育不同时间点后的稳定性

Fig. 3 Stability of W14 in complete culture medium and human plasma at different times detected by agarose gel electrophoresis assay

取孵育 6 h 后的 W14 与靶细胞 LoVo 进行细胞结合实验,流式细胞术结果(图 4)显示,与没有孵育的 W14 相比,孵育 6 h 后的 W14 与靶细胞的荧光结合峰仅有少许的左移,但是与 Library 组相比,仍有明显的右移,表明孵育后的 W14 基本上保持了靶细胞 LoVo 原有的结合能力。

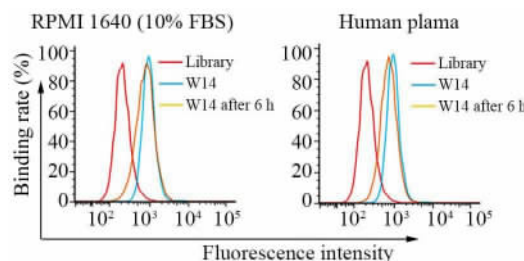


图 4 流式细胞术检测 W14 在完全培养基和人血浆中孵育 6 h 后与 LoVo 细胞的结合能力

Fig. 4 The binding capacity of W14 to LoVo cells after 6 h incubation in complete culture medium and human plasma detected by Flow cytometry

2.4 W14 对靶细胞 LoVo 没有毒性作用

MTS 实验结果(图 5)显示,与对照组相比,将不同浓度(2、4、8、10 $\mu\text{mol/L}$)的 W14 与 LoVo 细胞分别孵育 24、48、72 h,各组细胞存活率均无显著变化。

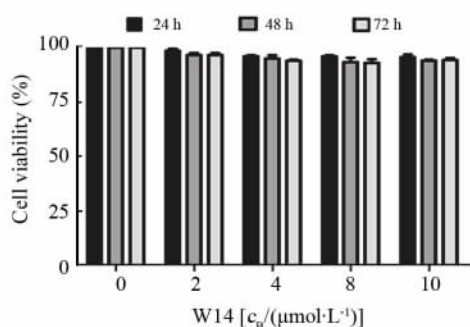


图 5 W14 对 LoVo 细胞的毒性

Fig. 5 The cytotoxicity of W14 against LoVo cells

3 讨论

转移性大肠癌恶性程度高、预后差。化疗可以通过缩小肿瘤体积使其适合手术治疗来提高患者的生存率,但是很快出现耐药性使疗效降低。目前临床上主要是通过提高药物使用剂量来克服耐药性,但却往往会引起更为严重的不良反应^[15]。主动靶向药物递送系统能够特异性地将药物输送至靶肿瘤组织和细胞并降低不良反应,从而在一定程度上克服耐药性^[16-17]。

本研究所使用的核酸适配子 W14 是本课题组前期以转移性大肠癌 LoVo 细胞为靶细胞、非转移性大肠癌 HCT-8 细胞为消减细胞进行筛选得到的^[14]。前期实验^[18]证实,W14 能被内化进入细胞,可作为化疗药物的靶向载体。但是核酸适配子的靶向功能只有在它与受体接触时才能发挥,而核酸适配子依赖于它们的二级或三级结构结合靶标,随着核酸适配子所在环境的不同,各种破坏二级或三级构造的因素(如温度、pH、离子强度等)都可能影响其结合能力,从而限制核酸适配子的应用。此外,体内靶物质的构象不像体外实验的靶物质一样保持恒定不变。如果体内靶细胞的表面发生小的变化,核酸适配子也可能无法和靶物质结合。因此,为了探讨 W14 的体内运用的可能性,首先利用荧光显微镜观察 W14 在 25 °C 和 37 °C 与靶细胞 LoVo 的结合,结果表明 W14 仍能保持其与靶细胞的结合力,提示 W14 可以应用于室温或体内的实验。接下来将

W14 对 LoVo 细胞的识别拓展到培养基和人血清这一更为复杂的生物环境中,以考察 Cell-SELEX 技术筛选的核酸适配子是否具备克服复杂环境识别靶标物的能力。结果也证实,即使肿瘤细胞所处的环境更为复杂,W14 依然能够实现对肿瘤细胞的特异性有效结合。这可能的原因是 W14 序列中所含的 GC 含量较多,形成的空间结构时较为牢固,受到周围环境的影响较少,所以在不同环境中仍然能保持其原有的空间结构,并能与靶细胞发生特异性结合。

核酸适配子的生物稳定性也是影响体内运用时的一个重要因素^[19-20]。核酸适配子在血液中可能被核酸酶降解,为了考察 W14 的稳定性,将其放置人新鲜血浆中一段时间,利用琼脂糖电泳检测是否分解,并进一步利用流式细胞术检测孵育后核酸适配子的细胞结合能力。结果证实核酸适配子 W14 具有良好的稳定性,且能保持其原有的结合能力。此外,笔者还考察了 W14 的细胞毒性,结果证实其对细胞没有毒性作用。

总之,本研究结果证实 W14 在生理温度及生理环境下均能特异性地识别和结合靶细胞,具有良好的生物稳定性,并且对正常细胞没有毒性作用,具有良好的体内实用性。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013 [J]. *Cancer J Clin*, 2013, 63(1): 11-30. DOI:10.3322/caac.21166.
- [2] LINNEKAMP J F, WANG X, MEDEMA J P, et al. Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: a case for molecular disease subtypes [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(2): 245-249. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-14-2240.
- [3] CORTÉ H, MANCEAU G, BLONS H, et al. MicroRNA and colorectal cancer [J]. *Dig Liver Dis*, 2012, 44(3): 195-200. DOI: 10.1016/j.dld.2011.10.010.
- [4] TOUGERON D, SHA D, MANTHRAVADI S, et al. Aspirin and colorectal cancer: back to the future [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(5): 1087-1094. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-13-2563.
- [5] LI W, CHEN H, YU M, et al. Targeted delivery of doxorubicin using a colorectal cancer-specific ssDNA aptamer [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2014, 297(12): 2280-2288. DOI:10.1002/ar.22990.
- [6] LI X, ZHAO Q, QIU L. Smart ligand: aptamer-mediated targeted delivery of chemotherapeutic drugs and siRNA for cancer therapy [J]. *J Control Release*, 2013, 171(2): 152-162. DOI:10.1016/j.jconrel.2013.06.006.
- [7] 高萌,刘家云,马越云,等. Beclin1 进化保守区-SA 融合蛋白偶联生物素-A10 适配子制备 PSMA 靶向系统及其前列腺癌细胞的抑制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(2): 161-167. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.002.

- [8] CATUOGNO S, ESPOSITO C L, DE FRANCISCIS V. Aptamer-mediated targeted delivery of therapeutic: an update[J]. *Pharmaceuticals*, 2016, 9(4): 69-75. DOI:10.3390/ph9040069.
- [9] VOROBYEVA M, VOROBYEV P, VENYAMINOVA A. Multivalent aptamers: versatile tools for diagnostic and therapeutic applications[J]. *Molecules*, 2016, 21(12): 1613-1622. DOI: 10.3390/molecules21121613.
- [10] 张瑞秀,徐文,殷正丰. 肿瘤细胞特异性适配子筛选技术及其应用的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 18(5): 561-564. DOI: 10.3872 / j. issn. 1007- 385X. 2011. 05. 019.
- [11] PARASHAR A. Aptamer in therapeutics[J]. *J Clin Diagn Res*, 2016, 10(6): 1-6. DOI: 10.7860/JCDR/2016/18712.7822.
- [12] 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. DOI:10.1021/ar900101s.
- [13] WANG C H, KANG S T, LEE Y H, et al. Aptamer-conjugated and drug-loaded acoustic droplets for ultrasound theranosis[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(6): 1939-1947. DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.11.036.
- [14] LI W M, BING T, WEI J Y, et al. Cell-SELEX-based selection of aptamers that recognize distinct targets on metastatic colorectal cancer cells[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(25): 6998-7007. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.112.
- [15] MINKO T, RODRIGUEZ-RODRIGUEZ L, POZHAROV V. Nanotechnology approaches for personalized treatment of multidrug resistant cancers[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(13/14): 1880-1895. DOI:10.1016/j.addr.2013.09.017.
- [16] SHAPIRA A, LIVNEY Y D, BROXTERMAN H J, et al. Nanomedicine for targeted cancer therapy: towards the overcoming of drug resistance[J]. *Drug Resist Updat*, 2011, 14(3): 150-163. DOI:10.1016/j.drug.2011.01.003.
- [17] JEONG H, LEE S H, HWANG Y, et al. Multivalent aptamer-RNA conjugates for simple and efficient delivery of doxorubicin/siRNA into multidrug-resistant cells[J/OL]. *Macromol Biosci*, 2016, 10: 343[2016-07-05]. [http://onlinelibrary.wiley.com/abstractjessionid = EDE36E98114CD307C57A5D96613CC768E.f04t02](http://onlinelibrary.wiley.com/abstractjessionid=EDE36E98114CD307C57A5D96613CC768E.f04t02). DOI: 10.1002/mabi.201600343.
- [18] WU X, CHEN J, WU M, et al. Aptamers: active targeting ligands for cancer diagnosis and therapy[J]. *Theranostics*, 2015, 5(4): 322-344. DOI:10.7150/thno.10257.
- [19] FAN X, SUN L, WU Y, et al. Bioactivity of 2'-deoxyinosine-incorporated aptamer AS1411[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25799 [2016-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4872150>. DOI: 10.1038/srep25799.
- [20] LAPA S A, CHUDINOV A V, TIMOFEEV E N. The toolbox for modified aptamers[J]. *Mol Biotechnol*, 2016, 58(2): 79-92. DOI:10.1007/s12033-015-9907-9.
- [收稿日期] 2016 - 11 - 12 [修回日期] 2016 - 12 - 31
[本文编辑] 王映红

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》关于抵制学术不端行为的声明

中国广大科技工作者坚持严谨求实、刻苦钻研、勇于创新的科学精神,取得了举世瞩目的科技成果,代表了中国科技工作者的主流。然而,近年来少数科技人员出现了抄袭剽窃、伪造数据、篡改数据、虚假署名、一稿多投等学术不端行为,影响了科技期刊的正常出版工作,给作者及其所在单位甚至我们国家带来非常负面的影响。《中国肿瘤生物治疗杂志》是中国肿瘤生物治疗领域惟一的高级学术刊物,一贯坚持“学术至上,质量第一”的原则,坚决抵制学术不端行为,努力维护学术纯洁性。为维护学术道德、保证期刊质量和学术声誉,本刊特作以下声明:

1. 作者投稿时须作出稿件无学术不端行为的声明;
2. 稿件审查过程中,本刊编辑部将采用“学术不端文献检测系统”,通过大量国内外学术文献的全文比对,对稿件进行学术不端行为的检查;
3. 本刊已加入“《中国学术文献网络出版总库》学术不端文献检测系统”,该系统协助本刊对已发表论文的学术不端行为进行全面复核;
4. 坚决贯彻执行国家七部委联合发表的《发表学术论文“五不准”》的规定,一旦发现学术论文有“五不准”其中之一行为,立即退稿或撤稿,并将论文作者列入黑名单;
5. 已发表的论文一经查实有学术不端行为,本刊将立即删除,第一时间刊登撤销声明,终止该论文在各相关数据库、文摘库中的传播,尽快消除不良影响。同时,视情节轻重分别给该文作者以下处理:书面警告,通知作者所在单位,在本领域相关期刊间通报,2年内本刊不刊登有其署名的稿件,相关学术责任人(通信作者)署名的其他稿件延缓审稿和刊登等。

(本刊编辑部)