

# 巨噬细胞源性泡沫细胞适配子 PM1 的特异性

严鹏科<sup>1</sup>, 汪江波<sup>2</sup>, 张 慧<sup>3</sup>, 段才闻<sup>3</sup>, 李世煌<sup>3</sup>

(1. 广州医学院附属第三医院药剂科, 广东省广州市 510150; 2. 南溪山医院药剂科, 广西壮族自治区桂林市 541002; 3. 南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 适配子; 巨噬细胞源性泡沫细胞; 动脉粥样硬化病变

[摘要] 目的 研究特异性寡核苷酸适配子 PM1 与巨噬细胞源性泡沫细胞和动脉粥样硬化病变结合的特异性, 为动脉粥样硬化的体内靶向治疗提供实验依据。方法 对适配子 PM1 进行 FITC 标记, 荧光显微镜分别观察适配子与血管平滑肌细胞、巨噬细胞、内皮细胞、巨噬细胞源性泡沫细胞结合情况。采用高脂方法建立兔动脉粥样硬化模型, 利用 PCR 方法和荧光显微镜观察适配子与动脉粥样硬化病变结合情况。结果 适配子 PM1 与巨噬细胞源性泡沫细胞和动脉粥样硬化病变组织高度特异性结合, 但不结合血管平滑肌细胞、巨噬细胞、内皮细胞和正常动脉组织。结论 筛选出的适配子 PM1 能特异性结合巨噬细胞源性泡沫细胞和动脉粥样硬化病变。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Research on the Specificity of PM1 Aptamer About THP-1 Macrophage Derived Foam Cells

YAN Peng-Ke<sup>1</sup>, WANG Jiang-Bo<sup>2</sup>, ZHANG Hui<sup>3</sup>, DUAN Cai-Wen<sup>3</sup>, and LI Shi-Huang<sup>3</sup>

(1. Pharmacy of the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510150, China; 2. Pharmacy of Nan Xi Shan Hospital, Guilin, Guangxi Zhuang Atonomous Region 541002, China; 3. Institute of Pharmacology and Pharmacy, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Aptamer; Macrophage Derived Foam Cell; Atherosclerotic Lesion

[ABSTRACT] **Aim** To observe the binding specificity of aptamers and THP-1 macrophage derived foam cells and atherosclerotic lesions. **Methods** The FITC-labeled PM1, binding to THP-1 macrophages, vascular smooth cells, endothelial cells and THP-1 macrophage derived foam cells were observed by fluorescence microscopy respectively. Model of atherosclerosis was formed by high-fat feeding rabbit methods. The binding of aptamers and atherosclerotic lesions were detected by fluorescence microscopy and PCR. **Results** PM1 didn't bind to THP-1 macrophages, vascular smooth cells and endothelial cells but bind to THP-1 macrophage derived foam cells and atherosclerotic lesions. **Conclusions** we have obtained PM1 specifically binding to THP-1 macrophage derived foam cells and atherosclerotic lesions.

巨噬细胞源性泡沫细胞是动脉粥样硬化病变中最早出现、最主要的泡沫细胞,也是构成不稳定性斑块脂质核主要的成份之一。巨噬细胞源性泡沫细胞有可能成为动脉粥样硬化诊断和治疗的靶点<sup>[1]</sup>。指数富集配基的系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)是 20 世纪 90 年代创立的一种生物文库技术<sup>[2,3]</sup>。利用该

技术可以从一个大容量的随机寡核苷酸文库中筛选得到与靶物质高特异结合亲和的配基,即适配子。适配子是一个 DNA 或 RNA 的寡核苷酸片段,具有靶向靶物质及抑制靶蛋白功能的作用,因此,在基础研究、药物筛选及临床诊断和治疗等方面有着广阔的应用前景。我们利用 SELEX 技术筛选出了巨噬细胞源性泡沫细胞的 36 个适配子,本研究旨在观察其中的 23 号适配子 PM1 与巨噬细胞源性泡沫细胞、动脉粥样硬化病变组织结合的特异性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

人单核细胞 THP-1 细胞株、人脐静脉血管内皮

[收稿日期] 2011-04-17

[作者简介] 严鹏科,博士后,副教授,硕士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化发病机制和药物防治,E-mail 为 Yan-PK@TOM.COM。汪江波,硕士,主管药师,研究方向为动脉粥样硬化发病机制和药物防治。张慧,硕士,研究方向为动脉粥样硬化发病机制和药物防治。

细胞 ECV-304 细胞株为南华大学心血管研究所保存;新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;佛波酯(PMA)为 Calbiochem 公司产品;低密度脂蛋白(LDL)由北京老年病研究所提供;雄性新西兰白兔由湖南农业大学动物科技学院实验动物中心提供,合格证号 scxk(湘) 2003~0003。

## 1.2 适配子的合成

FITC 标记的适配子 PM1 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

## 1.3 细胞培养

THP-1 细胞株用含有 10% 新生牛血清的 RP-MI1640 培养基于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,每 2~3 天用直接分瓶的方法传代。内皮细胞株用含有 15% 新生牛血清的高糖 DMEM 培养基于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,每 2~3 天用 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代。血管平滑肌细胞培养:在无菌条件下将 150~200 g、4~8 周龄的 SD 大鼠的胸主动脉段取出,刮除内膜迅速撕下中膜内、中层,切成约 1 mm 宽的小条,种植于培养瓶壁,置于 37℃ 恒温箱,待细胞铺满瓶底后进行细胞传代。

## 1.4 泡沫细胞模型的建立

THP-1 细胞培养于 6 孔板中,实验前用 100 nmol/L PMA 孵育 72 h,使其诱导分化成巨噬细胞,再用 80 mg/L ox-LDL 孵育 72 h,诱导成泡沫细胞。

## 1.5 适配子与巨噬细胞源性泡沫细胞结合的特异性鉴定

将培养于 6 孔板内的约  $1 \times 10^6$  THP-1 巨噬细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞及巨噬细胞源性泡沫细胞分别用 PBS 洗涤 3 次。加入含 200 pmol FITC 标记的适配子和 1  $\mu$ g 酵母 tRNA,37℃ 温箱孵育 30 min。去掉上清液后,再用 PBS 洗涤 3 次,荧光显微镜下观察并摄像。

## 1.6 动脉粥样硬化动物模型的建立

新西兰兔 10 只,雄性,体重 2.0~2.3 kg,随机分为两组,每组各 5 只。对照组使用普通全价营养饲料(粗蛋白 20%,粗脂肪 13%,碳水化合物 60%,灰分 1%,维生素混合物 1%);模型组在普通全价营养饲料基础上添加 1% 胆固醇和 10% 猪油。12 周后处死动物,将主动脉(自升主动脉至髂总动脉分叉处)取出后,福尔马林固定,常规脱水,石蜡包埋,用 Leitz1560 切片连续切片。

## 1.7 适配子与动脉粥样硬化病变结合的 PCR 鉴定

将动脉切片二甲苯常规脱蜡至水,抗原修复后滴入 50 pmol FITC 标记适配子和 1  $\mu$ g 酵母 tRNA,37℃ 温箱孵育 30 min。去离子和 PBS 液冲洗后,将动脉切片放入 6 孔板内并加入 900  $\mu$ L 洗脱液,放入 80℃ 的恒温水箱中 15 min。将孔内的洗脱液吸出均匀地分装于两个 1.5 mL 的 EP 管中,加入 1/10 体积 3 mol/L NaAC(pH 5.2)和 2 倍体积预冷的无水乙醇,振荡混匀后放入 -80℃ 冰箱 3 h 或过夜。12000 r/min 离心 30 min,经 70% 乙醇洗涤、空气中干燥后溶于 10  $\mu$ L 灭菌水中,进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 40 s,72℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,30 个循环。最后,72℃ 再延伸 7 min。

## 1.8 适配子与动脉粥样硬化病变结合观察

50 pmol FITC 标记 PM1 和 1  $\mu$ g 酵母 tRNA 滴入经脱蜡和修复抗原处理的动脉切片,37℃ 温箱孵育 30 min 后,去离子水和 PBS 液冲洗后荧光显微镜下观察适配子与动脉粥样硬化病变的结合情况。

## 2 结果

### 2.1 适配子与巨噬细胞源性泡沫细胞结合的特异性

PM1 明显地结合到巨噬细胞源性泡沫细胞上,泡沫细胞上出现较强的荧光;与 THP-1 巨噬细胞存在少量的结合;不结合血管平滑肌细胞和内皮细胞(图 1)。

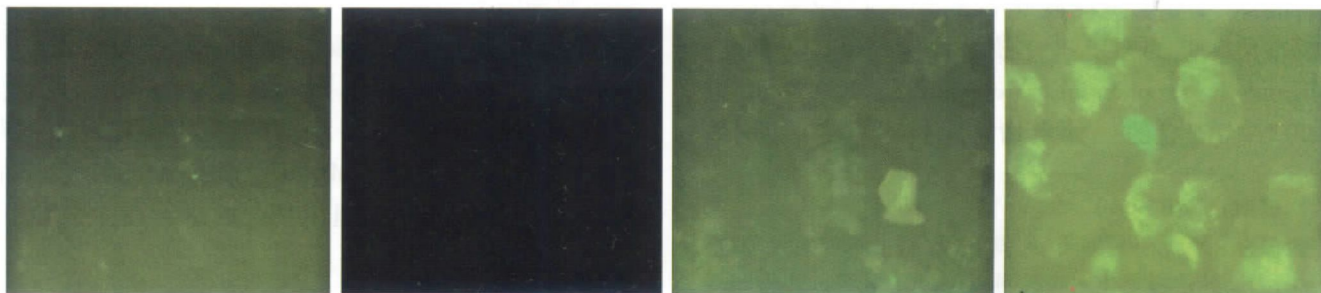


图 1. 荧光显微镜观察适配子 PM1 与巨噬细胞源性泡沫细胞结合的特异性( $\times 200$ ) 从左至右分别为适配子 PM1 结合的血管平滑肌细胞、适配子 PM1 结合的内皮细胞、适配子 PM1 结合的 THP-1 巨噬细胞、适配子 PM1 结合的巨噬细胞源性泡沫细胞。

Figure 1. The binding specificity of PM1 and macrophage-derived foam cells were detected by fluorescence microscope



## 2.2 动脉粥样硬化模型的鉴定

模型组可见明显的主动脉动脉粥样硬化病变(图2),说明动脉粥样硬化模型的建立成功。

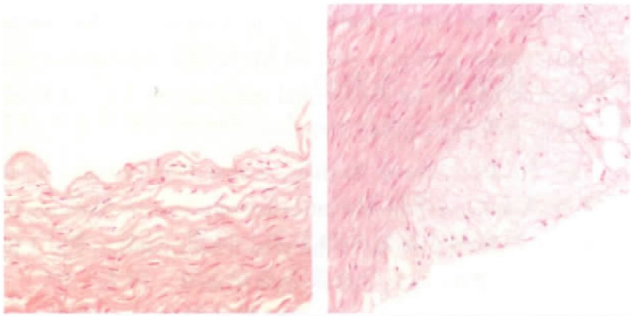


图2. 新西兰兔主动脉 HE 染色( $\times 200$ ) 左为对照组,右为模型组。

Figure 2. Aorta HE staining in New Zealand rabbits

## 2.3 适配子与动脉粥样硬化病变结合的鉴定

适配子 PM1 能特异性结合于兔主动脉动脉粥样硬化病变部位;动脉粥样硬化病变的洗脱回收液经 PCR 扩增都有目的 dsDNA 片断出现,而正常动脉无 dsDNA 片断(图3)。

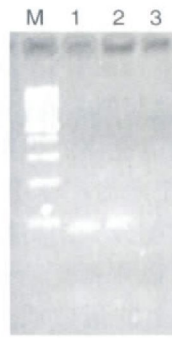


图3. PCR 观察 FITC 标记的 PM1 与动脉粥样硬化病变结合情况 M 为 GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder,1 为适配子 PM1 扩增结果,2 为动脉粥样硬化病变洗脱液扩增结果,3 为正常动脉洗脱液扩增结果。

Figure 3. The binding of the FITC-labeled PM1 and atherosclerotic lesions were detected by PCR

## 2.4 适配子与动脉粥样硬化病变结合的特异性

荧光显微镜下,动脉粥样硬化斑块区域有较多的散在的荧光点,中膜部分除了靠近斑块的部分由少量荧光点外,其他部分几乎没有荧光点,说明动脉粥样硬化病变与适配子特异性结合(图4)。

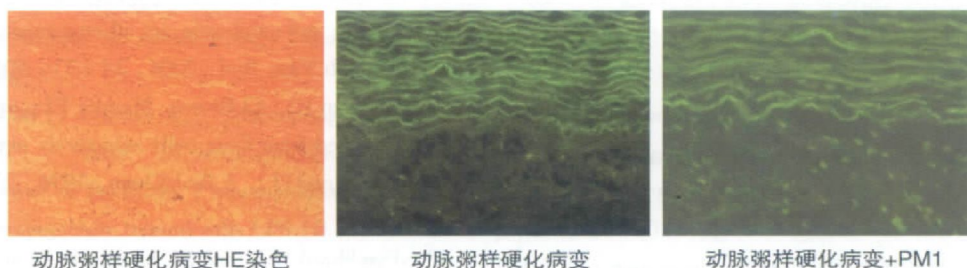


图4. 荧光显微镜观察 PM1 与动脉粥样硬化病变结合情况( $\times 100$ )

Figure 4. Fluorescence microscope graph of binding of PM1 and atherosclerotic lesions

## 3 讨论

单链随机寡核苷酸分子(包括 DNA 和 RNA 分子)容易形成各种形状的二级结构和三级结构,如茎环、假节、鼓包、G-四聚体等,基本涵盖所有的空间构象,尤其是 RNA 分子形成的空间构象更复杂、多样。这些适配子与靶物质结合具有极高的高亲和性和高特异性,结合的解离常数多在 pmol/L ~ nmol/L 之间。此外,这些适配子基本无毒、无免疫原性、可重复使用、长期保存和室温运输。其中 DNA 适配子相对于 RNA 适配子生产成本低,SELEX 筛选更简单方便且体内较稳定,不易被降解,更适合体外诊断和体内治疗<sup>[4-8]</sup>。

早期诊断与靶向治疗仍然是动脉粥样硬化防治

的一个“瓶颈”问题<sup>[9,10]</sup>。我们以人源巨噬细胞源性泡沫细胞为靶,利用 SELEX 技术筛选出了寡核苷酸适配子 PM1 并荧光标记,结合 PCR 方法对其与巨噬细胞源性泡沫细胞和动脉粥样硬化病变结合的特异性进行鉴定。结果发现这个适配子能特异性结合巨噬细胞源性泡沫细胞;与动脉粥样硬化病变结合也有很强的特异性,说明我们已经成功地获得了特异性亲和巨噬细胞源性泡沫细胞的适配子。

目前,SELEX 技术已成功筛选血栓生成因子、一些毒素蛋白和促生长因子等的适配子,并将它们作为拮抗剂,以达到治疗目的,其中研究较多的是肿瘤的靶向治疗,将治疗药物的靶向递送与可控释放有机结合,实现安全、有效的化疗,适配体纳米粒子可便捷地将化疗药物定向输送到肿瘤原发以及不定

向肿瘤部位<sup>[11-13]</sup>。Bagalkot 等<sup>[14]</sup>巧妙地利用抗肿瘤药物多柔比星能嵌入到 DNA 双链区这一特性,将多柔比星与特异识别前列腺表面膜抗原的适配体非共价结合,且不影响适配体的识别特性,实现了化疗药物对肿瘤细胞的靶向治疗作用。在诊断分析中也有应用价值,由于适配分子能高特异性、高亲和力地结合蛋白质,因此可以用标记有报道分子的寡核苷酸来检测固定在膜上的蛋白质分子。本研究通过 SELEX 筛选获得的巨噬细胞源性泡沫细胞适配子能特异性与巨噬细胞源性泡沫细胞结合,具有很好的靶向性,这将对于开发动脉粥样硬化的早期诊断试剂和靶向治疗药物有着潜在的重要意义。

本研究筛选出的适配子 PM1 经验证能特异性与 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞结合,推测其可能的机制为:适配子对靶分子具有极高的分辨率,与靶分子结合的特异性及亲和性同抗体相当,适配子由于本身的特性可以与细胞膜蛋白质、脂质或糖特异性结合。巨噬细胞经 ox-LDL 诱导形成泡沫细胞,其细胞膜蛋白可能发生变化,而适配子可能与这个差异表达的蛋白结合,因此具有特异性。适配子是否能与平滑肌细胞源性泡沫细胞结合,还需进一步的实验证明。

#### [参考文献]

- [1] Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for herapeutic Intervention [J]. *Nat Med*, 2002, 8 (11): 1 235-242.
- [2] Zimmermann B, Gesell T, Chen D, et al. Monitoring genomic sequences during SELEX using high-throughput sequencing: neutral SELEX [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (2): e9169.
- [3] Sefah K, Meng L, Lopez-Colon D, et al. DNA aptamers as molecular probes for colorectal cancer study [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (12): e14269.
- [4] Hicke BJ, Stephens AW. Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy [J]. *J Clin Invest*, 2000,

106 (8): 923-928.

- [5] Clark SL, Remcho VT. Aptamers as analytical reagents [J]. *Electrophoresis*, 2002, 23 (9): 1 335-340.
- [6] Joshi P, Prasad VR. Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by template analog reverse transcriptase inhibitors derived by SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) [J]. *J Viral*, 2002, 76 (13): 6 545-557.
- [7] Sung Ho Jeon, Basak Kayhan, Tamar Ben-Yedidia, et al. A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin [J]. *J Biol Chem*, 2004, 276 (49): 48 410-419.
- [8] Charlton J, Sennello J, Smith D. In vivo imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase [J]. *J Chem Biol*, 1997, 4: 809-816.
- [9] 张玮, 席艳, 孙慧君, 等. 脂蛋白 A 与血栓及动脉粥样硬化的关系 [J]. *中国现代医学杂志*, 2007, 17 (20): 2 500-505.
- [10] 严鹏科, 廖端芳, 杨永宗. Caveolin-1 表达对血管平滑肌细胞胆固醇逆转运的节作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (5): 379-383.
- [11] Larigauderie G, Furman C. Adipophilin enhance lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophage: potential role in atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (3): 504-510.
- [12] Gellisen IC, AJ Brown, Mander EL, et al. Sterol efflux is impaired from foam cells selectively enriched with 7-ketocholesterol [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271 (30): 17 582-860.
- [13] Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, et al. Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (21): 7 668-672.
- [14] Bagalkot V, Farokhzad OC, Langer R, et al. An aptamer-doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45 (48): 8 149-152.

(此文编辑 文玉珊)