

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.16.005

EpCAM 特异性适配体对胰腺癌细胞的靶向识别及促凋亡研究*

黄旭方 文娣娣 仲津漫 任 静 宦 怡[△]

(空军军医大学西京医院放射诊断科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:验证 EpCAM 分子特异性适配体对胰腺癌细胞的亲和性及对细胞凋亡的影响。**方法:**通过文献查询 EpCAM 分子特异性适配体,以流式细胞术验证适配体与胰腺癌 PANC-1 细胞的特异性亲和力;通过细胞免疫组化验证适配体与细胞结合的位点;通过流式细胞术检测适配体对细胞的凋亡影响。**结果:**选择文献报道的 EpCAM 分子特异性适配体 EP166,在不破坏主要二级结构情况下做截断处理形成 EP166s。通过流式细胞术验证发现 EP166s 与原适配体 EP166 均可以特异性识别胰腺癌 PANC-1 细胞,而与阴性对照的 HEK293T 细胞无特异性亲和力。细胞免疫荧光显示 EP166s 主要结合在细胞膜表面。凋亡检测结果发现 EP166s 在与 PANC-1 孵育 12 h、24 h 后均可促进细胞凋亡,且主要是细胞的早期凋亡,其所占百分比分别为 12.2 ± 0.20 、 27.13 ± 0.36 ,而随机文库对照组的早期凋亡百分比分别为 5.21 ± 0.63 、 4.91 ± 0.72 ;均值的配对 T 检验发现 EP166s 在孵育 12 h 和 24 h 后其早期凋亡所占百分数与随机文库组均有统计学差异,而且 EP166s 与细胞孵育 12 h 与 24 h 对凋亡的影响也有统计学差异, $P\leq 0.01$ 。**结论:**修饰后的适配体 EP166s 可以特异性识别胰腺癌 PANC-1 细胞,且结合位点位于细胞膜上;该适配体有促进 PANC-1 细胞凋亡的作用。

关键词:适配体;EpCAM;胰腺癌;凋亡

中图分类号:R-33; R735.9; R73 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)16-3022-06

Specific Aptamer of EpCAM Recognize Pancreatic Cancer Cell Line PANC-1 and Induce Apoptosis in This Cell Line*

HUANG Xu-fang, WEN Di-di, ZHONG Jin-man, REN Jing, HUAN Yi[△]

(Department of Radiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To verify the affinity of EpCAM specific aptamer on pancreatic cancer cell line PANC-1 and its effect on cell apoptosis. **Methods:** The specific aptamers of EpCAM were searched by literature from PubMed. The specific affinity of aptamers binding to pancreatic cancer cell line PANC-1 was tested by flow cytometry. The binding sites of the aptamer to PANC-1 cells were verified by cellular immunohistochemistry. The apoptotic effect of aptamers in this cell line was examined by flow cytometry using Annexin V-FITC/PI Kit. **Results:** The EpCAM specific aptamer EP166 reported in the literature was selected to be cut off to form EP166s without destroying the major secondary structure. Flow cytometry showed that both EP166s and EP166 can specifically recognize pancreatic cancer cell line PANC-1, but not recognize human embryonic kidney cell line HEK293T. Cellular immunofluorescence showed that EP166s mainly binds to the cell membrane surface. Apoptosis test results showed that EP166s promoted apoptosis after 12 h and 24 h of incubation with PANC-1, the percentages of the cell early apoptosis rate were 12.2 ± 0.20 and 27.13 ± 0.36 , respectively. The percentages were 5.21 ± 0.63 , 4.91 ± 0.72 respectively in the random library control group. The paired T-test of the mean found that the percentages of early apoptosis of EP166s with 12 h and 24 h incubation were statistically different from that of the random library group, and incubation with 12 h was statistically different from with 24 h, $P\leq 0.01$. **Conclusions:** The modified EpCAM specific aptamer EP166s can specifically recognize pancreatic cancer cell line PANC-1, and the binding site is located on the cell membrane. The aptamer EP166s has the effect of promoting apoptosis of PANC-1.

Key words: Aptamer; EpCAM; Pancreatic cancer; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.9; R73 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)16-3022-06

前言

胰腺癌是难治性恶性肿瘤,发病隐匿,早期诊断困难,发现时多为进展期,多数病人失去手术治疗机会,且胰腺癌恶性程

度高,病情进展迅速,早期就发生转移,缺乏有效治疗手段导致病死率极高^[1],胰腺癌的一年生存率不足 20%^[2]。在中国胰腺癌的发病率和死亡率均呈上升趋势^[3]。因此对胰腺癌早期诊断及靶向治疗的研究至关重要。上皮细胞粘附分子(Epithelial cell

* 基金项目:国家自然科学基金国际(地区)交流项目(81220108011);国家自然科学基金项目(81370039)

作者简介:黄旭方(1986-),博士研究生,主要研究方向:腹部分子影像学,电话:029-84771943, E-mail: xufanghuang@163.com

△ 通讯作者:宦怡,教授,主要研究方向:腹部影像诊断及基础研究, E-mail: huanyi3000@163.com

(收稿日期:2018-03-26 接受日期:2018-04-23)

adhesion molecule, EpCAM)在大多数肿瘤中过表达,是用于肿瘤诊断,预后评价以及靶向研究的理想抗原。EpCAM 在胰腺癌中高表达^[4,5],是胰腺癌诊断和治疗的潜在靶标。

适配体是一种寡核苷酸序列,可以是 DNA 或者 RNA 序列,体外通过指数富集的配基系统进化技术(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX) 筛选获得,适配体可以折叠成特有的 3D 结构特异性识别目标靶分子。适配体拥有分子量小,亲和力高,易于体外合成和化学修饰等优点,被称为化学抗体,常用于靶向成像和治疗的研究^[6,7]。针对胰腺癌的适配体研究主要 Kim 等^[8]筛选的胰腺癌干细胞的适配体以及 Wu 等^[9]筛选的胰腺导管腺癌 PL45 细胞的适配体,尽管可以较理想的识别靶细胞,但这种以细胞为筛选对象获得的适配体由于具体靶标的未知性,使其在适配体与肿瘤作用机制的进一步研究中有一定的局限性。而以已知在肿瘤中高表达的肿瘤分子的适配体为研究对象,可以促进该分子在肿瘤过程中作用的进一步研究。本研究中我们拟以 EpCAM 特异性适配体为研究对象,验证其与胰腺癌细胞系的结合特异性及对胰腺癌细胞的凋亡影响,借以探讨适配体在胰腺癌靶向诊断及治疗中的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

胰腺癌 PANC-1 细胞系及人胚肾细胞 HEK 293T 细胞系均为实验室保存;实验中所需适配体均委托生工生物有限公司合成,以 HPLC 方式纯化。激光共聚焦显微镜 AIR 为日本尼康公司产品;流式细胞仪 FACSibur 为美国 BD 公司产品;凋亡试剂盒为凯基生物有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 适配体的结构优化及修饰 通过查询文献选择 EpCAM 分子特异性适配体,并根据适配体的二级结构对适配体做截断处理,以保障适配体应用的经济性。另外在适配体两端的两个碱基以 2'-氧-甲基对碱基进行修饰,以增加适配体的核酸酶稳定性。

1.2.2 细胞培养 PANC-1 细胞与 HEK293T 细胞的培养基为含有 10%FBS 和 1%青链霉素的 DMEM 培养基,细胞在 37℃,5% CO₂ 的细胞孵箱中培养。所有细胞均在对数生长期进行实验操作。流式细胞术检测时,细胞用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化,收集后在胎牛血清中孵育 30 min。

1.2.3 Western Blot 检测 取对数生长期的细胞,用细胞刮刀收集细胞混合液并用 RAPI 裂解液在冰上裂解 20 min,12000 rpm 离心 10 min 收集蛋白上清,通过 BCA 方法测试蛋白浓度。向蛋白样品中加入四分之一体积的 5× 还原 loading buffer 沸水中煮 5 min 使蛋白变性,12000 rpm 离心 3 min。以 110 V 恒压进行电泳,结束后进行转膜,条件为 100 V 恒压。之后根据溴酚蓝染色情况对 PVDF 膜进行剪切,封闭 30 min 后进行抗体孵育,EpCAM 抗体为 abcam 公司产品,抗体在 4℃ 过夜孵育,二抗室温孵育 1 h,结束后通过成像系统进行结果分析。

1.2.4 适配体与胰腺癌细胞系的亲和力检测 通过流式细胞术检测适配体 EP166s 与 PANC-1 细胞的亲和力,以随机文库为对照。取对数生长期的细胞收集后与山羊血清 37℃ 封闭 30

min,之后分别与 FAM 标记的 EP166s 和 FAM 标记的随机文库在 37℃ 下孵育 1 h,流式细胞洗涤液洗涤 5 次,每次 3 min,最后用流式固定液 200 μL 重悬细胞,上机进行测定。操作中注意避光。

通过激光共聚焦显微镜观察适配体 EP166s 与 PANC-1 细胞的结合位点。取对数生长期的细胞转移至 30 mm 共聚焦小皿中培养,待细胞覆盖皿底 80%左右时进行染色。将细胞培养液倒掉,之后用 PBST 洗涤 3 次,每次 3 min,之后加入 FAM 标记的适配体或随机文库,37℃ 避光孵育 1 h,PBST 洗涤后加入 DAPI 避光染色 5 min,染色结束后以 PBST 再次进行洗涤并在激光共聚焦显微镜下观察结果。

1.2.5 适配体对胰腺癌细胞系凋亡的影响 通过 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测 EP166s 对 PANC-1 的凋亡影响。取对数生长期的细胞转移至六孔板中,待细胞长至 80%左右时进行实验。分别向细胞中加入高浓度的 EP166s 和随机文库,总量约 2 μmol,在细胞孵箱中孵育 12 h 和 24 h,然后收集细胞。向细胞中加入 Annexin V-FITC 混合均匀后,避光孵育 15 min,之后加入 PI 避光孵育 15 min。最后上机检测。

1.3 统计分析

所得数据通过 SPSS 软件进行统计分析。计量资料以均数± 标准差的形式记录,对获得数据的组间差异进行配对 T 检验,以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 适配体修饰结果

根据文献检索到两条 EpCAM 特异性适配体,分别为 EP166^[10]与 SYL3C^[11],前者在报道中称对 EP166 和 SYL3C 亲和力做对比发现 EP166 亲和力更优,因此本实验选择适配体 EP166 作为研究对象,其序列为 5'-AAC AGA GGG ACA AAC GGG GGA AGA TTT GAC GTC GAC GAC A-3'。

适配体 EP166 的 DNA 序列通过 RNA structure 预测其二级结构为紧密相连的两个茎环结构,推测该结构为适配体识别 EpCAM 分子的特异性结构。因此在不破坏此二级结构的基础上对适配体的序列做最短优化,并验证其亲和力有无改变。修饰后的序列为 5'-GAC AAA CGG GGG AAG ATT TGA CGT CGA CGA C-3'。

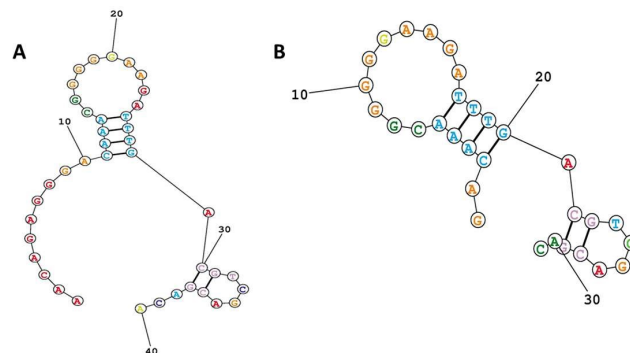


图1 适配体 EP166 及修饰后 EP166s 的二级结构预测图

Fig.1 Secondary structure of EP166 (1A) and EP166s (1B) predicted by RNA structure

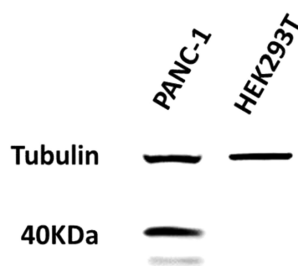


图2 PANC-1 细胞与 HEK293T 细胞裂解液 WB 结果
Fig.2 WB Results for PANC-1 and HEK293T whole cell lysates

2.2 胰腺癌 PANC-1 细胞系高表达 EpCAM

通过 Western blot 检测发现胰腺癌 PANC-1 细胞高表达 EpCAM,其分子量约 40KDa,而对照组 HEK293T 细胞不表达。内参为 Tubulin,结果如图 2 所示。

2.3 流式细胞术检测适配体 EP166s 与 PANC-1 细胞系的亲和力

流式细胞结果如图 3 所示,适配体 EP166s 与 EP166 均可与胰腺癌 PANC-1 细胞特异性结合(3A),而与 HEK293T 细胞

不结合(3B),随机文库 Lib 组可见在两种细胞系中均未见明显的特异性结合。对所得的流式细胞术结果中荧光标记阳性的细胞所占百分比进行统计,发现适配体 EP166s、EP166 与 PANC-1 细胞孵育后结合细胞的百分比分别为 78.17 ± 4.81 、 77.40 ± 1.65 ,而随机文库 Lib 组的为 2.57 ± 0.72 ,通过配对 T 检验发现适配体 EP166s、EP166 与 Lib 组之间的差异均有统计学差异, P 值分别为 0.000 和 0.001,而这两种适配体之间无统计学差异, P 值为 0.775。而 EP166s、EP166、Lib 与 HEK293T 细胞孵育后的结果分别为 2.60 ± 0.52 、 2.77 ± 0.87 、 2.83 ± 0.67 ,三组间均无统计学差异,EP166s、EP166 与 Lib 之间的 P 值分别为 0.820、0.706,EP166s 与 EP166 两组间的 P 值 0.635,结果见表 1。以上结果说明截断的 EP166s 与靶分子结合的特异性及亲和力没有受到影响,同原适配体 EP166 相当,表明在不破坏紧密相连的两个茎环结构的前提下可以保障适配体与 EpCAM 分子结合的特异性。该结果进一步验证了对筛选所得适配体进行必要的截断处理是一种修饰适配体可行的方案。

表 1 适配体与 PANC-1 细胞和 HEK293T 细胞亲和力分析表($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Binding ability of aptamers EP166s and EP166 to Panc-1 cells and HEK293T cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Cell Line	Aptamer		
	Lib	EP166s	EP166
PANC-1	2.57 ± 0.72	78.17 ± 4.81	77.40 ± 1.65
HEK293T	2.60 ± 0.52	2.77 ± 0.87	2.83 ± 0.67

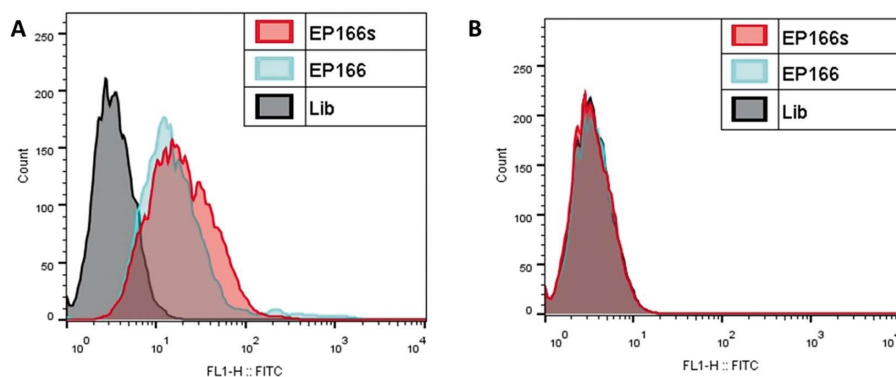


图3 流式细胞术检测适配体 EP166、EP166s 与 PANC-1 细胞(3A)与 HEK293T 细胞(3B)特异性亲和力
Fig.3 Binding ability of aptamers EP166 and EP166s to Panc-1 cells (3A) and HEK293T cells (3B) by flow cytometric

2.4 适配体 EP166s 与 PANC-1 细胞系的免疫荧光结果

适配体 EP166s 与 PANC-1 细胞共孵育后通过激光共聚焦显微镜观察,可见其主要与 PANC-1 细胞的胞膜结合。随机文库 Lib 组未见特异性细胞染色。该结果说明适配体 EP166s 可以特异性识别胰腺癌 PANC-1 细胞系,而且靶标位于细胞膜上。结果如图 4 所示,其中上图为随机文库组,其细胞附近的绿色荧光考虑为非特异性染色。该部分实验进一步验证适配体 EP166s 可以识别位于细胞膜上的 EpCAM 分子,说明针对 EpCAM 分子的适配体可以作为潜在的靶向成像及靶向治疗的工具。

2.5 适配体 EP166s 对 PANC-1 细胞系的凋亡影响

以大剂量适配体 EP166s 与 PANC-1 细胞分别孵育 12 h

和 24 h,通过 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒检测发现,适配体 EP166s 与 PANC-1 细胞孵育 12 h 与 24 h 后,其早期凋亡细胞所占百分比均多于随机文库对照组。而适配体 EP166s 孵育 24 h 其早期凋亡细胞所占百分比也多于孵育 12 h 组。具体结果见表 2。

通过 SPSS 软件对早期凋亡百分比数据进行配对 T 检验,发现适配体 EP166s 组与随机文库组在孵育 12 h、24 h 后凋亡细胞百分比差异均有统计学意义, P 值分别为 0.002 和 0.002,均小于 0.01。适配体 EP166s 孵育 12 h 与 24 h 之间的差异也有统计学意义, P 值为 0.000。其结果如图 5 和图 6。

对早期凋亡和晚期凋亡之和进行分析,其结果同上,适配体 EP166s 组与随机文库组在孵育 12 h、24 h 后的差异均有统

计学意义, P 值分别为 0.008 和 0.003, 均小于 0.01。适配体 EP166s 孵育 12 h 与 24 h 之间的差异有统计学意义, P 值为 0.001。晚期凋亡细胞所占百分比在各组间没有统计学差异。

以上结果说明适配体 EP166s 可以促进 PANC-1 细胞的凋亡, 而且随着孵育时间的延长, 促凋亡效果增强。EpCAM 分子

由胞外段、单次跨膜区和胞内段 3 部分构成, 其中胞外段有 242 个氨基酸, 跨膜区有 21 个氨基酸, 胞内段有 26 个氨基酸。其活化是通过胞外段与配体结合后使胞内段脱落, 进而发挥相应作用的。适配体可能是通过竞争结合 EpCAM 胞外段的配体位点, 导致其活性降低, 进而实现促凋亡作用的。

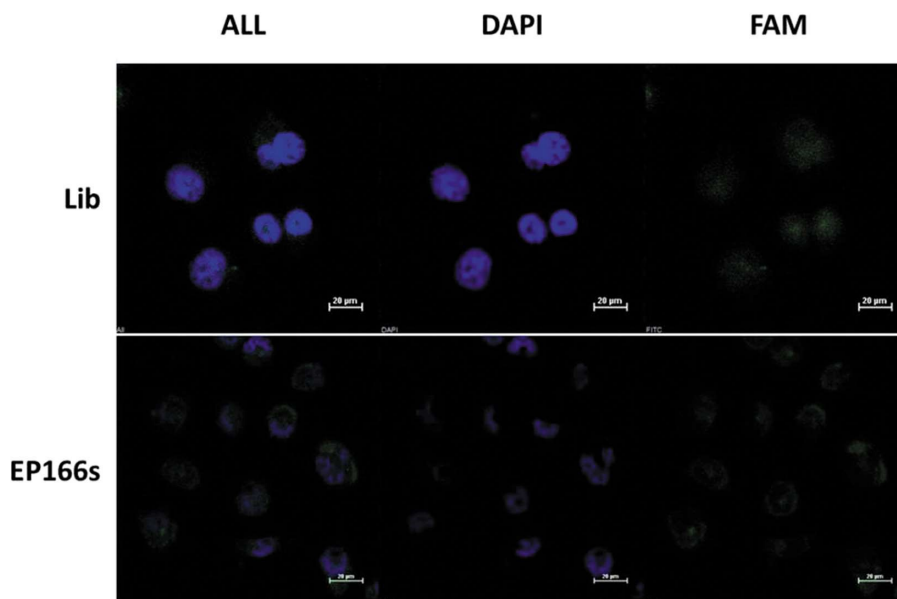


图 4 EP166s 与 PANC-1 细胞免疫荧光图, 标尺长度 20 μm

Fig.4 The binding site of aptamer EP166s to Panc-1 cells by confocal microscopy. Scale bar=20 μm

表 2 不同孵育时间适配体 EP166s 对 PANC-1 细胞凋亡影响结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of aptamer EP166s on the cell apoptosis rate of PANC-1 in 12 h and 24 h ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Aptamer	Time	Cell survival rate(%)	Cell early apoptosis rate(%)	Cell late apoptosis rate (%)	Cell apoptosis rate(%)
Lib	12 h	89.15 $\pm$ 1.18	5.21 $\pm$ 0.63	5.39 $\pm$ 1.02	10.61 $\pm$ 1.08
	24 h	88.66 $\pm$ 2.18	5.51 $\pm$ 1.69	5.58 $\pm$ 0.77	11.09 $\pm$ 2.46
EP166s	12 h	82.87 $\pm$ 0.06	12.2 $\pm$ 0.20	4.92 $\pm$ 0.23	17.12 $\pm$ 0.05
	24 h	67.52 $\pm$ 0.98	27.13 $\pm$ 0.36	5.21 $\pm$ 0.24	32.33 $\pm$ 0.83

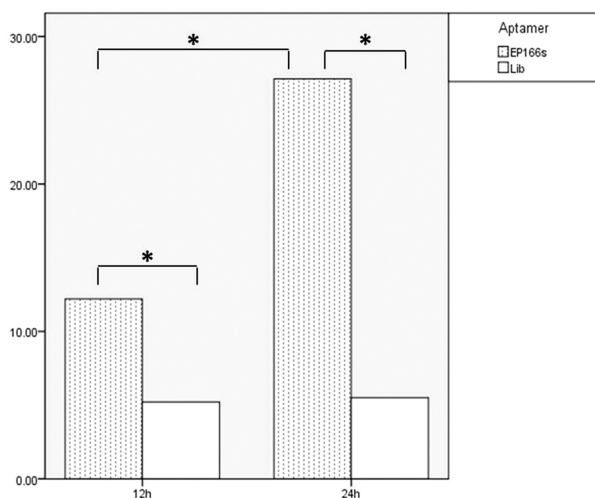


图 5 不同孵育时间点适配体 EP166s 对 PANC-1 细胞凋亡影响的条形图, * 表示 $P < 0.01$

Fig.5 Effect of aptamer EP166s on the cell apoptosis rate of PANC-1 in 12 h and 24 h by bar graph, * means $P < 0.01$

3 讨论

胰腺癌恶性程度高, 转移发生早, 治疗效果差, 是高死亡率肿瘤之一。胰腺导管腺癌是胰腺癌的主要类型, 约占胰腺癌的 95%^[12]。针对胰腺癌的治疗研究效果进展缓慢, 其 5 年生存率仍低于 5%^[13]。手术切除是胰腺癌患者唯一可能的治愈手段, 但 80-85% 的患者诊断时已经为局部进展期或发生转移而失去手术机会^[2]。而靶向诊断及治疗是提高胰腺癌早期诊断水平及治疗效果的有效途径之一。

上皮细胞粘附分子(EpCAM)也称为 CD326, EGP-2, ESA 等, 是上皮细胞内一种 Ca^{2+} 非依赖性单次跨膜糖蛋白^[14], 参与细胞信号传导^[15], 迁移, 增殖和分化^[16], 首次报道于结肠癌中^[17]。EpCAM 是循环肿瘤细胞的一种有效肿瘤抗原, 在肿瘤的筛查、复发监测及疗效评估方面有很大的应用潜力^[18]。有研究表明 EpCAM 分子的表达水平与肿瘤患者的总体生存率相关^[19], 因此其也可以作为一个预后指标。此外, EpCAM 在肿瘤的发生和转移中也发挥重要作用, 说明其在肿瘤的免疫治疗和靶向诊治

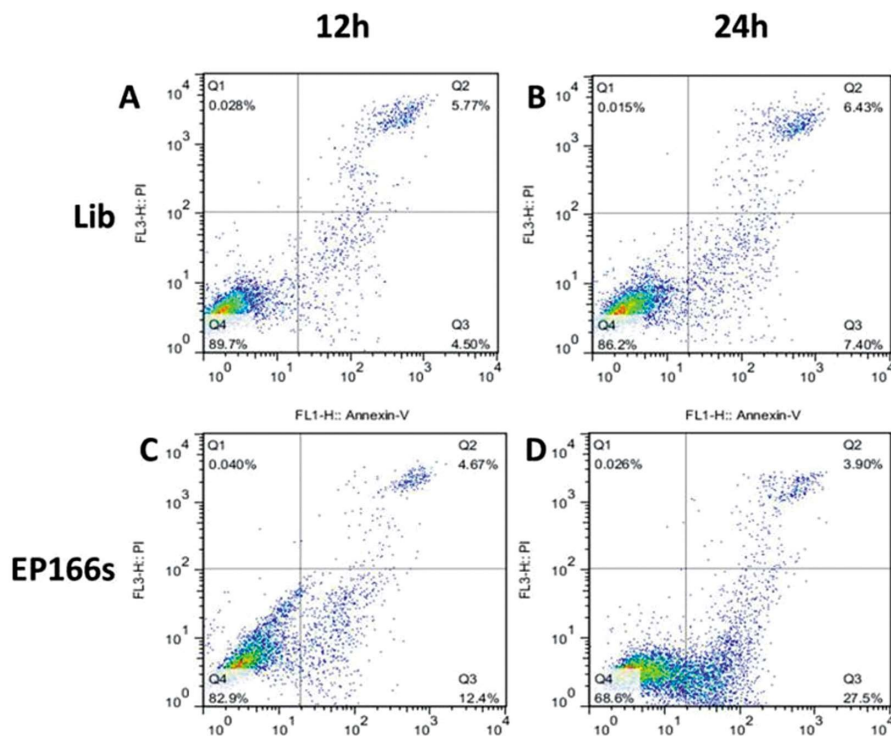


图 6 不同孵育时间适配体 EP166s 对 PANC-1 细胞凋亡影响结果

Fig.6 Effect of aptamer EP166s on the cell apoptosis rate of PANC-1 in 12 h and 24 h by flow cytometry

方面的潜力^[18]。EpCAM 分子在多种肿瘤中高表达,如胃癌^[20]、肝癌^[21]及乳腺癌^[22]等。其在胰腺癌中也呈高表达,因此 EpCAM 分子可以作为胰腺癌靶向诊断及治疗的一种潜在靶标。

目前,多数基于 EpCAM 的诊断和治疗策略都依赖于抗体,但抗体由于分子较大以及亲和力不稳定在科研及临床应用中有一定的局限性。而适配体有可能是最好的抗体替代产品。适配体是通过 SELEX 体外筛选获得的高特异性结合靶标的寡核苷酸序列,基于其复杂而特异的三维结构,适配体不仅拥有结合靶标的高亲和力,而且其识别靶标的范围很广,可以是小分子物质,如金属离子^[23]、多肽^[24]等,也可以是较大的蛋白质^[25]乃至细菌^[26]、细胞^[27]等。适配体分子量小,组织穿透力强,稳定性好,无免疫源性以及易于体外合成及修饰等优点使其成为抗体替代研究的热点。如 Rong 等^[28]通过细胞 SELEX 技术获得的适配体 LY-1 在体外能抑制 HCCLM9 细胞的迁移和侵袭,体内抑制异种移植瘤的生长。Tuerk 等^[29]筛选的人类免疫缺陷病毒 1 型逆转录酶(HIV-1)的适配体可以有效抑制 HIV 逆转录酶合成 cDNA,但不抑制其他逆转录酶,说明该适配体有特异性降低靶蛋白活性的能力,可作为病毒和其他疾病的治疗剂。以上研究表明适配体在肿瘤研究中既可以作为特异性靶向剂,亦可以作为靶标蛋白的拮抗剂参与其活性调节。

细胞凋亡是由基因控制的细胞自主的程序性死亡,不同于细胞坏死,其是一种主动过程,涉及多种基因的激活、表达及调控,凋亡过程中细胞的形态改变等也有别于细胞坏死。适配体在调节细胞凋亡过程中主要通过内在和外在两条途径^[29]。在内在途径中,适配体通过诱导或抑制某些凋亡基因的活化以调节凋亡过程。在外在途径中,当适配体特异性靶向受体时,触发凋亡信号导致细胞凋亡。

调节细胞凋亡的内在途径包括对以下基因的调节,主要有

Bcl-2 蛋白家族、活性氧、丝裂原活化蛋白激酶信号通路、Akt、p53、NF- κ B、c-Myc 等。Bcl-2 是抑制细胞凋亡的基因,核仁素可以与 Bcl-2 mRNA 结合防止其降解,核仁素特异性适配体 AS1411 可以竞争抑制该结合,导致 Bcl-2 合成减少,从而达到促凋亡的作用。Dam 等^[30]构建的 AS1411 与金纳米星颗粒复合物可以有效下调 Bcl-2 mRNA 的表达,并且明显促进 12 种癌细胞的凋亡增加,而对正常细胞系几乎没有影响。细胞内活性氧的增加可以促进细胞凋亡,Liu 等^[31]开发一种基于适配体的特异性光敏剂 TF70-R13,在光照条件下可有效增加细胞内活性氧的产生促使细胞死亡,其对肺癌细胞 A549 有效。Li 等^[32]研究证实其实验室开发的 OPN-R3 适配体是通过丝裂原活化蛋白激酶信号通路促进细胞凋亡的。在另一项工作中,White 等^[33]通过 SELEX 筛选血管生成素 1 的适配体 ANG9-4,经过修饰以增加其核酸酶抗性,该适配体可以特异性高亲和力结合血管生成素 1,其 Kd 值在纳摩尔范围,大剂量的 ANG9-4 可以阻断血管生成素 1 介导的 Tie2 磷酸化和下游 Akt 的激活,进而促进血管内皮细胞的凋亡,阻止新生血管的生成。p53 参与激活凋亡过程的许多下游基因,进而诱导细胞凋亡,核仁磷酸蛋白是一种 p53 的负性调节因子,在多种肿瘤中高表达,通过对其的阻断,可以促进细胞凋亡,Jian 等^[34]筛选的 RNA 适配体可以特异性结合核仁磷酸蛋白的中心酸性区域并影响其在体外和体内的寡聚化,而 p53 则高表达。该适配体不仅引起肿瘤细胞自身的凋亡,而且使其对其他治疗药物的敏感性更高。Porciani 等^[35]以适配体为靶向剂,通过对化疗药物的靶向递送,特异性抑制 NF- κ B 激活,通过对细胞活性分析及蛋白免疫印迹实验发现该递送系统可以显著抑制阿霉素诱导的 NF- κ B 反式激活并促进肿瘤细胞的凋亡。c-Myc 在细胞增殖、分化及凋亡中起关键作用。Lee 等^[36]筛选了一种针对 β -catenin 的 RNA 适配体,

其在结肠癌细胞中抑制 β -catenin 依赖性的 c-myc 和细胞周期蛋白 D1 的转录,进而抑制肿瘤细胞的生长。

调节细胞凋亡的外在途径主要通过阻断膜表面的受体促进细胞凋亡,如肿瘤坏死因子受体、表皮生长因子受体、血小板衍生生长因子等。EpCAM 分子与 c-myc 和细胞周期蛋白 A 和 E 有明显相关性^[20],因此 EpCAM 特异性适配体可能通过该通路的激活诱导细胞凋亡。

综上所述,我们通过对文献报道的 EpCAM 分子特异性适配体 EP166 进行截断修饰并验证其在胰腺癌细胞系中的应用价值,优化后的 EP166s 适配体,经验证可以特异性结合胰腺癌 PANC-1 细胞系,且结合位点在细胞膜上,适配体与细胞膜结合后部分适配体通过内吞进入胞质内。并且适配体 EP166s 可以有效促进胰腺癌 PANC-1 细胞系的凋亡。以上研究说明适配体 EP166s 可以作为一种胰腺癌诊断治疗的潜在靶向剂及治疗剂。

参考文献(References)

- [1] Buchsbaum DJ, Croce CM. Will detection of microRNA biomarkers in blood improve the diagnosis and survival of patients with pancreatic cancer[J]. JAMA, 2014, 311(4): 363-365
- [2] Ma C, Li J, Boukar MB, et al. Optimized ROI size on ADC measurements of normal pancreas, pancreatic cancer and mass-forming chronic pancreatitis[J]. Oncotarget, 2017, 8(58): 99085-99092
- [3] Chen Wanqing, Zheng Rongshou, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 166(2): 115-132
- [4] Soysal SD, Muenst S, Barbie T, et al. EpCAM expression varies significantly and is differentially associated with prognosis in the luminal B HER2(+), basal-like, and HER2 intrinsic subtypes of breast cancer[J]. Br J Cancer, 2013, 108(7): 1480-1487
- [5] Sankpal NV, Fleming TP, Gillanders WE. EpCAM modulates NF-kappaB signaling and interleukin-8 expression in breast cancer[J]. Mol Cancer Res, 2013, 11(4): 418-426
- [6] Ostendorf T, Kunter U, van Roeyen C, et al. The effects of platelet-derived growth factor antagonism in experimental glomerulonephritis are independent of the transforming growth factor-beta system[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(3): 658-667
- [7] White RR, Shan S, Rusconi CP, et al. Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(9): 5028-5033
- [8] Kim YJ, Lee HS, Jung DE, et al. The DNA aptamer binds stemness-enriched cancer cells in pancreatic cancer[J]. J Mol Recognit, 2017, 30(4)
- [9] 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): 985-994
- [10] Kim JW, Kim EY, Kim SY, et al. Identification of DNA aptamers toward epithelial cell adhesion molecule via cell-SELEX [J]. Mol Cells, 2014, 37(10): 742-746
- [11] Song Y, Zhu Z, An Y, et al. Selection of DNA aptamers against epithelial cell adhesion molecule for cancer cell imaging and circulating tumor cell capture[J]. Anal Chem, 2013, 85(8): 4141-4149
- [12] Aguirre AJ, Collisson EA. Advances in the Genetics and Biology of Pancreatic Cancer[J]. Cancer J, 2017, 23(6): 315-320
- [13] King J, Bouvet M, Singh G, et al. Improving theranostics in pancreatic cancer[J]. J Surg Oncol, 2017, 116(1): 104-113
- [14] Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, et al. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule [J]. J Cell Biol, 1994, 125(2): 437-446
- [15] Maetzel D, Denzel S, Mack B, et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM[J]. Nature Cell Biology, 2009, 11(2): 162-171
- [16] Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, et al. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy [J]. Cancer Res, 2004, 64(16): 5818-5824
- [17] Koprowski H, Stepkowski Z, Mitchell K, et al. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies [J]. Somatic Cell Genet, 1979, 5(6): 957-971
- [18] Munz M, Baeuerle P A, Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling[J]. Cancer Res, 2009, 69(14): 5627-5629
- [19] Imrich S, Hachmeister M, Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells[J]. Cell Adh Migr, 2012, 6(1): 30-38
- [20] Ren H, Yang X, Yang Y, et al. Upregulation of lncRNA BCYRN1 promotes tumor progression and enhances EpCAM expression in gastric carcinoma[J]. Oncotarget, 2018, 9(4): 4851-4861
- [21] Mani S, Andrisani O. Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma and Hepatic Cancer Stem Cells[J]. Genes (Basel), 2018, 9(3)
- [22] Wang R, Yang L, Li S, et al. Quercetin Inhibits Breast Cancer Stem Cells via Downregulation of Aldehyde Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1), Chemokine Receptor Type 4 (CXCR4), Mucin 1 (MUC1), and Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM)[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 412-420
- [23] Ciesiolka J, Yarus M. Small RNA-divalent domains[J]. RNA, 1996, 2(8): 785-793
- [24] Stoltenburg R, Nikolaus N, Strehlitz B. Capture-SELEX: Selection of DNA Aptamers for Aminoglycoside Antibiotics [J]. J Anal Methods Chem, 2012, 2012: 415697
- [25] Tuerk C, MacDougall S, Gold L. RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(15): 6988-6992
- [26] Bruno JG, Kiel JL. In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection [J]. Biosens Bioelectron, 1999, 14(5): 457-464
- [27] Cui C, Zhang H, Wang R, et al. Recognition-then-Reaction Enables Site-Selective Bioconjugation to Proteins on Live-Cell Surfaces [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2017, 56(39): 11954-11957
- [28] Rong Y, Chen H, Zhou XF, et al. Identification of an aptamer through whole cell-SELEX for targeting high metastatic liver cancers [J]. Oncotarget, 2016, 7(7): 8282-8294
- [29] Chen Y, Lin JS. The application of aptamer in apoptosis [J]. Biochimie, 2017, 132: 1-8
- [30] Dam DH, Culver KS, Odom TW. Grafting aptamers onto gold nanostars increases in vitro efficacy in a wide range of cancer cell types[J]. Mol Pharm, 2014, 11(2): 580-587
- [31] Liu Q, Xu L, Zhang X, et al. Enhanced photodynamic efficiency of an aptamer-guided fullerene photosensitizer toward tumor cells[J]. Chem Asian J, 2013, 8(10): 2370-2376

- Am J Psychiatry, 2017, 174(7): 686-694
- [6] 朱文标, 朱奕璇, 陈策, 等. 首发精神分裂症患者血糖和血脂代谢情况及奥氮平治疗的影响[J]. 中华全科医学, 2016(11): 1832-1834
Zhu Wen-biao, Zhu Yi-xuan, Chen Ce, et al. Blood glucose and blood lipid metabolism in first-episode schizophrenia patients and effect of Olanzapine [J]. Chinese Journal of General Practice, 2016 (11): 1832-1834
- [7] 于文娟, 朱浩, 谭立文, 等. 首发精神分裂症患者及其正常 I 级亲属糖代谢的研究 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2009, 18(7): 634-636
Yu Wen-juan, Zhu Hao, Tan Li-wen, et al. Metabolism of glucose in first-episode drug-naive patients with schizophrenia and their first-degree relatives [J]. Chinese Journal of Behavioral Medicine and Brain Science, 2009, 18(7): 634-636
- [8] Oberweis B, Gragnoli C. Potential role of prolactin in antipsychotic-mediated association of schizophrenia and type 2 diabetes[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(8): 3001-3006
- [9] Xu Ahong, Jie Yong, Luo Biming, et al. The relationship between antioxidant enzymes and fasting blood-glucose in schizophrenia patients with type 2 diabetes [J]. China Journal of Health Psychology, 2015, 23(10): 1441-1444
- [10] Ryan MC, Collins P, Thakore JH. Impaired Fasting Glucose Tolerance in First-Episode, Drug-Naive Patients With Schizophrenia [J]. Am J Psych, 2003, 160(2): 284
- [11] 陈大春, 李艳丽, 王宁, 等. 首发精神分裂症患者糖代谢异常病例对照研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2009, 35(8): 490-492
Chen Da-chun, Li Yan-li, Wang Yu, et al. A case-control study of first-episode schizophrenia patients with abnormal glucose metabolism [J]. Chinese Journal of Nervous and Mental Diseases, 2009, 35(8): 490-492
- [12] Holt R I G. The prevention of diabetes and cardiovascular disease in people with schizophrenia [J]. Acta Psychiatr Scand, 2015, 132(2): 86-96
- [13] Becker KG. The common variants/multiple disease hypothesis of common complex genetic disorders[J]. Med Hypotheses, 2004, 62(2): 309-317
- [14] 孙丽婷, 奴尔艾合麦提·吐地, 刘建霞. 274 例精神分裂症患者血清甲状腺激素水平检测结果分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(20): 3040-3041
Sun Li-ting, Nueraihemaiti·Tudi, Liu Jian-xia. Analysis of serum thyroid hormone levels in 274 patients with schizophrenia [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2015, 36(20): 3040-3041
- [15] 丁金伯. 精神分裂症患者血清甲状腺激素水平及其影响因素的相关性分析[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(4): 665-667
Ding Jin-bo. Correlation analysis of serum thyroid hormone levels and its influencing factors in schizophrenic patients [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2016, 20(4): 665-667
- [16] Gyllenberg D, Sourander A, Surcel H, et al. Hypothyroxinemia During Gestation and Offspring Schizophrenia in a National Birth Cohort[J]. Biol Psychiatry, 2016, 79(12): 962-970
- [17] Wysokiński A, Kłoszewska I. Level of thyroid-stimulating hormone (TSH) in patients with acute schizophrenia, unipolar depression or bipolar disorder[J]. Neurochem Res, 2014, 39(7): 1245-1253
- [18] Wu CS, Gau SS. Association Between Antipsychotic Treatment and Advanced Diabetes Complications Among Schizophrenia Patients With Type 2 Diabetes Mellitus[J]. Schizophr Bull, 2016, 42(3): 703-711
- [19] 莫亚莉, 夏泳, 陶云海, 等. 3 种非典型抗精神病药对首发精神分裂症患者血糖血脂、泌乳素、甲状腺激素的影响[J]. 中华全科医学, 2017, 15(3): 479-482
Mo Li ya, Xia Yong, Tao Yun hai, et al. Effects of three atypical antipsychotics on blood glucose and lipids, prolactin and thyroid hormone in first-episode schizophrenic patients[J]. Chinese Journal of General Practice, 2017, 15(3): 479-482
- [20] 王海燕. 抗精神病药物对精神病患者血糖和血脂代谢的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2016, 1(16): 117
Wang Hai-yan. Effect of antipsychotic drugs on blood glucose and lipid metabolism in patients with psychosis [J]. Clinical Research and Practice, 2016, 1(16): 117

(上接第 3027 页)

- [32] Li NY, Weber CE, Wai PY, et al. An MAPK-dependent pathway induces epithelial-mesenchymal transition via Twist activation in human breast cancer cell lines[J]. Surgery, 2013, 154(2): 404-410
- [33] White RR, Roy JA, Viles KD, et al. A nuclease-resistant RNA aptamer specifically inhibits angiopoietin-1-mediated Tie2 activation and function[J]. Angiogenesis, 2008, 11(4): 395-401
- [34] Jian Y, Gao Z, Sun J, et al. RNA aptamers interfering with nucleophosmin oligomerization induce apoptosis of cancer cells[J]. Oncogene, 2009, 28(47): 4201-4211
- [35] Porciani D, Tedeschi L, Marchetti L, et al. Aptamer-Mediated Codelivery of Doxorubicin and NF-kappaB Decoy Enhances Chemosensitivity of Pancreatic Tumor Cells [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2015, 4: e235
- [36] Lee HK, Choi YS, Park YA, et al. Modulation of oncogenic transcription and alternative splicing by beta-catenin and an RNA aptamer in colon cancer cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(21): 10560-10566