核酸适配体对纤溶酶原 Kringle 5 抗血管生成功能的影响

段美娇,周雅琪,王翠玲,边六交*(西北大学生命科学学院,西安 710069)

摘要:目的 研究核酸适配体 K-a2ct 与纤溶酶原 Kringle 5(K5)的特异性结合对 K5 抑制血管内皮细胞增殖和迁移以及促进血管内皮细胞凋亡功能的影响。方法 利用原核系统对重组 K5 蛋白进行克隆和表达,并采用亲和层析法对表达的 K5 蛋白进行分离纯化;使用等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)和酶联寡核苷酸吸附试验(enzyme-linked oligonucleotide adsorption assay, ELONA)对 K-a2ct 与 K5 的亲和特异性进行验证;采用 CCK-8、细胞划痕试验观察 K-a2ct 对 K5 抑制人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)增殖和迁移功能的影响;采用激光共聚焦显 微镜观察 Hoechst 33342 染色的 HUVEC 细胞凋亡形态,并采用 Annexin V/PI 双染流式细胞术检测 K-a2ct 对 K5 促进 HUVEC 细胞凋亡功能的影响。结果 重组蛋白 K5 在大肠杆菌中实现了高效表达,经亲和层析纯化的重组 K5 相对分子 质量为 12 kDa,浓度为 0.32 mg·mL⁻¹; ITC、ELONA 结果显示 K-a2ct 对 K5 的亲和性强,且具有良好的选择性,具备典型核酸适配体的亲和特异性; CCK-8、细胞划痕试验结果表明,K-a2ct 能够抑制 K5 的抗血管内皮细胞增殖和迁移的作用,且抑制程度与 K-a2ct 呈剂量依赖关系;激光共聚焦和流式细胞术结果表明,K-a2ct 对 K5 促 HUVEC 细胞凋亡的功能有一定抑制作用,且主要影响 K5 作用的 HUVEC 细胞喷烟洞亡,对早期凋亡影响不大。结论 核酸适配体 K-a2ct 以高亲和力和特异性结合 K5,并以剂量依赖性方式抑制 K5 的抗血管生成功能,在靶向调节 K5 在体内的浓度和功能以及促进血管新生方面具有很大潜力。

关键词: 核酸适配体; 纤溶酶原 Kringle 5; 特异性结合; 细胞凋亡; 血管生成

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)21-2909-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223033

引用本文:段美娇,周雅琪,王翠玲,等. 核酸适配体对纤溶酶原 Kringle 5 抗血管生成功能的影响[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(21): 2909-2916.

Effect of Nucleic Acid Aptamers on the Anti-angiogenic Function of Plasminogen Kringle 5

DUAN Meijiao, ZHOU Yaqi, WANG Cuiling, BIAN Liujiao^{*} (College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the specific binding of nucleic acid aptamers(k-a2ct) with plasminogen Kringle 5(K5) on the function of K5 in inhibiting proliferation and migration of vascular endothelial cells and promoting their apoptosis. **METHODS** The cloning and expression of recombinant K5 protein were performed by using a prokaryotic system, and the isolation and purification of the expressed K5 protein were performed by affinity chromatography. The affinity and specificity of K-a2ct and K5 were verified using isothermal titration calorimetry(ITC) and enzyme-linked oligonucleotide adsorption assay(ELONA). The effect of K-a2ct on the function of K5 in inhibiting the proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells(HUVEC) was investigated by CCK-8 and cell scratch assay. The apoptotic morphology of HUVEC cells stained with Hoechst 33342 was observed by laser confocal microscopy, and the effect of K-a2ct on the apoptosis- promoting function of K5 in HUVEC cells was also examined by Annexin V/PI double-stained flow cytometry. RESULTS Recombinant protein K5 was efficiently expressed in Escherichia coli and purified by affinity chromatography, identified as having a relative molecular weight of 12 kDa and a concentration of $0.32 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. ITC and ELONA results demonstrated that K-a2ct had a strong affinity and good selectivity for K5, showing the affinity specificity of a typical nucleic acid aptamer. CCK-8 and cell scratching assays showed that K-a2ct could inhibit the anti-proliferation and anti-migration effects of K5 on HUVEC cells in a dose-dependent manner. The laser confocal and flow cytometry results showed that K-a2ct inhibited the apoptosis-promoting function of K5 on HUVEC cells, mainly affecting late apoptosis of HUVEC cells effected by K5 but having little effect on early apoptosis. CONCLUSION The nucleic acid aptamers K-a2ct binds to K5 with high affinity and specificity, and inhibits its anti angiogenic function in a dose-dependent manner. It has great potential in targeting the regulation of K5 concentration and

*通信作者:边六交,男,博士,教授 E-mail: bianliujiao@sohu.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(31971143)

作者简介:段美娇,女,博士生 E-mail: duanmeijiao305@163.com

KEYWORDS: nucleic acid aptamer; plasminogen Kringle 5; specific binding; apoptosis; angiogenesis

近年来,血管生成逐渐成为治疗缺血性心脑 血管病的研究热点。血管生成是指在一定条件下, 新的血管从已有的血管中形成和发展而来,是机 体生殖、发育和组织损伤修复的重要生物学过程, 这一过程主要涉及血管内皮细胞从原始内皮小管 的末端和侧壁的萌发^[1]。新生血管的异常生长通常 与血管生成诱导因子和血管生成抑制因子的表达 不平衡有关^[2],这可能导致血管生成过度或不足。 许多病理状态,如恶性肿瘤、炎性疾病、增生性 视网膜病变都伴随着血管生成过度, 而在一些缺 血性心脑血管病中血管生成不足,导致内皮细胞 功能障碍。人纤溶酶原 Kringle 5(K5)是目前发现 的抑制新生血管内皮细胞增殖和转移活性最强的 血管生成抑制因子^[3],其抑制活性已被证实是血管 抑素的2倍以上^[4]。在人体内,一旦新生血管开始 形成,血液中的纤溶酶原就会在相关酶的催化下 降解并释放出 K5,其通过抑制血管内皮细胞的增 殖、迁移和黏附抑制新血管的过度生成^[5-6]。然而, 在一些缺血性疾病如心肌缺血、缺血再灌注损伤 和缺血性脑血管病等发生时,血管生成抑制因子 的高表达会阻碍缺血区血管的生成和缺血区的自 我搭桥, 使血管生成和发展难以有效持续进行。 显然,在这样的情况下如何有效地抑制或阻断 K5 从而使新血管的生成和发展能够正常进行是治疗 这些疾病的必须前提。

核酸适配体是通过指数富集配体系统进化 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)方法筛选得到的单链 DNA 或 RNA 分子片段^[7-8],它可以折叠成独特的二级和三 级结构,对相应的靶标具有高亲和力和特异性。自 1990年被发现以来,因其在诊断^[9-10]、治疗^[11-12]、 生物传感[13]、医学成像[14]等领域的应用潜力受到广 泛关注。由于靶向效率高,适配体常被称为"化学 抗体",与单克隆抗体相比,它不仅亲和力和选择 性更高[15-16], 且具有成本低, 易修饰, 稳定性好[17], 组织渗透性强,易进入细胞^[18],无免疫原性^[19]等独 特的优势,最重要的是其具有"开关"效应,能够 即刻完全掩蔽或重新释放靶标,使靶标蛋白即刻失 效或起效^[20]。因此,核酸适配体已成为疾病诊断和 靶向治疗的有力工具。首个核酸适配体药物 Pegaptanib(Macugen[™])用于治疗老年性黄斑变性, 已于 2004 年获 FDA 批准临床应用^[21]。

笔者所在课题组前期已通过 SELEX 技术筛选 到了 K5 的核酸适配体 K-a2ct(5'-AACTTCAAGG GATCCCCCGAGGTAAGCGGCTTGACCGTGC-3'), 但核酸适配体对 K5 抗血管生成功能的影响仍需 进一步的实验证实。基于此,本研究经原核表达 并纯化了 K5 蛋白,对实验室前期筛选到的核酸适 配体 K-a2ct 与 K5 的结合亲和力和选择特异性进行 了验证,进一步通过细胞实验研究 K-a2ct 与 K5 的结合对血管内皮细胞增殖、迁移和凋亡的影响, 以期为实现 K5 的靶向功能调控奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞及试剂

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)(上海富衡生物科技有限 公司, 货号: FH1122); K5 重组菌(E.coli BL21(DE3) pET-28b/K5)、核酸适配体 K-a2ct 序列 (5'-AACTTCAAGGGATCCCCCGAGGTAAGCG GCTTGACCGTGC-3', 带有和不带 biotin 标记的 批号分别为 1925004273, 1925120907)均合成或购 自上海生工生物工程公司; 重组人血管内皮生长 因子(vascular endothelial growth factor, VEGF₁₆₅) (GMP 级, 北京赛尔瑞成公司, 货号: PF0602); 人血清白蛋白(human serum albumin, HSA, 货号: A8230)、紫杉醇(批号: 33069624; 纯度: 99.9%)、 咪唑(货号: P7930)、单组份 TMB 底物显色液(货 号: PR1200)、ELISA 终止液(货号: C1058)均购 于北京索莱宝科技有限公司;兔抗生物素-HRP抗 体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号: 7075S); 10×PBS 缓冲液(合肥兰杰柯科技有限公 司, 货号: BL316A); 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG, 货号: ST097)、牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA, 货号: 0332)均购于 Amresco 公司; N-2-羟乙基哌嗪- N'-2-乙磺酸(HEPES, 阿拉丁试 剂公司, 货号: H109407; 纯度≥99.5%); Gibco 胎牛血清(批号: 42Q6395K)、卡那霉素(Kanamycin, Kan, 批号: 11815024) 和低分子量蛋白标准 Marker(3.4~100 kDa, 批号: 00672770)均购自美国 Thermo Fisher 公司; DMEM 高糖培养基(武汉塞维 尔生物科技有限公司,货号:G4511;规格:500 mL); 青-链霉素(双抗, 货号: SV30010)、胰酶 0.25%溶 液(货号: SH30042.01)均购于美国 HyClone 公司; Hoechst 33342 染色液(上海翌圣生物科技公司,货

号: MG025)、细胞增殖试剂盒(CCK-8, 批号: 034G0102-1)和细胞凋亡试剂盒(批号: 088D0302-2) 均购于上海百赛生物技术公司; 生物级二甲基亚砜(DMSO, 美国 Sigma 公司, 货号: D8418), 其他试剂均为分析级,所用水为灭菌超纯水。

1.2 仪器

L-UP-2-ZO 超纯水纯化系统(美国 Millipore 公司); AKTA10 低压层析系统、MicroCalTM iTC200 等温滴定量热仪均来自美国 GE Healthcare 公司; JY300C 电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公 司); Elx800UV 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); BBD6220 二氧化碳恒温培养箱(美国 Thermo Fisher 公司); H1850 高速离心机(上海湘仪科技有 限公司,离心机半径: 6.21 cm); DMIL-LED 倒置 光学显微镜、Leica SP8 激光共聚焦荧光显微镜均 购自德国 Leica 公司; FACSCalibur 流式细胞仪(美 国 BD 公司)。

2 方法

2.1 重组 K5 蛋白的诱导表达与纯化

以 NcoI/BamHI 为酶切位点,构建[E.coliBL21 (DE3)pET-28b/K5-6×his] 重组工程菌^[22]。将 pET28b-K5 单克隆接种于含有 Kan 的 50 mL LB 培 养基中, 220 r·min⁻¹ 37 ℃摇床过夜培养后, 按 8% 接种于 600 mL 培养基中培养, 条件不变。待 OD₆₀₀ 约为 0.4~0.6 的时候,加入 IPTG 诱导表达, 30 ℃ 培养 8 h。9000 r·min⁻¹ 离心 40 min 收集菌体。在 冰浴中超声破碎(破菌液为 20 mmol·L⁻¹ PBS, pH 7.4)后离心(9 000 r·min⁻¹, 40 min)。上清用 0.45 μm 滤膜过滤后,用 Ni²⁺螯合亲和柱(10 mm×15 mm)进 行分离纯化。纯化过程如下: 层析柱先用 buffer A (20 mmol·L⁻¹ PBS, 500 mmol·L⁻¹ NaCl, pH 7.4)平 衡后上样; 再依次用 10% buffer B (20 mmol·L⁻¹ PBS, 500 mmol·L⁻¹ NaCl 和 500 mmol·L⁻¹ 咪唑, pH 7.4)、50% buffer B 进行洗脱, 收集样品; 最后, 将 样品置于5L buffer A 中过夜透析。

2.2 等温量热滴定法 (isothermal titration calorimetry, ITC)

滴定前用 20 mmol·L⁻¹ HEPES 缓冲液将 K5 蛋 白溶液稀释到待测浓度,并用同样的缓冲液配制 适配体 K-a2ct 溶液。K5(50 µmol·L⁻¹)和适配体 K-a2ct(500 µmol·L⁻¹)分别装入样品池和滴定注射 器中^[23]。滴定实验在 25 ℃下进行,初始为 0.5 µL, 之后每次注射 2 µL,共注射 19 次, 2 次注射时间

中国现代应用药学 2023 年 11 月第 40 卷第 21 期

间隔 150 s,滴定搅拌的速度为 900 r·min⁻¹。滴定 完成后,利用 MicroCal Origin 软件拟合单位点并 结合模型进行数据分析。

2.3 酶联寡聚核苷酸吸附试验(enzyme-linked oligonucleotide adsorption assay, ELONA)^[24]

用包被液分别将 K5、VEGF₁₆₅、HSA 和 BSA 分别稀释到相同浓度(500 nmol·L⁻¹)包被于酶标 板,每组设 3 个重复,4 ℃过夜包被。PBST 洗涤 3 次,加入 5% BSA 封闭液,37 ℃封闭 1 h。PBST 洗涤 3 次,1.0 µmol·L⁻¹生物素标记的核酸适配体 K-a2ct 溶液(一抗)95 ℃加热变性 10 min、冰浴 15 min 后加入,37 ℃孵育 1 h,同时设置阴性对照。 PBST 洗涤 3 次,加入用 PBS 稀释 1 000 倍的兔抗 生物素-HRP(二抗)溶液,37 ℃孵育 1 h。PBST 清洗 3 次,加入单组份 TMB 底物显色液,37 ℃避光显 色 8 min。每孔加入 50 µL ELISA 终止液终止显色, 于 30 min 内在酶标仪上测定 OD₄₅₀ 值。

2.4 CCK-8 检测细胞增殖

在 96 孔板中接种对数生长期的 HUVEC 细胞 200 μL,接种密度为每孔 1×10³ 个,培养箱中培养 24 h 后弃上清,向其中加入 K5 蛋白、K-a2ct、对 照品(紫杉醇)等,培养箱中培养 24 h 后按 CCK-8 试剂盒说明书加入 10 μL CCK-8 试剂,恒温培养 1.5 h,取出观察显色程度。用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸收值,并根据以下公式计算细胞生长 抑制率:

抑制率 =
$$\frac{A_{\rm c} - A_{\rm s}}{A_{\rm c} - A_{\rm b}} \times 100\%$$
 (1)

其中, A_c表示阳性对照组的吸光值, A_s表示实 验组的吸光值, A_b表示空白对照组(只加 CCK-8)的 吸光值。用 EXCEL 软件计算出每个浓度下 K5 对 HUVEC 细胞的抑制率, 然后利用 Origin 2019b 软 件进行回归分析, 可得到 K5 对细胞的半数抑制浓 度(IC₅₀)。

2.5 细胞划痕试验

接种细胞前,用 Marker 笔在 6 孔板背部画均 匀的横线,每孔≥3 条。将 HUVEC 细胞悬液接种 到 6 孔板中,接种密度为每孔 2.5×10⁵ 个,培养 12 h 后,用 200 μL 的枪头垂直于培养板底部的横线在 每孔中划痕,然后用 PBS 清洗 2 次除去划掉的细 胞^[25]。分别在孔板中设置空白对照组(只更换培养 液)、K-a2ct 对照组(只加 500 nmol·L⁻¹ K-a2ct)和 K5(300 nmol·L⁻¹)与不同浓度 K-a2ct 混合组,每孔

Chin J Mod Appl Pharm, 2023 November, Vol.40 No.21 \cdot 2911 \cdot

体积为 2 mL。显微镜拍照记录划痕宽度,转入培养箱中培养,每隔固定时间拍照记录迁移过程。 采用 Image J 软件对划痕空隙面积(S)和划痕长度 (L)进行测量,通过以下公式算出细胞的迁移率:

划痕宽度平均值=
$$\frac{S}{L}$$
 (2)

细胞迁移率(%)=
$$\frac{W_0 - W}{W_0} \times 100\%$$
 (3)

其中, W₀表示 0 h 的划痕宽度, W 表示培养 后的划痕宽度。

2.6 激光共聚焦观察细胞核形态变化

在共聚焦皿中接种 500 μL HUVEC 细胞悬液, 培养 2 h 让细胞沉降贴壁,加入 1.5 mL 培养液过夜 培养。设置空白对照组、K-a2ct 对照组(只加 500 nmol·L⁻¹ K-a2ct)和 K5(300 nmol·L⁻¹)与不同浓 度 K-a2ct 混合组分别加入无血清培养液、无血清培 养液配制的 K5 和 K-a2ct,过夜培养。弃培养液, 用固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)固定 10~15 min,然 后用 Hoechst 33342 染色液避光染色 20~30 min。 PBS 清洗 2 遍,锡箔纸避光保存,于激光共聚焦显 微镜 40×水镜下观察细胞核形态变化^[26]。

2.7 流式细胞术检测细胞凋亡

将 HUVEC 细胞接种至 6 孔板中培养 24 h,按 "2.5"项下分组方法加药干预 24 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,PBS 洗涤离心 2 次后,加 入 Annexin V-FITC/PI 染料联合标记,室温避光孵 育 10~20 min,用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。 2.8 统计数据分析

采用 Origin 2019b 软件进行数据统计分析,组间比较采用单因素方差分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 重组 K5 蛋白的表达和纯化

将 BL21(DE3)pET-28b/K5-6×his 诱导表达,用 Ni²⁺柱对表达蛋白纯化,经 SDS-PAGE 电泳鉴定, 结果显示,在 10~15 kDa 处出现目标带,与 K5 蛋 白(12 kDa)大小相符,且纯化的蛋白条带较粗,清 晰且单一,经 Bradford 测得浓度为 0.32 mg·mL⁻¹。 结果见图 1。

3.2 核酸适配体 K-a2ct 对 K5 的亲和力及特异性 采用 ITC 测定了核酸适配体 K-a2ct 对 K5 的亲和 力,滴定完成后,选用了一类结合位点模型对结 果进行了拟合,结果见图 2A,拟合度较好,表明

 $\cdot\,2912\cdot$ Chin J Mod Appl Pharm, 2023 November, Vol.40 No.21

K-a2ct 与 K5 的结合为一类结合位点, 亲和常数 K_{d} 值为(432.01± 21.72)nmol·L⁻¹, 达到了纳摩尔级 别。接着, 采用 ELONA 法验证了 K-a2ct 与 K5 结 合的特异性, 结果见图 2B, K-a2ct 对 K5 具有良好 的结合亲和性(OD₄₅₀>1), 而对其他蛋白的亲和力较 弱(OD₄₅₀<0.5), 且差异显著(P<0.05), 表明核酸适 配体 K-a2ct 不仅对 K5 亲和性强, 且具有很好的选择性。



图 1 重组 K5 蛋白的 SDS-PAGE 图 M-Marker; 1-Ni²⁺柱纯化后的重组 K5 蛋白。 Fig. 1 SDS-PAGE image of recombinant K5 protein M-Marker; 1-recombinant K5 protein after purification by Ni²⁺ column.

3.3 核酸适配体 K-a2ct 对 K5 抑制 HUVEC 细胞 增殖功能的影响

不同浓度 K5 (50, 100, 200, 500, 600 nmol·L⁻¹) 处理 HUVEC 细胞, 与阳性对照紫杉醇 $(100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1})$ 均具有抑制 HUVEC 细胞增殖的作 用, 其抑制率明显高于空白对照组(P<0.05), 且具 有浓度依赖性,见图 3A,表明经诱导表达和分离 纯化得到的 K5 具有较强的活性,能有效抑制 HUVEC 细胞的增殖, IC₅₀为 285.2 nmol·L⁻¹。在 同样条件下,K-a2ct对 HUVEC 细胞的增殖基本无 抑制作用,将不同浓度的 K-a2ct(0, 150, 300, 500 nmol·L⁻¹) 与 K5(300 nmol·L⁻¹) 混合作用于 HUVEC 细胞, 细胞增殖的抑制率从 53%降低到了 0.3%, 见图 3B, 表明 K-a2ct 会抑制 K5 的抗血管 内皮细胞增殖的作用,且抑制程度与 K-a2ct 呈剂 量依赖关系。另外,随机文库组(由随机序列组成) 并未显示出对 K5 功能的抑制,表明 K-a2ct 对 K5 的抑制作用具有特异性。



图 2 核酸适配体 K-a2ct 对 K5 的亲和力及特异性($\bar{x} \pm s$, n=3) A-ITC 检测结果; B-ELONA 检测结果; 与 K5 组比较, ¹⁾P<0.001。 Fig. 2 Affinity and specificity of the nucleic acid aptamer K-a2ct for K5($\bar{x} \pm s$, n=3)

A-ITC assay results; B-ELONA assay results; compared with K5 group, ¹⁾P<0.001.

3.4 核酸适配体 K-a2ct 对 K5 抑制 HUVEC 细胞 迁移功能的影响

细胞划痕试验结果显示,与空白对照组细胞 相比,K5加入后 HUVEC 细胞的迁移速度变慢, 同一时间细胞覆盖划痕的面积减小,见图 4A;细 胞的迁移率明显降低,见图 4B,表明 K5对 HUVEC 细胞的迁移具有抑制作用。K5 与不同浓度 K-a2ct 处理组(0,150,300,500 nmol·L⁻¹)细胞的迁移率 随着 K-a2ct 浓度增大而提高,表明 K-a2ct 减小了 K5 对 HUVEC 细胞迁移的抑制作用,且具有剂量 依赖关系。

3.5 核酸适配体 K-a2ct 对 K5 促 HUVEC 细胞凋 亡功能的影响

3.5.1 激光共聚焦观察细胞的形态变化 激光 共聚焦显微镜观察 Hoechst 33342 染色的 HUVEC 细胞形态变化,见图 5。与空白对照组

中国现代应用药学 2023 年 11 月第 40 卷第 21 期



图3 CCK-8 法检测 HUVEC 细胞的增殖抑制率($\bar{x} \pm s$, n=5) A-不同浓度 K5 对 HUVEC 细胞作用后的生长抑制率;与空白对照组比 较,¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01,³⁾P<0.001;B-不同浓度 K-a2ct对 K5 抑制 HUVEC 细胞增殖的影响; R.L.表示 300 nmol·L⁻¹ 随机文库;与 K5+0 nmol·L⁻¹ K-a2ct 组比较,⁴⁾P<0.01,⁵⁾P<0.001。

Fig. 3 Proliferation inhibition rate of HUVEC cells measured by CCK-8($\overline{x}\pm s$, n=5)

A–proliferation inhibition rate of HUVEC cells under the effect of different concentrations of K5; compared with blank control group, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$, $^{3)}P<0.001$; B–effect of different concentrations of K-a2ct on the proliferation of K5-inhibited HUVEC cells; R.L. indicated 300 nmol·L $^{-1}$ random library; compared with K5+0 nmol·L $^{-1}$ K-a2ct group, $^{4)}P<0.01$, $^{5)}P<0.001$.

的正常 HUVEC 细胞核相比, K5+0 nmol·L⁻¹ K-a2ct 组细胞核的形状呈不规则状且边缘模糊, 核内出现空隙并可观察到小颗粒,表明核染色质 出现了凝集或断裂,细胞核发生了固缩。低浓度 K-a2ct(150 nmol·L⁻¹)处理时,上述现象依然出 现,随着 K-a2ct 浓度的增大,细胞核更多呈现 正常形态,表明 K-a2ct 对 K5 促细胞凋亡的功能 有抑制作用。

3.5.2 K-a2ct对K5促细胞凋亡功能的影响 流式 细胞术结果显示,K5+0 nmol·L⁻¹K-a2ct 组细胞凋 亡 率 为 (14.2±0.8)%,与 空 白 对 照 组 凋 亡 率 (2.6±0.3)%相比,表现出显著的促 HUVEC 细胞凋 亡的作用(*P*<0.001)。K5+不同浓度的 K-a2ct 处理 组(150,300,500 nmol·L⁻¹)细胞的凋亡率分别为 (13.1±1.0)%,(11.2±0.7)%和 (9.9±0.5)%,表明 K-a2ct 对 K5 促细胞凋亡的功能有一定抑制作用,

Chin J Mod Appl Pharm, 2023 November, Vol.40 No.21 · 2913 ·

结果见图 6。K-a2ct 主要影响 K5 作用的 HUVEC 细胞晚期凋亡,对细胞的早期凋亡影响不大。

4 讨论

K5 是目前发现最强的血管生成抑制因子,在



图 4 不同浓度 K-a2ct 对 K5 抑制的 HUVEC 细胞迁移的影响($\bar{x}\pm s$, n=3) A-划痕试验; B-细胞迁移率。与 K5+0 nmol·L⁻¹ K-a2ct 组比较, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001。 **Fig. 4** Effect of different concentrations of K-a2ct on the migration of K5-inhibited HUVEC cells($\bar{x}\pm s$, n=3) A-scratch test; B-cell migration rate. Compared with K5+0 nmol·L⁻¹ K-a2ct group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001.



图 5 不同浓度 K-a2ct 与 K5 结合下的 HUVEC 细胞形态 红色箭头所指为典型细胞形态。

Fig. 5 Morphology of HUVEC cells under different concentrations of K-a2et combined with K5 Red arrows showed typical cell morphology.





Fig. 6 Effects of different concentrations of K-a2ct on K5-induced apoptosis of HUVEC cells($\bar{x} \pm s$, n=3) A-cell apoptosis detection; B-statistical analysis chart of apoptosis rate. Compared with blank control group, ¹⁾P<0.001.

· 2914 · Chin J Mod Appl Pharm, 2023 November, Vol.40 No.21

体内血管系统平衡中发挥重要作用。严格控制 K5 的水平,减少其在病理条件下对血管生成的抑制 作用是治疗心肌缺血、缺血再灌注损伤和缺血性 脑卒中等缺血性心脑血管疾病的关键。在局部缺 氧等病理状态下,过多的 K5 会阻碍血管新生,因 此必须通过抑制其合成和释放,或利用拮抗机制 限制其活性。常用于调控细胞因子活性的拮抗剂 或抑制剂有抗细胞因子或其受体的抗体、可溶性 细胞因子受体和细胞因子受体拮抗剂等[27]。这些 蛋白抑制剂大都通过基因工程或蛋白质工程表达 构建,但价格昂贵、免疫原性高、存在引起细胞 因子风暴的风险。而通过 SELEX 筛选出的核酸适 配体,特异性高,稳定性好,易合成且成本低,免 疫原性低,体内应用更安全,重要的是具有可控的 靶向治疗体系,通过互补寡核苷酸解毒剂可以逆转 核酸适配体的活性^[28],因而其作为拮抗剂在细胞因 子调控方面得到了广泛的应用和认可[29-30]。笔者所 在课题组前期通过 SELEX 技术筛选到针对 K5 的 核酸适配体 K-a2ct, 经 ITC 和 ELONA 验证, K-a2ct 对 K5 的亲和力达到纳摩尔级,且选择特异性强, 提示该核酸适配体具有靶向结合 K5 的作用。

核酸适配体具有与靶标结合的特异性, 但其 是否能够与靶标结合从而抑制靶标的功能,阻断 细胞中的信号通路,是其应用于靶标调控或开发 为特异性抑制靶标的核酸药物的重要指标。同一 靶标的不同适配体可能具有不同的作用,如趋化 因子 CXCL-8(IL-8)的核酸适配体 8A-35 能有效抑 制 IL-8 诱导的嗜中性粒细胞活化和趋化,而核酸 适配体 8A-44 则主要抑制 IL-8 诱导的口腔癌细胞 侵袭^[31]。本研究的结果表明, K5 的核酸适配体 K-a2ct能够显著抑制 K5 的抗血管内皮细胞增殖和 迁移的作用并在一定程度上抑制 K5 促细胞凋亡 的作用,抑制程度与 K-a2ct 呈剂量依赖关系,提 示其在抑制和阻碍 K5 抗血管生成功能方面具有 良好活性。有研究显示,使用分子模拟技术和化 学修饰可以对筛洗得到的核酸适配体进行优化, 在保留其结合特异性的基础上进一步提高亲和力 和稳定性,使其能更好地应用于体内^[32],因此, 后续笔者所在课题组将对 K5 的核酸适配体进行 模拟优化,以进一步研究核酸适配体与靶标蛋白 的结合机制,为探索 K5 蛋白的检测和拮抗剂研究 提供灵敏特异的识别分子。

综上所述,本研究在成功表达并纯化 K5 蛋白的基础上,验证了核酸适配体 K-a2ct 与 K5 的特异

相互作用,并证实了核酸适配体 K-a2ct 具有抑制 K5 抗血管生成功能的活性,为实现 K5 的靶向功 能调控,开发基于核酸适配体的 K5 拮抗剂奠定了 基础。

REFERENCES

- PAPIEWSKA-PAJĄK I, BALCERCZYK A, STEC-MARTYNA E, et al. Vascular endothelial growth factor-D modulates oxidant-antioxidant balance of human vascular endothelial cells[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(6): 1139-1149.
- [2] SANKAR K S, ALTAMENTOVA S M, ROCHELEAU J V. Hypoxia induction in cultured pancreatic islets enhances endothelial cell morphology and survival while maintaining beta-cell function[J]. PLoS One, 2019, 14(10): e0222424.
- [3] WANG H B, SHI Y J, GU J. A multitarget angiogenesis inhibitor, CTT peptide-endostatin mimic-Kringle 5, prevents diet-induced obesity[J]. J Mol Med, 2020, 98(12): 1753-1765.
- [4] CAO Y, JI R W, DAVIDSON D, et al. Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells[J]. J Biol Chem, 1996, 271(46): 29461-29467.
- [5] ZHANG D, KAUFMAN P L, GAO G, et al. Intravitreal injection of plasminogen Kringle 5, an endogenous angiogenic inhibitor, arrests retinal neovascularization in rats[J]. Diabetologia, 2001, 44(6): 757-765.
- [6] FANG S H, HONG H H, LI L, et al. Plasminogen Kringle 5 suppresses gastric cancer via regulating HIF-1α and GRP78[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3144.
- [7] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. Science, 1990, 249(4968): 505-510.
- [8] NOSAZ Z, RASOULINEJAD S, MOUSAVI GARGARI S L. Development of a DNA aptamer to detect *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* through cell SELEX[J]. Iran J Vet Res, 2020, 21(4): 294-300.
- [9] SAPNA D, NEELESH S, TOOQEER A, et al. Aptamer-based diagnostic and therapeutic approaches in animals: Current potential and challenges[J]. Saudi J Biol Sci, 2021, 28(9): 5081-5093.
- [10] LIU R X, ZHU Q H. Research progress of new methods for biomarker detection[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应 用药学), 2020, 37(3): 378-384.
- [11] SHIGDAR S, SCHRAND B, GIANGRANDE P H, et al. Aptamers: Cutting edge of cancer therapies[J]. Mol Ther, 2021, 29(8): 2396-2411.
- [12] BUKARI B, SAMARASINGHE R M, NOIBANCHONG J, et al. Non-invasive delivery of therapeutics into the brain: The potential of aptamers for targeted delivery[J]. Biomedicines, 2020, 8(5): 120.
- [13] WANG B, ZHAO C Z, WANG Z Q, et al. Wearable aptamer-field-effect transistor sensing system for noninvasive cortisol monitoring[J]. Sci Adv, 2022, 8(1): eabk0967.
- [14] BOUHEDDA F, FAM K T, COLLOT M, et al. A

Chin J Mod Appl Pharm, 2023 November, Vol.40 No.21 · 2915 ·

dimerization-based fluorogenic dye-aptamer module for RNA imaging in live cells[J]. Nat Chem Biol, 2020, 16(1): 69-76.

- [15] MEHENNAOUI S, POORAHONG S, JIMENEZ G C, et al. Selection of high affinity aptamer-ligand for dexamethasone and its electrochemical biosensor[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6600.
- [16] QIN Y D, QIN Y N, BUBIAJIAER H, et al. Engineering constructed of high selectivity dexamethasone aptamer based on truncation and mutation technology[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022(10): 994711.
- [17] GUAN B Z, ZHANG X W. Aptamers as versatile ligands for biomedical and pharmaceutical applications[J]. Int J Nanomedicine, 2020(15): 1059-1071.
- [18] HEIDER R M, SMESTAD J A, LEMUS H N, et al. An assay that predicts *in vivo* efficacy for DNA aptamers that stimulate remyelination in a mouse model of multiple sclerosis[J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2018(9): 270-277.
- [19] LI L, XU S J, YAN H, et al. Nucleic acid aptamers for molecular diagnostics and therapeutics: Advances and perspectives[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2021, 60(5): 2221-2231.
- [20] TAIWE G S, MONTNACH J, NICOLAS S, et al. Aptamer efficacies for *in vitro* and *in vivo* modulation of αC-conotoxin PrXA pharmacology[J]. Molecules, 2019, 24(2): 229.
- [21] NG E W M, ADAMIS A P. Anti-VEGF aptamer (pegaptanib) therapy for ocular vascular diseases[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006(1082): 151-171.
- [22] PARK W, KIM J, CHOI S, et al. Human plasminogen-derived N-acetyl-Arg-Leu-Tyr-Glu antagonizes VEGFR-2 to prevent blood-retinal barrier breakdown in diabetic mice[J]. Biomedecine Pharmacother, 2021(134): 111110.
- [23] BELL D R, WEBER J K, YIN W, et al. In silico design and validation of high-affinity RNA aptamers targeting epithelial cellular adhesion molecule dimers[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(15): 8486-8493.

- [24] LU T F, ZHANG H, ZHOU J, et al. Aptamer-targeting of Aleutian mink disease virus (AMDV) can be an effective strategy to inhibit virus replication[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 4649.
- [25] WANG J, JU J G, ZHONG Y H, et al. Effect of meglumine cyclic adenylate on proliferation, migration, angiogenesis and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2022, 39(3): 324-328.
- [26] QIU J F, CHEN L, YANG J, et al. Garmultin-a incites apoptosis in CB3 cells through miR-17-5p by attenuating poly (ADP-ribose) polymerase-1[J]. Dose Response, 2022, 20(4): 15593258221130681.
- [27] LIU F, LEE S A, RIORDAN S M, et al. Effects of anti-cytokine antibodies on gut barrier function[J]. Mediators Inflamm, 2019(2019): 7028253.
- [28] YANG G, ZHANG S N, WANG Y C, et al. Aptamer blocking S-TLR4 interaction selectively inhibits SARS-CoV-2 induced inflammation[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 120.
- [29] CATUOGNO S, DI MARTINO M T, NUZZO S, et al. An anti-BCMA RNA aptamer for miRNA intracellular delivery[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019(18): 981-990.
- [30] THOMAS B J, PORCIANI D, BURKE D H. Cancer immunomodulation using bispecific aptamers[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2022(27): 894-915.
- [31] SUNG H J, CHOI S, LEE J W, et al. Inhibition of human neutrophil activity by an RNA aptamer bound to interleukin-8[J]. Biomaterials, 2014, 35(1): 578-589.
- [32] YOSHIKAWA A M, RANGEL A, FEAGIN T, et al. Discovery of indole-modified aptamers for highly specific recognition of protein glycoforms[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 7106.

收稿日期: 2022-11-21 (本文责编: 陈怡心)