文章编号:1000-5404(2014)04-0307-06

论著

SELEX技术筛选钙通道特异性核酸适配体及其抗肥大细胞活化的作用

杨永强[1],陈晓红[2],李怡然[2],陈 波[2],冉新泽[3],杨 涛[1],孙仁山[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科[1];400038 重庆,第三军医大学:药学系药理学教研室[2],军事预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[3])

[摘要] **目的** 筛选针对Orai1分子第1膜外区蛋白的核酸适配体,探讨适配体通过拮抗钙离子释放激活通道(Ca^{2+} release activation channel,CRAC)抑制肥大细胞活化的效应。**方法** 构建随机单链DNA文库,利用不对称PCR对单链DNA文库进行扩增。采用聚苯乙烯酶联板为介质的指数富集配体系统进化(systematic evolution of ligand by exponential enrichment,SELEX)技术筛选核酸适配体。利用酶联免疫吸附实验检测各轮筛选序列与靶蛋白的亲和力,验证适配体与靶蛋白的特异性结合;激光共聚焦显微镜观察适配体对细胞内钙离子浓度变化的影响;利用IgE介导的肥大细胞脱颗粒模型,观察适配体对β-氨基己糖苷酶释放的抑制效应。**结果** 经过12轮SELEX筛选,获得了7条核酸适配体,其中AptamerY1解离常数(Kd值)为1.72×10^{-8} mol/L。以终浓度2 μg/mL的AptamerY1可抑制由IgE介导的人肥大细胞系LAD2钙离子内流,并对LAD2细胞的β-氨基己糖苷酶释放抑制率达95%。**结论** 通过SELEX筛选,获得了7条针对Orai1分子第1膜外区的核酸适配体,所获得适配体可对肥大细胞LAD2钙内流有效抑制,进而抑制肥大细胞活化和β-氨基己糖苷酶的释放。

[关键词] 肥大细胞;SELEX适体技术;钙离子释放激活通道;β-氨基己糖苷酶
[中图法分类号] R392-33;R392.12;R392.2 [文献标志码] A

Calcium channel-specific oligonucleotide aptamers selected by SELEX inhibit mast cell activation

Yang Yongqiang[1], Chen Xiaohong[2], Li Yiran[2], Chen Bo[2], Ran Xinze[3], Yang Tao[1], Sun Renshan[1] ([1]Department of Dermatology, Institute of Battle Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Department of pharmacology, College of Pharmacy, [3]State Key Laboratory of Trauma, Burns, and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To screen the oligonucleotide aptamers for the first extracellular domain of Orai1 protein in order to determine the inhibitory effects of aptamers on mast cells activation by Ca^{2+} release activation channel (CRAC). **Methods** Random single-strand DNA (ssDNA) library was constructed. The key parameters of asymmetric PCR were optimized to amplify ssDNA library. The oligonucleotide aptamers were screened by systematic evolution of ligand by exponential enrichment (SELEX) technology with enzyme-linked polystyrene plate as medium. The affinity between ssDNA library and target protein was examined in each round by ELISA. The changes of intracellular Ca^{2+} concentration in LAD2 mast cell line were tested by laser confocal microscopy. The β-hexosaminidase release from LAD2 cells was measured so that the aptamer effects on mast cell activation mediated by IgE could be evaluated. **Results** Seven oligonucleotide aptamers were obtained after 12 rounds of SELEX. The Kd value of Aptamer Y1 reached 1.72×10^{-8} mol/L. Aptamer Y1 at the final concentration 2 μg/mL decreased the calcium entry and inhibited the β-hexosaminidase release from LAD2 cells by 95%. **Conclusion** The seven oligonucleotide aptamers targeting the first extracellular domain of Orai1 protein are obtained by SELEX technology. The aptamers can decrease intracellular calcium influx and inhibit the release of β-hexosaminidase from LAD2 cells effectively, and therefore, inhibit mast cell activation through CRAC channels.

[基金项目] 国家自然科学基金(30972647)
[通信作者] 孙仁山,E-mail: pharsunr@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131129.1809.007.html(2013-11-29)

[**Key words**] mast cells; SELEX aptamer technique; Ca^{2+} release activation channel; β-hexosaminidase

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972647). Corresponding author: Sun Renshan, E-mail: pharsunr@126.com

2006年Feske等[1]识别出一种新蛋白,命名为Orai1,证实了Orai1蛋白是钙离子释放激活通道(Ca^{2+} release activation channel,CRAC)的组成部分。20世纪90年代,SELEX技术[2]问世,由此获得的适配体可与靶分子高特异性和高亲和力地结合。适配体的另外一个优点是没有免疫原性[3],故在临床上具有广泛和潜在的应用价值。速发型过敏反应的关键环节是激活肥大细胞,活化的主要标志是脱颗粒反应。Ca^{2+}从细胞外经CRAC通道迅速进入细胞内是有效激活肥大细胞、产生脱颗粒反应的充分和必要条件[4]。现在已经明确Orai1是细胞膜表面蛋白,具有4个跨膜区域,2个膜外区[5]。Orai1第1膜外区D110和D112位的带负电荷的天冬氨酸密码子突变为编码中性的甘氨酸密码子,突变体cDNA转染HEK293细胞,可使Orai1丧失对钙离子的通道功能[6]。因此,采用化合物结合Orai1第1膜外区,改变其电荷分布,有可能终止Orai1的钙通道功能。本研究以Orail分子第1膜外区蛋白为靶分子,采用SELEX技术筛选适配体,利用IgE介导的LAD2细胞脱颗粒模型,研究适配体对肥大细胞钙通道的抑制效应,旨在为研究适配体用于IgE介导的Ⅰ型超敏反应的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

目的蛋白为Orai1膜外区11个氨基酸残基的短肽(氨基酸顺序为N-DADHDYPPGLL-C)、对照蛋白Cd-1215(氨基酸顺序为N-LIPTHTQPSY-C)、IgE寡肽均由北京赛百盛公司合成;2×*Taq* Mix、PMD19-T Simple vector购自TaKaRa公司;STEMPRO-34 SFM Complete Medium、琼脂糖购自Invitrogen公司;凝胶回收试剂盒购自Omega公司;HRP-1abeled Streptavidin购自碧云天公司;Biotin-IgE购自USBiological公司;人体干细胞因子购自Peprotech公司;链霉亲和素购自上海生工公司;BSA购自Sigma公司;96孔可拆酶联板购自Corning公司;SELEX筛选缓冲液及台式液根据文献[7]配制,所用化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 随机单链DNA(ssDNA)文库的构建和引物的合成 构建长度为80 nt的随机ssDNA文库,两端为固定序列,中间含39个随机碱基序列,5′-CTTCTGCCCGCCTCCTTCC-(39N)-GGAGACGAGATAGGCGGACACT-3′;上游引物P1为5′-CTTCTGCCCGCCTCCTTCC-3′,下游引物P2为5′-AGTGTCCGCCTATCTCGTCTCC-3′,生物素标下游引物(biotin -P2)为5′-biotin-AGTGTCCGCCTATCTCGTCTCC-3′。随机ssDNA文库和引物由上海英骏生物公司合成。3条对照序列HSP27-UP:5′-TCAAGCTTATGACCGAGCGCCGCGTGCC-3′; TRIM72-UP: 5′-TAGGATCCCCAGACCTGCCCGCCATGT-3′; UP-2.5: 5′-GGTACCGCAGAATTGGGAAGAGATAGA-3′。序列由本校药理学教研室陈晓红教授提供,3条对照序列和AptamerY1序列由上海百力格公司进行生物素化合成。

1.2.2 LAD2细胞的培养 LAD2细胞由美国哥伦比亚大学Michael D. Gershon,MD惠赠。细胞培养于50 mL的培养瓶中,每瓶5 mL完全培养基。完全培养基包含Stem Pro-34 Nutrient Supplement、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素、2 mmol/L谷氨酰胺、100 ng/mL人体干细胞因子。细胞密度应维持在$0.5\times10^6\sim1\times10^6$/mL,每周半量更换新鲜培养基[8]。

1.2.3 直接不对称PCR法制备ssDNA文库的优化 ssDNA文库1 μL(100 pmol),2×*Taq* Mix 15 μL,具有比例关系的P1:P2(1:50,1:100),加去离子水至总体积为30 μL。PCR扩增条件:94 ℃ 预变性3 min;94 ℃变性30 s,55~65 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,35个循环;最后72 ℃ 延伸5 min。

1.2.4 ssDNA文库合成双链DNA(dsDNA) ssDNA文库4 μL(20 pmol),2×*Taq* Mix 15 μL,P1 2 μL,P2 2 μL,2×*Taq* Mix 10 μL,加去离子水至总体积为20 μL。PCR扩增条件:94 ℃ 预变性3 min;94 ℃变性30 s,58 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,35个循环;最后72 ℃ 延伸5 min。

1.2.5 酶联板为介质的SELEX筛选 根据文献[7-8],略加改进进行。按预先设定的实验参数,用包被缓冲液将Orai1蛋白包被到酶联板中,37 ℃ 3 h或4 ℃过夜,同时设置未包被蛋白的空白孔。拍干后,用1% BSA 37 ℃封闭1 h。不对称PCR产物切胶回收,按参数设定用结合缓冲液混匀后加入到空白孔中,37 ℃孵育,反向筛选去除与BSA和微孔结合的序列,然后转移到包被孔中继续孵育,孵育时间根据参数减少。弃去结合缓冲液,用冲洗缓冲液冲洗包被孔,冲洗次数根据参数增加。甩干后加入洗脱缓冲液80 ℃作用10 min。向洗脱液中加入等体积的酚/氯仿/异戊醇溶液进行抽提,氯仿/异戊醇再抽提,经乙醇沉淀后,TE缓冲液保存获得筛选产物,用于下一轮筛选及亲和力检测。

1.2.6 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测亲和力 用P1和biotin-P2对筛选产物进行PCR扩增,电泳观察目的条带,切胶回收。取10 μg目的蛋白37 ℃ 3 h或4 ℃过夜包被,同时设空白孔,洗涤,用1% BSA 37 ℃封闭1 h,洗涤,各轮selex纯化产物0.1 μg在selex结合缓冲液中37 ℃孵育1 h。selex冲洗缓冲液洗涤6次,加入100 μL 1:2 000稀释的辣根过氧化物酶标链霉亲和素37 ℃孵育40 min。PBST缓冲液洗涤4次,然后加入四甲基联苯胺37 ℃ 10 min,2 mol/L浓硫酸终止反应,用酶标仪测450 nm光密度值[$D(450)$]。

1.2.7 连接转化克隆测序及结构分析 由亲和力检测值确定SELEX筛选轮数,得到的ssDNA文库经PCR扩增成dsDNA,琼脂糖凝胶电泳,DNA回收试剂盒纯化回收产物,将其与pMD19-T连接,转化DH5α感受态大肠杆菌。蓝白斑筛选,挑取22个白色菌落摇菌培养,随机挑选6瓶菌液,PCR法鉴定阳性克隆,将摇菌后的菌液送上海英骏公司测序。用DNAMAN

软件分析其空间结构。测序后的适配子序列进行人工合成,并用 ELISA 检测适配子与靶蛋白的亲和力。

1.2.8 核酸适配体对 IgE 介导 β-氨基己糖苷酶释放的影响

根据文献[9-10],略加改进进行。用台式液配制 1×10^6/mL LAD2 细胞悬液。取 6 个 EP 管,每管 0.5 mL。标记总酶组,Biotin-IgE + Streptavidin 组,Aptamer 组,并以 SELEX 第 1 轮筛选产物作对照组。实验设置空白调零孔。总酶组细胞 1 000 r/min × 5 min 离心后加 500 μL 的 Trition X-100,其余各管加 Biotin-IgE(终浓度 500 ng/mL),重悬后放 37 ℃孵育 2 h。适配体组分别加 AptamerY1、Y6、Y22(终浓度为 2 μg/mL)10 μL,对照组加第 1 轮筛选产物 21 μL(终浓度为 2 μg/mL)。5 min 后上述 4 管及 Biotin-IgE + Streptavidin 组分别加链霉亲和素(终浓度为 500 ng/mL),37 ℃孵育 30 min。将各管 1 000 r/min × 5 min 离心后吸取各孔细胞上清液 30 μL 于 96 孔板上,加入 50 μL 的 β-氨基己糖与 30 μL 细胞上清液在 37 ℃孵育 2 h。2 h 后 100 μL 0.1 mol/L 的 Na_2CO_3/$NaHCO_3$ 终止反应,并用酶标仪检测 405 nm 下的光密度值[D(405)]。实验中采用 3 个平行实验管,重复实验 3 次。

1.2.9 特异性结合的检测 将目的蛋白 Orai1,对照蛋白 Cd32-1215 蛋白、IgE 寡肽、BSA 蛋白配制成浓度为 100 μg/mL 溶液,采用生物素标记的 AptamerY1 与其进行亲和力检测;将生物素化的 AptamerY1、HSP27-UP、TRIM72-UP、UP-2.5 配制浓度为 10 μmol/L 溶液,检测上述寡核苷酸与目的蛋白 Orai1 的亲和力。实验步骤同 1.2.6 所述的酶联免疫吸附实验。实验中采用 3 个平行实验管,重复实验 3 次。

1.2.10 解离常数(Kd 值)的检测 根据文献[7,11],略加改进进行。将 AptamerY1 溶解在 0.05 mol/L 碳酸缓冲液(pH 9.5)中,终浓度为 1 μg/mL。每孔 100 μL 将溶液加到 96 孔板中 4 ℃包被过夜。以含 1% BSA 的 PBS 溶液对板进行封闭,将板干燥后在 4 ℃保存备用。配制 Orai1 蛋白溶液初始浓度为 5 ng/ml (4×10^{-9} mol/L),AptamerY1 的初始浓度为 1 μg/mL(80×10^{-9} mol/L),向下倍比稀释(表 2)和 Orai1 蛋白混合建立 8 个反应系统。在 37 ℃反应 1 h,以每孔 100 μL 的量将反应液以双孔加入到包被了适配体的免疫反应板。37 ℃孵育 1 h 后洗板 5 次,加入 100 μL 生物素化 AptamerY1 溶液 37 ℃反应 30 min,然后加入 50 μL 过氧化物酶标记的链霉亲和素 37 ℃反应 30 min,洗板 5 次,加入底物显色 15 min 后加入 50 μL 浓硫酸终止反应,测定 D(450)值计算各个反应溶液的抗原结合率,并按公式计算 Kd 值。

1.2.11 激光共聚焦观察核酸适配体对 LAD2 细胞内钙内流的影响 根据文献[12],略加改进进行。实验设置 1 组:阴性对照组;2 组:Biotin-IgE + Streptavidin 组;3 组:AptamerY1 抑制组。4 组:HSP27-UP 对照组。各制备细胞样本 0.5 mL,细胞浓度为 1×10^6/mL。在每组样本观察前加入 Streptavidin(100 ng/mL)激活。1 组:细胞不用 IgE 致敏,直接加 Fluo-4-AM 避光染色 30 min,1 000 r/min × 5 min ,加台式液重悬后转入专用平皿。2 组:将细胞用 IgE 致敏,混匀后孵育 2 h,1 000 r/min × 5 min,加台式液重悬后用 5 μmol/L 的 Fluo-4-AM 避光染色 30 min,1 000 r/min × 5 min。加台式液重悬后转入共聚焦专用平皿。3 组:在 Fluo-4-AM 避光染色后,1 000 r/min × 5 min 离心重悬后加入 AptamerY1(终浓度为 2 μg/mL)孵育 5min 后,余步骤同 2 组。4 组:在 Fluo-4-AM 避光染色后,1 000 r/min × 5 min 离心重悬后加入 HSP27-UP(终浓度为 2 μg/mL)孵育 5 min 后,余步骤同 2 组。观察前用 5 00 ng/mL 链霉亲和素激活后立即观察。观察过程中每隔 5s 采集 1 张图片,加链霉亲和素前 1 min 为基线,加入 Streptavidin 后观察约 4 min。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用两样本均数 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析。

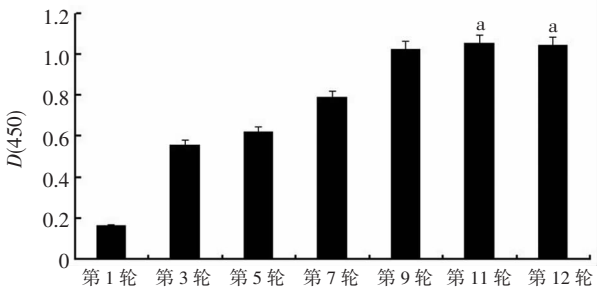
2 结果

2.1 PCR 扩增条件的优化结果

不对称 PCR 扩增条件的优化对于 ssDNA 次级文库的生成、筛选的成功至关重要。本实验对退火温度和上下游引物比进行了优化。通过对比发现:(1)退火温度在 64.3 ℃时目的片段较为明显且杂带及拖尾少;(2)上下游引物浓度为 1∶50 时目的条带较为明显。以上 2 个因素的优化已基本能够满足筛选的需要,循环次数为 35 次。

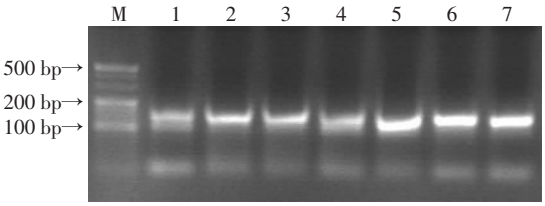
2.2 SELEX 筛选

通过 12 轮筛选,11 轮后 D(450)值不再升高。这说明经过 12 轮筛选后获得的 ssDNA 文库与 Orail 蛋白的亲和力基本达到饱和(图 1)。SELEX 各轮筛选产物电泳结果发现,产物条带逐渐单一,且比初始文库更为致密(图 2)。因此,经过 12 轮筛选可以获得与靶蛋白高亲和力的 ssDNA 文库。



a:$P<0.05$,与第 9 轮 D(450)值比较

图 1 12 轮筛选获得的 ssDNA 与 Orai1 之间的亲和力检测

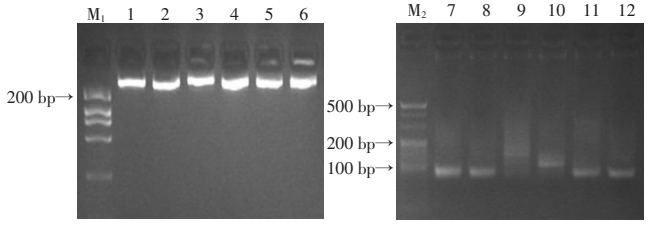


M:20bp DNA Ladder 标准;1:第 1 轮;2:第 3 轮;3:第 5 轮;4:第 7 轮;5:第 9 轮;6:第 11 轮;7:第 12 轮

图 2 SELEX 各轮筛选产物电泳结果

2.3 适配体的连接转化及克隆

对第 11 轮筛选产物进行 PCR,扩增双链 DNA(dsDNA),切胶回收目的条带后与载体 pMD19-T 连接,转化 DH5α 感受态细胞。蓝白斑筛选及摇菌后,随机取其中 6 瓶菌落抽提质粒后 PCR 法鉴定目的片段。图 3 表明目的片段连接克隆成功。



M_1:DL2000 DNA 标准,1~6:随机抽取的6条质粒;M_2:20 bp DNA Ladder 标准;7~12:随机抽提的6条目的片段

图3 目的片段与 pMD19-T 连接效果的鉴定

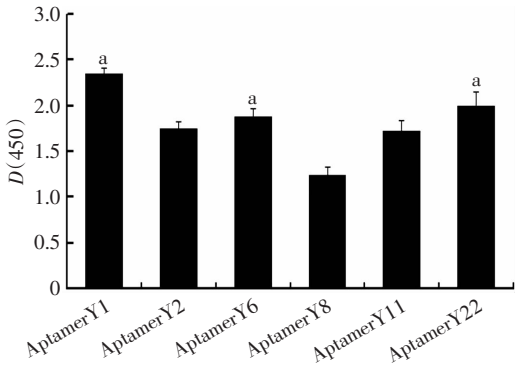
2.4 测序结果及亲和力检测

将22个克隆子送测序,分别标记为 AptamerY1-Y22,结果显示,成功筛选到7条序列。其中随机序列段的一级结构如表1。通过序列对比发现 AptamerY1 与 Aptamer14 相似度为100%,AptamerY2 与 AptamerY22 有1个碱基不同,AptamerY6 与 AptamerY11 有1个碱基不同。因此有6条序列,4条40个碱基,2条51个碱基。采用 DNAMAN 软件分析其二级结构,表明茎环和口袋结构为主要的结构形式,提示其可能是适配体与人 Orail 蛋白特异性结合的基础。每条序列的中间随机序列部分如表1所示。

表1 12轮筛选后的核酸适配体(省略两端固定序列)

序列编号	一级结构
AptamerY1	5′-CCAGTAGCCATACCGGTTTGTGGATGGGGTGTATGCGAGT-3′
AptamerY2	5′-GATGGTGGATTGGAGCTTGTCGCAAAGGGTTCACCACATT-3′
AptamerY6	5′-CGATGGCCTGCCCGATTTTCCGGAGGGGCGATCTGCACATG-CCGCAACGGG-3′
AptamerY8	5′-TGCGAGCATCTCGCTATCAGAGTGAGGTGATTTGTGCATA-3′
AptamerY11	5′-CGATGGCCTGCCCGATTTTCCGGAGGGGCGATCTGCACATGC-CGCAGCGGG-3′
AptamerY14	5′-CCAGTAGCCATACCGGTTTGTGGATGGGGTGTATGCGAGT-3′
AptamerY22	5′-GATGATGGATTGGAGCTTGTCGCAAAGGGTTCACCACATT-3′

我们将测序后的6条序列交由上海英骏生物公司人工合成后,采用 ELISA 方法进行亲和力检测,发现合成序列的亲和力均比11轮的 ssDNA 文库亲和力提高1倍,如图4所示。其中 AptamerY1 亲和力最高,AptamerY8 亲和力最低。我们选取较高的3个适配子 AptamerY1、Y6、Y22 进行后续的细胞功能实验。

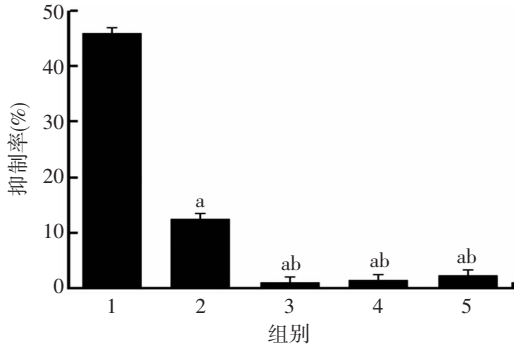


a:$P<0.05$,与 Aptamer8 比较

图4 适配体与靶蛋白的亲和力检测

2.5 适配体对 IgE 介导 β-氨基己糖苷酶释放的影响

对比 SELEX 第1轮后的筛选产物,3条适配子均显示了较好的抑制 β-氨基己糖苷酶释放的效果,与 IgE 介导的脱颗粒模型比较,抑制率(IgE 脱颗粒模型的 β 氨己糖苷酶-适配体干预的 β-氨基己糖苷酶释放量)/IgE 脱颗粒模型的 β-氨基己糖苷酶释放量均大于95%,其中 AptamerY1 抑制效果较好(图5)。

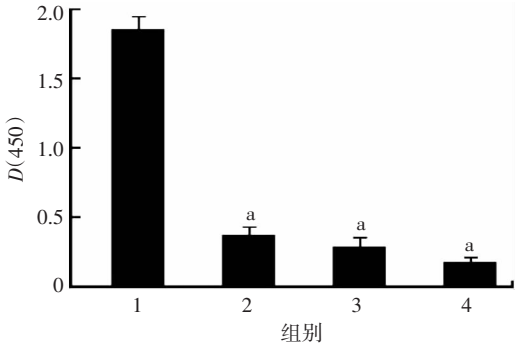


1:Biotin-IgE + Streptavidin 组;2:SELEX 第1轮筛选产物组;3:AptamerY1 组;4:AptamerY6 组;5:AptamerY22 组;a:$P<0.05$,与1组比较;b:$P<0.05$,与 SELEX 第1轮筛选产物组比较

图5 AptamerY1 对 β-氨基己糖苷酶释放的抑制效果

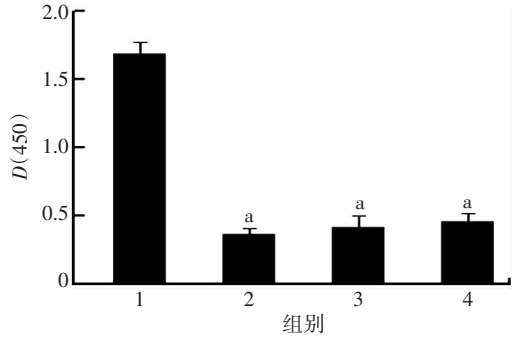
2.6 适配体与靶蛋白特异性结合的检测

通过选取不同的蛋白与 AptmerY1 进行亲和力检测,显示 Oari1 膜外区蛋白亲和力最强。通过选取不同的寡核苷酸与 Oari1 膜外区蛋白进行亲和力检测,显示 AptamerY1 亲和力最强(图6、7)。



1:Orai1 膜外蛋白组;2:Cd32-1215 蛋白组;3:IgE 寡肽组;4:BSA 蛋白组;a:$P<0.05$,与 Orai1 膜外蛋白组比较

图6 AptamerY1 与不同靶蛋白亲和力检测



1:AptamerY1 组;2:HSP27-UP 组;3:TRIM72-UP 组;4:UP-2.5 组;a:$P<0.05$,与 AptamerY1 组比较

图7 Orai1 膜外区蛋白与不同寡核苷酸序列亲和力检测

2.7 AptamerY1 的 Kd 值检测

Kd 值的检测公式：$Kd(i_0 - a_0B) = B/(1-B)$，$B = (A_0 - A_i)/A_0$，计算 Kd 值为 1.72×10^{-8} mol/L(表 2)。

表 2 不同浓度 AptamerY1 竞争下的 Orai1 膜外区蛋白结合率

	1	2	3	4	5	6	7	8
$a_0(10^{-9}mol/L)$	4	4	4	4	4	4	4	4
$i_0(10^{-9}mol/L)$	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0
$D(450)$	0.12	0.23	0.41	0.58	0.86	1.22	1.54	1.87
B	0.93	0.88	0.78	0.69	0.54	0.35	0.17	0

a_0：Orai1 膜外蛋白初始浓度；i_0：AptamerY1 初始浓度；A_0，A_i 是 AptamerY1 浓度为 0 和各浓度时的 $D(450)$ 检测值

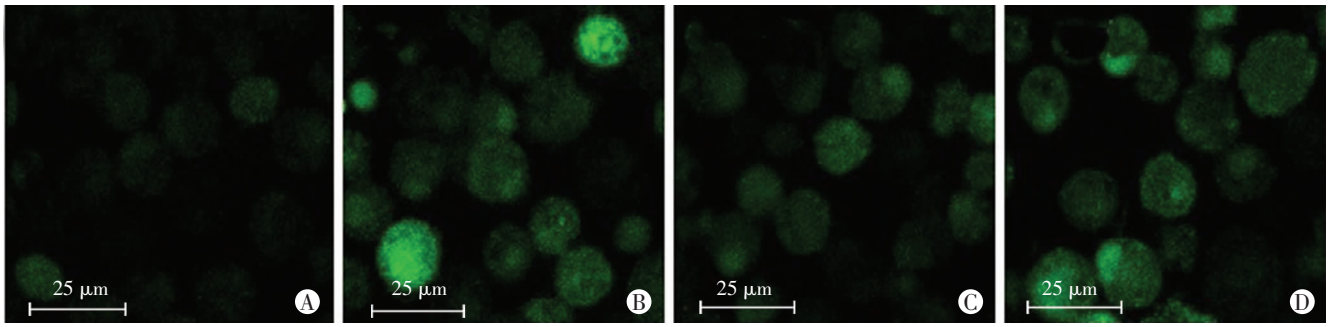
2.8 激光共聚焦显微镜观察 AptamerY1 对 LAD2 细胞钙离子内流的影响

在 Biotin-IgE + Streptavidin 组脱颗粒模型中，将细胞转入共聚焦专用平皿后 50 s 时加入链霉亲和素激活，约 200 s 时荧光强度值达到最大。而 AptamerY1 抑制实验组未出现荧光强度的增强，显示了与阴性对照相似的荧光变化。对照组 HSP27-UP 组出现了荧光强度的增加，显示了与 Biotin-IgE + Streptavidin 组相似的荧光变化(图 8，表 3)。

3 讨论

特异性 IgE 结合于肥大细胞表面上的高亲和力 IgE 受体，多价抗原 2 次进入机体后，交联肥大细胞膜表面高亲和力 IgE 受体，引起 Lyn 和 Spk 等信号蛋白磷酸化，导致细胞钙离子内流，从而激活肥大细胞，引起脱颗粒反应[13]。关于抑制上述肥大细胞活化途径的研究有：抗 IgE 单克隆抗体、CRAC 钙通道拮抗剂[14]、高亲和力 IgE 受体抑制肽等。由于肥大细胞属于静息细胞，肥大细胞的钙内流依赖于胞内钙池(线粒体、内质网等)的耗竭[15]，而不是通过细胞膜去极化导致，因此通常的钙拮抗剂不起作用。CRAC 通道介导的钙离子内流导致了肥大细胞等静息细胞的活化，因此将 CRAC 通道的重要组成分子 Orai1 蛋白作为靶点抑制肥大细胞等静息细胞的活化受到越来越多研究者的关注。Harteneck 等[16]对 SKF-96365 进行的研究，DeHaven 等[17]对 2-APB 的研究，以及 Ng 等[18]对 SK66 的研究，均发现该类小分子化合物在抑制 CRAC 通道的同时，也对其他离子通道抑制。表明该类小分子抑制剂受体特异性不强，而且研究也发现该类化合物毒性较大，仅限于实验室研究。

核酸适配体具有比抗体更小，更易制备，更易于化学修饰，在疾病治疗和诊断中显示了明显的优势，越来越多的研究者开始关注这方面的研究[19]。而且不少适配体药物正处于不同的临床实验阶段。ARC1779 是 1 种 DNA 适配体，针对 vWF 因子，通过作用于 vWF A1 区，抑制 vWF 与 GP Ib 的交联，从而达到抗血栓形成的作用[20]。Nox-E36 为 RNA 适配体，针对 CCL2 配体，通过与 40×10^3 PEG 的共轭结合效应来抑制糖尿病的发生[21]。E10030 作为 DNA 适配体，针对 PGDF 因子，诱导新生血管的复原治疗新生血管年龄相关性黄斑变性疾病[22]。本研究表明，适配体 AptamerY1 能特异结合肥大细胞钙内流的必经通路 Orai1 分子，抑制了钙离子内流和减少炎症介质 β-氨基己糖苷酶的释放，抑制率达 95%，从而抑制了肥大细胞的活化。



AptamerY1	−	−	+	−
HSP27-UP	−	−	−	+
Biotin-IgE	−	+	+	+
Streptavidin	+	+	+	+

A：阴性对照组；B：Bitin-IgE + Streptaridin 组；C：Aptamer Y1 抑制组；D：HSP27-UP 对照组

图 8 激光共聚焦显微镜观察适配体 Y1 对钙离子内里的干预效果

表 3 不同条件下 LAD2 细胞内钙离子荧光强度随时间的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	0 s	50 s	100 s	150 s	200 s	250 s	300 s
阴性对照组	37.7 ±9.9	37.5 ±9.2	38.2 ±10.1	37.9 ±9.5	37.6 ±9.4	37.5 ±9.4	37.4 ±9.7
Biotin-IgE + Streptavidin 组	56.3 ±5.7	59.1 ±2.3	58.9 ±4.6	74.6 ±6.9	88.3 ±11.2[c]	82.5 ±9.8	78.9 ±8.6
AptamerY1 抑制组	45.5 ±3.2	45.9 ±3.9	44.5 ±3.3	43.4 ±4.3[ab]	43.8 ±5.5[ab]	44.1 ±7.5[ab]	42.3 ±7.6
HSP27-UP 对照组	44.6 ±3.5	45.7 ±4.3	50.4 ±5.8	62.6 ±6.2	79.5 ±7.4[c]	76.6 ±8.4	74.5 ±6.4

a：$P < 0.05$，与 Biotin-IgE + Streptavidin 组同时间点的荧光强度值比较；b：$P > 0.05$，与本组 50s 荧光强度值比较；c：$P < 0.05$，与本组 50 s 荧光强度值比较

本实验通过改变靶蛋白与寡核苷酸序列对筛选序列和靶蛋白的结合进行了验证：AptmerY1 与 Orai1 第1膜外区蛋白反应的 $D(450)$ 为1.86，而与 Cd32-1215 蛋白、IgE 寡肽、BSA 蛋白的 $D(450)$ 分别为0.37、0.29、0.18。我们改变了寡核苷酸序列，采用 HSP27-UP、TRIM72-UP、UP-2.5 三条对照序列分别于 Orai1 第1膜外区蛋白蛋白结合，其检测结果也验证了 AptmerY1 与 Orai1 第1膜外区蛋白特异性结合。本实验采用 Fluo-4 钙离子荧光探针观察了 AptmerY1 对 CRAC 通道的抑制效应，以 IgE 介导的 LAD2 细胞脱颗粒模型为基础，采用 HSP27-UP 序列作为对照，在加入链霉亲和素150 s后，脱颗粒模型组荧光强度达到最高（88.3±11.2），AptamerY1 抑制组在加入链霉亲和素150 s后，荧光强度未见明显变化（$P>0.05$），HSP27-UP 对照组在加入链霉亲和素150 s后，荧光强度也达到最高（79.5±7.4），该实验证明了 AptmerY1 对钙离子内流的抑制效应，也在细胞水平间验证了筛选序列与目的蛋白的结合。下步实验中，拟将 Orai1 质粒转染至 HEK293 细胞，利用流式细胞术检测筛选序列 AptamerY1 与 Orai1 靶蛋白的结合。本研究以液相 AptamerY1 和固相 AptamerY1 竞争结合 Orai1 膜外区蛋白，通过双抗体夹心 ELISA 测出 Kd 值，而且本实验获得的 AptamerY1 的 Kd 值为 1.72×10^{-8} mol/L，达到纳摩尔级。以上结果均显示了 AptmerY1 与 Orai1 膜外区蛋白的高特异性高亲和力结合。

本研究获得的适配体对肥大细胞活化中信号传导通路及其他释放介质如白三烯等的影响及该适配体对其他来源的肥大细胞抑制效果如何，以及该适配体如何进行化学修饰以保证其在机体内的稳定性等方面，都需要进一步研究。

参考文献：

[1] Feske S, Gwack Y, Prakriya M, *et al*. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function[J]. Nature, 2006, 441(7090): 179-185.

[2] 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.

[3] 田红英，符兆英. SELEX 技术的原理和核酸适配体在医学上的应用进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2012，28(10)：1103-1106.

[4] Galli S J, Tsai M, Piliponsky A M. The development of allergic inflammation[J]. Nature, 2008, 454(7203): 445-454.

[5] Engh A, Somasundaram A, Prakriya M. Permeation and gating mechanisms in store-operated CRAC channels[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2012, 17: 1613-1626.

[6] Yeromin A V, Zhang S L, Jiang W, *et al*. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai[J]. Nature, 2006, 443(7108): 226-229.

[7] 秦莲花，郑瑞娟，杨华，等. SELEX 技术筛选结核分枝杆菌 MPT64 蛋白 DNA 适配子方法学研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2008，28(2)：176-180.

[8] 谢琳，刘韧，朱旭东，等. 人重组 TGF-βRⅡ亲和核酸筛选方法的建立[J]. 第三军医大学学报，2008，30(23)：2168-2171.

[9] Gage M C, Keen J N, Buxton A T, *et al*. Proteomic analysis of IgE-mediated secretion by LAD2 mast cells[J]. J Proteome Res, 2009, 8(8): 4116-4125.

[10] 杨永强，陈晓红，孙仁山，等. 肥大细胞系 LAD2 的培养及肥大细胞脱颗粒模型的建立[J]. 中国皮肤性病学杂志，2014，28(1)：34-37.

[11] 郭杰标，郭锐，刘艳华. 以抗体竞争结合抗原测定单抗亲和力常数的研究[J]. 南方医科大学学报，2006，26(7)：1057-1059.

[12] 陆月明，李莉，罗文侗，等. 肥大细胞抗原活化时钙离子信号变化的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志，2000，23(4)：243-246.

[13] 孙仁山，陈晓红，冉新泽，等. 高亲和力 IgE 受体介导的信号传导及其相关的抑制性受体[J]. 中国药理学通报，2005，21(4)：385-389.

[14] Parekh A B. Store-operated CRAC channels: function in health and disease[J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(5): 399-410.

[15] Di-Capite J, Parekh A B. CRAC channels and Ca^{2+} signaling in mast cells[J]. Immunol Rev, 2009, 231(1): 45-58.

[16] Harteneck C, Gollasch M. Pharmacological modulation of diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 channels [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2011, 12(1): 35-41.

[17] DeHaven W I, Smyth J T, Boyles R R, *et al*. Complex actions of 2-aminoethyldiphenyl borate on store-operated calcium entry[J]. J Biol Chem, 2008, 283(28): 19265-19273.

[18] Ng S W, di-Capite J, Singaravelu K, *et al*. Sustained activation of the tyrosine kinase Syk by antigen in mast cells requires local Ca^{2+} influx through Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels[J]. J Biol Chem, 2008, 283(46): 31348-31355.

[19] Banerjee J, Nilsen-Hamilton M. Aptamers: multifunctional molecules for biomedical research[J]. J Mol Med (Berl), 2013, 91(12): 1333-1342.

[20] Bae ON. Targeting von Willebrand factor as a novel anti-platelet therapy; application of ARC1779, an Anti-vWF aptamer, against thrombotic risk[J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(10): 1693-1699.

[21] Esposito C L, Catuogno S, de-Franciscis V, *et al*. New insight into clinical development of nucleic acid aptamers[J]. Discov Med, 2011, 11(61): 487-496.

[22] Ni X, Castanares M, Mukherjee A, *et al*. Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons[J]. Curr Med Chem, 2011, 18(27): 4206-4214.

（**收稿**：2013-10-16；**修回**：2013-11-19）

（编辑　邓强庭）