

## 雌激素受体核酸适配体在乳腺癌免疫组织化学检测中的应用

何煦<sup>1</sup>, 陈杰<sup>1</sup>, 叶尚勉<sup>1</sup>, 董丹丹<sup>2</sup>, 李科<sup>2</sup>, 周陶友<sup>3</sup>, 赵连三<sup>3</sup>

1. 四川省医学科学院·四川省人民医院 中心实验室(成都 610072); 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院 病理科(成都 610072); 3. 四川大学华西医院 感染病分子生物学重点实验室(成都 610041)

**【摘要】目的** 筛选出能应用于乳腺癌免疫组织化学检测的雌激素受体(ER)核酸。**方法** 制备ER蛋白,用指数富集的配体系统进化(SELEX)技术筛选出对ER具有高亲和力和特异性的核酸适配体。采用配体-受体相互反应实验来测定合成的ER适配体复合物的亲和力,用生物素化ER适配体和ER单克隆抗体分别作为一抗对105例乳腺癌组织进行免疫组化染色,以检测合成的ER适配体在癌组织中的特异性表达。用Kappa检验进行一致性检验。**结果** 线性回归法计算获得生物素化适配体与ER复合物的解离常数Kd值为(0.34±0.05)nmol/L ( $n=3, r=0.989$ ),最大结合力( $B_{max}$ )为769.23 fmol/(mg prot·nmol<sup>-1</sup>·L<sup>-1</sup>)。实验结果表明,分别用生物素化ER适配体和ER单克隆抗体分别作为一抗进行免疫组化染色的结果具有高度一致性。其中ER阳性和阴性样本 $n=105$ , kappa值=0.943, 95%可信区间=0.879~1.006,  $P<0.05$ ; 而ER弱阳性和中度/强表达样本 $n=75$ , kappa值=0.805, 95%可信区间=0.642~0.967,  $P<0.05$ 。进一步观察发现,ER适配体和ER抗体能使乳腺癌组织同一部位出现阳性表达,而阴性对照组均无表达。2例子宫内膜癌用生物素化ER适配体检测,癌细胞ER表达均为阳性。**结论** 我们合成的ER适配体在体外能高度结合ER,ER适配体和ER抗体都能检测乳腺癌组织中ER的特异性表达。

**【关键词】** 雌激素受体 核酸适配体 乳腺癌 免疫组织化学

**The Application of Estrogen Receptor Aptamer in Immunohistochemical Detection of Breast Cancer** HE Xu<sup>1</sup>, CHEN Jie<sup>1</sup>, YE Shang-mian<sup>1</sup>, DONG Dan-dan<sup>2</sup>, LI Ke<sup>2</sup>, ZHOU Tao-you<sup>3</sup>, ZHAO Lian-san<sup>3</sup>. 1. Core Laboratory, Sichuan Academy of Medical Sciences, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China; 2. Department of Pathology, Sichuan Academy of Medical Sciences, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China; 3. Key Laboratory of Infectious Disease Molecular Biology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

**【Abstract】 Objective** To synthesize and select an estrogen receptors aptamer that can be used in immunostaining of breast cancer tissues. **Methods** ER protein was purified. ER aptamer that showed a high affinity and specificity for ER was synthesized and selected and by SELEX. Ligand-receptor interactions assay was adopted to measure the affinity of the aptamer-ER complex. Both the biotinylated aptamer and the anti-ER monoclonal antibody were tested for immunohistochemical staining of ER status on 105 breast cancer samples. Agreement on the detection of ER expression was determined by kappa statistics. **Results** The dissociation constant (Kd) of the biotinylated aptamer-ER complex, as calculated by a linear regression analysis, was determined to be (0.34±0.05) nmol/L ( $n=3, r=0.989$ ). The binding capacity ( $B_{max}$ ) was 769.23 fmol/(mg prot·nmol<sup>-1</sup>·L<sup>-1</sup>). The ER aptamer and the anti-ER antibody both exhibited identical specificity to ER-expressing breast cancer cells. There was a high agreement between the two methods ( $n=105$ , kappa value=0.943, 95% confident interval=0.879-1.006,  $P<0.05$  for the ER positive and negative samples;  $n=75$ , kappa value=0.805, 95% confident interval=0.642-0.967,  $P<0.05$  for the ER weak and moderate/strong expression samples). Both the anti-ER antibody and the ER aptamer can also recognized breast cancer cells at the same sites. There was no expression in the negative controls. There were also positive expressions in the 2 endometrial cancer tissues by using biotinylated aptamer. **Conclusions** Our results indicated that the synthesized ER aptamer has a high affinity to bind ER. ER aptamer and the anti-ER antibody can both be used for immunohistochemical staining of ER status in breast cancer tissue.

**【Key words】** Estrogen receptor(ER) Aptamer Breast cancer Immunohistochemistry

雌激素受体(ER)是一种核转录因子,被雌二醇激活后可调节乳腺上皮细胞的生长和分化。约70%的乳腺癌组织中会出现ER高表达,从而导致患者预后不佳<sup>[1]</sup>。目前临床上主要采用免疫组织化学法,通过特异性ER抗体检测乳腺癌组织ER的表达,然而特异性抗体的制备非常耗时,且过程复杂,因此需要找到一种易于生产且花费较小的配体分子。近年来一种能特异性

结合到靶分子上的寡核苷酸或多肽分子的小分子配体-核酸适配体(aptamer)引起了广泛关注,它不仅可用于生物技术检测,而且可能用于疾病的治疗<sup>[2-3]</sup>。本研究中,我们用指数富集的配体系统进化(SELEX)技术从雌激素反应元件(ERE)寡核苷酸池中筛选出一段与乳腺癌细胞株MCF-7中ER蛋白有高亲和性的特异性结合寡核苷酸片段,用此寡核苷酸片段作为一抗,通过

免疫组织化学技术来检测ER的表达,以判断其能否作为ER核酸适配体。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验细胞和主要试剂

乳腺癌细胞株MCF-7购自美国ATCC,胎牛血清购自Gibco公司,ER单克隆抗体购自DAKO公司,兔抗人ER多克隆抗体购自GuideChem公司,亲和层析柱购自Qiagen公司,Western blot蛋白检测试剂盒购自Bio-Rad公司,ERE寡核苷酸池由Invitrogen公司合成,SP试剂盒购自北京中杉金桥公司。

### 1.2 ER蛋白的制备及纯化

从MCF-7细胞中获得内源性ER蛋白,用抗ER抗体处理后亲和层析法纯化蛋白。MCF-7细胞在RPMI-1640培养基(胎牛血清为葡聚糖被覆活性炭处理过的血清)中培养3 d,然后在无血清RPMI-1640培养基中培养1 d。收集细胞,用0.01 mol/L PBS洗2次,置于-70 °C备用。

将解冻的MCF-7细胞加入缓冲液(10 mmol/L Tris-HCL, pH7.5, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 10%甘油, 150 mmol/L谷氨酸钾)和蛋白酶抑制剂混合物进行匀浆(所有的操作步骤均在冰上进行)。将匀浆物以10 000×g离心1 h,收集上清,将1 g溴化氰活化琼脂糖(Sigma)与5 mg纯化的兔抗人ER多克隆抗体在PBS缓冲液中混合(pH 7.4),室温下孵育24 h,然后与上清液混合。将上清液与凝胶的混合物加入亲和层析柱中,轻柔搅动,并4 °C过夜。过量PBS冲洗层析柱,用100 mmol/L甘氨酸(pH3.0)洗脱蛋白。收集0.25 mL洗脱物,加入25 μL的1 mol/L Tris-HCL(pH8.6)中,以中和pH值。用Western blot蛋白检测试剂盒测定每个组分中的蛋白浓度,经聚丙烯酰胺凝胶电泳,考马斯亮蓝染色,通过Western blot法测定ER纯度。

### 1.3 寡核苷酸ER适配体的合成

ERE首先在非洲爪蟾卵黄蛋白A2基因中发现,其中一段保守序列为AGGTCAnnnTGACCT,标记为-7, -6, -5, -4, -3, -2, -1, 0, +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, ERE序列在-4, -5, +4和+5处,不同于糖皮质激素反应元件、孕激素受体反应元件和雄激素受体反应元件<sup>[4]</sup>。根据KLINGE<sup>[5]</sup>的报道,我们交由invitrogen公司合成了含有以上保守序列的ERE寡核苷酸池。

采用SELEX技术<sup>[6]</sup>筛选出ER适配体,方法如下:将ERE池溶解于结合缓冲液中(20 mmol/L HEPES, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 2 mmol/L KCl和150 mmol/L NaCl, pH7.4), 95 °C加热5 min变性,冰上

冷却10 min。将从MCF-7细胞中得到的ER与雌二醇作用后,加入ERE池37 °C共同孵育1 h。将ERE蛋白混合物通过硝酸纤维素膜,与ER非特异性结合的ERE被结合缓冲液去除,而与ER特异结合的ERE在95 °C加热5 min被复原。离心后,取上清液脱盐纯化。重复上述步骤3次。

### 1.4 ER核酸适配体结合实验和Scatchard分析检测亲和力

采用配体-受体相互反应实验测定ER适配体复合物的亲和力。将SELEX方法筛选出的核酸序列分别在5'端进行生物素化,然后将纯化的ER蛋白包被在96孔板上(2 μl/孔),与各种浓度的生物素化的ER适配体(0、200、400、600、800、1000和1200 μmol/L)一起孵育。37 °C孵育1 h, PBS-吐温溶液洗板4次,以去除未结合的ER适配体。加入链霉亲和素-辣根过氧化物酶复合物, TMB底物显色,所有实验均设3个复孔。

根据Scatchard方程式绘制数据,用线性回归分析计算生物素化适配体-ER复合物的解离常数(Kd)和结合位点数,并通过生物素化ER适配体的浓度来判定特异性结合量,得到饱和曲线。

根据Scatchard图,我们选择Kd值与文献报道的MCF-7细胞中雌二醇和ER的结合值(0.35±0.05 nmol/L)相同的一个核酸序列,其对ER受体具有较高的亲和力和特异性。该核酸序列如下:5'-GTCAGG-TCACAGTGACCTGATCAAAGTTAATG-3'。我们同时合成了一段具有与ER适配体相同序列长度的DNA寡核苷酸片段5'-GGGGGGGGGGGGTTTTTTTT-TTTT AAA CCCCC-3',用作阴性对照。

### 1.5 ER适配体免疫组化染色

分别用生物素化ER适配体和ER单克隆抗体作为一抗对乳腺癌和子宫内膜癌组织进行免疫组化染色,以检测乳腺癌和子宫内膜癌中ER的表达。105例乳腺癌患者组织样本来源于四川省医学科学院四川省人民医院,患者平均年龄51岁,术前均未进行化疗和内分泌治疗,术后ER阳性的患者接受内分泌治疗,而ER阴性者接受化疗和放疗(附表)。2例ER阳性的子宫内膜癌组织来源于四川省医学科学院四川省人民医院,术前均未进行化疗。

将所取组织用福尔马林固定,石蜡包埋,5 μm厚连续切片,常规脱蜡水化,抗原修复,封闭内源性过氧化物酶,加ER核酸适配体(1:50),其中ER适配体用DNA蛋白结合缓冲液稀释(含0.01 mol/L Tris-HCL, pH=7.5, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L

表 1 105例乳腺癌患者临床资料

Table 1 Clinicopathological characteristics of patients with breast cancer

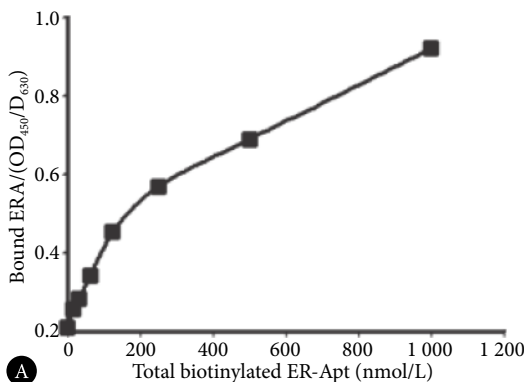
Characteristics	Case
Age	
≤50 yr.	68
>51 yr.	37
Histology	
Ductal	56
Lobular	49
Nodal status	
No	70
Yes	35
ER status	
Negative	31
Positive	74
+	20
++	12
+++	42
Adjuvant system therapies	
Endocrine therapy	74
Chemotherapy	31

EDTA, 50nmol/L NaCl), 4 °C过夜。PBS缓冲液洗3次, 加入SP试剂盒, DAB镜下显色, 苏木素复染。

用ER抗体作为一抗对乳腺癌组织进行免疫组化染色, 作为阳性对照, 同时还用ER阳性的子宫内膜癌作为阳性对照。用合成的与ER适配体相同序列长度的DNA寡核苷酸片段作为一抗用作阴性对照, 并且将ER阴性的正常乳腺组织也作为阴性对照。

1.6 统计学方法

用Kappa检验分析免疫组织化学中乳腺癌细胞



ER表达的一致性,  $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ER蛋白的制备及纯化

MCF-7细胞匀浆产物经抗ER抗体亲和和层析后, 收集蛋白, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳, 考马斯亮蓝染色, Western blot检测, 得到高纯度的ER蛋白(图1)。

2.2 ER适配体的结合亲和力

结果见图2。线性回归法计算获得生物素化适配体与ER复合物的Kd值为(0.34±0.05) nmol/L ( $n=3$ ,  $r=0.989$ ), 最大结合力( $B_{max}$ )为769.23 fmol/(mg prot·nmol<sup>-1</sup>·L<sup>-1</sup>)。

2.3 ER适配体的特异性检测结果

结果显示(图3), 用生物素化ER适配体作为一抗进行免疫组化染色, 可见癌细胞ER表达阳性, 周围正常组织ER无表达。为验证实验结果, 所有乳腺癌标本同时使用了生物素化ER适配体和抗ER单克隆抗体进行检测, 结果表明, 两组结果具有高度一致性。其中

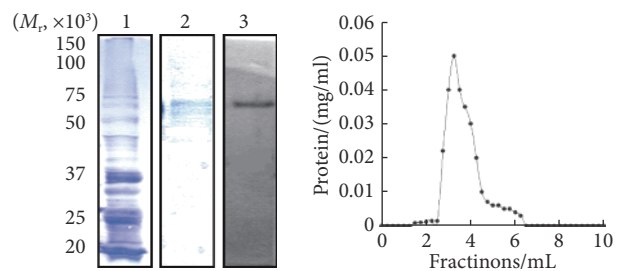


图 1 MCF-7细胞匀浆产物经抗ER抗体亲和和层析的聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Western Blot结果 ( A ) 和洗脱图谱(B)

Fig 1 SDS-PAGE separated crude cytosols, Western blot(A) and elution profile(B) of the anti-ER antibody affinity chromatography for crude cytosol preparation from cultured MCF-7 cells

1: SDS-PAGE separated crude cytosols; 2: ER protein purified by the anti-ER antibody affinity chromatography and stained with Coomassie Brilliant Blue; 3: Western blot of purified proteins with an anti-ER mAb.

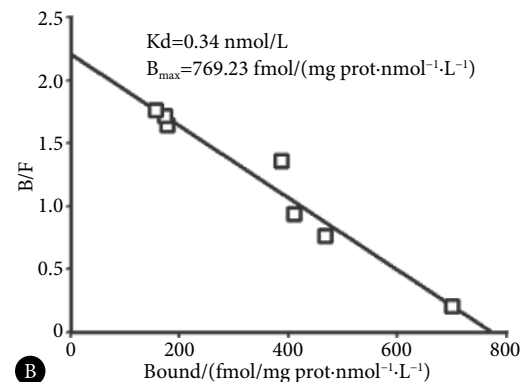


图 2 生物素化ER适配体与雌激素受体(ER)结合的饱和曲线(A)和Scatchard图 ( B )

Fig 2 Saturation curve ( A ) and Scatchard plot(B) of the binding of the biotinylated aptamer to estrogen receptors prepared from the MCF-7 cells



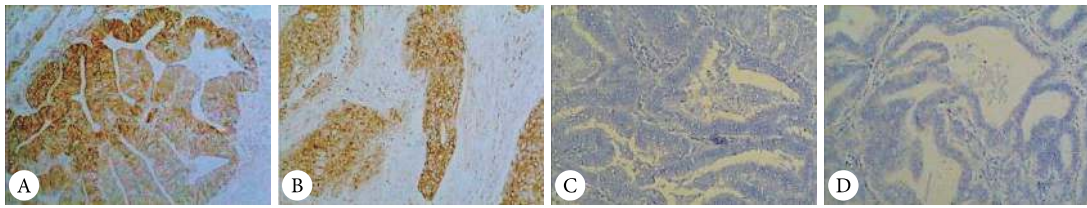


图 3 ER适配体作为一抗的免疫组化染色结果。×200

Fig 3 Immunostaining of breast and endometrial cancer tissue using the synthesized biotinylated aptamer. ×200

A: Expression of ER in sample of endometrial cancer; B: Negative control of endometrial cancer; C: Expression of ER in sample of breast cancer; D: Negative control of breast cancer

ER阳性和阴性样本的 $kappa$ 值为0.943( $n=105$ , 95%可信区间=0.879–1.006,  $P<0.05$ ); 而ER弱阳性和中度/强表达样本 $kappa$ 值为0.805( $n=75$ , 95%可信区间=0.642–0.967,  $P<0.05$ )。进一步观察发现, ER适配体和ER抗体能使乳腺癌组织同一部位出现阳性表达, 而阴性对照组均无表达(图4)。2例子宫内膜癌用生物素化ER适配体检测, 癌细胞ER表达均为阳性。

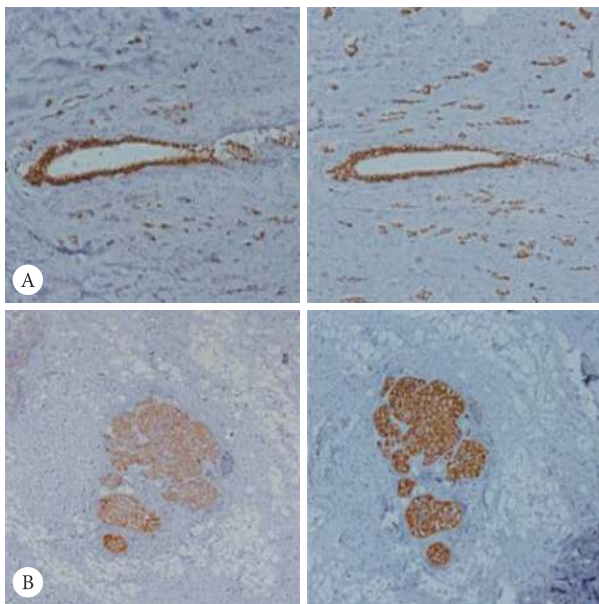


图 4 乳腺癌组织同一部位使用ER抗体(A)和ER适配体(B)均出现阳性表达。×200

Fig 4 Immunostaining of breast cancer tissue using ER (A) and the synthesized biotinylated aptamer (B) recognized the same cancer cells. ×200.

### 3 讨论

核酸适配体是一种能特异性结合到靶分子上的寡核苷酸或多肽分子的小分子配体。在生物技术检测方面, 核酸适配体可用作探针检测, 包括斑点杂交, 免疫印迹, 酶联免疫吸附实验, 酶活性检测, RNA检测以及流式细胞术<sup>[7-8]</sup>。在临床治疗方面, 核酸适配体则能用

作药物治疗的靶点<sup>[9]</sup>。

核酸适配体的合成通常是采用SELEX技术从核酸分子文库中得到寡核苷酸片段, 在适合结合的条件下, 寡核苷酸库与目标分子共同孵育, 未结合的核酸从特异性结合到靶分子的核酸中分离出来的, 此选择过程重复超过10次, 即可得到高度富集的序列。雌激素-ER复合物通过与ERE结合而调节转录, ERE是雌二醇靶基因启动子中的一段DNA短序列, 与雌激素-ER复合物具有高亲和性和碱基序列特异性<sup>[4]</sup>。因此我们假设, ER适配体可以从具有ERE相同序列的寡核苷酸池中筛选出来。为检验这一假设, 我们首先从ERE寡核苷酸池中用SELEX技术得到一些寡核苷酸片段, 然后筛选出一段与乳腺癌细胞株MCF-7(可表达ER)具有高亲和性和特异性结合的片段。我们用此寡核苷酸片段作为一抗, 通过免疫组化技术来检测ER的表达, 判断其能否作为ER适配体。结果显示, 合成的ER适配体在体外DNA-蛋白结合中具有类似于ER与雌二醇的高亲和性, 所得Kd值与之前报道的MCF-7细胞中雌二醇和ER的结合值[(0.35±0.05) nmol/L]吻合良好<sup>[10]</sup>。由于合成的ER适配体与ER抗体一样, 都能在ER阳性的乳腺癌组织中出现特异性表达, 证实了ER适配体可作为免疫组织化学法检测乳腺癌组织中ER表达的探针。PU等<sup>[11]</sup>报道了一种合成的EpCAM适配体探针用于冰冻和石蜡包埋组织的免疫组化染色, 而我们的研究证明ER适配体与抗ER单克隆抗体一样, 在识别乳腺癌细胞方面具有相同的亲和力和特异性, 因此核酸适配体在病理学上具有潜在的临床应用价值。

与抗体相比, 核酸适配体具有很多的优点, 因为适配体是合成的寡核苷酸, 因此生产成本很低, 而且易于储存, 并且在治疗应用上免疫原性很小。此外由于适配体分子量小, 它有可能用于评估活细胞内的目标分子, 这些优点将有力地促进适配体探针在疾病诊断中的应用。

## 参 考 文 献

- [1] KIM YY, OH SJ, CHUN YS, *et al.* Gene expression assay and Watson for Oncology for optimization of treatment in ER-positive, HER2-negative breast cancer. *PLoS One*, 2018; 13(7): e0200100[2018-12-24]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200100>
- [2] SARAF N, WOODS ER, PEPPLER M, *et al.* Highly selective aptamer based organic electrochemical biosensor with pico-level detection. *Biosens Bioelectron*, 2018, 117: 40–46.
- [3] YAN AC, LEVY M. Aptamer-mediated delivery and cell-targeting aptamers: room for improvement. *Nucleic Acid Ther*, 2018, 28(3): 194–199.
- [4] YASAR P, AYAZ G, MUYAN M, *et al.* Estradiol-estrogen receptor  $\alpha$  mediates the expression of the *cxcr5* gene through the estrogen response element-dependent signaling pathway. *Sci Rep*, 2016; 6: 37808[2018-12-25]. <https://www.nature.com/articles/srep37808>.
- [5] KLINGE CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(14): 2905–2919.
- [6] ZHUO Z, YU Y, WANG M, *et al.* Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine. *Int J Mol Sci*, 2017; 18(10): E2142[2018-12-25]. <https://doi.org/10.3390/ijms18102142>.
- [7] HASANZADEH M, ZARGAMI A, BAGHBAN HN, *et al.* Aptamer-based assay for monitoring genetic disorder phenylketonuria (PKU). *Int J Biol Macromol*, 2018, 116: 735–743.
- [8] SANCHEZ MI, PENAS C, VA'ZQUEZ ME, *et al.* Metal-catalyzed uncaging of DNA-binding agents in living cells. *Chem Sci*, 2014, 5: 1901–1907.
- [9] ZHOU G, LATCHOUMANIN O, BAGDESAR M, *et al.* Aptamer-based therapeutic approaches to target cancer stem cells. *Theranostics*, 2017, 7(16): 3948–3961.
- [10] WOOGE CH, NILSSON GM, HEIERSON A, *et al.* Structural requirements for high affinity ligand binding by estrogen receptors: a comparative analysis of truncated and full length estrogen receptors expressed in bacteria, yeast, and mammalian cells. *Mol Endocrinol*, 1992, 6: 861–869.
- [11] PU Y, LIU Z, LU Y, *et al.* Using DNA aptamer probe for immunostaining of cancer frozen tissues. *Anal Chem*, 2015, 87(3): 1919–1924.

(2018-08-20收稿, 2019-01-10修回)

编辑 汤 洁