

凝集素及其应用的研究进展*

关鑫综述,梁一[△]审校(广东医学院检验医学研究所/广东省医学分子诊断重点实验室,广东东莞 523808)

【关键词】凝集素; 生物学; 凝集素应用; 糖基

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.09.048 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)09-1268-03

凝集素是 1 类具有特异性糖基结合性糖蛋白。凝集素通常带有糖识别区域(CRD)^[1],该区域氨基酸序列特性及其三维结构决定该凝集素糖结合活性^[2],不同种类凝集素对不同类型糖基化修饰有识别偏好性。

1 凝集素分类及生物活性

1888 年首次从蓖麻子中发现凝集素,目前已有几百种凝集素从植物、动物、微生物中鉴定分离。

1.1 植物凝集素 植物凝集素种类繁多。根据凝集素受体蛋白激酶(LecRKs)可将有 LecRKs 区域跨膜糖蛋白大致分为 G-、C-、L 和 LysM 等 4 种类型^[3]。基于凝集素结合区域又可将可溶性凝集素分为:苋科凝集素,其与 GalNAc 和 T 抗原 Galβ(1,3)具有较高亲和性^[4];钙网蛋白凝集素(CRT)和钙联接蛋白凝集素(CNX),其存在于真核细胞内质网上,可特异性结合葡萄糖而作分子伴侣;EUL 相关性凝集素,此类核质糖蛋白分为 S 型 EUL 蛋白和 D 型 EUL 蛋白;Jacalin 相关凝集素,是从凤梨种子中提取对半乳糖有专一性凝集素,分为半乳糖专一和甘露糖专一 2 个亚族^[5]。此外,还包括 Nictaba 相关性凝集素、Ricin-B 凝集素等家族。植物凝集素具有重要生物学功能,不仅体现在其自身生长过程中发挥作用(如营养物质储存、生物固氮、抗昆虫、抗植物病毒等)^[6],还表现在与其他物种间相互作用。有研究表明,苦荞麦凝集素(TBL)可促进人外周血树突状细胞(DCs)增殖与分化,TBL-DCs 还可产生 IL-10、IL-12 等促炎性细胞因子,增强免疫反应^[7]。Xiao 等^[8]发现楤树凝集素(ACL)能有效抑制人类肝肿瘤细胞株 Hep-3B 生长,并通过共聚焦显微镜和线粒体膜电位检测,证实 ACL 可改变细胞结构并诱导细胞凋亡。

1.2 微生物凝集素 现已发现微生物凝集素包括病毒凝集素、细菌凝集素、真菌凝集素、细胞黏真菌凝集素、原生动物凝集素等类别。微生物凝集素多分布在细胞表面,如细菌菌毛和纤毛、病毒刺突、真菌子实体、分生孢子、菌丝等,具有凝集和黏附能力^[9]。微生物凝集素可触发细胞间反应而发挥其识别作用,如猪流感病毒识别宿主主体内唾液糖化靶细胞,并黏附至细胞膜上,介导病毒与宿主细胞膜融合,使病毒基因组释放入细胞质内并复制,引起病毒感染,增强病原微生物致病力。另一些细菌凝集素可通过与吞噬细胞结合参与吞噬作用,并激活后者消化杀灭细菌代谢活动,从而清除病原菌,遏制感染灶扩散。此外,微生物凝集素不仅介导宿主组织发生病理变化,还可与宿主共生,起互利作用。

1.3 动物凝集素 动物凝集素依据蛋白 1 级序列和三维结构可分为 C 型凝集素、P 型凝集素、五聚体凝集素、乳糖凝集素(S

型凝集素)、I 型凝集素等 5 类。动物凝集素参与众多重要生物进程,如蛋白折叠、细胞迁移、细胞内和细胞间信号转导作用(如选择素可介导循环白细胞向病理内皮组织迁移,唾液黏附素通过与白细胞表面糖蛋白受体结合,调节白细胞信号转导)^[10]。甘露糖凝集素和树突状细胞相关性 C 型植物血凝素 1 可分别与甘露糖、β-葡聚糖配体结合,识别外源物质等^[11]。动物凝集素中半乳凝集素家族因其重要作用成为研究热点,一方面,其与微生物病原体作用可促进树突状细胞成熟与迁移,提高细胞因子产生,诱导细胞间介质释放(如组胺),实现固有免疫和特异性免疫调节^[12];另一方面,又可增强病原菌感染反应,参与肿瘤免疫逃逸等负向活动^[13]。

2 凝集素在糖生物学中的应用

糖基-凝集素(糖基-抗体)相互作用特性可参与糖基鉴定,包括细胞血型分型、细胞种类分选、细菌亚型鉴定、细胞成熟伴有糖基化改变测定、凝集素细胞表面标记、凝集素组织化学染色、凝集素磁珠分选、凝集素微阵列、凝集素-ELISA、凝集素亲和层析等。凝集素和抗体在应用上各有所长,但比较而言凝集素更具有价格低廉、易获得、对某些糖基更专一亲和及深入分析等特性(如分类 N-、O-糖基,鉴定 α2-6 链接唾液酸化、α1-2 链接岩藻糖基化等)。因此,其在糖领域研究前景不可小觑。

2.1 检测细胞表面标志物 研究表明,细胞(包括免疫细胞、肿瘤细胞等)在分化发育过程中改变表面糖基化,带有荧光标记凝集素,可低水平高效与细胞表面糖蛋白结合,因此,应用凝集素通过组织化学结合流式细胞仪研究细胞表面糖基水平,是免疫细胞表面标志物早期鉴定重要手段之一。如 C 型凝集素血清甘露糖结合蛋白(S-MBP)被发现可结合未成熟 CD4⁺CD8⁺CD3^{low} 胸腺细胞,经鉴定其配体是 CD45RO,表明 CD45 糖基异构体是胸腺细胞成熟发育重要标志物。

此外,凝集素在描述较难获得细胞群体表面糖基化(例如干细胞)研究中应用广泛。无论胚胎干细胞还是肿瘤干细胞,分化发育过程中,糖基化出现改变,通常使用 1 组特异性识别不同糖基凝集素来研究其糖基化。例如恶性胶质瘤(GBM)肿瘤干细胞研究中,使用 20 种凝集素鉴定分化过程中糖基化改变,发现 N-乙酰半乳糖胺和 N-乙酰葡萄糖胺在 GBM 干细胞表面持续稳定表达,暗示这 2 种糖基可作为鉴定 GBM 干细胞亚群标志物^[14]。

2.2 凝集素的组织化学染色 标记凝集素结合组织化学方法,常被用于研究糖蛋白在组织空间不同位置、不同水平及细胞内外分布。在对肿瘤患者诊断及预后,检测肿瘤组织异常糖基化意义重大。Liang 等^[15]利用茶树菇凝集素(AAL)与磺酸

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81102850)。

[△] 通讯作者,E-mail:149156715@qq.com。

化和唾液酸化 TF 双糖高度亲和性,发现结肠肿瘤组织与 AAL 特意性结合活性高于健康组织,且该糖基表达与结肠肿瘤患者生存率呈负相关关系。因此,可应用 AAL 检测结肠肿瘤组织该糖基化表达情况,有助于结肠肿瘤预后评估。

另外,辣根过氧化物酶耦联凝集素还被用于检测肺和脑组织中感染曲霉菌细胞壁糖蛋白组分,分析种内种间突变株糖基化,发现凝集素 WGA 和 ConA 可标记菌丝和孢子等真菌结构^[16]。

2.3 凝集素芯片检测糖基阵列 凝集素芯片是新近出现 1 种研究糖基方法。其最大特点是能快速、高通量鉴别糖基表型,且无需糖基释放,适用不同来源样本,如组织、细胞、体液及生物合成糖基等。凝集素芯片作为生物标志物,可检测并筛选出病理状态异常改变糖基,用于对肿瘤病变糖基异常改变监测、蛋白糖基化检测、活细胞表面糖谱分析等。Yasuda 等^[17]将 16 种副干酪乳杆菌(LP)与凝集素芯片在液相中孵育,并用消逝场荧光扫描仪检测其结合信号,发现几乎每株 LP 糖结合谱系都存在差异。由此证明,凝集素芯片可作为检测细菌表面“糖指纹”方法,区别具有细微差异细菌菌株,对鉴别菌株有重要意义。另外,有学者构建包含 17 种凝集素芯片,用于分析糖尿病肾病患者不同阶段尿液样本,发现在肾衰期患者尿液样本中,某些糖蛋白与 3 种识别 Siaalpha2-6 半乳糖胺/葡萄糖胺凝集素(SNA、SSA、TJA-1)结合信号较强,联合质谱鉴定出该糖蛋白为胎球蛋白 A。因此,糖尿病肾病患者尿液中胎球蛋白 A 可作为候选生物标志物来预测病情发展与转归。

2.4 凝集素亲和层析柱富集目的糖蛋白 凝集素亲和层析利用凝集素结合糖基特点,对特定糖蛋白进行富集。其中串联凝集素亲和层析柱,可大幅度提高糖基分选敏感性并满足微量低丰度蛋白富集。凝集素亲和层析常与质谱联合应用,对凝集素富集目的糖蛋白进一步高通量鉴定。该方法已广泛应用于不同疾病发展过程中差异表达糖蛋白,特别是对肿瘤生物标志物筛选的研究中。通过该方法,已从肝肿瘤、乳腺肿瘤、结肠肿瘤、肺肿瘤等肿瘤疾病中鉴定到大量极具潜力生物标志物^[18-25],包括:galectin-1、ErbB-2、ZEB1、C6orf106、MicroRNA-21、RAI3、ACTN4、GM2AP 等糖蛋白标志物。

2.5 凝集素介导药物靶向治疗 多数细胞膜表面蛋白和脂类都有糖基化修饰,不同细胞表达不同糖基阵列,其中某些疾病(如肿瘤)病变细胞常表达与健康细胞不同糖基阵列,而凝集素可特异性识别病变相应糖基序列。因此,凝集素可作为载体靶向运输药物到病变组织和细胞。这种利用凝集素-糖基即受体-介导生物黏附作用,可激发滤泡内化和上皮细胞极化而发挥生物效应。有学者发现,放射性标记番茄凝集素(可特异结合 N-乙酰葡萄糖胺及其衍生物)可与小鼠小肠黏膜刷状缘上糖蛋白高度结合,且对肠内消化酶有耐受作用。利用此特性,以番茄凝集素耦联药物,靶向治疗消化道疾病方法引起研究人员关注。有学者利用化学方法使 5-氟尿嘧啶与花生凝集(PNA)形成复合物 5-Fu-PNA,发现,由于 PNA 与半乳糖结合特性,5-Fu-PNA 对结肠肿瘤细胞株毒性高于健康肝细胞。因此,5-Fu-PNA 可作为结肠肿瘤靶向治疗有效药物^[26]。

3 小 结

凝集素广泛存在自然界中,种类繁多。由于其特异性糖结合活性,可作为糖基研究重要工具。随着科学研究技术日新月异,凝集素研究重点由此前的基本分类及一般生物性质转变至基础研究与临床试验应用。研究表明,凝集素除具有多种生物活性,还可特异性结合细胞表面糖基,进行细胞分选,如凝集素

芯片和凝集素亲和层析筛选差异糖蛋白、凝集素介导药物靶向治疗等。虽然凝集素有亲和性和专一性不及抗体等固有问题,但也有自身优势。随着越来越多亲和力及专一性更强凝集素鉴定分离及对现有凝集素改造,凝集素将拥有广泛应用,为生物研究做出独特贡献。

参考文献

- [1] Jégouzo SAF, Feinberg H, Dungarwalla T, et al. A novel mechanism for binding of galactose-terminated glycans by the C-type carbohydrate-recognition domain in blood dendritic cell antigen 2[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(27):16759-16771.
- [2] Li H, Zhang H, Jiang S, et al. A single-CRD C-type lectin from oyster crassostrea gigas mediates immune recognition and pathogen elimination with a potential role in the activation of complement system[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2015, 44(2):566-575.
- [3] Singh P, Zimmerli L. Lectin receptor kinases in plant innate immunity[J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4: 124-128.
- [4] Ielasi FS, Verhaeghe T, Desmet T, et al. Engineering the carbohydrate-binding site of epa1p from candida glabrata: generation of adhesin mutants with different carbohydrate specificity[J]. Glycobiology, 2014, 24(12):1312-1322.
- [5] Kanagawa M, Liu Y, Hanashima S, et al. Structural basis for multiple sugar recognition of jacalin-related human ZG16p lectin[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(24):16954-16965.
- [6] Muthamilarasan M, Prasad M. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism[J]. Journal of Biosciences, 2013, 38(2):433-449.
- [7] Bai CZ, Ji HJ, Feng ML, et al. Stimulation of dendritic cell maturation and induction of apoptosis in lymphoma cells by a stable lectin from buckwheat seeds[J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(1):2162-2175.
- [8] Xiao X, He H, Ding X, et al. Purification and cloning of lectin that induce cell apoptosis from allium chinense[J]. Phytomedicine, 2015, 22(2):238-244.
- [9] Hansen RR, Shubert KR, Morrell-Falvey JL, et al. Microstructured block copolymer surfaces for control of microbe adhesion and aggregation[J]. Biosensors, 2014, 4(1):63-75.
- [10] Telen MJ. Cellular adhesion and the endothelium; E-selectin, L-selectin, and PAN-selectin inhibitors[J]. Hematology/Oncology Clinics of North America, 2014, 28(2):341-354.
- [11] Degn SE, Thiel S. Humoral pattern recognition and the complement system[J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2013, 78(2):181-193.
- [12] Pena C, Mirandola L, Figueroa JA, et al. Galectins as therapeutic targets for hematological malignancies: a hopeful sweetness[J]. Annals of Translational Medicine, 2014, 2(9):87-89.
- [13] Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, Compagno D, et al. Study

of galectins in tumor immunity; strategies and methods [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1207: 249-268.

[14] Tucker-Burden C, Chappa P, Krishnamoorthy M, et al. Lectins identify glycan biomarkers on glioblastoma-derived cancer stem cells[J]. *Stem Cells and Development*, 2012, 21(13): 2374-2386.

[15] Liang Y, Chen H, Zhang HB, et al. Lectin from agrocybe aegerita as a glycophenotype probe for evaluation of progression and survival in colorectal cancer[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, 15(14): 5601-5605.

[16] Leal AF, Lopes NE, Clark AT, et al. Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of aspergillus species in brain and lung tissues using lectin histochemistry[J]. *Medical Mycology*, 2012, 50(7): 756-759.

[17] Yasuda E, Sako T, Tateno H, et al. Application of lectin microarray to bacteria including lactobacillus casei/paracasei strains [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1200: 295-311.

[18] Yeh CC, Hsu CH, Shao YY, et al. Integrated stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) and isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) quantitative proteomic analysis identifies galectin-1 as a potential biomarker for predicting sorafenib resistance in liver cancer [J]. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2015, 14(6): 1527-1545.

[19] Costantini S, Capone F, Maio P, et al. Cancer biomarker profiling in patients with chronic hepatitis C virus, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. *Oncology reports*, 2013, 29(6): 2163-2168.

[20] Jang MH, Kim HJ, Kim EJ, et al. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related markers in triple-negative breast cancer; ZEB1 as a potential biomarker for poor clinical outcome [J]. *Human Pathology*, 2015, 46(9): 1267-1274.

[21] Jiang G, Zhang X, Zhang Y, et al. A novel biomarker C6orf106 promotes the malignant progression of breast cancer [J]. *Tumour Biology*, 2015, 36(10): 7881-7889.

[22] Li T, Leong MH, Harms B, et al. MicroRNA-21 as a potential colon and rectal cancer biomarker [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2013, 19(34): 5615-5621.

[23] Zougman A, Hutchins GG, Cairns DA, et al. Retinoic acid-induced protein 3: identification and characterisation of a novel prognostic colon cancer biomarker [J]. *European Journal of Cancer*, 2013, 49(2): 531-539.

[24] Wang MC, Chang YH, Wu CC, et al. Alpha-actinin 4 is associated with cancer cell motility and is a potential biomarker in non-small cell lung cancer [J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2015, 10(2): 286-301.

[25] Potprommanee L, Ma HT, Shank L, et al. GM2-activator protein; a new biomarker for lung cancer [J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2015, 10(1): 102-109.

[26] Cai Q, Zhang ZR. Lectin-mediated cytotoxicity and specificity of 5-fluorouracil conjugated with peanut agglutinin (5-Fu-PNA) in vitro [J]. *Journal of Drug Targeting*, 2005, 13(4): 251-257.

(收稿日期: 2015-10-13 修回日期: 2015-12-20)

• 综 述 •

miRNAs 表达谱在肺肿瘤中的临床应用*

李 静, 张艳亮 综述, 段 勇[△]审校(昆明医科大学第一附属医院医学检验科/云南省实验诊断研究所 650032)

【关键词】 miRNAs; 肺肿瘤; 肿瘤
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 09. 049 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)09-1270-04

miRNAs 是一类长约 22 个核苷酸的内源性非编码、单链小分子 RNA, 主要通过与靶 mRNA 的 3'-UTR 互补结合, 导致靶 mRNA 降解或抑制翻译, 在转录后水平上调控靶基因表达^[1]。近年来有关 miRNAs 与肺癌的报道越来越多, 并成为当前研究的一个热点。大量的研究表明 miRNAs 在人类肿瘤的发生发展中发挥了重要的作用, 作为潜在的生物标志物, 具有很好的临床应用前景。

1 miRNAs 的研究背景

肺肿瘤又称原发性支气管肺肿瘤, 是起源于支气管黏膜或腺体的恶性肿瘤, 发病率为肿瘤首位。据世界卫生组织统计, 2008 年全球新发肺肿瘤约 161 万例, 死亡约 138 万例, 分别占

当年全部恶性肿瘤发病和病死人群的 12.7% 和 18.2%, 均居首位。我国是世界上肺肿瘤患者最多的国家^[2]。尽管肺肿瘤治疗手段已有巨大改善, 但肺肿瘤患者预后仍不理想, 其 5 年存活率仅略高于 15%^[3]。为寻求早期诊断、治疗及预防等方面突破, 迫切需要发掘有助于肺肿瘤诊断和治疗新型分子标志物。

miRNAs 是一类长约 22 个核苷酸的内源性非编码、单链小分子 RNA, 主要通过与靶 mRNA 的 3'-UTR 互补结合, 导致靶 mRNA 降解或抑制翻译, 在转录后水平上调控靶基因表达。miRNAs 几乎与所有细胞生理过程有关, 并与主要生物反应密切相关, 如细胞增殖、凋亡、发育和新陈代谢等。miRNAs

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81160292)。
[△] 通讯作者, E-mail: duanyong7@139.com。