

· 基础研究 ·

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.03.007

膜联蛋白 A7 低表达对胃癌 MGC-803 细胞增殖和凋亡的影响

田焕娜, 梁秀军, 王小杰, 陈龙, 李欣(承德医学院基础医学研究所, 河北承德 067000)

[摘要] **目的:** 探讨 RNA 干扰技术靶向沉默膜联蛋白 A7(annexin A7, ANXA7)的表达对人胃癌 MGC-803 细胞增殖和凋亡的影响。**方法:** 实验分为 3 组,以靶向 ANXA7 的 siRNA 转染 MGC-803 细胞为 siRNA 干扰组,另设阴性 siRNA 对照和空白对照组。Western blotting 检测转染后 MGC-803 细胞中 ANXA7 蛋白的表达,应用 MTT、集落形成和流式细胞术检测 ANXA7 下调对 MGC-803 细胞增殖、凋亡的影响。**结果:** 靶向 ANXA7 的 siRNA 转染后 MGC-803 细胞中 ANXA7 的表达较阴性对照和空白对照组细胞明显降低[(21.79 ± 1.72)% vs (99.87 ± 5.13)%、(93.45 ± 4.89)%],均 $P < 0.05$ 。下调 ANXA7 明显降低 MGC-803 细胞的增殖能力[(0.97 ± 0.06) vs (1.21 ± 0.07)、(1.25 ± 0.08)],均 $P < 0.05$ 和集落形成能力[(183 ± 21) vs (363 ± 35)、(348 ± 27)个],均 $P < 0.05$],细胞凋亡率无显著变化($P > 0.05$)。**结论:** ANXA7 低表达可抑制胃癌细胞 MGC-803 增殖,而对细胞凋亡无明显影响。

[关键词] 胃癌;MGC-803 细胞;膜联蛋白 7;增殖;凋亡

[中图分类号] R735.2; R730.54; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)03-0322-04

Effect of annexinA7 knockdown on the proliferation and apoptosis of stomach carcinoma MGC-803 cells

Tian Huanna, Liang Xiujun, Wang Xiaojie, Chen Long, Li Xin(Basic Medical Institute, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of ANXA7 on the proliferation and apoptosis of human stomach carcinoma MGC-803 cells by downregulating ANXA7 expression using RNA interference technique. **Methods:** The MGC-803 cells were transfected with lipofectamineTM2000 alone (blank control), scrambled siRNA (negative control), and siRNA targeted ANXA7 (experiment group). After 48 hours, ANXA7 expression was examined by immunoblotting. The proliferation and growth of transected cells were assessed by MTT and colony formation assays. Apoptosis of the cells was analyzed by flow cytometry. **Results:** The expression of ANXA7 was significantly decreased in cells transfected with ANXA7 siRNA compared with these in the two controls [(21.79 ± 1.72)% vs (99.87 ± 5.13)% and (93.45 ± 4.89)%], $P < 0.05$. When ANXA7 expression was decreased, the proliferation and colony formation abilities of MGC-803 cells were markedly inhibited [(0.97 ± 0.06) vs (1.21 ± 0.07) and (1.25 ± 0.08)], $P < 0.05$; and (183 ± 21) vs (363 ± 35) and (348 ± 27), $P < 0.05$], whereas the apoptosis of the cells was not affected statistically [$P > 0.05$]. **Conclusion:** ANXA7 regulates the proliferation and colony formation of MGC-803 cells, and appears not involved in their apoptosis.

[Keywords] stomach carcinoma; MGC-803 cell; annexin A7; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(3): 322-325]

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤之一。在临床上,即使是根治性切除术,胃癌 5 年内复发率仍高达 60% ~ 70%,其转移复发已成为提高患者生存率的主要障碍^[1]。目前研究^[2]已发现众多与胃癌发生、发展密切相关的基因,膜联蛋白 A7(annexin A7, ANXA7)基因与胃癌关系密切。课题组前期检测了 ANXA7 在胃癌组织和正常胃组织中的表达,发现 ANXA7 在胃癌组织蛋白和 mRNA 水平的表达均显

著增高,ANXA7 在胃癌细胞中定位于细胞质^[3]。为

[基金项目] 河北省高校省级重点学科资助项目[No. 2013(4)号]。Project supported by the Key Subjects in University of Hebei Province [No. 2013-4]

[作者简介] 田焕娜(1985-),女,河北省保定市人,硕士,实习研究员,主要从事细胞生物学研究, E-mail: tianhuanna@163.com

[通信作者] 李欣(Li Xin, corresponding author), E-mail: cd-lixin@163.com

了进一步确定其在胃癌中的作用,本研究利用 siRNA 干扰沉默 ANXA7 的表达,观察其对胃癌 MGC-803 细胞增殖和凋亡的影响,为后续探究 ANXA7 在胃癌演化过程中的作用机制以及基因治疗奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人胃癌 MGC-803 细胞株购自上海中科院细胞库,常规培养。Lipofectamine™2000 转染试剂盒、靶向 ANXA7 的 siRNA、鼠抗人和兔抗人第二抗体均为美国 Invitrogen 公司产品,ANXA7 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司,细胞培养基(dulbecco's modified eagle medium,DMEM)为美国 GIBCO 公司产品,Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自联科生物公司,CO₂ 培养箱(HERAcell 150)为德国贺利公司产品,流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 siRNA 转染 MGC-803 细胞

MGC-803 细胞培养于 60 mm 细胞培养板中,转染前一天将细胞按 2×10^5 /孔种植于 6 孔板中,使细胞融合度在 24 h 内达到 40%~60%。实验分 3 组:以靶向 ANXA7 的 siRNA 转染 MGC-803 细胞为 siRNA 干扰组、以转染阴性 siRNA 的细胞为阴性对照组,空白对照组不作处理。按照脂质体 Lipofectamine™2000 试剂说明书,按 siRNA Oligo 20 pmol/孔、脂质体 5 μ l/孔,分别将 siRNA Oligo 和脂质体加入无抗生素、无血清的 DMEM 培养液 250 μ l 中混匀,静置 5 min。然后将两液混合,室温放置 20 min,然后将混悬液逐滴加入培养板,轻轻混匀,置于培养箱。转染后 6 h 更换含血清培养基。

1.3 Western blotting 检测 siRNA 转染后 MGC-803 细胞 ANXA7 蛋白的表达

细胞转染后 48 h, RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白质变性后经 12% SDS-PAGE,每泳道 30 μ g。电泳后湿法转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉/TBST 溶液封闭 2 h 后,将膜浸入 1:1 000 稀释的 ANXA7 鼠抗人单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜;加入羊抗鼠二抗 1:1 000 稀释,室温孵育 2 h;使用 ECL 化学发光法检测目的蛋白条带。用 Quantity One 软件分析图像,以目的蛋白条带的灰度值与内参 β -actin 蛋白条带的 IOD 值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。实验重复 3 次。

1.4 MTT 法检测 ANXA7 低表达对 MGC-803 细胞增殖的影响

细胞转染后 48 h,调整细胞密度为 5×10^5 /ml,

接种于 96 孔板,每 24 h 检测一次。检测前于每孔加入 20 μ l (5 mg/ml)的 MTT 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,弃孔内培养液后,加入 150 μ l DMSO 溶解结晶物,将培养板置于微孔板振荡器上震荡 10 min,用酶标仪于波长 490 nm 处测 D 值,每次设 6 个重复孔,最后取其平均值。实验重复 3 次。按照 D490 值大小绘制细胞增殖曲线。

1.5 细胞集落形成实验观察 ANXA7 低表达对 MGC-803 细胞集落形成的影响

胰酶消化处于生长对数期的各组细胞,调整细胞密度为 1×10^4 /ml,取 100 μ l 接种于 6 孔板中(1 000 个细胞/孔),加入 2 ml DMEM 培养液,置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 孵箱培养;培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养,弃去培养液,用 PBS 小心漂洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,姬姆萨染液染色 10 min,然后流水缓慢洗去染色液,空气干燥;肉眼计数细胞克隆数或者倒置显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数,统计分析并拍照。每种细胞设 3 个平行对照孔,实验重复 3 次。

1.6 流式细胞术检测 siRNA 转染后 ANXA7 低表达对 MGC-803 细胞凋亡的影响

细胞转染 48 h 后,收集各组细胞,预冷的 PBS 轻轻洗涤 3 次,将细胞重悬于 1 ml 预冷的结合缓冲液中,调整细胞密度至 1×10^6 /ml。取 500 μ l 细胞悬液于流式管中,加入 5 μ l Annexin V-FITC、10 μ l 碘化丙啶(PI)染液,室温下避光孵育 5 min。流式细胞术检测细胞凋亡。实验重复 3 次。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA 转染后 MGC-803 细胞中 ANXA7 蛋白低表达

Western blotting 检测结果(图 1)显示,与阴性和空白对照组相比,siRNA 干扰组 ANXA7 蛋白表达明显下降[(21.79 $\pm$ 1.72)% vs (99.87 $\pm$ 5.13)%、(93.45 $\pm$ 4.89)% , $P < 0.05$],结果表明 siRNA 能有效地抑制 ANXA7 蛋白的表达。

2.2 ANXA7 蛋白的低表达显著抑制 MGC-803 细胞的增殖

MTT 法第 4 天检测结果(图 2),显示,与阴性和空白对照组相比,siRNA 干扰组细胞的增殖明显被抑制[(0.97 $\pm$ 0.06) vs (1.21 $\pm$ 0.07)、(1.25 $\pm$

0.08), $P < 0.05$]; 而阴性对照和空白对照组则无显著差异[(1.21 ± 0.07), (1.25 ± 0.08), $P > 0.05$]。结果说明,沉默 ANXA7 基因能够抑制胃癌 MGC-803 细胞的增殖。

2.3 ANXA7 低表达显著抑制 MGC-803 细胞集落形成能力

细胞集落形成实验(图 3)显示,与对阴性和空白对照组相比,siRNA 干扰组细胞集落数明显减少[(183 ± 21) vs (363 ± 35), (348 ± 27) 个, $P < 0.05$],集落形成率低且体积较小,说明 ANXA7 低表达的 MGC-803 细胞增殖能力受到抑制、克隆形成能力下降。

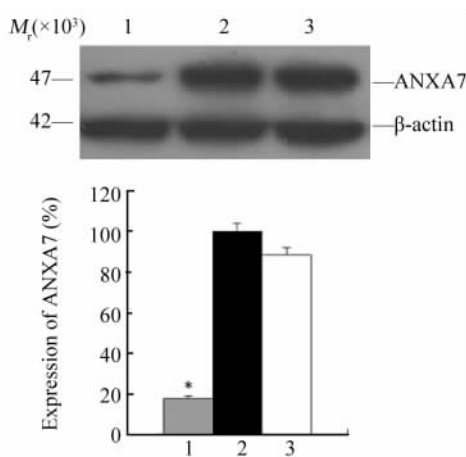


图 1 Western blotting 检测 ANXA7 蛋白的表达
Fig. 1 Expression of ANXA7 by Western blotting

1: siRNA interference; 2: Negative Ctrl; 3: Blank Ctrl

* $P < 0.05$ vs negative or blank Ctrl group

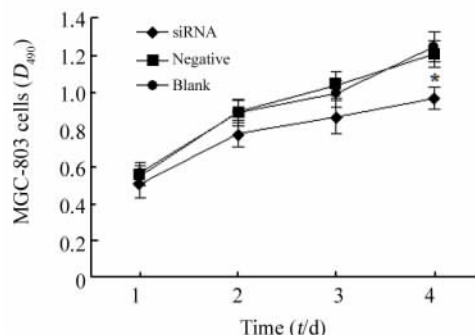


图 2 ANXA7 低表达抑制 MGC-803 细胞的增殖

Fig. 2 Suppression of ANXA7 inhibited proliferation of MGC-803 cells

* $P < 0.05$ vs negative or blank control group

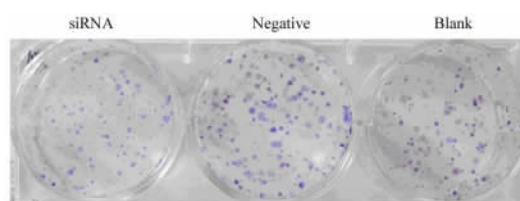


图 3 ANXA7 低表达对 MGC-803 细胞集落形成的影响

Fig. 3 Effect of ANXA7 on MGC-803 cells colony formation

2.4 ANXA7 低表达对 MGC-803 细胞的凋亡无显著影响

流式细胞术检测结果(图 4)显示,siRNA 转染 48 h 后,与阴性及空白对照组相比,siRNA 干扰组 MGC-803 细胞的早期凋亡率无显著差异[(0.84 ± 0.09)% vs (0.87 ± 0.07)% , (0.89 ± 0.04)% , $P > 0.05$],可见 ANXA7 低表达对 MGC-803 细胞凋亡无明显影响。

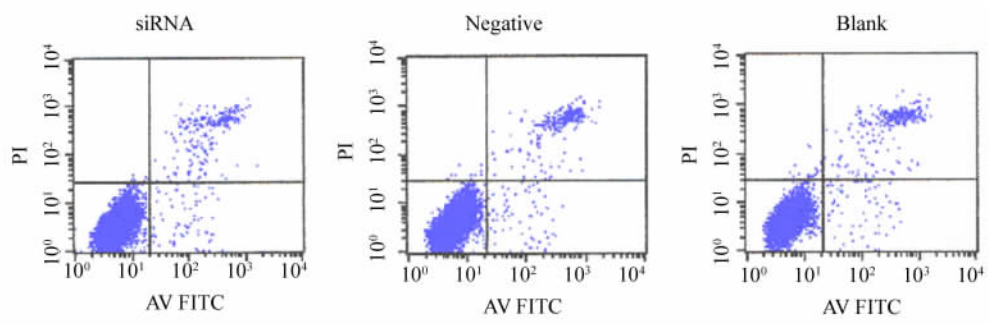


图 4 ANXA7 低表达对 MGC-803 细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of ANXA7 suppression on MGC-803 cells apoptosis

3 讨论

ANXA7 是 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合蛋白家族成员^[3],介导 Ca^{2+} /GTP 信号通路,参与膜转运及膜表

面一系列依赖于钙调蛋白的活动,在细胞信号转导、钙离子通道的形成、炎症反应、肿瘤细胞的增殖与分化、细胞骨架蛋白间的相互作用和维持细胞外基质

的完整性等方面具有重要作用^[4-7]。研究发现, ANXA7 表达异常与前列腺癌^[8]、乳腺癌^[9]、转移性黑色素瘤^[10]以及多形性胶质细胞瘤^[11]的发生、发展相关。但在不同肿瘤组织中 ANXA7 的表达并不相同,如在前列腺癌中表达显著降低,从而被认为是前列腺癌的诊断标志物;而在乳腺癌中表达却显著增高。其在不同癌组织的表达特异性也许说明其在不同肿瘤细胞中发挥不同的作用。本课题组先前通过免疫组织化学法和免疫印迹法研究^[12]发现, ANXA7 在胃癌组织中表达增高,与 Sun 等报道^[13]相同。而 ANXA7 在肿瘤细胞中发挥了怎样的作用目前尚未有定论。

有研究^[14]显示,调控 ANXA7 在肝癌细胞系 HcaF/HcaP 两株细胞的表达, ANXA7 表达降低可抑制肿瘤细胞增殖,降低肿瘤细胞的迁移能力。ANXA7 是原癌基因 Ras 调节通路的组成部分,提示其可能与细胞增生有关^[15],而它的下调也使癌基因 Galectin-3 的抗凋亡活性显著下降^[16]。本课题组在肝癌细胞 HepG2 细胞中敲低 ANXA7 表达,人肝癌细胞 HepG2 的增殖速率受到了抑制,而且细胞增殖相关核抗原 Ki67 以及周期蛋白 cyclinD1 的表达均下降^[17]。这些结果都提示, ANXA7 与肿瘤细胞的增殖有着密切的联系。但是,关于 ANXA7 在胃癌细胞发生、发展过程中究竟发挥怎样的作用目前未见报道。MGC-803 细胞是人胃低分化黏液腺癌细胞,有明显的形态特征、恶性程度大,代谢极旺盛。由于 ANXA7 在胃癌细胞中有较高丰度的表达,因此,本实验采用 RNA 干扰的方法抑制 ANXA7 在胃癌细胞 MGC-803 中的表达,以观测细胞增殖和凋亡是否发生改变,从而继续探讨其发生机制。本研究结果显示,抑制 ANXA7 的表达能够降低 MGC-803 细胞的增殖能力,但对 MGC-803 细胞凋亡无显著影响,此结果说明胃癌 MGC-803 细胞的增殖改变与 ANXA7 的表达密切相关, ANXA7 有望成为胃癌治疗的一个新靶点,但本研究也有很多缺陷,由于只采用了一种胃癌细胞系进行实验,实验结果尚不具有足够的说服力;而且只是研究了一些基本现象,其发生机制还有待于深入探讨。

[参考文献]

[1] Takeuchi H, Ueda M, Oyama T, et al. Molecular diagnosis and translymphatic chemotherapy targeting sentinel lymph nodes of patients with early gastrointestinal cancers [J]. *Digestion*, 2010, 82

(3): 187-191.

- [2] 奚剑敏, 赵强. AnnexinA7 表达与胃癌分化和转移关系研究 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2010, 9(10): 726-727.
- [3] Creutz CE, Pazoles CJ, Pollard HB. Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules [J]. *J Biol Chem*, 1978, 253(8): 2858 -2866.
- [4] Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: Linking Ca^{2+} signaling to membrane dynamics [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(6): 449-461.
- [5] Mussunoor S, Murray GI. The role of annexins in tumour development and progression [J]. *J Pathol*, 2008, 216(2): 131-140.
- [6] Hayes MJ, Longbottom RE, Evans MA, et al. Annexinopathies [J]. *Subcell Biochem*, 2007, 45: 1-28.
- [7] Fatimathas L, Moss SE. Annexins as disease modifiers [J]. *J Soc Psychol*, 2010, 25(4): 527-532.
- [8] Srivastava M, Bubendorf L, Srikantan V, et al. ANX7, a candidate tumor suppressor gene for prostate cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(8): 4575-4580.
- [9] Srivastava M, Bubendorf L, Raffeld M, et al. Prognostic impact of ANX7-GTPase in metastatic and HER2-negative breast cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(7): 2344-2350.
- [10] Kataoka TR, Ito A, Asada H, et al. Annexin VII as a novel marker for invasive phenotype of malignant melanoma [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91(1): 75-83.
- [11] Yadav AK, Renfrow JJ, Scholtens DM, et al. Monosomy of chromosome 10 associated with dysregulation of epidermal growth factor signaling in glioblastomas [J]. *JAMA*, 2009, 302(3): 276-289.
- [12] 张杨, 许倩, 陈龙, 等. 膜联蛋白 A7 在胃癌组织中的表达及意义 [J]. *承德医学院学报*, 2014, 31(3): 193-195.
- [13] Sun MZ, Liu S, Tang J, et al. Proteomics analysis of two mice hepatocarcinoma ascites syngeneic cell lines with high and low lymph node metastasis rates provide potential protein markers for tumor malignancy attributes to lymphatic metastasis [J]. *Proteomics*, 2009, 9(12): 3285-3302.
- [14] 王志强, 唐建武, 王绍青, 等. ANXA7 表达稳定下调的小鼠肝癌 Hca-F 细胞株的建立 [J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29(9): 1029-1033.
- [15] Ji H, Moritz RL, Kim YS, et al. Analysis of Ras-induced oncogenic transformation of NIH-3T3 cells using differential-display 2-DE proteomics [J]. *Electrophoresis*, 2007, 28(12): 1997-2008.
- [16] Yu F, Finley RL Jr, Raz A, et al. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome C release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(18): 15819-15827.
- [17] 王小杰, 李欣. 膜联蛋白 A7 低表达对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响 [J]. *解剖学报*, 2013, 4(5): 656-660.

[收稿日期] 2015-01-30

[修回日期] 2015-05-07

[本文编辑] 阮芳铭