

转移潜能不同人肝癌细胞系差异蛋白 Annexin1 的功能解析*

崔杰峰 刘银坤** 代智 周海君 宋海燕
张丽君 张予 孙瑞霞 陈洁 汤钊猷

(复旦大学附属中山医院肝癌研究所, 上海 200032)

摘要 解析比较蛋白质组学筛出的差异蛋白 Annexin1 的生物学功能, 证实其是否在肝癌转移复发中发挥作用. 分别以 RT-PCR、蛋白质印迹及细胞免疫化学对差异蛋白 Annexin1 在转移潜能不同人肝癌细胞系中的表达情况进行再验证, 然后构建 Annexin1 反义表达质粒, 转染高转移潜能人肝癌细胞系 MHCC97H, 通过对 MHCC97H 细胞的运动、侵袭、凋亡、生长周期、MMPs 分泌、克隆形成等系列检测, 观察目的蛋白表达降低对其生物学行为的影响, 特别是转移特性的影响. 验证结果均证实 Annexin1 在有转移潜能人肝癌细胞系 MHCC97L、MHCC97H 中呈高表达. 转染 Annexin1 反义重组表达质粒后, MHCC97H 细胞中 Annexin1 的表达被成功抑制. 依据 MHCC97H/pcDNA3.1(+) AS Annexin1, MHCC97H/ pcDNA3.1(+), MHCC97H 的检测排序, 转染反义重组质粒后的 MHCC97H 细胞穿过上室底膜的细胞数(运动实验)分别为: 11.13 ± 3.31 , 18.88 ± 2.03 , 21.86 ± 3.38 ; 穿过人工基底膜细胞数(侵袭实验)分别是: 16.43 ± 2.23 , 16.40 ± 1.57 , 16.86 ± 1.52 ; 细胞平均集落形成率(克隆形成实验)分别为: $(14.33 \pm 0.46)\%$, $(19.35 \pm 0.49)\%$, $(20.25 \pm 0.35)\%$; MHCC97H 细胞凋亡比例(FCM 分析)依次为 22.2%, 6.44%, 6.97%; 细胞周期各时相的比例依次为: G0-G1 期 79.5%/76.34%/80.5%, S 期 13.26%/14.4%/9.69%, G2-M 期 7.25%/9.26%/9.81%; 细胞培养上清 MMP9 的定量结果依次为: $26.37 \mu\text{g/L}$, $28.00 \mu\text{g/L}$, $31.90 \mu\text{g/L}$; MMP2 定量结果依次为 $29.46 \mu\text{g/L}$, $26.37 \mu\text{g/L}$, $26.53 \mu\text{g/L}$. 明胶酶谱分析细胞培养上清显示, 转染 Annexin1 反义重组表达质粒的 MHCC97H 细胞分泌的 MMP9 活性与对照比变化不明显. 综合上述结果发现, 转染 Annexin1 反义表达质粒 MHCC97H 细胞运动能力及集落形成率明显降低, 凋亡细胞的比例增加, 而侵袭潜能, 细胞周期时相, 细胞分泌 MMP2、MMP9 的量均变化不明显. 提示, 差异蛋白 Annexin1 可能通过影响细胞凋亡和细胞运动在肝癌细胞侵袭转移过程中发挥作用.

关键词 人肝癌细胞系, Annexin1, 转移

学科分类号 R735.7

差异蛋白 Annexin1 高表达于有转移潜能人肝癌细胞系这一新发现, 是运用高通量的比较蛋白质组学技术手段在转移(MHCC97H 和 MHCC97L)与不转移(Hep3B)的人肝癌细胞系中筛选出来的^[1]. Annexin1 是钙离子依赖结构相关磷脂结合蛋白, 属 Annexin 超家族的一员. 目前尚不清楚 Annexin1 的确切生理功能, 认为与膜聚集, 细胞信号传导, 凋亡, 肿瘤分化等重要生理病理过程关联^[2], 而其与肝癌转移复发的关系则未见相关报道. 本文以前期比较蛋白质组学筛查结果为基础, 对筛出的目标差异蛋白 Annexin1, 构建反义重组表达质粒(pcDNA3.1(+))AS Annexin1, 转染高转移潜能人肝癌细胞系 MHCC97H, 解析 Annexin1 表达量的改变对 MHCC97H 细胞的运动侵袭、恶性程度、生长周期、凋亡、MMPs 分泌等生物学特性的影响,

从而证实差异蛋白 Annexin1 在肝癌转移复发中是否发挥作用. 由于差异蛋白 Annexin1 是应用 2-DE 结合 ESI-MS/MS 筛出的, 受蛋白质筛选、鉴定技术体系本身的影响, 对获得的差异蛋白结果进行再验证至关重要, 也是下游蛋白功能解析的基础.

1 材料和方法

1.1 细胞培养及收集

人肝癌细胞系 Hep3B 在含 10%胎牛血清的

*国家重点基础研究发展计划(973)项目(001CB510205), 国家自然科学基金资助项目(30170416)和复旦大学青年科学基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-64041990(2501), E-mail: ykliu@zshospital.com

收稿日期: 2005-05-31, 接受日期: 2005-07-31

RPMI1640 培养液中传代培养. 人肝癌细胞系 MHCC97H、MHCC97L 用含 10% 胎牛血清高糖 DMEM 培养液进行传代培养. 细胞生长至 80% 左右密度, 胰酶消化, 收集.

1.2 试剂

10×PCR 缓冲液 (含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 10 mmol/L dNTP, 25 mmol/L MgCl_2 , 5 U/ μl Taq DNA 聚合酶, 100 bp 分子质量标准, 6×上样缓冲液, 5×M-Mul V 缓冲液, M-Mul V 逆转录酶均为 MBI Fermentas 公司产品. Oligo(dT)₁₈, 核酸酶抑制剂, 100 bp 分子质量标准购自上海申能生物博彩公司. Trizol, Lipofectamine™ 2000, pcDNA3.1(+) 质粒, 10% 的聚丙烯酰胺预制胶 (含 0.1% 明胶) 均为 Invitrogen 公司产品. Matrigel 为 BD 生物科学公司产品. Transwell 小室, Corning Costar 公司产品. 兔抗人 Annexin1 多克隆抗体为 Santa Cruz 生物技术有限公司产品. AP 标记的羊抗兔 IgG 抗体, NBT/BCIP 显色浓缩液购自北京中山生物技术有限公司. HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体购自华美生物工程公司. 1% 核固红复染液购自虹桥乐翔试剂公司. 质粒抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司. 胶回收试剂盒为 Qiagen 公司产品. 人 MMP-9、MMP-2 酶联免疫测定试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司.

1.3 RT-PCR

(1) RNA 抽提及逆转录反应: 按 Invitrogen 公司提供的操作步骤进行. (2) PCR 扩增: 50 μl 反应体系包括 2 μl Template cDNA, 5 μl 10×PCR 缓冲液 (含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0.2 mmol/L dNTP, 1 mmol/L MgCl_2 , 2U Taq 酶, 10 pmol β -actin 上游引物 (5' tgggcatgggtcagaaggat 3'), 10 pmol β -actin 下游引物 (5' aagcatttgcgttgacgat 3'), 20 pmol Annexin1 上游引物 (5' cagccaagtcttcattcacacc 3'), 20 pmol Annexin1 下游引物 (5' aactctgtgctgccatgaagg 3'), 引物由上海申友生物技术公司合成. 扩增程序: 95℃ 5 min 热启动, 后依 95℃ 1 min, 62℃ 1 min, 72℃ 1 min 扩增 35 循环, 最后 72℃ 保温 5 min.

1.4 细胞免疫化学

冷丙酮固定细胞爬片 10 min, 随后 0.3% H_2O_2 -甲醇室温作用 30 min. 1.5% 羊血清封闭 1 h 后, 加入 1:200 兔抗人 Annexin1 多克隆抗体 37℃ 反应 60 min. 接着 1:500 AP 标记的羊抗兔 IgG, 37℃ 反应 30 min, 加底物 BCIP/NBT, 避光显色 20 ~ 60 min, 镜下控制显色程度, 最后 1% 核固红复染核 1~2 min.

1.5 蛋白质印迹

每 5×10^6 细胞约加入 800 μl 细胞裂解液 (75 mmol/L Tris-HCl pH=6.8, 15% SDS, 20% 甘油, 适量溴酚蓝, 临用前加 5% 二巯基乙醇), 剧烈振荡 30 min, 100℃ 加热 3 min, 离心收集上清. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 调整样品蛋白质浓度使上样量一致, 5% 聚丙烯酰胺浓缩胶中 80 V 运行至分离胶, 后在 12% 聚丙烯酰胺分离胶中 120 V 继续电泳, 电泳结束, 湿法转移至 PVDF 膜, 电流为: 0.65 mA/ cm^2 , 1.5~2 h. 转移结束, 用 5% TBSA 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜过夜, 然后与 1:200 兔抗人 Annexin1 多克隆抗体反应 90 min, 接着与 1:50 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体反应 45 min, ECL 化学发光检测.

1.6 反义重组质粒的构建

1.6.1 反义目的条带的扩增. Annexin1 上游引物: 5' ggcctcgagattctctttagtcttgc 3', Annexin1 下游引物: 5' gcaagcttactctgcgaagttgttgata 3' (上海生工生物工程技术有限公司合成). 上、下游引物分别对应于 Annexin1 mRNA 23~789 bp 处, 在引物的上、下游引入限制性内切酶 *Xho*I 和 *Hind*III 的识别位点及保护碱基. RNA 抽提与逆转录步骤同前. 50 μl 反应体系包括: 2 μl Template cDNA, 0.2 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 20 pmol Primer A, 20 pmol Primer B, 1.5 U Taq, 5 μl 10×PCR 缓冲液 (含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). 95℃ 5 min 热启动, 然后 95℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min 扩增 35 循环, 最后 72℃ 保温 7 min.

1.6.2 目的片段扩增后回收纯化. 按 Qiagen 公司胶回收试剂盒操作说明进行.

1.6.3 双酶解. 20 μl Annexin1 双酶解体系包括 2 μl 10×缓冲液 R^+ , 2 U *Hind*III, 2 U *Xho*I, 0.4 μg Annexin1 PCR 产物. 20 μl pcDNA3.1(+) 双酶解体系包括 2 μl 10×缓冲液 R^+ , 7.25 U *Hind*III, 7.25 U *Xho*I, pcDNA3.1(+) 1.45 μg . 37℃ 酶解至少 6 h, 凝胶电泳割胶纯化回收.

1.6.4 连接反应. 20 μl 反应体系包括双酶解后 pcDNA3.1(+) 产物 100 ng, 目的片段双酶解产物 450 ng, 后依次加入 2 μl 10×连接缓冲液 (ligation buffer), 2 U T4 DNA 连接酶, 混匀离心, 22℃ 连接反应 1 h 后, 65℃ 灭活 10 min.

1.6.5 重组质粒的电转化、涂板、阳性菌落挑选及增菌培养. 按 40 μl 感受态细菌悬液和 20 ng DNA 混合, 混匀置于冰浴中. 将 Gene Pulser Apparatus

置于 25 μ F, Pulser Controller 置于 200 Ω , 用 0.1cm 电转杯调节 Gene Pulser Apparatus 到 1.8 kV. 将感受态细菌和 DNA 混合物加入冷的电转杯杯底, 电转杯正确置于冷的架子上, 依照上述设定给予一次电击. 电转结束立即加入 1 ml SOC^o, 并迅速且温和地将细菌重悬, 转入增菌管, 37 $^{\circ}$ C 225 r/min 振荡培养 1 h, 将细菌涂在选择性 (LBA+AMP) 培养板上培养. 挑选阳性菌落, 用酶解、测序鉴定重组质粒(测序由上海博亚生物技术有限公司协助完成).

1.7 质粒抽提

按试剂盒提供的操作步骤进行.

1.8 反义重组质粒转染

将 5×10^5 MHCC97H 细胞加入无菌 6 孔培养板中, 培养 24 h 至细胞融合率达 90% 以上, 用 LipofectamineTM 2000 分别介导空质粒、反义重组质粒转染 MHCC97H 细胞, 质粒与 Lipofectamine 按 1 μ g : 3 μ l 比例混匀形成 DNA-Lipofectamine 复合物. 如检测 MMP 的含量, 加无胎牛血清的 DMEM 2.0 ml, 培养 18~24 h 收集培养液.

1.9 转染效果的鉴定

RT-PCR 检测方法同前.

1.10 细胞侵袭实验

用 matrigel 在 transwell 上室制备人工基底膜. 转染后的 MHCC97H 细胞, 用无血清 DMEM 稀释成 1×10^6 /ml 细胞悬液, 100 μ l 细胞悬液加入 transwell 上室, 下室加 600 μ l 条件培养基, 5% CO₂ 培养箱培养 36 h. 取出 transwell 小室, 吸弃液体, 用棉签擦净基底膜胶, PBS 漂洗后甲醛固定 15 min, Giemsa 染色 30 min. 镜下计数 (平均计数 8 个视野) 并拍照.

1.11 运动实验

省略融胶、铺胶的步骤, 余同侵袭实验.

1.12 明胶酶谱实验

10%的聚丙烯酰胺预制胶 (含 0.1%明胶). 无血清细胞培养上清与 $2 \times$ 上样缓冲液 (0.125 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 20% 甘油, 4% SDS, 0.005% 溴酚蓝) 按 1:1 的比例混合后静置 10 min. 恒压 125 V 电泳, 结束后将凝胶置于 $1 \times$ 复性缓冲液 (25% Triton X-100) 室温振荡 30 min. 弃复性缓冲液, 加 $1 \times$ 显影缓冲液 (0.121% Tris 碱, 0.63% Tris-HCl 粉, 1.17% NaCl, 0.074% CaCl₂, 0.002% Brij35) 室温振荡平衡 30 min, 随后将凝胶置于新鲜的 $1 \times$ 显影缓冲液中, 37 $^{\circ}$ C 孵育反应至少 4 h. 考马斯亮蓝染液染

色 30 min. 脱色液脱色至深蓝背景中亮带出现.

1.13 MMP2、MMP9 的酶联免疫吸附实验

酶联免疫吸附实验 (ABC-ELISA) 操作步骤参照试剂盒说明书进行.

1.14 流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡

用 LipofectamineTM 2000 将 pcDNA3.1 (+) AS annexin1 转染 MHCC97H 细胞, 5% CO₂ 培养箱培养 48 h, 用胰蛋白酶将贴壁培养细胞从壁上消化下来, 收集后 PBS 洗一遍, 然后用 2 ml 柠檬酸缓冲液固定 (制成细胞悬液), 室温放置 30 min 后, 置冰箱 -20 $^{\circ}$ C 保存. 临检测前, 快速融化细胞固定悬液, 离心去上清, 加入 1 800 μ l A 液 (胰酶消化液) 充分反应, 接着加入 1 500 μ l B 液 (胰酶抑制酶液, RNase) 反应数分钟. 最后加入 1 500 μ l C 溶液 (碘化丙锭) 作用 15 min 以上. 用 200 目尼龙网过滤上机 (FACS), 作 DNA 细胞周期采样分析 (本实验由中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所 FACS 流式细胞室协助完成).

1.15 细胞克隆形成实验

收集转染后的 MHCC97H 细胞 2×10^3 种植于 6 孔培养板中, 补足 5 ml 含 10% 胎牛血清高糖 DMEM 培养液, 置 5% CO₂ 培养箱培养, 6 天后每孔弃去 2.5 ml 旧培养液, 补加 2.5 ml 新鲜培养液. 连续培养 14 天后弃培养液, 用 PBS 洗涤 2 次, 甲醛固定 10 min, Giemsa 染色 10 min, 肉眼结合镜下计数克隆数. 集落形成率 = (形成集落的数目 / 接种细胞的数目) $\times 100\%$.

1.16 统计学分析

用 SPSS11.0 统计软件包进行独立样本的 *t* 检验.

2 结 果

2.1 3 种转移潜能不同人肝癌细胞系中 Annexin1 mRNA 表达

以 β -actin (图 1 箭头 C 指示) 为控制带, 目的片段灰度与其灰度的比值进行比较, MHCC97H、MHCC97L 分别是 Hep3B 的 4.75 和 3.25 倍, Annexin1 mRNA 的表达 (图 1 箭头 A 指示) 在 Hep3B、MHCC97L、MHCC97H 3 种细胞系中依次增强.

2.2 3 种转移潜能不同人肝癌细胞系中 Annexin1 蛋白质表达

泳道 3 目的条带的灰度明显弱于泳道 1, 2 条带 (图 2). 提示 MHCC97H、MHCC97L 中

Annexin1的蛋白质表达量较 Hep3B 明显增多.

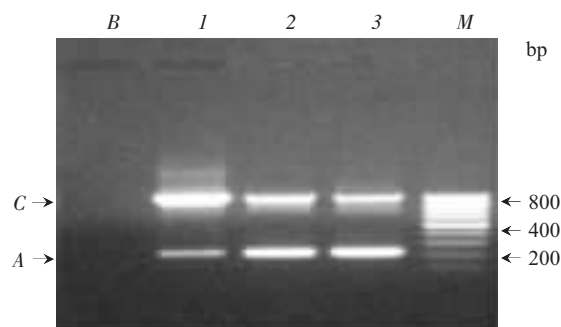


Fig. 1 The various expression of Annexin1 mRNA in HCC cell line with different metastasis potential detected by RT-PCR

1: Hep3B; 2: MHCC97L; 3: MHCC97H; M: 100 bp marker. A: Annexin1; B: Mock experiment; C: β -actin.

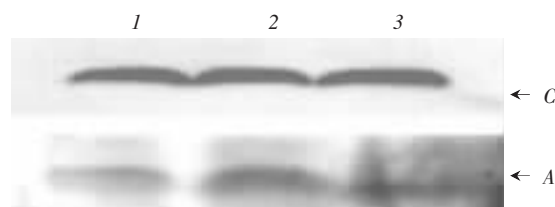


Fig. 2 The various expression of Annexin1 in HCC cell lines with different metastasis potential detected by Western blot

1: MHCC97; 2: MHCC97L; 3: Hep3B. A: Annexin1; C: β -actin.

2.3 Annexin1 在细胞水平的表达

经核固红复染后, 胞核胞浆分辨清晰. 在 MHCC97H、MHCC97L (图 3a、图 3b) 细胞的胞浆区域出现深染的蓝色, 而 Hep3B (图 3c) 细胞胞浆区域几乎无蓝色. 说明 Hep3B 中 Annexin1 含量很弱.

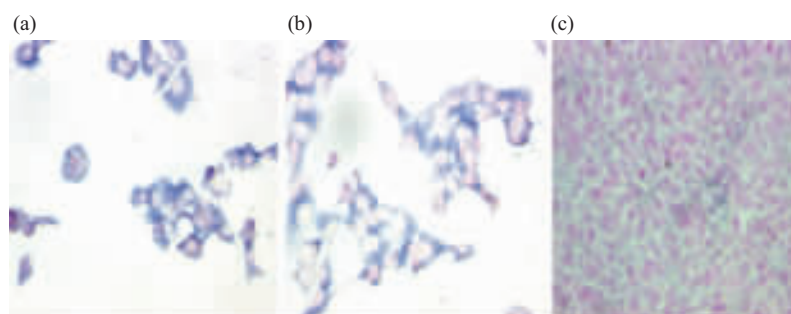


Fig. 3 The distribution expression of Annexin1 in HCC cell lines with different metastasis potential analysed by immunochemistry

(a) MHCC97H; (b) MHCC97L; (c) Hep3B. (200 $\times$).

2.4 阳性克隆菌 pcDNA3.1 (+) AS Annexin1 重组质粒酶解鉴定及测序鉴定

挑取阳性克隆菌抽提重组质粒后双酶解(*Hind* III/*Xho* I) 鉴定, 结果出现 5 326 bp 的 pcDNA3.1(+) 和 767 bp 的 Annexin1 两条目的条带(图 4), 与理论值符合. 从阳性克隆菌抽提的重组质粒进一步经测序鉴定, 所得序列与反义重组序列相符.

2.5 pcDNA3.1 (+) AS Annexin1 重组质粒转染效率的检测

图 5 显示泳道 3 目的条带 Annexin1 的灰度较泳道 1, 2 减弱. 以 β -actin 为控制带, 用目的条带灰度与 β -actin 灰度比值观察, 未转染和转染空质粒目的条带的灰度比分别是 MHCC97H/pcDNA3.1 (+) AS Annexin1 的 2.91 和 2.89 倍,

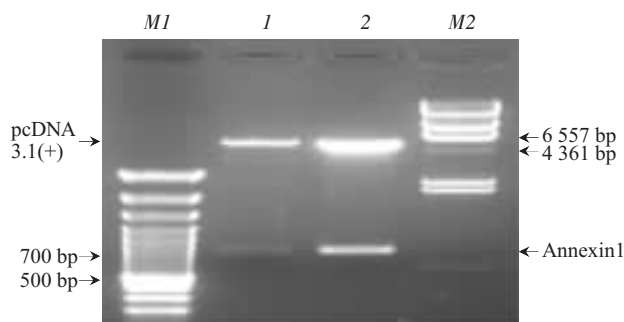


Fig. 4 Identification of positive clone bacteria with Annexin1 antisense recombinant plasmid by double enzyme digestion

M1: 100 bp marker; M2: λ DNA/*Hind* III; 1,2: pcDNA3.1 (+)AS Annexin1/*Hind* III + *Xho* I.

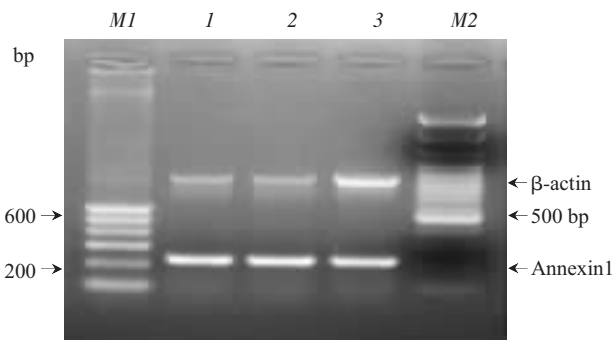


Fig. 5 Different expression of Annexin1 mRNA in MHCC97H transfected detected by RT-PCR
1: MHCC97H; 2: MHCC97H/pcDNA3.1(+); 3: MHCC97H/pcDNA3.1(+)
AS Annexin1; M1: 100 bp marker(Biolor); M2: 100 bp marker(MBI).

MHCC97H/pcDNA3.1 (+) AS Annexin1 细胞中 Annexin1 mRNA 的表达受到抑制.

2.6 细胞侵袭、运动实验

转染后的 MHCC97H 细胞培养 36 h 穿过人工基底膜的细胞数(图 6, 表 1). 转染后的 MHCC97H 细胞培养 12 h 穿过上室底膜的结果(图 6, 表 1).

2.7 细胞克隆形成实验

MHCC97H/pcDNA3.1(+)
AS Annexin1 细胞与 MHCC97H/pcDNA3.1 (+) 细胞、未转染的 MHCC97H 的平均集落形成率分别为 (14.33 ± 0.46)%, (19.35±0.49)%, (20.25±0.35)%, 转染反义重组质粒 MHCC97H 细胞集落形成率明显少于转染空质粒 MHCC97H 细胞及未转染的 MHCC97H 细胞 (*t* 检验, *P* < 0.05) (图 7).

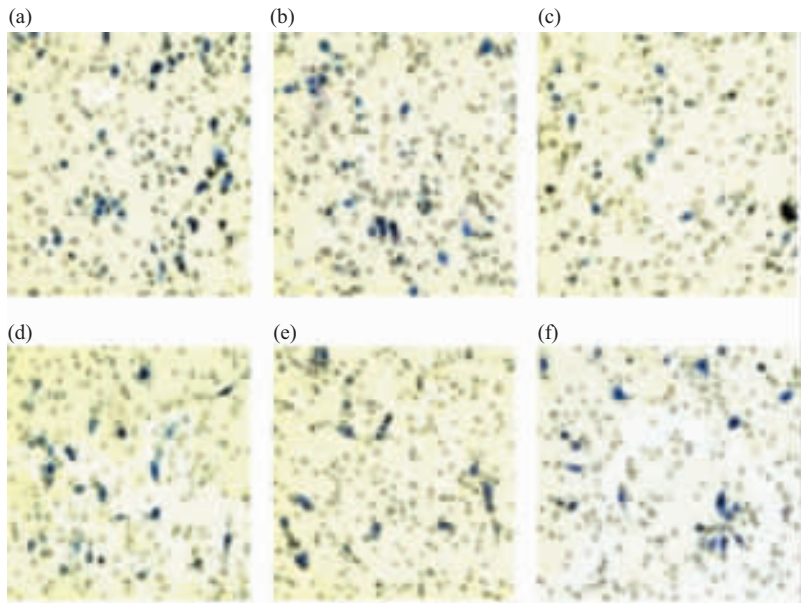


Fig. 6 Cell motility assay and cell invasion assay
(a)~(c) Cell motility assay. (a) MHCC97H. (b) MHCC97H/pcDNA3.1(+). (c) MHCC97H/pcDNA3.1(+)
AS Annexin1. (d)~(f) Cell invasion assay. (d) MHCC97H. (e)MHCC97H/pcDNA3.1(+).(f) MHCC97H/pcDNA3.1(+)
AS Annexin1. (200×).

Table 1 The average amount of invaded cells per field in cell invasion assay and motility assay (200×)

Cell transfected	Invaded cells per field in cell invasion assay	Invaded cells per field in cell motility assay
MHCC97H	16.86±1.52 ¹⁾	21.86±3.39 ⁴⁾
MHCC97H/pcDNA3.1(+)	16.40±1.57 ²⁾	18.88±2.03 ⁵⁾
MHCC97H/pcDNA3.1(+) AS Annexin1	16.43±2.23 ³⁾	11.13±3.31 ⁶⁾

Statistic analysis, ³⁾, ¹⁾, ²⁾ no significant differences in the average amount of invaded cells per field in cell invasion assay were found. (*t* test, *P* > 0.05). ⁶⁾, ⁴⁾, ⁵⁾ significant differences in the amount of invaded cells in cell motility assay were discovered (*t* test, *P* < 0.05).

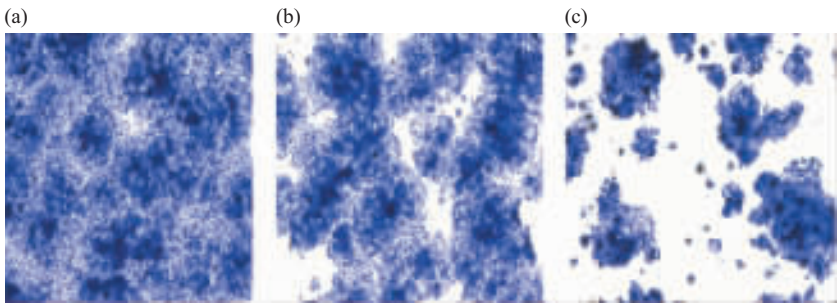


Fig. 7 Cell clone formation assay
(a) MHCC97H. (b) MHCC97H/pcDNA3.1(+). (c) MHCC97H/pcDNA3.1(+)/AS Annexin1. (50×)

2.8 转染反义重组质粒后 MHCC97H 细胞生长周期比较

FCM 分析表明，转染反义重组质粒后 MHCC97H 细胞周期各时相的比例依次为：G0-G1 期 80.5% /76.34% /79.5%，S 期 9.69% /14.4% /13.26%，G2-M 期 9.81%/9.26%/7.25%/. MHCC97H 细胞周期各时相经历瞬时转染变化不大.

2.9 转染反义重组质粒后 MHCC97H 细胞凋亡情况比较

转染反义重组质粒后 MHCC97H 细胞凋亡比例分别为 6.97% (MHCC97H)，6.44% (MHCC97H/pcDNA3.1(+))，22.2% (MHCC97H/pcDNA3.1(+)/AS Annexin1). 与未转染及转染空质粒的 MHCC97H 细胞相比，转染 pcDNA3.1 (+)AS Annexin1 的 MHCC97H 细胞凋亡数明显增加(图 8).

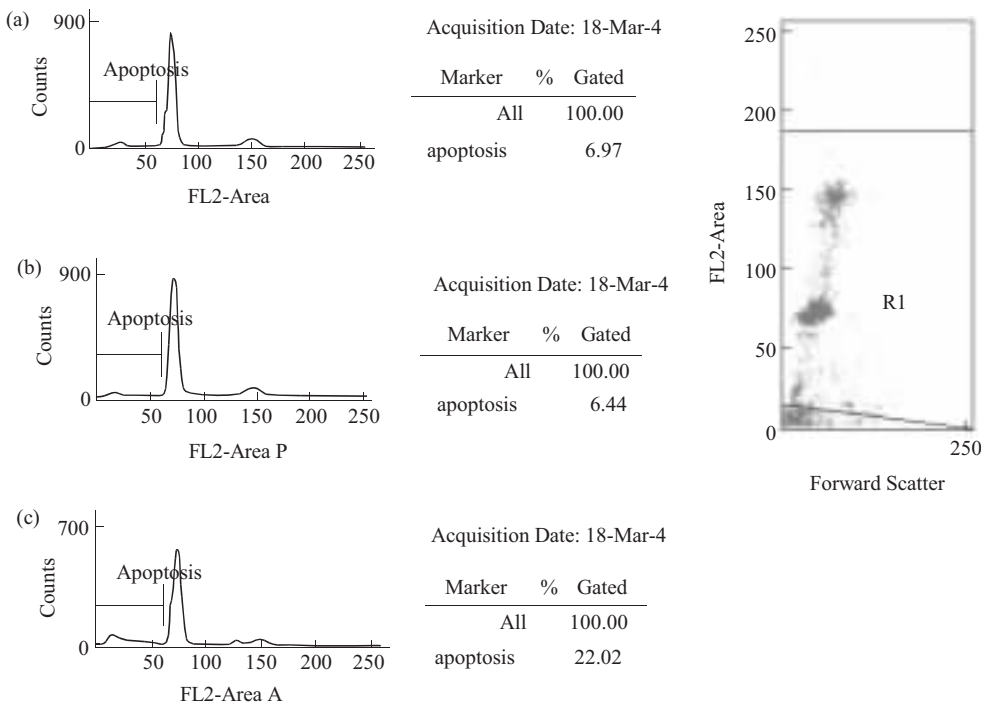


Fig. 8 The ration of apoptosis cells of MHCC97H transfected by FCM
(a) MHCC97H. (b) MHCC97H/pcDNA3.1(+). (c) MHCC97H/pcDNA3.1(+)/AS Annexin1.

2.10 MMP9、MMP2 酶联免疫吸附实验结果

酶联免疫吸附实验 (ABC-ELISA) 定量检测转

染反义重组质粒 MHCC97H 细胞的无血清培养上清液中 MMP9、MMP2 的含量如表 2.

Table 2 The concentration of MMPs secretion in culture medium of transfected MHCC97H cell lines detected by ABC-ELISA

Cell transfected	MMP9/ (μg·L ⁻¹)	MMP2/ (μg·L ⁻¹)
MHCC97H	31.90	26.53
MHCC97H/pcDNA3.1(+)	28.00	26.37
MHCC97H/pcDNA3.1(+) <i>AS Annexin1</i>	26.37	29.46

No significant changes in MMP9 and MMP2 secretion were found between MHCC97H, MHCC97H/pcDNA3.1(+) and MHCC97H/pcDNA3.1(+) *AS Annexin1*.

2.11 明胶酶谱法测定基质金属蛋白酶

明胶酶谱法检测细胞无血清培养上清中 MMP 结果如图 9, 仅在 92 ku 左右 4 条泳道均发现蓝屏背景下有一白色条带, 且泳道 3 该条带的灰度较 1、2 泳道比变化不明显. MMP2 在本实验中未被检测到.

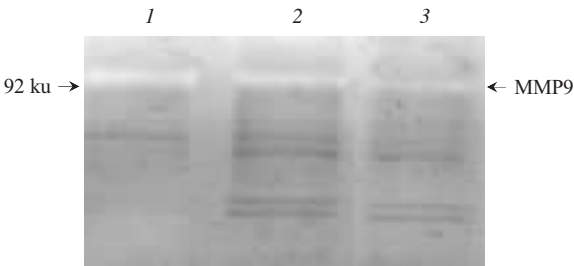


Fig. 9 MMPs in serum-free medium analysed by Gelatin zymography

1: MHCC97H; 2: MHCC97H/pcDNA3.1(+); 3: MHCC97H/pcDNA3.1(+)
AS annexin1.

3 讨 论

对比较蛋白质组学筛出的差异蛋白 Annexin1 再验证的结果 (mRNA 水平, 蛋白质水平, 细胞水平) 进行分析, 发现 Annexin1 的基因和蛋白质表达呈现一致性, 均在转移潜能高的人肝癌细胞系 (MHCC97H、MHCC97L) 上调表达, 而在不转移的 Hep3B 下调表达, 该结果与我们前期 2-DE 筛出的结果一致. Wu 等^[3]运用差异蛋白质组分析发现, Annexin1 在的头颈部肿瘤转移细胞系上调表达. Yeatman 等^[4]报道 Annexin1 在鼠淋巴瘤高转移细胞系中表达高于非转移细胞系, 而 Jiang 等^[5]对人高、低转移肺癌细胞系 PLA801D 和 PLA801C 全蛋白质组比较分析, 发现 Annexin1 在高转移潜能的肺

癌细胞系表达明显上调, 并用其他方法进一步证实了差异蛋白 Annexin1 的可信. 上述工作虽筛出差异蛋白 Annexin1, 但均未对 Annexin1 生物学功能进行分析. 本文通过构建反义 Annexin1 重组表达质粒, 转染高转移潜能人肝癌细胞系 MHCC97H, 抑制 MHCC97H 细胞中 Annexin1 蛋白的表达, 观察 Annexin1 蛋白表达降低对 MHCC97H 细胞生物学行为的影响, 尤其对转移特性的影响.

肿瘤细胞侵袭转移的重要标志之一是侵入突破基底膜, 该病理过程的发生既反映转移性肿瘤细胞本身的运动和侵袭能力强, 同时也提示细胞分泌较多的基质蛋白酶以降解基质帮助转移性肿瘤细胞扩散. 已有研究证明, 基质金属蛋白酶及其抑制剂在肿瘤细胞的侵袭转移中发挥重要作用^[6,7]. Annexin1 是 Annexins 蛋白家族的重要一员, 又称为 lipocotin I, calpactin I, 磷脂酶 A2 抑制蛋白和 p35, 分子质量为 35 ku. 虽然有报道 Annexin1 可参与细胞生长分化, 凋亡, 信号传导, 炎症, 胞膜融合, 胞吞胞吐, 应急反应, 黏附等过程, 但最主要的生物学功能仍需进一步的实验肯定. Annexin1 除能与 Ca²⁺、磷脂结合外, 结构上还与肌动蛋白结合 (依赖 Ca²⁺ 的存在), 同时与肌动结合蛋白 (profilin) 作用形成复合物影响细胞骨架的重排^[8,9]. 我们的运动试验结果显示, 转染 pcDNA3.1(+)*AS Annexin1* 表达质粒后的 MHCC97H 细胞, 穿过上室底膜的细胞数明显少于未转染及转染空质粒的 MHCC97H 细胞, 统计学分析有显著性差异 ($P < 0.05$, t 检验), 这一结果说明 Annexin1 蛋白表达的减少, 使 MHCC97H 细胞的运动能力减弱, 提示 Annexin1 蛋白可能通过影响其结构关联的细胞骨架蛋白而在细胞运动中发挥作用. 令人感兴趣的是, 转染

pcDNA3.1(+)-AS Annexin1 表达质粒的 MHCC97H 细胞穿过人工基底膜的细胞数与未转染及转染空质粒的 MHCC97H 细胞比, 变化却不明显 ($P > 0.05$, t 检验). 可能是 Annexin1 表达抑制对 MMPs 的分泌影响较弱, 而 MMPs 的分泌对 MHCC97H 细胞的侵袭转移的影响大于细胞本身的运动能力. 我们同时对影响转移潜能的另一关键因素基质金属蛋白酶的分泌情况进行定量检测, 发现 Annexin1 表达的改变对 MMP9 和 MMP2 分泌量影响均不明显, 证实了对细胞侵袭实验结果的推测. 就目前知识水平, 尚未发现 Annexin1 蛋白与基质金属蛋白酶相关性的报道.

Annexin1 是上皮生长因子受体(EGFR)激酶(酪氨酸蛋白激酶)的主要底物, 也是丝氨酸/苏氨酸激酶(如蛋白激酶 C)的主要底物^[10], Annexin1 参与细胞内信号传递的可能解释为 Annexin1 体内磷酸化后, 与含 SH2 识别结构域序列相似区域的蛋白质形成复合物级联, 影响下游分子从而传递细胞内信号^[11]. 有报道 Annexin1 在 MAPK/ERK 信号通路上游发挥作用, 主要通过影响蛋白质复合物的形成及活性实现的^[12]. Coupade 等^[13]认为, 通过 cPLA2 活性或者 EGFR 的功能调节, Annexin1 的表达和磷酸化成为肝脏再生和肿瘤发生的潜在指标. Masaki 等^[2]提出 Annexin1 在人肝癌细胞 (HCC) 恶性转化中发挥重要作用并与 HCC 的病理分级密切相关. Wu 等^[14]对 TNF 诱导 U937 白血病细胞凋亡的研究, 发现肾上腺皮质类固醇(Dex)对自发和 TNF 诱导的 cPLA2 活性均有抑制, 即抵抗 TNF 诱导的细胞凋亡, Wu 认为, Dex 对胞内 cPLA2 水平没有直接影响, 而通过使 cPLA2 降解和合成内源性 cPLA2 抑制剂 Annexin1 量的增加实现抵抗凋亡. Wu 用针对 Annexin1 的反义寡核苷酸完全取消了 Dex 对 TNF 诱导 U937 白血病细胞凋亡的抵抗. 上述研究结果证明 Annexin1 在肿瘤细胞生长与凋亡中可能发挥重要作用. 我们对转染 MHCC97H/pcDNA3.1(+)-AS Annexin1 表达质粒的 MHCC97H 细胞的生长周期、凋亡及恶性增殖情况进行观察分析, 发现转染 pcDNA3.1(+)-AS Annexin1 表达质粒的 MHCC97H 细胞 G0-G1 期, S 期, G2-M 期细胞比例与未转染及转染空质粒的 MHCC97H 细胞比, 未有明显变化, 提示 Annexin1 在 MHCC97H 细胞生长周期调节中作用不大. 而细胞凋亡的结果显示, 转染 pcDNA3.1(+)-AS Annexin1 表达质粒的 MHCC97H 细胞凋亡比例与

未转染及转染空质粒的 MHCC97H 细胞相比明显增加, 提示 Annexin1 参与肝肿瘤细胞的凋亡过程, 它的降低可减少对 cPLA2 抑制, 从而促进肿瘤细胞凋亡. 转染 pcDNA3.1(+)-AS Annexin1 的 MHCC97H 细胞集落形成率明显少于未转染和转染空质粒的 MHCC97H 细胞. 分析可能与 Annexin1 表达减少细胞凋亡增加有关.

综合上述结果分析, 显示 Annexin1 表达降低的 MHCC97H 细胞运动能力、集落形成率明显降低, 细胞凋亡的比例却增加. 侵袭潜能, 细胞周期时相, 细胞分泌 MMP2、MMP9 的量均变化不明显. 提示差异蛋白 Annexin1 可能通过影响细胞凋亡和细胞运动而在肝癌细胞侵袭转移过程中发挥作用.

参 考 文 献

- 1 Cui J F, Liu Y K, Pan B S, *et al.* Differential proteomic analysis of human hepatocellular carcinoma cell line metastasis-associated proteins. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004, **130** (10): 615-622
- 2 Masaki T, Tokuda M, Ohnishi M, *et al.* Enhanced expression of protein kinase substrate annexin in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1996, **24** (1): 72-81
- 3 Wu W G, Tang X M, Hu W, *et al.* Identification and validation of metastasis-associated protein in head and neck cancer cell line by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Clinical & Experiment Metastasis*, 2002, **19** (4): 319-326
- 4 Yeatman T J, Updyke T V, Kaetzel M A. Expression of annexins on the surfaces of non-metastatic and metastatic human and rodent tumor cells. *Clin Exp Metastasis*, 1993, **11** (1): 37-44
- 5 Jiang D F, Ying W T, Lu Y L, *et al.* Identification of metastasis-associated proteins by proteomic analysis and functional exploration of interleukin-18 in metastasis. *Proteomics*, 2003, **3** (5): 724-737
- 6 Duffy M J. Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin Cancer Res*, 1996, **2** (2): 613-618
- 7 Yamamoto H, Itoh F, Hinda Y, *et al.* Suppression of matrilysin inhibits colon cancer cell invasion *in vitro*. *Int J Cancer*, 1995, **61** (2): 218-222
- 8 宋海燕. Annexin 家族与肿瘤转移. 国外医学分子生物学分册, 2003, **25** (增刊): 111-114
- 9 Song H Y. Foreign medicine science-section of molecular biology, 2003, **25**(supplement): 111-114
- 9 刘 懿, 凌谔萍, 钟慈声. Annexin 依赖磷脂结合蛋白在细胞分泌中的作用. *生理科学进展*, 1997, **28**: 367-369
- 10 Liu Y, Ling Y P, Zong C S. *Prog Physiol Sci*, 1997, **28**: 367-369
- 10 Schlaepfer D D, Haigler H T. Expression of annexins as a function of cellular growth rate. *J Cell Biol*, 1990, **111** (1): 229-238
- 11 Croxtall J D, Choudhury Q, Flower R J. Inhibitory effect of peptides derived from the N-terminus of lipocortin 1 on arachidonic acid release and proliferation in the A549 cell line: identification of

- E-Q-E-Y-V as a crucial component. *Br J Pharmacol*, 1998, **123** (5): 975~983
- 12 Alldridge L C, Harris H L, Plevin R, *et al.* The annexin protein lipocortin 1 regulates the MAPK/ERK pathway. *J Biol Chem*, 1999, **274** (12): 37620~37628
- 13 Coupade C D, Gillet R, Bennoun M, *et al.* Annexin 1 expression and phosphorylation are upregulated during liver regeneration and transformation in antithrombin III SV40 T large antigen transgenic mice. *Hepatology*, 2000, **31** (2): 371~380
- 14 Wu Y L, Jiang X R, Lillington D M, *et al.* Upregulation of lipocortin 1 inhibits tumour necrosis factor-induced apoptosis in human leukaemic cells: a possible mechanism of resistance to immune surveillance. *Bri J Haematol*, 2000, **111** (3):807~816

Biological Function Explore of Different Protein Annexin1 Discovered From HCC Cell Lines*

CUI Jie-Feng, LIU Yin-Kun**, DAI Zhi, ZHOU Hai-Jun, SONG Hai-Yan, ZHANG Li-Jun, ZHANG Yu, SUN Rui-Xia, CHEN Jie, TANG Zhao-You

(Liver Cancer Institute Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract To elucidate biological functions of different protein Annexin1 discovered from hepatocellular carcinomamar (HCC) cell lines by comparative proteomics approach. The different expression level of Annexin1 among HCC cell lines was further validated using other approachs including RT-PCR, Western blot and cell immunochemistry. The pcDNA3.1(+) AS Annexin1 expression plasmid was constructed, and then transfected into high metastatic cell lines MHCC97H to observe the alteration of biological functions of MHCC97H (motility, invasion, extracellular matrix metalloproteinase). All data from validation tests confirmed the overexpression of Annexin1 in high metastatic HCC cell lines with the comparison of non-metastatic one. Inhibition of the expression of Annexin1 in MHCC97H was successfully detected by RT-PCR after transfected with anti-sense RNA. According to analysis sequence followed as MHCC97H/pcDNA3.1(+) AS Annexin1, MHCC97H/pcDNA3.1(+) and MHCC97H. Cell motility assay *in vitro* showed the average amount of invading cell per field were 11.13 ± 3.31 , 18.88 ± 2.03 , 21.86 ± 3.39 respectively. The average amount of invading cell per field in cell invasion assay were 16.43 ± 2.23 , 16.4 ± 1.57 , 16.86 ± 1.52 respectively. The Average clone formation ration of MHCC97H transfected was $(14.33 \pm 0.46)\%$, $(19.35 \pm 0.49)\%$, $(20.25 \pm 0.35)\%$. The amount of apoptosis cell transfected by FCM analysis was 22.2%, 6.44%, 6.97%. The number of transfected cell in each phase during cell cycles displayed G0-G1 phase 79.5%/ 76.34%/ 80.5%, S phase 13.26%/ 14.4%/9.69%, G2-M phase 7.25%/ 9.26% / 9.81%. The concentration of MMP9 in serum free culture media by quantitative assay (ABC-ELISA) were 26.37 $\mu\text{g/L}$, 28.00 $\mu\text{g/L}$, 31.90 $\mu\text{g/L}$ and MMP2 were 29.79 $\mu\text{g/L}$, 26.37 $\mu\text{g/L}$, 26.53 $\mu\text{g/L}$. The activities of MMPs in serum free culture media were detected by Gelatin zymography. No significant changes were found between target sample and control. Analysis of the results mentioned, some biological properties (including motility, clone formation potential) of MHCC97H transfected with pcDNA3.1(+) AS Annexin1 were all down-regulation, and yet the amount of apoptosis cell transfected were increased. No significant changes in cell invasion, cell cycle, MMPs were discovered. All the data suggested that Annexin1 may involved in HCC metastasis by alteration of cell apoptosis and of cell motility property.

Key words hepatocellular carcinomamar cell lines, Annexin1, metastasis

*This work was supported by grants from The National Basic Research Program of China (2001CB510205), The National Natural Science Foundation of China (30170416) and Youth Fund of Fudan University.

**Corresponding author . Tel: 86-21-64041990-2501, E-mail: ykliu@zshospital.com

Received: May 31, 2005 Accepted: July 31, 2005