基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-0984-04

特异性小干扰 RNA 沉默 Annexin Ⅱ基因表达对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 侵袭迁移力的影响

郭变琴[1],文阳安[2],陈婷梅[1]

(1. 重庆医科大学医学检验系血液学教研室、教育部重点实验室、重庆市重点实验室;2. 重庆医科大学附属第一医院检验科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 RNA 干扰技术沉默 Annexin Ⅱ基因表达对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 侵袭迁移力的影响。方法:体外化学合成 Annexin Ⅱ基因序列特异性双链小干扰 RNA(Annexin Ⅱ-siRNA),转染高转移人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231,用荧光显微镜观察转染效率,逆转录-聚合酶链反应和蛋白印迹检测 Annexin Ⅱ mRNA 和蛋白表达水平;通过生长曲线和体外侵袭迁移实验,观察乳腺癌细胞恶性生物学行为的改变。结果:Annexin Ⅱ-siRNA 能有效抑制 Annexin Ⅱ mRNA 和蛋白表达($P<0.05$);经 siRNA 处理的细胞,细胞生长速度明显降低($P<0.05$),侵袭迁移力显著下降($P<0.05$)。结论:沉默 Annexin Ⅱ基因表达可抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的侵袭迁移力。

【关键词】RNA 干扰;乳腺癌;Annexin Ⅱ;侵袭转移

【中国图书分类法分类号】R737-9 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-24

Effect of silencing annexin Ⅱ by specific siRNA on invasion and metastasis of human breast cancer cell MDA-MB-231

GUO Bian-qin, et al

(*Department of Clinical Hematology, Key Laboratory of Clinical Medical Diagnostics of Education Ministry, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objectives*: To investigate the effects of small interference RNA (siRNA) silencing Annexin Ⅱ on invasion and metastasis of human breast cancer cell MDA-MB-231. *Methods*: The chemically-synthetic siRNA duplexes targeting Annexin Ⅱ (Annexin Ⅱ-siRNA) was transiently transfected into MDA-MB-231 cells which have high metastatic potential by lipofectamin 2000. The transfection efficiency was observed by fluorescence microscopy. RT-PCR and western blot were used to semi-quantify the Annexin Ⅱ mRNA and protein levels. The malignant characters of transfected MDA-MB-231 cells including celluar proliferation rate, the activities of invasion and metastasis were analyzed by use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and millicell chamber assay, respectivilly. *Results*: Annexin Ⅱ-siRNA effectively inhibited Annexin Ⅱ mRNA and protein levels ($P<0.05$). With siRNA interferring cells, the ability of cells proliferation was decreased ($P<0.05$), and cells invasive and metastasis were depressed ($P<0.05$). *Conclusion*: Silencing Annexin Ⅱ could significantly inhibit the abilities of invasion and metastasis of human breast cancer cells MDA-MB-231 in vitro.

【Key words】RNA *interference*; *Breast cancer*; *Annexin* Ⅱ; *Invasion and metastasis*

Annexins 蛋白是一类受 Ca^{2+} 调节、能结合到带负电荷的膜磷脂上的蛋白家族,参与一系列与 Ca^{2+} 相关的生物学活动。目前研究表明,其家族成员 Annexin Ⅱ在多种恶性肿瘤中呈高表达[1-3]。本研究通过 RNA 干扰技术抑制高转移乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 中 Annexin Ⅱ表达,并观察细胞恶性生物学行为的改变,尤其侵袭迁移力的变化,为探讨 Annexin Ⅱ在乳腺癌中的作用机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 购于中国科学院上海细胞所,MCF-7 由文阳安博士惠赠;Annexin Ⅱ、β-actin 引物合

作者介绍:郭变琴(1979-),女,硕士,研究方向:乳腺癌。

通讯作者:陈婷梅,女,副教授,E-mail: chentingmei@sohu.com。

基金项目:重庆市自然科学基金(2006BB5427)。

成于 Invitrogen 公司;RNA Trizol rose 购于上海华舜公司;RT-PCR 试剂盒购于 TAKARA 公司;小鼠抗人单克隆抗体 Annexin Ⅱ、β-actin 购于 Santa cruz 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗购于北京中山公司;Negative control siRNA、FAM-siRNA 购于广州锐博公司;Lipofectamin2000 购于 Invitrogen 公司;millicell 小室购于 Millipore 公司;基质胶、纤维连接蛋白购于美国 BD 公司。

1.2 siRNA 的合成

广州锐博公司化学合成 3 条针对 Annexin Ⅱ序列的 siRNA,我们从中筛选出一条有效的 siRNA 序列,正义链:5'-GCAGCAAUGCACAGAGACAdTdT-3',反义链:5'-UGUCUCUGUGCAUUGCUGCTdTd-3'。干粉 siRNA 用 Free-RNase 水稀释成浓度为 20 μmol/L。

1.3 细胞培养

细胞生长于含 10%胎牛血清的 1640 培养基中,37℃,5% CO_2,培养传代。

1.4 荧光显微镜观察转染效率

参照广州锐博公司提供的说明书,用 FAM-siRNA 转染人乳腺癌细胞 MDA-MB-231,于转染后 10 h 在荧光显微镜下观察转染效率。

1.5 转染细胞

将细胞分 3 组,(1)空白组(未做任何处理);(2)阴性组(Negative control siRNA 转染组);(3)实验组(Annexin Ⅱ-siRNA 转染组)。转染前 24 h,取对数生长期的细胞用胰酶消化,计数,调整细胞浓度为 1.0×10^5 个/ml,接种于 6 孔板,孵箱培养,待细胞密度达到 60%转染:配制 A、B 液,A 液为 7.5 μl siRNA + 250 μl 无血清 1640;B 液为 5 μl Lipofectamine 2000 + 250 μl 无血清 1640,吹匀,室温 5 min;将 A 液与 B 液混合吹匀,室温放置 20 min;将混合液加入 6 孔培养板中后,放入 CO_2 孵箱中培养 8 h,空白组只加 500 μl 无血清 1640;8 h 后换液,置培养箱中继续培养 24~72 h。

1.6 RT-PCR

用 RNA trizol rose 提取转染 24 h、48 h、72 h 培养细胞总 RNA,RT-PCR 检测 Annexin Ⅱ mRNA 水平。β-actin 引物序列:F:5'-TCATGAAGTGTGACGTGGACATC-3',R:5'-CAGGAGGAGCAATGATCTTGATC-3',扩增长度为 156bp。Annexin Ⅱ引物序列:F:5'-ACTTTGATGCTGAGCG GGATG-3',R:5'-CGAAGGCAATATCCTGTCTCTGTG-3',扩增长度为 126 bp。取 5 μl PCR 产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,紫外照相并进行图像分析,以 Annexin Ⅱ与 β-actin 平均光密度值的比值来反映 Annexin Ⅱ mRNA 水平。

1.7 Western blot

用 RIPA(含 PMSF 蛋白酶抑制剂)提取转染 48 h 各组细胞总蛋白,考马斯亮蓝法蛋白定量,以 25 μg/道上样,经 12%SDS-PAGE 电泳后转 PVDF 膜,4℃封闭过夜,加一抗 37℃温育 2 h,再加二抗温育 2 h 后,显色,凝胶成像系统分析,以 Annexin Ⅱ与 β-actin 平均光密度值的比值来反映 Annexin Ⅱ蛋白量。

1.9 生长曲线测定(MTT 法)

实验分组同转染细胞,取对数生长期细胞按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板,待细胞生长至 60% 密度时转染,剂量为 0.375 μl siRNA + Lipofectamine 2000 0.25 μl,培养至 24 h、48 h、72 h 时,分别向各组细胞孔中加入浓度为 5g/L MTT 20 μl,培养箱孵育 4 h,吸去上清,每孔加入 DMSO 100 μl,震荡 10 min,酶标仪 570 nm 波长测吸光度值(A),以吸光度值(A)代表细胞生长速度。

1.10 体外侵袭、迁移实验

用无血清 1640 稀释基质胶(稀释比例 6:1),按 50 μl/孔均匀地铺在 millicell 小室膜上,在小室另一面涂上纤维连接蛋白(10 μg/ml,30 μl)。收集转染 48 h 后的各组细胞 2×10^5 个,用 400 μl 无血清 1640 稀释后接种到上室中,将小室置于加有 600 μl 趋化因子的 24 孔板内,37℃、5%CO_2 孵育 36 h 后取出小室,小心擦掉上室细胞,PBS 洗 3 次,95%乙醇固定,HE 染色,显微镜下计数 5 个视野的细胞数,求出每个视野的平均穿膜细胞数。迁移实验不铺 matrigel,其余步骤同侵袭实验。以穿膜细胞数代表细胞侵袭迁移能力。

1.11 统计学方法

计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,两组均数比较采用 t 检验,多组均数比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 不同转移能力人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 MCF-7 中 Annexin Ⅱ蛋白表达

Western blot 结果显示:Annexin Ⅱ蛋白在 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中相对表达水平分别为 1.10±0.05,0.09±0.01,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 1)。

2.2 siRNA 转染细胞条件筛选及转染效率的评价

用 FAM-siRNA 转染 MDA-MB-231 细胞,在 6 孔板中选取细胞密度为 30%~70%,siRNA 浓度为 30~100 nmo/L 为初步预实验条件。结果发现,在细胞融合度达到 60%,siRNA 浓度为 75 nmo/L 时有最佳的转染效率。荧光显微镜观察,计数 100 个细胞,其中有绿色荧光的占 85%以上(图 2)。

2.3 转染细胞 Annexin Ⅱ mRNA 水平的变化

MDA-MB-231 细胞经 siRNA 作用 24、48、72 h 后,实验组 Annexin Ⅱ mRNA 相对水平(Annexin Ⅱ/β-actin)较空白组(0.57±0.03)和阴性组(0.52±0.04)明显下调($P<0.05$),48 h 时 Annexin Ⅱ mRNA 相对水平(0.23±0.02)下调最为明显($P<0.05$),空白组 Annexin Ⅱ mRNA 相对水平较阴性组差异无统计学意

义（$P>0.05$）（图 3）。

2.4　转染细胞 Annexin Ⅱ 蛋白水平的变化

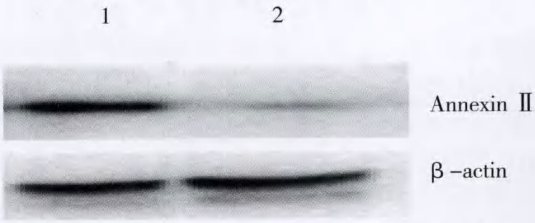
MDA-MB-231 细胞经 siRNA 作用 48 h 时，实验组 Annexin Ⅱ蛋白相对表达量（0.24±0.04）较空白组（0.92±0.15）和阴性组（0.89±0.17）显著降低（$P<0.05$），空白组 Annexin Ⅱ 蛋白表达水平较阴性组差异无统计学意义（$P>0.05$）（图 4）。

2.5　转染细胞生长速度的变化

MTT 结果显示，阴性组细胞生长速度略低于空白组（$P>0.05$），48 h 及 72 h 组细胞生长速度较空白组和阴性组显著降低（$P<0.05$），24 h 组差异无统计学意义（$P>0.05$）（图 5）。

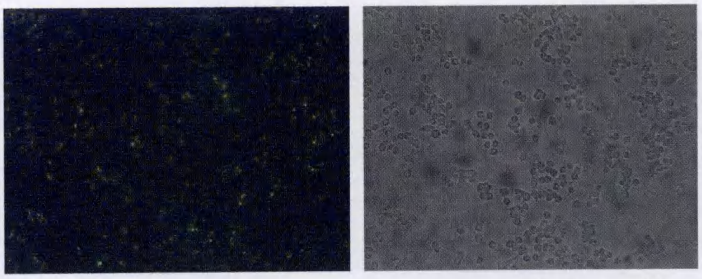
2.6　转染细胞侵袭、迁移力的变化

MDA-MB-231 细胞经 siRNA 作用 48 h 后，实验组侵袭迁移穿膜细胞数较空白组、阴性组显著下降（$P<0.05$），空白组较阴性组差异无统计学意义（$P>0.05$）（表 1、图 6）。



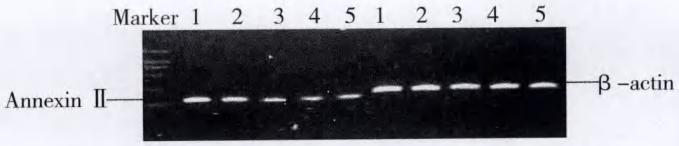
1. MDA-MB-231；　2. MCF-7

图 1　Western blot 检测 Annexin II 蛋白



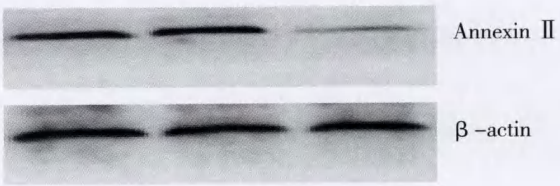
A. 荧光共显微镜　　B. 同一视野相差显微镜

图 2　荧光显微镜观察转染效率（×200）



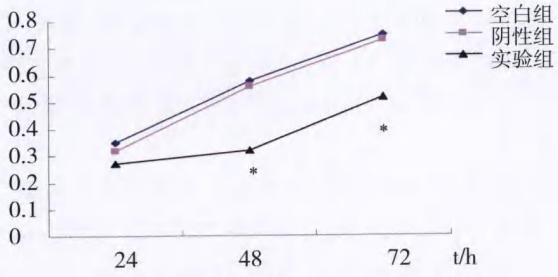
1. 空白组；2. 阴性组；3. 实验组（转染 24 h）；4. 实验组（转染 48 h）；5. 实验组（转染 72 h）

图 3　RT-PCR 检测 Annexin Ⅱ mRNA



1. 空白组；2. 阴性组；3. 实验组（转染 48 h）

图 4　Western blot 检测 Annexin Ⅱ 蛋白



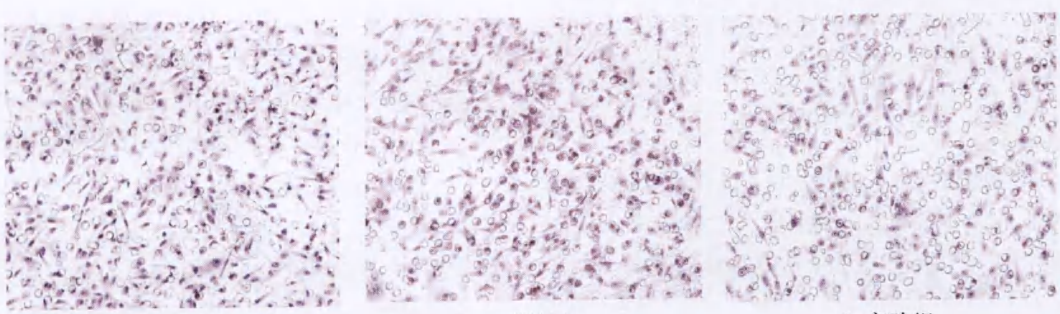
*. $P<0.05$，与空白组，阴性组比较

图 5　MTT 检测细胞增殖力

表 1　Annexin Ⅱ-siRNA 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 侵袭迁移力的影响

组别	侵袭穿膜细胞数	迁移穿膜细胞数
空白组	308 ± 55	321 ± 45
阴性组	301 ± 43	311 ± 20
实验组	152 ± 36*	160 ± 26*

*：$P<0.05$，与空白组和阴性组比较



A. 空白组　　B. 阴性组　　C. 实验组

图 6　体外侵袭实验（HE×200）

3 讨 论

Annexin Ⅱ,又名 P36,其基因位于 15q21~q22,编码的蛋白有 339 个氨基酸,分子量 36 kD,在人体内皮细胞、单核/巨噬细胞、骨髓细胞和某些肿瘤细胞中表达丰富[4]。

研究表明 Annexin Ⅱ在结肠癌[1]、星形细胞瘤[2]、胃癌[3]等恶性肿瘤中过表达,如在结肠癌中,Annexin Ⅱ过表达与肿瘤的大小、组织学类型、浸润深度及 TNM 分期相关,与转移性无关,但和 Tenascin-C 的共同表达却与结肠癌的进展和转移相关,并提示预后不良; Roseman[2]等认为 Annexin Ⅱ蛋白的表达水平与星形细胞瘤的恶性程度的分级相关,恶性程度越高,表达水平越高,可以作为胶质瘤分级的指标,并提示预后。另有研究表明 Annexin Ⅱ在肿瘤侵袭及转移中也起着重要作用,Wu 等[5]对原发性及转移性人头颈部鳞状细胞癌的差异表达基因进行鉴定,结果表明 Annexin Ⅱ是转移癌中表达明显增高的基因之一;有研究者也观察到胰腺癌的肿瘤浸润灶和转移灶,以及原发性肾细胞癌的转移灶中 Annexin Ⅱ蛋白表达量增高[6]。本研究通过比较乳腺癌高、低转移细胞系 Annexin Ⅱ蛋白水平,证实 Annexin Ⅱ蛋白在不同转移能力乳腺癌细胞系中存在差异,高转移细胞系 MDA-MB-231 中 Annexin Ⅱ蛋白水平高于低转移细胞系 MCF-7。此外我们采用 RNA 干扰技术,体外化学合成 Annexin Ⅱ-siRNA,并转染高转移乳腺癌细胞系 MDA-MB-231, 结果表明 Annexin Ⅱ-siRNA 转染 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,与空白组和阴性组相比,细胞中 Annexin Ⅱ在 mRNA 和蛋白水平均有显著下调。为证实 Annexin Ⅱ在乳腺癌中的作用,我们利用 MTT 法和体外侵袭迁移实验,从不同角度检测转染细胞恶性生物学行为的变化。结果表明经 Annexin Ⅱ-siRNA 作用 48 h 后的 MDA-MB-231 细胞,与空白组和阴性组相比,其生长速度显著下降,穿膜细胞数也显著降低,表明细胞内 AnnexinⅡ水平下调可抑制乳腺癌细胞的侵袭迁移能力。

肿瘤细胞表面 Annexin Ⅱ可作为组织型纤溶酶原活化剂、纤溶酶原的受体,促进细胞表面纤溶酶的活化[7],活化的纤溶酶通过特殊受体-Annexin Ⅱ向细胞内传递信号,增加基质金属蛋白酶-1 的合成和分泌[8];此外,肿瘤细胞表面 Annexin Ⅱ尚可与组织蛋白酶 B 前体相互作用,促进组织蛋白酶 B 的活化[9],而纤溶酶、基质金属蛋白酶-1、组织蛋白酶 B 均是促进肿瘤侵袭转移的关键分子。结合本实验结果,我们认为 Annexin Ⅱ可能在乳腺癌的发生发展中起重要作用,进一步研究 Annexin Ⅱ及其在乳腺癌侵袭转移中的作用机制,将为临床治疗乳腺癌提供依据。

参 考 文 献

[1] Emoto K, Yamada Y, Sawada H, et al. Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal carcinoma[J]. Cancer, 2001, 92(6): 1419-1426.

[2] Roseman B J, Bolen A, Hsu J, et al. Annexin II marks astrocytic brain tumors of high histologic grade[J]. Oncol Res, 1994, 6(12): 561-567.

[3] Emoto K, Sawada H, Yamada Y, et al. Annexin II overexpression is correlated with poor prognosis in human gastric carcinoma[J]. Anticancer Res, 2001, 21(2B): 1339-1345.

[4] 萧 笑, 王 元, 张思河. 钙依赖性磷脂结合蛋白 Annexin Ⅱ的研究进展[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(6): 570-572.

[5] Wu W, Tang X, Hu W, et al. Identification and validation of metastasis associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mess spectrometry[J]. Clin Exo Metastasis, 2002, 19(4): 319-326.

[6] Tanaka T, Akatsuka S, Ozeki M, eta1. Redox regulation of annexin 2 and its implications for oxidative stress-induced renal carcinogenesis and metastasis[J]. Oncogene, 2004, 23(22): 3980-3989.

[7] Choi K S, Fogg K D, Yoon C S, et al. P_{11} regulates extracellular plasmin production and invasive ness of HT1080 fibrosarcoma cells [J]. FASEB, 2003, 17: 235-246.

[8] Yahong Z H, Zhaohua Z H, Thomas H, et al. Urokinase-type plasminogen activator stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-1 production is mediated by plasmin-dependent signaling through Annexin A2 and inhibited by inactive plasmin [J]. Immunol, 2007, 179(5): 3297-3304.

[9] Mai J, Finley R L J, Waisman D M, et al. Human procathepsin B interacts with the Annexin Ⅱ tetramer on the surface of tumor cells[J]. Biol Chem, 2000, 275(17): 12806-12812.

(责任编辑:冉明会)