DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.007
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)18-1627-04

论著

Annexin Ⅱ基因反义表达载体对肺癌细胞生长的影响

贾晋伟,钱桂生,黄桂君 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 研究annexinⅡ基因反义表达载体(annexin Ⅱ-pLXSN)对人肺腺癌细胞株SPC-A-1生长的影响。方法 ①提取SPC-A-1细胞总RNA,应用RT-PCR法扩增目的片断,通过双酶切定向克隆的方法构建annexinⅡ基因反义表达载体。②应用脂质体将annexin Ⅱ-pLXSN导入SPC-A-1细胞(SPC-A-1-annexinⅡ)。半定量RT-PCR法分析转染细胞中annexin ⅡmRNA的表达。③观察反义RNA对SPC-A-1细胞生物学行为的影响。结果 ①反义表达载体成功导入SPC-A-1细胞;半定量RT-PCR证实SPC-A-1-annexinⅡ细胞中annexinⅡmRNA表达量较亲代细胞下降约2/3。②对转染前后的细胞观察表明,SPC-A-1-annexinⅡ细胞生长减慢,克隆形成率降低,^{3}H-TdR掺入率下降,细胞增殖被阻滞于$G_0 \sim G_1$期。结论 annexin Ⅱ具有促进肺癌细胞增殖的作用,此功能将有助于肺癌的发生发展。

关键词:annexinⅡ;基因转染;细胞增殖;DNA合成
中图法分类号:R341.33;R392.2;R734.2 文献标识码:A

Effects of annexin Ⅱ antisense vector on the growth of lung cancer cells

JIA Jin-wei, QIAN Gui-sheng, HUANG Gui-jun (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the effects of antisense vector of annexin Ⅱ gene on the growth of SPC-A-1, a human lung cancer cell line. Methods The total RNA was isolated from human lung cancer cell line SPC-A-1 and the target DNA fragments were amplified by RT-PCR. The antisense expression vector was constructed by double restriction endonuclease cleavage directional clone method. Annexin Ⅱ antisense expression vector was introduced into SPC-A-1 cells by liposome transfection reagent. The expression of annexin Ⅱ mRNA was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The effects of antisense vector of annexin Ⅱ gene on the growth of SPC-A-1 were observed. Results The antisense vector of annexin Ⅱ gene was constructed and introduced into SPC-A-1 cells successfully. Semi-quantitative RT-PCR showed that the annexin Ⅱ mRNA expression reduced by about two thirds in the transfected cells as compared with that in the untransfected cells. Compared with the untransfected cells, transfected cells decreased significantly in cell growth, clone formation efficiency in plating and DNA synthesis. Cell cycle was blocked in G_0-G_1 phase. Conclusion Annexin Ⅱ could promote the growth of lung cancer cells and may be helpful for the development of lung cancer.

Key words: annexin Ⅱ; gene transfection; cell proliferation; DNA synthesis

Annexins是一类钙依赖性的磷脂结合蛋白,其家族成员annexin Ⅱ参与多种重要的生物学功能,如:细胞分泌、增殖、纤溶、细胞骨架连接等,但目前其确切的作用机制尚不十分清楚。已有多项研究显示,annexin Ⅱ在DNA合成及细胞增殖中起重要作用,并且在多种肿瘤组织中表达量显著升高,且与恶性肿瘤的预后显著相关。为探讨annexin Ⅱ在肺癌细胞生长中的可能作用,本研究以人肺腺癌细胞系SPC-A-1为模型,应用PCR技术从SPC-A-1中克隆出annexin Ⅱ基因片段,并构建其反义表达载体,通过基因转染技术将其导入SPC-A-1细胞,观察annexin Ⅱ反义RNA对肺癌细胞生长的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人肺腺癌细胞系SPC-A-1由周向东博士惠赠,用含10%新生牛血清的1640培养基于37 ℃、5%CO_2孵箱中进行培养。

1.2 基因转染、转染克隆的筛选与鉴定

1.2.1 annexin Ⅱ反义表达载体的构建 用逆转录PCR法扩增annexin Ⅱ基因mRNA第53-593 bp碱基序列,引物序列如下:

作者简介:贾晋伟(1972—),女,山西省朔州市人,博士,主治医师,主要从事肺癌的分子生物学机制方面的研究。电话:(023)68774603
通信作者:钱桂生,电话:(023)68755603
收稿日期:2004-01-30;修回日期:2004-05-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

正义引物:5′-GCGGATCCTCTACTGTTCACGAAATCC-3′反义引物:5′-TCGAATTCCCTCTGCTCTTCTACCCT-3′,经 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ双酶切,反向连接于经酶切的真核表达载体 pLXSN 中,酶切、测序鉴定插入方向和序列正确性。

1.2.2 Annexin Ⅱ反义表达载体的转染与克隆筛选 用脂质体 DOTAP(美国 Roche 公司)将 annexin Ⅱ反义表达载体转染人肺腺癌细胞系 SPC-A-1(按照 DOTAP 说明书进行)。用含 375 μg/ml G418(美国 Roche 公司)的培养液进行筛选,同时用未加质粒的细胞作对照。

1.2.3 抗性克隆 PCR 鉴定 应用 pLXSN 引物进行 PCR 反应,鉴定 annexin Ⅱ反义表达载体是否整合到细胞基因组,pLXSN 引物序列如下:正义引物(1 572~1 594 bp):5′-CCCTTGAACC TCCTCGTTCGACC-3′,反义引物(1 711~1 689 bp):5′-GAGCCTGGGGA CTTTCCACACCC-3′。产物预期扩增长度为 681 bp,其中插入片段长度 541 bp,pLXSN 片段 140 bp。

1.2.4 半定量 RT-PCR 法分析转染细胞 annexin Ⅱ的表达 根据人 annexin Ⅱ基因 mRNA 序列,重新设计一对引物,序列如下:正义引物:5′-TCTACTGTTCACGAAATCC-3′,反义引物:5′-CTTCACTCCAGCGTCATA-3′,产物长度 609 bp。以 β-actin 为参照,序列如下:正义引物:5′-ACTGGCATTGTGATGGACT-3′反义引物:5′-GGCATAGAGGTCTTTACGG-3′,产物长度 441 bp,1%琼脂糖凝胶电泳。使用凝胶分析系统测定电泳图像中各条带光密度值(以灰度表示),以同一泳道中 annexin Ⅱ和 β-actin 产物条带积分光密度值之比作数据分析,以此反映 annexin Ⅱ基因 mRNA 的表达程度。

1.3 转染细胞生物学行为观察

1.3.1 生长曲线 取对数生长期的 SPC-A-1 及转染细胞各 5×10^3,分别接种到 24 孔板中,按照常规方法绘制生长曲线并计算出细胞的倍增时间。

1.3.2 平板克隆形成试验 取对数生长期亲代和转染细胞,分别消化悬浮于完全 1640 培养基中使成单细胞悬液,按每皿含 500 个细胞的梯度密度,接种于含 10 ml 预温 37 ℃培养液的培养皿中,连续培养至出现肉眼可见的克隆时,终止培养。纯甲醇固定,Giemsa 应用液染色 10~30 min,计数克隆数,计算克隆形成率。

克隆形成率= 克隆数/接种细胞数× 100%。

1.3.3 ^{3}H-TdR 摄取测定 取处于对数生长期的亲代和转染细胞,将其分别接种到接种于 96 孔板内,每孔细胞数为 1×10^4,每组设 5 个复孔。待细胞贴壁后,每孔中加入 1 μCi ^{3}H-TdR,细胞培养箱内孵育 16 h,弃去培养液,生理盐水漂洗 3 次,0.25%胰酶消化细胞。用多头细胞收集器采集细胞于玻璃纤维素膜上,生理盐水洗膜 3 次,10%三氯乙酸固定,60~80 ℃将膜烤干,行液体闪烁计数(Bq)。

1.3.4 细胞周期的测定 取处于对数生长期的亲代与转染细胞,分别消化吹打成为单细胞悬液,调整细胞密度为 1.0×10^5/ml,加入 PBS 0.2 ml 制成单细胞悬液,70%乙醇固定,将等体积的细胞悬液和 PI(碘化丙啶)染液混合,4 ℃放置 20~30 min,测定前 300 目尼龙膜过滤后用流式细胞仪测定各细胞周期比率。

1.4 统计学分析

计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件行单因素方差分析及均数间多重比较(LSD);计数资料数据以百分数表示,行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 基因转染、转染克隆的筛选与鉴定

2.1.1 载体构建 构建的反义载体经 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ双酶切,证实产生约 541 bp 的 annexin Ⅱ目的条带(图 1)。测序结果表明除第 574 位存在 G 缺失,第 384 位未能测出,其余碱基序列完全相同,同源性为 99.6%,且插入方向正确,表明 annexin Ⅱ基因反义真核表达载体构建成功。



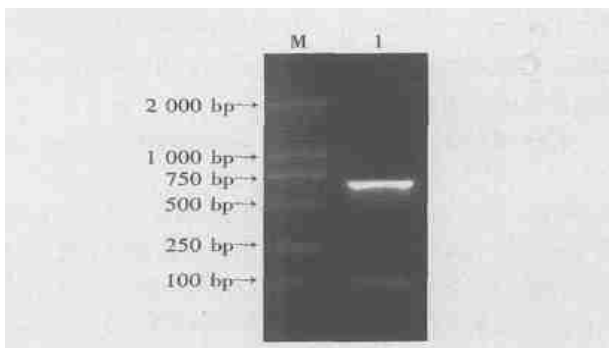
M: Marker λ DNA/*Eco*RⅠ + *Hind* Ⅲ; 1: Annexin Ⅱ-pLXSN; 2: Annexin Ⅱ PCR prodoct; 3: pLXSN

图 1 酶切鉴定反应载体

Fig 1 Detection of antisense vector

2.1.2 G418 筛选 约 10~14 d 即可见具有 G418 抗性的阳性细胞克隆形成,而 SPC-A-1 对照细胞在 7 d 左右死亡。

2.1.3 引物扩增 根据 pLXSN 多克隆位点所设计的引物扩增出约 681 bp 的条带,说明反义表达载体已成功整合到 SPC-A-1 细胞基因组中(图 2)。



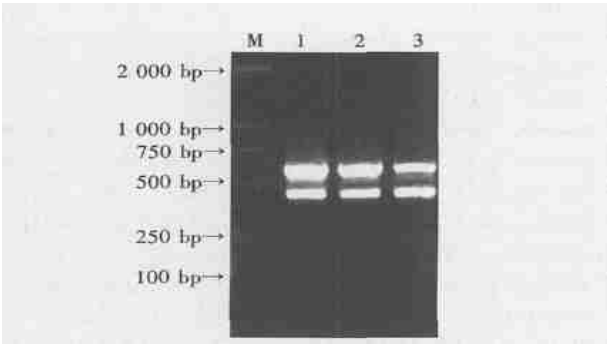
M: Marker DL 200; 1: SPC-A-1-annexin

图 2 抗性克隆的鉴定

Fig 2 Identification of resistant clone

2.1.4 亲代 SPC-A-1 细胞中 annexinⅡ mRNA 的表达 其量约为 SPC-A-1-annexin Ⅱ细胞表达量的 2.74 倍,即 SPC-A-1-annexinⅡ中 annexinⅡ的表达量下降约 2/3(图 3)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



M：Marker DL2000；1：SPC-A-1；2：SPC-A-1-pLXSN；3：SPC-A-1-annexin Ⅱ

图 3　annexin Ⅱ mRNA 表达半定量 RT-PCR

Fig 3　Semi-quantification RT-PCR of annexin Ⅱ mRNA

2.2　转染细胞生物学行为的观察

2.2.1　生长曲线　　对亲代和转染细胞分别测定生长曲线，结果如图 4 所示，SPC-A-1 组、SPC-A-1-pLXSN 和 SPC-A-1-annexin Ⅱ的倍增时间分别为 44.5、45.5 和 75 h。表明 annexinⅡ反义载体基因转染后细胞生长速度明显减慢。

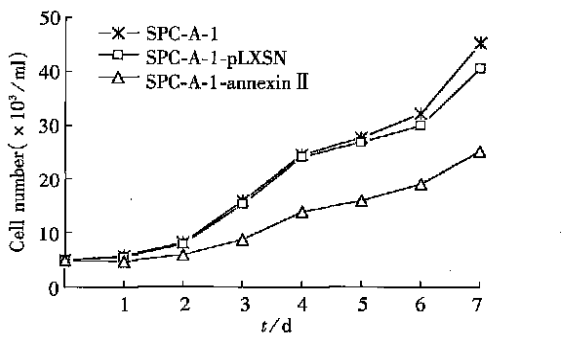


图 4　SPC-A-1、SPC-A-1-pLXSN 和 SPC-A-1-annexinⅡ细胞生长曲线

Fig 4　Growth curves of SPC-A-1, SPC-A-1-pLXSN, and SPC-A-1-annexin Ⅱ cells

2.2.2　平板克隆形成试验　　SPC-A-1 组的平板克隆形成率为 82.4%，显著高于 SPC-A-1-annexin Ⅱ的 77%（χ^2= 4.506，P= 0.041）。SPC-A-1 组不仅形成的集落数多，而且每一集落的细胞数也明显比 SPC-A-1-annexinⅡ细胞数多。

2.2.3　^{3}H-TdR 摄取测定　　SPC-A-1-annexin Ⅱ细胞 ^{3}H-TdR 较 SPC-A-1（P< 0.01）及 SPC-A-1-pLXSN 细胞（P< 0.01）明显减少，说明 SPC-A-1-annexinⅡ细胞在导入反义表达载体后，其 DNA 合成受到显著抑制（表 1）。

表 1　^{3}H-TdR 测定结果（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Result by ^{3}H-TdR ($\bar{x}\pm s$)

Cell	^{3}H-TdR(Bq)
SPC-A-1	486.15±28.17
SPC-A-1-pLXSN	459.45±10.31
SPC-A-1-annexinⅡ	300.26±15.59 **##

F= 132.56，P= 0.000，**：P< 0.01，*vs* SPC-A-1；##：P< 0.01，*vs* SPC-A-1-pLXSN。

2.2.4　细胞周期的测定　　SPC-A-1、SPC-A-1-pLXSN 及 SPC-A-1-annexinⅡ细胞处于 G_0-G_1 期的百分比分别为 61.97%、63.85% 和 69.78%，S 期分别为 30.69%、27.83% 和 27.02%，M 期分别为 7.34%、8.32% 和 3.20%，说明 SPC-A-1-annexinⅡ细胞生长受阻于 G_0～G_1 期。

3　讨论

annexinⅡ最早是作为 Rous 肉瘤病毒转化基因的酪氨酸激酶底物于 1982 年被发现的，在其发现之初，annexinⅡ被不同的研究者冠以多种不同的名称，包括：lipocortinⅡ，calpactinⅠ及 p36 等。1990 年，美国学者 Frohlich 等[1]首次报道 annexinⅡ的 mRNA 及蛋白质在肝癌组织中表达量明显高于癌旁正常组织，但是经过部分切除的鼠肝再生组织中 annexinⅡ的表达量并没有因此而明显升高，提示 annexinⅡ表达增高与细胞恶性转化有关。在其它类型肿瘤研究也有类似结果，如：胰腺癌、多形性胶质母细胞瘤、肾癌以及急性早幼粒细胞性白血病[2]等。2001 年日本学者 Emoto 等[3]检测人胃癌细胞株及 153 例原发性胃癌中 annexinⅡ的表达，结果表明所有细胞株及 33%的原发性胃癌表达呈阳性，且在淋巴结、远处转移及静脉侵犯者 annexinⅡ表达量明显升高。对 105 例原发性大肠癌组织的研究结果表明，annexinⅡ高表达与组织学类型、肿瘤大小、侵犯深度及 TNM 分期显著相关[4]。另有研究表明 annexinⅡ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 annexinⅡ是转移癌中表达明显增高的基因之一。另有学者证实肿瘤组织 annexinⅡ基因高表达可能在阿霉素治疗后出现的远处转移中起一定作用[6]，这可能与 annexinⅡ是组织型纤溶酶原激活物、纤溶酶原及细胞粘合素 C 的受体有关[7]。

尽管已知 annexinⅡ与多种肿瘤关系密切，但 annexinⅡ在肺癌细胞中的作用尚少见报道。本实验通过亚克隆技术，将 annexinⅡ基因片段反向克隆至真核表达载体 pLXSN 上，稳定转染人肺腺癌细胞株 SPC-A-1，并显著抑制胞内 annexinⅡmRNA 的表达，结果表明 annexinⅡ表达减少使细胞 DNA 合成减少，细胞周期受阻于 G_0～G_1 期，细胞生长明显减慢，倍增时间延长，克隆形成率降低。表明 annexinⅡ具有促进 SPC-A-1 细胞生长和增殖，并提高其生存能力的作用。

近年，已有多项研究表明 annexinⅡ在 DNA 合成及细胞增殖中起重要作用。Chiang 等[8]观察到当细胞进入 G_1 期（DNA 合成前期）时 annexinⅡmRNA 和蛋白质出现一次下降，然后逐渐升高，当细胞进入 S 期（DNA 合成期）时表达量达到最高，然后再次逐渐下降，提示 annexinⅡ的表达与细胞周期关系密切。在使用血清、

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表皮生长因子与细胞共同孵育时观察到，细胞DNA的合成和annexinⅡ的表达量显著相关，并且annexinⅡ是细胞早期表达的蛋白之一，提示该蛋白在DNA合成中起着重要作用。另有研究表明，在DNA的复制过程中所需的DNA聚合酶α，它的其中一个组分被称为引物识别蛋白，是由3-磷酸甘油酸激酶和annexinⅡ蛋白单体组成，因而在DNA复制过程中annexinⅡ对DNA聚合酶α的活性具有重要作用[9]。进一步研究表明，爪蟾卵细胞的提取物可以有效启动及完成外源添加的质粒DNA的半保留复制，加入抗annexinⅡ的单克隆抗体可以阻断此过程，再次添加纯化的人annexinⅡ蛋白可以恢复DNA复制能力[10]。

结合以上文献报道及本研究结果，我们推测annexinⅡ在肺癌细胞所起作用为：annexinⅡ高表达通过促进肺癌细胞DNA合成和增殖，提高细胞的生存能力，从而促进肺癌的发生和发展，因此有必要进一步探讨其在肺癌诊断与治疗中的作用。

参考文献：

[1] Frohlich M, Motte P, Galvin K, *et al*. Enhanced expression of the protein kinase substrate p36 in human hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cell Biol, 1990, 10(6): 3216-3223.

[2] Menell J S, Cesarman G M, Jacovina A T, *et al*. Annexin Ⅱ and bleeding in acute promyelocytic leukemia[J]. N Engl J Med, 1999, 340(13): 994-1004.

[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] 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.

[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 mass spectrometry[J]. Clin Exp Metastasis, 2002, 19(4): 319-326.

[6] Choi S, Kobayashi M, Wang J, *et al*. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) and annexin II are involved in the metastatic progression of tumor cells after chemotherapy with Adriamycin[J]. Clin Exp Metastasis, 2000, 18(1): 45-50.

[7] Kim J, Hajjar K A. Annexin Ⅱ: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor[J]. Front Biosci, 2002, 7: d341-348.

[8] Chiang Y, Schneiderman M H, Vishwanatha J K. Annexin Ⅱ expression is regulated during mammalian cell cycle[J]. Cancer-Res, 1993, 53(24): 6017-6021.

[9] Kumble K D, Vishwanatha J K. Immunoelectron microscopic analysis of the intracellular distribution of primer recognition proteins, annexin 2 and phosphoglycerate kinase, in normal and transformed cells[J]. J Cell Sci, 1991, 99(Pt4): 751-758.

[10] Vishwanatha J K, Kumble S. Involvement of annexin Ⅱ in DNA replication: evidence from cell-free extracts of Xenopus eggs[J]. J Cell Sci, 1993, 105(Pt2): 533-540.

（编辑 汪勤俭）

（上接1626页）

③手术穿刺方法：见YL-1型针说明书。④血肿抽吸方法：对于100 ml左右的血肿，匀速抽出30～50 ml，尽量不作血肿碎吸，首次抽吸血肿量在50%～60%；余下血肿加入尿激酶2～3×10^3U/ml盐水，6 h后开放引流。

1.3 术后半年随访

远期疗效主要用日常生活能力(ADL：activity of daily living)来衡量。ADL1正常，ADL2稍不便，ADL3部分不便，ADL4完全不便，ADL5植物状态。

2 结果

8例患者经颅内血肿微创术6例存活，2例死亡。死亡原因术后10 d发生难以控制的肺内感染导致呼吸功能衰竭，这两例在术后3～5 d也曾意识好转，瞳孔呈等大等圆对光反射略迟钝。存活的6例意识完全恢复的时间为24 h至7 d。

3 讨论

重症脑出血(ICH)是否进行手术，直到今日仍存在争议[1,2]，传统的开颅手术创伤大，死亡率及残疾率高，有报道80 ml以上的脑出血开颅手术后死亡率40%以上，术后持续植物状态(PVS)高达90%以上。

本组8例出血量均在100 ml以上，最大达到130 ml以上，出血部位均在基底节区及脑叶，形成的脑疝状态符合天幕切迹疝的表现，且均为双侧脑疝形成。经微创术后存活的6例患者，无1例发生PVS，死亡的2例术后也均出现中间意识改善，瞳孔恢复，对光反射出现及各种反射恢复，半年随访，存活的6例患者，2例达到ADL2，3例达到ADL3，1例为ADL4。

应用微创术应重视的几个问题，手术时机，本组8例除1例因血压过高难以控制导致继续出血形成脑疝手术在入院12 h进行，7例入院4～8 h内完成。首次血肿清除量，本组8例首次血肿清除量控制在50%～65%，不仅症状明显改善，即刻CT显示被严重挤压移位的脑组织均基本回到或接近回到脑中线；早期再出血的问题，超早期手术再出血是影响预后的主要因素之一[3]，本组8例超大量出血，术中术后无1例再出血。可能由于逐渐的抽吸血肿容积缩小，对中枢压迫减轻，心血管中枢缺血缺氧情况得到改善，血压下降，从而大大减小了因过高血压而导致的再出血的可能。

关键词：微创术；高血压性脑出血；双侧脑疝形成
中图法分类号：R743.340.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] Rabinstein A A, Atkinson J L, Wijdicks E F. Emergency craniotomy in patients worsening due to expanded cerebral hematoma: To what purpose[J]? Neurology, 2002, 58(9): 1367-1372.

[2] Gebel J M, Powers W J. Emergency craniotomy for intracerebral hemorrhage: when doesn't it help and does it ever help[J]? Neurology, 2002, 58(9): 1325-1326.

[3] Qureshi A I, Tuhrim S, Broderick J P, *et al*. Spontaneous Intracerebral Hemorrhage[J]. N Engl J Med, 2001, 344(19): 1450-1460.

（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net