

敲低膜联蛋白A5对人胃癌MGC-803和MKN-45细胞周期的影响

王小杰,赵依纳,李欣*

(承德医学院基础医学研究所,河北承德067000)

摘要: **目的** 探讨敲低膜联蛋白A5(ANXA5)对人胃癌细胞系MGC-803、MKN-45细胞周期相关蛋白表达的影响。**方法** 将细胞分为干扰组、阴性对照组,空白对照组,采用脂质体转染法将靶向膜联蛋白A5的siRNA以及阴性siRNA分别转染干扰组和阴性对照组MGC-803、MKN-45细胞,空白对照组不加任何试剂。转染后48h采用qRT-PCR和Western blot分别从mRNA和蛋白水平检测ANXA5的表达,确定ANXA5被敲低之后,qRT-PCR和Western blot检测各组p21cip1mRNA和P21cip1蛋白的表达,Western blot检测各组CyclinD1蛋白的表达,流式细胞术检测各组细胞周期的变化情况。**结果** 敲低ANXA5后,与阴性对照组和空白对照组相比,两种细胞的p21cip1mRNA和P21cip1蛋白均显著降低($P<0.05$),CyclinD1蛋白($P<0.05$)也显著降低。**结论** 敲低ANXA5可下调MGC-803、MKN-45细胞中p21cip1mRNA和P21cip1蛋白以及CyclinD1的表达,推测ANXA5可能通过作用于细胞周期相关蛋白而引发细胞周期阻滞从而影响着胃癌的发展。

关键词: 膜联蛋白A5; MGC-803; MKN-45细胞; P21cip1; 周期素D1; 细胞周期

中图分类号: R34

文献标识码: A

文章编号: 1004-6879 2020 03-

Effects of AnnexinA5 Knockdown on Cell Cycle of Human Gastric Cancer MGC-803 and MKN-45 Cells

WANG Xiao-jie, ZHAO Yi-na, LI Xin*

(Basic Medical Institute Chengde Medical University, Hebei Chengde 067000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of ANXA5 knockdown on cell cycle of human gastric cancer cell lines MGC-803, MKN-45 cells. **Methods** Cells were divided into interference group, negative control group and blank control group. The siRNA targeted to ANXA5 was transfected into MGC-803, MKN-45 cells by lipofectamine 2000 respectively. At the same time, negative siRNA was also transfected into negative control group and in blank control group nothing was added in. qRT-PCR and Western blot was used to identify whether the siRNA targeted to ANXA5 can highly suppress annexin A5 expression 48 hours after transfection. When the effect of the siRNA was assured, qRT-PCR and Western blot were applied to observe the expression of p21cip1 mRNA and P21cip1 protein, Western blot was used to detect the expression of cyclinD1, flow cytometry(FCM) was applied to observe the cell cycle progression. **Results** The expression of p21cip1 mRNA, P21cip1 protein and cyclinD1 decreased significantly when compared with the negative control group and the blank control group($P<0.05$). FCM analysis showed that the percentage of cells in G1 phase increased in interference group($P<0.05$). **Conclusion** ANXA5 knockdown can down-regulate the expression of p21cip1 mRNA, P21cip1 protein and cyclinD1 in human gastric cancer MGC-803 and MKN-45 cells, it is speculated that ANXA5 may affect the development of gastric cancer by inducing cell cycle arrest by acting on cell cycle related proteins.

Key words: Annexin A5; MGC-803; MKN-45; P21cip1; CyclinD1; Cell cycle

收稿日期: 2017-08-18;修回日期:2018-01-26

基金项目:河北省高校省级重点学科资助项目(201304);河北省教育厅项目(Z2014026),题目:XXXXXXXXXXXX

作者简介:王小杰(1982-),女,学位,硕士,研究方向,电话:XXXXXXXX, E-mail XXXXXXXXXXX

*通讯作者:李欣(出生年-),女,职称,研究方向,电话:(0314)2291043, E-mail hbcldx@cdmc.edu.cn

膜联蛋白A5(Annexin A5, ANXA5)是一种钙离子依赖的磷脂结合蛋白和蛋白激酶C抑制蛋白,在细胞信号转导、炎症、细胞生长和分化方面发挥着一种潜在的作用^[1]。近年来研究发现,ANXA5在多种肿瘤组织中存在异常表达,且ANXA5可望作为肿瘤的潜在标记物^[2],但关于ANXA5与胃癌的研究,目前国内外报道较少。P21cip1蛋白属于CDK抑制蛋白家族中的KIP家族,其基因名为CDKN1A,主要参与细胞周期调控^[3],与肿瘤的增殖、分化、迁移和侵袭有关^[4]。有研究表明,在皮肤癌HaCaT细胞中沉默P21cip1的表达可以抑制细胞的增殖^[5]。CyclinD1为D型周期素的一种。本研究采用脂质体转染法敲低ANXA5在人胃癌MGC-803、MKN-45细胞中的表达水平,检测了各组细胞周期及周期相关蛋白P21cip1和cyclinD1的表达变化,为阐明ANXA5在胃癌的发生发展中所发挥的作用奠定一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器设备

细胞培养基1640(美国GIBCO公司);无支原体特级胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);转染试剂lipofectamine2000(lipo2000)、靶向ANXA5的siRNA(正义链序列:GGGCTGATGCAGAACTCTTCGGAA),阴性siRNA(货号:1082140)均购自Invitrogen公司;ANXA5、CyclinD1兔抗人单克隆抗体购自EPITOMICS公司;P21cip1小鼠抗人单克隆抗体购于ORIGENE公司,山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗均购自美国KPL公司;ANXA5与p21cip1引物由上海生物工程技术有限公司设计并合成;反转录及PCR试剂盒购自宝生物大连公司,蛋白定量试剂盒购于北京索莱宝公司;细胞周期试剂盒购于美国BD公司。

1.2 细胞培养

人胃癌细胞系MGC-803、MKN-45细胞购自中科院上海细胞库,两株细胞均培养于含10%胎牛血清的1640中,置于含5%CO₂的37℃细胞培养箱中培养。

1.3 靶向ANXA5的siRNA抑制效果鉴定

1.3.1 细胞分组及转染 将细胞分为干扰组、阴性对照组(转染非特异性siRNA)和空白对照组(不加任何试剂)。MGC-803、MKN-45细胞培养于60mm细胞培养皿中,转染前24h将细胞按5×10⁴/孔种于6孔板中,使细胞密度在转染前达到60%;在无血清培养基中加入30pmol siRNA寡核苷

酸,使终体积为250μl,柔和混匀,于预先在室温放置5min的lipo2000溶液250μl混合,室温静置15min;将siRNA与转染试剂混合物均匀加至培养孔中;空白对照组不做任何处理。转染后48h收集细胞。

1.3.2 qRT-PCR检测ANXA5 mRNA的表达从而鉴定抑制效果 转染48h之后,6孔板每孔加入500μL Trizol提取各组细胞总RNA,取1μg模板RNA反转录为cDNA,对目的基因ANXA5及内参基因β-actin进行qRT-PCR扩增。ANXA5上游引物:5'-AgACCCTgATgCTggAATTg-3',下游引物:TCqTqTTCCAAAqATqqTqA,长度121bp;β-actin上游引物:5'-TggCACCCAgCACAAATgAA-3'下游引物:5'-CTAAGTCATAgTCCgCCTAgAAGCA-3',长度186bp。采用SYBR Green I法进行RT-PCR,将在Agilent Mx3000P上检测荧光超过背景时的循环数定义为循环阈值(cycle threshold, Ct值)。使用TaKaRa公司试剂SYBR Premix Ex TaqTM,建立20μL反应体系:2×SYRB Premix Ex TaqTM10μL,50×ROX Reference Dye 0.4μL,cDNA 1μL,10μM上下游引物各1μL,无酶蒸馏水6.6μL。反应条件:95℃预变性30s,95℃变性5s,55℃退火30s,72℃延伸30s,循环4次。反应结束后Setup MxPro v4.10系统自动给出Ct值,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对量。实验重复3次,取平均值。

1.3.3 Western blot鉴定siRNA抑制效果 转染48h之后,6孔板每孔加入150ul细胞裂解液,充分裂解后,提取各组MGC-803、MKN-45细胞总蛋白,BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,与样品处理液混合后煮沸10min以使蛋白变性,预制浓度为12%的SDA-PAGE凝胶,每孔加样30μg,电泳,湿法转膜,5%脱脂奶粉4℃封闭过夜,ANXA5兔抗人单克隆抗体(1:1000)室温孵育2h,TBST洗膜,羊抗鼠二抗(1:5000)室温孵育1h;超敏化学发光(ECL)法于化学发光仪上扫描成像,获得条带后,于Quantity One 4.6.2上测量条带灰度值,以ANXA5与β-actin条带灰度值的比值作为ANXA5的相对表达水平。实验重复3次,取平均值。

1.4 qRT-PCR检测p21cip1 mRNA的表达

RNA提取及qRT-PCR及方法同3.2。PCR反应:引物如下:p21cip1上游引物5-TGGTGTCTCGGTGACAAAGT-3',下游引物 5'-GGGATTTCTTCTGTTCAGGCG-3',长度134bp。内参β-actin同3.2。反应体系20μL:2×SYRB Premix Ex TaqTM10μL,50×ROX Reference Dye 0.4μL,cDNA 1μL,

10 μ M上下游引物各1 μ L,无酶蒸馏水6.6 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性30s,95 $^{\circ}$ C变性5s,55 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,循环38次。反应结束后Setup MxPro v4.10系统自动给出Ct值,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对量。实验重复3次,取平均值。

1.5 Western blot检测P21cip1和CyclinD1蛋白的表达

蛋白提取及Western blot流程同3.3。P21cip1小鼠抗人及CyclinD1、 β -actin兔抗人单克隆抗体(1:1000)均4 $^{\circ}$ C孵育过夜,山羊抗兔二抗(1:5000)室温孵育1h,增强型化学发光(ECL),化学发光仪扫描成像,采用Quntity One 4.6.2软件测量条带灰度值,以P21cip1、CyclinD1与 β -actin条带灰度值的比值作为P21cip1、CyclinD1的相对表达水平。实验重复3次,取平均值。

1.6 流式细胞术检测各组细胞周期变化情况

细胞计数,将各组细胞收于流式管中,确保每管达到 1×10^6 个细胞,每管加入3ml PBS,1000rpm离心10分钟,弃上清,逐滴加入预冷的无水乙醇5ml,涡旋混匀细胞,4 $^{\circ}$ C避光过夜,1000rpm离心10分钟,弃上清,PBS洗涤一次,染色液洗涤一次,离心弃上清,每管以0.5ml PI/RNase染色液重悬细胞,37 $^{\circ}$ C温育15min染色液,1h之内上流式细胞仪检测。

1.7 统计学处理

采用spss19.0统计软件进行处理,所有数据以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 靶向ANXA5的siRNA抑制效率鉴定

各组ANXA5蛋白表达情况(图1),各组ANXA5 mRNA定量分析结果(图2):干扰组ANXA5 mRNA及蛋白的表达显著低于阴性对照组和空白对照组($P < 0.05$),阴性对照组与空白对照组相比,差别无统计学意义($P > 0.05$)。

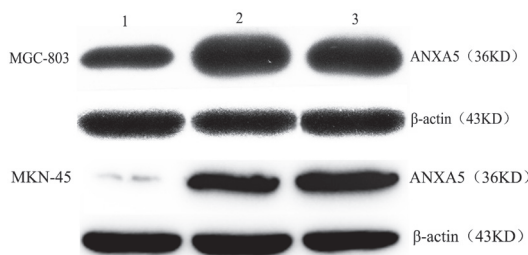


图1 Western blot检测ANXA5的表达结果

注:1.siRNA干扰组;2.阴性对照组;3.空白对照组

Fig.1 The expression of ANXA5 protein in each group by Western blot
1.siRNA interference group 2.negative control group 3.blank control group

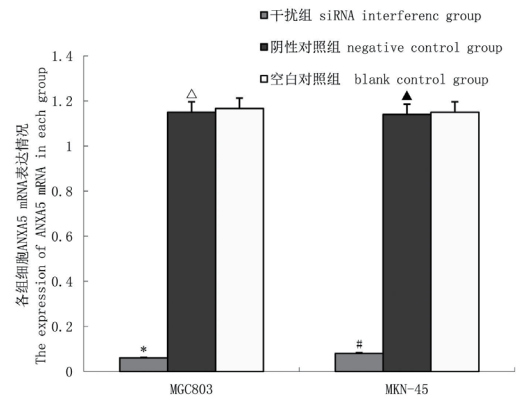


图2 各组ANXA5 mRNA表达水平定量分析结果

注:与空白对照组相比, $\Delta P > 0.05$, $\Delta P > 0.05$;与阴性对照组相比, $*P < 0.05$, $#P < 0.05$

Fig.2 The quantitative analysis results of ANXA5 mRNA in each group
Compared with the blank control group, $\Delta P > 0.05$, $\Delta P > 0.05$; Compared with the negative control group, $*P < 0.05$, $#P < 0.05$

2.2 qRT-PCR及Western blot检测敲低ANXA5的两种胃癌细胞p21cip1 mRNA及P21cip1蛋白的表达

各组P21cip1蛋白表达情况(图3),p21cip1 mRNA定量分析结果(图4):干扰组p21cip1 mRNA及蛋白的表达水平显著低于阴性对照组和空白对照组($P < 0.05$)。

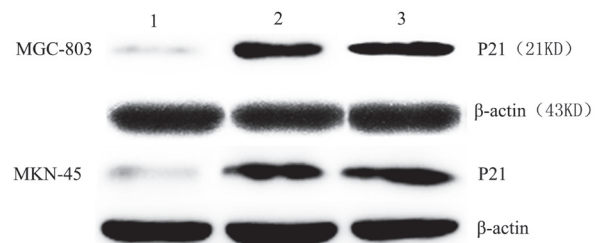


图3 Western blot检测P21cip1的表达结果

1.siRNA干扰组;2.阴性对照组;3.空白对照组

Fig.3 The expression of P21cip1 protein in each group by Western blot
1.siRNA interference group 2.negative control group 3.blank control group

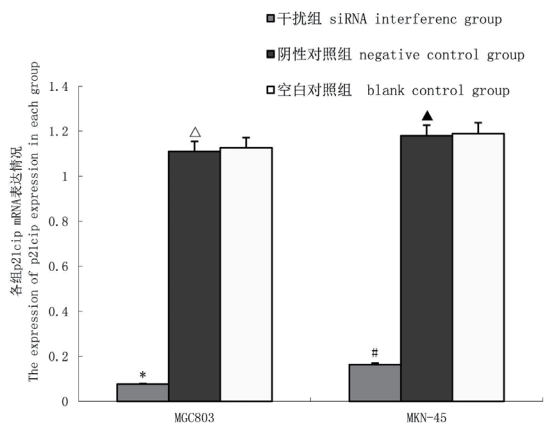


图4 各组p21cip1mRAN定量分析结果

注:与空白对照组相比, $\Delta P > 0.05$, $\Delta P > 0.05$; 与阴性对照组相比, $*P < 0.05$, $\#P < 0.05$

Fig.4 The quantitative analysis results of p21cip1 mRAN in each group Compared with the blank control group, $\Delta P > 0.05$, $\Delta P > 0.05$; Compared with the negative control group, $*P < 0.05$, $\#P < 0.05$

2.3 Western blot检测敲低ANXA5的两种胃癌细胞CyclinD1蛋白的表达

各组CyclinD1蛋白表达情况(图5), 干扰组CyclinD1蛋白的表达水平显著低于阴性对照组和空白对照组

($P < 0.05$)。

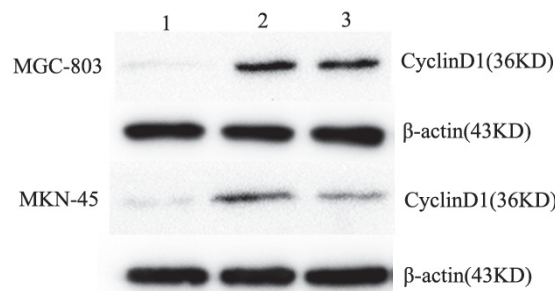


图5 Western blot检测CyclinD1的表达结果

1.siRNA干扰组; 2.阴性对照组; 3.空白对照组

Fig.5 The expression of CyclinD1 proein in each group by Western blot

1.siRNA interference group 2.negative control group 3.blank control group

2.4 细胞周期检测结果

与阴性对照组和空白对照组相比, 干扰组两种细胞G1期比例分别为: MGC803细胞(72.0567 ± 0.2469), MKN-45细胞(65.4333 ± 0.6724), 明显高于阴性对照组(61.2133 ± 0.732 ; 58.1533 ± 0.6842)和空白对照组(63.9600 ± 0.6701 ; 54.0167 ± 0.1747) ($P < 0.05$)。

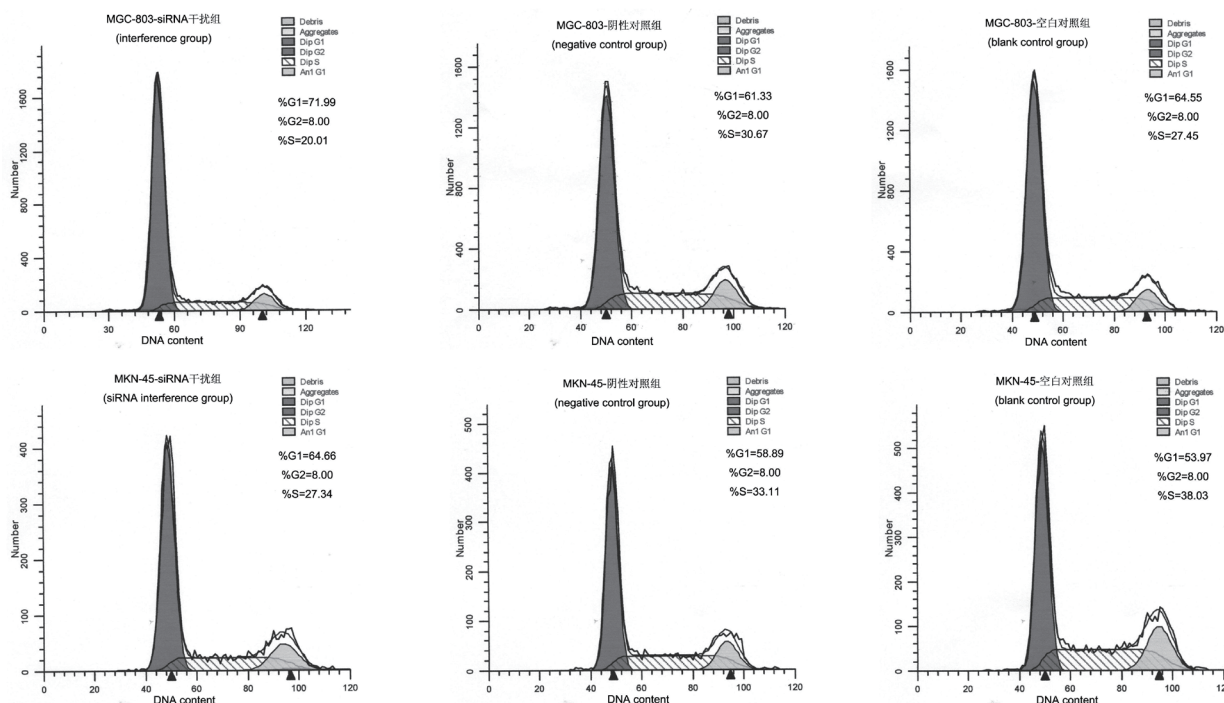


图6 各组细胞周期分析结果

Fig.6 Results of cell cycle analysis in each group

3 讨论

胃癌是一种消化道常见肿瘤,据统计,近年来胃癌的发病率在全球已经位居第5位,而在我国,已经位列第2名^[6],虽然近年来胃癌的发生率有所下降,但其高死亡率已经对全球造成了沉重的负担。随着基因治疗的不断发展,寻找针对胃癌特异、灵敏而有效的诊疗靶点迫在眉睫。

ANXA5是膜联蛋白家族的一个重要成员,课题组近年来研究了ANXA5与宫颈癌发生发展的关联,发现ANXA5在宫颈癌组织中异常的高表达,在人宫颈癌HeLa细胞中敲低ANXA5的表达可抑制HeLa细胞的凋亡^[7],促进HeLa细胞的迁移性和侵袭性^[8]。关于ANXA5与消化道肿瘤的研究,目前已有研究表明ANXA5在肝癌、结直肠癌、胰腺癌等消化道肿瘤中均存在异常的高表达^[9-11],但关于ANXA5与胃癌的研究国内外报道较少,其在胃癌发生发展过程中是否发挥了作用,发挥了怎样的作用呢?本研究通过RNA干扰法将靶向ANXA5的siRNA转染胃癌MGC-803和MGC-45细胞,检测两株细胞敲低ANXA5的表达之后,p21cip1和CyclinD1的表达情况。

p21cip1基因是位于6号染色体短臂上的单拷贝基因,DNA长度为85kb,由3个外显子构成。由p21cip1基因编码的P21cip1蛋白是一种广泛的细胞周期素依赖激酶(CDK)抑制剂,对细胞周期晚期存在的细胞周期素(Cyclin)-CDK复合物具有广泛的抑制作用,但与众不同的是,P21cip1能够抑制其他在整个细胞周期中起作用的Cyclin-CDK复合体,但在G1期却能够刺激CyclinD-CDK4/6复合物的形成,P21cip1可通过增强CyclinD-CDK4/6复合体的组装,并调控该复合体的胞内定位而促进G1期的进程^[12]。本研究发现敲低ANXA5之后,两种胃癌细胞的P21cip1蛋白表达均降低,于是我们思考,P21cip1的降低会不会影响到CyclinD-CDK4/6复合物的形成呢?于是本研究继续检测了各组CyclinD1的表达情况。

人类CyclinD1蛋白由CCND1基因编码,由295个氨基酸构成,分子量为34KD。CyclinD1是一个重要的细胞周期正向调控子,通过结合CDK4/6并活化来促进G1/S期的过渡^[13]。CyclinD1在G0期大量合成,其复合体在G1期达到最高水平,而在S期下降^[14],CyclinD1的表达升高会加快G1/S进程,促进细胞的增殖^[15]。本研究发现敲低ANXA5之后CyclinD1的表达发生下调,我们推测细胞的周期进程

在G1期发生了阻滞,于是我们又采用流式细胞术检测了两种细胞各组的细胞周期变化情况,结果发现干扰组G1期细胞的比例显著高于对照组,这一结果印证了我们的推测。

综上,我们推测,ANXA5的敲低下调了P21cip1的表达水平,这使得P21cip1对CyclinD-CDK4/6复合物的刺激作用减弱,未得到足够刺激信号的CyclinD1未能大量蓄积,也发生了下调,CyclinD1的下调严重影响了G1/S进程,从而导致细胞周期在G1期发生了阻滞。

目前,胃癌的发生机制尚不清楚,而P21cip1是细胞周期调控通路上一个关键因子,我们会继续在胃癌细胞中研究ANXA5影响细胞周期的机制,为阐明胃癌的发生机制奠定一定的理论基础,更期待ANXA5能够成为胃癌基因治疗的备选靶点。

参考文献

- [1] Linlin Gong, Haoqi Zhao, Lan Wang, et al. Upregulation of annexin A5 affects the biological behaviors of lung squamous carcinoma cells in vitro[J]. Chinese Science Bulletin, 2014, 59(28): 3610-3620.
- [2] Boya Peng, Chunmei Gao, Hongwei Guan, et al. Annexin A5 as a potential marker in tumors[J]. Clinica Chimica Acta, 2014, 427: 42-48.
- [3] Wang B. Analyzing cell cycle checkpoints in response to ionizing radiation on Mammalian cells[J]. Methods Mol Bio, 2014, 1170: 313-320.
- [4] Flores JM, Martin-Caballero J, Garcia-Fernandez RA. P21 and p27 a shared senescence history[J]. Cell Cycle, 2014, 13(11): 1655-1656.
- [5] Aijun Chen, Xin Huang, Zhenan Xue, et al. The Role of p21 in Apoptosis, Proliferation, Cell Cycle Arrest, and Antioxidant Activity in UVB-Irradiated Human HaCaT Keratinocytes[J]. Med Sci Monit Basic Res, 2015, 21: 86-95.
- [6] Piazuolo MB, Correa P. Gastric cancer: overview[J]. Colomb Med(Cali), 2013, 44(3): 192-201.
- [7] 李欣,周晓春,许倩,等.膜联蛋白A5低表达对人宫颈癌细胞系HeLa细胞增殖与凋亡的影响[J].解剖学报,2009,40(1): 48-51.
- [8] 王小杰,杨艳丽,田焕娜,等.膜联蛋白A5低表达对人宫颈癌HeLa细胞迁移和侵袭的影响[J].解剖学报,2016,47(4): 487-492.

- [9] Guo W, Man X, Yuan H, et al. Proteomic analysis on portal vein tumor thrombus associated proteins for hepatocellular carcinoma[J]. *Natl Med J China*, 2007, 87(30): 2094-2097.
- [10] Xue G, Hao L, Ding F, et al. Expression of annexin A5 is associated with higher tumor stage and poor prognosis in colorectal adenocarcinomas[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2009, 43(9): 831-837.
- [11] Cui Y, Zhang D, Jia Q, et al. Proteomic and tissue array profiling identifies elevated hypoxia-regulated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(7): 747-755.
- [12] A Novel, Non-Apoptotic Role for Scythe/BAT3: A Functional Switch between the Pro-and Anti-Proliferative Roles of p21 during the Cell Cycle[J]. *PloS ONE*, 2012, 7(6): e38085.
- [13] Wei M, Zhu L, Li Y, et al. Knocking down cyclin D1b inhibits breast cancer cell growth and suppresses tumor development in a breast cancer model[J]. *Cancer Science*, 2011, 1202(8): 1537-1544.
- [14] Yi Ru, Xiao-Jie Chen, Zhi-Wei Zhao, et al. CyclinD1 and p57kip2 as biomarkers in differentiation, metastasis and prognosis of gastric cardia adenocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 73860-73870.
- [15] Patel H, Abduljabbar R, Lai CF, et al. CDK7, cyclin H and MAT1 is elevated in breast cancer and is prognostic in estrogen receptor-positive breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(3): 5929-5938.