

膜联蛋白 A1 在不同骨转移潜能的肺癌细胞中的表达差异研究

马丽 庞海林 王华贝 周菁 刘娜 张峰 刘理礼 张贺龙

【摘要】 目的 探究膜联蛋白 A1 (AnnexinA1) 在肺癌骨转移中的表达及意义。方法 应用 RT-PCR 和 Western blot 分别从 mRNA 水平和蛋白水平检测不同骨转移潜能肺癌细胞系 SBC-5 与 SBC-3 中 AnnexinA1 的表达差异;通过免疫化学方法分别从细胞和组织中检测 AnnexinA1 的表达差异。结果 AnnexinA1 在产生骨转移的肺癌细胞 SBC-5 中的表达强度明显高于非骨转移肺癌细胞 SBC-3。伴有肺癌骨转移者 AnnexinA1 表达阳性率为 97.1% (33/34), 无骨转移者 AnnexinA1 表达阳性率为 43.3% (13/30), 其差异有显著性 ($P < 0.05$)。结论 AnnexinA1 表达与肺癌骨转移可能相关。

【关键词】 肺癌; AnnexinA1; 骨转移

Study on the relationship between AnnexinA1 expression and bone metastases in different lung cancer cell lines MA Li, PANG Hai-lin, WANG Hua-bei, ZHOU Jing, LIU Na, ZHANG Feng, LIU Li-li, ZHANG He-long. Department of Oncology, Tangdu Comprehensive Cancer Center, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

Corresponding author: ZHANG He-long, Email: zhanghelong@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the role of AnnexinA1 in lung cancer with bone metastasis. **Methods** RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of AnnexinA1 mRNA and protein in two human SCLC cell lines, SBC-3 and SBC-5, which have different potential to bone metastasis. The expression of AnnexinA1 in lung cancer cell and tissue were also determined by immunohistochemistry. **Results** AnnexinA1 was more highly expressed in lung cancer tissue with bone metastasis than those with no bone metastasis (97.1% vs. 43.3%, $P < 0.05$), AnnexinA1 was also expressed higher in SBC-5 than in SBC-3 cell. **Conclusions** The expression of AnnexinA1 may have a correlation with bone metastasis in lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms; AnnexinA1; Bone metastases

肺癌的发病率和死亡率列恶性肿瘤的首位。晚期常伴有转移,骨骼是其常见的转移部位之一,发生骨转移的患者约占肺癌的 30%~40%,但目前对肺癌骨转移的机制还不太清楚。

膜联蛋白 A1 (AnnexinA1) 是一个 37 kDa 的钙依赖的磷脂结合蛋白,在细胞中含量较高(占细胞蛋白质含量的 0.5%~2%),参与膜转运及信号传导、调控炎症反应、细胞分化和细胞骨架蛋白间的相互作用等膜表面一系列依赖于钙调蛋白的活动^[1]。有研究表明,AnnexinA1 在食管腺癌、胃腺癌、大肠腺癌、肾细胞癌中高表达,而在食管鳞状细胞癌、前列腺癌中低表达或缺失^[2],提示 AnnexinA1 可能参与调节恶性肿瘤的侵袭/转移过程,但是 AnnexinA1 与肺癌骨转移的发生是否

相关并不清楚,SBC-5 是小细胞肺癌骨转移细胞株,SBC-3 是不发生骨转移的小细胞肺癌细胞株。本实验拟通过免疫化学、RT-PCR 和 Western blot 等方法来探讨 AnnexinA1 是否在肺癌骨转移中发挥作用。

材料和方法

一、材料

1. 细胞:SBC-5 和 SBC-3 细胞系由日本德岛大学 Sone 教授惠赠,并由我科保存。培养条件:RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清),37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2. 材料与试剂:收集我院 2009 年 6 月至 2010 年 6 月的临床肺癌组织石蜡切片标本 64 例(其中鳞癌 20 例、腺癌 21 例、小细胞肺癌 23 例)。主要试剂:兔抗人 AnnexinA1 多克隆抗体,两步法免疫组化试剂盒,DAB 染色试剂盒(均购自武汉博士德公司);HRP 标记的山羊抗兔的二抗(中杉),预染蛋白 Marker 和 BCA 蛋白定

量盒(购自天根生化科技有限公司); NC膜(Millipore), ECL试剂盒(Thermo), 胶片(柯达), RT-PCR试剂盒(Takara)。主要仪器: PCR仪(Bio-Rad), 凝胶成像仪(Bio-Rad), 倒置显微镜(Olympus), 低温高速离心机(Sigma)。

二、方法

1. 免疫化学法: 细胞化学: 将细胞 SBC-3 和 SBC-5 分别爬片, 用 4% 多聚甲醛固定后, 3% 的过氧化氢室温 10 min 灭活内源性酶, 95 °C 抗原热修复 10 min, 5% 的脱脂牛奶封闭 10 min, 一抗 4 °C 封闭过夜, 1 × PBS 漂洗 3 次, 滴加二抗, 37 °C 孵育 30 min, 1 × PBS 漂洗 3 次, DAB 显色, 镜下控制反应时间。苏木素轻度复染, 脱水透明, 封片。组织化学: 将肺癌组织蜡块 5 μm 厚切片, 附着于载玻片上, 室温空气干燥, 65 °C 烤箱中加热 2 h。常规二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水, 3% H₂O₂ 37 °C 孵育 10 min 灭活内源性过氧化物酶, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 切片置于 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 中煮沸 (95 °C, 15 min) 抗原修复, 自然冷却至室温, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 正常羊血清 37 °C 封闭 10 min, 滴加一抗 4 °C 杂交过夜, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 与 HRP 标记的二抗 37 °C 杂交 30 min, DAB 显色。以阳性片显色强度进行染色时间控制, 苏木素复染, 脱水透明, 封片。结果判定: 阳性染色为棕黄色颗粒, 位于胞质和胞膜, 切片在 200 倍视野下计算阳性细胞数, 分级方法如下: (-) 为无棕黄色颗粒, (+) 为阳性细胞数小于 25%, (++) 为阳性细胞数在 25% ~ 50%, (+++) 为阳性细胞数大于 50%, “+” 以上为计算阳性例数的标准。

2. RT-PCR: 待细胞培养至对数生长期后, 收集细胞, 加入 500 μl Trizol, 加入氯仿 200 μl, 剧烈振荡 15 s, 室温放置 3 min, 12 000 × g 4 °C 离心 15 min, 吸取无色水相入新的 EP 管中, 500 μl 异丙醇沉淀 RNA, 12 000 × g 4 °C 离心 10 min, 弃上清, 1 ml 75% 乙醇洗涤沉淀, 7500 × g 4 °C 离心 5 min, 弃上清, 室温空气干燥沉淀, 加入 30 μl ddH₂O 溶解沉淀, 用紫外分光光度计定量。按 PrimeScriptRT Master Mix (Perfec Real Time) 说明书进行反转录, AnnexinA1 PCR 扩增正向和反向引物序列

分别为 5'-GCAGAAGGTAGAGATAAAG-3' 和 5'-ATCTCTCTCAGTTCCTCTC-3', 扩长度 523 bp, 对应基因库中 gi: 11878001 mRNA 序列 149 ~ 671 位核苷酸。β-actin PCR 扩增正向和反向引物序列分别为 5'-GATCATTGCTCCTCCTGAGC-3' 和 5'-CACCTTCACCGTTC-CAGTTT-3', 扩增长度 308 bp, 对应基因库中 gi: 5016088 mRNA 序列 1057 ~ 1364 位核苷酸。反应条件: 预变性 94 °C 3 min 后, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环后延伸 72 °C 5 min, 扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳后成像。

3. Western blot: 常规提取细胞总蛋白, 按 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量后制样。在 SDS-聚丙烯酰胺电泳。然后转印至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂牛奶摇床封闭 2 h, 加入一抗薄膜封口, 摇床 (60 r/min) 上 4 °C 过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 加入 HRP 标记的羊抗兔抗体, 室温杂交 1 h, ECL 显影, 曝光。

三、统计学分析

采用 SPSS 17.0 进行统计学分析, AnnexinA1 表达强度两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, AnnexinA1 表达阳性率的组间比较采用 Fisher 精确概率法。P < 0.05 认为差异具有统计学意义。

结 果

免疫细胞化学和免疫组织化学结果显示, AnnexinA1 存在于胞质及胞膜上, AnnexinA1 在骨转移细胞株 SBC-5 和骨转移肺癌组织中多数呈强阳性表达 (+++), 而在非骨转移肺癌细胞株 SBC-3 和非骨转移肺癌组织中多数呈弱阳性表达 (+)。提示 AnnexinA1 的表达与肺癌骨转移可能相关。见图 1。

从表 1 可以看出 AnnexinA1 在非骨转移组与骨转移组的阳性率有明显差异, 分别为 43.3% 和 97.1%。在不同组织类型中非骨转移组与骨转移组的阳性率也不相同, 肺鳞癌为 55.6% 和 100%, 肺腺癌为 33.3% 和 91.7%, 小细胞肺癌为 41.7% 和 100%。综上所述, 肺鳞癌、肺腺癌和小细胞肺癌 AnnexinA1 的阳性率骨转移组较非骨转移组都高。我们采用 Mann-Whitney U 检验

表 1 AnnexinA1 在肺癌组织中的表达(例)

组织分型	非骨转移组 (n = 30)				骨转移组 (n = 34)				U 值 ^a	P 值 ^b
	-	+	++	+++	-	+	++	+++		
鳞癌	4	2	2	1	0	2	4	5	2.439	0.015
腺癌	6	3	0	0	1	2	2	7	3.346	0.001
小细胞肺癌	7	3	2	0	0	0	5	6	3.903	0.000

注: ^a: Mann-Whitney U 检验的统计量 U 值; ^b: Mann-Whitney U 检验的 P 值

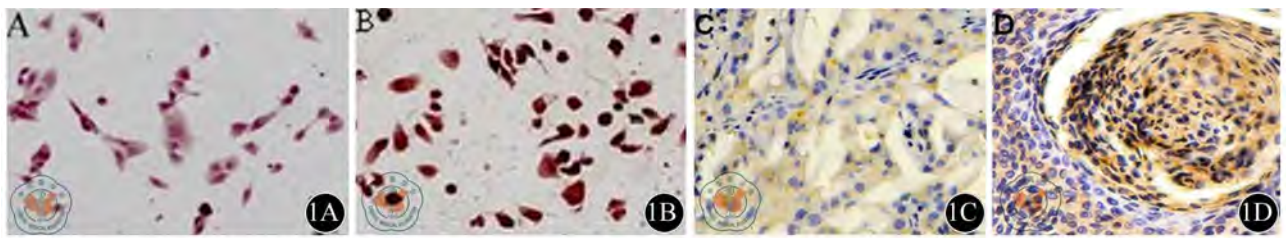


图1 1A: AnnexinA1在SBC-3中的表达(SP×400); 1B: AnnexinA1在SBC-5中的表达(SP×400); 1C: AnnexinA1在非骨转移肺癌组织中的表达(SP×400); 1D: AnnexinA1在骨转移肺癌组织中的表达(SP×400)

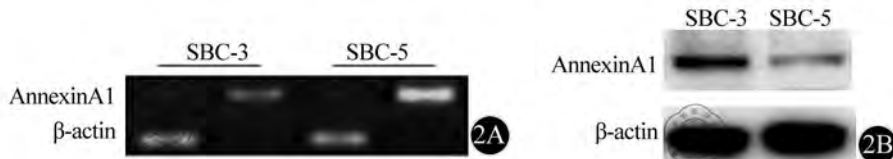


图2 2A: RT-PCR检测AnnexinA1在SBC-5和SBC-3细胞中的表达; 2B: Western blot检测AnnexinA1在SBC-5和SBC-3细胞中的表达

发现在肺癌骨转移组($n = 34$)和非骨转移组($n = 30$) AnnexinA1的表达强度也有统计学差异($U = 5.719$, $P = 0.000$),按不同组织类型,肺鳞癌($U = 2.439$, $P = 0.015$)、肺腺癌($U = 3.346$, $P = 0.001$)、小细胞肺癌($U = 3.903$, $P = 0.000$),其 P 值均小于0.05。表明在不同组织类型中非骨转移组与骨转移组中 AnnexinA1的表达强度也有统计学差异;采用 Kruskal-Wallis H 检验发现 AnnexinA1 在鳞癌组($n = 20$)、腺癌组($n = 21$)和小细胞癌组($n = 23$)中的表达强度无统计学差异($H = 0.473$, $P = 0.789$)。

RT-PCR 和 Western Blot 分别从 mRNA 和蛋白水平检测 AnnexinA1 在 SBC-5 和 SBC-3 细胞株中的表达,结果显示 AnnexinA1 在肺癌骨转移细胞株 SBC-5 的表达明显高于非骨转移细胞株 SBC-3 中的表达。见图 2。

讨 论

AnnexinA1 由钙或钙离子和磷脂结合蛋白组成,编码这种蛋白质的基因位于染色体 19q24,整个超家族具有很大程度的生物和结构同源性(40%~60%)^[1]。AnnexinA1 与家族中其他成员的区别在于它在未结合钙离子的时候,其第Ⅲ重复序列和 N-端的疏水结构域都是由 N-端前 12 个氨基酸残基构成,并代替 D 螺旋包裹在第Ⅲ重复序列的核心位点中,而 D 螺旋则位于 N 端螺旋外侧^[3]。其 C 端结构域通过疏水作用与 cPLA2 的特异位点结合,干扰 cPLA2 与质膜结合,抑制 cPLA2 的活性进而阻遏 cfos 等原癌基因的表达^[4-5]。AnnexinA1 为表皮生长因子受体(EGFR)激酶和蛋白激酶 C 的磷酸化底物,可以通过调控肿瘤细胞的生长、迁移、黏附或肿瘤免疫等途径影响肿瘤细胞的侵袭和转移能力。

AnnexinA1 在不同的组织中具有特征性的表达,且正常组织与肿瘤及癌前病变组织存在表达差异^[6]。在

宫颈鳞状上皮、食管、组织巨噬细胞及外周血白细胞中 AnnexinA1 高表达^[7],而在肝细胞、胃肠道腺上皮、胰岛外分泌腺的泡心和管状细胞中不表达。AnnexinA1 在 B 细胞淋巴瘤、头颈癌中表达下调,而在肺腺癌、胰腺癌、肾癌中表达上调。可见 AnnexinA1 表达对多种肿瘤的发生和进展都有影响,然而由于受其他基因表达差异的作用,在不同的肿瘤中 AnnexinA1 对肿瘤的发生、发展及转移可发挥不同的作用。

肺癌骨转移是多基因、多因素、多机制共同参与的复杂病理过程,AnnexinA1 的表达水平在转移过程中也发生相应变化。AnnexinA1 可通过影响钙黏着蛋白(E-cadherin)的表达,调节细胞间的黏附能力以及细胞集落形成能力^[8]。E-cadherin 是一种抑制癌细胞侵袭和转移的黏附分子,通过 E-cad/cat 复合体发挥其功能。高表达 AnnexinA1 可能使其复合体结构破坏或功能障碍,导致癌细胞间黏连松散、易脱离原发灶发生浸润转移,肺癌细胞膜表面的受体与骨基质中的趋化因子相互作用促进肺癌细胞的特异性骨转移。还可通过影响不同信号转导通路成员,诱导肺癌细胞骨架重排,促进肺癌细胞紧密黏附于内皮细胞,使癌细胞在骨组织中循趋化因子浓度梯度进入特定的部位。同时,肿瘤细胞的转移能力往往与肿瘤细胞的抗凋亡能力正相关^[9],抗凋亡效应的增加,使肺癌细胞在骨组织特定部位得以存活定居并形成骨转移灶。有研究证实 AnnexinA1 与胞内 PLA2 结合后,可抑制 PLA2 活性,从而抑制细胞增生,阻碍肿瘤形成^[10],然而当组织发生病理变化时,AnnexinA1 抑制 PLA2 的作用减弱或消失,使机体组织产生过多的具有抗凋亡的前列腺素类因子,促进细胞过度增殖形成肿瘤。

此外,有文献报道腺癌组织中 AnnexinA1 与增殖细胞核抗原(PCNA)的表达存在明显的正相关^[11],且

在肺癌组织中 PCNA 表达显著高于正常肺组织,其表达与肺癌分化程度、淋巴结转移有关^[12]。PCNA 是在细胞周期调控中发挥重要作用的一种核蛋白,在 DNA 合成的 G 期开始增加, S 期达高峰, G/M 期明显下降,是反映细胞增殖的重要指标^[13]。因此在肺癌中 AnnexinA1 可能与 PCNA 的高表达发挥细胞增殖的效应相关,在高度增殖的癌组织中,肿瘤细胞间压力增大,细胞间的黏附性降低,致使肿瘤细胞更易于脱离原发灶向远处扩散、转移。

本研究证实, AnnexinA1 的 mRNA 和蛋白质水平在骨转移肺癌组织和细胞株中高表达。已知肺癌骨转移绝大多数为溶骨性转移,肺癌细胞通过激活破骨细胞引起局部骨质破坏,为肺癌发生骨转移提供条件,破骨细胞是肺癌骨转移过程中的关键因素^[14-15]。高表达 AnnexinA1 的肺癌细胞可能通过与破骨细胞类似的机制,特异性的识别、黏附、迁移于骨基质。我们推测 AnnexinA1 可能通过诱导破骨细胞分化促进肺癌细胞激活破骨细胞溶骨性破坏的作用,从而对肺癌骨转移起到一定的促进作用, SBC-5 细胞强骨转移活性可能与该细胞株 AnnexinA1 的显著高表达有关, AnnexinA1 为肺癌骨转移的正向调节因子。然而 AnnexinA1 在肺癌骨转移中发挥作用及确切机制可能比较复杂,还依赖于更多的研究证实,我们后续的研究也拟将通过体内外实验探索 AnnexinA1 在肺癌骨转移的作用及可能机制。

参 考 文 献

- [1] Lim LH, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J*, 2007, 21: 968-975.
- [2] Wang YF, Piao YS, Lu DH, et al. Diagnostic use of D2-40 and annexin1 in ependymal tumors. *Zhonghua BingLi Xue Za zhi*, 2011, 40: 595-598.

- [3] Shesham RD, Bartolotti LJ, Li Y. Molecular dynamics simulation studies on Ca^{2+} -induced conformational changes of annexin I. *Protein Eng Des Sel*, 2008, 21: 115-120.
- [4] Damazo AS, Sampaio AL, Nakate CM, et al. Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. *BMC Immunol*, 2011, 12: 59.
- [5] Kim SW, Rhee III, Ko J, et al. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I: specific interaction model and mapping of the interaction site. *J Biol Chem*, 2001, 276: 15712-15779.
- [6] 刘腊军, 徐爱君, 方秀根. Annexin I 蛋白在人前列腺癌中的表达及临床意义. *现代生物医学进展*, 2008, 5: 910-912.
- [7] Dreier R, Schmid KW, Gerke V, et al. Differential expression of annexin I, II and IV in human tissues: An immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol*, 1998, 110: 137-148.
- [8] Liu YF, Zhang PF, Li MY, et al. Identification of annexin A1 as a pro-invasive and prognostic factor for lung adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis*, 2011, 28: 413-425.
- [9] Cicek M, Samant RS, Kinter M, et al. Identification of metastasis-associated proteins through protein analysis of metastatic MDA-MB-435 and metastasis suppressed BRMS1 transfected MDA-MB-435 cells. *Clin Exp Metastasis*, 2004, 21: 149-157.
- [10] Sakaguchi M, Murata H, Sonogawa H, et al. Truncation of annexin A1 is a regulatory lever for linking epidermal growth factor signaling with cytosolic phospholipase A2 in normal and malignant squamous epithelial cells. *Biol Chem*, 2007, 282: 35679-35686.
- [11] 倪晓光, 白晓枫, 王贵齐. 膜联蛋白 A1 和增殖细胞核抗原在胰腺癌组织中的表达及其相互关系. *中华胰腺病杂志*, 2010, 10: 326-328.
- [12] Goya M, Yonou H, Saito S. Mechanism of the development of osteoblastic bone metastasis of prostate cancer. *Nihon Rinsho*, 2011, 69 Suppl 5: 638-644.
- [13] Sone S, Yano S. Molecular pathogenesis and its therapeutic modalities of lung cancer metastasis to bone. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26: 685-689.
- [14] Naryzhny SN. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 3789-3808.
- [15] 翁密霞, 吴翠环, 杨秀萍. E-cadherin、CD44V6 和 PCNA 在非小细胞肺癌组织中的表达及意义. *癌症*, 2008, 27: 191-195.

(收稿日期: 2011-12-20)

(本文编辑: 张岚)

马丽, 庞海林, 王华贝, 等. 膜联蛋白 A1 在不同骨转移潜能的肺癌细胞中的表达差异研究[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(14): 3925-3928.