

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01029

膜联蛋白 A7 表达稳定下调的小鼠肝癌 Hca-F 细胞株的建立

王志强¹, 唐建武^{2*}, 王绍青², 孙成荣³, 王波²

1. 大连医科大学第一附属医院耳鼻喉科, 大连 116011

2. 大连医科大学病理学教研室, 大连 116044

3. 大连市第五人民医院肿瘤科, 大连 116021

[摘要] 目的: 建立针对膜联蛋白 A7(annexin A7)的 shRNA(small hairpin RNA)稳定转染的小鼠肝癌细胞株 Hca-F, 为后续研究奠定基础。方法: 构建 3 条针对 annexin A7 的 shRNA(shRNA1, 2, 3), 分别与 pSilencer 连接, 构建表达载体并分别转染 Hca-F 细胞, 在 mRNA 和蛋白质水平比较 3 条 shRNA 对 annexin A7 表达的抑制作用, 筛选抑制效果最好的 shRNA 转染 Hca-F。稳转后用含 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 的完全培养基筛选, 获得 annexin A7 表达稳定下调的 Hca-F 细胞株后传代扩增, 应用 Western 印迹法检测 Hca-F 细胞 annexin A7 蛋白的表达, 并与空载体转染组及正常对照组进行比较。结果: 经 DNA 测序鉴定, 所得干扰序列与 GenBank 中序列一致; 筛选出其中 shRNA1 对 annexin A7 的表达抑制效果最好。pSilencer-shRNA1 转染 Hca-F 细胞株后, annexin A7 蛋白的表达远低于空载体转染组和正常对照组(0.318 6 vs 0.798 7, 0.824 3, $P < 0.05$), 而后二者间无统计学差异。结论: 成功建立了 annexin A7 表达稳定下调的小鼠肝癌 Hca-F 细胞株, 为后续研究奠定了基础。

[关键词] 膜联蛋白 A7; RNA 干扰; 转染; 肝肿瘤; 淋巴转移

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)09-1029-05

Establishment of mouse hepatic cancer cell line Hca-F with knockdown of annexin A7 gene

WANG Zhi-qiang¹, TANG Jian-wu^{2*}, WANG Shao-qing², SUN Cheng-rong³, WANG Bo²

1. Department of Otorhinolaryngology, The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China

2. Department of Pathology, Dalian Medical University, Dalian 116044

3. Department of Oncology, The 5th People's Hospital of Dalian, Dalian 116021

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a mouse hepatic cancer cell line Hca-F transfected with shRNA (small hairpin RNA) targeting annexin A7, so as to provide a basis for future study. **Methods:** Three shRNAs(shRNA1, 2 and 3) were designed and inserted into the pSilencer vector to silence annexin A7 gene. The three pSilencer-shRNA vectors were transfected into Hca-F cells separately, and the most effective pSilencer-shRNA vector was selected based on the results of RT-PCR and Western blotting. The Hca-F cells were transfected with the most effective pSilencer-shRNA vector and the transfectants were selected by 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418. The cells with annexin A7 stably knockdown were passaged and the expression of annexin A7 was confirmed by Western blotting, and the result was compared with those transfected with empty vector and normal controls.

Results: The sequencing results confirmed that the sequences of the 3 shRNAs were correct, and shRNA1 was found to have the best inhibitory effect against annexin A7. Compared with normal Hca-F cells and those transfected with empty vectors, the annexin A7 protein expression was significantly down-regulated in cells transfected with pSilencer-shRNA(0.318 6 vs 0.824 3, 0.798 7, $P < 0.05$), with no significant difference found between the former 2 groups. **Conclusion:** We have successfully established a Hca-F cell line with annexin A7 stably down-regulated using shRNA technique, paving a way for future study.

[KEY WORDS] annexin A7; RNA interference; transfection; liver neoplasms; lymphatic metastasis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(9):1029-1033]

恶性肿瘤淋巴道转移与很多蛋白有关, 调控相关蛋白的表达可能会改变肿瘤的生物特性, 抑制

[收稿日期] 2008-03-11 **[接受日期]** 2008-05-22

[基金项目] 国家自然科学基金(30572098, 30772468), 高等学校博士学科点专项科研基金(20040161005). Supported by National Natural Science Foundation of China (30572098, 30772468) and Specialized Research Foundation for the Doctoral Program of Higher Education (20040161005).

[作者简介] 王志强, 教授. E-mail: wangzqx@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0411-86110297, E-mail: jianwutang@163.com

其淋巴道转移潜能^[1-3]。本研究前期采用定量蛋白质组学技术对来源于同一亲本、遗传背景相似、但淋巴道转移潜能不同的小鼠肝癌细胞株(Hca-F、Hca-P)筛选差异表达蛋白,结果发现膜联蛋白A7(annexin A7)在高淋巴道转移潜能的Hca-F细胞株中表达高于低淋巴道转移潜能的Hca-P细胞株^[4-5]。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)一般用于阻断哺乳动物系统某一特定基因的表达^[6],产生类似基因敲除的效应,目前被广泛用于干扰细胞中特定基因的表达,以探讨基因的生物学功能。本研究采用RNAi技术筛选针对annexin A7基因的高效shRNA(small hairpin RNA)序列,并将其转染Hca-F细胞,建立annexin A7稳定下调表达的Hca-F细胞株,为进一步探讨annexin A7基因与Hca-F高淋巴道转移潜能的关系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂 PCR仪Life Express(大和公司),紫外分光光度计HP 8453(HP公司),凝胶图像分析系统BioSenSC300(上海山富科学仪器有限公司),低温高速离心机Biofuge 28RS(Heraeus公司),恒温水浴箱Model DK-8D(上海森信实验仪器有限公司),恒温摇床(江苏太仓科教仪器有限公司)。pSilencer质粒(上海之江生物公司),TRIzol,引物(Invitrogen公司),逆转录酶MMLV、Taq酶(Promega公司),琼脂糖(Biowest公司),DNA Marker DL2000、限制性内切酶、T4 DNA连接酶(TaKaRa公司),3S柱式质粒抽提试剂盒(上海申能博采生物技术有限公司),Plasmid mini kit(Qiagen公司),琼脂糖DNA回收试剂盒(Watson Biotech公司),胰化蛋白胨、酵母提取物(Oxoid公司),Tween-20、丽春红、一抗anti-annexin A7 A4475(Sigma公司),二抗Donkey anti-mouse(Santa Cruz公司),Cell Lysis、Supersignal west femto kit(Pierce公司)。

1.2 shRNA表达载体的构建及鉴定

1.2.1 引物设计 根据GenBank中小鼠annexin A7基因序列(NM_009674.3)合成3条shRNA的DNA模板的2条单链,分别命名为shRNA1、shRNA2、shRNA3,shRNA1:5'-GAT CCG TCA GAA TTG AGT GGG AAT TTC AAG AGA ATT CCC ACT CAA TTC TGA CTT TTT TGG AAA-3',5'-AGC TTT TCC AAA AAA GTC AGA ATT GAG TGG GAA TTC TCT TGA AAT TCC CAC TCA ATT CTG ACG-3';shRNA2:5'-GAT CCG

CGA CTC TAC TAT TCC ATG ATT CAA GAG ATC ATG GAA TAG TAG AGT CGT TTT TTG GAA A-3',5'-AGC TTT TCC AAA AAA CGA CTC TAC TAT TCC ATG ATC TCT TGA ATC ATG GAA TAG TAG AGT CGC G-3';shRNA3:5'-GAT CCG CAA AGC AAT GAA AGG GTT CTC AAG AGA AAC CCT TTC ATT GCT TTG CGG TTT TTT GGA AA-3',5'-AGC TTT TCC AAA AAA CCG CAA AGC AAT GAA AGG GTT TCT CTT GAG AAC CCT TTC ATT GCT TTG CG-3'。所有引物由上海之江生物公司设计合成。

1.2.2 质粒抽提 将1 μ l pSilencer质粒转化DH-5 α 宿主菌感受态细胞,挑2个克隆,37 $^{\circ}$ C摇菌过夜。抽提pSilencer质粒,具体操作参照上海申能博采生物技术有限公司3S柱式质粒抽提试剂盒说明书。

1.2.3 pSilencer质粒的构建及鉴定 将pSilencer双酶切体系(15 U/ μ l的BamH I 2 μ l,15 U/ μ l的Hind III 2 μ l,10 \times K buffer 4 μ l,0.01% pSilencer质粒 10 μ l,ddH₂O 22 μ l)置于37 $^{\circ}$ C水浴酶切3 h后,经1.0%琼脂糖电泳,切胶回收约4 000 bp大小的酶切片段,回收操作参照Watson Biotech琼脂糖DNA回收试剂盒说明书。3条合成序列分别用TE buffer(pH=7.5)溶解,浓度为100 μ mol/L,分别取对应上下游引物按1:1混匀,使终浓度为50 μ mol/L。按下列参数退火:95 $^{\circ}$ C \times 30 s;72 $^{\circ}$ C \times 2 min;37 $^{\circ}$ C \times 2 min;25 $^{\circ}$ C \times 2 min,冷冻保存。3个体系分别于室温连接过夜。体系:T4 buffer 2.5 μ l,浓度350 U/ μ l的T4 DNA连接酶1 μ l,各约含0.3 pmol的退火后产物(shRNA1、shRNA2、shRNA3)各6 μ l,各约含0.3 pmol的pSilencer双酶切片段1 μ l,ddH₂O 14.5 μ l。连接产物分别转化DH-5 α 宿主菌感受态细胞,挑克隆,37 $^{\circ}$ C摇菌过夜。连接产物shRNA1、shRNA2、shRNA3质粒的抽提,具体操作参照Qiagen公司Plasmid mini kit试剂盒说明书。采用通用引物M13F(5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3')进行序列测定与比对。

1.3 shRNA的筛选 培养状态良好的Hca-F细胞(由大连医科大学病理学教研室提供),离心收集细胞,用无血清RPMI 1640培养基重悬细胞,铺6孔板,10⁶/孔,每孔600 μ l细胞悬液。实验分组:正常Hca-F细胞,转染shRNA1的Hca-F细胞,转染shRNA2的Hca-F细胞,转染shRNA3的Hca-F细胞。各取浓度为0.01%的质粒25 μ l,分别加入225 μ l无血清RPMI 1640培养基中,静置5 min;同时取10 μ l Lipofectamine 2000加入240 μ l无血清RPMI

1640 培养基中, 静置 5 min; 将以上 2 种液体轻轻混匀, 室温静置 20 min, 使脂质体包裹质粒; 轻轻混匀转染液体, 慢慢滴入培养皿中, 轻轻晃动培养皿后放入 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中, 培养 6 h; 换完全培养基 (含 10% FBS), 继续培养 24、48、72、96 h 后分别收集细胞, 抽提 RNA 和蛋白, 分别在 mRNA 和蛋白质水平检测 3 条 shRNA 对 annexin A7 表达的抑制作用, 并设正常 Hca-F 细胞为对照, 以筛选 RNAi 效果最好的 shRNA。

1.4 稳定转染 shRNA 的 Hca-F 的建立及鉴定

选择 1.3 项下筛选的 shRNA 转染 Hca-F 细胞, 以空转染细胞作为对照, 转染成功后更换完全培养基 (即含 10% FBS), 继续培养 24 h 后, 换含 400 μg/ml G418 的完全培养基筛选, 13 d 后大部分细胞死亡, 将存活的细胞转移至细胞瓶中用含 400 μg/ml G418 完全培养基培养, 传代并冻存。取两瓶细胞抽提蛋白、RNA。采用 Western 印迹检测空载体转染组、高效 shRNA 转染组及正常 Hca-F 细胞株中 annexin A7 蛋白表达情况。检测结果用凝胶图像分析系统 BioSenSC300 测定平均光密度值 ($n=3$), 计算转染前后 annexin A7/GAPDH 的值, 比较正常组、空载体转染组和高效质粒转染组间的表达差异。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计学软件进行分析, 定量数据采用 $\bar{x} \pm s$, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒抽提及测序结果 参照 Plasmid mini kit 试剂盒说明书抽提得到 shRNA1、shRNA2、shRNA3 质粒 (图 1)。采用通用引物 M13F 测序鉴定, 3 个表达载体中所含 3 条 shRNA 序列被正确检测出, 靶序列与 GenBank 中序列一致。

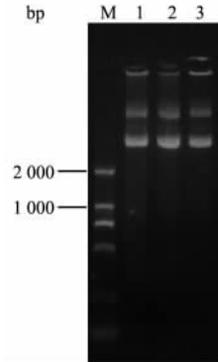


图 1 质粒抽提结果

Fig 1 Results of plasmid extracting

M: DNA marker; 1: pSilencer-shRNA1; 2: pSilencer-shRNA2; 3: pSilencer-shRNA3

2.2 shRNA 的筛选

2.2.1 mRNA 水平 pSilencer-shRNA1 转染后 24 h, 其抑制 annexin A7 表达的作用强于此时间点其他 shRNA 的抑制作用, 亦强于其他各时间点的抑制效果 (图 2)。

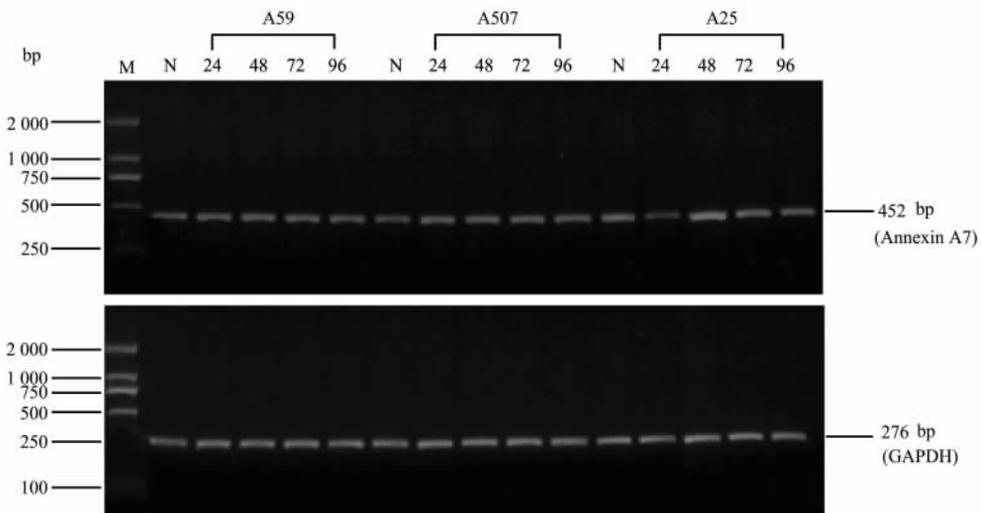


图 2 3 条 shRNA 在 mRNA 水平对 annexin A7 表达的抑制作用

Fig 2 Silencing of annexin A7 gene in Hca-F cells by three shRNA

M: DNA marker; N: Normal Hca-F; A25: pSilencer-shRNA1; A507: pSilencer-shRNA2; A59: pSilencer-shRNA3

2.2.2 蛋白质水平 pSilencer-shRNA1 转染后 72 h,其对 annexin A7 蛋白表达的抑制作用强于其他 shRNA。pSilencer-shRNA1 在蛋白水平对 annexin A7 表达的抑制作用要晚于核酸水平,这种蛋

白表达滞后是由于从 mRNA 翻译成蛋白这一时间差造成的,所以,本研究后续研究中选择 shRNA1 进行 Hca-F 细胞转染(图 3)。

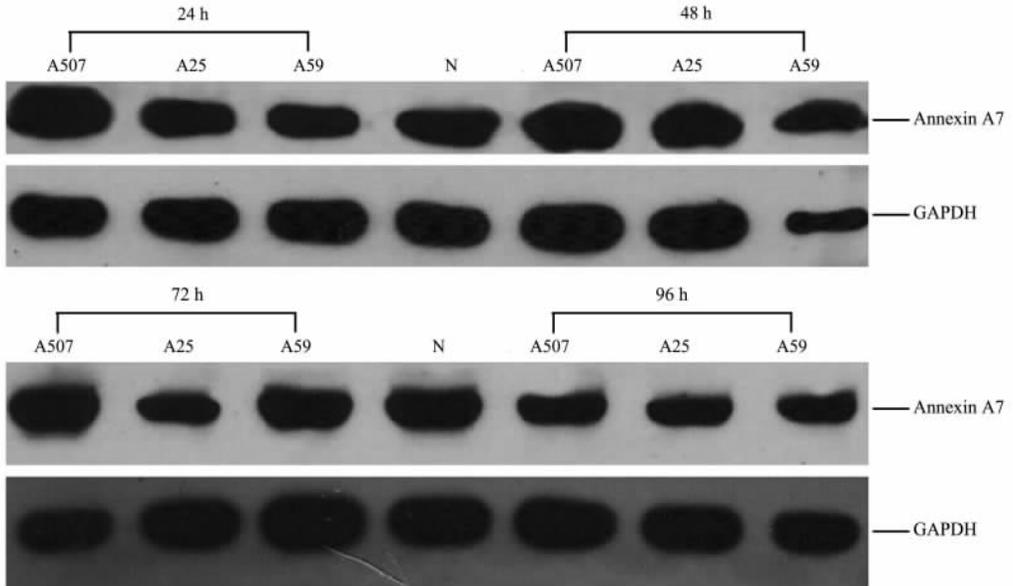


图 3 3 条 shRNA 在蛋白水平对 annexin A7 表达的抑制作用

Fig 3 Silencing of annexin A7 protein in Hca-F by three shRNA

A25:pSilencer-shRNA1;A507:pSilencer-shRNA2;A59:pSilencer-shRNA3;N:Normal Hca-F

2.3 稳定转染 shRNA1 的 Hca-F 细胞株的建立 Western印迹检测结果(图 4)显示:pSilencer-shRNA1 转染组的 Hca-F 细胞 annexin A7 蛋白表达明显低于转染空载体组和正常细胞组(0.318 6 vs 0.798 7,0.824 3, $P<0.05$),而后二者间无统计学差异。结果表明 shRNA1 已成功转入 Hca-F 细胞,且显著抑制了 annexin A7 蛋白的表达。

的恶性肿瘤,淋巴道转移是其早期转移的主要方式^[7],因此对于恶性肿瘤淋巴道转移机制进行研究,探索淋巴道转移的关键分子机制和通路,在此基础上发展出有效的干预手段,对于提高恶性肿瘤患者的生存率有重要意义。近年来,国内外对肿瘤淋巴道转移机制的研究,已经从细胞水平深入到基因和蛋白质水平。研究者利用不同的肿瘤细胞株为研究对象,发现 Ezrin(埃兹蛋白)^[8]、AF1Q^[9]、MMP-11^[10]等蛋白质在恶性肿瘤细胞中的异常高表达与肿瘤淋巴道转移潜能相关,采用 RNA 干扰、基因敲除等技术下调某些蛋白质表达水平,则可降低这些肿瘤的淋巴道转移能力,从而证实了这些蛋白与肿瘤淋巴道转移潜能的相关性。

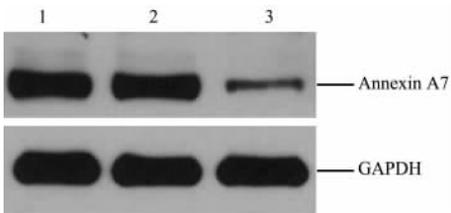


图 4 稳转 shRNA1 后 annexin A7 蛋白的表达

Fig 4 Down-regulated expression of annexin A7 protein of Hca-F by shRNA1

1: Normal Hca-F;2: Transfected by pSilencer;3: Transfected by pSilencer-shRNA1

本实验室的前期研究利用高淋巴道转移潜能的小鼠肝癌细胞株 Hca-F 和低淋巴道转移潜能的小鼠肝癌细胞株 Hca-P,筛选出与两株细胞淋巴道转移潜能相关的差异表达基因^[11-12],并在此基础上,利用定量蛋白质组学技术筛选出 Hca-F 和 Hca-P 细胞之间差异表达蛋白质^[5]。其中,无论在基因还是在蛋白质水平,annexin A7 在 Hca-F 细胞中的表达都显著高于其在 Hca-P 的表达,提示 annexin A7 蛋白可能在肿瘤淋巴道转移过程中发挥作用。

3 讨论

浸润性生长和转移潜能是恶性肿瘤患者病死率高、预后差的根本原因,其发生机制尚不清,长期以来一直是肿瘤学研究面临的难题之一。由上皮来源

Smitherman 等^[13]研究发现,所有的膜联蛋白成员显示出同样的蛋白拓扑,由 70 个氨基酸区域的 4 个保守重复序列构成的 C 端核心和功能多样的 N 端尾部组成,被认为与膜运输、信号转导、细胞分化和增殖有关。Annexin A7 蛋白的 C 端包含潜在的胰岛素位点、钙离子和磷脂结合位点等,有利于依赖钙离子促进膜的融合^[14]。Srivastava 等^[15]在基因敲除小鼠 annexin A7(+/-)中发现其肝癌、淋巴瘤等恶性肿瘤的进展迅速,认为 annexin A7 是某些肿瘤的抑制基因。Ji 等^[16]研究认为 annexin A7 上调表达可能与肿瘤形成过程中的 Ras 突变相关。而 Srivastava 等^[17]研究发现 annexin A7 低表达与许多种肿瘤的高侵袭性相关,但在某些肿瘤的转移灶中 annexin A7 的表达高于原发灶,而转移淋巴结中 annexin A7 的表达却低于未受侵的淋巴结。相关研究缺乏定论,因此,进一步研究该蛋白的表达与肿瘤淋巴道转移的相关性十分必要。

本研究为了探讨 annexin A7 表达水平与 Hca-F 高淋巴道转移潜能的关系,设计 3 条针对 annexin A7 的 shRNA,筛选其中高效干扰者,并用其转染 Hca-F 细胞株,建立稳定转染的 Hca-F 细胞株,结果表明 shRNA1 的干扰效果最好,转染 Hca-F 细胞株后能有效抑制 annexin A7 蛋白表达,成功建立了稳定转染的 Hca-F 细胞株,为后续研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Schulz P, Scholz A, Rexin A, Hauff P, Schirner M, Wiedenmann B, et al. Inducible re-expression of p16 in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer inhibits lymphangiogenesis and lymphatic metastasis[J]. *Br J Cancer*, 2008, 99: 110-117.
- [2] Achen M G, Stacker S A. Molecular control of lymphatic metastasis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1131: 225-234.
- [3] Tervala T, Suominen E, Saaristo A. Targeted treatment for lymphedema and lymphatic metastasis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1131: 215-224.
- [4] 凌茂英, 王明辉, 郭伶俐, 王 波. Hca/16A3-F 及 Hca/A2-P 两株小鼠淋巴道转移肝癌细胞系的特性研究[J]. *中华医学杂志*, 1995, 75: 170-171.
- [5] 孙成荣, 唐建武, 孙明忠, 刘淑清, 张宏颖, 王 波, 等. 采用定量蛋白质组学技术筛选小鼠肝癌淋巴道转移相关蛋白[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34: 856-864.
- [6] Matzke M A, Birchler J A. RNAi-mediated pathways in the nucleus[J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 24-35.
- [7] Nathanson S D. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis[J]. *Cancer*, 2003, 98: 413-423.
- [8] Li Q, Wu M, Wang H, Xu G, Zhu T, Zhang Y, et al. Ezrin silencing by small hairpin RNA reverses metastatic behaviors of human breast cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2008, 261: 55-63.
- [9] Li D Q, Hou Y F, Wu J, Chen Y, Lu J S, Di G H, et al. Gene expression profile analysis of an isogenic tumour metastasis model reveals a functional role for oncogene AF1Q in breast cancer metastasis[J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42: 3274-3286.
- [10] Jia L, Wang S, Cao J, Zhou H, Wei W, Zhang J. siRNA targeted against matrix metalloproteinase 11 inhibits the metastatic capability of murine hepatocarcinoma cell Hca-F to lymph nodes [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39: 2049-2062.
- [11] Cui X N, Tang J W, Hou L, Song B, Ban L Y. Identification of differentially expressed genes in mouse hepatocarcinoma ascites cell line with low potential of lymphogenous metastasis [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12: 6893-6897.
- [12] Song B, Tang J W, Wang B, Cui X N, Hou L, Sun L, et al. Identify lymphatic metastasis-associated genes in mouse hepatocarcinoma cell lines using gene chip [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 1463-1472.
- [13] Smitherman A B, Mohler J L, Maygarden S J, Ornstein D K. Expression of annexin I, II and VII proteins in androgen stimulated and recurrent prostate cancer[J]. *J Urol*, 2004, 171(2 Pt 1): 916-920.
- [14] Naidu D G, Raha A, Chen X L, Spitzer A R, Chander A. Partial truncation of the NH2-terminus affects physical characteristics and membrane binding, aggregation, and fusion properties of annexin A7 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1734: 152-168.
- [15] Srivastava M, Montagna C, Leighton X, Glasman M, Naga S, Eidelman O, et al. Haploinsufficiency of Anx7 tumor suppressor gene and consequent genomic instability promotes tumorigenesis in the Anx7 (+/-) mouse [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 14287-14292.
- [16] Ji H, Moritz R L, Kim Y S, Zhu H J, Simpson R J. Analysis of Ras-induced oncogenic transformation of NIH-3T3 cells using differential-display 2-DE proteomics [J]. *Electrophoresis*, 2007, 28: 1997-2008.
- [17] Srivastava M, Torosyan Y, Raffeld M, Eidelman O, Pollard H B, Bubendorf L. ANXA7 expression represents hormone-relevant tumor suppression in different cancers [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121: 2628-2636.

[本文编辑] 贾泽军