

ANXA2对人结直肠癌caco2细胞行为及细胞骨架结构的调节

张彩霞 武浩杰 奉 艳 王晓静 胡妍妍 贾良杰 侯颖春*

(陕西师范大学肿瘤分子细胞生物学实验室, 西安 710062)

摘要 ANXA2是Annexin蛋白家族中的重要成员, 研究证实, 其在多种肿瘤组织中异常表达, 且在细胞功能及命运的调节中扮演重要角色。为了准确研究ANXA2对细胞行为及细胞骨架结构的调节以及该调节对肿瘤发展过程中的影响, 该实验室构建了敲除ANXA2基因的人结直肠癌细胞系(ANXA2^{-/-}caco2), 研究ANXA2对细胞的生物学行为及结构的调节。结果显示, ANXA2表达的祛除明显抑制caco2细胞的增殖和迁移能力($P<0.05$), 但对其凋亡没有显著影响; 敲除ANXA2显著降低F-actin的表达, 且抑制caco2细胞伪足和微绒毛的发育, 这也进一步验证了ANXA2的敲除影响caco2细胞的增殖与迁移能力。该研究结果在靶基因敲除的条件下从更加客观的形态学角度进一步支持了ANXA2对caco2细胞癌发展有关特性的重要调节作用, 以及其作为癌基因治疗靶基因的重要潜在性。

关键词 膜联蛋白A2; 人结直肠癌; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞凋亡; 肌动蛋白; 伪足

ANXA2 Regulates the Behaviors and Cytoskeletal Structure of caco2 Cells in Human Colorectal Cancer

Zhang Caixia, Wu Haojie, Feng Yan, Wang Xiaojing, Hu Yanyan, Jia Liangjie, Hou Yingchun*

(Lab of Cancer Cellular Biology of Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract Annexin A2 (ANXA2) is an important member of Annexin family and it was confirmed to be abnormally expressed in various cancers and has important roles in cellular functions and fate. To further study the specific effects of ANXA2 on the behaviors and cytoskeletal structure exactly, the research was conducted to construct a ANXA2^{-/-}caco2 cell line and to study the roles of ANXA2 playing in the biological behavior and cytoskeletal structure for caco2 cells. The results showed that the knockout of ANXA2 could significantly inhibit proliferation and migration in ANXA2^{-/-}caco2 ($P<0.05$), but it had no clear change on apoptosis. Depletion of ANXA2 in caco2 cells remarkably decreased the expression of F-actin and inhibited the development of pseudopodium and microvilli, as evidenced by decreased proliferation and migration. Our data from the perspective of morphology objectively support that ANXA2 plays significant part in regulating the development of caco2 cells under the condition of target gene knockout, and the data also shows that ANXA2 may be a potential target for therapeutic strategies.

Key words Annexin A2; human colorectal cancer; cell proliferation; cell migration; cell apoptosis; F-actin; pseudopodium

收稿日期: 2013-04-12 接受日期: 2013-10-15

*通讯作者。Tel: 029-85310274, E-mail: ychhou@snnu.edu.cn

Received: April 12, 2013 Accepted: October 15, 2013

*Corresponding author. Tel: +86-29-85310274, E-mail: ychhou@snnu.edu.cn

网络出版时间: 2013-11-12 12:24 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131112.1224.001.html>

Annexin A2(ANXA2)属于膜联蛋白家族成员,是一种广泛分布于胞核、胞浆及细胞质膜外表面的磷脂结合蛋白,被报道在人体多种癌细胞中高表达^[1],并可能与癌发展相关的细胞行为调节有关^[2-3]。

已有大量文献从不同角度报告了ANXA2的高表达可能与癌发展有密切关系,但仍缺乏直观的具有说服力的证据,这些研究大多使用了基因敲低(Knockdown)的方法,如RNAi(RNA干扰)^[4-6],而这些方法有可能导致实验结果的不稳定。例如,有人报道ANXA2在前列腺癌组织中表达下调^[7],并在分化程度低的前列腺癌组织中下调最明显^[8],但也有研究结果提示ANXA2的表达回升与前列腺癌复发和恶性表形有关^[9]。另有研究发现,ANXA2在头颈部鳞状细胞癌组织表达明显下调^[10],且在分化越低、生长越快、淋巴转移力越强的瘤组织下调越明显^[11]。在高转移性的肺癌细胞,ANXA2被报道抑制瘤细胞增殖^[12]。以上这些研究报道差异较大,说明ANXA2在不同组织源肿瘤发展过程中的作用可能很复杂外,也可能与研究者所用基因敲低法所致的残留靶基因表达对结果影响度的不同有关。本文采用自己构建的ANXA2基因敲除细胞系(ANXA2^{-/-}caco2)^[13]研究了ANXA2对细胞生物学行为及运动有关的微结构的调节,旨在为ANXA2未来作为癌基因治疗靶点基因提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系 野生人结肠癌细胞caco2购自美国ATCC; ANXA2^{-/-}caco2本室建立、保存。

1.1.2 试剂与实验仪器 Hoechst33342/PI试剂盒:南京凯基公司; MitoView 633:美国Biotium公司; FITC-Phalloidin、2.5%戊二醛:美国Sigma公司; DMEM培养基:美国Gibco公司; TCS SP5激光共聚焦显微镜:德国Leica公司; guava easyCyte8HT流式细胞仪:美国MILLIPORE公司; ELX800全自动酶联免疫检测系统:美国BIO-TEK公司; Quanta2000扫描电子显微镜:荷兰Philips-FEI公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞增殖力检测 取对数生长期的野生(WT)和ANXA2^{-/-}caco2(KO)细胞,按4 000/孔接种于96孔板,培养24, 48, 72, 96, 120 h后检测其 D_{562} 值:每孔加入MTT工作液(5 mg/mL) 20 μ L,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培

养箱中孵育5 h,弃上清后每孔加入DMSO 150 μ L,摇床上室温孵育15 min,充分溶解结晶(空白对照组NC不加细胞只加培养液,与实验平行),结晶溶解后于酶标仪562 nm测定各孔 D 值,并依据公式($D_{\text{实验组}}/D_{\text{对照组}} \times 100\%$)计算细胞增殖率(每组8个复孔,重复5次,取平均值)。

1.2.2 细胞迁移能力的检测 细胞同上,以 2.5×10^5 /孔接种于6孔板,培养至细胞汇合率100%时用1 mL移液枪头分别在细胞层吸除细胞,制备适于低倍显微镜拍摄的空白区若干个,分别在培养24, 48, 72 h时以低倍镜采集图像。用Gene Tool分析软件测量各时间点空白区面积,并依据公式 $(1-t/o) \times 100\%$ 计算细胞各时间点的迁移率,其中“t”为该时间点该区面积;“o”为该区制备时的面积(每组5个复孔,重复5次,取平均值)。

1.2.3 细胞凋亡率的检测 (1)细胞核形态观察。细胞同上,以 2.5×10^5 /孔接种于放有小盖片的6孔板,培养细胞至汇合率达到60%~70%后弃培养基, PBS洗3次,4%多聚甲醛室温固定15 min,再洗3次,依据试剂盒说明以Hoechst33342进行细胞核染色后在荧光显微镜和共聚焦显微镜下观察、拍照。(2)线粒体观察。细胞接种、培养同上, PBS洗3次,依据说明书以MitoView 633进行线粒体染色, PBS洗3次后在荧光显微镜和共聚焦显微镜观察、拍照。(3)流式细胞仪检测。按Hoechst33342/PI双染试剂盒说明进行细胞核荧光标记,取200 μ L细胞悬液置于96孔板后以流式细胞仪分析细胞凋亡。

1.2.4 细胞骨架结构的观察 (1)细胞骨架蛋白F-actin的观察。细胞同上,接种于放有小盖片的6孔板中培养24 h,用预热的PBS洗3次(37 $^{\circ}$ C),4%多聚甲醛于37 $^{\circ}$ C固定15 min,再洗3次,以0.2% Triton X-100处理爬片10 min后,洗3次,再以1% BSA室温封闭30 min,弃上清后滴加FITC-Phalloidin染液(5 mg/mL),避光孵育1 h,洗涤6次后以90%甘油封片在激光扫描共聚焦显微镜下进行图像采集。(2)扫描电镜下细胞微结构的观察。细胞同上接种培养24 h, PBS漂洗3次,2.5%戊二醛于4 $^{\circ}$ C固定1 h, PBS洗后,用不同稀释梯度的乙醇脱水(30%、50%、70%、80% \times 2、90% \times 2、95% \times 2、100% \times 2, 15 min/次),乙酸异戊酯置换乙醇,二氧化碳临界点干燥、真空喷镀,扫描电子显微镜下进行图像采集。

1.2.5 统计学分析 所得数值以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm S.D.$)表示,利用统计学软件SPSS 13.0进行数据

分析, 两组数值比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 细胞增殖力检测

MTT法检测结果提示, ANXA2的敲除对野生(WT)与敲除(KO)细胞在24~72 h间的增殖无显著影响(图1A), 而在96 h时WT组细胞增殖率达到45%, 而KO组仅达到15%, 差异极显著($P < 0.01$)(图1B), 但在120 h时由于细胞密度过大、培养时间过长等, 两组细胞的增殖情况已失去对比意义(图1), 但仍可见到KO组细胞的持续增殖, 可能是因为该组细胞密度仍不足以限制其生长。

2.2 细胞迁移力的检测

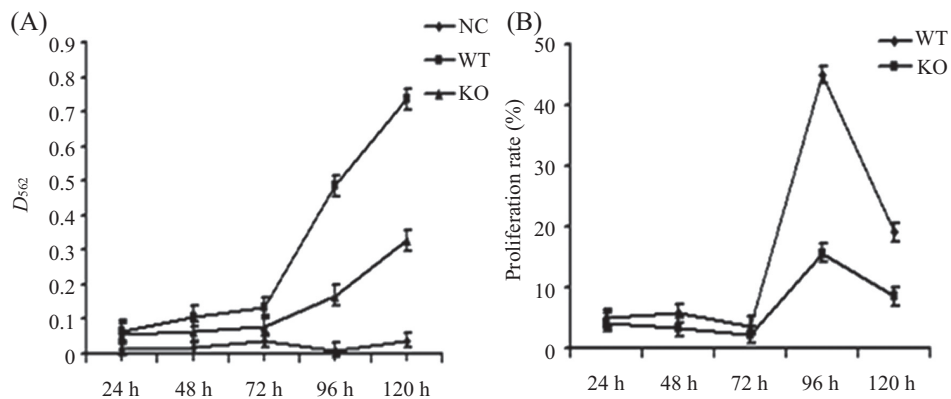
细胞迁移能力是肿瘤浸润与转移的关键因素,

采用损伤修复法比较WT与KO细胞的迁移能力, 分析ANXA2对caco2细胞迁移能力的调节。结果显示: 在0~72 h之间, 随着时间的增加, WT组细胞的损伤修复能力明显优于KO组, 在48 h后KO组细胞的迁移能力明显降低(图2, $P < 0.05$)。

2.3 细胞凋亡率的检测

2.3.1 细胞核形态观察 Hoechst33342染色结果显示, WT组细胞内弥漫蓝色荧光, 且呈现明显的凋亡形态学特征, 可见半月形、马蹄形的细胞核形态, 染色质边缘化, 胞质和核浓缩, 有凋亡小体出现(图3A和4B)。而KO组细胞内出现亮蓝色荧光, 也明显观察到细胞凋亡的上述特征, 相对于WT组, KO组细胞中的凋亡形态学变化较为明显(图3B和图4E)。

2.3.2 线粒体观察 MitoView 633染色是通过检测线粒体膜活性来分析细胞凋亡情况的一种有效方

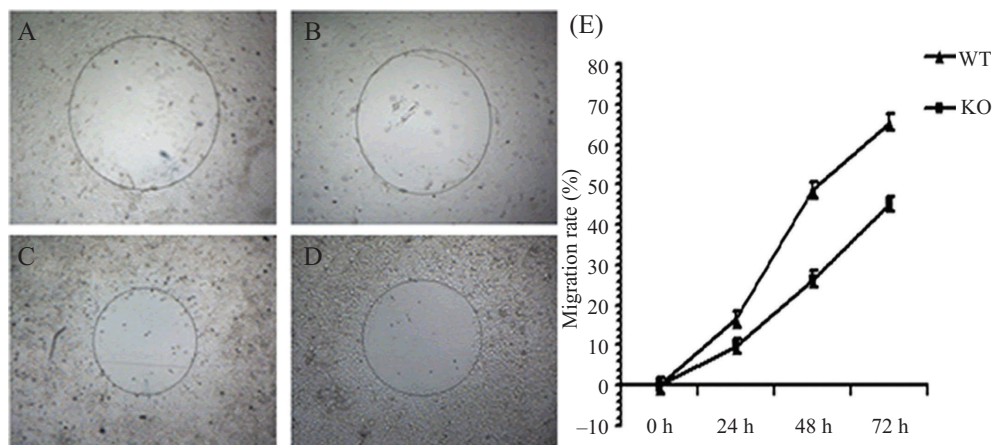


WT: 野生细胞; KO: ANXA2敲除细胞。

WT: wild type cells; KO: ANXA2 deleted cells.

图1 不同时间caco2细胞的增殖能力

Fig.1 The proliferation of caco2 cells at different time points



A、C: WT组0, 48 h; B、D: KO组0, 48 h。

A,C: WT group at 0, 48 h; B,D: KO group at 0, 48 h.

图2 不同时间caco2细胞迁移能力的测定

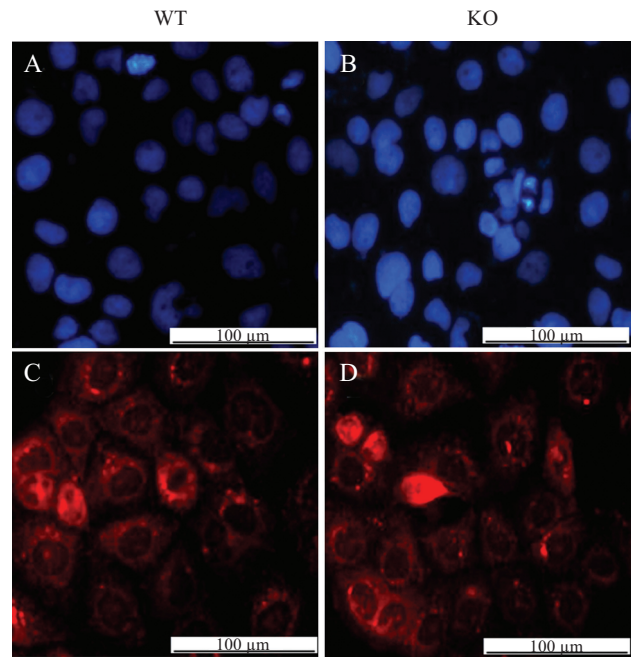
Fig.2 The motility of caco2 cells at different time points

法,随着线粒体活性的增强,染料积累于线粒体膜上,红色荧光逐渐增强。如图显示,WT组细胞呈现出均匀明亮的红色荧光(图3C和图4A),而KO组细胞中则同样出现均匀的红色荧光(图3D和图4D),结果提示,*ANXA2*的敲除对caco2细胞线粒体膜荧光强度无显著影响。

2.3.3 流式细胞仪检测 以Hoechst33342/PI试剂盒染色后以流式细胞仪检测的散点图,结果显示,WT组细胞无明显凋亡现象(图5A,左上),KO组细胞未检测到大量凋亡细胞(图5B,左上),这与核和线粒体检测结果一致,说明*ANXA2*的敲除对caco2细胞的凋亡无显著影响。

2.4 细胞骨架结构的观察

2.4.1 细胞骨架蛋白F-actin的观察 F-actin的组装/去组装过程与多种细胞运动过程相关,在激光共聚焦显微镜下,野生caco2细胞呈现F-actin强表达,分子聚合后的微丝结构明显,细胞质中的张力纤维活力旺盛,细胞边缘的片状、丝状伪足发达,细胞间连接紧密,提示正常细胞应有的接触抑制消失(图6A)。*ANXA2*敲除组细胞F-actin的表达及分布发生明显变化,微丝形成、片状/丝状伪足的发育等明显受到抑

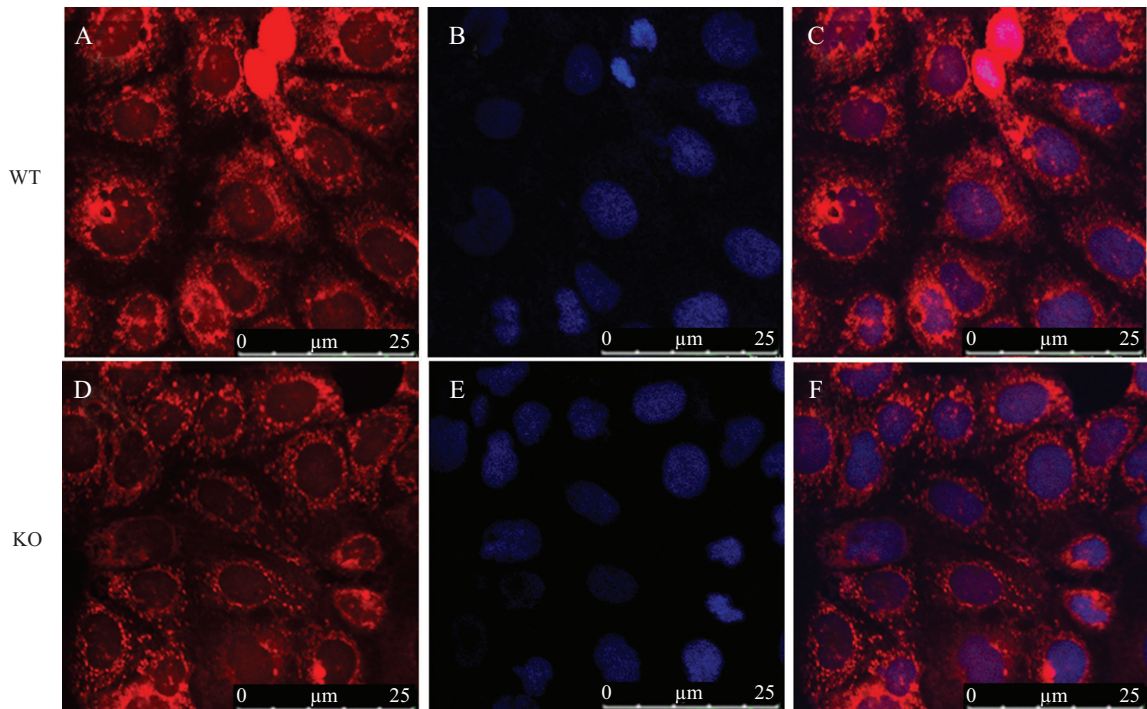


A, B: WT和KO细胞核; C, D: WT和KO细胞线粒体。

A,B: nuclei of WT and KO cells; C,D: mitochondria of WT and KO cells.

图3 caco2细胞凋亡的荧光显微镜观察

Fig.3 Apoptotic analysis for caco2 cells under fluorescence microscope

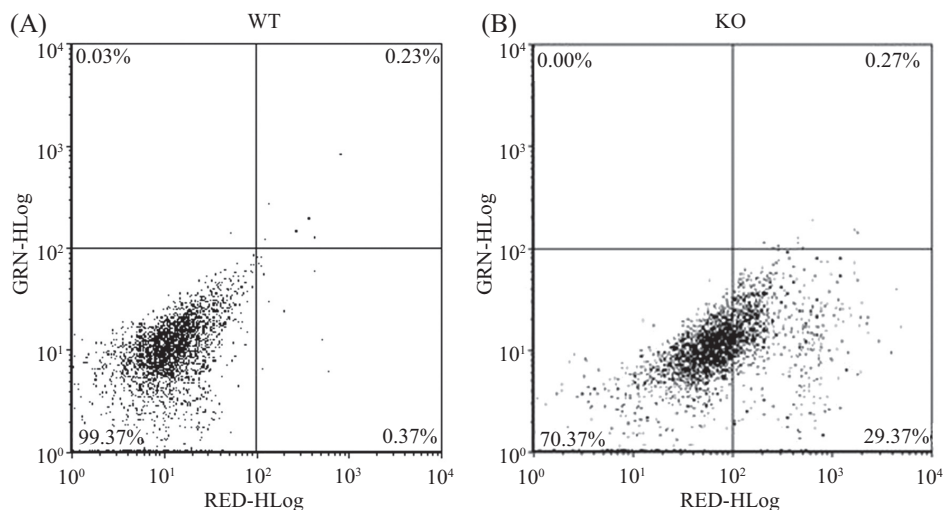


A, D: WT、KO细胞线粒体; B, E: WT、KO细胞核; C, F: merged。

A,D: mitochondria of WT and KO cells; B,E: nuclei of WT and KO cells; C,F: merged.

图4 caco2细胞凋亡的共聚焦显微镜观察

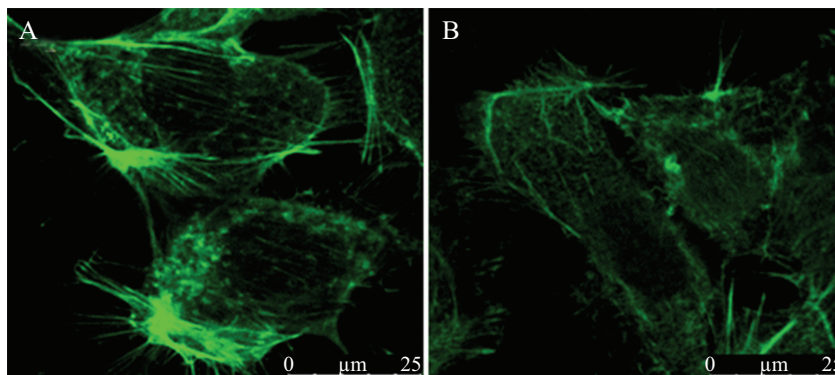
Fig.4 Apoptotic analysis for caco2 cells under laser cofocal microscope



A: WT组; B: KO组。
A: WT group; B: KO group.

图5 caco2细胞凋亡的流式细胞仪检测

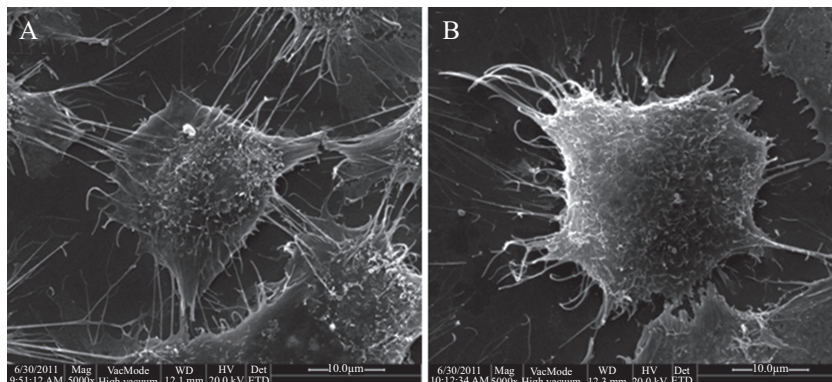
Fig.5 The apoptotic analysis for caco2 cells using flow cytometry



A: WT组; B: KO组。
A: WT group; B: KO group.

图6 caco2细胞F-actin的免疫荧光染色

Fig.6 Immunofluorescence staining assay for F-actin under laser cofocal microscope



A: WT组; B: KO组。
A: WT group; B: KO group.

图7 caco2细胞微结构扫描电镜观察

Fig.7 Observation of microstructures in caco2 cells under scanning electron microscope

制, 细胞的接触抑制有所恢复(图6B)。

2.4.2 扫描电镜下细胞微结构的观察 扫描电镜观察结果显示, 野生caco2片状伪足、丝状伪足等运动结构发达, 细胞表面的微绒毛结构丰富, 且微绒毛结构长短不一; 细胞间紧密连接, 其连接具有一定的方向性; 细胞间接触抑制行为消失(图7A)。敲除细胞中片状、丝状伪足减少, 尤其片状伪足的变化更为明显, 细胞表面微绒毛结构有一定的减少; 细胞生长的方向性减弱, 细胞有一定程度变形; 接触抑制行为有所恢复(图7B), 提示ANXA2与肿瘤细胞的侵袭、浸润、转移密切相关。

3 讨论

ANXA2的异常表达与肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移及细胞骨架结构的变化密切相关^[14-17]。干扰ANXA2表达, 通过降低PL活性、启动MAPK信号通路, 可降低肿瘤细胞转移与血管生成能力^[2,18]。抑制ANXA2导致Rho蛋白活性下降, 细胞板状伪足的F-actin纤维束减弱, 细胞增殖受到抑制^[19]。相反, ANXA2的表达与前胃泌素作用, 可促进细胞增殖^[20]。此外, ANXA2与S100A10、S100A4互作用可加速PL生成, 激活MMPs, 共同诱导胞外基质的重塑, 促进血管生成和肿瘤的浸润、转移^[21-22]。进一步研究还发现, ANXA2具有F-actin的结合位点, 佐证了其调控细胞骨架网络的作用^[23], 而细胞骨架与细胞恶性转化、黏附、运动等肿瘤转移过程密切相关。

但是, 以往以RNAi等基因敲低技术研究ANXA2与肿瘤发展进程关系的报告较多^[16], 这种实验环境有时使实验结果易于受到残留靶基因表达的影响而变得不稳定^[9-11]。所以, 本研究前期建立了ANXA2敲除的细胞系(ANXA2^{-/-}caco2)^[13], 以这种靶基因敲除细胞系为实验环境的研究结果更加客观和可信。同时, 为了动态地观察其调节作用, 我们在细胞培养不同时间点观察了ANXA2表达对细胞增殖、迁移、凋亡的调节作用, 并特别检测了癌细胞运动相关的表型如F-actin表达、丝状/片状伪足的发育和形态变化以评价该基因在癌转移、发展过程中的作用, 为ANXA2在未来肿瘤靶向诊治研究中作为靶基因的可能性从细胞行为及微结构角度提供支持。结果显示, 敲除ANXA2能显著抑制细胞增殖与迁移能力, 但对凋亡的影响没有显著性差异。ANXA2敲除后, 胞内F-actin表达明显受到抑制, 其分子聚合作用(poly-

merization)亦受到抑制而使其呈弥散状分布于细胞质膜内侧及细胞的突起部位, 微丝网络结构变得不明显, 进而导致丝状/片状伪足的发育受到抑制, 细胞表面绒毛结构的发育受到抑制。实验结果中很明显的另一个特点是, 癌细胞的接触抑制行为有所恢复。上述结果提示, ANXA2可能具有对F-actin的表达、组装/去组装、聚合、重排的促进作用, 并可能通过这个机制加强癌细胞的增殖、迁移能力, 从而加速了肿瘤的发展。

综上所述, 本文以基因敲除的细胞系(ANXA2^{-/-}caco2)研究了ANXA2对caco2细胞生物学行为及其细胞骨架结构的调节作用, 结果提示, ANXA2对caco2细胞的增殖、迁移有明显的促进作用, 且对微丝和伪足等运动有关结构的发育都有明显的强化作用, 所以它在caco2细胞的发展过程中扮演了重要角色。由于肿瘤的发生发展是一个多步骤、多阶段的过程, ANXA2在不同肿瘤、不同发展时相所起的具体作用还有待于进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Laohavisit A, Davies JM. Annexins. *New Phytol* 2011; 189(1): 40-53.
- 2 Lokman NA, Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C. The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression. *Cancer Microenviron* 2011; 4(2): 199-208.
- 3 Zhang X, Liu S, Guo C, Zong J, Sun MZ. The association of annexin A2 and cancers. *Clin Transl Oncol* 2012; 14(9): 634-40.
- 4 Zhao S, Huang L, Wu J, Zhang Y, Pan D, Liu X. Vascular endothelial growth factor upregulates expression of annexin A2 *in vitro* and in a mouse model of ischemic retinopathy. *Mol Vis* 2009; 15: 1231-42.
- 5 Flood EC, Hajjar KA. The annexin A2 system and vascular homeostasis. *Vascul Pharmacol* 2011; 54(3/4/5/6): 59-67.
- 6 Madureira PA, Hill R, Miller VA, Giacomantonio C, Lee PW, Waisman DM. Annexin A2 is a novel cellular redox regulatory protein involved in tumorigenesis. *Oncotarget* 2011; 2(12): 1075-93.
- 7 Lehnigk U, Zimmermann U, Woenckhaus C, Giebel J. Localization of annexins I, II, IV and VII in whole prostate sections from radical prostatectomy patients. *Histol Histopathol* 2005; 20(3): 673-80.
- 8 Yee DS, Narula N, Ramzy I, Boker J, Ahlering TE, Skarecky DW, *et al.* Reduced annexin II protein expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131(6): 902-8.
- 9 Inokuchi J, Narula N, Yee DS, Skarecky DW, Lau A, Ornstein DK, *et al.* Annexin A2 positively contributes to the malignant phenotype and secretion of IL-6 in DU145 prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2009; 124(1): 68-74.
- 10 Pena-Alonso E, Rodrigo JP, Parra IC, Pedrero JM, Meana MV, Nieto CS, *et al.* Annexin A2 localizes to the basal epithelial layer

- and is down-regulated in dysplasia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2008; 263(1): 89-98.
- 12 Rodrigo Tapia JP, Pena Alonso E, García-Pedrero JM, Florentino Fresno M, Suárez Nieto C, Owen Morgan R, *et al.* Annexin A2 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2007; 58(6): 257-62.
 - 13 Huang Y, Jin Y, Yan CH, Yu Y, Bai J, Chen F, *et al.* Involvement of Annexin A2 in p53 induced apoptosis in lung cancer. *Mol Cell Biochem* 2008; 309(1/2): 117-23.
 - 14 邢睿欢, 牟茂森, 高晓杰, 聂红娟, 杨敏敏, 侯颖春, 等. 人结肠癌细胞ANXA2基因敲除细胞系的建立. *陕西师范大学学报* (Xing Ruihuan, Mou Maosen, Gao Xiaojie, Nie Hongjuan, Yang Minmin, Hou Yingchun, *et al.* The generation of Annexin A2^{-/-} caco2 cell line. *Journal of Shaanxi Normal University*) 2012; 40(6): 61-6.
 - 15 Wang YX, Lv H, Li ZX, Li C, Wu XY. Effect of shRNA mediated down-regulation of Annexin A2 on biological behavior of human lung adenocarcinoma cells A549. *Pathol Oncol Res* 2012; 18(2): 183-90.
 - 16 Zhai H, Acharya S, Gravanis I, Mehmood S, Seidman RJ, Shroyer KR, *et al.* Annexin A2 promotes glioma cell invasion and tumor progression. *J Neurosci* 2011; 31(40): 14346-60.
 - 17 Xing R, He H, He Y, Feng Y, Zhang C, Hou Y, *et al.* Anxa2 remodels the microstructures of caco2 cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2013; 59 Suppl: OL1848-54.
 - 18 Zheng L, Foley K, Huang L, Leubner A, Mo G, Olinio K, *et al.* Tyrosine 23 phosphorylation-dependent cell-surface localization of annexin A2 is required for invasion and metastases of pancreatic cancer. *PLoS One* 2011; 6(4): e19390.
 - 19 Sharma M, Ownbey RT, Sharma MC. Breast cancer cell surface annexin II induces cell migration and neoangiogenesis via tPA dependent plasmin generation. *Exp Mol Pathol* 2010; 88(2): 278-86.
 - 20 Babbitt BA, Parkos CA, Mandell KJ, Winfree LM, Laur O, Ivanov AI, *et al.* Annexin 2 regulates intestinal epithelial cell spreading and wound closure through Rho-related signaling. *Am J Pathol* 2007; 170(3): 951-66.
 - 21 Sarkar S, Swiercz R, Kantara C, Hajjar KA, Singh P. Annexin A2 mediates up-regulation of NF- κ B, β -catenin, and stem cell in response to progastrin in mice and HEK-293 cells. *Gastroenterology* 2011; 140(2): 583-95.
 - 22 Miles LA, Parmer RJ. S100A10: A complex inflammatory role. *Blood* 2010; 116(7): 1022-4.
 - 23 Kwon M, MacLeod TJ, Zhang Y, Waisman DM. S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors. *Front Biosci* 2005; 10: 300-25.
 - 24 Hayes MJ, Shao D, Bailly M, Moss SE. Regulation of actin dynamics by annexin 2. *EMBO J* 2006; 25(9): 1816-26.