

肺鳞癌组织中 Annexin-1 的表达及意义

燕 贞, 沈 飞, 李智涛, 周 舫, 王 娜, 姚 武, 吴卫东, 吴逸明

Expression and Clinical Significance of Annexin-1 in Lung Squamous Carcinoma Tissues

YAN Zhen, SHEN Fei, LI Zhi-tao, ZHOU Fang, WANG Na, YAO Wu, WU Wei-dong, WU Yi-ming

Department of Occupational Medicine, School of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Corresponding Author: WU Yi-ming, E-mail: wuym@zzu.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of Annexin-1(Anx-A1) mRNA and protein in lung squamous carcinoma tissues. **Methods** Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to detect Anx-A1 mRNA and protein levels in 22 cases of lung squamous carcinoma and corresponding adjacent normal tissues. The relationship between expressional levels and pathological characters was analyzed. **Results** The expression levels of Anx-A1 mRNA and protein in lung squamous carcinoma were significantly higher than those in adjacent normal tissues. The expression level of Anx-A1 in poor differentiated tissues was higher than that in middle and high differentiation tissues of lung squamous cell carcinoma ($P < 0.05$). No expression difference between stage III tumor tissues and stage I ~ II tissues was detected ($P > 0.05$). **Conclusion** Up-regulated expressions of Anx-A1 mRNA and protein in lung squamous cell carcinoma tissue might contribute to lung carcinogenesis.

Key words: Annexin-1; Lung squamous carcinoma; RQ-PCR; Western blot

摘要:目的 检测肺鳞癌组织中膜联蛋白 I (Annexin-1, Anx-A1) 的表达水平, 探讨其临床意义。**方法** 采用实时荧光定量 PCR(RQ-PCR)和 Western blot 方法检测 22 例肺鳞癌组织及其相应癌旁正常组织中 Anx-A1 mRNA 及蛋白的表达水平, 并分析其与临床病理指标的关系。**结果** 肺鳞癌组织中 Anx-A1 mRNA 和蛋白的表达水平均高于癌旁正常组织, 在低分化肺鳞癌组织中的表达水平高于高、中分化肺鳞癌组织, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。Anx-A1 在早期(I 期 + II 期)肺鳞癌组织和非早期(III 期)癌组织中表达水平的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** Anx-A1 在肺鳞癌中表达上调, 可能与肺癌的发生、发展相关。

关键词: Annexin-1; 肺鳞癌; 荧光定量 PCR; 免疫印迹

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)01-0038-03

0 引言

膜联蛋白 I (Annexin-1, Anx-A1) 属于钙离子依赖的磷脂蛋白超家族 (Annexins 家族), 该蛋白功能活跃, 是表皮生长因子受体 (EGFR) 酪氨酸激酶的磷酸化底物和磷脂酶 A2 的抑制剂, 具有诱导分化和调节细胞增殖、凋亡的功能^[1-2]。研究发现 Anx-A1 在多种肿瘤发生发展过程中的表达量发生明显改变, Anx-A1 的表达异常是肿瘤发生的一个早期事件^[3], 与肿瘤的分化及转移相关^[4], 但其在肺

癌组织中的表达情况研究较少, 本研究拟采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RQ-PCR) 和免疫印迹 (Western blot) 方法检测肺鳞癌中 Anx-A1 的表达水平, 探讨 Anx-A1 与肺癌发生、发展的关系。

1 资料和方法

1.1 资料

肺鳞癌组织和相应的癌旁正常肺组织标本在 22 例肺鳞癌患者签署知情同意书前提下取自郑州大学第一附属医院, 术中取材符合医学伦理学规范。原发性肺鳞癌患者术中肺切除后立即切取癌组织及远离肿瘤 5cm 以上的癌旁正常肺组织, 放入无菌冻存管于 -80℃ 冰箱保存。所有肺组织标本均经组织病理学确诊。根据 AJCC 和 UICC 于 2002 年修订的国际 TNM 分期标准进行肺癌分期, I 期 6 例, II 期 4 例, III 期

收稿日期: 2009-10-09; 修回日期: 2010-04-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30872148)

作者单位: 450001 郑州, 郑州大学公共卫生学院劳动卫生学教研室

通信作者: 吴逸明, E-mail: wuym@zzu.edu.cn

作者简介: 燕贞 (1980-), 女, 博士, 讲师, 主要从事肿瘤分子生物学研究

12 例。其中高分化 5 例,中分化 7 例、低分化 10 例。男 19 例,女 3 例,年龄 30~73 岁。MMLV Reverse Transcriptase、Rnase inhibitor 为 Promega 公司产品;Trizol、dNTP、Taq 酶购自 Takara 公司;兔抗 Anx-A1 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;ECL 显色试剂盒购自北京中衫金桥生物技术有限公司;PRISM 7700 Sequence Detector 荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司产品,半干电转仪为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 荧光定量 PCR 检测 根据 Genbank 中 Anx-A1 的 mRNA 序列,设计特异性引物,以 β -actin 作为内参照,引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成。序列如下:Anx-A1 上游引物:5'-GAA ATG CCT CAC AGC TAT CGT-3',下游引物:5'-CCT CCA CAA AGA GCC ACC-3'; β -actin 上游引物:5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3',下游引物:5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3'。

取适量肺组织,用 Trizol 提取总 RNA,反转录合成 cDNA。反转录反应体积为 20 μ l,反应体系如下:RNA 5 μ l、10mM dNTP 0.4 μ l、N6 Rnandom Primer 0.8 μ l、5 \times 反转录缓冲液 4 μ l、MMLV 反转录酶 0.3 μ l、RNasin 0.4 μ l,补充 DEPC 水至 20 μ l。将上述反应液混匀,37 $^{\circ}$ C 水浴作用 1h。然后 94 $^{\circ}$ C 3 min 灭活反转录酶,反转录产物以特异引物进行 PCR 扩增反应。PCR 扩增反应体积为 25 μ l,反应体系如下:cDNA 5 μ l,10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l,上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ l,dNTP(10 mmol/L) 0.2 μ l,TaqDNA 聚合酶(2.5 u/ μ l) 0.4 μ l,50 \times SYBR Green 0.12 μ l,MgCl₂(50 mmol/L) 0.7 μ l,双蒸水补足至反应终体积 25 μ l。反应条件如下:37 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 20 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,重复 40 个循环。反应结束后,由软件自动分析并显示分析结果循环阈值(cycle threshold, Ct)和实时定量荧光值动态曲线。目的基因的表达以 β -肌动蛋白(β -actin)作内对照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[5]分析比较目的基因在肺鳞癌组织和癌旁正常组织中的表达差异。

1.2.2 Western blot 分析 取适量肺组织,提取总蛋白,用 Bradford 法测定蛋白含量。取 50 μ g 总蛋白变性 5 min 后进行 SDS-PAGE 电泳,分离后的蛋白 10V 恒压 35 min 转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)。5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,用含 0.05% Tween-20 的 Tris 缓冲液(TBST)洗涤 NC 膜 3 次,加入 1:100 稀释的 Anx-A1 特异抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:1 000 稀释),室温 2 h,洗膜后加入化学发光(electrochemiluminescence, ECL)试剂显色曝光。以 β -actin 作

为上样量的内参照,用相对吸光度值(目的基因条带吸光度值/ β -actin 条带吸光度值)表示 Anx-A1 蛋白的相对表达强度。

1.3 统计学方法

利用 SPSS12.0 软件进行统计分析。采用 t 检验方法分析目的基因的表达差异,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Anx-A1 mRNA 表达分析结果

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析 Anx-A1 在肺鳞癌组织和癌旁正常组织中的表达差异,肺鳞癌和癌旁正常组织中的 Anx-A1 Ct 值与 β -actin Ct 值的差值经 t 检验差异具有统计学意义($P < 0.05$),Anx-A1 在肺鳞癌组织中的表达水平是癌旁正常组织的 1.81 倍。

Anx-A1 在早期(I期+II期)肺鳞癌组织和非早期(III期)癌组织中 mRNA 的表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。低分化的肺鳞癌组织中 Anx-A1 mRNA 的表达水平显著高于高、中分化的肺鳞癌组织,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 检测 Anx-A1 的表达及与肿瘤病理特征的关系

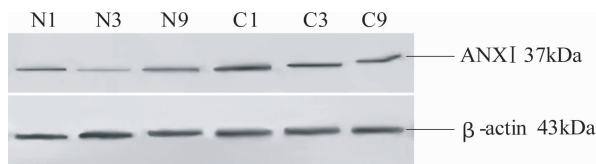
Table 1 Expression of Anx-A1 assayed by qRT-PCR and its relationship with pathological characteristics of tumors

Pathological characteristics	n	Folds (mean \pm SD)	t	P
Histology type				
Adjacent non-cancerous tissues	22	1		
Lung squamous carcinoma tissues	22	1.81 \pm 0.32	3.494	0.001
Clinical stage				
I + II	10	1.79 \pm 0.27		
III	12	1.83 \pm 0.36	0.496	0.625
Differentiation				
High or middle differentiation	12	1.62 \pm 0.21		
Poor differentiation	10	2.05 \pm 0.26	2.474	0.022

Note: Folds = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{gene} - Ct_{\beta-actin})_{lung\ carcinoma\ tissue} - (Ct_{gene} - Ct_{\beta-actin})_{adjacent\ non-cancerous\ tissue}$

2.2 Anx-A1 蛋白表达分析

Western blot 结果显示 Anx-A1 在肺鳞癌组织中的表达明显高于癌旁组织,见图 1。

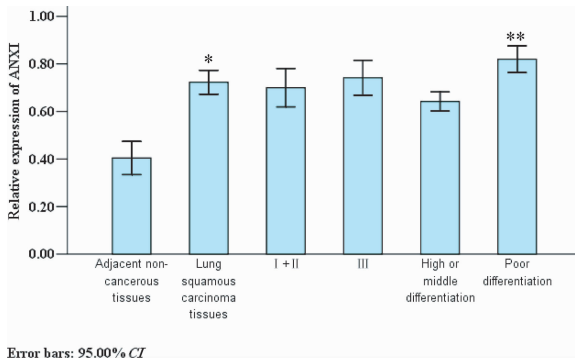


C: lung squamous cancer tissue; N: adjacent non-cancerous tissue

图 1 Western blot 分析 Anx-A1 在肺鳞癌及癌旁正常组织中的表达

Figure 1 Expression of Anx-A1 in lung squamous cancer and adjacent non-cancerous tissues by Western blot

非早期(Ⅲ期)肺鳞癌组织和早期(Ⅰ期+Ⅱ期)肺鳞癌组织中 Anx-A1 的蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。低分化的肺鳞癌组织中 Anx-A1 的蛋白表达水平高于高、中分化肺鳞癌组织,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 2。



*: compared with adjacent non-cancerous tissues, difference was significant; **: compared with high and middle differentiation tumor tissues, difference was significant

图 2 Western blot 检测 Anx-A1 的表达

Figure 2 Expression of Anx-A1 assayed by Western blot and the correlation to pathological characteristics of tumors

3 讨论

近年来, Anx-A1 和肿瘤的关系成为研究的热点, Anx-A1 表达水平潜在的改变在肿瘤发生发展中所起的重要作用日益受到了人们的关注。Paweletz 等^[6]发现 Anx-A1 高表达的食管、前列腺上皮细胞发生恶性转化时在癌前病变阶段及癌组织均观察到 Anx-A1 的明显减少或完全丢失。Cao 等^[7]在基因芯片检测发现 Anx-A1 在乳腺癌中的表达缺失率达 79%。随着宫颈癌的进展, Anx-A1 表达显著降低, 并与细胞分化密切相关^[8]。口腔鳞状细胞癌^[9]、食管癌^[10]中也发现 Anx-A1 mRNA 的表达水平降低。以上研究提示在乳腺癌、食管癌、宫颈癌等肿瘤中 Anx-A1 表达下调。但 De-Coupade 等^[3]在 ASV 转基因大鼠肝癌发展中证实了 Anx-A1 的高表达, 并出现在肿瘤形成之前, 且早于 AFP (甲胎蛋白) 的升高, 提示在肝癌发生中 Anx-A1 的表达异常是一个重要的早期事件。胰腺癌中^[11]亦有 Anx-A1 的表达改变, 癌组织的表达明显高于癌旁正常的组织, 表达水平与分化程度呈负相关, 恶性程度越高, 表达量越高。食管癌中 Anx-A1 表达上调, 并与不良预后相关^[12]。不同肿瘤组织中 Anx-A1 表达变化趋势并不一致, 提示在不同来源的肿瘤发生过程中 Anx-A1 发挥的生物学作用及调控机制可能不同。

Anx-A1 在肺癌中的表达变化研究较少, Anx-A1 在肺癌发展的早期是否也出现表达变化? 本研

究结果显示 Anx-A1 在肺鳞癌组织中的表达明显高于癌旁组织, 非早期(Ⅲ期)肺鳞癌组织和早期(Ⅰ期+Ⅱ期)癌组织中 Anx-A1 的表达水平差异无统计学意义, 未发现 Anx-A1 的表达异常与肺癌分期相关, 提示在肺癌的发生、发展过程中 Anx-A1 的表达上调可在早期出现。

本研究结果表明肺鳞癌中 Anx-A1 基因的 mRNA 和蛋白水平均表达上调, 且分化程度越低, 表达水平越高, 提示 Anx-A1 表达水平上调影响肺鳞癌细胞分化, 与 Oh 等^[13]的研究结果一致, 提示 Anx-A1 可能参与了肺鳞癌细胞的分化过程。

参考文献:

- [1] D'Acquisto F, Perretti M, Flower RJ. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems[J]. Br J Pharmacol, 2008, 155(2): 152-169.
- [2] Grewal T, Enrich C. Annexins—modulators of EGF receptor signalling and trafficking[J]. Cell Signal, 2009, 21(6): 847-858.
- [3] De-Coupade C, Gillet R, Bennoun M, et al. Annexin I expression and phosphorylation are upregulated during liver regeneration and transformation in antithrombin III SV40 T large antigen transgenic mice[J]. Hepatology, 2000, 31(2): 371-380.
- [4] Garcia Pedrero JM, Fernandez MP, Morgan RO, et al. Annexin A1 down-regulation in head and neck cancer is associated with epithelial differentiation status[J]. Am J Pathol, 2004, 164(1): 73-79.
- [5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [6] Paweletz CP, Ornstein DK, Roth MJ, et al. Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma [J]. Cancer Res, 2000, 60(22): 6293-6297.
- [7] Cao Y, Li Y, Edelweiss M, et al. Loss of annexin A1 expression in breast cancer progression[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2008, 16(6): 530-534.
- [8] Wang LD, Yang YH, Liu Y, et al. Decreased expression of annexin A1 during the progression of cervical neoplasia[J]. J Int Med Res, 2008, 36(4): 665-672.
- [9] Faria PC, Sena AA, Nascimento R, et al. Expression of annexin A1 mRNA in peripheral blood from oral squamous cell carcinoma patients[J]. Oral Oncol, 2010, 46(1): 25-30.
- [10] Hu N, Flaig MJ, Su H, et al. Comprehensive characterization of annexin I alterations in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(18Pt1): 6013-6022.
- [11] Bai XF, Ni XG, Zhao P, et al. Overexpression of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(10): 1466-1470.
- [12] Wang KL, Wu TT, Resetkova E, et al. Expression of annexin A1 in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas; association with poor outcome [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(15): 4598-4604.
- [13] Oh P, Li Y, Yu J, et al. Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy[J]. Nature, 2004, 429(6992): 629-635.

[编辑:周永红;校对:贺文]