

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.23.004

## siRNA 干扰膜联蛋白 A1 表达对甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞凋亡的影响\*

钟雪梅<sup>1</sup>, 林一民<sup>2△</sup>, 周源<sup>1</sup>, 邓世山<sup>3</sup>, 丁浩<sup>1</sup>

(1. 重庆医药高等专科学校临床医学院 401331; 2. 重庆市肿瘤医院检验科 400030; 3. 川北医学院基础医学院, 四川南充 637000)

**[摘要]** 目的 通过小干扰 RNAs(siRNA)干扰膜联蛋白 A1(ANX A1)在甲状腺乳头状癌(PTC)细胞中的表达,探讨 ANX A1 对 PTC 细胞的生物学特性的影响。方法 设计并筛选使用高效的 siRNA 在 PTC TPC-1 细胞株特异性干扰 ANX A1 的表达,然后用流式细胞术观察 ANX A1 干扰后对 PTC 细胞 TPC-1 凋亡的影响。结果 筛选的 siRNA 可高效沉默 ANX A1 在 PTC 细胞中的表达,促进 PTC 细胞的凋亡。结论 siRNA 干扰 ANX A1 表达,可促进 PTC 细胞的凋亡,提示 ANX A1 可能是 PTC 治疗的一个重要的生物学靶标。

**[关键词]** 甲状腺肿瘤;乳头状癌;膜联蛋白 A1;TPC-1 细胞;RNA,小分子干扰;凋亡

**[中图分类号]** R736.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)23-3180-04

### Influence of siRNA interfering Annexin A1 expression on apoptosis of papillary thyroid carcinoma TPC-1 cells\*

Zhong Xuemei<sup>1</sup>, Lin Yimin<sup>2△</sup>, Zhou Yuan<sup>1</sup>, Deng Shishan<sup>3</sup>, Ding Hao<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Medicine, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China; 3. School of Basic Medical Sciences, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of ANX A1 on the biological characteristics of papillary thyroid carcinoma cells by interfering with the expression of Annexin A1 (ANX A1) in papillary thyroid carcinoma cells through small interfering RNAs (siRNA). **Methods** The designed highly efficient siRNA was used to conduct the specific interference on ANXA1 expression in the papillary thyroid carcinoma TPC-1 cells. The effect of ANXA1 on TPC-1 apoptosis in PTC was observed by flow cytometry. **Results** The designed siRNA could efficiently inhibit the expression of ANXA1 mRNA in PTC, enhanced the cell apoptosis in TPC-1 cells in vitro. **Conclusion** siRNA can interfere with the expression of ANXA1 and promote the apoptosis of papillary thyroid carcinoma which suggesting that ANXA1 may be an important biological target for the treatment of papillary thyroid carcinoma.

**[Key words]** thyroid neoplasms; papilloma; annexin A1; TPC-1 cells; RNA, small Interfering; apoptosis

甲状腺癌(thyroid cancer, TC)是内分泌系统常见肿瘤,发病率在头颈部恶性肿瘤中居首位。而甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)的发病率约占所有甲状腺癌发病类型的 80%以上<sup>[1]</sup>。临床上 PTC 常表现为甲状腺结节,但由于甲状腺结节构成复杂,良恶性很难鉴别,易过度治疗。研究表明,对不确定恶性患者的术后病理发现,仅 20%~25%为甲状腺癌,另 75%~80%的患者则接受了不必要的甲状腺手术<sup>[2]</sup>。2016 年,《美国医学会杂志》已经将包裹性滤泡型 PTC 改称为“肿瘤”,虽然目前还没有标准化诊治规范,但诊断性甲状腺切除的概率会减少<sup>[3]</sup>。为此,需探索新的生物学靶标和诊治方法。膜联蛋白(annexins, ANX)是一类钙依赖性、能够结合带负电荷磷脂的蛋白超家族,是一种高丰度蛋白,而 ANX A1 是第一个被发现的家族成员,它主要介导细胞内糖皮质激素抗炎作用的效应分子,与细胞增殖、细胞凋亡的信号传导及肿瘤发生的机制都密切相关<sup>[4]</sup>。笔者的前期实验也发现,ANX A1 在 PTC 原发灶、转移灶的表达明显高于癌旁正常组

织,且与淋巴结转移和肿瘤大小相关<sup>[5]</sup>。因此,深入研究 ANX A1 在 PTC 中的作用是非常必要的。

双链小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)由 21~25 个核苷酸组成,能引起 RNA 的干扰和抑制靶蛋白的表达<sup>[6-7]</sup>。为进一步明确 ANX A1 在 PTC 中的作用,本研究拟使用 siRNA 干扰 ANX A1 的表达,观察其对 PTC 细胞株 TPC-1 细胞的增殖、凋亡的生物学影响,从而进一步探讨 ANX A1 在 PTC 发生、发展中的作用。

### 1 材料与方法

**1.1 主要材料及仪器** RPMI-1640 培养基(HyClone 公司);脂质体 Lipofectamine2000(Invitrogen 公司);RNA 提取试剂盒(TaKaRa 公司);PCR 仪、凝胶图像系统、酶标仪(Bio-Rad 公司);流式细胞仪(BD 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** TPC-1 细胞购自深圳百恩维生物公司,细胞在生长至 90%汇合度时进行传代,在含 10%~15%的胎牛

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81172496)。 作者简介:钟雪梅(1980—),讲师,硕士,主要从事内分泌基础与临床研究。

△ 通信作者, E-mail: 3102175660@qq.com。

血清的 RPMI-1640 培养基中, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温孵箱内培养。

**1.2.2 ANX A1 siRNA 设计** 使用 Version2.0 软件设计出针对 ANX A1 基因的特异性片段 3 对及无关序列 siRNA 片段 1 对。以上 siRNA 由广州锐博生物科技有限公司复核并合成。

**1.2.3 细胞转染** 将 TPC-1 细胞以  $4.5 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板生长 24 h, 使其生长至 80% 汇合度或刚好铺满培养板且处于对数生长期进行转染。根据 Lipfectamine2000 (Invitrogen 美国) 说明书操作, 将带有荧光标记的 siRNA 转染至 TPC-1 细胞内。实验分为: 实验组 (分别转染 3 对 siRNA)、阴性对照组 (转染无关序列 siRNA) 和空白组 (不转染) 及脂质体组, 其中实验组又包括 ANX A1-siRNA1 组、ANX A1-siRNA2 组、ANX A1-siRNA3 组。

**1.2.4 半定量逆转录 PCR (RT-PCR)** 在 GeneBank 中检索出人 ANX A1 和  $\beta$ -actin 全长序列, 用 Oligo6.0 软件分别设计引物, 将逆转录所得的 cDNA 模板进行 PCR 扩增反应, 以  $\beta$ -actin 为内参对照。反应条件: 预变性 94 °C 5 min; 变性 94 °C 30 s, 退火 56 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 反应结束后 4 °C 保存。将 PCR 扩增产物及 DNA marker 在 1.0%~1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳, 溴酚蓝染色, 在凝胶成像系统上观察扩增的条带, 采集图片后, 用图像分析软件 PDQuest 进行分析, 测量灰度值, 计算 mRNA 的相对表达量。

**1.2.5 细胞凋亡检测** 根据 Annexin V-异硫氰酸荧光素

(FITC)/碘化丙啶 (PI) 双染细胞凋亡检测试剂盒说明书操作: 将细胞以  $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$  接种于 6 孔板, 转染 72 h 后收集约  $1 \times 10^5$  个细胞, 加入 500  $\mu$ L Binding Buffer 悬浮细胞, TPC-1 细胞悬液中先加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 室温孵育 5 min 后再加入 5  $\mu$ L PI 双染混合液混匀, 室温避光反应 15~20 min, 1 h 内进行流式细胞仪的检测。数据结果的分析与统计用软件为 WinMDI2.9。

表 1 目的基因上、下游引物及产物大小

名称	序列 (5'-3')	产物大小 (bp)
ANX A1		
正向引物	GTCATCCAAAGGTGGTCCCG	153
反向引物	CGCTGTGCATTGTTTCGCTTA	
$\beta$ -actin		
正向引物	GACCCAGATCATGTTTGAGACC	594
反向引物	ATCTCCTTCTGCATCCTGTCCG	

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 比较采用 *t* 检验, 计数资料采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 转染效率** 分别细胞转染于转染 24、48、72 h 后在荧光显微镜下观察转染情况, 计数转染荧光阳性的细胞, 估算转染效率, 在 48~72 h 转染效率达 80% 以上。见图 1。

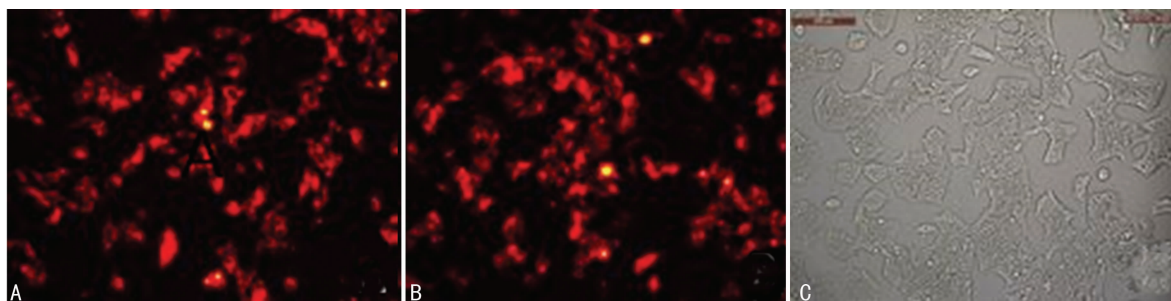


图 1 TPC-1 细胞转染 24 h 后荧光显微镜下图像 (×200)

**2.2 RT-PCR 检测各组 ANX A1 mRNA 表达情况** 各组 TPC-1 细胞中 ANX A1 mRNA 的比较, RT-PCR 结果表明, 转染 72 h 后, ANX A1 基因的 PCR 扩增产物经电泳及凝胶成像后, 由 PDQuest 软件分析 ANX A1/ $\beta$ -actin 的比值: ANX A1-siRNA1 组、ANX A1-siRNA2 组、ANX A1-siRNA3 组基因 mRNA 表达水平分别为  $0.51 \pm 0.11$ 、 $0.49 \pm 0.08$ 、 $0.41 \pm 0.14$ , 空白组、脂质体组及阴性对照组的基因 mRNA 表达水平分别为  $1.34 \pm 0.17$ 、 $1.15 \pm 0.10$ 、 $1.25 \pm 0.18$ 。各实验组 mRNA 表达水平较其他组明显下降 ( $P < 0.05$ ), 其中, ANX A1-siRNA3 组下降最明显。而空白组、脂质体组及阴性对照组的基因 mRNA 表达无明显变化, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 2。

**2.3 凋亡能力** siRNA 干扰 ANX A1 基因后对 TPC-1 细胞凋亡能力的影响: 转染 72 h 后, ANX A1-siRNA3 组细胞凋亡

率为  $(18.93 \pm 1.16)\%$ , 而阴性对照组和空白组的细胞凋亡率分别为  $(6.04 \pm 0.72)\%$ 、 $(5.19 \pm 0.65)\%$ , ANX A1-siRNA3 组与阴性对照组和空白组比较凋亡增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而阴性对照组与空白组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 3。

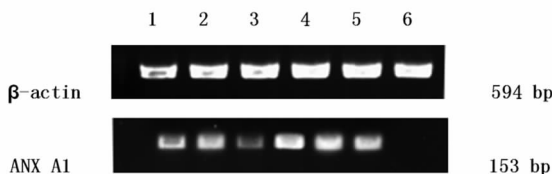
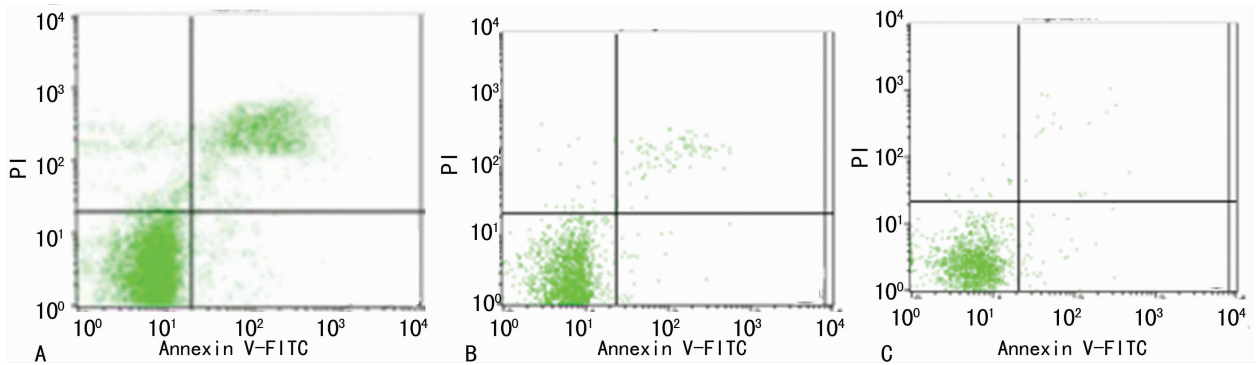


图 2 RT-PCR 检测 ANX A1 基因 mRNA 的表达



A: ANX A1-siRNA3 组; B: 阴性对照组; C: 空白组。

图 3 Annexin A1 基因对甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞凋亡率的影响

### 3 讨 论

PTC 是 TC 的最常见类型。PTC 的治疗方法有药物治疗、手术治疗、放射治疗、放射性<sup>131</sup>I 治疗、甲状腺激素(TSH)抑制治疗、靶向治疗等<sup>[8]</sup>。PTC 虽然恶性程度较低、生存期长,但易转移和复发,其中尤以手术导致的喉返神经损伤引起声音嘶哑、呼吸困难甚至窒息等为甲状腺手术的严重并发症。因此,深入探讨如何提高 PTC 的疗效,改善患者的生活质量具有重要的临床价值。PTC 的发生不仅仅由环境、电离辐射等因素引起,更是多基因、多通路、多因素共同调控的结果。其中,多基因调控如已知的有 BRAF、RAS、RET/PTC 癌基因,多通路则包括磷酸肌醇(-3)激酶(PI3K)/AKT 信号通路和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路等。ANX A1 是一类钙依赖型、高丰度蛋白,与细胞增殖、细胞凋亡的信号传导及肿瘤发生机制密切相关。目前,关于 ANX A1 的研究已成为肿瘤治疗领域的热点。ANX A1 与组织学不同类型的肺癌关联,它在肺腺癌和小细胞肺癌表达比在肺鳞癌更丰富<sup>[9]</sup>;研究还发现 ANX A1 在直肠癌中表达上调,可促进结肠癌的发生<sup>[10]</sup>。ANX A1 蛋白的周期调控,参与恶性肿瘤的发生和发展过程可能与 ANX A1 和酪氨酸蛋白激酶的底物结合,且多个磷酸化位点,参与细胞内信号传递有关<sup>[11]</sup>。ANX A1 也参与 MAPK 信号通路传导、基因转录因子激活及各种生长因子蛋白结合等,引发一系列反应,导致细胞增殖、凋亡细胞分化和炎症反应<sup>[12]</sup>。故推测 ANX A1 与 PTC 的发生有一定程度的关联性。

目前,关于 ANX A1 与 PTC 关系研究的文献,国内外报道极少,国内已有 ANX A2 在 TC 中及 PTC 中的表达及意义的研究。国外有关于 ANX A1 在 TC 类组织中的表达情况研究,包括乳头状癌、滤泡状癌、未分化癌。但都是仅研究了表达情况,未做进一步基因阻低试验<sup>[13]</sup>。还有关于 ANX A1 在甲状腺未分化癌中的基因阻低试验<sup>[14]</sup>,但也未见 ANX A1 与 PTC 的阻低试验的报道。

本实验前期的研究发现,ANX A1 蛋白在 PTC 组织及淋巴结转移组织中高表达,在癌旁正常组织中低表达,并与淋巴结转移和肿瘤大小相关。也提示了 ANX A1 与 PTC 发生的相关性。这为 ANX A1 在 PTC 的分子诊断、治疗方法、疗效及预后评估上的研究提供了很好的着眼点,抑制 ANX A1 基因功能是否影响 PTC 的生物学特性成为本次研究的目的。研

究也证明,ANX A1 在肿瘤的发生、发展中有很重要的作用,通过干扰其活性显示很好的抑制小细胞肺癌的效果<sup>[15]</sup>。分子靶向治疗 PTC 显示出一定的治疗前景,如索拉非尼、舒尼替尼靶向血管内皮生长因子(VEGF)通道,小分子多靶点酪氨酸激酶抑制剂凡德他尼等。但这些靶向治疗也存在一些不足,如是否提高总体生存率,能否恢复放射性<sup>131</sup>I 治疗的敏感性等,且这些靶向药物缺乏直接比较研究,有没有一种靶向治疗的药物都优于所有的药物也尚未明确。

siRNA 能引起 RNA 的沉默和抑制靶蛋白的表达。因此,siRNA 对很多疾病(如肿瘤、基因疾病、病毒性干扰等)具有极好的治疗前景。本研究结果显示,设计并合成的 siRNA 在 mRNA 水平显著抑制了 ANX A1 的表达,具有高效性和专一性。进而利用筛选的效率最高的 siRNA 作为研究工具,进行细胞转染,观察干扰后对细胞凋亡的影响。结果表明 siRNA 显著干扰了 ANX A1 蛋白的表达,促进了 TPC-1 细胞的凋亡。这可能与 ANX A1 和 PTC 基因中的某些通路有相似的结构域和与特异配体相结合,参与细胞内信号传递有关<sup>[11-12]</sup>。这也与已有文献报道的 ANX A1 抑制在甲状腺未分化癌的凋亡结果一致<sup>[16]</sup>。提示 ANX A1 在 PTC 中可能作为一个癌基因。ANX A1 在癌组织中高表达,运用 siRNA 技术干扰 ANX A1 在 PTC 中的表达,有促进细胞凋亡的作用,这为 PTC 的临床治疗提供了新思路,即通过靶向抑制 ANX A1 蛋白表达来抑制肿瘤的生长,从而达到控制肿瘤的作用。但是 ANX A1 通过何种方式参与,其具体机制还不十分清楚。本实验的缺陷在于 siRNA 干预方法虽然高效,但容易降解,价格昂贵,干扰或沉默时效短,不适合做长期的基因抑制研究,未对 ANX A1 通过何种机制来调控 PTC 细胞的增殖、凋亡等生物学行为进行深入探讨,这也是下一步需改进和研究的方向。

总之,本实验设计合成并筛选了高效专一的能够抑制 ANX A1 基因的 siRNA,成功干扰了 PTC 细胞 ANX A1 基因的表达,抑制 ANX A1 表达的同时,促进了肿瘤细胞的凋亡,这为 ANX A1 作为 PTC 治疗靶点提供了新方向。

### 参考文献

- [1] Liu X, Li S, Lin XE, et al. AXIN2 is Associated With Papillary Thyroid Carcinoma[J]. Iran Red Crescent Med J, 2016, 18(2): e20960.

- [2] Gomez Saez JM. Diagnostic and prognostic markers in differentiated thyroid cancer [J]. *Curr Genomics*, 2011, 12(8):597-608.
- [3] Hodak S, Tuttle RM, Maytal G, et al. Changing the cancer diagnosis: the case of follicular variant of papillary thyroid Cancer-Primum Non nocere and NIFTP [J]. *Thyroid*, 2016, 26(7):869-871.
- [4] Rescher U, Gerke V. Annexins—unique membrane binding proteins with diverse functions [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 13):2631-2639.
- [5] 钟雪梅, 陈敏, 邓世山, 等. AnnexinA1 在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义 [J]. *重庆医学*, 2015, 44(25):3488-3490.
- [6] Higuchi DY, Kawakami S, Hashida M. Strategies for in vivo delivery of siRNAs: recent progress [J]. *Biodrugs*, 2010, 24(3):195-205.
- [7] Ren T, Qing Y, Dai N, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 induced upregulation of fibroblast growth factor 2 and its receptor 3 induces angiogenesis in human osteosarcoma cells [J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(2):186-194.
- [8] Ardito G, Revelli L, Polistena A, et al. Complications of neck dissections in papillary thyroid carcinoma: a modified procedure to reduce parathyroid morbidity [J]. *In Vivo*, 2016, 30(3):303-308.
- [9] Liu YF, Zhang PF, Li MY, et al. Identification of annexin A1 as a proinvasive and prognostic factor for lung adenocarcinoma [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2011, 28(5):413-425.
- [10] He ZY, Wen H, Shi CB, et al. Up-regulation of hnRNP A1, Ezrin, tubulin  $\beta$ -2C and Annexin A1 in sentinel lymph nodes of colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(37):4670-4676.
- [11] Monastyrskaya K, Babiychuk EB, Draeger A. The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(16):2623-2642.
- [12] D'Acquisto F, Piras G, Rattazzi L. Pro-inflammatory and pathogenic properties of Annexin-A1: the whole is greater than the sum of its parts [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(9):1213-1218.
- [13] Petrella A, Festa M, Ercolino SF, et al. Annexin-1 down-regulation in thyroid cancer correlates to the degree of tumor differentiation [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(6):643-647.
- [14] Petrella A, Festa M, Ercolino SF, et al. Induction of annexin-1 during TRAIL-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(10):1358-1360.
- [15] Fang Y, Guan XY, Cai TH, et al. Knockdown of ANXA1 suppresses the biological behavior of human NSCLC cells in vitro [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(5):3858-3866.
- [16] Alldridge LC, Bryant CE. Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the ERK1/2 MAPK signal [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 290(1):93-107.

(收稿日期:2017-03-10 修回日期:2017-04-20)

(上接第 3179 页)

- [5] 任媛姝, 付钢, 邱雨, 等. 缺氧对人牙周膜细胞 OPG 和 RANKL 基因表达的影响 [J]. *重庆医学*, 2015, 44(35):4955-4957.
- [6] Liu JZ, Ji ZL, Chen SM. The OPG/RANKL/RANK system and bone resorptive disease [J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2003, 19(6):655-660.
- [7] Hofbauer LC, Kuhne CA, Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2004, 4(3):268-275.
- [8] Kanzaki H, Chiba M, Arai K, et al. Local RANKL gene transfer to the periodontal tissue accelerates orthodontic tooth movement [J]. *Gene therapy*, 2006, 13(8):678-685.
- [9] Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, et al. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro [J]. *Orthod Craniofac Res*, 2006, 9(2):63-70.
- [10] Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy [J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(6):652-657.
- [11] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27:485-517.
- [12] Ogasawara T, Yoshimine Y, Kiyoshima T, et al. In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue [J]. *J Periodontol Res*, 2004, 39(1):42-49.
- [13] Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, et al. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition [J]. *J Dent Res*, 2001, 80(3):887-891.
- [14] 林丹萍, 王威栋, 李璐, 等. IL-17 对人牙周膜成纤维细胞 RANKL 表达的影响 [J]. *口腔医学*, 2014, 36(6):405-408.

(收稿日期:2017-03-19 修回日期:2017-04-21)