

• 论 著 •

ANLN 敲除对肺腺癌细胞生物学功能的影响*

朱思明,李 标[△]

(海南医学院第二附属医院胸外科一区,海南 海口 570311)

[摘 要] **目的** 通过敲除肺腺癌细胞的 Anillin 肌动蛋白结合蛋白(ANLN)基因,验证其对肺癌细胞增殖、迁移等生物功能及行为学的影响。**方法** 通过构建 ANLN-siRNA 质粒,电转染 A549 肺腺癌细胞,单克隆挑取、鉴定、扩大培养后得到实验组(ANLN-A549 组),空载体质粒转染 A549 细胞得到对照组(Ctrl-A549 组)。采用 Transwell 细胞迁移实验和细胞划痕实验检测 2 组肺癌细胞的迁移情况;采用 CCK-8 细胞增殖实验和细胞集落形成实验检测肺癌细胞的克隆增殖能力。**结果** Transwell 细胞迁移及细胞划痕实验结果表明,ANLN 基因敲除后,ANLN-A549 组肺癌细胞的迁移率较 Ctrl-A549 组显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$);CCK-8 细胞增殖实验结果显示,ANLN-A549 组较 Ctrl-A549 组细胞增殖明显减缓,差异有统计学意义($P<0.05$);细胞集落形成实验表明,ANLN-A549 组较 Ctrl-A549 组细胞群落数显著减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** ANLN 基因的敲除显著抑制了肺腺癌细胞的增殖、迁移能力。

[关键词] Anillin 肌动蛋白结合蛋白; 肺腺癌; 增殖; 迁移; 非小细胞肺癌
DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.23.001 **中图法分类号:**R734.2
文章编号:1009-5519(2023)23-3961-05 **文献标识码:**A

The effect of ANLN knockout on the biological function of lung adenocarcinoma cells*

ZHU Siming, LI Biao[△]

(No. 1 District of Thoracic Surgery, Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan 570311, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Anillin actin-binding protein(ANLN) gene knockout on the proliferation, migration and behavior of lung adenocarcinoma(LUAD) cells. **Methods** ANLN-siRNA plasmid was constructed and transfected into A549 lung adenocarcinoma cells by electroporation. After mono-clonal selection, identification and expansion culture, the experimental group(the ANLN-A549 group) was obtained. The control group(the Ctrl-A549 group) was obtained by transfecting A549 cells with empty vector plasmid. Transwell cell migration assay and cell scratch test were used to detect the migration of lung cancer cells in the two groups, and CCK-8 cell proliferation assay and cell colony formation assay were used to detect the clonal proliferation ability of lung cancer cells. **Results** Transwell cell migration and cell scratch experiments showed that after ANLN gene knockout, the migration rate of lung cancer cells in the ANLN-A549 group was significantly lower than that in the Ctrl-A549 group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The results of CCK-8 cell proliferation assay showed that the proliferation of ANLN-A549 group was significantly slower than that of the Ctrl-A549 group($P<0.05$). Cell colony formation assay showed that the number of cell communities in the ANLN-A549 group was significantly lower than that in the Ctrl-A549 group($P<0.05$). **Conclusion** The knockout of ANLN gene significantly inhibits the proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells.

[Key words] Anillin actin-binding protein; Lung adenocarcinoma; Proliferation; Migration; Non-small cell lung cancer

肺癌作为一种发病率及病死率都比较高的恶性肿瘤,起源于肺部的支气管黏膜或腺体。肺癌在男女患者所患恶性肿瘤中,发病率占 11.4%,肺癌一直是导致癌症患者死亡的首要原因,占有所有癌症死亡的

* 基金项目:海南省自然科学基金高层次人才项目(SQ2022MSXM1128)。
作者简介:朱思明(1994—),硕士研究生在读,主要从事胸外科(含胸部肿瘤学)相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: libiao70@163.com。

18%^[1]。肺癌的发病率与吸烟、职业暴露(石、硅、镍、煤烟等)、慢性阻塞性肺疾病、遗传等因素有较明显的关系^[2]。由于肺癌早期缺乏较特异性的临床表现,因此临床确诊时,患者大多已经处于肺癌的中期或晚期^[3]。虽然近些年随着医学水平的进步,肺癌的治疗得到了有效的改进,但是当下患者的 5 年生存率还需进一步提升^[4]。因此,科研工作者们对肺癌发生发展的分子机制进行进一步的探索研究,力图寻找新的、有潜力的、有效果的分子治疗靶点。

Anillin 肌动蛋白结合蛋白(ANLN)最是从果蝇的胚胎组织中提取到的一种蛋白质,研究者们发现其能够与 F-肌动蛋白特异性地结合,因此将其命名为 F-肌动蛋白结合蛋白^[5]。在人类基因组中,ANLN 基因(NM_018685)位于 7p14.2,其含有 24 个外显子,编码相对分子质量为 123×10^3 的 1 125 个氨基酸残基^[6-8]。在众多的肌动蛋白结合蛋白中,ANLN 作为细胞骨架中重要的组成成分,参与细胞的多种病理生理过程^[9]。ANLN 表达异常在多种癌症中起到重要的作用,但是在肺癌中的作用研究较少,因此本研究采用在 A549 细胞中敲除 ANLN 基因,探讨 ANLN 基因在肺腺癌细胞中增殖、迁移过程中的作用及部分机制,从而为寻找肺腺癌的治疗靶点提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 A549 肺癌细胞(上海市干细胞技术有限公司)。经由靶向 ANLN-siRNA 基因敲除技术得到的实验组(ANLN-A549 组)及对照组(Ctrl-A549 组)细胞均由广州源井生物科技有限公司制备。磷酸盐缓冲液(PBS)、胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA, 0.25%),含酚红、DMEM 高糖培养基、FBS 胎牛血清均购于美国 Gibco 公司。CCK-8 试剂盒购于 Biosharp 生物科技有限公司。Transwell 试剂盒购于美国 Corning 公司。结晶紫染液购于生工生物工程股份有限公司。4%多聚甲醛购于上海凌峰化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 A549 细胞(属于贴壁细胞)培养条件:首先配制含有 89%DMEM 高糖培养基+10%FBS 胎牛血清+1%双抗(青霉素和链霉素)的完全培养基,然后配制 A549 细胞悬液,后移至细胞培养瓶中,最后放置于细胞培养箱中,培养箱条件设定为温度 37℃、5%二氧化碳(CO₂)、饱和湿度。每天使用显微镜仔细观察所培养的细胞,并对细胞的生长状态作出分析判断,选择每 2~3 天更换 1 次完全培养基。当观察到细胞生长融合度占 80%左右时,可以进行细胞的传代培养。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖 设计实验分组为 ANLN-A549 组、Ctrl-A549 组及空白组。将 ANLN-

A549 组及 Ctrl-A549 组细胞消化离心后加入新鲜的完全培养基,制成细胞悬液,计数并调整浓度为 2×10^4 个/mL。铺 4 张 96 孔板,分别将已经制备好的 ANLN-A549 组及 Ctrl-A549 组细胞悬液接种到 96 孔板中,空白组接种新鲜的完全培养基,每孔接种 100 μ L 细胞悬液,每组 5 个复孔。同时在剩余空白孔加入 PBS,防止液体蒸发影响实验结果。在 5%CO₂、37℃恒温条件下继续培养 1 d。测定前,用 10 μ L 移液枪在 ANLN-A549 组、Ctrl-A549 组及空白组孔加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂,注意在加样过程中避免在孔中产生气泡,以免光密度(OD)值受到影响,混匀试剂后转移至培养箱,恒温孵育 2 h。酶标仪测量每组细胞在波长 450 nm 处的 OD 值,并连续测量 3 d,计算细胞的增殖倍数。

1.2.3 细胞集落形成实验 设计实验分组为 ANLN-A549 组、Ctrl-A549 组。将 ANLN-A549 组及 Ctrl-A549 组细胞制成细胞悬液,计数并调整浓度为 1×10^5 个/mL。接种于 6 孔板上,调整每孔细胞数量 800 个左右,将 6 孔板置于培养箱中,37℃恒温培养 14 d,每 3 天采用显微镜观察 1 次,并更换完全培养基。当 6 孔板中出现集落,且每个集落的细胞数超过 50 个,吸弃完全培养基,PBS 冲洗,4%多聚甲醛固定 30 min,然后 PBS 缓慢冲洗 2~3 次,后加入适量结晶紫染液,染色 20 min,最后 PBS 洗涤 2~3 次,将 6 孔板倒扣在网格纸上室温晾干,用数码相机拍照记录细胞的克隆数量。细胞集落形成率=(集落数/接种细胞数)×100%。

1.2.4 Transwell 细胞迁移实验 设计实验分组为 ANLN-A549 组、Ctrl-A549 组。将 ANLN-A549 组及 Ctrl-A549 组细胞制成细胞悬液,计数并调整浓度为 5×10^5 个/mL。ANLN-A549 组和 Ctrl-A549 组每组各 3 个 Transwell 小室,分组置于新的 24 孔板中,移液枪取 100 μ L 无血清细胞悬液加入各个小室的上室,然后在各个下室内添加 500 μ L 含 20%胎牛血清的完全培养基,培养箱中培养 24 h。培养 1 d 后去除 24 孔板,用镊子夹住 Transwell 小室,弃去孔中培养液,PBS 冲洗,4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 缓慢冲洗 2~3 次,后加入适量结晶紫染液,染色 20 min,PBS 洗涤 2~3 次,擦去小室上层未转移的细胞,用镊子小心将每个 Transwell 小室膜取下,移至载玻片中央并用中性树胶封片。封片后,在显微镜下拍照观察,随机选取视野拍 100×照片 3 张,计数后分析。

1.2.5 细胞划痕实验 设计实验分组为 ANLN-A549 组、Ctrl-A549 组。将 ANLN-A549 组及 Ctrl-A549 组细胞制成细胞悬液,计数并调整浓度为 1×10^5 个/mL。培养 24 h 后,吸弃 6 孔板中完全培养

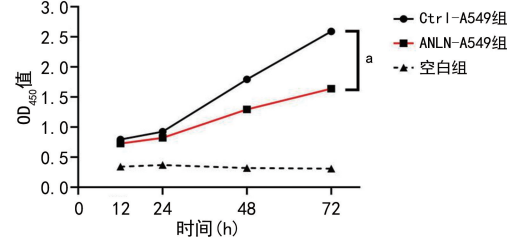
基,然后加入不含血清的培养基,用 200 μ L 的枪头比着直尺,垂直于记号标线进行划痕,枪头始终保持垂直,尽量减少误差。划痕后使用 PBS 洗涤 2~3 次,除去划下的细胞,然后加入无血清培养基,将 6 孔板置于培养箱中恒温培养。选择 0、12、24、48 h 在荧光显微镜下进行拍照,根据所拍摄的照片,使用 Image J 软件打开图片后,计算细胞划痕面积均值,分析各组细胞迁移率,取 3 次的平均值。细胞迁移率(伤口愈合率)=(初始划痕面积-t 时刻划痕面积)/初始划痕面积。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件对数据进行分析。2 组数据间对比采用 *t* 检验,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组数据之间的对比用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CCK-8 法检测细胞增殖结果 培养 12、24、48、72 h 时,ANLN-A549 组 OD₄₅₀ 值分别为 0.727 $\pm$ 0.038、0.820 $\pm$ 0.020、1.293 $\pm$ 0.025、1.638 $\pm$ 0.029,

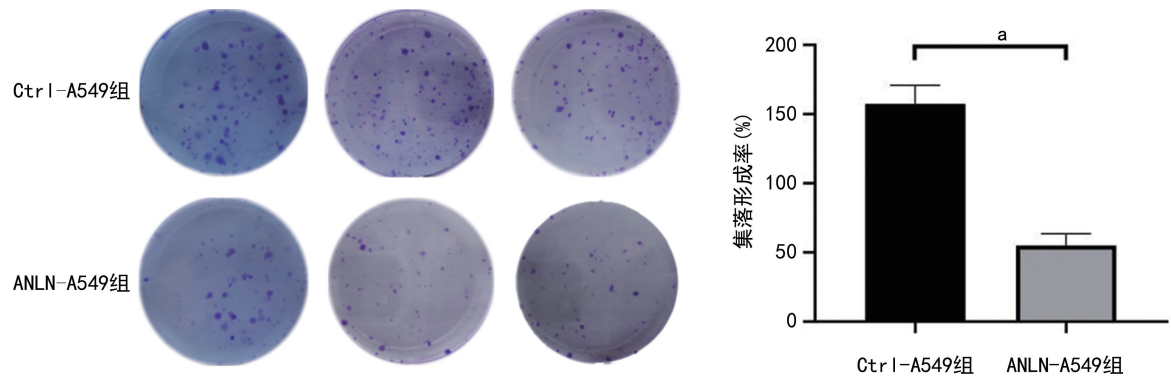
Ctrl-A549 组分别为 0.794 $\pm$ 0.014、0.923 $\pm$ 0.024、1.793 $\pm$ 0.020、2.592 $\pm$ 0.026,空白组为 0.342 $\pm$ 0.003、0.369 $\pm$ 0.005、0.318 $\pm$ 0.005、0.308 $\pm$ 0.004。ANLN-A549 组细胞相比 Ctrl-A549 组,增殖明显减缓,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。



注:与 Ctrl-A549 组比较,^a $P<0.0001$ 。

图 1 A549 细胞 CCK-8 增殖实验

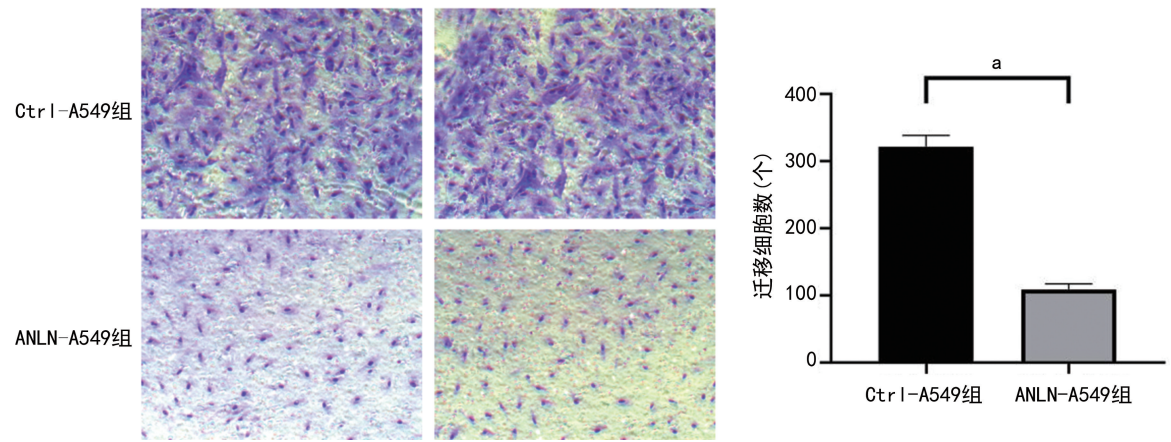
2.2 细胞集落形成实验结果 分别将 ANLN-A549 组、Ctrl-A549 组细胞接种于 6 孔板,培养 14 d 后, Ctrl-A549 组与 ANLN-A549 组细胞的集落数分别为 (157 $\pm$ 14)、(55 $\pm$ 9)个。2 组细胞集落数比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。



注:与 Ctrl-A549 组比较,^a $P<0.001$ 。ANLN-A549 组和 Ctrl-A549 组克隆增殖图(左)及统计学处理结果(右)。

图 2 A549 细胞集落形成实验

2.3 Transwell 细胞迁移实验结果 ANLN-A549 组、Ctrl-A549 组迁移细胞数量分别为 (109 $\pm$ 8)、(322 $\pm$ 17)个。ANLN-A549 组较 Ctrl-A549 组的迁移数明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。



注:与 Ctrl-A549 组比较,^a $P<0.0001$ 。ANLN-A549 组和 Ctrl-A549 组在 Transwell 小室内孵育 24 h 后的细胞迁移图(左)及统计学结果(右)。

图 3 A549 细胞 Transwell 迁移实验

2.4 细胞划痕实验检测细胞迁移情况 Ctrl-A549 组与 ANLN-A549 组细胞培养 24 h 时,细胞迁移率分别为 $(0.33 \pm 0.04)\%$ 、 $(0.11 \pm 0.01)\%$,48 h 时为 $(0.39 \pm 0.01)\%$ 、 $(0.16 \pm 0.02)\%$ 。ANLN-A549 组相比 Ctrl-A549 组,在 24、48 h 时细胞迁移率有较明显的降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

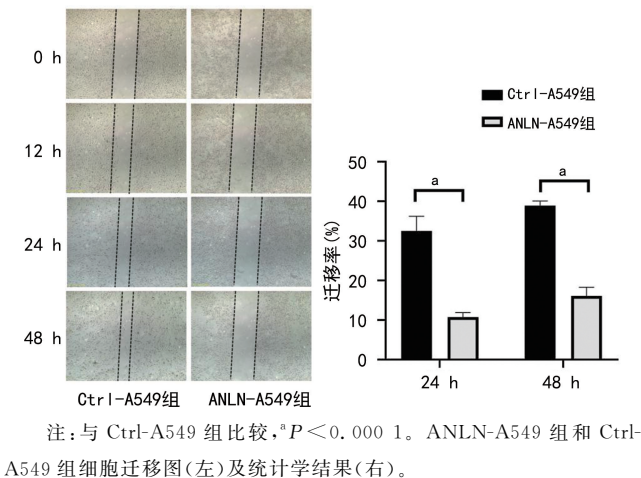


图 4 A549 细胞划痕实验

3 讨 论

肺癌是对人类危害最严重的疾病之一,在世界范围内,肺癌的发病率及病死率均在各恶性肿瘤中处于高位,近年来呈持续上升的一种态势,且趋于年轻化。肿瘤的发生发展是一个多程序、多基因共同作用的结果,早期临床症状特异性差,诊断困难,大多数患者就诊时已处于肿瘤进展的中晚期。近些年来,随着科技水平的逐渐升高,分子生物学的发展迎来了较为明显的上升期,人们对肺癌的认识尤其是肺腺癌基因层次的发病机制愈发全面深刻,如调控肿瘤生长的原癌基因及调控抑制生长的抑癌基因,无论是原癌基因突变或是抑癌基因缺失,它们之间的协调失衡是肿瘤发生发展的重要原因。

ANLN 是一种为细胞分裂所必需的保守的肌动蛋白结合蛋白,参与细胞的迁移和增殖^[10]。ZHANG 等^[11]使用微阵列芯片技术对肝癌组织标本进行研究,结果发现,ANLN 的 CpG 位点甲基化程度与 Ctrl-A549 组相比降低,而与此相反组蛋白中甲基化程度升高,敲除 SMMC-7721 肝肿瘤细胞中的 ANLN 基因,肝肿瘤细胞停留在 G₂/M 期,从而达到抑制肿瘤细胞增殖的目的。此外,在肝脏肿瘤组织标本中,ANLN 大量表达在细胞核内,且癌组织表达量相比癌旁组织明显升高,与原发性肝癌相比转移灶中 ANLN 表达水平明显升高。ZENG 等^[12]敲除 J82 和 5637 膀胱癌细胞的 ANLN 基因,结果发现肿瘤细胞周期蛋白 B1 和 D1 的表达量明显减少,肿瘤细胞停留在 G₂/

M 期,从而使肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭能力下降。WANG 等^[13]在胰腺癌细胞系中发现 LASP1 的上调,而 LASP1 的上调可导致肿瘤的增殖、迁移、侵袭能力增加。与此相反,ANLN 下调可以拮抗 LASP1 的作用,诱导 miR-218-5p 表达,而 miR-218-5p 与 LASP1 的 3'非编码区(3'UTR)相结合。LI 等^[14]在生物信息学的研究中发现,ANLN、SCN11A、LY6D、ZNF488、MYEOV 等基因的表达量在胰腺癌患者预后中扮演重要的角色,随后研究发现,ANLN 的表达与 T 淋巴细胞的浸润存在一定的关系,在 T 淋巴细胞减少的亚群中,ANLN 表达量高的胰腺癌患者的预后相比于 ANLN 表达量低的患者预后更差,表明 ANLN 在胰腺癌患者的免疫治疗中存在一定的应用价值。ZHOU 等^[15]对 71 份乳腺癌肿瘤标本进行免疫组织化学分析,结果显示 ANLN 在癌组织中的表达较癌旁组织升高。随后通过基因敲除技术抑制 ANLN 基因在 ZR-75-30 和 MDA-MB-231 细胞中的表达,结果验证了敲除后的肿瘤细胞较未敲除的肿瘤细胞在增殖、侵袭及迁移等能力下降。上述结果表明,ANLN 在肿瘤细胞中的上调可导致肿瘤细胞增殖、侵袭、迁移能力增加,下调 ANLN 的表达可以拮抗这种作用。

本细胞实验结果表明,在不同时间节点,加入 CCK-8 试剂后 ANLN-A549 组的 OD₄₅₀ 值较 Ctrl-A549 组低,且随着细胞培养时间的延长,差距变大,因此本实验证明,敲除 ANLN 基因后的 A549 细胞增殖能力减弱。同样细胞集落形成实验结果显示,培养一定时间后,ANLN-A549 组细胞在形成集落的数量上低于 Ctrl-A549 组细胞,印证了敲除 ANLN 基因可以有效抑制 A549 细胞的增殖能力。在细胞划痕实验中,ANLN-A549 组细胞划痕操作后的 24、48 h,细胞迁移率相比 Ctrl-A549 组细胞均表现出较为明显的降低,因此本实验结果显示,敲除 ANLN 基因后的 A549 细胞迁移能力明显下降。同时采用 Transwell 迁移实验对敲除 ANLN 基因的 A549 细胞的迁移率进行验证,结果发现,在培养一定时间后,ANLN-A549 组迁移至小室膜另一侧的细胞数量明显少于 Ctrl-A549 组,再次证明敲除 ANLN 基因后可以有效抑制 A549 细胞的迁移能力。在 DENG 等^[16]通过生物信息学研究发现,ANLN 在肺腺癌中的表达升高,通过逆转录聚合酶链反应(qPCR)和蛋白质印迹法证实高表达的 ANLN 与肿瘤的预后不良、淋巴结转移和恶性程度呈正相关。本研究通过细胞实验,验证了其部分结果,显示 ANLN 的表达导致肺腺癌细胞的增殖、迁移能力增加。

本实验通过降低 ANLN 在肺腺癌细胞中的表

达,结果显示肺腺癌细胞的增殖、迁移能力下降。因此,ANLN 有望成为一个有效的分子治疗靶点,参与临床上对肺腺癌患者的治疗。未来仍需要进一步的研究来阐明 ANLN 分子的作用机制,为发展治疗肺癌的有效靶向药物提供理论和实验基础。

参考文献

[1] 曹毛毛,陈万青. GLOBOCAN 2020 全球癌症统计数据解读[J/CD]. 中国医学前沿杂志(电子版),2021,13(3):63-69.

[2] FAN Y G,JIANG Y,LI X,et al. Burden of lung cancer attributable to occupational carcinogens from 1990 to 2019 and projections until 2044 in China[J]. Cancers(Basel),2022,14(16):3883.

[3] 朱小琼,蒋栋铭,沈佳莹,等. 全球不同人类发展指数国家肺癌发病率和死亡率分析[J]. 上海预防医学,2023,35(4):305-313.

[4] SHARMA P, ALLISON J P. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: Toward combination strategies with curative potential[J]. Cell,2015,161(2):205-214.

[5] MILLER K G, FIELD C M, ALBERTS B M. Actin-binding proteins from Drosophila embryos: A complex network of interacting proteins detected by F-actin affinity chromatography [J]. Cell Biol,1989,109(6 Pt 1):2963-2975.

[6] OEGEMA K, SAVOIAN M S, MITCHISON T J, et al. Functional analysis of a human homologue of the Drosophila actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis[J]. Cell Biol,2000,150(3):539-552.

[7] GEORGOULI M, HERRAIZ C, CROSAS-MOLIST E, et al. Regional activation of myosin II in cancer cells drives tumor progression via a secretory cross-talk with the immune microenvironment [J]. Cell,2019,176(4):757-774. e23.

[8] 徐丽萌. Anillin 对细胞骨架蛋白和细胞力学特

性的调节作用[D]. 太原:太原理工大学,2019.

[9] MADDOX A S, LEWELLYN L, DESAI A, et al. Anillin and the septins promote asymmetric ingression of the cytokinetic furrow [J]. Dev Cell,2007,12(5):827-835.

[10] SHI Y, MA X, WANG M, et al. Comprehensive analyses reveal the carcinogenic and immunological roles of ANLN in human cancers[J]. Cancer Cell Int,2022,22(1):188.

[11] ZHANG L, WANG D, LI Z, et al. Overexpression of anillin is related to poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2021, 20 (4): 337-344.

[12] ZENG S, YU X, MA C, et al. Transcriptome sequencing identifies ANLN as a promising prognostic biomarker in bladder urothelial carcinoma[J]. Sci Rep,2017,7(1):3151-3162.

[13] WANG A, DAI H, GONG Y, et al. ANLN-induced EZH2 upregulation promotes pancreatic cancer progression by mediating miR-218-5p/LASP1 signaling axis[J]. J Exp Clin Cancer Res,2019,38(1):347.

[14] LI Z, HU C, YANG Z, et al. Bioinformatic analysis of prognostic and immune-related genes in pancreatic cancer [J]. Comput Math Methods Med,2021,2021:5549298.

[15] ZHOU W, WANG Z, SHEN N, et al. Knock-down of ANLN by lentivirus inhibits cell growth and migration in human breast cancer [J]. Mol Cell Biochem,2015,398(1/2):11-19.

[16] DENG F, XU Z, ZHOU J, et al. ANLN regulated by miR-30a-5p mediates malignant progression of lung adenocarcinoma[J]. Comput Math Methods Med,2021,2021:9549287.

(收稿日期:2023-04-03 修回日期:2023-09-25)