

eEF1A1 低表达对肝癌细胞凋亡、增殖与迁移的影响及 eEF1A1/A2 与 ANXA7 间的相互作用

周淑亭,王 丽,黄玉红,张 军,魏元怡,王静文,王洪海,邢博漪,宣 威,黄 贺,唐建武
(大连医科大学基础医学院病理学与法医学教研室,辽宁 大连 116044)

摘 要: [目的] 研究 shRNA 抑制 eEF1A1 表达对肝癌 Hca-P 细胞凋亡、增殖、迁移的影响,并通过分别下调 eEF1A1 和 ANXA7 的表达,探讨肝癌 Hca-P 细胞中 eEF1A1、eEF1A2 与 ANXA7 表达的相关性及潜在的相互作用。[方法] 构建靶向 eEF1A1 基因的 shRNA 质粒表达载体,瞬时转染至小鼠肝癌 Hca-P 细胞中,设无处理组(CON)、eEF1A1-shRNA 组(eEF1A1-shRNA)、转染 pGPU/GFP/Neo-NC 的阴性对照组(NC)三组细胞进行实验。采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 技术检测 eEF1A1 的抑制效果,并分别检测各组 eEF1A2、ANXA7 在 mRNA 和蛋白水平的表达。CCK-8 法、流式细胞仪、Transwell 小室分别检测对细胞增殖、凋亡、迁移的影响。此外,复苏已稳定低表达 ANXA7 的 Hca-P 细胞,通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot 技术检测无处理组(CON)、ANXA7-shRNA 转染组(ANXA7-shRNA)、阴性对照组(NC)三组 Hca-P 细胞中 eEF1A1、eEF1A2 在 mRNA 和蛋白水平的表达。[结果] eEF1A1 靶向 shRNA 成功下调小鼠肝癌 Hca-P 细胞中 eEF1A1 基因的表达。流式细胞仪检测显示,CON 组、eEF1A1-shRNA 组、NC 组细胞凋亡率分别为 $2.85\% \pm 0.37\%$ 、 $4.71\% \pm 0.21\%$ 和 $3.01\% \pm 0.33\%$,eEF1A1-shRNA 组的细胞凋亡较 CON 组和 NC 组明显增加($P < 0.05$);CCK-8 实验发现,eEF1A1-shRNA 转染细胞后细胞增殖能力较 CON 组和 NC 组明显下降;Transwell 实验显示,CON 组、eEF1A1-shRNA 组、NC 组迁移细胞数目为 123.75 ± 9.26 、 66.84 ± 17.47 、 115.31 ± 12.59 ,eEF1A1-shRNA 组细胞迁移能力较 CON 组和 NC 组显著减弱 ($P < 0.05$)。qRT-PCR 和 Western blot 检测显示,eEF1A1-shRNA 组 eEF1A2、ANXA7 在 mRNA 和蛋白水平的表达量较 CON 组和 NC 组明显降低 ($P < 0.05$),相较于其无处理组的蛋白表达水平,eEF1A2 和 ANXA7 分别下降了 57% 和 21%;ANXA7-shRNA 组中 eEF1A1、eEF1A2 在 mRNA 和蛋白水平的表达量较 CON 组和 NC 组亦明显降低($P < 0.05$)。[结论] 通过靶向 eEF1A1 的 shRNA 使 eEF1A1 低表达,可诱导细胞凋亡,抑制细胞的增殖能力及迁移能力。eEF1A1、eEF1A2 与 ANXA7 的表达密切相关,且 eEF1A1 与 ANXA7 存在相互作用,可能共同参与调控肿瘤的发生与发展。

关键词: eEF1A1; eEF1A2; ANXA7; 肝肿瘤

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)08-0755-09

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.08.B001

Effects of Down-regulating eEF1A1 Gene on Apoptosis, Proliferation and Migration of Hepatocarcinoma Cells and Interaction between eEF1A1/A2 and ANXA7

ZHOU Shu-ting, WANG Li, HUANG Yu-hong, ZHANG Jun, WEI Yuan-yi, WANG Jing-wen, WANG Hong-hai, XING Bo-yi, XUAN Wei, HUANG He, TANG Jian-wu

(Department of Pathology, Basic Medical College, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of down-regulating eEF1A1 gene on the apoptosis, proliferation and migration of hepatocarcinoma cells(Hca-P), and the interactions between eEF1A1/A2 and ANXA7. [Methods] The mouse Hca-P cells were transfected with shRNA plasmid vector targeting eEF1A1 gene (eEF1A1-shRNA group) or pGPU/GFP/Neo-NC (NC group), and the untransfected cells were set as CON group. The mRNA and protein expression levels of eEF1A2 and ANXA7 were detected by qRT-PCR and Western blot, respectively. Cell proliferation, apoptosis, migration after transfection were evaluated by CCK-8 method, flow cytometry and Transwell chamber, respectively. The pre-retained Hca-P cells with stably low expressing ANXA7 were revived, and the mRNA and protein expression levels of eEF1A1 and eEF1A2 in Hca-P cells were detected with qRT-PCR and Western blot, respectively in 3 groups. [Results] The shRNA targeting eEF1A gene successfully knocked down the mRNA and protein expression levels of eEF1A1. Flow cytometry assay suggested that the apoptotic rates were $2.85\% \pm 0.37\%$ (CON), $4.71\% \pm 0.21\%$ (eEF1A1-shRNA) and $3.01\% \pm 0.33\%$ (NC)($P < 0.05$). CCK-8 assay showed that compared with CON and NC groups, the cell proliferation significantly declined in eEF1A1-shRNA group ($P < 0.05$). The Transwell assay showed that cell migration in eEF1A1-shRNA group was lower than that of CON and NC groups (66.84 ± 17.47 vs 123.75 ± 9.26 and 115.31 ± 12.59 ; $P < 0.05$). The qRT-PCR and Western blot results showed that compared with the CON group and NC group, the expression levels of eEF1A2 and ANXA7 in eEF1A1-shRNA group were significantly decreased($P < 0.05$). Compared to the expression in untreated group, the protein expression levels of eEF1A2 and ANXA7 decreased by 57% and 21% respectively. The expression of eEF1A1 and eEF1A2 at mRNA and protein levels in ANXA7-shRNA group were also significantly lower than those of CON group and NC group ($P < 0.05$). [Conclusion] Knocking down of eEF1A1 expression can induce apoptosis, inhibit proliferation and migration in Hca-P

通讯作者: 唐建武, 教授, 博士生导师, 硕士; 大连医科大学基础医学院病理学与法医学教研室, 辽宁省大连市旅顺口区旅顺南路西段 9 号(116044); E-mail: jianwutang@163.com

收稿日期: 2017-04-17; **修回日期:** 2017-11-05

cells. It is suggested that the expression of eEF1A1, eEF1A2 and ANXA7 are closely related; there is interaction between eEF1A1 and ANXA7, which may be jointly involved in the regulation of tumor occurrence and development.

Subject words: eEF1A1; eEF1A2; ANXA7; hepatocarcinoma

真核翻译延长因子 1A (eukaryotic translation elongation factor 1A, eEF1A) 是在蛋白质合成过程中参与翻译功能的重要分子。eEF1A 可分为 eEF1A1 和 eEF1A2 两种亚型, 在人类, 分别由 6 号和 20 号染色体上的 2 个不同的基因编码, 主要参与凋亡、细胞周期调节、蛋白质降解及翻译后修饰等^[1,2]。大量研究发现它们在肝癌、前列腺癌和胰腺癌等多种恶性肿瘤中呈高表达, 且与肿瘤增殖、侵袭、转移和患者的预后密切相关。

膜联蛋白 A 是一类钙依赖性磷脂结合蛋白超家族。膜联蛋白 A7 (Annexin A7, ANXA7) 与家族其他成员相似, 可被蛋白激酶 C (PKC) 磷酸化成为蛋白激酶 C 的底物^[3]。Ca²⁺, GTP 和 PKC 共同使 ANXA7 具有促进胞吐过程中细胞膜融合的活性^[4,5], 且 ANXA7 具有 Ca²⁺ 依赖的 GTP 水解酶活性, 随着胞内颗粒的向外分泌活性加强^[5]。此外, ANXA7 参与细胞生长、分化、增殖、运动、凋亡等^[6]。ANXA7 形成 51kD 和 47kD 分子量的两个亚型, 大部分细胞多以 47kD 亚型表达为主。

众所周知, 肿瘤的转移是一个多步骤、连续、复杂的生物学过程, 是恶性肿瘤患者预后差、病死率高的重要原因之一。肿瘤细胞内多种分子的异常表达以及相关信号通路的异常激活常与肿瘤细胞的高转移、高侵袭密切相关。因此, 研究肿瘤侵袭转移中发挥调控作用的关键分子与其共相关蛋白间的作用机制, 寻找合理有效的肿瘤治疗新靶点是肿瘤学研究的重点, 也是当今临床医学面临的挑战之一。

Hca-F 细胞和 Hca-P 细胞是本课题组利用同一亲本筛选分离出的具有不同淋巴道转移潜能的小鼠肝癌细胞系。我们前期通过蛋白质组学技术筛选发现, eEF1A1 与 eEF1A2 在高低不同淋巴道转移潜能细胞株 Hca-F 和 Hca-P 的表达具有显著性差异^[7]。Jin 等^[8,9]分别在 Hca-F 和 Hca-P 细胞中证实 ANXA7

是影响肝癌淋巴道转移的重要基因。本实验旨在通过 RNA 干扰技术研究 eEF1A1 对肝癌 Hca-P 细胞凋亡、增殖、转移能力的影响, 探讨 eEF1A1/A2 以及 ANXA7 在肿瘤中表达的相关性及其潜在的相互作用, 进一步分析它们在肿瘤增殖、凋亡、转移等过程中可能共同参与的调控机制。

1 材料与方法

1.1 一般材料

细胞来源: 小鼠肝癌低淋巴道转移 Hca-P 细胞株, 由大连医科大学基础医学院病理教研室建立并提供。

主要试剂: 胎牛血清 (Biowest 公司); RPMI-1640 (Gibco 公司); Lipo2000 转染试剂 (Invitrogen 公司); eEF1A1 质粒载体套装 (上海吉玛基因技术有限公司); Annexin A7 抗体 (Abcam 公司); eEF1A1、eEF1A2 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司); 远红外荧光二抗 (ODYSSEY 公司); Trizol 试剂 (北京全式金生物技术有限公司); qRT-PCR 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司); CCK-8 试剂 (日本同仁化学研究所); 细胞凋亡检测试剂盒 (凯基生物科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 shRNA 合成

从基因库获得小鼠 eEF1A1 基因序列号 (NM_010106), 委托上海吉玛基因公司构建靶向小鼠 eEF1A1 的 pGPU6/GFP/Neo-eEF1A1-shRNA 载体质粒和阴性对照 pGPU6/GFP/Neo-NC-shRNA。

1.2.2 细胞培养及转染

细胞培养: 复苏液氮中妥善保存的稳定转染 pGPU6/GFP/Neo-ANXA7 的 Hca-P 细胞, 以及 pGPU6/GFP/Neo-NC 的 Hca-P 细胞以及未作任何处理的

Hca-P 细胞。PBS 洗去冻存液,后将细胞于含 20%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中培养,并置于 37℃,5% CO₂,相对湿度 90%的细胞培养箱中,每 24h 换液 1 次。

细胞转染:收集生长活跃的 Hca-P 细胞,调密度 2×10^5 个细胞/孔,接种于 24 孔板中。按照 Lipo2000 转染试剂盒说明书,分别将重组载体质粒 pGPU/GFP/Neo-eEF1A1-shRNA 和阴性对照 pGPU/GFP/Neo-NC 转染至 Hca-P 细胞,细胞设无处理组 Hca-P 细胞 (CON)、eEF1A1-shRNA 组 Hca-P 细胞 (eEF1A1-shRNA)、阴性对照组 Hca-P 细胞 (NC) 三组进行后续实验。转染 48h 后荧光显微镜下观察各组细胞绿色荧光蛋白的表达情况,收集细胞准备提取总 RNA 和总蛋白。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达

应用 Trizol 试剂和分别提取各组细胞的总 RNA,并将其反转录成 cDNA (反应条件:37℃ 15min,85℃ 5s),随后以此 cDNA 为模板应用全式金公司提供的 qRT-PCR 试剂盒进行 PCR 扩增,检测各组细胞中 eEF1A1/A2 及 ANXA7 mRNA 的表达水平。引物:eEF1A1 上游 5'-ATTGGAGGCATTG-GCACTGT-3',下游 5'-CCCAGGAAGAGCTTCACT-CAA-3';eEF1A2 上游 5'-AGGAGGCTGC-CCAGTTCAC-3',下游 5'-TGCCAGAACGACGGT-CAAT-3';ANXA7 上游 5'-AGGTCGGTGTGAACG-GATTTG-3',下游 5'-TGTAACCATGTAGTTGAG-GTCA-3';GAPDH 上游 5'-AAGGGTTTGGGACA,下游 5'-CATGAACAGCGCAAGGATTA-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。反应程序为:94℃ 30s,94℃ 5s,60℃ 30s,反应 45 个循环。

1.2.4 Western Blot 检测蛋白表达

提取细胞总蛋白,BCA 法测蛋白浓度。按照 40μg/孔的蛋白行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将电泳产物转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉中封闭 2h;加入 eEF1A1 抗体(1:1000)、eEF1A2 抗体 (1:500)、ANXA7 抗体 (1:2000)、GAPDH 抗体 (1:1000),4℃过夜;TBST 漂洗 3 次,加入 1:16000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)结合的山羊抗兔/鼠荧光二抗,37℃恒温箱避光孵育 1h,TBST 漂洗 3 次。应用 Odyssey 红外荧光成像仪扫描 PVDF 膜,进行蛋白条带灰度值的分析。以目的蛋白条带的灰度值与

内参 GAPDH 蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

使用细胞凋亡检测试剂盒检测转染后细胞凋亡情况。eEF1A1-shRNA 转染 48h 后,收集三组细胞,冷 PBS 小心洗涤 2 次,先将细胞重悬于 200μl 结合缓冲液,加入 10μl AnnexinV-FITC 染液和 5μl PI 染液,轻轻混匀,避光反应 15min,再加入 300μl 结合缓冲液,应即上流式细胞仪检测。

1.2.6 CCK8 法检测细胞增殖

收集 eEF1A1-shRNA 转染 48h 后的各组细胞,接种于 96 孔板(密度为 1.5×10^4 个/ml,100μl/孔),每组 5 个复孔,细胞分别培养 0h、24h、48h、72h 后,加入 CCK-8 试剂,10μl/孔,37℃孵箱培养 1h 后,酶标仪检测不同时间各组细胞在 450nm 波长处的吸光度(OD)值,以 OD 值作为纵坐标、时间为横坐标绘制细胞生长曲线,分析细胞增殖能力的变化。

1.2.7 Transwell 小室检测细胞迁移能力

eEF1A1-shRNA 转染 48h 后,收集三组细胞,PBS 洗涤 2 次。用 15%胎牛血清的培养基重新混悬细胞,调细胞密度至 3×10^5 个/ml,接种于 24 孔板小室上室(200μl/孔),下室加入 600μl 含 30%胎牛血清的 RPMI 1640 的培养基,每组细胞设 3 个复孔,置于 37℃,5%CO₂ 孵箱中培养 24h。取出小室,吸出上室剩余培养基及细胞,用棉签擦去周边,干燥 30min。风干后的小室浸在 1%结晶紫溶液中染色,20min 后吸出结晶紫溶液,PBS 清洗。显微镜下细胞计数,每小室随机选取 3 个视野取平均数。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,重复测量资料采用均数±标准差表示,独立样本的组间比较采用单因素方差分析(Bonferroni's Multiple Comparison Test)或 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 转染 pGPU6/GFP/Neo-eEF1A1-shRNA 和 pGPU/GFP/Neo-NC 的效率鉴定

将重组载体质粒 pGPU6/GFP/Neo-eEF1A1-shRNA 和阴性对照载体 pGPU6/GFP/Neo-NC 转染至 Hca-P 细胞 48h 后,在荧光显微镜下查看细胞中荧

光蛋白的表达情况, 如图 Figure 1。eEF1A1-shRNA 转染组细胞和阴性对照组细胞均可见较高荧光表达。

2.2 eEF1A1-shRNA 对肝癌 Hca-P 细胞 eEF1A1 表达的影响

qRT-PCR 和 Western blot 结果表明, eEF1A1-shRNA 转染组中 eEF1A1 mRNA 和蛋白的表达水平相比无处理组和阴性转染组细胞均呈明显下调, 差异有统计学意义 ($t=9.887, 9.052; P$ 均 <0.05)。另外, 在 mRNA 水平上其表达量降为原来的 45.3%, 在蛋白水平的表达量降为原来的 72.8%; 而无处理组和阴性对照组细胞间 eEF1A1 mRNA 和蛋白表达比较, 均无显著性差异 ($t=0.946, P>0.05$), 见 Figure 2、3 及 Table 1。

2.3 下调肝癌 Hca-P 细胞 eEF1A1 的表达对 eEF1A2 与 ANXA7 表达的影响

qRT-PCR 检测结果显示, eEF1A1-shRNA 转染组与无处理组和阴性对照组细胞相比, eEF1A2 和 ANXA7 mRNA 的表达水平均显著降低 ($t=8.96, 6.95; P$ 均 <0.05), 前者降低 84.5%, 后者降低 63.0%; 而无处理细胞组和阴性对照细胞组 mRNA 的表达水平比较, 差异无统计学意义 ($t=2.02, P>0.05$)。见 Figure 4。

Western blot 结果进一步表明, eEF1A1-shRNA 转染组细胞中 eEF1A2 蛋白的表达水平明显低于无处理组和阴性对照组 ($t=10.65, 8.209; P$ 均 <0.05), 且 ANXA7 蛋白的表达也较无处理组和阴性对照组降低, 差异均有统计学意义 ($t=5.565, 5.047; P$ 均 <0.05)。而无处理组和阴性对照组蛋白的表达水平, 比较差异无统计学意义

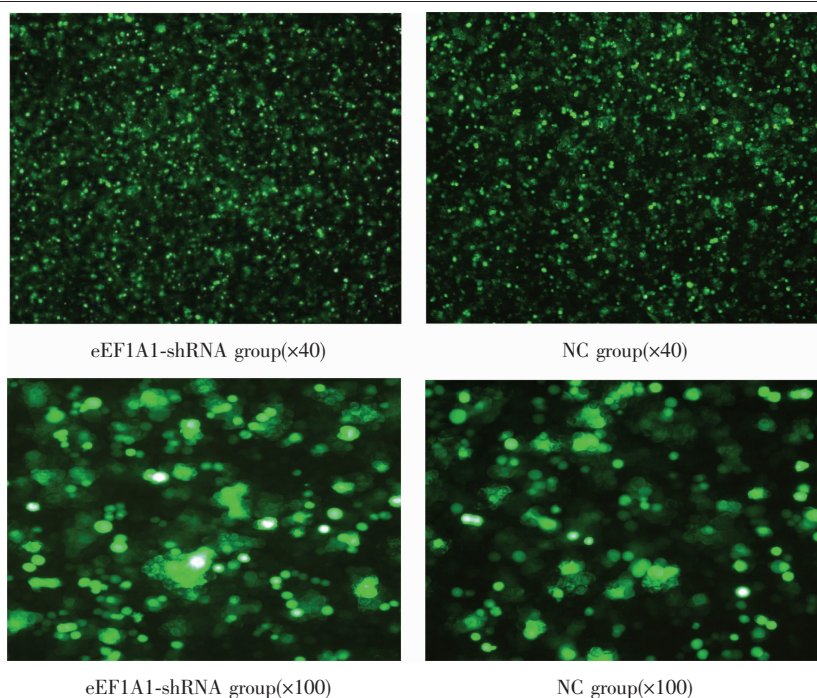


Figure 1 Expression of green fluorescent protein in Hca-P cells at 48h post-transfection

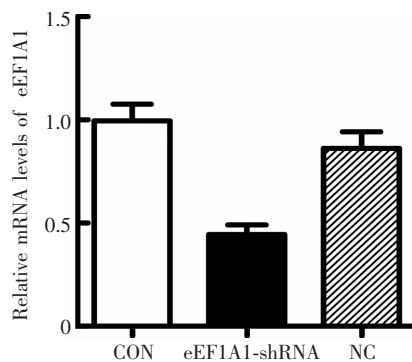


Figure 2 The expression level of eEF1A1 mRNA measured by qRT-PCR

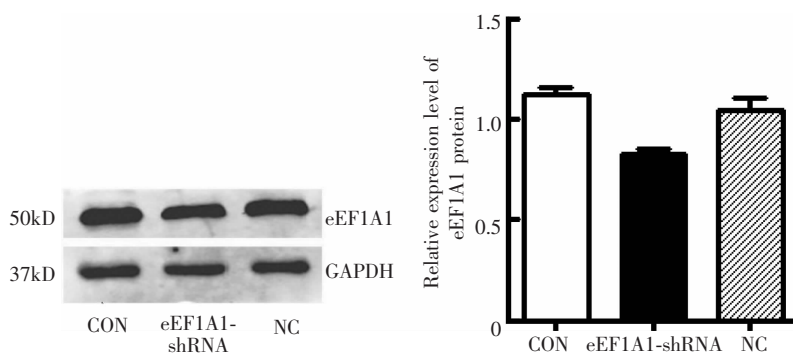


Figure 3 The expression level of eEF1A1 protein measured by Western blot

Table 1 The primer sequence of the three groups

Groups	eEF1A1	GAPDH	eEF1A1:GAPDH
CON	10531	9097	1.157
eEF1A1-shRNA	7436	8820	0.843
NC	9960	9038	1.102

2.4 下调肝癌 Hca-P 细胞 ANXA7 的表达对 eEF1A1、eEF1A2 表达的影响

qRT-PCR 结果显示,同无处理组和阴性对照组相比,ANXA7-shRNA 稳定下调组(ANXA7-shRNA)细胞中,eEF1A1 和 eEF1A2 mRNA 的表达量均有明

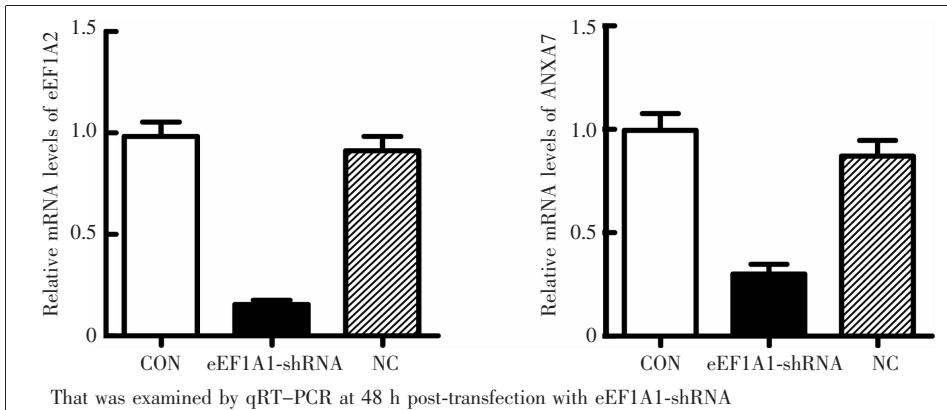


Figure 4 The mRNA expression level of eEF1A1 and ANXA7

($t=2.438, 0.708$; P 均 >0.05), 见 Figure 5、Table 2。进一步分析显示,eEF1A2 的蛋白表达量下降了 57%, Annexin A7 的蛋白表达量下降了 21%。

Table 2 The gray value of protein bands in each group

Groups	Target protein	GAPDH	Target protein: GAPDH
eEF1A2 protein			
eEF1A1-shRNA	3711	9099	0.407
CON	8844	9299	0.951
NC	7850	9561	0.821
ANXA7 protein			
eEF1A1-shRNA	7505	9099	0.824
CON	9754	9299	1.049
NC	9364	9561	0.979

显减低 (eEF1A1: $t=16.86, 14.83$; P 均 <0.05 。eEF1A2: $t=12.53, 11.17$, P 均 <0.05), eEF1A1 在 mRNA 水平的表达减少了 72.3%, eEF1A2 减少了 62.0%; 而无处理组与阴性对照组 mRNA 的表达水平比较, 差异无统计学意义 ($t=2.03, 2.42$; P 均 >0.05), Figure 6。

Western blot 结果也表明,ANXA7 稳定下调组细胞 eEF1A1 和 eEF1A2 蛋白的表达水平显著低于无处理组和阴性对照组 (eEF1A1: $t=5.792, 5.000$; P 均 <0.05 。eEF1A2: $t=6.887, 4.452$; P 均 <0.05), 差异均有统计学意义; 同时, 无处理组和阴性对照组两组细胞 eEF1A1 和 eEF1A2 的蛋白表达量比较, 差异无统计学意义 ($t=0.793, 2.436$; P 均 >0.05), 见 Figure 7、Table 3。

2.5 下调 eEF1A1 的表达诱导肝癌 Hca-P 细胞凋亡

流式细胞仪检测细胞凋亡情况如 Figure 8 所示, 无处理组、eEF1A1-shRNA 转染组、阴性对照组三组细胞早期凋亡率分别为 $2.85\% \pm 0.37\%$, $4.71\% \pm 0.21\%$, $3.01\% \pm 0.33\%$, eEF1A1-shRNA 组 (Figure 8E) Hca-P 细胞相较空白对照组细胞 (Figure 8D) 和阴性

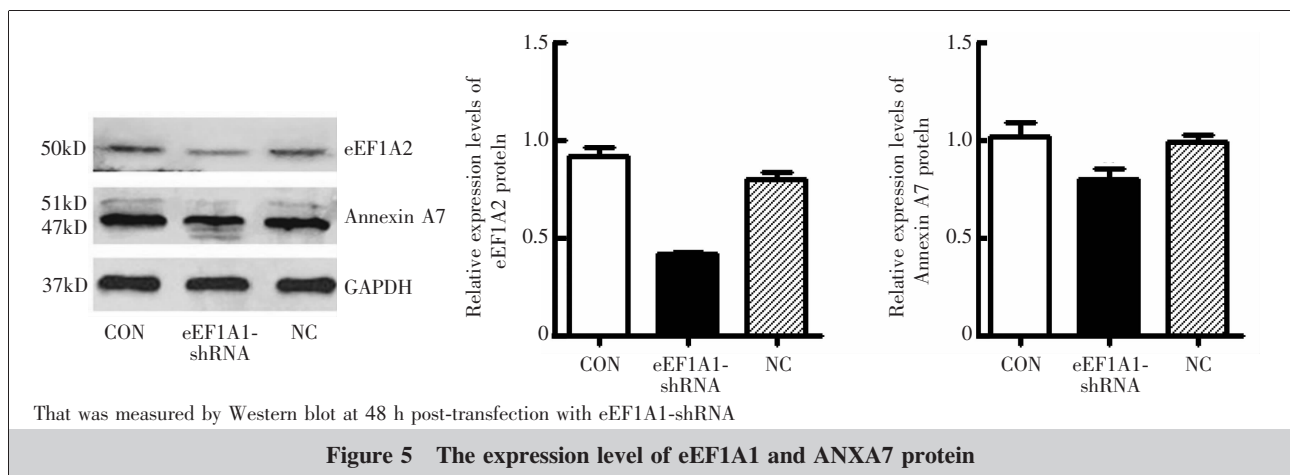


Figure 5 The expression level of eEF1A1 and ANXA7 protein

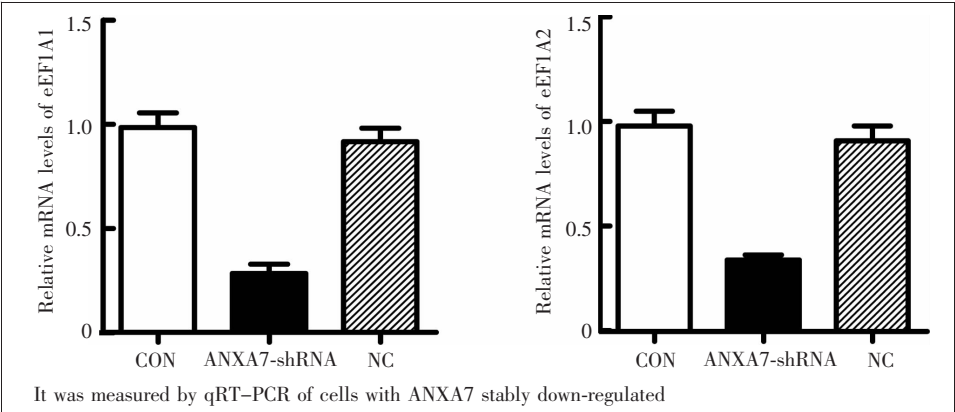


Figure 6 The mRNA expression level of eEF1A1 and ANXA7

对照组细胞(Figure 8F)凋亡数目明显增多($t=10.26$, $P<0.05$)。而无处理组和阴性对照组细胞凋亡数目无明显差异($t=2.001$, $P>0.05$)。

2.6 下调 eEF1A1 的表达抑制肝癌 Hca-P 细胞增殖

CCK-8 法检测细胞增殖结果,发现 eEF1A1-shRNA 转染组肝癌细胞的生长活力相比无处理组,于 48h 时呈现出显著性差异($P=0.0017$)。绘制细胞增殖曲线后可见,eEF1A1-shRNA 转染组细胞的增殖能力一直低于无处理组和阴性对照组细胞,两对

Table 3 The gray value of protein bands in each group

Groups	Target protein	GAPDH	Target protein: GAPDH
eEF1A1 protein			
ANXA7-shRNA	7011	9601	0.730
CON	9065	8425	1.076
NC	8653	9834	0.880
eEF1A2 protein			
ANXA7-shRNA	4478	9601	0.467
CON	7760	8425	0.921
NC	7887	9834	0.802

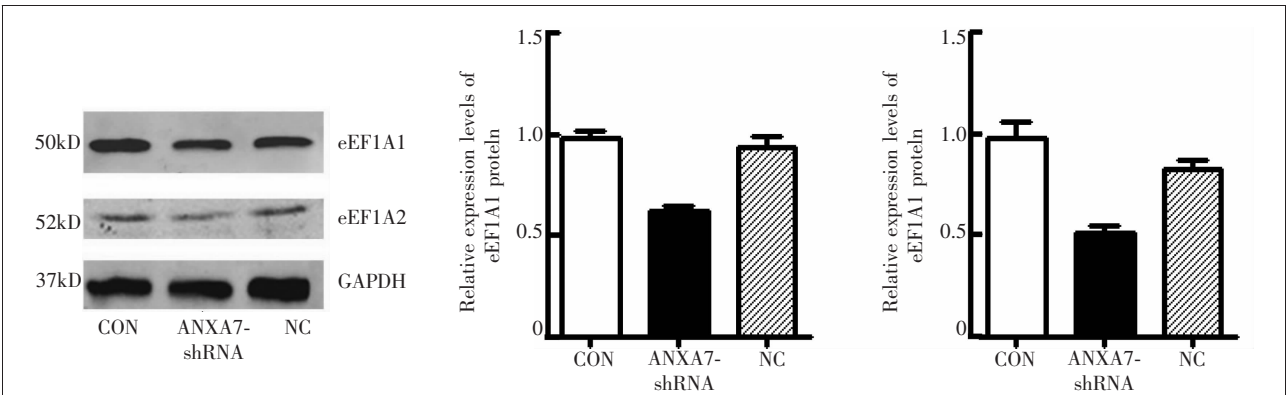


Figure 7 The expression level of eEF1A1 and eEF1A2 protein

照组间比较无显著性差异($P=0.96$)。每组细胞在各时间点的 OD 值见 Table 4,eEF1A1 基因下调后每组细胞的增殖能力见 Figure 9。

2.7 下调 eEF1A1 的表达抑制肝癌 Hca-P 细胞迁移

eEF1A1-shRNA 转染组穿过小室的细胞数明显少于无处理组细胞($t=5.206$, $P<0.05$)。而无处理组和阴性对照组穿过小室的细胞数无显著性差异($t=0.662$, $P>0.05$),见 Table 5,Figure 10、11。

3 讨论

近年研究发现,eEF1A1/A2 在多种恶性肿瘤中异常高表达,对肿瘤细胞的增殖、凋亡及转移能力有重要影响。本研究中细胞增殖和迁移实验结果显示,eEF1A1 表达下调后与无处理组和阴性对照组相比,肝癌细胞的增殖与迁移能力受到明显抑制,凋亡数目明显增加。晏琛等^[10]发现抑制 eEF1A1 的表达,可以抑制人肝癌细胞中 cyclin D1 和 CDK4 蛋白的表达,使细胞周期停滞于 G 期,影响肝癌细胞的增殖能力。Zhang 等^[11]在肝癌 HepG2 和 Hep3B 细胞中发现,eEF1A1 可与骨桥蛋白结合,调控后者 mRNA 半衰期,降低骨桥蛋白的表达水平,影响肝细胞癌的迁移、侵袭。另有研究表明肿瘤细胞中异常增多的 eEF1A1 蛋白可以与 p53 家族结合,抑制 p53 家族介

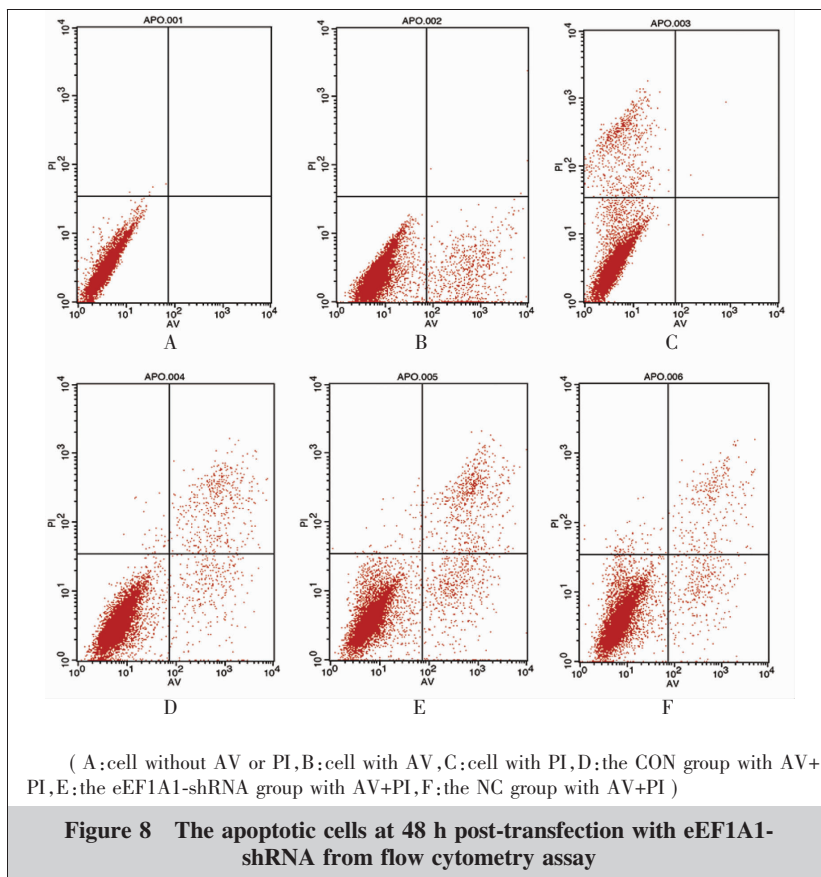
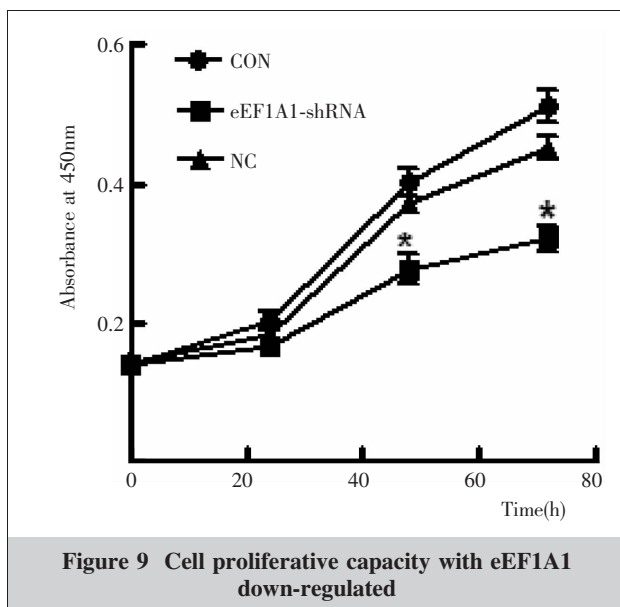


Table 4 The absorbance values of CCK-8 assay

Groups	OD values at different time			
	0h	24h	48h	72h
eEF1A1-shRNA	0.137±0.010	0.167±0.015	0.280±0.033	0.321±0.027
CON	0.142±0.012	0.198±0.018	0.402±0.031	0.516±0.043
NC	0.145±0.011	0.181±0.020	0.371±0.011	0.452±0.031



导的促凋亡效应^[12]。在人结肠癌细胞和急性 T 细胞白血病细胞中亦发现抑制 eEF1A1 表达后细胞凋亡增多^[13,14]。

膜联蛋白 A7(ANXA7)基因是本课题组前期重点研究的影响肿瘤增殖、转移等生物学行为的关键基因。前期有关 ANXA7 的实验表明,在 Hca-F 细胞和 Hca-P 细胞中,ANXA7 基因的表达水平与细胞的增殖与转移呈正相关。且细胞中存在多种与 ANXA7 相互结合或相互作用的蛋白,如 ALG-2、SODD、Hn-RNPA2/B1、RBM4 等,它们同 ANXA7 协同或拮抗共同参与调控细胞凋亡、增殖、转移等行为活动。另有研究发现在人肝癌 HepG2 细胞中,ANXA7 表达下调后,cyclinD1 和 Ki67 的表达都出现了不同程度的降低,细胞增殖能力被抑制^[15];抑制 ANXA7 的表达,galactin-3 的表达也随之降低^[16]。

本实验通过分别下调 eEF1A1 和 ANXA7 的表达发现,抑制 eEF1A1 基因表达后,ANXA7 在基因和蛋白水平的表达随之降低,而抑制 ANXA7 基因表达,eEF1A1 在基因和蛋白水平的表达亦降低,结果提示 eEF1A1 与 ANXA7 之间存在相互作用。ANXA7 与 eEF1A 都是细胞中高度保守的蛋白质,且从功能上二者有一定的相似性。此外,它们同时参与细胞骨架的活动,细胞凋亡等。有研究提出,ANXA7 也可作为一种不典型的 G 蛋白,通过 Ca²⁺-GTP 通路介导细胞融合^[17]。Vinayagam 等^[18]采用自动酵母双杂交技术,通过细胞间的信号转导,搜索到 450 多个信号相关的蛋白,建立这些蛋白的相关

Table 5 Cell count at 48 h post-transfection with eEF1A1-shRNA

Groups	Mean±SD
eEF1A1-shRNA	66.84±17.47
CON	123.75±9.26
NC	115.31±12.59

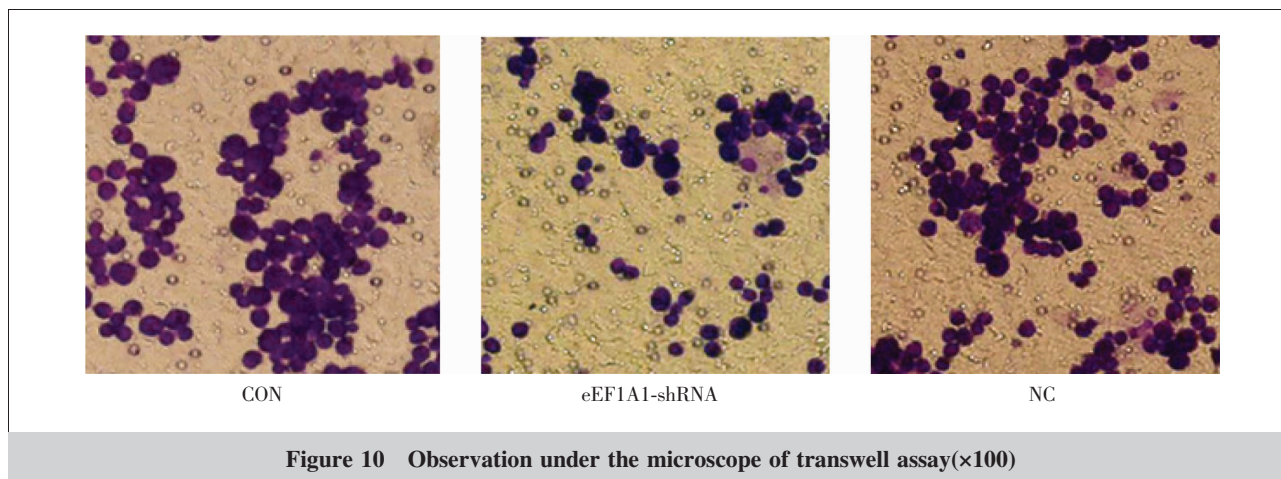


Figure 10 Observation under the microscope of transwell assay(×100)

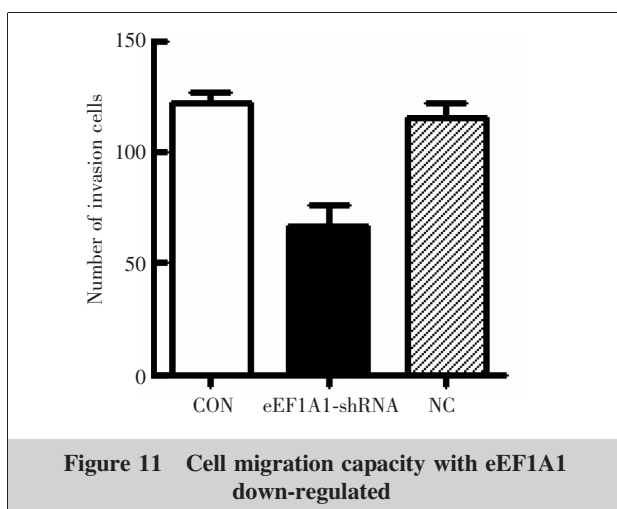


Figure 11 Cell migration capacity with eEF1A1 down-regulated

联结网络,发现 eEF1A1 与 ANXA7 为一对直接相互作用的相关蛋白。

结合本组前期有关 ANXA7 与 RBM4、HnRNP-A2/B1 的相关性的研究结果,过表达 ANXA7 可以引起 HnRNP-A2/B1、RBM4 在基因和蛋白水平的表达升高,而抑制 ANXA7 的表达亦可使 HnRNP-A2/B1、RBM4 在基因和蛋白水平的表达受到抑制。HnRNPs 属于核内 RNA 结合蛋白,具有多种亚型,已发现该家族在肿瘤细胞的增殖、转移、凋亡和周期等的调节有重要作用^[19]。我们还在蛋白质作用分析网络中看到 eEF1A1 与 HnRNP-A1 相互作用,参与 mRNA 的翻译后修饰过程^[20]。Havugimana 等^[21]通过定量串联质谱分析,系统地鉴定了 3000 多稳定相关的可溶性人类蛋白质,其中 eEF1A1 与 HnRNP-L、HnRNP-DL 均存在蛋白的相互作用;且还发现,RBM3/4 也与 eEF1A1 之间存在相互作用。综上结果表明,ANXA7 还可能通过调控 RBM4、HnRNP 的表达进而会影响

eEF1A1 的表达,但其具体机制尚不清晰,需进一步实验研究证实。

本实验结果还显示,eEF1A2 在 mRNA 和蛋白水平的表达量也随 eEF1A1 的表达下调而下降,可见结构上具有高度同源性的 eEF1A1 与 eEF1A2 在细胞中的表达也有高度相关性。已有研究应用亲和纯化和定量质谱分析人类可溶性蛋白,发现 eEF1A1 与 eEF1A2 存在多种共同的相关蛋白,多为 eEFs 的亚型,如 eEF1B2、eEF1D 和 eEF1G 等^[22,23],或可通过这些蛋白的互相作用体现 eEF1A1、eEF1A2 表达的相关性。目前,对于 eEF1A2 作为一种潜在癌蛋白的认识已日趋成熟^[24]。Qiu 等^[25]发现沉默 eEF1A2 基因减弱了肝癌细胞的增殖、侵袭与转移,增加了细胞凋亡,并诱导细胞周期停滞在 G₀/G₁ 期,且 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路被显著抑制。Pellegrino 等^[26]在人肝细胞癌中发现 eEF1A2 的过表达引起短生存期肝癌患者 eEF1A2/PI3K/AKT/mTOR/MDM4 通路的强激活。Elgohary 等^[27]还发现人肝癌细胞中 eEF1A2 可直接与 TIM(Timeless)蛋白相互作用,促进肿瘤细胞的迁移。

参考文献:

- [1] Soares DC, Abbott CM. Highly homologous eEF1A1 and eEF1A2 exhibit differential post-translational modification with significant enrichment around localised sites of sequence variation[J]. Bio Direct, 2013, 8: 29-37.
- [2] Meriin A, Zaarur N, Sherman M. Association of translation factor eEF1A with defective ribosomal products generates a signal for aggresome formation [J]. J Cell Sci, 2012, 125 (Pt11): 2665-2674.
- [3] Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins; linking Ca²⁺ sig-

- nalling to membrane dynamics,molecular cell biology[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2005,6(6):449-461.
- [4] Caohuy H,Pollard HB. Protein kinase C and guanosine triphosphate combine to potentiate calcium-dependent membrane fusion driven by Annexin a7 [J]. Biol Chem, 2002,277(28):25217-25225.
- [5] Caohuy H,Srivastava M,Pollard HB. Membrane fusion protein synexin (annexin VII) as a Ca^{2+} /GTP sensor in exocytotic secretion [J]. Proc Natl Acad Sci,1996,93(20): 10797-10802.
- [6] Fatimathas L,Moss SE. Annexins as disease modifiers[J]. Histol Histopathol,2010,25(4):527-532.
- [7] Sun CR,Tang JW,Sun MZ,et al. Calculation of lymphatic metastasis related proteins in mice with liver by quantitative proteomics [J].Progress in Biochemistry and Biophysics,2007,34(8):856-864.[孙成荣,唐建武,孙明忠,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(8): 856-864.]
- [8] Jin YL,Wang ZQ,Qu H,et al. Annexin A7 gene is an important factor in the lymphatic metastasis of tumors [J]. Biomed Pharmacother,2013,67(4):251-259.
- [9] Jin Y,Wang S,Chen W,et al. Annexin A7 suppresses lymph node metastasis of hepatocarcinoma cells in a mouse model[J]. BMC Cancer,2013,13(1):522.
- [10] Yan C,Liu XX,Ge J,et al. Effect of eukaryotic translation elongation factor1A1 on proliferation of Hep3B cells[J]. Tumor,2014,34(11):1016-1022.[晏琛,刘秀霞,戈进,等. RNA 干扰真核翻译延长因子 1A1 抑制肝癌 Hep3B 细胞的增殖[J].肿瘤,2014,34(11):1016-1022]
- [11] Zhang J,Guo H,Mi Z,et al. eEF1A1-actin interactions alter mRNA stability to determine differential osteopontin expression in HepG2 and Hep3B cells [J]. Exp Cell Res, 2009,315(2):304-312.
- [12] Blanch A,Robinson F,Watson IR,et al. Eukaryotic translation elongation factor1 alpha1 inhibits p53 and p73 dependent apoptosis and chemotherapy sensitivity [J]. PLoS One,2013,8(6):e66436.
- [13] QB Su,Wei GN,Liu HJ,et al. Effects of inhibiting the expression of eukaryotic translation elongation 1A1 by siRNA on apoptosis and drug sensitivity of colon cancer cells[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology,2015,31(17): 177-180.[苏启表,韦桂宁,刘洪俊,等.siRNA 抑制真核翻译延长因子 1A1 表达对结肠癌细胞凋亡和药物敏感性的影响[J].中国临床药理学杂志,2015,31(17):177-180.]
- [14] Huang Y,Hu JD,Wu YA,et al. Effects of eEF1A1 re-expression on proliferation and apoptosis of Jurkat cells with eEF1A1 gene knocked down eEF1A1 gene and its mechanisms[J].Journal of Experimental Hematology,2013,21(2): 279-284.[黄毅,胡建达,伍严安,等.eEF1A1 回复表达对敲除 eEF1A1 基因的 Jurkat 细胞增殖、凋亡的影响及机制研究[J].中国实验血液学杂志,2013,21(2):279-284]
- [15] Wang XJ,Li X. Effects of low expressed Annexin A7 on cell proliferation of human hepatocarcinoma HepG2 cells [J].Acta Anatomica Sinica,2013,44(5):656-660.[王小杰,李欣.膜联蛋白 A7 低表达对人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响[J].解剖学报,2013,44(5):656-660.]
- [16] Tian HN,Wang XJ. Effects of inhibiting the expression of annexin A7 on the expression of Galectin-3 and PKC in HepG-2 cells [J].Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry,2015,24(2):175-179.[田焕娜,王小杰.膜联蛋白 A7 表达抑制对 HepG-2 细胞中 galectin-3 及 PKC 表达的影响 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2015,24(2):175-179.]
- [17] Herrc,Clemen CS,Lehnert G,et al. Function,expression and localization of Annexin A7 in platelets and ted blood cells:illsights derived from an Annexin A7 mutant mouse [J].BMC Biochem,2003,4:8.
- [18] Vinayagam A,Stelzl U,Foulle R,et al. A directed protein interaction network for investigating intracellular signal transduction[J]. Sci Signal,2011,4(189):rs8.
- [19] Shi H,Hood KA,Hayes MT,et al. Proteomic analysis of advanced colorectal cancer by laser capture microdissection and two-dimensional difference electrophoresis[J]. J Proteomics,2011,75(2):339-351.
- [20] Roy R,Durie D,Li H,et al. hnRNPA1 couples nuclear export and translation of specific mRNAs downstream of FGF-2/S6K2 signalling [J]. Nucleic Acids Res,2014,42(20):12483-12497.
- [21] Havugimana PC,Hart GT,Nepusz T,et al. A census of human soluble protein complexes [J]. Cell,2012,150(5): 1068-1081.
- [22] Wan C,Borgeson B,Phanse S,et al. Panorama of ancient metazoan macromolecular complexes[J]. Nature,2015,525 (7569):339-344.
- [23] Huttlin EL,Ting L,Bruckner RJ,et al. The BioPlex network;a systematic exploration of the human interactome [J]. Cell,2015,162(2):425-440.
- [24] Abbas W,Kumar A,Herbein G. The eEF1A proteins:at the crossroads of oncogenesis,apoptosis,and viral infections[J]. Front Oncol,2015,5:75.
- [25] Qiu FN,Huang Y,Chen DY,et al. Eukaryotic elongation factor-1 α 2 knockdown inhibits hepatocarcinogenesis by suppressing PI3K/Akt/NF- κ B signaling [J]. World J Gastroenterol,2016,22(16):4226-4237.
- [26] Pellegrino R,Calvisi DF,Neumann O,et al. EEF1A2 inactivates p53 by way of PI3K/AKT/mTOR-dependent stabilization of MDM4 in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology,2014,59(5):1886-1899.
- [27] Elgohary N,Pellegrino R,Neumann O,et al. Protumorigenic role of Timeless in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Oncol,2015,46(2):597-606.