

贾梦真,黄岩杰,杨晓青,等. 运用基因调控技术探析膜联蛋白 A2 的病理作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 125-131.

Jia MZ, Huang YJ, Yang XQ, et al. Pathological effects of annexin A2 investigated by gene regulation techniques [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 125-131.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.01.019

# 运用基因调控技术探析膜联蛋白 A2 的病理作用

贾梦真<sup>1</sup>,黄岩杰<sup>1,2\*</sup>,杨晓青<sup>2</sup>,韩红艳<sup>3</sup>,张建江<sup>4</sup>

(1.河南中医药大学第一临床医学院,郑州 450046; 2.河南中医药大学第一附属医院儿科,郑州 450099;  
3.河南中医药大学,郑州 450046; 4.郑州大学第一附属医院儿科,郑州 450052)

**【摘要】** 膜联蛋白 A2 (Annexin A2, ANXA2) 是一种多功能的钙依赖性磷脂结合蛋白,既往报道 ANXA2 与多种肿瘤疾病的发生发展密切相关。近年来利用基因调控技术敲低、敲除和过表达 ANXA2 的实验研究发现:ANXA2 功能复杂,参与了细胞增殖、肿瘤细胞侵袭、新血管生成、纤溶酶系统、炎症反应、上皮-间充质转化和抗癌药物的耐药性及副作用等病理过程,因此涉及多种肿瘤和非肿瘤疾病的发生发展。本文根据国内外最新进展在基因层面对 ANXA2 上述病理作用及其机制进行综述,精准揭示 ANXA2 能否作为相关疾病早期筛查和治疗的靶点。

**【关键词】** 膜联蛋白 A2;基因调控;病理作用

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0125-07

## Pathological effects of annexin A2 investigated by gene regulation techniques

JIA Mengzhen<sup>1</sup>, HUANG Yanjie<sup>1,2\*</sup>, YANG Xiaoqing<sup>2</sup>, HAN Hongyan<sup>3</sup>, ZHANG Jianjiang<sup>4</sup>

(1. First School of Clinical Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.  
2. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450099.  
3. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046.  
4. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital Pediatrics of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

**【Abstract】** Annexin A2 (ANXA2) is a multifunctional calcium-dependent phospholipid-binding protein. Previous reports have shown that ANXA2 is closely related to the occurrence and development of various tumors. However, knockdown, knockout or overexpression of ANXA2 using gene regulation technologies have indicated that ANXA2 is multifunction and involved in various pathological processes including cells proliferation, tumor cell invasion, neoangiogenesis, the plasmin system, inflammatory response, epithelial - mesenchymal transition, anti-cancer drug resistance, and side effects. It also participates in the occurrence and development of tumors and non-tumor diseases. These pathological effects and pathways of ANXA2 at the genetic level were summarized on the basis of recent developments and we also explored whether ANXA2 can be used as a target for early diagnosis and treatment of the related diseases.

**【Keywords】** ANXA2; gene regulation; pathological effects

**【基金项目】** 河南省自然科学基金资助项目(182300410346);河南省高校科技创新团队支持计划(18IRTSTHN028);河南省中医药科学研究重大专项课题(2018ZYD05)。

**【作者简介】** 贾梦真(1993—),女,硕士研究生,研究方向:小儿肾病。E-mail:1301903767@qq.com

**【通信作者】** 黄岩杰(1969—),女,博士,教授,研究员,博士生导师,研究方向:小儿肾病。E-mail: huangyanjie69@163.com

膜联蛋白 A2 (Annexin A2, ANXA2) 分子量为  $36 \times 10^3$ , 含有三个不同的功能区域: N 端区域, C 端区域和核心区域<sup>[1]</sup>。核心区域由四个重复的氨基酸序列组成, 它们紧密堆积形成一个具有凹面和凸面的弯曲结构, 凸面含有膜结合必需的钙和磷脂结合位点, N 端结构域位于核心结构的凹面, 含有组织型纤溶酶原激活剂 (tPA) 和 p11 (S100A10 的片段) 结合位点, C 端区域包含 F-肌动蛋白, 肝素和纤溶酶原结合位点<sup>[1-2]</sup>。ANXA2 广泛分布于各种真核细胞的细胞膜、细胞质和细胞核, 参与膜转运及膜表面一系列与钙调蛋白相关的活动, 包括增殖、分化、凋亡、迁移、膜修复和炎症反应等多种细胞进程<sup>[3]</sup>。人 ANXA2 是最早实现克隆的 ANX 家族成员之一, 在人类疾病学方面研究最广泛<sup>[4]</sup>。既往报道 ANXA2 在多种肿瘤中过表达, 参与癌症的发生发展, 涉及多种机制, 并与预后不良密切相关<sup>[5]</sup>。我们先前研究显示 ANXA2 在参与肾小球细胞性新月体形成的上皮细胞中高表达, 在伴有新月体病变的紫癜性肾炎患儿尿中的浓度也明显增高, 拓展了对 ANXA2 病理作用的认识<sup>[6]</sup>。本文通过综述运用基因调控技术敲低、敲除和过表达 ANXA2 的相关研究, 以期更全面地总结 ANXA2 的病理作用及其相关作用机制, 并精准探寻可能的临床诊疗靶点。

## 1 基因调控技术在研究 ANXA2 功能中的应用

近年来, 基因调控技术广泛应用于 ANXA2 功能研究。基因敲除或敲低的技术包括 siRNA (small-interfering RNA) 技术、shRNA (short hairpin RNA) 技术和成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白 9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) 9, CRISPR/Cas9) 技术。因 ANXA2 在多种疾病中过表达, 有关探究 ANXA2 功能的细胞及动物实验多采用 siRNA 干扰技术降低 ANXA2 表达水平。靶向 ANXA2 的 siRNA 进入细胞质后, 通过 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 机制与 ANXA2 mRNA 互补结合, 从而引起目标 mRNA 降解, 实现细胞或生物体 ANXA2 基因沉默<sup>[7-8]</sup>。但 siRNA 技术存在脱靶率问题, 在基因敲除实验中不能完全敲除目标基因。在细胞核内合成的 shRNA 可由 Drosha 酶处理后转运至细胞质, 并经 Dicer 酶将 shRNA 加工成 siRNA, shRNA 诱导的

基因沉默较 siRNA 更持久<sup>[7]</sup>。通过将敲除 ANXA2 基因的胚胎干细胞注射至胚泡, 并植入假孕小鼠的子宫中, 经嵌合体杂交育种可产生稳定敲除 ANXA2 的小鼠<sup>[9]</sup>。CRISPR/Cas9 系统是新兴的基因编辑技术, 通过 sgRNAs 序列特异性互补并切割靶 DNA, 导致基因部分序列缺失, 精准实现基因敲除<sup>[10]</sup>。但应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术靶向 ANXA2 的研究较少。目前多采用构建靶向 ANXA2 基因的 DNA 质粒转染细胞实现基因的过表达<sup>[11]</sup>。

## 2 敲低或敲除 ANXA2

### 2.1 敲低 ANXA2 可抑制细胞上皮-间充质转化及肿瘤细胞侵袭、迁移和增生

细胞上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是指具有上皮表型的细胞失去极性和粘附性等上皮特征, 转化为具有间充质表型的细胞<sup>[12]</sup>。目前, 与 ANXA2 相关的 EMT 报道主要涉及肿瘤增殖、侵袭、迁移方面。胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDA) 是一种破坏性恶性疾病, ANXA2 属于 PDA 相关抗原, 细胞表面 ANXA2 的表达随着 PDA 的进展而增加。Zheng 等<sup>[13]</sup>通过建立小鼠 PDA 模型证实了 ANXA2 在细胞表面的定位依赖于酪氨酸 23 (Tyr-23) 位点磷酸化, 并可通过 Rho 介导 PDA 细胞中转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 诱导 EMT。敲低 ANXA2 或使用抗 ANXA2 抗体可有效抑制 PDA 转移并提高模型小鼠存活率, 为开发靶向 ANXA2 抑制剂治疗人 PDA 提供了理论依据<sup>[13]</sup>。在鼻咽癌中, Chen 等<sup>[14]</sup>通过将靶向 ANXA2 的 shRNA 导入 TW01 和 BM1 鼻咽癌细胞系, 建立特异性敲低 ANXA2 细胞系, 发现敲低 ANXA2 可抑制 TGF- $\beta$  诱导的 Snail/Twist 癌症相关转录因子的表达, 抑制鼻咽癌细胞 EMT 进程, 从而减少细胞侵袭、迁移, 同时可提高放射治疗和化学治疗敏感性。2018 年, Rocha 等<sup>[15]</sup>基于对敲低 ANXA2 的结肠直肠癌细胞研究, 提出 TGF- $\beta$  可通过其受体激活 Src 介导 ANXA2 磷酸化, 磷酸化的 ANXA2 一方面促进 E-钙粘蛋白内化, 下调 E-钙粘蛋白转录, 另一方面结合并激活 STAT3, 同时诱导 STAT3 磷酸化, 磷酸化的 STAT3 从细胞质转移至细胞核, 上调 EMT 相关转录因子 Slug 的表达, 进而上调波形蛋白和金属蛋白酶 MMP2/9 的表达<sup>[16]</sup>。

ANXA2 可在细胞膜、细胞质等不同的细胞结构部位介导表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)功能。细胞质中的 ANXA2 在蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)和 Src 激酶介导下实现 N 端丝氨酸 25(ser-25)和 Tyr-23 位点磷酸化后,经钙离子载体或钙诱导剂移至细胞表面<sup>[17]</sup>。2019 年, Fan 等<sup>[18]</sup>研究表明,活化的蛋白激酶 C 受体 1(RACK1)是 ANXA2 和 Src 激酶的共受体,可介导两者结合,促进 ANXA2 磷酸化。EGFR 由细胞外配体结合结构域和胞质 C 端酪氨酸激酶结构域组成, Chaudhary 等<sup>[19]</sup>发现在三阴性和赫赛汀耐药的乳腺癌细胞中,大量易位至细胞膜表面的 ANXA2 与 EGFR 的细胞外结构域结合,在表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)诱导下导致 EGFR 同源二聚化和酪氨酸激酶区域自磷酸化后脱离细胞膜内化进入细胞质。内化过程依赖于脂质筏对 EGFR 的内吞作用,而 ANXA2 作为 Ca<sup>2+</sup> 依赖性膜结合蛋白,在富含胆固醇和/或磷脂酰肌醇 4,5-双磷酸酯域中与肌动蛋白细胞骨架相互作用,可调节脂质筏形成<sup>[20]</sup>。研究者利用抗 ANXA2 抗体阻断细胞表面 ANXA2 功能可抑制 EGF 诱导的 EGFR 同源二聚化、酪氨酸磷酸化、内化和 EGFR 介导的下游 AKT 和 ERK 信号通路,从而抑制三阴性和赫赛汀耐药乳腺癌细胞的细胞增殖和迁移<sup>[19]</sup>。Wang 等<sup>[21]</sup>提出磷酸化的 EGFR 可引起细胞质 ANXA2 Tyr-23 位点磷酸化,触发 STAT3 途径。使用 shRNA 在表达 EGFR 的上皮样乳腺癌细胞系 T47D 细胞中稳定敲低 ANXA2,可抑制 ANXA2 介导的 STAT3 Tyr-705 磷酸化,降低 STAT3 活化和核转位,阻断 EMT 的发生发展,表明 ANXA2 可通过 STAT3 依赖性方式促进 EGF 诱导的乳腺癌细胞 EMT。在宫颈癌细胞中,敲低 ANXA2 可部分逆转 EGF 诱导的 CaSki 宫颈癌细胞 EMT 进程,并抑制 CaSki 细胞活力和迁移<sup>[22]</sup>。上述结果表明 ANXA2 在 EMT 进程中发挥重要作用,可能成为潜在的治疗靶点。同时也证明了 ANXA2 可在 EGFR 信号通路的上游和下游发挥不同的作用,在 EGF 诱导的 EMT 信号通路中具有上通下联的关键功能。

## 2.2 敲低 ANXA2 抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,恢复顺铂耐药细胞的药物敏感性

ANXA2 作为引物识别蛋白参与 DNA 复制<sup>[2]</sup>,并通过不同的途径参与细胞周期进程。Wang 等<sup>[23]</sup>

发现经皮下注射 ANXA2 缺陷型人肺腺癌 A549 细胞(shANXA2-A549)悬浮液的 BALB/c 裸鼠的背侧肿瘤结节明显小于对照组,用 siRNA 敲低体外培养的 A549 细胞的 ANXA2,同样细胞增殖明显受到抑制。进一步证明敲低 ANXA2 可抑制 JNK/c-Jun 通路,并诱导 p53 及其下游凋亡基因如 p21 表达,引起细胞周期 G2 期停滞,从而抑制细胞增殖<sup>[23]</sup>。Zhang 等<sup>[24]</sup>用 shANXA2 慢病毒转染人乳腺癌细胞系 T47D 和 MDA-MB-231,获得稳定敲低 ANXA2 的细胞,发现敲低 ANXA2 抑制 EGF 诱导的 STAT3 磷酸化,进而降低细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)水平。ANXA2 也是一种 RNA 结合蛋白,可与原癌基因 c-myc mRNA 的 3'UTR 结合,从而导致其核周定位及与细胞骨架结合,并促进 c-myc 蛋白的合成<sup>[5]</sup>。C-myc 在促进细胞增殖和凋亡中发挥重要作用, Cyclin D1 是 c-myc 的下游因子,也是细胞增殖的关键促进因子,可延迟细胞 G1 到 S 期转变,抑制癌细胞增殖<sup>[5]</sup>。

顺铂是非小细胞肺癌患者的常用药,主要通过相关 DNA 上的嘌呤相互作用,激活数个信号转导途径造成 DNA 损伤和线粒体凋亡并最终导致细胞凋亡,然而治疗过程中伴随的细胞凋亡作用减弱可能是肿瘤细胞获得顺铂耐药性的关键特征<sup>[25-26]</sup>。Feng 等<sup>[27]</sup>通过体内外细胞实验证明,非小细胞肺癌细胞的顺铂耐药性与 ANXA2 调控的 JNK/c-Jun/p53 途径中 p21 等凋亡基因的异常表达密切相关,敲低 ANXA2 增加了凋亡细胞数量,可部分恢复已耐药细胞的药物敏感性。ANXA2 也可作为凋亡细胞表面 C1q 的配体诱导自身裂解,抑制细胞周期促进凋亡<sup>[27]</sup>。因此, ANXA2 基因可能用作耐药性非小细胞肺癌的重要治疗靶标。

## 2.3 敲低 ANXA2 降低博来霉素诱导的肺纤维化

博来霉素是一种临床应用广泛的抗癌药物,然而其诱导肺纤维化的发生率高达 46%,严重限制了博来霉素的临床使用和治疗效果。博来霉素诱导的肺毒性涉及氧化应激和其引起的 DNA 损伤,从而引起炎症反应。2018 年一项研究发现,生理状态下 ANXA2 可通过肌动蛋白促进噬菌体装配参与自噬过程<sup>[28]</sup>。在小鼠肺部感染模型中, ANXA2 可通过肺泡巨噬细胞中的 AKT-雷帕霉素(mammalian target of rapamycin, mTOR)途径调节自噬<sup>[29]</sup>。2018 年,

Wang 等<sup>[28]</sup>利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术和蛋白质组学方法证明了在 A549 细胞中 ANXA2 的 Glu139 位点可直接与博来霉素二糖片段的酰胺基结合,二者的结合可抑制 TFEB(转录因子 EB)诱导的自噬通量,进而导致肺纤维化。2019 年 Lei 等<sup>[30]</sup>证明博来霉素可诱导肺上皮细胞中 ANXA2 向细胞表面易位,并激活整合素连接激酶/核因子- $\kappa$ B(ILK/NF- $\kappa$ B)途径介导炎症反应。同时将博来霉素经气管注射至缺失 ANXA2 小鼠中 14 d 后,通过 Masson 染色和羟脯氨酸(胶原蛋白的标志物)定量分析证明,低表达 ANXA2 小鼠肺间质厚度及胸膜下胶原沉积明显小于对照组,NF- $\kappa$ B 磷酸化以及 p65、IL-6 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )等炎症因子表达水平降低<sup>[30]</sup>。因此,ANXA2 可通过与博来霉素结合抑制自噬,促进炎症反应诱导肺纤维化,下调 ANXA2 的表达可能是降低博来霉素所致肺部毒副作用的有效方案。

#### 2.4 敲低 ANXA2 抑制炎症

TNF- $\alpha$  是 TNF 超家族成员,介导一系列免疫反应,在炎症性肠病的发展中起关键作用。去整合素金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinases, ADAM)17 是裂解 TNF- $\alpha$  前体的关键酶,参与多种炎症性疾病的发生发展<sup>[31]</sup>。为了明确 ANXA2 是否参与 TNF- $\alpha$  裂解脱落,Tsukamoto 等<sup>[32]</sup>在单核细胞和结肠上皮细胞系中运用 siRNA 分别敲低 ANXA2 或 ADAM,均显著地抑制了细胞中 TNF- $\alpha$  的裂解脱落。Tsukamoto 等<sup>[32]</sup>又运用免疫沉淀蛋白印迹法证实 ANXA2 可直接结合并激活 ADAM17,被激活的 ADAM17 裂解 TNF- $\alpha$  的前体,使 TNF- $\alpha$  的释放增加,从而加重炎症反应。因此,抑制 ANXA2 可能是减少 TNF- $\alpha$  脱落,防治炎症性肠病炎症的新治疗策略。

#### 2.5 敲低 ANXA2 减少细胞表面的低密度脂蛋白受体水平,增加高胆固醇血症发生率

文献显示,前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin9 型(proprotein convertase subtilisin/kexin-type 9, PCSK9)的催化结构域可与低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)的 EGF-A 结构域结合,在酸性条件下经由内体/溶酶体有效诱导肝 LDLR 降解,较低水平的肝 LDLR 降低了血浆中低密度脂蛋白-胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)的清除率,导致高胆固醇血

症<sup>[33-34]</sup>。ANXA2 基因位于染色体 15q22.2 上,由 13 个外显子组成,ANXA2 的 R1 结构域由外显子 4e6 编码,外显子 4e6 具有 8 个报告的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),rs11633032 和 rs17191344 为 SNP 的功能性突变体,与 LDL-C 水平正相关,其次等位基因可产生转录因子阻遏蛋白结合位点,抑制 ANXA2 基因表达<sup>[35]</sup>。ANXA2 通过其 R1 域与 PCSK9 富含半胱氨酸-组氨酸的结构域结合发挥 PCSK9 功能的内源性抑制剂作用,ANXA2 单体和四聚体均可抑制 PCSK9 对细胞表面 LDLR 的降解活性,降低高胆固醇血症发生率<sup>[35]</sup>。Ly 等<sup>[34]</sup>发现用 shANXA2 转染人肝细胞癌细胞系 Huh7 敲低 ANXA2 细胞,可减轻 ANXA2 对 PCSK9 C 末端结构域 M1 和/或 M2 的抑制作用,使 PCSK9 mRNA 在该细胞中翻译增加,加速对 LDLR 降解,升高循环 LDL-C 水平,证实敲低 ANXA2 解除了对 PCSK9 活性的抑制作用,提高了高胆固醇血症风险。

### 3 过表达 ANXA2

#### 3.1 过表达 ANXA2 加速纤溶酶产生导致肿瘤新血管生成及出血性疾病

p11 是钙结合蛋白 S100A10 的片段,在细胞内钙浓度变化的驱动下,两个 p11 的 C 末端结构域可与两个 ANXA2 单体的 N 末端氨基酸结合形成异源四聚体<sup>[36]</sup>。锚定于内皮细胞膜表面的 ANXA2 四聚体是纤溶酶原和 tPA 的共同受体,当 ANXA2 过表达时可加速纤溶酶产生,并激活多种 MMP(如 MMP2, MMP9)参与下游蛋白水解级联反应,促进细胞外基质、基底膜溶解,释放内皮细胞以及基质中的血管生成调节剂(如血管内皮生长因子),启动血管生成系统<sup>[5,37]</sup>。胶质母细胞瘤是最常见和致命的脑肿瘤,Maruo 等<sup>[38]</sup>将犬神经胶质瘤细胞系 J3T 经皮下植入无胸腺小鼠中,6 周后分别在肿瘤中收集到 J3T-1 和 J3T-2 细胞系,经检测 J3T-1 细胞系中 ANXA2 表达水平高于 J3T-2 细胞系,并且 J3T-1 细胞主要聚集在肿瘤边界处的扩张血管周围,而 J3T-2 细胞则表现出弥散的单细胞浸润到周围正常的脑实质中,没有新血管生成。Onishi 等<sup>[39]</sup>用 ANXA2 编码质粒载体(pIRES-EGFP)转染 J3T-2 细胞建立过表达 ANXA2 的 J3T-2 细胞系,并将其接种在无胸腺大鼠中 28 d 出现脑肿瘤,在肿瘤中心观察到新血管

生成而致血管扩张,同时血管内皮生长因子和血小板衍生生长因子的表达明显升高。2020 年一项最新的研究表明,在三阴性乳腺癌细胞中外泌体 ANXA2 也可促进新血管生成<sup>[40]</sup>。总之,以上结果表明过表达 ANXA2 可通过促进血管生成因子表达诱导血管生成。

ANXA2 过表达时,纤溶酶合成量过高可致周围组织受损,甚至引发出血,其中以急性早幼粒细胞白血病最具代表性。其细胞具有特征性染色体易位 t(15; 17),也称为早幼粒细胞白血病/视黄酸受体  $\alpha$  (PML/RAR $\alpha$ ) 融合基因<sup>[41]</sup>。PML/RAR $\alpha$  融合蛋白激活 ANXA2 启动子上调 ANXA2 mRNA,过表达的 ANXA2 可通过翻译后调控导致 p11 表达的增加,加速合成的 ANXA2 四聚体促进纤溶酶以异常高的速率产生,大量活性纤溶酶在血浆中累积,最终导致急性早幼粒细胞白血病出血性并发症<sup>[41]</sup>。然而,He 等<sup>[42]</sup>提出纤溶酶可特异性激活 Toll 样受体 4 信号途径诱导 PKC 活化,启动 ANXA2 的 ser-11 和 ser-25 位点磷酸化,使四聚体解离,游离的 p11 受到蛋白酶体依赖性多泛素化和降解,可阻止 ANXA2 向细胞表面转移,从而保持 ANXA2 单体和四聚体的精确划分。纤溶酶的这种“反馈”机制可以限制自身的生成,从而维持血管纤溶系统平衡。

### 3.2 过表达 ANXA2 促进上皮细胞增殖

据报道 G 蛋白偶联受体 (G protein coupled receptor, GPCR) 可感知氨基酸的刺激,也可激活 PKC 和蛋白激酶 A (PKA),同时两个蛋白激酶参与介导 ANXA2 磷酸化,而激素是刺激牛乳合成和牛乳腺上皮细胞 (bovine mammary epithelial cells, BMEC) 增殖的最重要因素<sup>[43]</sup>。因此,激素刺激下 ANXA2 与乳蛋白合成和 BMEC 增殖密切相关。Osorio 等<sup>[44]</sup>认为氨基酸如甲硫氨酸可诱导 mTOR 途径相关蛋白磷酸化,对牛乳蛋白合成有积极作用。2018 年, Zhang 等<sup>[43]</sup>为了研究 ANXA2 与 BMEC 增殖和牛乳合成的分子机制,利用 pcDNA3.1-ANXA2 构建体转染 BMEC 过表达 ANXA2。结果显示,在氨基酸及雌激素刺激下, BMEC 中过表达的 ANXA2 正向调节磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 产生 PIP3,进而刺激 mTOR 磷酸化,并增加固醇调节元件结合蛋白 1c (sterol response element-binding protein-1c, SREBP-1c) 和 Cyclin D1 表达水平,经由 PI3K-

mTOR-SREBP-1c/Cyclin D1 信号通路促进 BMEC 增殖,合成乳蛋白、脂肪和乳糖等乳汁原料,加速乳汁合成<sup>[43]</sup>。正如前所述, ANXA2 可能通过影响细胞周期因子促进增殖过程。

### 3.3 过表达 ANXA2 参与多种病毒生命周期

文献显示, ANXA2 单体和四聚体可通过病毒-膜融合的内吞机制参与人乳头瘤病毒、肠道病毒 71、呼吸道合胞病毒、巨细胞病毒的附着和渗入细胞内,参与多种靶向上皮细胞的病毒装配、复制和释放等过程,也是促进体外流感病毒复制的前病毒宿主因子,在加速高致病性禽流感病毒 H5N1 的复制中起着重要作用<sup>[45-46]</sup>。2019 年一篇文献显示,非结构蛋白 1 (Non-structural protein 1, NS1) 是一种多功能蛋白,包含两个不同的功能域: N 端 RNA 结合域和 C 末端效应域,效应域与宿主蛋白相互作用,抑制宿主免疫反应,调节病毒感染过程<sup>[47]</sup>。为了研究 ANXA2 与 NS1 在禽流感病毒 H5N1 复制中的具体作用机制, Ma 等<sup>[46]</sup>利用 RT-PCR 扩增 A549 细胞的 ANXA2 基因,然后将其克隆到 pCAGGS-HA 载体中,构建重组质粒 pCAGGS-HA-ANXA2,再用质粒及 GD1322 (H5N1 菌株) 转染 A549 细胞 24 h,检测到子代病毒滴度显著增加。免疫共沉淀实验表明 ANXA2 可作为 NS1 的靶分子,并与 NS1 C 末端效应域相互作用,加速病毒复制。细胞凋亡是抵抗病毒感染的宿主防御机制, NS1 与 p53 结合可抑制细胞凋亡,基于 ANXA2 和 NS1 之间的相互作用以及 p53 的潜在拮抗作用, NS1 可能作为桥接分子促进 ANXA2 和 p53 结合以抑制细胞凋亡<sup>[46]</sup>。

## 4 总结

ANXA2 可作用于 EMT 进程的不同位点,在 EGFR 介导的 EMT 信号通路中具有上通下联的作用。ANXA2 具有博来霉素的结合靶点,两者的结合可抑制自噬通量,进而导致肺纤维化。作为支架蛋白, Tyr-23 位点磷酸化是 ANXA2 由细胞质向细胞表面移位的关键环节, ANXA2 四聚体可促进纤溶酶生成,裂解细胞外基质、基底膜,释放血管生成调节剂促进新血管生成。此外, ANXA2 还可调节细胞增生、炎症和胆固醇代谢,参与病毒生命周期复制、凋亡等过程。综上所述,运用基因调控技术精准揭示了 ANXA2 的病理作用,拓展了对 ANXA2 作用机制的认识,有助于探索针对 ANXA2 的肿瘤早期诊断

和靶向治疗,也有助于建立其他非肿瘤疾病的治疗策略。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Wang CY, Lin CF. Annexin A2: Its molecular regulation and cellular expression in cancer development [J]. *Dis Markers*, 2014, 2014: 308976.
- [ 2 ] Grindheim AK, Saraste J, Vedeler A. Protein phosphorylation and its role in the regulation of Annexin A2 function [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017, 1861 ( 11 ): 2515-2529.
- [ 3 ] Grewal T, Wason SJ, Enrich C, et al. Annexins—insights from knockout-mice [J]. *Biol Chem*, 2016, 397(10): 1031-1053.
- [ 4 ] Moss SE, Morgan RO. The annexins [J]. *Genome Biol*, 2004, 5 (4): 219.
- [ 5 ] Wang T, Wang Z, Niu R, et al. Crucial role of Anxa2 in cancer progression; highlights on its novel regulatory mechanism [J]. *Cancer Biol Med*, 2019, 16(4): 671-687.
- [ 6 ] 黄岩杰, 杨晓青, 刘萌, 等. 凉血解毒活血方联合西医治疗对紫癜性肾炎Ⅲ型患儿尿蛋白及尿中 ANXA2 的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(1): 372-375.
- [ 7 ] Thijssen M, Brüggerwirth I, Gillooly A, et al. Gene silencing with siRNA (RNA interference): A new therapeutic option during ex-vivo machine liver perfusion preservation [J]. *Liver Transpl*, 2019, 25(1): 140-151.
- [ 8 ] Rai MF, Pan H, Yan H, et al. Applications of RNA interference in the treatment of arthritis [J]. *Transl Res*, 2019, 214: 1-16.
- [ 9 ] Ling Q, Jacovina A, Deora A. Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis *in vivo* [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(1): 38-48.
- [ 10 ] El-Mounadi K, Morales-Florian M, Garcia-Ruiz H. Principles, applications, and biosafety of plant genome editing using CRISPR-Cas9 [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 56.
- [ 11 ] Keller AA, Maeß MB, Schnoor M, et al. Transfecting macrophages [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1784: 187-195.
- [ 12 ] Marcucci F, Stassi G, De Maria R. Epithelial - mesenchymal transition; a new target in anticancer drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(5): 311-325.
- [ 13 ] Zheng L, Foley K, Huang L, et al. Tyrosine 23 phosphorylation-dependent cell-surface localization of annexin A2 is required for invasion and metastases of pancreatic cancer [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19390.
- [ 14 ] Chen CY, Lin YS, Chen CL, et al. Targeting annexin A2 reduces tumorigenesis and therapeutic resistance of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 ( 29 ): 26946-26959.
- [ 15 ] Rocha MR, Barcellos-de-Souza P, Sousa-Squiavinato ACM, et al. Annexin A2 overexpression associates with colorectal cancer invasiveness and TGF- $\beta$  induced epithelial mesenchymal transition via Src/ANXA2/STAT3 [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 11285.
- [ 16 ] Yuan J, Yang Y, Gao Z, et al. Tyr23 phosphorylation of Anxa2 enhances STAT3 activation and promotes proliferation and invasion of breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 164(2): 327-340.
- [ 17 ] Shetty PK, Thamake SI, Biswas S, et al. Reciprocal regulation of annexin A2 and EGFR with Her - 2 in Her - 2 negative and herceptin-resistant breast cancer [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (9): e44299.
- [ 18 ] Fan Y, Si W, Ji W, et al. Rack1 mediates tyrosine phosphorylation of Anxa2 by Src and promotes invasion and metastasis in drug-resistant breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res*, 2019, 21(1): 66.
- [ 19 ] Chaudhary P, Thamake S, Shetty P, et al. Inhibition of triple-negative and Herceptin-resistant breast cancer cell proliferation and migration by Annexin A2 antibodies [J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(12): 2328-2341.
- [ 20 ] Grewal T, Enrich C. Annexins - Modulators of EGF receptor signalling and trafficking [J]. *Cell Signal*, 2009, 21(6): 847-858.
- [ 21 ] Wang T, Yuan J, Zhang J, et al. Anxa2 binds to STAT3 and promotes epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 30975-30992.
- [ 22 ] Cui L, Song J, Wu L, et al. Role of Annexin A2 in the EGF-induced epithelial-mesenchymal transition in human CaSki cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(1): 377-383.
- [ 23 ] Wang CY, Chen CL, Tseng YL, et al. Annexin A2 silencing induces G2 arrest of non-small cell lung cancer cells through p53-dependent and -independent mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(39): 32512-32524.
- [ 24 ] Zhang F, Wang Z, Yuan J, et al. RNAi-mediated silencing of Anxa2 inhibits breast cancer cell proliferation by downregulating cyclin D1 in STAT3-dependent pathway [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 153(2): 263-275.
- [ 25 ] Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 88: 102925.
- [ 26 ] Letai AG. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(2): 121-132.
- [ 27 ] Feng X, Liu H, Zhang Z, et al. Annexin A2 contributes to cisplatin resistance by activation of JNK-p53 pathway in non-small cell lung cancer cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 123.
- [ 28 ] Wang K, Zhang T, Lei Y, et al. Identification of ANXA2 (annexin A2) as a specific bleomycin target to induce pulmonary fibrosis by impeding TFEB-mediated autophagic flux [J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 269-282.
- [ 29 ] Li R, Tan S, Yu M. Annexin A2 regulates autophagy in *Pseudomonas aeruginosa* infection through Akt1-mTOR-ULK1/2 signaling pathway [J]. *J Immunol*, 2015, 195(8): 3901-3911.

- [30] Lei Y, Wang K, Li X, et al. Cell-surface translocation of annexin A2 contributes to bleomycin-induced pulmonary fibrosis by mediating inflammatory response in mice [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(7): 789–804.
- [31] Nishimi A, Isozaki T, Nishimi S, et al. ADAM-17 is expressed in the inflammatory myopathy and is involved with interstitial lung disease [published correction appears in *Clin Rheumatol*] [J]. *Clin Rheumatol*, 2018, 37(4): 1017–1024.
- [32] Tsukamoto H, Tanida S, Ozeki K, et al. Annexin A2 regulates a disintegrin and metalloproteinase 17 - mediated ectodomain shedding of pro-tumor necrosis factor- $\alpha$  in monocytes and colon epithelial cells [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(7): 1365–1373.
- [33] Mayer G, Poirier S, Seidah NG. Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(46): 31791–31801.
- [34] Ly K, Saavedra YG, Canuel M, et al. Annexin A2 reduces PCSK9 protein levels via a translational mechanism and interacts with the M1 and M2 domains of PCSK9 [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(25): 17732–17746.
- [35] Fairoozy RH, Cooper J, White J, et al. Identifying low density lipoprotein cholesterol associated variants in the Annexin A2 (ANXA2) gene [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 261: 60–68.
- [36] He KL, Deora AB, Xiong H, et al. Endothelial cell annexin A2 regulates polyubiquitination and degradation of its binding partner S100A10/p11 [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(28): 19192–19200.
- [37] Liu W, Hajjar KA. The annexin A2 system and angiogenesis [J]. *Biol Chem*, 2016, 397(10): 1005–1016.
- [38] Maruo T, Ichikawa T, Kanzaki H, et al. Proteomics-based analysis of invasion-related proteins in malignant gliomas [J]. *Neuropathology*, 2013, 33(3): 264–275.
- [39] Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, et al. Annexin A2 regulates angiogenesis and invasion phenotypes of malignant glioma [J]. *Brain Tumor Pathol*, 2015, 32(3): 184–194.
- [40] Chaudhary P, Gibbs LD, Maji S, et al. Serum exosomal-annexin A2 is associated with African-American triple-negative breast cancer and promotes angiogenesis [J]. *Breast Cancer Res*, 2020, 22(1): 11.
- [41] Huang D, Yang Y, Sun J, et al. Annexin A2-S100A10 heterotetramer is upregulated by PML/RAR $\alpha$  fusion protein and promotes plasminogen-dependent fibrinolysis and matrix invasion in acute promyelocytic leukemia [J]. *Front Med*, 2017, 11(3): 410–422.
- [42] He KL, Sui G, Xiong H, et al. Feedback regulation of endothelial cell surface plasmin generation by PKC-dependent phosphorylation of annexin A2 [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(17): 15428–15439.
- [43] Zhang M, Chen D, Zhen Z, et al. Annexin A2 positively regulates milk synthesis and proliferation of bovine mammary epithelial cells through the mTOR signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3): 2464–2475.
- [44] Osorio JS, Lohakare J, Bionaz M. Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: roles of transcriptional and posttranscriptional regulation [J]. *Physiol Genomics*, 2016, 48(4): 231–256.
- [45] Taylor JR, Skeate JG, Kast WM. Annexin A2 in virus infection [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2954.
- [46] Ma Y, Sun J, Gu L, et al. Annexin A2 (ANXA2) interacts with nonstructural protein 1 and promotes the replication of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus [J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17(1): 191.
- [47] Han CW, Jeong MS, Jang SB. Structure and Function of the influenza a virus non-structural protein 1 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2019, 29(8): 1184–1192.

[收稿日期]2020-06-08