

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.25.010

Annexin A1 在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义*

钟雪梅¹, 陈敏^{1△}, 邓世山², 谢少利³

(川北医学院:1. 附属医院内分泌科;2. 解剖教学研究;3. 附属医院乳腺外科, 四川南充 637000)

[摘要] **目的** 通过检测 Annexin A1 在甲状腺乳头状癌中的表达,探讨其与甲状腺乳头状癌的关系与意义。**方法** 取 69 例甲状腺乳头状癌患者癌组织及癌旁正常组织切片,使用二步法免疫组织化学染色观察 Annexin A1 在甲状腺乳头状癌和癌旁正常组织中的表达情况。**结果** Annexin A1 在癌组织中高表达。癌组织表达 61 例(88.41%),癌旁正常组织表达 6 例(8.69%),差异有统计学意义($P<0.05$);在淋巴结转移和肿瘤直径大于或等于 1 cm 的患者中,Annexin A1 表达高于肿瘤小于 1 cm 的患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 甲状腺乳头状癌组织中 Annexin A1 的高表达,提示其可能为甲状腺乳头状癌潜在的生物学标记物。

[关键词] 甲状腺乳头状肿瘤;Annexin A1;免疫组织化学

[中图分类号] R736.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)25-3488-03

Expression and clinical significance of annexin A1 in different stages of papillary thyroid carcinoma patients*

Zhong Xuemei¹, Chen Min^{1△}, Deng Shishan², Xie Shaoli³

(1. Department of Endocrinology, the Affiliated Hospital; 2. Teaching and Research Office of Anatomy; 3. Department of Breast Surgery, the Affiliated Hospital, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the correlations between Annexin A1 protein expression and clinicopathological characteristics in carcinoma of papillary thyroid. **Methods** The different expressions of annexin A1 in papillary thyroid tissue and para-carcinoma tissue were investigated by immunohistochemistry. **Results** Among 69 samples tissues of papillary thyroid carcinoma, the positive rate of annexin A1 was higher than that of 69 para-carcinoma tissues(88.41% vs. 8.69%), there was a significant difference ($P<0.05$). Furthermore, the expression of annexin A1 was correlation with the lymph node metastasis and tumor size, which was higher in ≥ 1 cm diameter of tumor($P<0.05$). **Conclusion** High Annexin A1 positive expression in papillary thyroid cancer tissues is associated with tumor malignant progression, which might be a valuable predictor and potential target for the diagnosis and treatment of papillary thyroid carcinoma.

[Key words] carcinoma of papillary thyroid neoplasms; annexin A1; immunohistochemistry

甲状腺癌是内分泌系统常见恶性肿瘤,近年来甲状腺癌的发病率逐年增高,2010 年男性和女性发病率分别为 4/10 万和 12/10 万,是第 8 个最常见肿瘤,第 5 位女性最常见肿瘤^[1-3]。他的病理分型有甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)、髓样癌、滤泡型癌和未分化癌,而 PTC 是最常见的一型。由于甲状腺结节构成复杂、淋巴结转移早、具有多灶性及发病率较年轻等特点,所以甲状腺结节的良恶性很难鉴别,需要更敏感可靠的肿瘤标记物用于早期诊断的研究。甲状腺癌发病机制方面的研究,在基因和转录水平上的研究报道较多。Annexin 家族是钙依赖性的磷脂结合蛋白,他广泛存在于细胞内,约占细胞总蛋白的 0.2%~5.0%,Annexin A1 是其中第一个被发现的成员^[4-5]。目前,已有 Annexin A2 与甲状腺癌和 PTC 之间关系研究的报道,但 Annexin A1 在人体 PTC 组织中表达的研究,国内外报道极少,因此,本实验通过观察 Annexin A1 在 PTC 组织和癌旁正常组织的表达情况,探讨其与 PTC 的关系,为进一步的功能研究提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集川北医学院附属医院 2010 年 1 月至 2013 年 1 月的 PTC 组织病理标本。病例纳入标准:所有患者临床病例资料完整,经病理确诊的 PTC 标本 69 例,术前均未接受任何抗肿瘤治疗和放射性碘治疗,在此基础上选择同一患者癌旁组织的标本 69 例(距癌组织大于 1 cm)。排除标准:甲状腺良性病变、结节性甲状腺肿、桥本甲状腺炎等。纳入的 69 例患者中,男 14 例,女 55 例,年龄 14~81 岁,中位年龄 40 岁。其中,<45 岁 38 例,占 55.07%; ≥ 45 岁 31 例,占 44.92%;TNM 分期中的 T 分期:T₁ 38 例,T₂ 24 例,T₃ 6 例,T₄ 1 例。69 例 PTC 组织中有淋巴结转移 27 例,占 39.13%。

1.2 方法 根据 HE 切片选取具有代表性的部位,找到存档组织蜡块及冰冻组织,包括癌组织、癌旁正常组织和淋巴结转移灶,选取对应蜡块,进行切片,厚度为 4 μ m,烘干,备用。免疫组织化学:免疫组织化学采用二步法。I 抗为小鼠抗人 Annexin A1 单克隆抗体(美国 ORIGENE 公司),II 抗免疫组织化

* 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—),在读硕士,主要从事内分泌甲状腺疾病方面的研究。

△ 通讯作者, E-mail: chenmin1972@sina.com。

学试剂盒购自北京中杉金桥公司。按试剂盒说明书方法进行,组织经过脱蜡、水化后用枸橼酸对组织进行抗原修复。3%的过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性,加 I 抗 Annexin A1 单克隆抗体 50 μ L,浓度为(1:50),4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。PBS 洗涤后,加聚合物增强剂,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;加 II 抗(山羊抗小鼠),37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。加新配制的 DAB 溶液 5 min,水洗,苏木素复染,梯度乙醇脱水干燥,中性树胶封片。

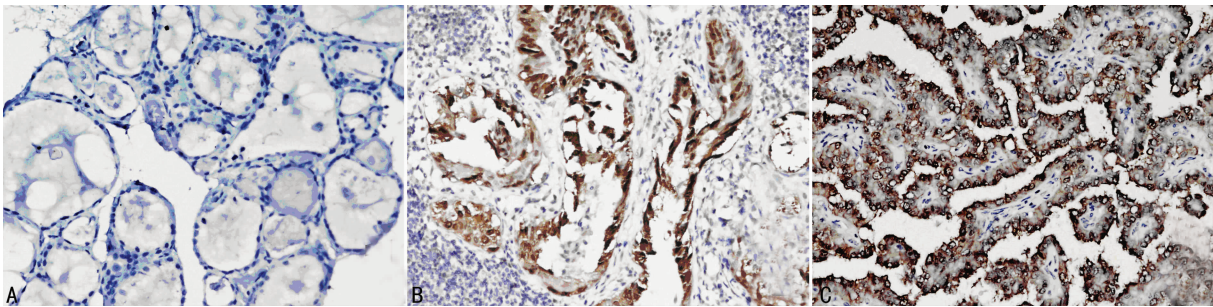
1.3 免疫组织化学结果判断标准 染色结果判定采用二级计分法^[5]。染色强度分级计分标准:无显色为 0 分;淡黄色为 1 分;黄或深黄色为 2 分;褐或棕褐色为 3 分。阳性细胞计分标准: $\leq 5\%$ 为 0 分; $>5\% \sim 25\%$ 为 1 分; $>25\% \sim 50\%$ 为 2 分; $>50\% \sim 75\%$ 为 3 分; $>75\%$ 为 4 分。两者计分的乘积作为判

断标准:0 分为阴性(-);1~4 分为弱阳性(+);5~8 分为阳性(++);9~12 分为强阳性(+++)。将-和+定为阴性,++和+++定为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件进行统计学分析。计数资料以率表示,采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 癌组织和癌旁正常组织中 Annexin A1 表达情况 69 例 PTC 中,Annexin A1 蛋白表达阳性率(88.41%,61/69)高于癌旁正常组织(8.69%,5/69),差异有统计学意义($P<0.01$)。Annexin A1 蛋白主要定位于细胞质,呈毛玻璃状、弥散状分布,着色深浅不一,细胞核及膜中有少量表达,见图 1。



A:癌旁正常组织;B:PTC 淋巴转移;C:PTC。

图 1 Annexin A1 阳性表达情况(DAB 显色 $\times 200$)

2.2 Annexin A1 蛋白表达与 PTC 临床病理特征间的关系 PTC 组织中 Annexin A1 阳性表达与性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。淋巴结转移患者 Annexin A1 阳性表达高于无淋巴结转移患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。肿瘤大于或等于 1 cm 的患者 AnnexinA1 在 PTC 中的阳性表达率高于肿瘤小于 1 cm 的患者,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 69 例 Annexin A1 蛋白表达与 PTC 临床病理特征间的关系(n)

项目	n	阴性	阳性	χ^2	P
性别					
男	14	11	3	1.66	0.200
女	55	50	5		
年龄(岁)					
<45	38	34	4	0	1.000
≥ 45	31	27	4		
有无淋巴结转移					
无	42	34	8	4.11	0.043
有	27	27	0		
肿瘤直径(cm)					
≥ 1	39	38	1	5.25	0.020
<1	30	23	7		

2.3 Annexin A1 在 69 例癌组织 TMN 分期中的阳性表达情况 TNM 分期中由于 PTC 分期较细,故将 TNM 分期大致分

为 2 个范围,且在临床分期中,45 岁以下都是 I 期。因此,TNM 分期的影响并不显著,总体趋势显示出分期越晚,PTC 癌组织中 Annexin A1 阳性表达率越高,T₁N₀M₀~T₂N₁M₀ 期阴性 6 例,阳性 56 例,T₃N₀M₀~T₄N₁M₀ 期阴性 2 例,阳性 5 例,差异无统计学意义($\chi^2=0.735,P=0.391$)。

3 讨 论

PTC 的发病机制不仅与甲状腺自身免疫性病变、碘摄取异常、电离辐射等有关,更与一系列遗传和 BRAF 基因点突变等有关^[6-7],这就需要基因水平的分子诊断和靶向治疗。Annexin A 家族在脊柱细胞动物中有 13 个成员,即 Annexin A1~A13^[8],已有研究显示 Annexin A2 在甲状腺癌中表达上调^[9]。Annexin A1 与肿瘤的发生发展也有着密切联系,在一些肿瘤中 Annexin A1 表达显著降低甚至缺失。Wang 等^[10]发现在正常乳腺组织和乳腺良性病变组织中,Annexin A1 在上皮细胞中呈现出强阳性表达。认为其表达程度与乳腺癌的进展呈反比关系。在口腔鳞状细胞癌、前列腺癌表达也显著降低^[11-13]。但在另外一些肿瘤细胞中表达却有所增加,如结直肠癌、胰腺癌^[14-15]。燕贞等^[16]发现 Annexin A1 在肺鳞癌组织中的表达明显高于癌旁正常组织。

研究表明,甲状腺癌的发生是多基因、多蛋白参与的结果^[17]。本研究应用免疫组织化学法检测了 Annexin A1 在 PTC 的原发灶、转移灶及癌旁正常组织的表达,为探讨 PTC 组织中 Annexin A1 蛋白表达与临床病理特征之间的关系,本研究将性别、年龄、有无淋巴结转移、肿瘤直径等因素纳入进行分析,发现 Annexin A1 蛋白表达与淋巴结转移及肿瘤大小相关,这也与文献报道 Annexin A2 在 PTC 中的高表达相似^[9]。但 Annexin A1 在 PTC 中的表达与患者的性别、年龄无相关

性,TNM 分期的影响并不显著,总体趋势显示出分期越晚,PTC 组织中 Annexin A1 阳性表达率越高,差异无统计学意义($P=0.391$),这可能与本研究样本量少、地域等因素有关。Annexin A1 在 PTC 中的高表达为肿瘤的早期诊断提供新的标志物的可能性。Annexin A1 在 PTC 的发生、发展及转移的分子机制的进一步研究将对人 PTC 的诊治及预后起到重要作用。

由于受研究人群的地域、环境、样本量较少等的影响,对于 Annexin A1 在 PTC 的进展作用需进一步研究证实,相信随着 Annexin A1 基础研究的深入,以 Annexin A1 为靶点的治疗可为 PTC 的治疗提供更多的新思路。

参考文献

[1] Andrade LJO, Melo PRS, Neto WA, et al. Molecular markers in thyroid cancer[J]. *Revista Argentina de Endocrinologiy Metabolismo*,2013,50(2):84-89.

[2] Harris PJ, Bible KC. Emerging therapeutics for advanced thyroid malignancies: rationale and targeted approaches [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2011, 20 (10): 1357-1375.

[3] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics,2010[J]. *CA Cancer J Clin*,2010,60(5):277-300.

[4] Lee DB, Jamgotchian N, Allen SG, et al. Annexin A2 heterotetramer: role in tight junction assembly [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*,2004,287(3):481-491.

[5] 任媛媛,何妙霞,应明真,等. 疱疹病毒相关性泛素特异性蛋白酶在乳腺癌组织中的表达及临床意义[J]. *中国癌症杂志*,2009,7(4):491-496.

[6] Bhaijee F, Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors[J]. *Endocr Pathol*,2011,22(3):126-133.

[7] Barollo S, Pennelli G, Vianello F, et al. BRAF in primary and recurrent papillary thyroid cancers: the relationship with (131) I and 2-[(18) F] fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake ability[J]. *Eur J Endocrinol*,2010,163(4):659-663.

[8] Rescher U, Gerke V. Annexins-unique membrane binding proteins with diverse functions[J]. *J Cell Sci*,2004,117(Pt 13):2631-2639.

[9] 赵玲,王鹏,崔全才. Annexin A2 在人甲状腺癌中表达的意义[J]. *诊断病理学杂志*,2008,15(2):117-120.

[10] Wang LP, Bi J, Yao C, et al. Annexin A1 expression and its prognostic significance in human breast cancer [J]. *Neoplasma*,2010,57(3):253-259.

[11] 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.

[12] Schaeffer EM, Marchionni L, Huang Z, et al. Androgen-induced programs for prostate epithelial growth and invasion arise in embryogenesis and are reactivated in cancer [J]. *Oncogene*,2008,27(57):7180-7191.

[13] 赵宪龙,李增运,文心,等. 膜联蛋白 A1 在前列腺癌中的表达及意义[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*,2011,25(8):735-736.

[14] 葛慧娟,杨晓群,余宏宇,等. 结直肠癌及其淋巴结转移灶内 Annexin I 和 Annexin II 的表达及意义[J]. *第二军医大学学报*,2009,26(3):340-341.

[15] 倪晓光,白晓枫,王贵齐,等. 膜联蛋白 A1 和 Ki67 抗原在胰腺癌组织中的表达及其相互关系[J]. *中国肿瘤*,2010,19(4):549-552.

[16] 燕贞,沈飞,李智涛,等. 肺肺癌组织中 Annexin-1 的表达及意义[J]. *肿瘤防治研究*,2011,38(1):38-40.

[17] Stephen D. Farris, Jie Hong Hu, Ranjini Krishnan, et al. Mechanisms of urokinase plasminogen activator (uPA)-mediated atherosclerosis[J]. *J Biol Chem*,2012,286(25):129-134.

(收稿日期:2015-04-13 修回日期:2015-05-16)

(上接第 3587 页)

[10] 高倩倩,杨秀芬,欧敏. 藤茶总黄酮和二氢杨梅素含药血清对肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响[J]. *中国中药杂志*,2011,36(4):500-503.

[11] Liu J, Shu Y, Zhang Q, et al. Dihydromyricetin induces apoptosis and inhibits proliferation in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Oncol Lett*,2014,8(4):1645-1651.

[12] Zeng G, Liu J, Chen H, et al. Dihydromyricetin induces cell cycle arrest and apoptosis in melanoma SK-MEL-28 cells[J]. *Oncol Rep*,2014,31(6):2713-2719.

[13] Lin B, Tan X, Liang J, et al. A reduction in reactive Oxygen species contributes to dihydromyricetin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Sci Rep*, 2014,4:7041.

[14] Wu S, Liu B, Zhang Q, et al. Dihydromyricetin reduced Bcl-2 expression via p53 in human hepatoma HepG2 cells [J]. *PLoS One*,2013,8(11):e76886.

[15] 李洁,熊兴耀,曾建国,等. 白藜芦醇的研究进展[J]. *中国现代中药*,2013,15(2):100-108.

[16] Winter M, Sombroek D, Dauth I, et al. Control of HIPK2 stability by ubiquitin ligase Siah-1 and checkpoint kinases ATM and ATR[J]. *Nat Cell Biol*,2008,10(7):812-824.

[17] 姬俊成,徐亮. 胃癌靶向化疗及相关治疗的研究进展[J]. *现代诊断与治疗*,2009,20(1):43-47.

[18] Haq R, Fisher DE. Improving apoptotic responses to targeted therapy[J]. *Oncotarget*,2013,4(9):1331.

(收稿日期:2015-03-08 修回日期:2015-05-16)