结肠腺癌中膜联蛋白 A5 的表达及其 临床意义

赵 帅,肖 琳

(长沙市第三医院,湖南 长沙 410000)

摘 要:[目的]研究膜联蛋白 A5(Annexin A5)在结肠腺癌组织中的表达水平及其与临床病理因素之间的关系。[方法]应用蛋白质印迹法(Western blot)和 S-P 免疫组化法检测结肠腺癌组织和相应癌旁正常组织中 Annexin A5 表达状况。[结果] Annexin A5 在结肠腺癌组织中的表达水平及阳性表达率均显著高于相应癌旁正常组织中的表达,差异具有显著性(P<0.05)。进一步研究表明,Annexin A5 表达与肿瘤大小和患者是否发生淋巴结转移有关(P<0.05)。[结论] Annexin A5 在结肠腺癌的形成和转移中有着重要作用,有望成为结肠腺癌临床治疗的新靶标。

主题词:结肠肿瘤:膜联蛋白 A5:肿瘤转移

中图分类号: R735.3+5 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2013)05-0378-04

Expression of Annexin A5 in Adenocarcinoma of Colon and Its Clinical Significance

ZHAO Shuai, XIAO Lin

(The Third Hospital of Changsha, Changsha 410000, China)

Abstract: [Purpose] To explore the expression of annexin A5 in adenocarcinoma of colon and the relationship between annexin A5 and clinicopathologic factors. [Methods] Expression of annexin A5 was detected by Western blot and immunohistochemistry in adenocarcinoma of colon tissues and corresponding adjacent normal tissues. [Results] Positive rate of annexin A5 in adenocarcinoma of colon tissues was significantly higher than that in corresponding adjacent normal tissues (P<0.05). Furthermore, expression of annexin A5 correlated with tumor size and lymph node metastasis (P<0.05). [Conclusion] Annexin A5 plays an important role in the carcinogensis and metastasis of colon adenocarcinoma, and it may be a new target of clinical therapy for adenocarcinoma of colon.

Subject words: colon neoplasms; annexin A5; neoplasm metastasis

膜联蛋白(Annexin)家族是一个钙离子依赖的磷脂结合蛋白家族,目前为止,共发现 12 个家族成员。膜联蛋白家族成员参与细胞增殖、信号转导、细胞活动等。研究发现,Annexin A1 和 Annexin A2 参与了多种肿瘤的发生,例如 Annexin A1 高表达与肾癌、胰腺癌有关^[1,2],Annexin A2 在宫颈癌、胰腺癌、肾癌中表达上调^[3-5]。有研究报道,结肠癌中也发现Annexin A3 阳性表达率较高^[6]。考虑到膜联蛋白家族各成员之间存在相似的保守序列,其余膜联蛋白与肿瘤的发生也可能存在联系。

通讯作者:赵 帅,主治医师,硕士;长沙市第三医院病理科,湖南省 长沙市劳动西路 176 号(410000);E-mail: shuaishuai927@ya-

收稿日期:2013-01-09;修回日期:2013-02-16

相比较而言,Annexin A5 与肿瘤的关系目前国内外知之甚少,Annexin A5 在结肠癌中的表达及其临床意义国内外均未报道。本实验通过研究 Annexin A5 表达与结肠癌各临床病理因素之间的关系,探讨其在结肠癌发生发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集长沙市第三医院 2008 年 1 月至 2012 年 12 月的手术存档石蜡标本 40 例,其中男性 25 例,女性 15 例;年龄 46~75 岁,中位年龄 60.5 岁。所选择病例均经病理医生核实,其中低分化及未分化结

肠腺癌 12 例,高分化及中分化结肠腺癌 28 例;有淋巴结转移 13 例,未发生淋巴结转移 27 例;临床TNM 分期 I/Ⅱ期 25 例,Ⅲ/Ⅳ期 15 例。6 例新鲜手术切除结肠癌标本及相应的癌旁正常组织储存于液氮罐中。

1.2 免疫组织化学法

将 40 例结肠癌及癌旁正常组织石蜡标本,用免疫组化的方法检测 Annexin A5 在各种不同分化程度结肠腺癌组织与癌旁正常组织的表达。免疫组织化学染色及 DAB 显色试剂盒均购自迈新公司,兔抗人 Annexin A5 多克隆抗体购自 Santa Cruz,稀释浓度为 1:1 000,本实验采用 S-P 法,按照 S-P 试剂盒的步骤进行操作。切片脱蜡至水,过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,微波抗原修复,加入一抗 4℃过夜,DAB 显色,苏木素复染,PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 蛋白质印迹法(Western blot)

取出液氮罐中的 6 例新鲜结肠腺癌和相应的癌 旁正常组织,PBS 洗 3 次,加入液氮后用研钵将其磨碎,加入蛋白裂解液,置于冰上裂解 1.5h。12 000r/min,4℃离心 20min,小心吸取上清,测定蛋白含量。取总蛋白 30μg,电泳结束后进行转膜,PVDF 膜三明治转移法,100V,约 60min,5%牛奶封闭 2h,PVDF 膜放入杂交袋中加入一抗(兔抗人 Annexin A5)4℃孵育过夜。TBST 洗膜 15min×3 次,加入二抗,室温孵育2h,TBST 洗膜 15min×3 次,用 ECL 进行发光、显影。

1.4 结果判定

免疫组化结果:Annexin A5 阳性显色为细胞浆和细胞膜出现阳性颗粒,阳性表达评定以细胞染色强度和阳性细胞所占百分比决定。细胞染色强度评分:无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别判定为 0、1、2、3 分;阳性细胞所占百分比评分:阳性细胞数 0、<10%、11%~50%、51%~75%及≥75%,分别判定为0、1、2、3、4 分。细胞染色强度和阳性细胞百分比评分的乘积:<3 为阴性(-),≥3 为阳性(+)^[7]。

Western blot 结果:用凝胶图像分析系统对显影条带进行扫描,Annexin A5蛋白表达量用 Annexin A5光密度值与 GAPDH 光密度值的比值表示。

1.5 统计学处理

应用 SPSS11.0 统计软件,对数据行 Fisher 确切概率法, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Annexin A5 蛋白在结肠癌组织与癌旁正常结肠黏膜组织中的表达

免疫组化实验结果表明,癌旁正常结肠黏膜中Annexin A5 蛋白阳性表达率为 12.5%(5/40)。而在结肠癌组织中Annexin A5 蛋白阳性表达率为 72.5%(29/40),两者比较差异有统计学意义(P<0.05)。Annexin A5 在癌旁正常结肠黏膜组织中阳性表达率低(Figure 1),Annexin A5 在结肠癌组织中的表达主要定位于肿瘤细胞的细胞浆和细胞膜中(Figure 2~4)。

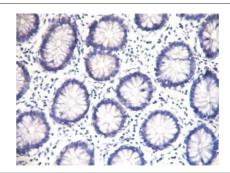


Figure 1 The negative expression of Annexin A5 in cancer adjacent tissue

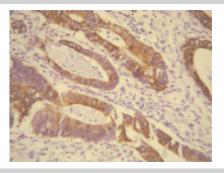


Figure 2 The positive expression of Annexin A5 in high differentiation adenocarcinoma of colon

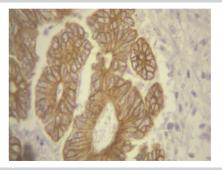


Figure 3 The positive expression of Annexin A5 in moderately differentiated adenocarcinoma of colon

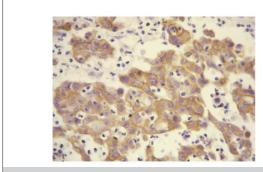
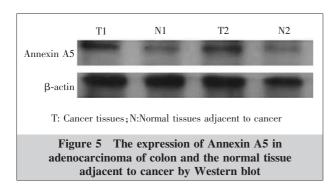


Figure 4 The positive expression of Annexin A5 in lowly differentiated adenocarcinoma of colon

2.2 Western blot 结果

Band Scan5.0 软件分析显示影条带后, Annexin A5 蛋白灰度值为各组条带灰度值与内参条带灰度值之比。6 例结肠腺癌组织中 Annexin A5 蛋白灰度值(1.32±0.14)显著高于癌旁正常组织(0.41±0.21), 差异有统计学意义(*P*<0.05)(Figure 5)。



2.3 Annexin A5 表达与结肠腺癌临床病理因素之间的关系

统计学结果表明,Annexin A5 表达与肿瘤大小和有无淋巴结转移有关(P<0.05),而与患者的性别、年龄、肿瘤分化程度、TNM 分期等临床病理因素之间无明显相关性(P>0.05)(Table 1)。

3 讨论

Annexin A5 蛋白与肿瘤的关系目前报道很少。与其他膜联蛋白相比,Annexin A5 的结构和功能存在一定的特殊性。Annexin A5 氨基酸肽链的 N 末端没有蛋白激酶 C (PKC) 的磷酸化位点,不是 PKC 的作用底物,因此,Annexin A5 可抑制 PKC 的活性。众所周知,PKC 在因细胞增殖失控而导致的恶性转化过程中起着重要作用,它的激活紊乱理论是引起肿

Table 1 The relationship between the expression of Annexin A5 and the clinicopathological factors in adenocarcinoma of colon

auchocal chioma of colon					
Clinicopathological factors	n	Positive	Negative	Positive rate(%)	P
Gender					
Male	25	19	6	76.0	0.603
Female	15	10	5	66.6	
Age(years)					
≤60	18	13	5	72.2	0.322
>60	22	16	6	72.7	
Tumor size(cm)					
€5	29	19	10	65.5	0.026
>5	11	10	1	90.9	0.026
Differential degree					
High~moderate	28	22	6	78.6	0.546
Low~normal	12	7	5	58.3	
TNM stage					
I / II	25	20	5	80.0	0.579
III / IV	15	9	6	60.0	0.579
Lymph node metastasis					
Yes	27	17	10	62.9	0.014
No	13	12	1	92.3	

瘤发生的重要因素之一[8~11]。

本实验研究结果发现,Annexin A5 蛋白在结肠 腺癌组织的细胞浆和细胞膜中表达高,并且阳性表 达率明显高于癌旁正常结肠黏膜组织,提示 Annexin A5 蛋白表达在结肠癌的发生中发挥着重要作用,李 欣等[12]也曾报道宫颈鳞癌中,Annexin A5 表达在 mR-NA 和蛋白水平上都明显增强,这与本实验的报道是 一致的。值得注意的是,Karube 等[13]报道 Annexin A5 在宫颈癌组织和子宫内膜癌组织中的表达比相 应的正常组织显著下调,这与我们的研究结果是矛 盾的,可能是肿瘤的类别不同引起的,Karube 研究 的是宫颈癌而本实验研究的样本是结肠腺癌;也可 能是与研究的样本量不足有关,当时 Karube 收集的 样本仅十几例,样本量不够大可能影响实验结果。进 一步研究发现, Annexin A5 表达与肿瘤的大小直接 相关。有研究报道, Annexin A5 可以促进肿瘤细胞 的增殖,我们的实验结果也发现 Annexin A5 与肿瘤 的大小呈正相关,这也间接证明了 Annexin A5 可以 促进肿瘤细胞的增殖。值得注意的是, 国外有报道 Annexin A5 对正常淋巴细胞、心肌细胞的凋亡有促 进作用[14,15]。但是关于 Annexin A5 在肿瘤细胞凋亡 中的作用研究较少,李欣等[16]研究 Annexin A5 可促 进宫颈癌细胞系 SiHa 细胞的凋亡。关于 Annexin A5 在结肠癌细胞中是否存在促凋亡及其细胞凋亡中的确切作用机制值得继续深入探讨。本实验研究结果还发现,Annexin A5 蛋白阳性表达率在有淋巴结转移组中明显高于未发生淋巴结转移组,表明 Annexin A5 与结肠癌组织的淋巴结转移相关,提示 Annexin A5 可能促进了癌细胞的淋巴结转移。此外,本实验还有一些阴性发现,Annexin A5 在不同分化程度的结肠腺癌中的表达没有明显差别,且与患者的年龄、性别亦无关。

综上所述,Annexin A5 在结肠腺癌组织中的高表达与结肠腺癌组织大小以及肿瘤的淋巴结转移有关,提示 Annexin A5 可能参与结肠腺癌的发生、发展,并可能成为结肠癌预后判断的参考指标,但是 Annexin A5 在结肠癌中的作用及相关分子机制仍有待深入研究。

参考文献:

- Bai XF, Ni XG, Zhao P, et al. Overexpression of annexin
 I in pancreatic cancer and its clinical significance [J].
 World J Gastroenterol, 2004, 10(10):1466–1470.
- [2] Zimmermann U, Woenckhaus C, Teller S, et al. Expression of annexin A I in conventional renal cell carcinoma (CRCC) correlates with tumour stage, Fuhrman grade, amount of eosinophilic cells and clinical outcome[J]. Histol Histopathol, 2007, 22(5): 527–534.
- [3] Bae SM, Lee CH, Cho YL, et al. Two-dimensional gel analysis of protein expression profile in squamous cervical cancer patients[J]. Gynecol Oncol, 2005, 99(1): 26–35.
- [4] Domoto T, Miyama Y, Suzuki H, et al. Evaluation of S100A10, annexin II and B-FABP expression as markers for renal cell carcinoma[J]. Cancer Sci, 2007, 98(1): 77–82.
- [5] Chen R, Brentnall TA, Pan S, et al. Quantitative proteomic analysis reveals that proteins differentially expressed in chronic pancreatitis are also frequently involved in pancreatic cancer[J]. Mol Cell Proteomics, 2007, 6(8):1331–1342.
- [6] Madoa-Gúrpude J, López-Serra P, Martínez-Torrecuadrada JL, et al. Proteomics-based validation of genomic data: ap-

- plication in colorectal cancer diagnosis[J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(8):1471–1483.
- [7] Xu LZ, Yang WT. The criterion for judgement of result of immunohistochemical reaction[J]. China Oncology, 1996, 6 (4):229-231.[许良中,杨文涛.免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4):229-231.]
- [8] Emoto K, Sawada H, Yamada Y, et al. Annexin II overexpression is correlated with poor prognosis in human gastric carcinoma[J]. Anticancer Res, 2001, 21(2B):1339–1345.
- [9] Van Heerde WL, de Groot PG, Reutelingsperger CP. The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V[J]. Thromb Haemost, 1995, 73(2):172-179.
- [10] Dubois T, Mira JP, Feliers D, et al. Annexin V inhibits protein kinase C activity via a mechanism of phospholipid sequestration[J]. Biochem J, 1998, 330(Pt 3):1277-1282.
- [11] Mi L, Xiao Z, Veenstra TD, et al. Proteomic identification of binding targets of isothicyanates: a perspective on techniques[J]. J Proteomics, 2011, 74(7):1036–1044.
- [12] Li X,Gao FL,Li JT,et al. Expression of annexin A5 in human uterine cervical squamous cell carcinomas[J].Acta Anatomica Sinica,2008,39(6): 923-926.[李欣,高福禄,李建团,等. 膜联蛋白 A5 在人子宫颈鳞癌组织中的表达[J].解剖学报,2008,39(6): 923-926.]
- [13] Karube A, Shidara Y, Hayasaka K, et al. Suppression of calphobidin I (CPB I) production in carcinoma of uterine cervix and endometrium [J]. Gynecol Oncol, 1995, 58(3): 295–300.
- [14] Hawkins TE, Das D, Young B, et al. DT40 cells lacking the Ca²⁺-binding protein annexin 5 are resistant to Ca²⁺dependent apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(12):8054–8059.
- [15] Monceau V, Belikova Y, Krat assiouk G, et al. Externalization of endogenous annexin A5 participates in apoptosis of rat cardiomyocytes[J]. Cardiovasc Res, 2004, 64(3):496–506.
- [16] Li X,Gao FL,Dou ZJ,et al. Influence of annexin A5 overexpression on SiHa cells apoptosis[J]. Chinese Journal of Anatomy,2008,31(5): 669-673.[李欣,高福禄,窦志杰,等. 膜联蛋白 A5 过表达对宫颈癌细胞系 SiHa 细胞 凋亡的影响[J]. 解剖学杂志,2008,31(5): 669-673.]