

AHNAK2 蛋白在肺腺癌中的表达及其对血管生成的影响

臧志意, 魏小东

(中国人民解放军联勤保障部队第九〇四医院, 江苏 无锡 214044)

摘要: [目的] 探讨 AHNAK 核蛋白 2 (AHNAK2) 在肺腺癌中的表达及其对血管生成的影响。 [方法] 收集中国人民解放军联勤保障部队第九〇四医院 2015 年 2 月至 2019 年 2 月行肺癌根治术诊治的 118 例肺腺癌患者的组织蜡块及临床病理资料, 分别利用免疫组化检测肺腺癌组织及配对癌旁组织中 AHNAK2、Ki-67 及 CD34 的表达情况, 使用 Western blot 检测 40 例肺癌组织及其对应癌旁组织中 AHNAK2 蛋白相对表达情况。分析 AHNAK2 蛋白的表达水平与患者预后的关系以及对血管生成的影响。 [结果] Western blot 实验与免疫组化结果显示, AHNAK2 蛋白在肺腺癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。肺腺癌组织中 AHNAK2 蛋白的表达水平与 Ki-67 表达呈正相关 ($V = 0.359, P < 0.05$), 与 MVD 计数之间也呈正相关 ($r_s = 0.304, P < 0.05$) ($P < 0.05$)。Cox 单因素分析结果显示肿瘤组织分化程度、肿瘤直径、淋巴结转移、TNM 分期以及 AHNAK2 蛋白表达水平是患者生存时间的影响因素 (P 均 < 0.05)。Cox 多因素分析结果显示, AHNAK2 高表达 ($HR = 1.855, 95\%CI: 1.092 \sim 3.149, P < 0.05$) 与 TNM 分期 ($HR = 2.802, 95\%CI: 1.639 \sim 4.790, P < 0.05$) 是影响患者生存的独立危险因素。 [结论] AHNAK2 蛋白在肺腺癌组织中高表达, 与 Ki-67 及 MVD 计数呈正相关, 且 AHNAK2 蛋白高表达是患者预后的独立危险因素, AHNAK2 蛋白可能可作为提示患者预后不良的参考因素。

关键词: AHNAK2; 肺癌; 预后; 血管生成

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2022)10-0818-08

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2022.10.B004

Expression of AHNAK2 in Lung Adenocarcinoma and Its Relation with Tumor Angiogenesis

ZANG Zhi-yi, WEI Xiao-dong

(The 904th Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Wuxi 214044, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of AHNAK2 in lung adenocarcinoma and its relation with tumor angiogenesis and the prognosis of patients. [Methods] The tissue wax blocks and clinicopathological data of 118 patients with lung adenocarcinoma who underwent radical mastectomy in the Department of Thoracic Surgery of The 904th Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA from February 2015 to February 2019 were collected. The expressions of AHNAK2, Ki-67 and CD34 in lung adenocarcinoma tissues and paired adjacent tissues were detected by immunohistochemistry. The relative expression of AHNAK2 protein in 40 fresh lung cancer tissues and corresponding adjacent tissues were detected by Western blot. The relationship of the expression of AHNAK2 with tumor angiogenesis and the prognosis of patients were analyzed. [Results] The results of Western blot and immunohistochemistry showed that the expression level of AHNAK2 in lung adenocarcinoma tissues was significantly higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). The expression of AHNAK2 was positively correlated with the expression of Ki-67 ($V = 0.359, P < 0.05$) and MVD count ($r_s = 0.304, P < 0.05$) in lung adenocarcinoma tissue. Cox univariate analysis showed that tumor tissue differentiation, tumor diameter, lymph node metastasis, TNM stage and the expression level of AHNAK2 were significantly associated with the survival time of patients (all $P < 0.05$). Cox multivariate analysis showed that high expression of AHNAK2 ($HR = 1.855, 95\%CI: 1.092 \sim 3.149, P < 0.05$) and TNM stage ($HR = 2.802, 95\%CI: 1.639 \sim 4.790, P < 0.05$) were the independent risk factor for poor prognosis of patients. [Conclusion] AHNAK2 is highly expressed in lung adenocarcinoma tissues and has a positive correlation with Ki-67 and MVD counts. And the high expression of AHNAK2 is an independent risk factor for poor prognosis of patients, indicating that AHNAK2 may be used as a reference factor for prognosis of patients with lung adenocarcinoma.

Subject words: AHNAK2; lung cancer; prognosis; angiogenesis

通信作者: 魏小东, E-mail: 552006953@qq.com

收稿日期: 2022-06-12; 修回日期: 2022-09-09

根据 GLOBOCAN 2020 统计,目前在所有癌症中肺癌发病率位列第 2,但仍是造成癌症死亡的主要原因(约 180 万人死亡,占总死亡数的 18%),临床病理亚型多为肺腺癌^[1]。近年来随着靶向治疗及免疫治疗等新型治疗方式的普及与应用,患者的预后得到了改善,但总体生存率仍较差^[2]。因此探索影响肺癌发病及进展的相关分子机制至关重要。近期研究发现 AHNAK2 蛋白是一种致癌蛋白,在甲状腺癌^[3]、膀胱癌^[4]、胃癌^[5]等癌症中起着促进肿瘤细胞转移及侵袭的作用。目前关于 AHNAK2 蛋白在肺腺癌中的具体作用机制不详,本研究通过 Western blot 实验以及免疫组化实验探讨 AHNAK2 蛋白在肺腺癌中的表达及其与患者预后的关系,并通过分析 AHNAK2 蛋白的表达与增殖因子 Ki-67、肿瘤微血管密度(MVD)计数的相关性,探究 AHNAK2 蛋白的表达水平与肿瘤增殖及肿瘤血管生成的关系,为改善肺癌患者不良预后提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性分析中国人民解放军联勤保障部队第九〇四医院 2015 年 2 月至 2019 年 2 月收治的 118 例行肺癌根治术治疗的术后病理为肺腺癌的患者资料,并收集相关肿瘤组织蜡块标本,其中男性 65 例,女性 53 例,中位年龄 66 岁(35~87 岁);I 期 62 例,II 期 26 例,III 期 30 例;淋巴结转移 42 例,无转移 76 例。其中 40 例肿瘤组织有对应的癌旁组织,使用 SP 免疫组织染色法对 118 例肿瘤组织及 40 例癌旁组织进行相关蛋白的染色。在病理科合作下,在手术切除肺癌 30 min 内将新鲜肺癌组织及其癌旁组织放入-80℃冰箱保存,选取 3 例肺腺癌标本用于 Western blot 蛋白印迹实验。

中国人民解放军联勤保障部队第九〇四医院伦理委员会批准本次研究(编号:2022-2-002)。

1.2 纳排标准

纳入标准:(1)进行肺癌根治术,术后病理结果为肺腺癌。(2)术前未进行放化疗等新辅助治疗。

排除标准:(1)术后 3 个月内或围手术期内发生死亡。(2)患者合并其他系统的肿瘤病史或发生全身免疫系统疾病。(3)临床或病理资料有缺损。

1.3 Western blot 蛋白印迹实验

取 100 mg 肺癌组织及对应癌旁组织,加入 1 mL 裂解液使用匀浆机打碎并置于冰上裂解 30 min,彻底裂解后放入离心机中离心 20 min(10 000 r/min),抽取组织上清液后加入蛋白缓冲液煮沸 10 min。配胶后加入 20 μg 样本,进行电泳与转膜,随后加入浓度为 5%的脱脂牛奶封闭 2 h,结束后使用 TBST 缓冲液冲洗 3 次每次 5 min,加入一抗兔抗人 AHNAK2 多克隆抗体(工作浓度 1:1 000,美国 Abcam 公司)及 β-actin(武汉三鹰公司),4℃冰箱过夜。第 2 天 TBST 缓冲液冲洗后,加入二抗羊抗兔 HRP 抗体(武汉三鹰公司),室温孵育 2 h,使用 TBST 缓冲液洗膜,最后 ECL 显影后使用 Image J 分析图像灰度值,分析 AHNAK2 蛋白的相对表达量,实验重复 3 次。

1.4 免疫组化染色

使用 SP 免疫组化染色法对相应标本进行染色。取相应的组织蜡块切片(厚度约 4 μm)后,进行烘片、脱蜡、脱水后,将切片放入修复液中进行高压抗原修复 20 min,室温冷却后使用 PBS 缓冲液洗涤,滴加内源性过氧化物酶阻断剂后避光放置 10 min,随后进行 PBS 缓冲液洗涤,滴加一抗(AHNAK2 工作浓度 1:200,抗体购自美国 Abcam 公司;Ki-67 为即用型抗体,抗体购自中杉金桥公司),4℃冰箱过夜,第 2 天使用 PBS 缓冲液洗涤,滴加辣根过氧化物还原酶工作液(中杉金桥公司)避光放置 30 min,PBS 缓冲液洗涤,应用 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,使用显微镜观察显色情况,显色后使用蒸馏水洗涤并置于苏木素中染色 5 min,随后盐酸酒精中分化,清洗后置于热水中反蓝,最后脱水透明中性树脂封片。阳性对照:组织进行 SP 法免疫组化染色后,阳性结果参考抗体说明书上组织阳性染色图片。阴性对照:按上述实验步骤进行 SP 法染色时,将一抗替代为 PBS 缓冲液得到的结果作为阴性对照参考。

1.5 免疫组化结果判定

AHNAK2 蛋白主要表达于细胞质与细胞膜中,细胞质及细胞膜染色为黄色或棕黄色时提示表达阳性。Ki-67 主要表达于细胞核中,细胞核染色为黄色或棕黄色是提示表达阳性。所有切片结果均由 2 名高级职称的病理医生判定与审核,每张切片于 400 倍镜下,随机选 5 个视野进行观察计数与染色程度的判断,采用半定量积分法判定结果^[6]:阳性染色程度评分标准:0 分:未染色,1 分:黄色,2 分:棕黄色,

3分:深棕色。阳性细胞着色比例判定标准:0分:0~5%细胞染色,1分:5%~25%的细胞染色,2分:25%~50%的细胞染色,3分:50%~75%的细胞染色,4分:75%~100%的细胞染色。阳性细胞染色程度与染色比例的得分相乘为最终分数。AHNAK2蛋白最终分数的平均数为5.14分,因此AHNAK2蛋白的评价标准:<5.14分为低表达,≥5.14分为高表达。Ki-67表达的评价标准:<25%的细胞染色为低表达,≥25%的细胞染色为高表达^[7]。

微血管密度(microvessel density, MVD)计数采用CD34进行标记,CD34表达于血管内皮细胞,当细胞呈黄色或棕黄色染色时为阳性表达,单独的内皮细胞及细胞团或不相连的分支结构作为一个微血管进行计数。所有切片结果均由2名高级职称的病理医生判定与审核,先在100倍镜下找到5个血管密度最高区域,然后使用200倍镜计算每个视野中的微血管数量,最终取均值作为该标本的MVD值^[8]。

1.6 随访及预后评价

随访方法为门诊定期随访与电话随访相结合(截止日期为2022年2月1日)。随访时间4~84个月,中位38个月。死亡57例,存活49例,失访12例。患者预后采用总生存时间(overall survival, OS)表示,OS的定义:患者术后至因任何原因死亡的时间。

1.7 统计学处理

使用Image J对Western blot蛋白印迹实验图像进行分析,使用IBM SPSS 22.0与GraphPad Prism 8进行数据分析,正态分布的定量资料(MVD计数)采用均数±标准误表示,组间对比采用独立样本t检验,非正态分布定量资料(年龄和随访时间)采用中位数表示,相关性分析使用Spearman相关性检验;定性资料通过成组或配对的卡方检验进行分析,相关性分析使用Cramer's V相关性检验;采用Kaplan-Meier检验绘制生存曲线,并使用Log-rank检验对影响生存的因素进行分析;采用Cox比例风险回归模型进行单因素及多因素分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AHNAK2蛋白在肺腺癌组织及配对癌旁组织中的表达

Western blot检测结果显示,AHNAK2蛋白在

40例肺腺癌组织中的相对表达水平明显高于相应的癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.05$, Figure 1~2)。

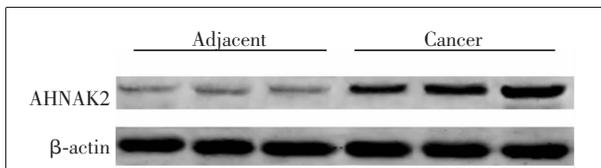


Figure 1 The representative results of AHNAK2 in cancer tissue and adjacent tissue detected by Western blot

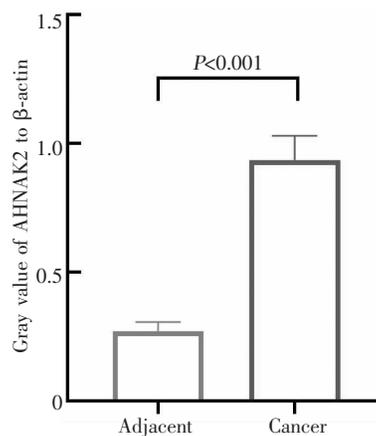
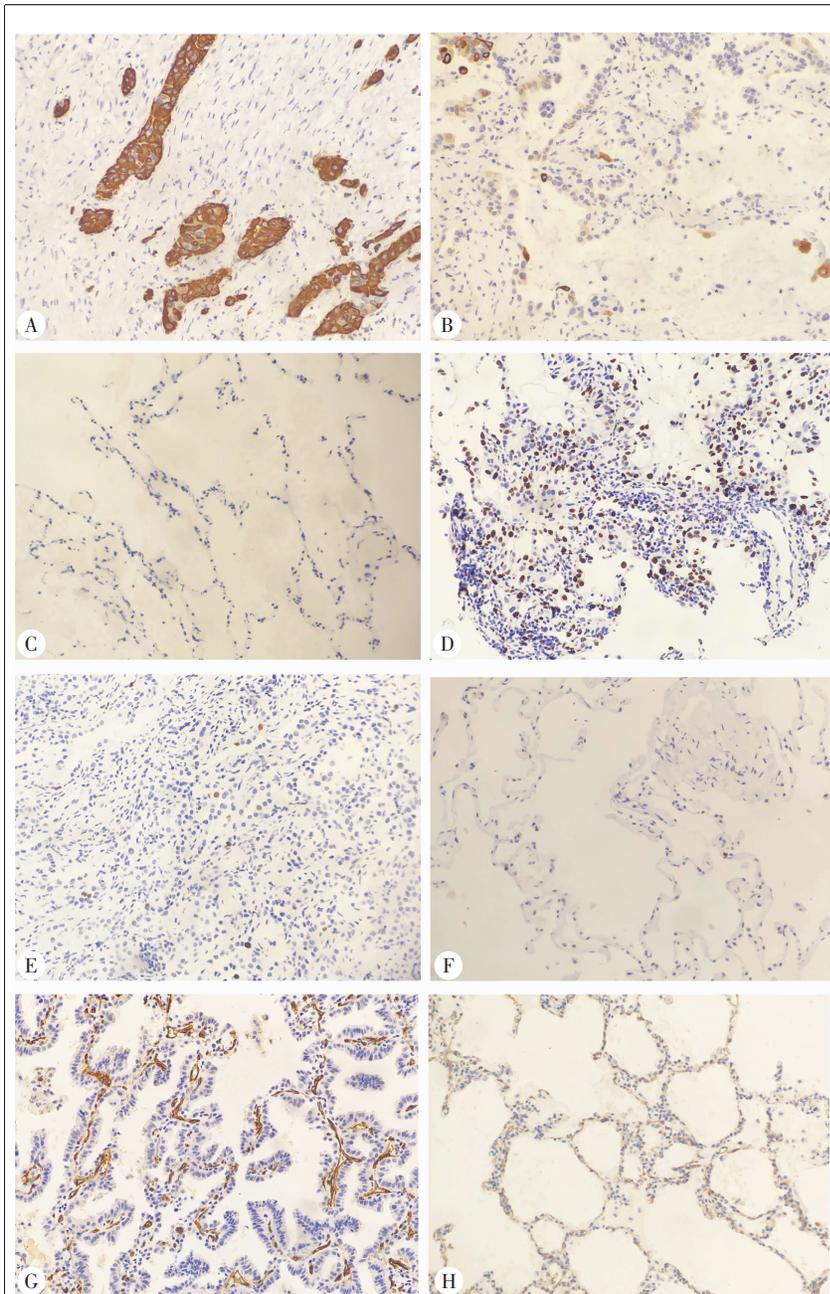


Figure 2 AHNAK2 expression in cancer tissue and adjacent tissue

AHNAK2蛋白在肺腺癌组织主要表达于细胞膜与细胞质,Ki-67表达于细胞核,CD34主要表达于内皮细胞用于血管计数,阳性表达为黄色或黄棕色(Figure 3)。免疫组化结果显示,40例肺腺癌组织中AHNAK2蛋白与Ki-67高表达患者分别为19例和29例,明显多于相对应癌旁组织的2例和1例($P<0.05$);且肿瘤组织中的MVD计数也明显高于对应的癌旁组织(31.10 ± 17.07 vs 8.15 ± 4.02 , $P<0.001$)(Table 1)。

2.2 肺腺癌组织中AHNAK2蛋白表达及MVD计数与临床病理特征的关系

118例肺腺癌患者组织中,AHNAK2高表达52例,低表达66例,肺腺癌组织中AHNAK2蛋白表达水平与肿瘤直径、淋巴结转移、TNM分期及Ki-67表达水平有关($P<0.05$);与患者年龄、性别、吸烟史、肿瘤位置、手术方式及肿瘤组织分化程度无关($P>0.05$)(Table 2)。肺腺癌组织中MVD计数与手术方式、肿瘤直径、淋巴结转移及TNM分期有关($P<0.05$),而与患者年龄、性别、吸烟史、肿瘤位置、肿瘤组织分



Notes: A: high expression of AHNAK2 in adenocarcinoma; B: low expression of AHNAK2 in adenocarcinoma; C: negative expression of AHNAK2 in adjacent tissue; D: high expression of Ki-67 in adenocarcinoma; E: low expression of Ki-67 in adenocarcinoma; F: negative expression of Ki-67 in adjacent tissue; G: positive expression of CD34 in adenocarcinoma; H: positive expression of CD34 in adjacent tissue

Figure 3 Expression of related proteins in cancer tissues and adjacent tissues (SP×200)

Table 1 Expression of AHNAK2 and Ki-67 in paired lung adenocarcinoma and adjacent tissue

Group	AHNAK2				Ki-67			
	Low	High	χ^2	P	Low	High	χ^2	P
Cancer group (n=40)	21	19	18.660	<0.001	11	29	41.813	<0.001
Adjacent group (n=40)	38	2			39	1		

化程度及 Ki-67 表达水平无关 ($P > 0.05$) (Table 2)。

2.3 肺腺癌组织中 AHNAK2 蛋白表达与 Ki-67 以及 MVD 计数的相关性

相关性分析显示, 118 例肺腺癌组织中 AHNAK2 蛋白表达水平与 Ki-67 表达水平呈正相关 ($V = 0.359, P < 0.05$) (Table 3), AHNAK2 蛋白表达与 MVD 计数也呈正相关 ($r_s = 0.304, P < 0.05$), AHNAK2 蛋白高表达的肺腺癌组织中微血管数量明显多于 AHNAK2 蛋白低表达组 (30.24 ± 13.12 vs 41.98 ± 19.49)。

2.4 影响肺腺癌患者生存时间的因素分析

118 例肺腺癌患者的中位生存时间为 57 个月, 1 年生存率为 92.4%, 3 年生存率为 63.4%, 5 年生存率为 45.3% (Figure 4)。通过 Kaplan-Meier 绘制患者的生存曲线, 并使用 Log-rank 检验对影响患者生存的因素进行分析, 结果显示肿瘤组织的分化程度、肿瘤直径、淋巴结转移、TNM 分期以及 AHNAK2 蛋白表达水平是影响患者生存的因素 ($P < 0.05$) (Table 4)。

AHNAK2 蛋白低表达组的 1 年生存率为 96.9%, 3 年生存率为 73.0%, 5 年生存率为 55.4%, AHNAK2 蛋白高表达组的 1 年生存率为 86.5%, 3 年生存率为 51.0%, 5 年生存率为 32.5%, AHNAK2 高低表达组间生存率差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (Figure 5)。

2.5 影响腺癌患者预后的单因素和多因素 Cox 回归分析

Cox 单因素分析结果显示肿瘤组织的分化程度、肿瘤直径、淋巴结转移、AHNAK2 蛋白表达水平及 TNM 分期是影响患者预后的危

Table 2 Relationship between the expression of AHNAK2 in lung adenocarcinoma and clinicopathological features

Feature	N	AHNAK2		MVD				
		Low (n=66)	High (n=52)	χ^2	P	$\bar{x}\pm s$	t	P
Age(years old)*								
<66	57	35	22	1.339	0.247	32.60±16.01	1.736	0.085
≥66	61	31	30			38.05±17.96		
Gender								
Male	65	38	27	0.376	0.540	34.34±17.44	0.752	0.454
Female	53	28	25			36.74±16.96		
Smoking								
Yes	41	26	15	1.427	0.232	34.59±18.37	0.381	0.704
No	77	40	37			35.86±16.64		
Tumor location								
Left	63	33	30	0.692	0.406	37.90±18.34	1.697	0.092
Right	55	33	22			32.56±15.45		
Surgical approach								
Subpulmonary lobectomy	78	45	33	0.289	0.591	38.10±18.27	2.420	0.017
Lobectomy	40	21	19			30.18±13.61		
Differentiation								
Low	32	17	15	0.140	0.708	33.00±18.63	0.930	0.354
Moderate,high	86	49	37			36.31±16.65		
Diameter(cm)								
<3	72	49	23	11.013	0.001	32.86±15.67	2.046	0.043
≥3	46	17	29			39.41±18.83		
Lymphatic metastasis								
Yes	42	18	24	4.523	0.033	40.07±16.83	2.224	0.028
No	76	48	28			32.84±16.95		
TNM staging								
I + II	88	56	32	8.335	0.004	33.36±16.58	2.259	0.026
III	30	10	20			41.43±17.81		
Ki-67								
Low	46	36	10	15.249	<0.001	33.22±15.03	1.111	0.269
High	72	30	42			36.82±18.41		

Note:*.The age group of patients is cut-off with a median age of 66 years old

Table 3 Correlation analysis of AHNAK2 and Ki-67 expression in lung adenocarcinoma

Ki-67	AHNAK2		All (n=118)	V	P
	Low	High			
Low	36	10	46	0.359	<0.001
High	30	42	72		

险因素(Table 5)。将Cox单因素分析中P<0.05的因素纳入多因素Cox风险比例回归模型进行分析,结果提示AHNAK2高表达(HR=1.855,95%CI:1.092~3.149,P<0.05)和TNM分期(HR=2.802,95%CI:1.639~4.790,P<0.05)是影响患者生存的独立危险因素(Table 6)。

3 讨论

AHNAK2 蛋白是 AHNAK 家族的成员之一,也称为 C14orf78,最初发现于小鼠心肌细胞,基因位于人类染色体 14q32 上^[9]。Yang 等^[10]通过 GEO 数据库分析发现在胰腺癌中 AHNAK2 基因是区分胰腺良恶性肿瘤的差异性基因,并且 AHNAK2 高表达与患者预后不良相关。Lu 等^[11]通过对胰腺导管癌组织进行免疫组化实验发现,AHNAK2 主要位于上皮癌细胞的细胞质和细胞膜中,与癌旁组织相比,胰腺导管癌组织中 AHNAK2 明显过表达,并且其高表达与患者预后不良相关。Koguchi 等^[12]通过对正常尿路上皮和膀胱癌组织进行免疫组化实验发现,在正常尿路上皮细胞中几乎没有 AHNAK2 蛋白的表达,

而在膀胱癌组织中可以观察到 AHNAK2 蛋白明显过表达,且生存分析发现 AHNAK2 高表达与患者预后不良相关。本研究通过对肺腺癌组织与癌旁组织进行免疫组化实验发现,在癌旁组织中 AHNAK2 蛋白表达较低,而在肺腺癌组织中 AHNAK2 蛋白明显过表达;本研究还通过 Western blot 蛋白印迹实验检测了新鲜肺癌组织及其相对应的癌旁组织中 AHNAK2 蛋白的相对表达情况,发现在癌旁组织中 AHNAK2 蛋白表达较肿瘤组织中明显减少,提示 AHNAK2 蛋白的表达可能参与了肿瘤进展。Wang 等^[13]研究发现,在肾透明细胞癌细胞系中 AHNAK2

Table 4 Analysis of single factors affecting the prognosis of patients with lung adenocarcinoma

Index	N	Median survival (months)	Cumulative survival(%)			χ^2	P
			1-year	3-year	5-year		
Age(years old)							
<66	57	57	94.7	63.8	49.8	0.783	0.376
≥66	61	55	90.1	63.1	39.0		
Gender							
Male	65	55	92.3	66.0	43.6	0.013	0.910
Female	53	57	92.4	59.9	48.3		
Smoking							
Yes	41	46	95.1	68.7	41.5	0.192	0.661
No	77	57	90.9	60.5	47.9		
Tumor location							
Left	63	55	95.2	69.4	44.7	0.008	0.928
Right	55	57	89.1	56.6	46.7		
Surgical approach							
Subpulmonary lobectomy	78	55	91.0	62.1	41.3	0.556	0.456
Lobectomy	40	67	95.0	65.7	53.3		
Differentiation							
Low	32	37	87.5	50.4	27.1	4.311	0.038
Moderate,high	86	67	94.2	68.1	51.6		
Diameter(cm)							
<3	72	67	97.2	69.5	54.6	6.444	0.011
≥3	46	37	84.8	53.6	30.9		
Lymphatic metastasis							
Yes	42	37	85.7	51.2	34.9	7.671	0.006
No	76	67	96.0	70.2	50.9		
TNM staging							
I + II	88	27	95.4	73.3	52.8	17.138	<0.001
III	30	67	83.3	35.1	23.4		
AHNAK2							
Low	66	70	96.9	73.0	55.4	6.605	0.010
High	52	43	86.5	51.0	32.5		
Ki-67							
Low	46	67	91.2	67.1	57.1	1.678	0.195
High	72	47	93.1	61.1	37.8		

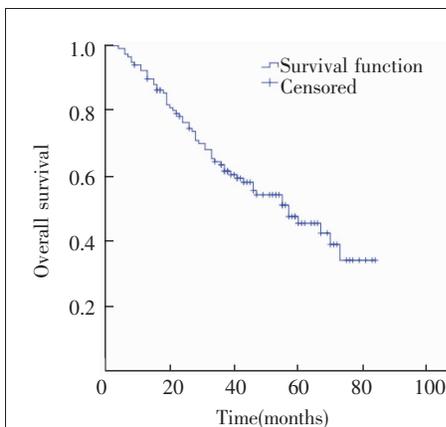


Figure 4 The OS curve of lung adenocarcinoma patients

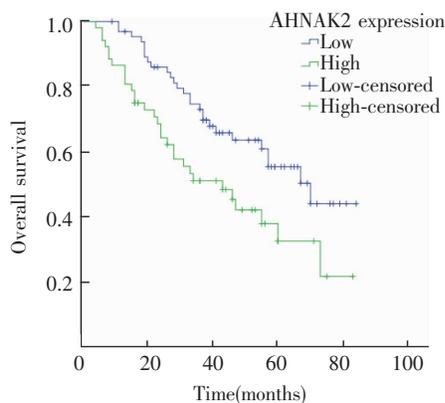


Figure 5 Relationship of AHNAK2 expression with OS

蛋白表达明显上调,且 AHNAK2 高表达与患者不良预后有关,通过敲低肾透明细胞癌细胞中的 AHNAK2 蛋白,发现敲低 AHNAK2 蛋白的肿瘤组织体积与对照组相比明显减小,提示 AHNAK2 蛋白参与了肿瘤的生长。本研究发现肺腺癌组织中 AHNAK2 表达水平与肿瘤直径相关,AHNAK2 蛋白高表达组肿瘤直径 ≥3 cm 的患者比例明显多于低表达组,同时,AHNAK2 蛋白高表达组 Ki-67 高表达患者比例也较低表达组高。相关性分析提示 AHNAK2 蛋白表达与 Ki-67 表达呈正相关 ($V=0.359, P<0.05$),提示在肺腺癌中 AHNAK2 蛋白表达可能参与肿瘤的增殖与生长。

AHNAK2 蛋白是成纤维细胞生长因子-1(fibroblast growth factor 1,FGF-1)非经典输出途径的重要组成部分,细胞应激时 FGF-1 与 ANHAK2 蛋白在细胞膜附近的 F-肌动蛋白共同定位,同时细胞中 ANHAK2 蛋白的消耗会导致 FGF-1 输

Table 5 Univariate analysis of Cox affecting the prognosis of lung adenocarcinoma

Index	B	SE	Wald	P	HR(95%CI)
Differentiation(low)	0.284	0.140	4.147	0.042	1.329(1.011~1.747)
Diameter(≥3 cm)	0.658	0.265	6.141	0.013	1.931(1.147~3.249)
Lymphatic metastasis	0.725	0.269	7.255	0.007	2.065(1.218~3.501)
AHNAK2 high expression	0.669	0.267	6.291	0.012	1.952(1.157~3.291)
TNM stage	1.068	0.272	15.444	<0.001	2.910(1.708~4.957)

Table 6 Multivariate analysis of Cox affecting the prognosis of lung adenocarcinoma

Index	B	SE	Wald	P	HR(95%CI)
AHNAK2 high expression	0.618	0.270	5.231	0.022	1.855(1.092~3.149)
TNM stage	1.030	0.274	14.192	<0.001	2.802(1.639~4.790)

出的急剧减少^[14]。近年研究发现 FGF-1 在癌症中是血管生成、新血管形成的促进剂,FGF-1 的激活可上调内皮细胞中的细胞间黏附分子-1 和血管细胞黏附分子-1 的表达,具有强大的血管生成活性^[15-16]。Li 等^[17]在研究黑色素瘤时发现,敲低癌细胞的 AHNAK2 蛋白表达,会抑制细胞的增殖、迁移与侵袭,同时还抑制了 PI3K/AKT 信号通路的激活。研究表明激活的 PI3K/AKT 信号通路可通过上调缺氧诱导因子-1 来增加血管内皮生长因子的分泌促进血管生成,同时还可以通过调节一氧化氮和血管生成素的表达水平来参与调解血管生成^[18-19]。提示 AHNAK2 蛋白的表达可能与血管生成之间存在联系,本研究发现 AHNAK2 蛋白表达水平与 MVD 计数相关,AHNAK2 蛋白高表达组的 MVD 计数明显多于低表达组,相关性分析显示两者呈正相关 ($r_s=0.304, P<0.05$),提示 AHNAK2 蛋白的表达可能参与了肿瘤新生血管的形成,而在肿瘤中新血管的形成成为肿瘤输送营养、代谢废物,促进肿瘤的生长及转移,另一方面也间接反映了 AHNAK2 蛋白参与了肿瘤生长^[20]。Liu 等^[21]通过沉默肺癌细胞中 AHNAK2 的表达发现,AHNAK2 蛋白的下调会通过抑制 TGF-β/Smad3 通路的活性抑制肺癌细胞的迁移、侵袭和上皮间充质转化。Wang 等^[22]通过肺癌细胞系实验发现,当下调 AHNAK2 蛋白活性时 MAPK/ERK 信号通路的活性受到了抑制,并且细胞的迁移和侵袭能力均下降,而细胞的凋亡能力明显增强。本研究发现 AHNAK2 表达水平与淋巴转移及 TNM 分期有关,提示在肺腺癌中 AHNAK2 蛋白的表达可能参与了肿瘤细胞的迁移与进展,与既往研究结果一致。生存分析显示,肺腺癌中 AHNAK2 蛋白高表达与患者预

后不良有关。多因素分析结果显示 AHNAK2 蛋白高表达是影响患者预后的独立危险因素。

本研究是单中心研究并且样本量较小存在一定局限性,可能造成结果存在一定的偏倚,未来仍需大样本多中心的相关生物分子机制的进一步研究。

综上,本研究发现 AHNAK2 蛋白在肺腺癌组织中高表达,与 Ki-67 及 MVD 计数呈正相关性,提示 AHNAK2 蛋白可能参与了肿瘤生长及血管生成,并且 AHNAK2 蛋白高表达是影响患者预后的独立危险因素并提示不良预后,因此,AHNAK2 蛋白可能可以作为一个提示患者预后不良的参考因素,以及作为一个潜在的靶基因因为肺腺癌患者的诊治提供新思路。

参考文献:

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249.
- [2] Tsimberidou AM, Fountzilias E, Nikanjam M, et al. Review of precision cancer medicine: evolution of the treatment paradigm[J]. Cancer Treat Rev, 2020, 86:102019.
- [3] Kim MJ, Sun HJ, Song YS, et al. CXCL16 positively correlated with M2-macrophage infiltration, enhanced angiogenesis, and poor prognosis in thyroid cancer[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):13288.
- [4] Witzke KE, Groberueschkamp F, Jütte H, et al. Integrated fourier transform infrared imaging and proteomics for identification of a candidate histochemical biomarker in bladder cancer[J]. Am J Pathol, 2019, 189(3):619-631.
- [5] Zhou YY, Kang YT, Chen C, et al. Combination of TNM staging and pathway based risk score models in patients with gastric cancer[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(4):3608-3617.
- [6] Pang Z, Wang Y, Ding N, et al. High PKD2 predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma via promoting epithelial-mesenchymal transition[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):1324.
- [7] Yang J, Ramnath N, Moysich KB, et al. Prognostic significance of MCM2, Ki-67 and gelsolin in non-small cell lung

- cancer[J]. BMC Cancer, 2006, 6: 203.
- [8] Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 1992, 84(24): 1875–1887.
- [9] Komuro A, Masuda Y, Kobayashi K, et al. The AHNAKs are a class of giant propeller-like proteins that associate with calcium channel proteins of cardiomyocytes and other cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(12): 4053–4058.
- [10] Yang ZQ, Liu YJ, Zhou XL. An integrated microarray analysis reveals significant diagnostic and prognostic biomarkers in pancreatic cancer[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e921769.
- [11] Lu D, Wang J, Shi X, et al. AHNAK2 is a potential prognostic biomarker in patients with PDAC[J]. Oncotarget, 2017, 8(19): 31775–31784.
- [12] Koguchi D, Matsumoto K, Shimizu Y, et al. Prognostic impact of AHNAK2 expression in patients treated with radical cystectomy[J]. Cancers(Basel), 2021, 13(8): 1748.
- [13] Wang M, Li X, Zhang J, et al. AHNAK2 is a novel prognostic marker and oncogenic protein for clear cell renal cell carcinoma[J]. Theranostics, 2017, 7(5): 1100–1113.
- [14] Kirov A, Kacer D, Conley BA, et al. AHNAK2 participates in the stress-induced nonclassical FGF1 secretion pathway [J]. J Cell Biochem, 2015, 116(8): 1522–1531.
- [15] Presta M, Dell’Era P, Mitola S, et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16(2): 159–178.
- [16] Mori S, Tran V, Nishikawa K, et al. A dominant-negative FGF1 mutant (the R50E mutant) suppresses tumorigenesis and angiogenesis[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57927.
- [17] Li M, Liu Y, Meng Y, et al. AHNAK nucleoprotein 2 performs a promoting role in the proliferation and migration of uveal melanoma cells[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2019, 34(10): 626–633.
- [18] Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics[J]. Cancer Res, 2000, 60(6): 1541–1545.
- [19] Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis[J]. Front Mol Neurosci, 2011, 4: 51.
- [20] Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis[J]. Semin Oncol, 2002, 29(6 Suppl 16): 15–18.
- [21] Liu G, Guo Z, Zhang Q, et al. AHNAK2 promotes migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells via the TGF- β /Smad3 pathway [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 12893–12903.
- [22] Wang DW, Zheng HZ, Cha N, et al. Down-regulation of AHNAK2 inhibits cell proliferation, migration and invasion through inactivating the MAPK pathway in lung adenocarcinoma [J]. Technol Cancer Res Treat, 2020, 19: 1533033820957006.

《肿瘤学杂志》作者/通信作者校对文稿须知

作者/通信作者自拟发排校样稿,是期刊出版工作中不可缺少的重要环节,也是确保期刊质量的重要手段。特此重申,请作者/通信作者务必按以下要求进行校对:

(1)首先全面校对全文,对编辑提出的校样稿中需特别注意校对及需补充的内容,必须予以改正或解释。

(2)所有需修改和补充的内容,均请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范的汉字);必须改动的字符,直接在校样稿的空白处写出,所增删字数最好相符。

(3)文题、作者、单位名称、邮政编码、通信作者等信息,务必确认无误。

(4)对正文文字(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等应认真细致逐一校对;请用规范的通用药品名称(不用商品名)和医学名词,认真核查并使用标准计量单位及药物剂量。

(5)参考文献缺项的部分,应按本刊规定的著录格式进行补充。请作者务必认真核实所引用文献是否正确,并核查正文中角码是否与文后所列参考文献序号对应。

(6)校对完毕请作者/通信作者签名,并在规定的日期内将校样稿寄回编辑部。如有要求补充的资料,也需一并寄回。

(7)由于出版周期的限制,如作者/通信作者不能在规定时间内校对寄回,请及时联系本刊编辑部说明原因,否则可能造成该文稿延期出版,或者取消刊发。