

ANXA1 在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义

营晓梅¹ 陈亮¹ 吴晴晴² 曹立宇² 余宏铸¹

摘要 目的 研究膜联蛋白 A1(ANXA1)在甲状腺乳头状癌(PTC)中的表达及其临床意义,探讨 ANXA1 的表达在 PTC 发生发展中的作用及其分子机制。方法 在 TCGA 公开数据库中,查询并获取甲状腺癌及癌旁正常组织中 ANXA1 表达的相关数据,探究两者之间 ANXA1 的表达情况,分析 ANXA1 在甲状腺癌中的表达与患者总生存期的关系;收集石蜡切片,其中包括 PTC、结节性甲状腺肿(NG)及癌旁正常甲状腺组织(NT),利用免疫组织化学染色的方法,检验 ANXA1 蛋白在三者之间的表达情况;收集上述 3 种组织的新鲜标本,应用 qRT-PCR 分析 ANXA1 mRNA 在其三者之间的表达差异,并分析 ANXA1 的表达水平与临床病理特征的相关性。结果 通过数据库分析,ANXA1 在甲状腺癌中的表达高于 NT 的表达($P < 0.05$),且 ANXA1 表达水平与甲状腺癌患者的总生存期存在关联($P < 0.05$);在收集到的石蜡标本和新鲜组织中,相对于甲状腺正常组织及 NG,ANXA1 蛋白在 PTC 中呈现高表达水平,而 mRNA 呈现低表达水平,临床数据分析结果提示,ANXA1 与 PTC 部位、直径及淋巴结转移有关($P < 0.05$),与性别、年龄、临床分期均无关。结论 ANXA1 的表达与 PTC 存在密切联系,在以后的研究中可能作为潜在的临床诊断或预后的指标。

关键词 甲状腺乳头状癌; ANXA1; 结节性甲状腺肿; 甲状腺癌; TCGA

中图分类号 R 736.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1987-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.026

甲状腺癌是内分泌系统中常见肿瘤,占甲状腺结节的 5%~10%^[1]。甲状腺癌约 80%~85% 的病理类型是甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC),10 年生存率可达 90% 以上^[2-3]。但有些特殊类型的 PTC,具有明显的侵袭性及转移性。因此,PTC 发病机制的深入研究以及寻找潜在的靶标对临床诊断具有重要的指导意义。

膜联蛋白 A1(annexin-A1, ANXA1)是与细胞

膜上的磷脂结合的一类蛋白质,包含 N 末端、C 末端,其中 C 端高度保守,基本不参与细胞相关活动,而 N 端参与多种组织的生理病理过程^[4],从而影响细胞增殖、凋亡、转移和侵袭等过程^[5]。目前关于 ANXA1 与 PTC 的联系鲜有报道,为了更好的了解和检测 PTC 发生的分子机制,该研究验证 ANXA1 在 PTC 中表达,并比较其临床病理特征,探讨 ANXA1 是否可以成为 PTC 潜在生物标志物及预后指标。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 收集安徽医科大学附属阜阳医院 2019 年 1 月—2020 年 3 月石蜡组织标本,其中 56 例 PTC、26 例 NT、33 例 NG;并收集甲状腺结节组织和邻近的甲状腺正常组织或对侧甲状腺腺叶组织,在手术室中切除后用液氮进行速冻,在病理学的诊断下,确诊为 PTC、NT、NG;剩余组织放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存。该研究由安徽医科大学附属阜阳医院伦理委员会授权。上述所有患者均已签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂 ANXA1 抗体(ab214486)购自英国 Abcam 公司;DAB 染色液(增强聚合物法)试剂盒、EDTA 抗原修复液、PBS 缓冲液均购自福州迈新有限公司;TRIzol 购自上海 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒(RR047A)和 qRT-PCR 试剂盒(RR0820)购自北京宝日医生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 从 TCGA 数据库中,对获得的 58 例正常甲状腺组织(normal thyroid, NT)和 508 例甲状腺癌组织数据,进行 ANXA1 的差异表达分析;并对其中配对的 58 例 NT 与甲状腺癌组织进行比较;对获得的数据进行进一步分析,获得 ANXA1 的表达与患者总生存期的关系。

1.2.2 免疫组化 将收集的石蜡标本,制成 $3\text{ }\mu\text{m}$ 厚度切片,烤干后,二甲苯脱蜡,乙醇脱水, PBS 缓冲液冲洗, EDTA 修复抗原,按照 DAB 染色液(增强聚合物法)试剂盒说明书,依次添加过氧化物酶阻断

2021-09-08 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1808085MH283)

作者单位:安徽医科大学附属阜阳医院¹ 普外科、² 病理科,阜阳 236000

作者简介:营晓梅,女,硕士研究生;

余宏铸,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: hongzhu.620929@aliyun.com

剂、ANXA1 一抗(工作浓度 1 : 28 000)、反应增强液、酶标抗小鼠/兔 IgG 聚合物、DAB 显色、复染、二甲苯透明、封片。最后的成片,分别由 3 位病理科医师采用双盲法进行相应读片,记录读片结果。

1.2.3 免疫组化结果判读 免疫组化观察标准为染色强度与阳性细胞百分比的乘积,染色深浅:明显没有染色为 0 分,浅黄色 1 分,黄棕色 2 分,棕褐色 3 分。阳性细胞百分比 ≤5% 记为 0 分, ≤25% 记为 1 分, ≤50% 为 2 分, ≤75% 为 3 分, 75% 以上可记为 4 分。染色强度与阳性细胞百分比所得的数值相乘 < 4 分为低表达,分值 ≥4 分为高表达^[6]。

1.2.4 qRT-PCR 法检测 对收集到的 PTC、NT 及 NG 组织按照 TRIzol 试剂说明提取总 RNA,并进行浓度测定,再根据逆转录试剂盒的使用说明获得 cDNA,PCR 扩增的条件为第一步预变性 95 °C、5 min,第二步循环 40 次 95 °C、15 s 60 °C、31 s,GAPDH 作为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算上述 3 组中 ANXA1 mRNA 的相对表达量。Human-ANXA1 的引物 (F: 5'-TGTGAAGTCATCCAAAGGTGG-3'; R: 5'-GCTGTGCATTGTTTCGCTTA-3'); Human-GAPDH 引物 (F: 5'-ACTTTGGTATCGTGGGAAGGAC-3'; R: 5'-ACTAGAGGCAGGGATGATGTT-3')

1.3 统计学处理 应用 SPSS 23.0 软件对 NT、结节性甲状腺肿(nodular goiter ,NG) 和 PTC 中免疫组化结果进行 χ² 检验,对 ANXA1 mRNA 的表达结果应用方差分析,对 ANXA1 与临床病理参数分析应用 χ² 检验 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲状腺癌中 ANXA1 的表达情况 在 TCGA 网站下载的数据信息中,包含了 58 例 NT 和 508 例甲状腺癌组织,ANXA1 在甲状腺癌中呈现高表达 (P < 0.05),见图 1。其中配对的 58 例癌旁 NT 与甲状腺癌组织中 ANXA1 在甲状腺癌中呈现高表达 (P < 0.05),见图 2。对 ANXA1 的表达与患者总生存期的数据进行相应分析后,结果显示 ANXA1 低表达患者的预后更差 [HR = 0.09 (0.02 ~ 0.38) ,P < 0.05],见图 3。

2.2 ANXA1 蛋白在组织中表达情况 免疫组织化学染色结果显示,ANXA1 在 PTC 中主要定位于细胞质和(或)细胞核,相比于另两组,ANXA1 蛋白在 PTC 中呈现高表达,见图 4。比较三者阳性百分率,差异有统计学意义(χ² = 54.336 ,P < 0.01),见表 1。ANXA1 蛋白在 PTC 组中为 0.910 7,分别高

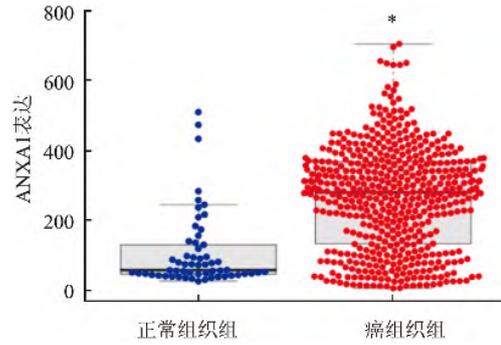


图 1 TCGA 数据库中 ANXA1 在甲状腺癌中表达情况与正常组织组比较: * P < 0.05

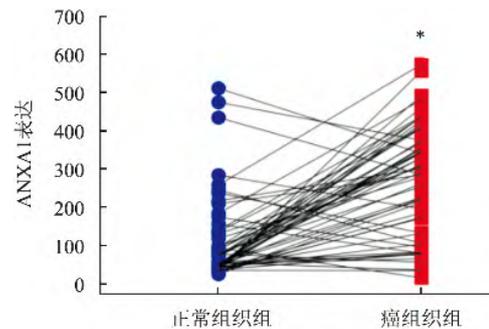


图 2 TCGA 数据库中 58 例配对甲状腺正常组织与甲状腺癌中 ANXA1 的表达情况与正常组织组比较: * P < 0.05

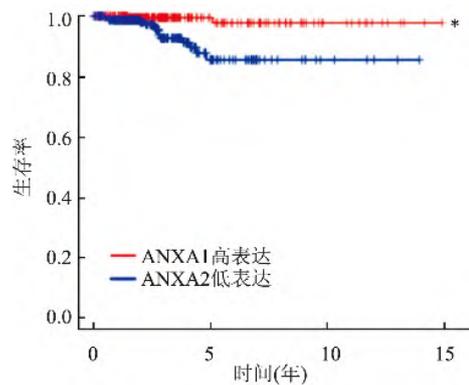


图 3 TCGA 数据中 ANXA1 表达与甲状腺癌患者生存期关系与 ANXA1 低表达组比较: * P < 0.05

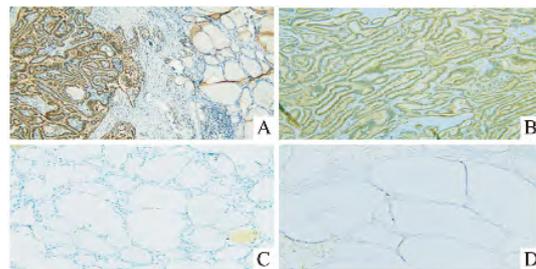


图 4 ANXA1 在 PTC、NG、NT 中的表达情况

A: ANXA1 在 NT 与 PTC 组织中分别呈现低表达和高表达 × 40; B: ANXA1 在 PTC 中的表达情况 × 100; C: ANXA1 在 NT 的表达情况 × 100; D: ANXA1 在 NG 的表达情况 × 100

表1 不同甲状腺组织中 ANXA1 的表达情况 [n(%)]

组别	n	ANXA1		P 值
		阴性	阳性	
NT	26	22(84. 62)	4(15. 38)	$P > 0. 05$
NG	33	23(69. 70)	10(30. 30)	$P < 0. 01$
PTC	56	5(8. 93)	51(91. 07)	$P < 0. 01$

于癌旁正常组织 0. 153 8 ($\chi^2 = 46. 056, P < 0. 01$) 和 NG 组 0. 303 0 ($\chi^2 = 35. 560, P < 0. 01$) 。 NT 和 NG 阳性率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1. 788, P = 0. 181$) 。

2.3 ANXA1 mRNA 在 PTC 中相对表达情况 应用 qRT-PCR 比较上述 3 组 ANXA1 mRNA 的相对表达量,结果显示 ANXA1 mRNA 在三者比较中差异有统计学意义 ($F = 8. 315, P < 0. 05$) ,且相比于 NT 组 ANXA1 mRNA 在 PTC 中相对低表达,差异有统计学意义 ($P < 0. 05$) ,NG 组未见明显差异,见图 5。

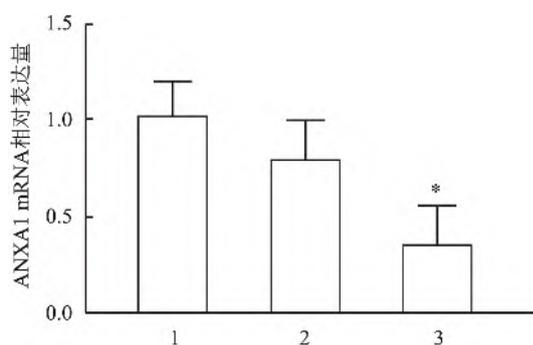


图5 ANXA1 mRNA 在 NT、NG、PTC 中相对表达情况

1: NT 组; 2: NG 组; 3: PTC 组; 与 NT 组比较: * $P < 0. 05$

2.4 ANXA1 在 PTC 中的表达与临床病理信息的关系 整理实验中 PTC 患者的临床病理信息,得出 ANXA1 与 PTC 患者的性别、年龄及临床分期差异无统计学意义,与肿瘤部位、直径、淋巴结转移差异有统计学意义 ($P < 0. 05$) ,见表 2。

3 讨论

从 TCGA 官网中获得 58 例 NT 和 508 例甲状腺癌的数据信息,分析 ANXA1 在两者中的表达情况,结果显示 ANXA1 在甲状腺癌中的表达高于 NT; 其中配对的 58 例样本中,结果同样如前所述; 对 ANXA1 的表达水平与甲状腺癌患者总生存期的相关数据进行分析,结果提示 ANXA1 高表达患者的生存期长于低表达患者的生存期。因此,ANXA1 表达可能与甲状腺恶性肿瘤诊断及临床预后相关。甲状腺恶性肿瘤的发病率逐年上升。其中,PTC 又

表2 ANXA1 表达与 PTC 临床病理学特征的相关性 (n)

项目	n	ANXA1 表达		χ^2 值	P 值
		高表达	低表达		
性别				1. 44	0. 230
男	11	9	2		
女	45	42	3		
年龄(岁)				0. 86	0. 355
< 45	22	21	1		
≥ 45	34	30	4		
肿瘤部位				4. 85	0. 028
单侧	44	42	2		
双侧	12	9	3		
肿瘤直径(cm)				4. 17	0. 041
≤ 1	43	41	2		
> 1	13	10	3		
淋巴结转移				5. 67	0. 017
无	45	43	2		
有	11	8	3		
临床分期					1. 000 ^a
I + II	49	44	5		
III + IV	7	7	0		

^a 表示采用 Fisher 确切概率法检验

是甲状腺癌中最多见的一种分型。为进一步研究 PTC 与 ANXA1 的相关情况,从安徽医科大学附属阜阳医院收集 NT、NG、PTC 3 种组织的石蜡标本及新鲜组织样本分别应用免疫组织化学染色和 qRT-PCR 技术,在 ANXA1 蛋白、mRNA 水平进行相关验证,结果显示,相较于另两组组织,ANXA1 蛋白在 PTC 中呈高表达水平,ANXA1 mRNA 水平相较于另两组表达量呈下降趋势;在此基础上进行 PTC 患者临床病理特征与 ANXA1 的相关性研究,结果显示 ANXA1 的表达与患者的性别、年龄、临床分期无关,与其肿瘤部位、直径、淋巴结转移有关。

ANXA1 是一种磷脂结合蛋白,其特有的生理结构使得 ANXA1 在炎症与肿瘤中发挥不一样的作用。在炎症中,ANXA1 可以通过与 FPR2/ALX 结合,诱导中性粒细胞和单核细胞凋亡并抑制炎症细胞聚集,从而起到抗炎的作用^[7]。在肿瘤中,ANXA1 的表达呈现上调或下调趋势,如在胰腺癌^[8]、胃癌^[9]、肺腺癌^[10]中的 ANXA1 表达上调;而在食管鳞癌^[11]、前列腺癌^[12]中呈现低表达,因此,ANXA1 可以被用于疾病诊断或成为预后标志物。在 ANXA1 相关机制的研究报道中,有些报道显示了 ANXA1 在食管鳞状细胞癌^[13]、胰腺癌^[14]中,增强细胞增殖、迁移和侵袭能力;而在胰腺导管腺癌^[15]中,ANXA1 降低细胞增殖并诱导癌细胞生长停滞。因此,ANXA1 在不同肿瘤中有不同的表达且其相关机制具有肿瘤特异性,可以作为潜在肿瘤标

志物及预后指标。

参考文献

- [1] 马秀梅,那日苏,王芳,等. 甲状腺乳头状癌及相关病变 Jab1、Skp2 和 p27 蛋白的表达及意义[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(1): 124-9.
- [2] Cabanillas M E, McFadden D G, Durante C. Thyroid cancer[J]. *Lancet*, 2016, 388(10061): 2783-95.
- [3] Harari A, Singh R K. Increased rates of advanced thyroid cancer in California[J]. *J Surg Res* 2016, 201(1): 244-52.
- [4] Jia C, Kong D, Guo Y, et al. Enhanced antitumor effect of combination of annexin A1 knockdown and bortezomib treatment in multiple myeloma *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(3): 720-5.
- [5] 胡荣华,朱莉,李诗,等. ANXA1 的肿瘤特性研究[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 127-31.
- [6] 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): 229-31.
- [7] Ding Y, Flores J, Klebe D, et al. Annexin A1 attenuates neuroinflammation through FPR2/p38/COX-2 pathway after intracerebral hemorrhage in male mice [J]. *J Neurosci Res*, 2020, 98(1): 168-78.
- [8] Novizio N, Belvedere R, Pessolano E, et al. Annexin A1 released in extracellular vesicles by pancreatic cancer cells activates components of the tumor microenvironment, through interaction with the formyl-peptide receptors [J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2719.
- [9] Takaoka R, Sertorio N D, Magalini L, et al. Expression profiles of annexin A1, formylated peptide receptors and cyclooxygenase-2 in gastroesophageal inflammations and neoplasias [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(2): 181-6.
- [10] Allen K L, Cann J, Zhao W, et al. Upregulation of annexin A1 protein expression in the intratumoral vasculature of human non-small-cell lung carcinoma and rodent tumor models [J]. *PLoS One*, 2020, 15(6): e234268.
- [11] Han G H, Lu K J, Huang J X, et al. Association of serum annexin A1 with treatment response and prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(Supplement): S667-74.
- [12] Bizzarro V, Belvedere R, Migliaro V, et al. Hypoxia regulates ANXA1 expression to support prostate cancer cell invasion and aggressiveness [J]. *Cell Adh Migr*, 2017, 11(3): 247-60.
- [13] Han G, Lu K, Huang J, et al. Effect of annexin A1 gene on the proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells and its regulatory mechanisms [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(2): 357-63.
- [14] Belvedere R, Bizzarro V, Forte G, et al. Annexin A1 contributes to pancreatic cancer cell phenotype, behaviour and metastatic potential independently of formyl peptide receptor pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 29660.
- [15] Wan Y, Tian J, Qi L, et al. ANXA1 affects cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5): 5214-8.

Expression and clinical significance of ANXA1 in papillary thyroid carcinoma

Ying Xiaomei¹, Chen Liang¹, Wu Qingqing², et al

(¹Dept of General Surgery, ²Dept of Pathology, The Affiliated Fuyang Hospital of Anhui Medical University, Fuyang 236000)

Abstract Objective To study the expression and clinical significance of annexin A1 (ANXA1) in papillary thyroid carcinoma (PTC) and explore the role of ANXA1 in the development of PTC and its relative molecular mechanism. **Methods** From the TCGA public database, the relevant data of ANXA1 expression was obtained and analyzed in thyroid cancer and adjacent normal tissues, and explored the relationship between the ANXA1 expression and the patient's overall survival; then the paraffin sections were collected which contained PTC, nodular goiter (NG), and normal thyroid tissue (NT), and the expression of ANXA1 protein were detected by immunohistochemical method; the fresh tissues were collected and ANXA1 mRNA was checked by the way of qRT-PCR; then the relationship between the expression level of ANXA1 and clinicopathological characteristics was studied. **Results** Through database analysis, the expression of ANXA1 in thyroid cancer was more prominent than that in NT ($P < 0.05$), and the expression level of ANXA1 was associated with the survival of patients ($P < 0.05$); ANXA1 protein had a higher level in the paraffin sections of PTC, which compared with NT and NG; and ANXA1 mRNA was lower than them. The results of clinical data analysis showed that ANXA1 was related to the location, diameter and lymph node metastasis ($P < 0.05$), but had nothing with the patient's age, gender and clinical stage. **Conclusion**

ANXA1 has a closed relationship with PTC, which is essential to potential diagnostic and prognostic indicators.

Key words papillary thyroid carcinoma; ANXA1; nodular goiter; thyroid cancer; TCGA