

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201302002

· 论著 ·

膜联蛋白 A5 在喉癌组织中的表达及临床意义

赵锐¹, 李金穗², 陈果³, 邓世山⁴, 杨正伟⁴, 敬保迁³, 刘海¹

(川北医学院第一附属医院1. 耳鼻咽喉科; 2. 普外科, 四川南充 637000; 3. 川北医学院免疫学与分子生物学研究所, 四川南充 637000; 4. 川北医学院形态学研究所, 四川南充 637000)

摘要: **目的** 通过观察膜联蛋白 A5 (annexin A5, ANXA5) 在喉癌组织中的表达, 探讨 ANXA5 在喉癌中的作用。**方法** 采用免疫组化 SP 法及 RT-PCR 法检测 53 例不同临床分期、病理学分级及颈部淋巴结转移的喉癌组织与 25 例癌旁组织标本中 ANXA5 及其基因的表达情况。**结果** 喉癌组织中 ANXA5 水平高于癌旁组织中 ANXA5 的水平 ($P < 0.05$); ANXA5 的表达与临床分期、病理学分级及颈部淋巴结转移密切相关 ($P < 0.05$), 与患者年龄、性别及临床分型无关 ($P > 0.05$)。**结论** ANXA5 可能在喉癌的发生、发展中发挥重要作用。

关键词: 膜联蛋白 A5; 喉癌; 浸润和转移

中图分类号: R739.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-1520(2013)02-0098-04

Expression of annexin A5 in human laryngeal carcinoma and its clinical significance

ZHAO Rui, LI Jin-sui, CHEN Guo, et al.

(Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

Abstract: **Objective** To study the role of annexin A5 (ANXA5) in laryngeal carcinoma via detecting the expression of ANXA5 in human laryngeal carcinoma tissue. **Methods** Protein and gene expression of ANXA5 was detected with immunohistochemical technique and RT-PCR. 53 specimens of laryngeal carcinoma and 25 of adjacent normal tissues from laryngeal carcinoma patients with various clinical stages and pathologic classification. **Results** Over-expression of gene and protein of ANXA5 was observed in human laryngeal carcinoma tissues ($P < 0.05$), and the expression levels of ANXA5 were closely associated with the clinical stages, pathologic classification and cervical lymphatic metastasis of laryngeal carcinoma ($P < 0.05$) and irrelevant with patients' age, gender and clinical classification ($P > 0.05$). **Conclusions** ANXA5 may play an important role in the occurrence and development of human laryngeal carcinoma.

Key words: ANXA5; Laryngeal carcinoma; Invasion and metastasis

喉癌是来源于喉黏膜上皮组织的恶性肿瘤, 最常见的是喉鳞状细胞癌。喉癌发病率约占全身肿瘤的 1% ~ 5%, 在耳鼻咽喉科领域中仅次于鼻咽癌和鼻腔鼻窦癌, 居第 3 位。近年来, 其发病率有明显增长趋势, 但其病因机制尚未明了^[1]。喉癌的死亡原因主要是因为其早期转移、手术复发及放化疗的失败, 其中早期转移是其最主要的因素之一。ANX 家族目

前被认为与恶性肿瘤的转移有密切关系^[2]。本研究应用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术检测喉癌组织中 ANXA5 mRNA 的表达, 并应用免疫组化方法检测其蛋白水平的表达, 探讨 ANXA5 与喉癌转移之间的关系。

1 资料和方法

1.1 标本来源

收集 2008 ~ 2011 年川北医学院第一附属医院耳鼻咽喉科手术切除喉癌组织 53 例和癌

作者简介: 赵锐, 男, 硕士研究生。
通讯作者: 刘海, Email: liuhai100@sina.com.

旁组织 25 例。53 例喉癌组织中男 48 例,女 5 例;年龄 38 ~ 70 岁,平均年龄 68 岁。根据 2002 年国际抗癌联盟 (UICC) 修订标准按临床分型分为声门上型 (16 例)、声门型 (30 例) 与声门下型 (7 例);按临床分期分为 I、II 期 (21 例) 与 III、IV 期 (32 例);按组织病理学分级为高分化鳞癌 (27 例)、中分化鳞癌 (19 例) 与低分化鳞癌 (7 例);有淋巴结转移 17 例,无淋巴结转移 36 例。标本均一式两份,一份送病检,一份置液氮罐编号保存备用。

1.2 主要仪器及主要试剂

SP 试剂盒, DAB 显色试剂盒 (中杉金桥生物技术有限公司, 中国北京), 兔抗人 ANXA5 多克隆抗体 (博士德, 中国武汉), Trizol 试剂盒, RT-PCR 试剂盒 (Takara 生物工程有限公司, 中国大连), PCR 仪, 凝胶成像及分析系统 (Bio-Rad, 美国)。

1.3 实验方法

采用免疫组化 SP 法, 操作步骤: 常规切片脱蜡和水化, 3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性 10 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次, 柠檬酸缓冲液 (0.01 mol/L, pH = 6.0) 高温抗原修复 20 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次; 山羊血清封闭非特异性抗体, 室温孵育 20 min; 滴加一抗 (浓度 1:50), 4℃ 过夜, 孵箱 37℃ 复温 40 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次; 滴加生物素标记二抗, 孵箱 37℃ 孵育 60 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次; 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 孵箱 37℃ 孵育 60 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次; DAB 显色, 自来水冲洗, 苏木素复染, 中性树脂封片。用以知的阳性喉鳞癌组织切片作为阳性对照, 用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

RT-PCR 法操作步骤: 分别取喉癌及癌旁组织各 100 mg, 在液氮下研成粉末, 加入 1 ml Trizol 溶液匀浆, 室温放置 5 min; 加入 0.2 ml 氯仿混匀, 室温放置 3 min; 4℃ 12 000 r/min, 离心 15 min, 取水相, 加入等体积异丙醇, 室温放置 10 min; 4℃ 12 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清液, 加入 1 ml 75% 乙醇洗涤, 4℃ 7 500 r/min, 离心 5 min, 弃上清液, 室温放置干燥, 所得 RNA 溶于 50 μl DEPC 水中, 用紫外分光光度仪对其定量后分别行 RNA 电泳判断 RNA 的质量和 cDNA 的合成; 取 RNA 1 μg、oligo-dT 1 μl、dNTP Mixture 1 μl 加入 RNase Free dH₂O 中混匀, 总体积 10 μl,

65℃ 孵育 5 min, 冰上冷却 1 min, 加入 10 μl 逆转录反应液 (buffer 4 μl、RNase Inhibitor 0.5 μl、PrimeScript RTase 0.5 μl、RNase Free dH₂O 5 μl), 在 PCR 仪上孵化 42℃, 20 min; 95℃, 5 min; 进行聚合酶链反应时, 94℃ 5 min 预变性; 94℃ 30 s 变性, 57℃ 退火 30 s (β-actin 退火温度为 55℃), 72℃ 30 s 复性, 进行 30 个循环; 循环结束后 72℃ 5 min 延伸。β-actin 的上游引物 5'-AGCAAGAGAGGCATCCTCAC-3', 下游引物 5'-TCTCTTGCTCGAAGTCCAGG-3', 扩增片断长度 502 bp; ANXA5 上游引物 5'-GGTGCAGCTGCCGATCCT-3', 下游引物 5'-GAAGGCATGTTTCAGTTCATAAGC-3', 扩增片断长度 447 bp。

1.4 结果判定

免疫组化 SP 法^[3]: 染色细胞内有棕色颗粒的为阳性表达, ANXA5 染色阳性表达主要定位于细胞膜和胞浆, 对每张病理切片在高倍 (×400) 镜下至少观察 10 个不重复的视野, 判断细胞着色率和着色强度。根据细胞质或细胞核着色强度分为 4 级 (0 级: 未着色; 1 级: 浅棕色; 2 级: 棕色; 3 级: 深棕色); 同时将细胞着色密度分为 5 级 (0 级: 未着色; 1 级: 着色细胞率 ≤ 20%; 2 级: 着色细胞率 21% ~ 40%; 3 级: 着色细胞率 41% ~ 60%; 4 级: 着色细胞率 > 60%)。按每一病例的染色强度与密度的级数和, 分为 0 ~ 7 级。0 级者为 (-), 指不表达; 1 ~ 3 级为 (+), 低表达; 4 ~ 5 级为 (++) , 中度表达; 6 ~ 7 级为 (+++) , 强表达。

RT-PCR 法^[4]: PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 使用凝胶成像分析系统观察扫描条带的荧光强度, 在相应位置出现目标条带者为阳性, 未出现目标条带者为阴性, 用 Photoshop CS5 分析结果。

1.5 统计学分析

统计软件采用 SPSS 13.0, 实验数据采用四格表 χ^2 检验、R × C 列联表 χ^2 检验及独立样本 *t* 检验相关分析, *P* < 0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ANXA5 在喉癌组织及癌旁组织中的表达

喉癌组织中细胞层次不清, 大小不一, 细胞异形性明显, 细胞质处可见棕色着色 (图 1~3); 癌旁组织中细胞排列规则, 而细胞内无着色或浅

棕色着色(图 4)。肿瘤组 ANXA5 表达水平明显高于正常组,差异具有统计学意义($\chi^2 = 9.950, P = 0.002$)。

2.2 ANXA5 mRNA 的表达

ANXA5 mRNA/ β -action 在癌旁组织中的表

达水平为 0.45675 ± 0.10801 , 在喉癌组织中的表达水平为 0.57987 ± 0.98881 ; ANXA5 mRNA 在喉癌组织中的表达明显高于癌旁组织(图 5), 两者比较差异具有统计学意义($t = -4.982, P < 0.05$)。

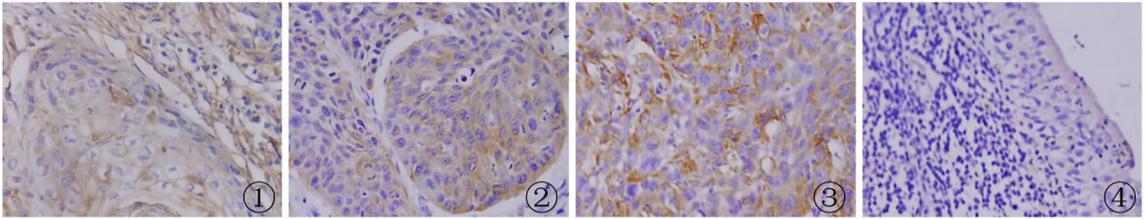


图 1 ANXA5 在高分化喉癌中的表达(SP ×400) 图 2 ANXA5 在中分化喉癌中的表达(SP ×400) 图 3 ANXA5 在低分化喉癌中的表达(SP ×400) 图 4 ANXA5 在癌旁正常组织中的表达(SP ×400)

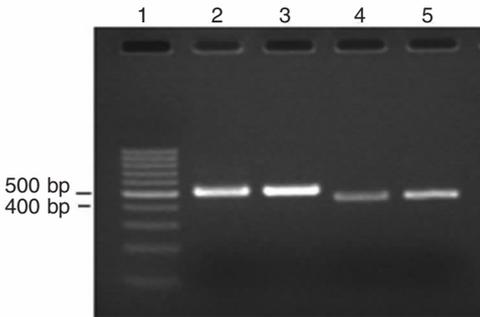


图 5 喉癌组织及癌旁组织中 ANXA5 mRNA 电泳图 1 道为 Marker;2 道为癌旁组织的 β -actin;3 道为喉癌组织的 β -actin;4 道为癌旁组织的 ANXA5;5 道为喉癌组织的 ANXA5

2.3 ANXA5 在人喉癌组织中的表达与病理、临床特征的关系

ANXA5 的表达与喉癌的临床分期、病理学分级与颈淋巴结转移密切相关($P < 0.05$), 而与喉癌患者年龄、性别及临床分型无关($P > 0.05$)。具体见表 1。

3 讨论

喉癌的发生发展是多因素、多步骤综合所致的复杂疾病。喉癌细胞的转移是影响喉癌疗效的主要因素之一。膜联蛋白是一类钙依赖性、能够结合带负电荷膜磷脂的蛋白家族, ANXA5 是膜联蛋白家族中分布最广泛, 含量最丰富的成员之一。ANXA5 具有抗炎^[5]、抗凝^[6]、参与自身免疫应答^[7]、调控细胞周期^[8]等多种生理功能。

表 1 ANXA5 的表达与喉癌患者临床、病理参数之间的关系

参数	例数	ANXA5		χ^2	P
		-/+	++/+++		
组织					
喉癌组织	53	16	37	9.950	0.002*
癌旁组织	25	17	8		
年龄					
≥ 55 岁	40	14	26	1.791	0.181
< 55 岁	13	2	11		
性别					
男	48	20	28	0.889	0.346
女	5	1	4		
临床分型					
声门上型	16	6	10	0.063	0.969
声门型	30	12	18		
声门下型	7	3	4		
临床分期					
I、II 期	21	12	9	11.990	0.001*
III、IV 期	32	4	28		
病理学分级					
高分化	27	17	10	6.553	0.038*
中分化	19	7	12		
低分化	7	1	6		
颈淋巴结转移					
有	17	2	15	6.313	0.012*
无	36	17	19		

注: * $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义

近年来研究表明 ANXA5 在结直肠腺癌^[9]、鼻咽癌^[10]和宫颈鳞癌^[11]等多种人类恶性肿瘤中的表达有不同程度增高, ANXA5 的异常表达可能与恶性肿瘤细胞的浸润和转移有关。但 ANXA5 在喉癌组织中的研究目前尚少报道。目前有学者发现喉癌与癌旁组织蛋白上存在一定差异^[12-13], 本课题组在前期通过差异蛋白质组研

究中发现, ANXA5 在喉癌组织中高表达。本实验通过免疫组织化学证实, 喉癌组织中 ANXA5 表达高于癌旁正常组织, 提示 ANXA5 的高表达可能与喉癌的发生发展有关。

喉癌临床分期中, I、II 期与 III、IV 期的差别在于 III、IV 期伴有声带固定和(或)区域淋巴结转移和(或)远处转移。我们研究发现临床 III、IV 期患者肿瘤组织中的 ANXA5 表达高于 I、II 期的患者。由此可见, III、IV 期患者肿瘤组织中 ANXA5 高表达率明显高于 I、II 期患者, 提示随着肿瘤临床分期增加以及癌细胞的浸润和转移, ANXA5 表达强度也增高; 另外, 本研究结果显示: 有颈淋巴结转移的喉癌组织 ANXA5 表达高于无颈淋巴结转移组。有学者^[10,14]报道, 分别在口腔癌和鼻咽癌中运用 RNA 干扰技术阻断 ANXA5 后, 观察到肿瘤细胞的迁移侵袭能力下降。以上结果提示, ANXA5 的高表达与喉癌细胞的侵袭转移可能有密切关系。根据癌细胞分化程度可对癌症进行病理分级: 高分化、中分化和低分化。我们实验结果发现 ANXA5 在低分化组、中分化组和高分化组中的表达率分别为 85.71% (6/7)、63.16% (12/19) 和 37.04% (10/27), 说明细胞分化程度越低, ANXA5 的表达就越高, ANXA5 的表达与细胞分化程度有密切关系。Xue 等^[9]在结直肠腺癌中发现 ANXA5 蛋白及其 mRNA 表达明显上升, 且表达程度与细胞分化有关。喉癌细胞的分化程度越低, 恶性程度就越高, 发生早期浸润与转移的可能性就越大。因此, 这也提示 ANXA5 的高表达与喉癌细胞的浸润和转移可能存在一定的关联。喉癌的临床分型可分为声门上型、声门型和声门下型; 其中声门上型和声门下型喉癌常见的病理类型以中低分化为, 而声门型却是以高中分化为, 这在我们收集的病例中得到体现。

综上所述, ANXA5 在低分化喉癌细胞、有颈淋巴结转移的喉癌细胞中高表达, 但其表达程度与年龄、性别、临床分型并没有直接关系, 表明 ANXA5 表达程度与喉癌细胞的分化、淋巴结的转移有密切关系; 另外, 与癌旁正常组织相比, ANXA5 的 mRNA 在喉癌组织中高表达, 这也表明喉癌组织细胞中 ANXA5 在基因与蛋白质两个水平都存在高表达。因而, ANXA5 可能在喉癌的发生、发展中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] 田勇泉. 耳鼻咽喉头颈外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 204 - 208.
- [2] 董维峰, 汪昱. Annexins 在恶性肿瘤中的表达及其临床意义[J]. 中国现代普通外科进展, 2010, 13(4): 302 - 305.
- [3] 刘红, 毛慧生, 傅西林, 等. nm23 基因表达与乳腺癌远处转移及预后相关性的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23(3): 224 - 227.
- [4] 张寒冰, 张道宫, 潘新良, 等. STAT3 在喉癌中的表达特征及其与 Survivin 表达的关系[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2008, 22(2): 123 - 126.
- [5] Ewing MM, De vrie MR, Nordzell M, et al. Annexin A5 therapy attenuates vascular inflammation and remodeling and improves endothelial function in mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(1): 95 - 101.
- [6] Sater MS, Finan RR, Mustafa FE, et al. Anti-annexin V IgM and IgG autoantibodies and the risk of idiopathic recurrent spontaneous miscarriage [J]. Reprod Immunol, 2011, 89(1): 78 - 83.
- [7] Rand JH, Wu XX, Quinn AS, et al. Hydroxychloroquine protects the annexin A5 anticoagulant shield from disruption by antiphospholipid antibodies; evidence for a novel effect for an old antimalarial drug [J]. Blood, 2010, 115(11): 2292 - 2299.
- [8] Kheifets V, Bright R, Inagaki K, et al. Protein kinase C delta (deltaPKC) - annexin V interaction: a required step in deltaPKC translocation and function [J]. Biol Chem, 2006, 281(32): 23218 - 23226.
- [9] Xue G, Hao LQ, Ding FX, et al. Expression of annexin A5 is associated with higher tumor stage and poor prognosis in colorectal adenocarcinomas [J]. Clin Gastroenterol, 2009, 43(9): 831 - 837.
- [10] 李岭, 庄英帆. Annexin A5 表达与鼻咽癌分化转移的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(4): 389 - 393.
- [11] 李欣, 高福祿, 李建团, 等. 膜联蛋白 A5 在人子宫颈癌组织中的表达[J]. 解剖学报, 2008, 39(6): 923 - 926.
- [12] 刘玲, 赵素萍, 赵长青, 等. 喉癌及喉正常黏膜组织的差异蛋白质组学分析[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2008, 14(4): 246 - 250.
- [13] 张红茹, 肖健云, 赵素萍, 等. 喉癌及喉正常黏膜组织蛋白质组学差异表达的初步研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2004, 10(3): 136 - 139.
- [14] Wehder L, Arndt S, Murzik U, et al. Annexin A5 is involved in migration and invasion of oral carcinoma [J]. Cell Cycle, 2009, 8(10): 1552 - 1558.

(修回日期: 2012 - 11 - 05)