

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.12.014

Annexin II、S100A4 在甲状腺乳头状癌中的表达及意义

黄器伟,李道明,黄培,杨麟珂

Expressions and Clinical Significance of Annexin II and S100A4 in Papillary Thyroid Carcinoma

HUANG Qi-wei, LI Dao-ming, HUANG Pei, YANG Lin-ke

Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding Author: LI Dao-ming, E-mail: lidaoming@zzu.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the expression of Annexin II and S100A4 in papillary thyroid carcinoma and their correlations with the occurrence and lymphatic metastasis of papillary thyroid carcinoma. **Methods** The immunohistochemistry S-P and in situ hybridization technique was used to test the different expressions of Annexin II, S100A4 proteins and Annexin II mRNA in tissues of 50 papillary thyroid carcinoma, 14 thyroid adenoma, 26 nodular goiter and 10 normal thyroid gland. **Results** The positive expression rates of Annexin II, S100A4 proteins and Annexin II mRNA in papillary thyroid carcinoma were 82.00% (41/50), 78.00% (39/50) and 74.00% (37/50), respectively. They were significantly higher than those in thyroid adenoma, nodular goiter and normal thyroid gland ($P < 0.05$). The expression rates of Annexin II, S100A4 proteins and Annexin II mRNA in papillary thyroid carcinoma were associated with lymph node metastasis ($P < 0.05$). The expression of Annexin II protein was positive correlated with that of S100A4 protein ($r = 0.380, P = 0.025$). The expression of Annexin II protein was positive correlated with that of Annexin II mRNA ($r = 0.434, P = 0.008$). **Conclusion** The over expressions of Annexin II and S100A4 were closely related with the occurrence and lymphatic metastases of thyroid carcinoma. Combining detection of Annexin II and S100A4 would help to distinguish the benign or malignant disease of thyroid gland and predict tumor development and prognosis.

Key words: Papillary thyroid cancer; Immunohistochemistry; In situ hybridization; Annexin II; S100A4

摘要:目的 探讨甲状腺乳头状癌中钙磷脂结合蛋白 II (Annexin II) 与钙结合蛋白 S100A4 的表达, 分析其与甲状腺乳头状癌发生及淋巴结转移的关系以及二者的相关性。**方法** 应用免疫组织化学 SP 法和原位杂交技术检测 50 例甲状腺乳头状癌组织、14 例甲状腺腺瘤组织、26 例结节性甲状腺肿组织和 10 例正常甲状腺组织中 Annexin II、S100A4 蛋白和 Annexin II mRNA 的表达。**结果** 甲状腺乳头状癌中 Annexin II、S100A4 蛋白和 Annexin II mRNA 的阳性表达率分别为 82.00% (41/50)、78.00% (39/50) 和 74.00% (37/50), 均明显高于甲状腺腺瘤组织、结节性甲状腺肿组织及正常甲状腺组织 ($P < 0.05$); 三者癌组织中的表达与甲状腺乳头状癌淋巴结转移有关 ($P < 0.05$); Annexin II 蛋白与 S100A4 蛋白的表达呈正相关性 ($r = 0.380, P = 0.025$); Annexin II 蛋白与 Annexin II mRNA 的表达呈正相关性 ($r = 0.434, P = 0.008$)。**结论** Annexin II 蛋白、Annexin II mRNA 及 S100A4 蛋白的高表达与甲状腺乳头状癌的发生和淋巴结转移密切相关, 二者联合检测有助于鉴别甲状腺良恶性病变, 并预测肿瘤的发展和预后。

关键词: 甲状腺乳头状癌; 免疫组织化学; 原位杂交; Annexin II; S100A4

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)12-1397-04

收稿日期: 2011-02-16; 修回日期: 2011-08-30

作者单位: 450052 郑州, 郑州大学第一附属医院病理科

通信作者: 李道明, E-mail: lidaoming@zzu.edu.cn

作者简介: 黄器伟 (1985-), 女, 硕士在读, 主要从事肿瘤病理的研究

0 引言

甲状腺癌是一种常见的恶性肿瘤, 多见于中青年女性, 其特性是淋巴结转移早, 发生远处转移是影响其预后的重要因素。部分甲状腺癌与良性腺瘤鉴别较困难, 在取材少、未见血管和包膜侵犯的情况下

容易误诊。流行病学发现,甲状腺癌的发病率正在逐年增加,危险性也在逐步进展^[1]。本实验采用免疫组织化学 SP 法和原位杂交技术检测 Annexin II、S100A4 蛋白和 Annexin II mRNA 在甲状腺乳头状癌和一些良性病变中的表达,并探讨其与甲状腺癌临床病理特征、淋巴结转移的关系以及二者的相关性。

1 资料及方法

1.1 标本来源

收集 2008 年 6 月—2009 年 12 月郑州大学第一附属医院外科手术切除标本 100 例。其中甲状腺乳头状癌 50 例,男 6 例,女 44 例;年龄在 19~82 岁之间,年龄≥45 岁者 24 例,<45 岁者 26 例;肿瘤直径≥1.0 cm 者 30 例,<1.0 cm 者 20 例;有淋巴结转移者 21 例,无淋巴结转移者 29 例。甲状腺腺瘤 14 例、结节性甲状腺肿 26 例、腺瘤旁正常甲状腺组织 10 例。

1.2 试剂

兔抗人 Annexin II 多克隆抗体、兔抗人 S100A4 多克隆抗体(工作浓度均为 1 : 100)、SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒均为北京中杉金桥生物技术公司产品。人 Annexin II 原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 检验方法

蛋白检测采用免疫组织化学 SP 法进行染色,按试剂盒说明书进行。DAB 显色,苏木精对比染色,常规脱水、透明,中性树胶封固,用 PBS 代替一抗作为阴性对照;采用已知的阳性组织切片作为阳性对照。Annexin II mRNA 的检测采用原位杂交技术,按原位杂交检测试剂盒说明书操作,BCIP/NBT 染色后核固红复染,常规脱水、透明,中性树胶封片。采用已知的阳性组织切片作为阳性对照;用不含探针的预杂交液进行杂交作为阴性对照。

1.4 结果判断

Annexin II 与 S100A4 蛋白均以胞质染色为主,呈棕黄或棕褐色,见图 1a、1b;Annexin II mRNA 表达的阳性信号主要定位于细胞质,呈紫蓝色颗粒,见图 1c。参照有关文献确定免疫组织化学结果判断标准^[2]:每例在显微镜下随机观察 5 个高倍视野,记录肿瘤细胞中染色阳性细胞百分率,具体如下:A 显色细胞数:≤5% 为 0 分,5% ~ 25% 为 1 分; > 25% ~ 50% 为 2 分; > 50% 为 3 分。B 显色程度:无显色为 0 分;浅黄色为 1 分;棕黄色为 2 分;棕褐色为 3 分。将每例积分 AB 相乘,两者乘积≤1 分为免疫组织化学反应阴性,2~3 分为弱阳性(+),4~6 分为阳性(++),>6 分为强阳性(+++)。参照有关文献确定原位杂交结果判定标准^[3]:阳性表达细胞数占计数细胞百分率的 0% 为阴性记为(-),<10% 为低表达记为(+),10%~70% 为中度表达记为(++),>70% 为高度表达记为(+++)。

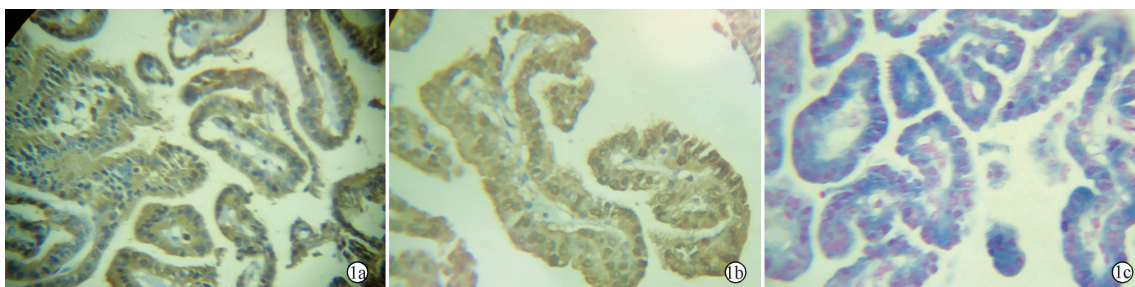
1.5 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,两组间率比较应用 χ^2 检验,相关关系应用 Spearman 相关分析,以 $\alpha = 0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 正常甲状腺组织、甲状腺腺瘤、结节性甲状腺肿及甲状腺乳头状癌组织中 Annexin II、S100A4 蛋白和 Annexin II mRNA 的表达

Annexin II 蛋白在甲状腺乳头状癌组织中的阳性表达率为 82.00% (41/50),在甲状腺腺瘤组织中阳性表达率为 14.29% (2/14),在结节性甲状腺肿组织中的阳性表达率为 7.69% (2/26),在正常甲状腺组织中无表达。S100A4 蛋白在甲状腺乳头状癌组织中的阳性表达率为 78.00% (39/50),在甲状腺腺瘤组织中阳性表达率为 28.57% (4/14),在结节性甲状腺肿组织中的阳性表达率为 3.85% (1/26),在正常甲状腺组织中无表达。Annexin II mRNA 在甲状腺乳头状癌组织中的阳性表达率为



1a: Annexin II protein; 1b: S100A4 protein; 1c: Annexin II mRNA

图 1 甲状腺乳头状癌中 Annexin II 和 S100A4 蛋白和 Annexin II mRNA 的阳性表达 (SP × 400)

Figure 1 The positive expression of Annexin II and S100A4 protein and Annexin II mRNA in papillary thyroid carcinoma (SP × 400)

表 1 Annexin II、S100A4 蛋白和 Annexin II mRNA 的表达与甲状腺乳头状癌临床病理因素的关系
Table 1 Relationship between the expression of Annexin II, S100A4 proteins and Annexin II mRNA with clinical pathological parameters in papillary thyroid carcinoma

Items	n	Annexin II +		P	S100A4 +		P	AnnexinII mRNA +		P
		n	%		n	%		n	%	
Gender										
Male	6	5	83.33		4	66.67		4	66.67	
Female	44	36	81.82	1.000	35	79.55	0.850	33	75.00	1.000
Age(year)										
<45	26	20	76.92		19	73.08		16	61.54	
≥45	24	21	87.50	0.546	20	83.33	0.382	21	87.50	0.037
Tumor size(cm)										
<1.0	20	15	75.00		14	70.00		13	65.00	
≥1.0	30	26	86.67	0.499	25	83.33	0.443	24	80.00	0.236
Lymph node metastasia										
No	29	20	68.97		19	65.52		18	62.07	
Yes	21	21	100.00	0.014	20	95.24	0.031	19	90.48	0.024

74.00% (37/50), 在甲状腺腺瘤组织中阳性表达率为 14.29% (2/14), 在结节性甲状腺肿组织中的阳性表达率为 3.85% (1/26), 在正常甲状腺组织中无表达。Annexin II、S100A4 蛋白和 Annexin II mRNA 在甲状腺乳头状癌中的表达分别与在甲状腺腺瘤、结节性甲状腺肿组织中表达的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 甲状腺乳头状癌组织中 Annexin II、S100A4 蛋白和 Annexin II mRNA 的表达与临床病理因素的关系

Annexin II、S100A4 蛋白和 Annexin II mRNA 在有淋巴结转移组中的表达均显著高于无淋巴结转移组中的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 三者与患者性别、年龄、肿瘤大小指标的组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 甲状腺乳头状癌组织中 Annexin II 蛋白和 S100A4 蛋白、Annexin II mRNA 表达的相关性分析

根据 Spearman 等级相关分析显示甲状腺乳头状癌组织中 Annexin II 蛋白和 S100A4 蛋白、Annexin II mRNA 的表达呈正相关关系, 见表 2、3。

表 2 甲状腺乳头状癌中 Annexin II 蛋白和 S100A4 蛋白表达的相关性

Table 2 Correlation analysis of Annexin II and S100A4 proteins expression in papillary thyroid carcinoma

Annexin II protein	S100A4 protein		χ^2	r	P
	+	-			
+	35	6			
-	4	5	5.014	0.380	0.025

表 3 甲状腺乳头状癌中 Annexin II 蛋白和 Annexin II mRNA 表达的相关性

Table 3 Correlation analysis of Annexin II protein and Annexin II mRNA expression in papillary thyroid carcinoma

Annexin II protein	Annexin II mRNA		χ^2	r	P
	+	-			
+	34	7			
-	3	6	7.033	0.434	0.008

3 讨论

钙磷脂结合蛋白 II (Annexin II) 是 Annexins 家族中的一个重要成员, 主要存在于细胞膜、胞质和胞外, 通过钙离子的调节及与靶蛋白的相互作用, 可以发挥细胞内的多种功能, 主要参与纤溶、细胞间黏附、病毒感染、细胞骨架活动、胞膜运输、黏合素介导的细胞信号转导及细胞增殖、迁移与分化等^[4]。研究发现, Annexin II 在多种肿瘤组织中表达水平发生变化, 在肾细胞癌^[5]、胰腺癌^[6]、结肠癌^[7]等一些肿瘤中表达上调, 其表达具有显著组织特异性, Annexin II 在肿瘤中的异常表达与肿瘤的发生发展、浸润、转移及预后密切相关。Annexin II 在高侵袭、高转移的恶性肿瘤中的表达异常使它可能成为判断肿瘤浸润转移能力和肿瘤基因治疗的新靶点。本研究结果显示 Annexin II 蛋白和 Annexin II mRNA 在甲状腺乳头状癌的表达明显高于良性甲状腺腺瘤、结节性甲状腺肿, 并呈逐渐减低的趋势, 而在正常甲状腺组织中无表达, 提示 Annexin II 参与甲状腺乳头状癌的发生。Annexin II 蛋白和 Annexin II mRNA 在肿瘤大小的组间差异无统计学意义,

其机制尚不清楚,可能与样本量小有关,还需要进一步研究。Annexin II 蛋白和 Annexin II mRNA 在淋巴结转移组中的表达明显高于无淋巴结转移组,差异有统计学意义,提示 Annexin II 的高表达为甲状腺乳头状癌的侵袭转移提供了重要条件。本研究结果与上述结果一致^[5-7]。Annexin II 蛋白和 Annexin II mRNA 的表达呈正相关关系,并且在甲状腺乳头状癌中 Annexin II 蛋白的表达高于 Annexin II mRNA 的表达,提示 Annexin II 在甲状腺乳头状癌中的异常表达可能始于转录水平。

钙结合蛋白 S100A4 是一种具有 EF 双螺旋结构的钙离子结合蛋白,由 101 个氨基酸组成,参与细胞内外的信号转导、细胞增殖和分化、细胞外基质分泌活动、细胞间黏附及细胞自身运动等多个生理过程,临床大量研究表明,S100A4 基因高表达与前列腺癌、结肠癌和乳腺癌的转移具有密切关系,它不但可以与肿瘤抑制蛋白 p53 结合促进细胞的增殖,还参与细胞黏附、细胞外基质重建和细胞运动,对肿瘤细胞转移具有促进作用^[8-10]。Sherbet 等^[11]研究发现,S100A4 是肿瘤治疗的一个潜在的分子靶点,为新的肿瘤治疗途径提供依据,激活的 S100A4 途径中的效应子都可能成为肿瘤治疗的关键位点。本研究结果显示 S100A4 在甲状腺乳头状癌的表达明显高于甲状腺腺瘤、结节性甲状腺肿,并呈逐渐减低的趋势,而在正常甲状腺组织中无表达,提示 S100A4 蛋白参与甲状腺乳头状癌的发生及发展。同时 S100A4 蛋白在淋巴结转移组中的表达明显高于无淋巴结转移组,提示 S100A4 的高表达为甲状腺乳头状癌的侵袭转移提供了重要条件。

研究发现,S100A4 蛋白可以结合于 Annexin II 蛋白的氨基末端,二者结合后可通过 S100A4 蛋白羧基端的赖氨酸结合纤维蛋白溶酶原(plasminogen,PLG)的赖氨酸结合域,促进组织型纤维蛋白溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator,tPA)依赖的 PLG 的激活,使纤溶酶的生成增加,促进细胞的迁移,使用特殊的多肽阻断 S100A4 蛋白和 Annexin II 蛋白的结合,则明显降低细胞表面纤溶酶的生成,提示 Annexin II 在 S100A4 的促肿瘤转移中有重要作用^[12]。

研究结果表明,Annexin II 蛋白与 S100A4 蛋白在甲状腺癌中的表达呈正相关,因此可以推测 Annexin II、S100A4 蛋白的高表达在甲状腺乳头状癌的发生、发展过程中具有协同作用。Annexin II 和 S100A4 在甲状腺乳头状癌中高表达而在甲状腺腺

瘤、结节性甲状腺肿、正常甲状腺组织中低表达或者不表达,同时 Annexin II 和 S100A4 的高表达与乳头状甲状腺癌的淋巴结转移有关,上述结果均提示 Annexin II 和 S100A4 蛋白的联合检测可作为评价甲状腺乳头状癌恶性程度和判断预后的重要指标。

参考文献:

- [1] Grubbs EG, Rich TA, Li G, et al. Recent advances in thyroid cancer[J]. *Curr Probl Surg*, 2008, 45(3): 156-250.
- [2] Wilentz RE, Su GH, Dai JL, et al. Immunohistochemical labeling for dpc4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas: a new marker of DPC4 inactivation[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(1): 37-43.
- [3] Ahlén J, Enberg U, Larsson C, et al. Malignant fibrous histiocytoma, aggressive fibromatosis and benign fibrous tumors express mRNA for the metalloproteinase inducer EMMPRIN and the metalloproteinases MMP-2 and MT1-MMP[J]. *Sarcoma*, 2001, 5(3): 143-149.
- [4] 宋魏,仇晓菲. Annexin II 与肿瘤的研究进展[J]. *医学综述*, 2008, 14(6): 851-853.
- [5] Zimmermann U, Woenckhaus C, Pietschmann S, et al. Expression of annexin II in conventional renal cell carcinoma is correlated with Fuhrman grade and clinical outcome[J]. *Virchows Arch*, 2004, 445(4): 368-374.
- [6] Esposito I, Penzel R, Chaib-Harrièche M, et al. Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis[J]. *J Pathol*, 2006, 208(5): 673-685.
- [7] Emoto K, Yamada Y, Sawada H, et al. Annexin II over expression correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal carcinoma[J]. *Cancer*, 2001, 92(6): 1419-1426.
- [8] Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33(7): 637-668.
- [9] Pietas A, Schlüns K, Marenholz I, et al. Molecular cloning and characterization of the human S100A4 gene encoding a novel member of the S100 family[J]. *Genomics*, 2002, 79(4): 513-522.
- [10] Mazzucchelli L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists[J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(1): 7-13.
- [11] Sherbet GV. Metastasis promoter S100A4 is a potentially valuable molecular target for cancer therapy[J]. *Cancer Lett*, 2009, 280(1): 15-30.
- [12] Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, et al. Metastasis associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(21): 20833-20841.

[编辑:刘红武;校对:黄园玲]