

ANXA2 与 ERp29 在正常与临床型乳房炎 绵羊乳腺组织中的表达与定位

高建锋^{1,2}, 李讨讨^{1,2}, 陈灿灿^{1,2}, 赵兴绪³, 马友记^{1,2*}

(1. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州 730070; 2. 甘肃省肉羊繁育生物技术工程实验室, 民勤 733300; 3. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

摘要: 旨在探讨膜联蛋白 A2(annexin A2, ANXA2)与内质网蛋白 29(endoplasmic reticulum protein 29, ERp29) 基因在正常与临床型乳房炎绵羊(*Ovis aries*)乳腺组织中的表达与定位。选取正常与临床型乳房炎绵羊各 3 只, 采集乳腺组织, 通过 qRT-PCR、免疫印迹(Western blot, WB)和免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)方法检测正常与临床型乳房炎绵羊乳腺组织中 ANXA2 与 ERp29 mRNA 和蛋白的表达与定位。结果表明, ANXA2 在临床型乳房炎绵羊乳腺组织中 mRNA 的表达极显著高于正常型($P < 0.01$), 而该蛋白的表达却极显著低于正常型($P < 0.01$); ERp29 在临床型乳房炎绵羊乳腺组织中 mRNA 与蛋白表达均极显著高于正常型($P < 0.01$)。ANXA2 和 ERp29 分别在正常与临床型乳房炎绵羊乳腺组织中均有阳性反应, 且主要定位于乳腺上皮细胞。综上所述, ANXA2 与 ERp29 在正常与临床型乳房炎绵羊乳腺组织中的表达均差异显著, 其可能参与了绵羊乳房炎的发生与发展的调控。

关键词: 绵羊; 乳房炎; ANXA2; ERp29; 表达; 定位

中图分类号: S826.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)06-1307-07

Expression and Localization of ANXA2 and ERp29 in Mammary Gland Tissue of Normal and Clinical Mastitis Sheep(*Ovis aries*)

GAO Jian-feng^{1,2}, LI Tao-tao^{1,2}, CHEN Can-can^{1,2}, ZHAO Xing-xu³, MA You-ji^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Gansu Engineering Laboratory of Sheep Breeding Biotechnology, Minqin 733300, China; 3. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The study aimed to investigate the expression and localization of annexin2 (ANXA2) and endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29) genes in mammary gland tissue of normal and clinical mastitis sheep (*Ovis aries*). In this study, mammary gland tissues of 3 normal and 3 clinical mastitis sheep (*Ovis aries*) were sampled. qRT-PCR, Western blot (WB) and immunohistochemistry (IHC) were used to detect the expression and distribution of ANXA2 and ERp29 mRNA and proteins in mammary gland tissue of normal and clinical mastitis sheep. The results showed that the expression of ANXA2 mRNA in the mammary gland tissue of clinical mastitis sheep was significantly higher than that of normal group ($P < 0.01$), while the expression of ANXA2 protein was significantly lower than that of normal group ($P < 0.01$). The expression of ERp29 mRNA and protein in the mammary gland tissue of clinical mastitis sheep were significantly higher than that of normal group ($P < 0.01$). ANXA2 and ERp29 proteins had positive

收稿日期: 2017-11-06

基金项目: 甘肃省科技重大专项计划(1602NKDH020); 甘肃农业大学校级课题(GSAU-ZL-2015-030); 国家肉羊产业技术体系项目(CARS-38)

作者简介: 高建锋(1991-), 女, 陕西榆林人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: 1518867937@qq.com

* 通信作者: 马友记, 教授, 主要从事绵山羊繁育与疫病防治工作, E-mail: yjma@gsau.edu.cn

reactions in mammary gland tissues of normal and clinical mastitis sheep respectively and mainly located in mammary epithelial cells. The expression of ANXA2 and ERp29 were significantly different in the mammary gland tissue of normal and clinical mastitis sheep, which may be involved in the regulation of the occurrence and development of sheep mastitis.

Key words: sheep; mastitis; ANXA2; ERp29; expression; location

乳房炎是目前畜牧养殖业中最为常见的多发性疾病之一,会导致泌乳动物产奶量下降和乳成分及其理化性质等发生变化,从而降低乳制品的营养价值和经济价值^[1-4]。按泌乳动物有无乳房炎及病变的类型进行分类,将分为正常型、隐性乳房炎和临床型乳房炎。正常型和隐性乳房炎在宏观上用肉眼观察,乳房与乳汁均无明显异常,但在体细胞(somatic cell count, SCC)计数、细菌学检测、乳汁导电率和pH上,二者结果明显不同。临床型乳房炎患者相比较前二者,在宏观上,乳房和乳汁却有着十分明显的变化。其主要表现:1)乳房红肿、发痒、触碰时有疼痛反应;2)乳汁中含有絮状物或呈水样。乳房炎患者若不能得到及时治疗,不仅会导致泌乳动物产奶量和奶品质显著降低,而且还会影响正常生理功能,延长产后发情时间。因此,若能从这些病变的乳房炎患者中寻找更多的相关分子致病机理,将对早期诊断与治疗具有重要意义。目前国内外学者和专家针对泌乳动物乳房炎病因、发病机理及致病原理等进行了大量的研究,但仍未找到安全有效的防治途径。究其根源是由于正常乳腺组织产生炎症反应会转化为乳房炎,涉及多个致病基因、抑制基因、细胞黏附因子、生长因子及其多基因变异积累与相互作用。

本课题组前期结合二维电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)和质谱鉴定技术从正常与临床型乳房炎绵羊乳腺组织中筛选与鉴定出差异性表达蛋白30种,其中ANXA2与ERp29蛋白在临床型乳房炎绵羊乳腺组织中分别被鉴定为下调蛋白和上调蛋白。ANXA2蛋白是一类受Ca²⁺所依赖的膜磷脂连接蛋白超家族成员之一^[5-8],在生物膜的形成、胞吞和胞吐、成骨细胞的形成和骨的重吸收、DNA合成、细胞增殖、凋亡及分化等方面起着重要调节作用。内质网蛋白29(ERp29)是一种新型的内质网应激蛋白,它不同于传统的分子伴侣,既不与ATP结合也不与Ca²⁺结合^[9-10],但其主要发挥类似分子伴侣的功能,在新生蛋白的分泌和成熟中发挥着重要的作用。本研究以正常与临床型乳房炎绵羊乳腺组织为研究对象,应用qRT-PCR、Western blot

和免疫组织化学法检测ANXA2、ERp29的mRNA和蛋白在正常与临床型乳房炎绵羊乳腺组织中的表达与定位,旨在为进一步从分子水平上探讨ANXA2与ERp29在绵羊乳房炎中的作用提供新的研究素材。

1 材料与方法

1.1 试验动物及样品采集

正常与临床型乳房炎绵羊(*Ovis aries*,各3只)乳腺组织样品来源于甘肃省临洮县平长现代农牧业有限公司种羊场。其中患临床型乳房炎绵羊可结合以下特征进行诊断:1)当肉眼观测时发现绵羊乳房红肿且触摸时伴有坚硬疼痛、发热等症状;2)挤掉初乳,再挤出乳汁置于灭菌的广口瓶内,然后观测绵羊乳汁的变化,当乳汁呈现絮状和凝乳块并且伴有一定酸臭味时,则最终判定为临床型乳房炎。以正常绵羊为对照组。正常绵羊可通过pH法测定,当乳汁呈弱酸性时,则判定为正常。试验羊经颈静脉放血处死后,沿腹部正中中线切开皮肤至耻骨后缘,剥离皮肤,用生理盐水将避开脂肪组织的乳腺组织冲洗干净,取约0.1 m³乳腺组织块,剪成小块,分装于1.5 mL冻存管中后迅速投入液氮进行保存,之后转入-80℃冰箱保存待用。将另一部分的乳腺组织固定在4%的多聚甲醛溶液中。

1.2 主要试剂

Trans Zol UP RNA提取试剂盒、Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Ki、焦碳酸二乙酯(Diethyl pyrocarbonate, DEPC)水、Tran Start TipGreen qPCR Super Mix和Passive Reference Dye(北京全式金生物公司);一抗(Rabbit Anti-ANXA2 antibody、Rabbit Anti-ERp29 antibody、Anti-beta-Actin)、免疫组化试剂盒(SP-0022)、二抗(Goat Anti-rabbit IgG/HRP)、二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(北京的博奥森生物公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 总RNA提取及反转录 将充分研磨好

的绵羊乳腺组织根据 Trans Zol UP RNA 提取试剂盒的使用说明提取总 RNA。选择完整性较好的 RNA 样品将其浓度调至 $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 按反转录试剂盒操作说明中的两步法进行 cDNA 第一链的合成, 将产物置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.3.2 引物设计与合成 根据 NCBI 上已公布

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers of qRT-PCR

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
Gene	Primer sequence	Products length
ANXA2	F:CAAGCCCTGTATTTTCGCTGA,R: CTTTCTGGTAGTCGCCCTT	194
ERp29	F:CCTTCCCCTGGATACAATCACT,R:AGTTTTTCAGCCAGACGCTTG	125
GAPDH	F: GAAGGTCGGAGTGAACGGAT,R: GATGACGAGCTTCCC GTTCT	196

1.3.3 qRT-PCR 以反转录得到的 cDNA 为模板,按照 Trans Start[®] Tip Green qPCR Super Mix 试剂盒建议的体系,对 ANXA2、ERp29 与 GAPDH 基因进行 qRT-PCR 扩增。反应体系(20 μL):上下游引物($10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.4 μL 、cDNA 1 μL 、2 \times Tran Start TipGreen qPCR Super Mix 10 μL 、Passive Reference Dye(50 \times)0.4 μL 、dd H₂O 7.8 μL 。扩增程序:94 $^\circ\text{C}$ 30 s;94 $^\circ\text{C}$ 5 s,56 $^\circ\text{C}$ 15 s,72 $^\circ\text{C}$ 10 s,共 40 个循环。所有样品都做 3 次重复,待反应完成后,分别观测溶解曲线和扩增曲线。

1.3.4 绵羊乳腺组织中 ANXA2 与 ERp29 蛋白表达水平的检测 将苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)和裂解液加入到充分研磨的乳腺组织中,以此来提取乳腺组织中总蛋白,置于冰上充分裂解 30 min,经 4 $^\circ\text{C}$ 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,吸取上清,采用聚氧基丙烯酸正丁酯(bicin chonic acid, BCA)试剂盒测定总蛋白的浓度,定量后按一定比例将 4 \times SDS 上样缓冲液加入其中,并煮沸 10 min,使蛋白变性,于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。12%的十二烷基硫酸钠一聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),将蛋白从凝胶转至聚偏二氟(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,在室温环境下使用浓度为 5%的脱脂奶粉封闭存放 2 h,分别向其中加入兔源 ANXA2、ERp29 一抗(1:500)和鼠源 β -actin 一抗(1:1 500),并在 4 $^\circ\text{C}$ 下孵育过夜。用含 1%吐温-20 的 pH 7.2 的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗膜 5 次,将山羊抗

羊源膜联蛋白 A2(ANXA2, NM_001093788.1)与内质网蛋白 29(ERp29, EU596595.1)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH, NM_001190390.1)的序列,应用 Oligo7 软件来实现对引物的设计,之后通过 NCBI 上的 BLAST 去检测引物特异性,送上海生工生物公司合成。引物序列见表 1。

兔二抗按照 1:5 000 的比例加入其中。最后通过底物化学发光(electrochemi-luminescence, ECL)试剂盒完成显影曝光,并记录试验结果。试验重复 3 次。

1.3.5 乳腺组织免疫组织化学检测 取石蜡切片,60 $^\circ\text{C}$ 烤片 2.5 h。经常规方法脱蜡后按照免疫组化试剂盒的使用说明进行。滴加 DAB 显色剂后观测切片显色反应,当显色反应合适时,终止显色。按照苏木精二次染色、分化、脱水、透明、封片的顺序进行后期处理并进行镜检照相。

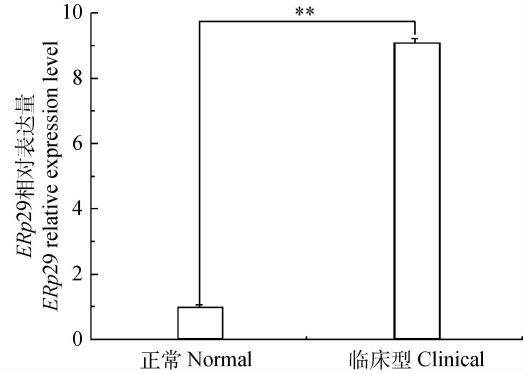
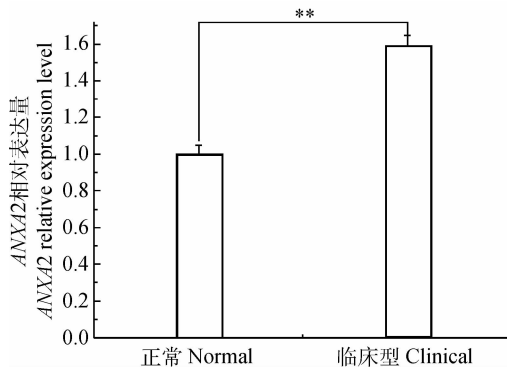
1.3.6 数据处理与图像分析 通过 SPSS17.0 软件对所有数据进行独立样本 t 检验,使用“平均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm SE$)”表示,当 $P < 0.01$ 表示差异极显著, $P < 0.05$ 表示差异显著。荧光定量分析目的基因的相对表达水平可以通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法来计算。通过内参基因 GAPDH 来校正目的基因的表达量;Western blot 结果使用 Image Pro Plus6.0 软件进行图像分析,将扫描出来的目的蛋白 ANXA2、ERp29 分别与内参蛋白 β -actin 蛋白的灰度值作比值;用 Olympus Dp71 显微镜来观察 HE 染色和免疫组织化学染色的结果,从每个组织里选择 3 张切片,随机在每张切片上选择 3 个视野。

2 结 果

2.1 绵羊乳腺组织中 ANXA2 与 ERp29 mRNA 的表达 应用实时荧光定量 PCR,用内参基因 GAPDH 对正常与临床型乳房炎绵羊乳腺组织中的 ANXA2 与 ERp29 mRNA 表达量进行校正,结果表明:

ANXA2 与 ERp29 基因在正常与临床型乳房炎绵羊乳腺组织中均表达,且临床型乳房炎绵羊乳腺组

织中 ANXA2 与 ERp29 mRNA 的表达量均极显著高于对照组 ($P < 0.01$) (图 1)。



* * . 正常型 vs 临床型 $P < 0.01$ 。下同

* * . Normal vs Clinical $P < 0.01$. The same as below

图 1 乳腺组织中 ANXA2 与 ERp29 mRNA 的相对表达量 ($n=6$)

Fig. 1 The expression of ANXA2 and ERp29 mRNA in mammary gland tissue ($n=6$)

2.2 绵羊乳腺组织中 ANXA2 与 ERp29 蛋白的表达

运用 Western blot 检测 ANXA2、ERp29 蛋白在正常与临床型乳房炎绵羊乳腺组织中的表达,用内参 β -actin 对目的蛋白进行校正,结果显示: ANXA2、ERp29 蛋白在正常与临床型乳房炎绵羊

乳腺组织中均有表达(图 2A)。在临床型乳房炎绵羊乳腺组织中,ANXA2 蛋白表达量极显著低于正常型 ($P < 0.01$),ERp29 蛋白表达量极显著高于正常型 ($P < 0.01$) (图 2B,C)。

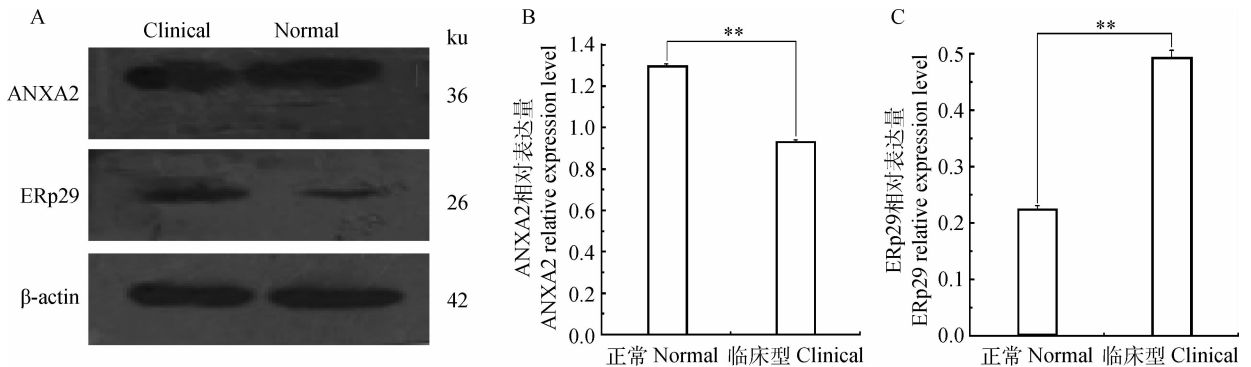


图 2 Western bolt 检测绵羊乳腺组织中 ANXA2 和 ERp29 蛋白表达(A)和相对表达量(B,C)

Fig. 2 The expression (A) and relative expression level (B,C) of ANXA2 and ERp29 proteins detected in mammary gland tissue of sheep by Western bolt

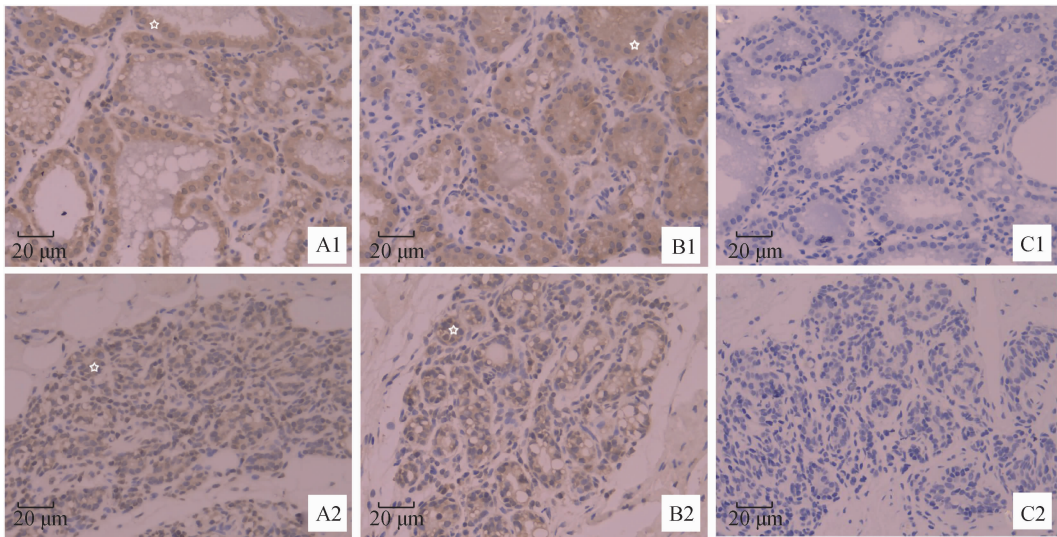
2.3 绵羊乳腺组织中 ANXA2、ERp29 蛋白表达与定位

免疫组织化学染色阳性产物呈黄褐色,表示有该蛋白的分布。从免疫组织的化学染色结果可以看出,ANXA2 和 ERp29 在正常与临床型乳房炎绵羊乳腺组织中均有阳性反应,且主要定位于乳腺上皮细胞(图 3)。

3 讨论

膜联蛋白超家族(annexins, ANX)是一类受钙中的表达高于癌旁组织;于洋等^[19]通过免疫组织化

离子依赖、带负电荷的膜磷脂结合的蛋白^[11]。其中 ANXA2 属于膜联蛋白家族一员,广泛存在于人体内多种细胞内^[12],具有多种生物学功能,如参与离子转运、细胞增殖、分化、凋亡、信号转导、细胞迁移、合成与结合等多个生物学过程^[13-15]。目前有研究发现,ANXA2 与多数肿瘤的发生、发展及转移等过程密切相关^[16-17],且在不同肿瘤病变组织中差异性表达。如李鑫静等^[18]通过实时荧光 PCR、Western blot 技术及免疫组织化学发现,ANXA2 在胃癌组织学方法发现 ANXA2 在口腔鳞癌组织中的表达明显



A1、A2. 临床型乳房炎与正常乳腺组织中 ANXA2 表达; B1、B2. 临床型乳房炎与正常乳腺组织中 ERp29 表达; C1、C2. 临床型乳房炎与正常乳腺组织的阴性对照; ☆. 乳腺上皮细胞

A1, A2. Expression of ANXA2 in mammary gland tissues of normal and clinical mastitis; B1, B2. Expression of ERp29 in mammary gland tissues of normal and clinical mastitis; C1, C2. Negative control of mammary gland tissues of normal and clinical mastitis; ☆. Mammary epithelial cells

图 3 免疫组织化学检测乳腺组织中 ANXA2 与 ERp29 蛋白的表达

Fig. 3 The expression of ANXA2 and ERp29 proteins in mammary gland tissue by immunohistochemistry

高于对照组; Zhang 等^[20]通过实时荧光 PCR、Western blot 技术、免疫组织化学染色及 ELISA 方法也发现 ANXA2 在肝癌组织中的表达明显高于对照组, Li 等^[21]通过二维凝胶电泳和质谱鉴定技术发现 ANXA2 蛋白在食管鳞细胞癌中为下调蛋白。同样本研究也探讨 ANXA2 在正常与临床型乳房炎绵羊乳腺组织中的表达, 结果表明, 临床型乳房炎乳腺组织中该基因 mRNA 的表达明显高于对照组, 而该蛋白的表达却明显低于对照组, 暗示 ANXA2 在正常与临床型乳房炎绵羊乳腺组织中的转录与蛋白水平上的表达并不一致, 其原因可能是由于基因表达在转录和翻译阶段存在时空间隔, 这期间可能在 mRNA 达到峰值时蛋白还在增加, 或蛋白达到峰值 mRNA 已经开始降解。但总体表明 ANXA2 在不同病变样本组织中的表达模式不相同, 这可能与研究对象, 样本量多少、不同治病机理与基因本身功能相关。

内质网(endoplasmic reticulum, ER)存在于除哺乳动物成熟的红细胞以外的各种真核细胞中, 其主要功能是蛋白质的合成、修饰、加工和新生肽链的折叠、组装与运输, 此外还具有合成脂质和排毒等功能。ERp29 作为内质网上的一种蛋白, 最初克隆于大鼠肝及牙釉质细胞^[22-23], 广泛表达于各种组织如

甲状腺、唾液腺、肾上腺、乳腺、前列腺、胰腺和肝等组织, 但在心肌和骨骼肌中表达很少^[24]。目前有研究表明, ERp29 基因在组织或细胞中的差异性表达与多种疾病的发生密切相关^[25], 如桑旭^[26]通过免疫组织化学染色(immunohistochemistry, IHC)方法检测 ERp29 在胃癌组织及癌旁组织中的表达, 结果发现该蛋白在胃癌组织中的表达低于癌旁组织; Cheretis 等^[27]通过免疫组织化学法也检测 ERp29 在 104 例皮肤基底细胞癌患者(包括 50 个结节, 29 个浸润, 15 个浅表, 7 个硬化, 2 个纤维上皮和 1 个色素细胞癌)中的表达, 结果发现该蛋白在浸润型癌中的表达较强, 浅表癌中表达较弱; 韩娉怡^[28]也检测 ERp29 在原发性肝癌与正常肝组织中的表达, 结果发现 ERp29 在原发性肝癌中的表达明显低于正常组。同样本研究通过 qRT-PCR、Western blot 技术也检测 ERp29 在正常与临床型乳房炎乳腺组织中的表达, 结果显示, 该基因在临床型乳房炎绵羊乳腺组织中的 mRNA 与蛋白表达均明显高于正常型。说明 ERp29 基因在不同病变组织中的表达具有差异性, 暗示该蛋白与多种疾病发生与发展密切相关

可见, ANXA2、ERp29 均在正常与临床型乳房炎绵羊乳腺组织中的表达具有差异性, 由此表明二者均参与泌乳动物乳房炎的发生与发展, 但其作用

机制不同,这可能与基因本身的功能相关。

4 结 论

ANXA2、ERp29 mRNA 与其蛋白在正常与临床型绵羊乳腺组织中均表达且表达趋势存在差异。其中 ANXA2 在临床型乳房炎绵羊乳腺组织中的 mRNA 表达明显高于正常型,而该蛋白表达却明显低于正常型;ERp29 mRNA 与蛋白在临床型乳房炎绵羊乳腺组织中的表达均明显高于正常型;ANXA2 和 ERp29 蛋白在正常与临床型乳房炎绵羊乳腺组织中均有阳性反应且主要定位于乳腺上皮细胞。综上所述,ANXA2 与 ERp29 均参与绵羊乳房炎的发生与发展,但二者是否可以作为判断乳房炎预后重要依据,还有待于进一步研究证实。

参考文献(References):

- [1] HALASA T, NIELEN M, DE ROOS A P W, et al. Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model [J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92(2):599-606.
- [2] HAGNESTAM-NIELSEN C, EMANUELSON U, BERGLUND B, et al. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation[J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92(7):3124-3133.
- [3] MA Y, RYAN C, BARBANO D M, et al. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk [J]. *J Dairy Sci*, 2000, 83(2):264-274.
- [4] SADEGHI-SEFIDMAZGI A, MORADI-SHAHRABAK M, NEJATI-JAVAREMI A, et al. Estimation of economic values and financial losses associated with clinical mastitis and somatic cell score in Holstein dairy cattle[J]. *Animal*, 2011, 5(1):33-42.
- [5] GERKE V, MOSS S E. Annexins: From structure to function[J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(2):331-371.
- [6] CLARK G B, MORGAN R O, FERNANDEZ M P, et al. Evolutionary adaptation of plant annexins has diversified their molecular structures, interactions and functional roles [J]. *New Phytol*, 2012, 196(3):695-712.
- [7] ROSENBAUM S, KREFT S, ETICH J, et al. Identification of novel binding partners (annexins) for the cell death signal phosphatidylserine and definition of their recognition motif[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(7):5708-5716.
- [8] MONASTYRSKAYA K, BABIYCHUK E B, HOSTETTLER A, et al. Annexins as intracellular calcium sensors [J]. *Cell Calcium*, 2007, 41(3):207-219.
- [9] MKRTCHIAN S, SANDALOVA T. ERp29, an unusual redox-inactive member of the thioredoxin family [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(3-4):325-337.
- [10] 谢作斌, 王友群. ERp29——一种新的内质网蛋白 [J]. 医学综述, 2009, 15(3):374-377.
- XIE Z B, WANG Y Q. ERp29—a new endoplasmic reticulum protein [J]. *Medical Recapitulate*, 2009, 15(3):374-377. (in Chinese)
- [11] RESCHER U, GERKE V. Annexins—unique membrane binding proteins with diverse functions [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 13):2631-2639.
- [12] CHIANG Y, SCHNEIDERMAN M H, VISHWANATHA J K. Annexin II expression is regulated during mammalian cell cycle [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(24):6017-6021.
- [13] C, DAIGELER A L, SEIFERT W, et al. Annexin A2 mediates apical trafficking of renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(14):9983-9997.
- [14] MADUREIRA P A, HILL R, MILLER V A, et al. Annexin A2 is a novel cellular redox regulatory protein involved in tumorigenesis [J]. *Oncotarget*, 2011, 2(12):1075-1093.
- [15] LIANG Q L, CHEN G Q, LI Z Y, et al. Function and histopathology of a cell adhesion molecule TSLC1 in cancer [J]. *Cancer Invest*, 2011, 29(2):107-112.
- [16] ZHANG X H, LIU S Q, GUO C M, et al. The association of annexin A2 and cancers [J]. *Clin Transl Oncol*, 2012, 14(9):634-640.
- [17] LOKMAN N A, WEEN M P, OEHLER M K, et al. The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression [J]. *Cancer Microenviron*, 2011, 4(2):199-208.
- [18] 李鑫静, 林贤东, 陈刚, 等. Anxa2 基因在胃癌组织中的表达及意义 [J]. 诊断病理学杂志, 2016, 23(10):779-783.
- LI X J, LIN X D, CHEN G, et al. Clinicopathological significance of Anxa2 expression in gastric cancer [J]. *Chinese Journal of Diagnostic Pathology*, 2016, 23(10):779-783. (in Chinese)
- [19] 于洋, 顾玉州, 刘俊, 等. Anxa2, Stat3 在口腔鳞状细胞癌中的表达及意义 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(17):3249-3252.

- YU Y, GU Y Z, LIU J, et al. Expression and significance of Anxa2 and Stat3 protein in oral squamous cell carcinoma tissue [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16(17): 3249-3252. (in Chinese)
- [20] ZHANG H J, YAO D F, YAO M, et al. Expression characteristics and diagnostic value of annexin A2 in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(41): 5897-5904.
- [21] LI X L, ZHENG S T, LIU Q, et al. Under-expression of annexin A2 is associated with Kazakh's esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Mol Carcinog*, 2015, 54(9): 779-788.
- [22] DEMMER J, ZHOU C M, HUBBARD M J. Molecular cloning of ERp29, a novel and widely expressed resident of the endoplasmic reticulum [J]. *FEBS Lett*, 1997, 402(2-3): 145-150.
- [23] MKRTCHIAN S, FANG C, HELLMAN U, et al. A stress-inducible rat liver endoplasmic reticulum protein, ERp29 [J]. *FEBS J*, 1998, 251(1-2): 304-313.
- [24] SARGSYAN E, BARYSHEV M, BACKLUND M, et al. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding a putative endoplasmic reticulum chaperone, ERp29 [J]. *Gene*, 2002, 285(1-2): 127-139.
- [25] ZHANG D H, RICHARDSON D R. Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29): An emerging role in cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(1): 33-36.
- [26] 桑 旭. 内质网分子伴侣 29(ERp29)在胃癌中的表达特点及临床意义研究 [D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2013.
- SANG X. Endoplasmic reticulum molecular chaperons 29 (ERp29) expression characteristics and clinical significance of gastric [D]. Bengbu: Bengbu Medical College, 2013. (in Chinese)
- [27] CHERETIS C, DIETRICH F, CHATZISTAMOU I, et al. Expression of ERp29, an endoplasmic reticulum secretion factor in basal-cell carcinoma [J]. *Am J Dermatopathol*, 2006, 28(5): 410-412.
- [28] 韩娉怡. ERp29 与 Arp3 在原发性肝细胞癌中的表达和意义 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- HAN P Y. The expression of ERp29 and Arp3 in hepatic carcinoma and their significances [D]. Changsha: Central South University, 2012. (in Chinese)

(编辑 程金华)