

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.10.007

文章编号: 1005-8982(2016)10-0031-05

论著

## 膜联蛋白 A1 和 CA19-9 在胆管癌中的表达及其临床意义

李辽<sup>1</sup>, 王金<sup>2</sup>, 尚培中<sup>2</sup>

(1.河北北方学院,河北 张家口 075000;2.解放军第二五一医院 普通外科,河北 张家口 075000)

**摘要:目的** 观察膜联蛋白 A1(Annexin A1)和肿瘤特异性大分子糖蛋白抗原 CA19-9 在胆管癌中的表达,探讨两者与胆管癌临床病理特征之间的关系。**方法** 采用免疫组织化学检测 54 例胆管癌术后标本(癌组织和癌旁组织)及 15 例非肿瘤胆管组织中 Annexin A1 和 CA19-9 的表达,分析两者与临床病理特征的关系。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)分别检测 24 例健康志愿者、24 例胆管结石患者、24 例胆管癌患者血清中 Annexin A1 和 CA19-9 的表达情况。**结果** 胆管癌组织中 Annexin A1 和 CA19-9 表达的阳性率显著高于癌旁组织和非肿瘤胆管组织( $P < 0.05$ )。Annexin A1 的表达状态与胆管癌的临床病理分期、组织学分级及淋巴结转移有关( $P < 0.05$ ),而与患者发病年龄、肿瘤大小无关( $P > 0.05$ );CA19-9 的表达与胆管癌的淋巴结转移有关( $P < 0.05$ ),而与患者发病年龄、肿瘤大小、临床病理分期及组织学分级无关( $P > 0.05$ )。Annexin A1 和 CA19-9 在胆管癌组织中的表达呈正相关( $r = 0.356, P < 0.05$ )。ELISA 结果表明,胆管癌患者组血清中 Annexin A1 和 CA19-9 表达含量高于胆管结石患者组及健康人组( $P < 0.05$ )。Annexin A1 和 CA19-9 在胆管癌术前与术后血清中的表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** Annexin A1 和 CA19-9 与胆管癌的发生、发展和淋巴结转移有关,联合检测可为胆管癌诊断及预后判断提供一定的参考价值。

**关键词:** 胆管癌;Annexin A1;CA19-9

**中图分类号:** R735.8

**文献标识码:** A

## Expressions of Annexin A1 and CA19-9 in cholangiocarcinoma and their clinicopathological significance

Liao Li<sup>1</sup>, Jin Wang<sup>2</sup>, Pei-zhong Shang<sup>2</sup>

(1. Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China; 2. Department of General Surgery, the 251st Hospital of PLA, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expressions of Annexin A1 and CA19-9 in cholangiocarcinoma and their correlations with clinical and pathological features. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expressions of Annexin A1 and CA19-9 in 54 samples of cholangiocarcinoma and the surrounding tissues and 15 samples of non-carcinoma bile duct tissue. Statistical analysis was performed with reference to the related clinical and pathological features. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expressions of Annexin A1 and CA19-9 in the serum of 24 healthy volunteers, 24 patients with bile duct stones and 24 cases of bile duct carcinoma. **Results** The positive expression rates of Annexin A1 and CA19-9 in the cholangiocarcinoma were significantly higher than those in the peri-carcinoma tissue and non-carcinoma bile duct tissue ( $P < 0.05$ ). The positive expression of Annexin A1 was correlated with the pathological grades, clinical stages and lymph node metastasis of cholangiocarcinoma ( $P < 0.05$ ). The positive expression of CA19-9 was correlated with the lymph node metastasis of cholangiocarcinoma ( $P < 0.05$ ). The expression of Annexin A1 in the cholangiocarcinoma was positively

收稿日期:2015-12-02

[通信作者] 尚培中, E-mail: spz251@163.com; Tel: 18903138087

correlated with that of CA19-9 ( $r = 0.356, P < 0.05$ ). The results of ELISA indicated that the expressions of Annexin A1 and CA19-9 in serum of the cholangiocarcinoma patients were significantly higher than those in the patients with bile duct stones and the healthy volunteers ( $P < 0.05$ ). In the cholangiocarcinoma patients, the expressions of Annexin A1 and CA19-9 before operation had significant differences from those after operation ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The positive expressions of Annexin A1 and CA19-9 may be correlated with carcinogenesis, development and lymph node metastasis of cholangiocarcinoma. The combined detection of the above markers possibly has certain referential value in diagnosis of cholangiocarcinoma and its prognosis.

**Keywords:** cholangiocarcinoma; Annexin A1; CA19-9

胆管癌是一种起源于肝内或肝外胆管上皮的恶性肿瘤,其发生率约占消化道肿瘤的 3%,近年来全球发病率及死亡率均有所上升<sup>[1-2]</sup>。随着影像技术的发展,临床上对胆管癌的诊断取得长足进步,但是在新的肿瘤标志物研究方面仍是进展缓慢。从分子生物学角度寻求更好、更精确的指标是目前研究的热点。Annexin A1 是膜联蛋白家族中的一员,具有钙依赖性磷脂结合功能,参与炎症反应、细胞周期调控、增殖、分化和凋亡等多种生物学行为<sup>[3]</sup>。近来研究表明,Annexin A1 与多种肿瘤的发生、发展、转移及预后相关。CA19-9 是一种含黏液成分的肿瘤特异性大分子糖蛋白抗原(carbohydrate antigen, CA),在胆胰恶性肿瘤的诊断中具有较高的敏感性和特异性,对于肿瘤的转归、复发和预后是一个有价值的指标<sup>[4]</sup>。本研究采用免疫组织化学和酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)联合检测 Annexin A1 和 CA19-9 在胆管癌中的表达,探讨 Annexin A1 和 CA19-9 与胆管的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 组织标本

选取 2010 年 2 月 -2014 年 1 月解放军第二五一医院 54 例胆管癌手术切除后的蜡块标本为胆管癌组织。其中,男性 34 例,女性 20 例,男女比例 1.7 : 1,年龄 43 ~ 82 岁,平均年龄(60.370 ± 1.249)岁。临床及病理资料齐全,术前均未接受放疗、化疗及其他针对肿瘤的治疗,术后病理组织学诊断均为腺癌。按世界卫生组织分类标准进行组织学分级<sup>[5]</sup>:高分化 22 例、中分化 24 例、低分化 8 例。临床分期参照美国癌症联合委员会 TNM 分期 2010 版<sup>[6]</sup>进行,其中 I 期 9 例、II 期 16 例、III 期 12 例、IV 期 17 例。选取距离肿瘤边缘 ≥ 1 cm 经病理证实为不典型增生组织为癌旁组织。同时取 15 例为非肿瘤胆管组织。胆管损伤、胆管囊肿患者的胆管组织标本。

### 1.2 血清标本

收集 2014 年 8 月 -2015 年 4 月间在解放军第二五一医院就诊的胆管癌患者 24 例为胆管癌组,选取同期在该院就诊胆管结石患者 24 例为胆管结石组,另外收集 24 例在该院体检中心经化验各项指标均正常体检者血清为健康组。所有患者在血清标本采集前均未行放疗及化疗,所有病例资料完整。

### 1.3 试剂

鼠抗人 Annexin A1 免疫组织化学单克隆抗体(浓缩型),Annexin A1 酶联免疫分析试剂盒,鼠抗人 CA19-9 免疫组织化学单克隆抗体(即用型),CA19-9 酶联免疫分析试剂盒均系美国 Cloud-Clone Corp 公司;EliVision™ plus 二步法免疫组织化学染色试剂盒,二氨基联苯胺(DAB)显色液均系福州迈新生物技术开发有限公司。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 免疫组织化学 EliVision™ plus 二步法** 所有组织标本均经 10% 中性甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,免疫组织化学染色步骤按试剂盒说明书进行操作,以磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照组,以公司提供的阳性切片作阳性对照组。

**1.4.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)** 抽取患者初诊治疗前 1 天晨起空腹静脉血 5 ml,3 500 r/min 离心 15 min,提取上层血清,置于 -20℃ 冰箱冷冻保存备用,再于患者手术后第 10 天抽取晨起空腹静脉血 5 ml,按上述方法保存。标本成批检测,血清无溶血、脂浊。所有操作严格按试剂盒说明书进行操作。

### 1.5 结果判定

免疫组织化学染色结果通过双盲法评价,确定染色结果。Annexin A1 以细胞浆或细胞膜或两者同时出现棕黄色沉着为阳性信号;CA19-9 以细胞浆或细胞膜上出现棕黄色沉着为阳性表达,根据阳性细胞显色强度和百分数进行分析,依据阳性细胞显色程度计分:无显色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。依据显色细胞阳性百分比计分:高倍视野下每张切片随机选取 5 个视野,每个

视野计数 100 个肿瘤细胞,计算阳性细胞数占肿瘤细胞总计数百分比,无或阳性细胞 <10% 记为 0 分,10% ~ 25% 记为 1 分,25% ~ 50% 记为 2 分,>75% 记为 3 分。将两个分值相加,0 ~ 1 分为阴性(-),2 ~ 3 分为弱阳性(+),4 ~ 5 分为阳性(++),5 分以上为强阳性(+++)。

ELISA 试验使用北京普朗公司生产的 DNM-9602 标准规格酶标仪检测,以标准物浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,选择拟合系数(即“r”值)最好的曲线方程对测得数据进行分析。

### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,ELISA 试验中多组计量资料用方差分析,术前与术后比较用配对 *t* 检验,免疫组织化学中 Annexin A1 和 CA19-9 的表达及其与胆管癌临床病理特征分析用  $\chi^2$  检验,Spearman 相关分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Annexin A1 和 CA19-9 在胆管癌不同组织中的表达

在胆管癌、胆管癌旁和非肿瘤胆管 3 种不同组织中,Annexin A1 的阳性表达率分别为 70.37%(38/54),33.33%(18/54),6.67%(1/15),各组间比较差异有统计学意义( $\chi^2=25.709, P < 0.05$ );CA19-9 的阳

性表达率分别为 74.07%(40/54),38.89%(21/54),13.33%(2/15),各组间比较差异有统计学意义( $\chi^2=23.192, P < 0.05$ )。见图 1、2 和表 1。

### 2.2 Annexin A1 和 CA19-9 的表达水平与胆管癌患者临床病理特征关系

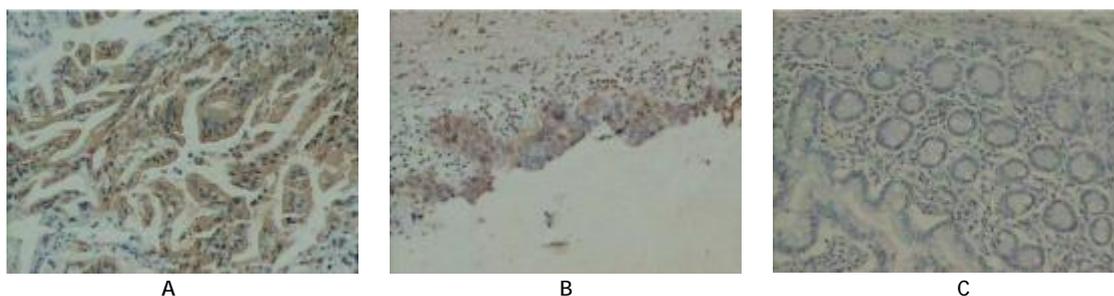
54 例胆管癌患者中,Annexin A1 的表达与肿瘤的分化程度、TNM 分期、淋巴结转移有关( $P < 0.05$ ),而与患者年龄、肿瘤大小无关( $P > 0.05$ );CA19-9 的表达则与淋巴结转移有关( $P < 0.05$ ),而与患者年龄、肿瘤大小、肿瘤的分化程度、TNM 分期无关( $P > 0.05$ )。见表 2。

### 2.3 胆管癌中 Annexin A1 和 CA19-9 表达之间的关系

38 例 Annexin A1 阳性表达的胆管癌组织中,同时有 CA19-9 阳性表达 32 例,共阳率为 59.26%,在 16 例 Annexin A1 阴性表达的标本中,同时有 CA19-9 阴性表达 8 例,共阴率为 14.81%。经 Spearman 相关分析,Annexin A1 和 CA19-9 在胆管癌中的表达呈正相关,两者相关系数差异有统计学意义( $r=0.356, P=0.008 < 0.05$ )。见表 3。

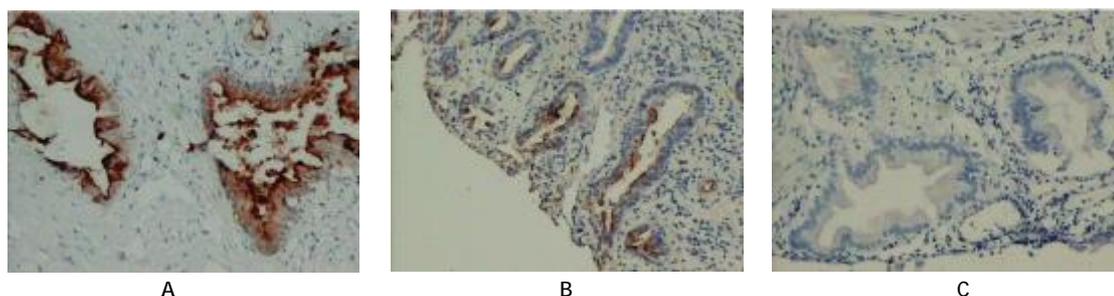
### 2.4 3 组血清标本中 Annexin A1 和 CA19-9 的含量

胆管癌组血清 Annexin A1、CA19-9 表达水平明显高于胆管结石组及健康组,差异有统计学意义(Annexin A1:  $F=68.525, P=0.000$ ; CA19-9:  $F=$



A:胆管癌组织;B:癌旁组织;C:非肿瘤胆管组织

图 1 Annexin A1 在胆管组织中的表达 (EliVision™ plus × 100)



A:胆管癌组织;B:癌旁组织;C:非肿瘤胆管组织

图 2 CA19-9 在胆管组织中的表达 (EliVision™ plus × 100)

135.333,  $P=0.000$ ); 在胆管结石组血清中 Annexin A1 的表达水平略高于健康组, 两者差异无统计学意义 ( $P=0.660$ ); CA19-9 在胆管结石患者血清中的表达水平高于健康组, 但两者差异也无统计学意义 ( $P=0.731$ )。见表 4。

### 2.5 胆管癌组手术前后血清中 Annexin A1 和 CA19-9 的含量

胆管癌组患者手术前血清中 Annexin A1 和 CA19-9 的含量均高于手术后, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见表 5。

表 1 Annexin A1 和 CA19-9 在不同胆管组织中的表达 例(%)

组别	Annexin A1				CA19-9			
	阳性	阴性	$\chi^2$ 值	P 值	阳性	阴性	$\chi^2$ 值	P 值
胆管癌组织 (n=54)	38(70.37)	16(29.63)			40(74.07)	14(25.93)		
癌旁组织 (n=54)	18(33.33)	36(66.67)	25.709	0.000	21(38.89)	33(61.11)	23.192	0.000
非肿瘤胆管组织 (n=15)	1(6.67)	14(93.33)			2(13.33)	13(86.67)		

表 2 胆管癌组织中 Annexin A1、CA19-9 表达与临床病理特征的关系 例(%)

临床病理特征	例数	Annexin A1			CA19-9		
		阳性	$\chi^2$ 值	P 值	阳性	$\chi^2$ 值	P 值
<b>年龄</b>							
≤60 岁	23	15(65.21)	0.510	0.475	16(69.57)	0.424	0.515
>60 岁	31	23(74.19)			24(77.42)		
<b>肿瘤大小</b>							
≤2 cm	26	16(61.53)	1.876	0.171	17(65.38)	1.971	0.160
>2 cm	28	22(78.57)			23(82.14)		
<b>分化程度</b>							
高分化	22	10(45.45)	11.054	0.001	14(63.64)	2.106	0.147
中+低分化	32	28(87.50)			26(81.25)		
<b>TNM 分期</b>							
I+II	25	14(56.00)	4.611	0.032	16(64.00)	2.460	0.117
III+IV	29	24(82.76)			24(82.76)		
<b>淋巴结转移</b>							
有	18	16(88.89)	4.441	0.035	17(94.44)	5.834	0.016
无	36	22(61.11)			23(63.89)		

表 3 Annexin A1 和 CA19-9 在胆管癌中表达的关系 例

Annexin A1	CA19-9		合计
	阳性	阴性	
阳性	32	6	38
阴性	8	8	16
合计	40	14	54

表 4 3 组血清中 Annexin A1、CA19-9 的含量 ( $n=24, \bar{x} \pm s$ )

组别	Annexin A1/(ng/ml)	CA19-9/(u/ml)
胆管癌组	6.314 ± 2.957	21.558 ± 8.250
胆管结石组	1.328 ± 0.444	2.088 ± 0.711
健康组	1.105 ± 0.416	1.610 ± 0.584

表 5 胆管癌患者手术前后 Annexin A1、CA19-9 的含量 ( $n=24, \bar{x} \pm s$ )

组别	Annexin A1/(ng/ml)	CA19-9/(u/ml)
术前	6.314 ± 2.957	21.558 ± 8.250
术后	5.389 ± 2.025	12.131 ± 0.886
t 值	3.199	9.543
P 值	0.004	0.000

### 3 讨论

胆管癌的发生、发展建立在机体本身遗传因素与环境因素相互作用的基础上, 是一个多阶段、多基因协同参与的过程。Annexin A1 是一类钙依赖性磷脂结合蛋白, 其 N- 末端含有多个潜在的磷酸化位

点,具有调控 Annexin A1 与其他蛋白相互作用的功能,能够与表皮生长因子受体结合,通过 MAPK/ERK 信号通路影响蛋白质复合物形成和活性,抑制细胞周期 D1 期表达,减少细胞增殖<sup>[7-9]</sup>。Annexin A1 的异常表达可造成细胞生长紊乱,从而影响肿瘤的发生,而其在多种恶性肿瘤组织中也存在不同的表达<sup>[10-11]</sup>。Annexin A1 在胃食管交界处腺癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌中表达增强,在鼻咽癌、头颈部鳞癌、食管鳞状细胞癌、前列腺癌中表达降低,该表达水平迥异未发现明显规律,依目前的研究统计发现,其在鳞状细胞癌中多表达降低,而在腺癌组织中表达多呈升高趋势。本研究中采用免疫组织化学法检测 Annexin A1 主要表达于胆管癌细胞的胞浆和胞膜中,并且在癌组织中阳性表达率明显高于癌旁不典型增生组织和非肿瘤胆管组织。在 Annexin A1 与胆管癌的临床病理特征之间的关系中,笔者发现,临床 TNM 分期越晚的病理 Annexin A1 阳性率越高;病理分化越低的组织中,Annexin A1 表达越高;在伴有淋巴结转移组中,Annexin A1 表达高于不伴有淋巴结转移组。提示 Annexin A1 在正常胆管组织中有一定的生理作用,而且参与正常胆管上皮到恶性肿瘤的演变过程。

CA19-9 是一种糖链抗原,由单克隆抗体 116NS 19-9 识别,在血清中表达为黏蛋白糖脂,在组织中表达为单涎酸神经节糖苷脂<sup>[12]</sup>。可分布在正常人的胰腺、胆管上皮等处,是目前临床上用于诊断胆管癌、胰腺癌最重要的指标,敏感性高<sup>[13]</sup>。在本研究中发现,胆管癌组织中 CA19-9 的表达水平由非肿瘤胆管组织、癌旁组织到胆管癌组织呈增强趋势,无淋巴结转移的胆管癌组织中 CA19-9 表达低于伴有淋巴结转移组,提示 CA19-9 与胆管癌的发生和淋巴结转移有关。

此外,笔者在对 3 组不同血清检测发现,胆管癌组中 Annexin A1、CA19-9 的表达均明显高于胆管结石组和健康组,再次验证两者在胆管癌的发生和发展中起着一定作用。杨尽晖等报道中<sup>[14]</sup>,CA19-9 作为胆管癌诊断的一个重要指标,血清中的敏感性为 79%,特异性为 89%,且在行手术切除后,患者血清中 CA19-9 明显下降。而目前关于 Annexin A1 在血清含量及其降解的研究较少。本实验中发现,Annexin A1 在胆管癌组术前的表达高于术后。由此笔者推测两者可作为胆管癌、手术诊断、手术效果

判定及肿瘤转移复发的辅助指标。

综上所述,笔者通过免疫组织化学和酶联免疫吸附试验发现,Annexin A1 在胆管癌中的高表达提示其可能成为肿瘤治疗的一个新的干预靶点,调控其表达或其介导的信号转导通路<sup>[15]</sup>,并由此发现治疗胆管癌的新药物。联合检测 Annexin A1 和 CA19-9 的表达,可为胆管癌诊断及预后评估提供参考依据。

#### 参 考 文 献:

- [1] BERTUCCIO P, BOSETTI C, LEVI F, et al. A comparison of trends in mortality from primary liver cancer and intrahepatic cholangiocarcinoma in Europe[J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(6): 1667-1674.
- [2] MARONI L, PIERANTONELLI I, BANALES JM, et al. The significance of genetics for cholangiocarcinoma development[J]. *Ann Transl Med*, 2013, 1(3): 28.
- [3] 李辽,尚培中.膜联蛋白 A1 在消化系统肿瘤中的研究进展[J]. *中国现代普通外科进展*, 2015, 18(7): 543-546.
- [4] 吴伟,王少峰.血清 CA19-9 检测对胆胰疾病的诊断价值[J]. *中国现代医药杂志*, 2012, 14(6): 4-6.
- [5] FRED TB, RALPH HH, 著. 崔全才, 孟宇宏, 译. 消化系统肿瘤 WHO 分类, 世界卫生组织肿瘤分类及诊断标准系列[M]. 北京: 诊断病理学杂志社, 2012: 411-520.
- [6] 徐贵升, 王育盛, 王沐廷, 等. NCCN 肝胆癌临床指引(2010.1 版)[J]. *循证医学*, 2010, 10(5): 294-314.
- [7] D'ACUNTO C W, GBELCOVA H, FESTA M, et al. The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(1): 173-178.
- [8] YANG Y, LI XJ, CHEN Z, et al. Wogonin induced calreticulin/annexin A1 exposure dictates the immunogenicity of cancer cells in a PERK/AKT dependent manner [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): Doi: 10.1371/journal.pone.0050811.
- [9] GREWAL T, ENRICH C. Annexins-modulators of EGF receptor signalling and trafficking[J]. *Cell Signal*, 2009, 21(6): 847-858.
- [10] RONG B X, CAI X G, YANG S Y. Annexin A1 in malignant tumors: current opinions and controversies[J]. *Int J Biol Markers*, 2014, 29(1): e8-20.
- [11] MUSSUNOOR S, MURRAY G I. The role of annexins in tumour development and progression[J]. *J Pathol*. 2008, 216(2): 131-140.
- [12] 许国彩. CA19-9 在消化道疾病中的应用 [J]. *青海医药杂志*, 2015, 45(3): 77-80.
- [13] 夏雷, 马优钢, 吴孟超, 等. 血清 CA19-9 在胆道系统疾病中的临床意义[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2008, 14(3): 170-172.
- [14] 杨尽晖, 蒋波, 吴金术, 等. 肿瘤标志物 CEA、CA19-9 联合检测在胆管癌诊治中的价值[J]. *中国医师杂志*, 2005, 7(4): 552-553.
- [15] 张晓娜, 张学彦, 曹秀红. 膜联蛋白 A1 与消化系统肿瘤关系的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(20): 2160-2165.

(张蕾 编辑)