膜联蛋白 A1 基因的表达与胆囊癌临床病理的关系及调控信号转导与转录因子 3 信号通路对胆囊癌细胞增殖凋亡的影响

江若霞[1],赵丽敏[2]

(1. 河南医学高等专科学校医学系,河南 郑州 451191;
2. 河南大学附属郑州市第一人民医院病理科,河南 郑州 450004)

摘要:目的 探讨膜联蛋白 A1(ANXA1)基因的表达与胆囊癌临床病理的关系及调控信号转导与转录因子 3(STAT3)信号通路对胆囊癌细胞增殖凋亡的影响及其机制。**方法** 应用免疫组化法检测 100 例胆囊癌组织中 ANXA1 基因的阳性表达,分析其与临床病理特征的关系。培养人胆囊癌 GBC-SD 细胞,分别将 ANXA1 小干扰 RNA(ANXA1-siRNA)和阴性对照(siRNA-NC)转染细胞,以空脂质体转染的细胞作为对照组,蛋白质印迹法(Western blot)检测转染效果;细胞转染后培养 48 h,细胞计数试剂盒(CCK8)检测细胞增殖;流式细胞仪检测细胞凋亡;蛋白质印迹法检测活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Cleaved Caspase-3)、STAT3、磷酸化的信号转导与转录因子 3(p-STAT3)蛋白表达。**结果** ANXA1 基因在胆囊癌中的阳性表达率显著高于癌旁组织(69.0% 比 7.5%,$\chi^2=43.261$,$P<0.01$);ANXA1 在胆囊癌中的表达与性别和年龄不相关($P>0.05$),与肿瘤的分化程度、临床分期、淋巴转移显著相关($P<0.01$)。siRNA-NC 组中 ANXA1、Cleaved caspase3、STAT3、p-STAT3蛋白表达、细胞存活率、细胞凋亡率与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);ANXA1-siRNA 组 ANXA1 蛋白表达、细胞存活率及 p-STAT3 蛋白表达显著低于对照组($P<0.01$),细胞凋亡率及 Cleaved caspase3 蛋白表达显著高于对照组($P<0.01$),STAT3 蛋白表达在三个组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** ANXA1 基因的表达参与了胆囊癌的生长、分化和迁移过程,下调 ANXA1 的表达能抑制人胆囊癌 GBC-SD 细胞的增殖,并通过下调 Cleaved caspase3 蛋白促进细胞凋亡,其机制与 STAT3 信号通路的调控有关。

关键词:膜联蛋白 A1;胆囊肿瘤;STAT3 转录因子;细胞增殖

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.06.020

The relationship between the expression of ANXA1 gene and the clinical pathology of gallbladder carcinoma and the effect of STAT3 signaling pathway on the proliferation and apoptosis of gallbladder cancer cells

JIANG Ruoxia[1],ZHAO Limin[2]

(1. *Department of Medicine,He'nan Medical College,Zhengzhou,He'nan* 451191,*China*;2. *Department of Pathology,The First People's Hospital of Zhengzhou Affiliated to He'nan University,Zhengzhou,He'nan* 450004,*China*)

Abstract:Objective To investigate the relationship between the expression of annexin A1 (ANXA1) gene and the clinical pathology of gallbladder carcinoma and the effect of signal transduction and transcription factor 3 (STAT3) signaling pathway on the proliferation and apoptosis of gallbladder cancer cells. **Methods** The expression of ANXA1 in 100 cases of gallbladder carcinoma was detected by immunohistochemical method,and the relationship between the expression of the ANXA1 gene and the clinical pathological characteristics was analyzed. Human gallbladder carcinoma GBC-SD cells were cultured,ANXA1 small interfering RNA (ANXA1-siRNA) and negative control (siRNA-NC) were transfected respectively into cells,and with empty liposomes transfected cells as the control group,Western blot was used to detect the transfection effect;cells were cultured for 48h,cell proliferation was detected by CCK-8;cell apoptosis was detected by flow cytometry;the expressions of Cleaved Caspase3,p-STAT3,STAT3 protein were detected by Western blot. **Results** The positive expression of ANXA1 gene in gallbladder carcinoma was significantly higher than those in the adjacent tissues (69.0% *vs* 7.5%,$\chi^2=43.261$,$P<0.01$);the expression of ANXA1 in gallbladder carcinoma was not related to gender and age ($P>0.05$),and the degree of tumor differentiation,clinical stage,lymph node metastasis was significantly correlated ($P<0.01$);the expression of ANXA1,Cleaved Caspase3,STAT3,p-STAT3 protein ,cell survival rate,and the apoptosis rate in siRNA-NC group were not significantly different compared with control group ($P>0.05$) and the protein expression of p-STAT3 in ANXA1-siRNA group were significantly lower than the control group($P<0.01$),the apoptosis rate and the expression of Cleaved Caspase3 protein were significantly higher than the control group ($P<0.01$);the expression of STAT3 protein was not significantly different among the three group

($P>0.05$). **Conclusions** The expression of ANXA1 gene is involved in the growth, differentiation and migration process of gallbladder carcinoma. Down-regulating the expression of ANXA1 can inhibit the proliferation of GBC-SD cells in human gallbladder carcinoma, and promote cell apoptosis by down-regulating Cleaved Caspase3 protein, and its mechanism is related to the regulation of STAT3 signaling pathway.

Keywords: Annexin A1; Gallbladder neoplasms; STAT3 transcription factor; Cell proliferation

胆囊癌是常见的消化系统恶性肿瘤,发病的机制及病因复杂,诊断困难,但大部分患者在确诊时已处于晚期,手术的切除率很低[1]。因此,寻找诊断和预防的方法进行早期治疗具有重要意义。膜联蛋白 A1(annexin A1,ANXA1)是钙离子依赖磷脂蛋白结合家族中的一员,其具有参与调控炎性反应、凝血过程、钙离子通道的形成、细胞的凋亡和分化等多种生物学功能[2-4]。研究显示,ANXA1 在胃癌、结肠癌、肝癌等肿瘤中表达增强,而在前列腺癌、宫颈癌等肿瘤中表达降低[5-6],这说明 ANXA1 在肿瘤的发生中具有重要影响。鉴于此,本研究通过免疫组化检测 ANXA1 在胆囊癌中表达,研究其对胆囊癌细胞增殖凋亡的影响及机制,以期为胆囊癌的诊断和治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 材料

1.1.1 *一般资料* 收集河南大学附属郑州市第一人民医院 2014 年 8 月至 2016 年 8 月期间进行胆囊癌切除手术的患者 100 例,其中男性 40 例,女性 60 例,年龄范围 31 ~85 岁,平均年龄为 65.82 岁。术前未行放化疗,术后病理报告均为腺癌。术后按照常规的病理学检查确定组织学类型、肿瘤的分化程度。按照 WHO 的分级标准分为高(G1,18 例)、中(G2,42 例)、低(G3,36 例)分化组和未分化组(G4,4 例)。病理分期按照 Nevin 标准分为五期,其中 0 期 4 例,Ⅰ期 23 例,Ⅱ期 34 例,Ⅲ期 20 例,Ⅳ期 19 例。无淋巴转移 41 例,有淋巴转移 59 例。从 100 例胆囊癌组织腊块标本中随机抽取 40 例,取癌旁组织作为对照组,其中男性 15 例,女性 25 例,平均年龄为61.26 岁。所有的样品采集均经过患者及其近亲属的知情同意及河南大学附属郑州市第一人民医院医学伦理委员会审核通过。

1.1.2 *细胞* 人胆囊癌 GBC-SD 细胞株购自郑州大学。

1.1.3 *主要试剂和仪器* 胎牛血清、胰酶、青链霉素均购自美国 Gibco 公司;活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3,Cleaved Caspase-3)、信号转导与转录因子 3(Signal transducers and activators of transcription 3,STAT3)、磷酸化的信号转导与转录因子 3(Phosphorylated Signal transducers and activators of transcription 3,p-STAT3)单克隆抗体及 ANXA1 多克隆抗体和辣根过氧化物标记的二抗均购自美国 abcam公司;小干扰 RNA-阴性对照(siRNA-NC)组、ANXA1-siRNA 购自上海生工生物工程有限公司;DAB 显色试剂盒购自 TIANGEN BIOTECH 北京有限公司;Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购自碧云天生物技术研究所;细胞计数(Cell Counting Kit-8,CCK8)试剂盒购自日本 Dongji 公司;二氧化碳细胞培养箱购自德国 Heraeus 公司;酶标仪购自 TECAN 公司;流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司。

1.2 方法

1.2.1 *免疫组化及结果判定* 将厚度为 4 μm 的蜡块切片放置于载玻片上,室温条件下去除液体,脱蜡过程使用二甲苯,脱水过程使用酒精,在 3% 双氧水条件下孵育 20 min 后,用 0.1% 的胰蛋白酶消化反应 15 min,PH7.4 的 PBS 洗涤 3 遍,甩去 PBS 液,加入 1∶80 稀释的 ANXA1 多克隆抗体,孵育 70 min,重新清洗 3 次,加入辣根过氧化物标记的山羊抗兔,DAB 显色,苏木精复染,乙醇脱水,二甲苯Ⅰ、Ⅱ分别浸泡 2 min、5 min,中性树胶封片。PBS 作为阴性对照,相应抗体的阳性切片作为阳性对照。以 Olympus 数码显微成像系统进行采集、分析。随机选择 10 个视野,400 倍观察,测定每个视野下阳性反应的平均吸光度值(IOD),根据 IOD 统计阳性细胞的比例。

1.2.2 *细胞培养* 取出保存于液氮罐中的人胆囊癌 GBC-SD 细胞株,置于 37 ℃的水浴锅中溶解,转移溶解的细胞至一个新的离心管中,向离心管中加入含有 10% 胎牛血清、100 mg · L^{-1} 链霉素和 1 × 10^5 U · L^{-1} 青霉素的 RPMI1640 培养基,1 000 r · min^{-1} 离心 5 min,弃上清,加入细胞培养液悬浮细胞,接种至细胞培养瓶中,置于 37 ℃,5% 二氧化碳培养箱中培养。细胞长满皿底 90% 以上时,0.25% 胰酶消化细胞,用完全培养基终止消化,按照实验需要进行传代。细胞进入对数生长期再用于实验研究。

1.2.3 *细胞转染* 将生长至对数期的人胆囊癌 GBC-SD 细胞株以 10^6 个/毫升每孔加 2 mL 接种于

6 孔细胞培养板中。细胞培养 24 h 后,按照 Lipofectamine 2000转染说明将 siRNA-NC(转染对照)、ANXA1-siRNA 转染到细胞内,各转染 100 nmol·L^{-1},对照组不转染,将各组细胞与培养基充分混合后加入到人胆囊癌 GBC-SD 细胞,置于 37 ℃,5% 二氧化碳培养箱中培养 4 h,观察到细胞融合度达到 80% 以上时,用不含血清的 RPMI1640 培养基继续培养细胞 24 h,更换成含血清的 RPMI1640 培养基继续培养。

1.2.4 *转染效果检测* 取生长至对数期的上述三组细胞,1 000 r·min^{-1},离心 5 min,加入适量的 Trizol 置于冰上裂解反应 30 min 后,4 ℃,14 000 r·min^{-1},离心 15 min,吸取蛋白上清液,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)试剂盒检测提取的蛋白浓度。将蛋白样品和上样缓冲液充分混匀,100 ℃条件下变性 5 min,将蛋白加入到 SDS-PAGE 凝胶孔中进行电泳,电泳结束后 4 ℃转膜 1.5 h,5% 的脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 2 h,以 1∶500 稀释的 ANXA1 单克隆抗体作为一抗,4 ℃孵育过夜,TBST 清洗后加入 1∶1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,37 ℃孵育 1 h,TBST 清洗后加入增强型化学法(ECL)发光剂显影,自动凝胶成像系统采集图像。以 GAPDH 作为内参,分析蛋白表达水平。

1.2.5 *细胞增殖检测* 将生长至对数期的上述三组细胞,以 5×10^3 个/毫升每孔 100 μL 细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中,置于 37 ℃,5% 二氧化碳浓度培养箱中培养 48 h 后,向每孔细胞中加入 10 μL CCK8 溶液,置于 37 ℃,5% 二氧化碳培养箱孵育 3 h,酶标仪在波长为 490 nm 处测定并记录 OD 值,计算细胞增殖率。细胞增殖率 =(转染组细胞 OD/对照组细胞 OD)×100%

1.2.6 *细胞凋亡检测* 取上述三组细胞,0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,调整细胞浓度为每毫升还有 2×10^5 个细胞,接种细胞至 96 孔细胞培养板中培养 48 h 后,取 1 mL 细胞悬液转移至离心管中,4 ℃,1 000 r·min^{-1},离心 8 min,弃上清,洗涤细胞后加入 200 μL 结合缓冲液,然后加入 PI 和 Annexin-V 各 5 μL,室温避光条件下反应 20 min 后,再加入 400 μL 结合缓冲液,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.7 *蛋白质印迹法检测 STAT3、p-STAT3 蛋白表达* 取上述三组细胞,按照 1.2.4 的方法检测 STAT3、p-STAT3 蛋白表达。

1.3 统计学方法 数据采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。观测资料中的计量数据,组间比较用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ANXA1 基因在胆囊癌及癌旁组织中的表达 ANXA1 在胆囊癌中阳性表达 69 例,阳性率为 69.0%,对照组阳性表达 3 例,阳性率为 7.5%,两组之间 ANXA1 阳性表达差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

表 1 ANXA1 基因在胆囊癌及癌旁组织中的表达/例

组别	例数	ANXA1 表达	
		阳性	阴性
对照组	40	3	37
胆囊癌组	100	69[a]	31

注:两组比较,[a]$\chi^2=43.261$,$P<0.01$

2.2 ANXA1 表达与胆囊癌临床病理参数之间的关系 如表 2 所示,ANXA1 在胆囊癌中的表达与性别、年龄不相关($P>0.05$),与肿瘤的分化程度、临床分期、淋巴转移显著相关($P<0.01$)。

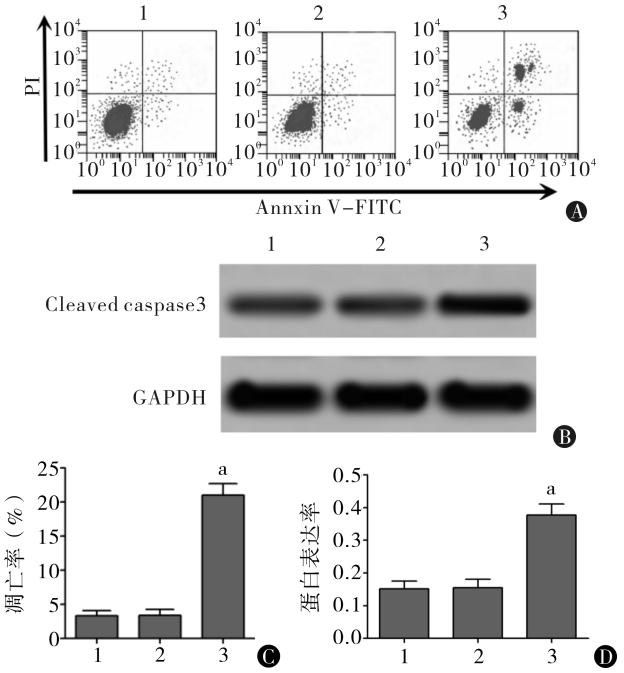
表 2 ANXA1 表达与胆囊癌临床病理参数之间的关系/例(%)

临床参数	例数	ANXA1 蛋白表达		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性		
性别				1.811	0.178
男	40	12(30.0)	28(70.0)		
女	60	26(43.3)	34(56.7)		
年龄				2.118	0.146
≥50 岁	84	65(77.4)	19(22.6)		
<50 岁	16	9(56.3)	7(43.7)		
分化程度				11.196	0.011
G1	18	18(100.0)	0(0.0)		
G2	42	27(61.9)	16(38.1)		
G3	36	28(77.8)	8(22.2)		
G4	4	4(100.0)	0(0.0)		
临床分期				9.902	0.002
淋巴转移				8.612	0.003
有	41	37(90.2)	4(9.8)		
无	59	38(64.4)	21(35.6)		

2.3 转染后细胞中 ANXA1 的表达及对细胞增殖的影响 空脂质体、siRNA-NC、ANXA1-siRNA 转染人胆囊癌 GBC-SD 细胞后培养 48 h,siRNA-NC 组细胞中 ANXA1 蛋白表达率为 0.335±0.031,细胞存活率为(97.02±1.46)%,与对照组[0.342±0.035,(97.15±1.51)%]比较差异无统计学意义($P=0.346$);ANXA1-siRNA 组细胞中 ANXA1 蛋白表达率

为 0.141 ±0.018,细胞存活率为(51.54 ±3.31)%,显著低于对照组(P =0.003 ~0.006)。见图 1。

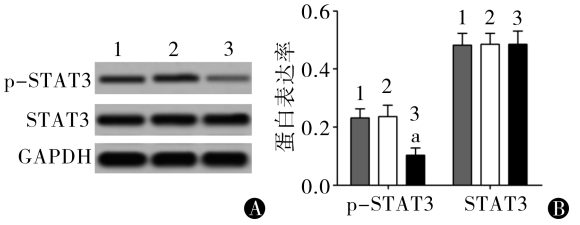
2.4 抑制 ANXA1 的表达促进细胞凋亡 流式细胞仪检测空脂质体、siRNA-NC、ANXA1-siRNA 转染人胆囊癌 GBC-SD 细胞后培养 48 h 的细胞凋亡情况,结果显示,siRNA-NC 组细胞凋亡率为(3.42 ±0.68)%,Cleaved caspase3 蛋白表达率为 0.162 ±0.017,与对照组[(3.35 ±0.62)%,0.154 ±0.015]比较差异无统计学意义(P =0.523);ANXA1-siRNA 组细胞凋亡率为(17.14 ±2.02)%,Cleaved caspase3 蛋白表达为 0.411 ±0.038,显著高于对照组(P =0.002 ~0.005)(图 2)。



注:1 为对照组,2 为 siRNA-NC 组,3 为 ANXA1-siRNA 组;与对照组比较,[a]P =0.002 ~0.005

图 2 抑制 ANXA1 的表达对细胞凋亡的影响:A 为流式细胞仪检测结果;B 为蛋白质印迹法检测结果图;C 为细胞凋亡率;D 为蛋白表达率

2.5 抑制 ANXA1 的表达对 STAT3、p-STAT3 蛋白表达的影响 蛋白质印迹法检测上述三组细胞转染人胆囊癌 GBC-SD 细胞培养 48 h 后的 STAT3、p-STAT3 蛋白表达,结果显示,siRNA-NC 组 STAT3 蛋白表达率为 0.468 ±0.040,p-STAT3 蛋白表达率为 0.220 ±0.031,与对照组(0.462 ±0.039,0.216 ±0.026)比较差异无统计学意义(P =0.421);ANXA1-siRNA 组 p-STAT3 蛋白表达率为 0.094 ±0.011,显著低于对照组(P =0.002 ~0.004),三个组 STAT3 蛋白表达均差异无统计学意义(P =0.332)(图 3)。

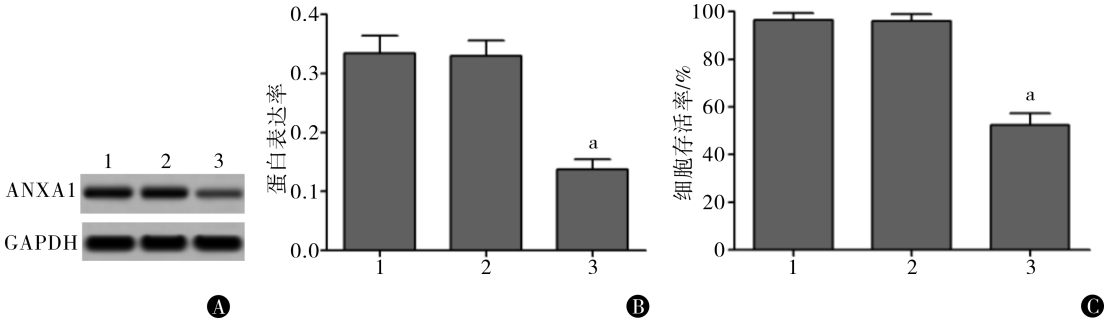


注:1 为对照组,2 为 siRNA-NC 组,3 为 ANXA1-siRNA 组;与对照组比较,[a]P =0.002 ~0.004

图 3 抑制 ANXA1 的表达对 STAT3、p-STAT3 蛋白表达的影响:A 为蛋白质印迹法检测结果图;B 为蛋白表达率

3 讨论

膜联蛋白超家族有 A、B、C、D、E 五组,在人类的组织中仅存在 A 组,A 组有 13 个成员,其中 ANXA1 是最早发现的成员。ANXA1 属于胞质蛋白,在各种细胞内广泛存在,占细胞中蛋白质总含量的 0.5% ~2%,它既可以可溶性的形式存在,也可以稳定或可逆的形式结合在细胞骨架蛋白上[7-8]。其功能具有多样性,包括参与炎性反应、细胞凋亡和分化及信号传递等生命活动,在不同肿瘤中的表达有明显的差异,且在同一种肿瘤的不同形式中也有可能不同。在不同组织中 ANXA1 的不同表达均可引起肿瘤的发生,目前尚无合理的解释[9-11]。



注:1 为对照组,2 为 siRNA-NC 组,3 为 ANXA1-siRNA 组;与对照组比较,[a]P =0.003 ~0.006

图 1 转染后细胞中 ANXA1 的表达及对细胞增殖的影响:A 为蛋白质印迹法检测结果图;B 为 ANXAI 蛋白表达率;C 为细胞存活率

本研究中旨在探究 ANXA1 对胆囊癌发生发展的关系及机制。研究显示,ANXA1 在食管腺癌中高表达,其表达与肿瘤的病理分期及淋巴转移密切相关,ANXA1 的表达越高,肿瘤的分期越高,肿瘤的复发率越高[12]。在鼻咽癌中 ANXA1 低表达,其表达与淋巴转移及远处转移有关[13]。在胃癌的研究中发现 ANXA1 表达越低,肿瘤的恶性程度越高[14]。本研究检测 ANXA1 在胆囊癌中的阳性表达及与病理关系进行分析,结果显示,ANXA1 在胆囊癌中的阳性表达显著高于相应的癌旁组织,且表达与肿瘤的分化程度、临床分期、淋巴转移显著相关。

RNA 干扰是一种能引起内源性靶基因沉默的机制,是研究基因功能有效的方法[15]。研究显示,ANXA1 在前列腺癌中高表达,沉默 ANXA1 的表达后能显著促进人前列腺癌细胞的凋亡[16]。胰腺癌中沉默 ANXA1 的表达能阻滞癌细胞于 G1 期并诱导细胞凋亡[17]。本研究中,检测沉默 ANXA1 的表达对胆囊癌细胞增殖凋亡的影响,结果显示,沉默 ANXA1 的表达能显著抑制人胆囊癌 GBC-SD 细胞增殖,并促进细胞凋亡和上调 Cleaved caspase3 蛋白的表达。细胞凋亡是细胞程序性死亡过程,主要有半胱氨酸蛋白酶的级联反应引起,caspase3 处在 caspase 级联反应的下游,为细胞凋亡过程中的共同效应蛋白,被称为“凋亡的执行者”[18-19]。本研究的结果说明沉默 ANXA1 的表达,通过上调 Cleaved caspase3 蛋白的表达引起人胆囊癌细胞的凋亡。

酪氨酸激酶 JAK/转录因子 STAT(Janus kinase/Signal transducers and activators of transcription 3,JAK/STAT3)是近些年新发现的一个信号转导通路,由 JAKS 蛋白家族和 STAT 蛋白家族组成,该通路与肿瘤的增殖、分化等生物学特性密切相关[20]。STAT3 是 STAT 家族中的一员,参与细胞的增殖、凋亡、分化等过程,该通路受到细胞因子、生长因子刺激后,可作用于细胞核内的特异性 DNA 片段,对靶基因的转录进行调控,从而使通路激活,导致细胞的增殖异常和恶性转化[21]。本研究中检测沉默 ANXA1 的表达对 STAT3 信号通路的影响,结果显示沉默 ANXA1 的表达后能显著抑制 p-STAT3 蛋白表达。

综上所述,ANXA1 基因的表达参与了胆囊癌的生长、分化和迁移过程,下调 ANXA1 的表达能抑制人胆囊癌 GBC-SD 细胞的增殖,并通过下调 Cleaved caspase3 蛋白促进细胞凋亡,其机制与 STAT3 信号通路的调控有关。该研究为胆囊癌的早期诊断和治疗提供了理论依据。

参考文献

[1] BAIG M,GUARINO M,PETRELLI N. Report on demographics of gall bladder cancer in Delaware and retrospective review of treatment strategies for gallbladder cancer in a large community cancer center[J]. Surg Onco,2016,25(2):86-91.

[2] ZHANG X,LI X,ZHENG L,et al. ANXA1 silencing increases the sensitivity of cancer cells to low-concentration arsenic trioxide treatment by inhibiting ERK MAPK activation[J]. Tumori,2015,101(4):360-367.

[3] KREFT S,KLATT AR,STRABBURGER J,et al. Skin wound repair is not altered in the absence of endogenous AnxA1 or AnxA5, but pharmacological concentrations of AnxA4 and AnxA5 inhibit wound hemostasis[J]. Cells Tissues Organs,2016,201(4):287-298.

[4] YDY LR,DO ESPÍRITO SANTO GF,DE MENEZES I ,et al. Study of the Annexin A1 and its associations with carcinoembryonic antigen and mismatch repair proteins in colorectal cancer[J]. Journal of Gastrointestinal Cancer,2016,47(1):61-68.

[5] PREVETE N,LIOTTI F,VISCIANO C, et al. The formyl peptide receptor 1 exerts a tumor suppressor function in human gastric cancer by inhibiting angiogenesis[J]. Oncogene,2015,34(29):3826-3838.

[6] PATHAK BR,BREED AA,APTE S,et al. Cysteine-rich secretory protein 3 plays a role in prostate cancer cell invasion and affects expression of PSA and ANXA1[J]. Mol Cell Biochem,2016,411(1-2):11-21.

[7] 贾浩楠,梅轶芳,张志毅. 膜联蛋白 A1 在类风湿关节炎中的研究进展[J]. 中华内科杂志,2015,54(6):551-553.

[8] LINKE B,ABELER-DÖRNER L,JAHNDEL V, et al. The tolerogenic function of annexins on apoptotic cells is mediated by the annexin core domain[J]. J Immunol,2015,194(11):5233-5242.

[9] 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.

[10] HUANG Y,ZHANG C,CHEN C,et al. Investigation of circulating antibodies to ANXA1 in breast cancer[J]. Tumour Biol,2015,36(2):1233-1236.

[11] PRATES J,FRANCO-SALLA GB,DINARTE DOS SANTOS AR,et al. ANXA1Ac peptide reduces ID1 expression in cervical carcinoma cultures[J]. Gene,2015,570(2):248-254.

[12] KAILASAM A,MITTAL SK,AGRAWAL DK. Epigenetics in the pathogenesis of esophageal adenocarcinoma[J]. Clin Transl Sci,2015,8(4):394-402.

[13] CAI XZ,ZENG WQ,XIANG Y,et al. iTRAQ - based quantitative proteomic analysis of nasopharyngeal carcinoma[J]. J Cell Biochem,2015,116(7):1431-1441.

[14] LI Y,WANG L,KANG A,et al. Screening and identification of proteins related to gastric cancer metastasis with comparative proteomics[J]. Journal of Southern Medical University,2015,35(3):360-364.

[15] 刘丹丹,郑翔宇,刘奔,等. siRNA 沉默 Bmi-1 表达对肺腺癌 A549 细胞侵袭能力的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,35(13):3518-3520.