

肝癌细胞通过上调巨噬细胞 ANXA2 和 ANXA5 表达诱导其向 M2 型极化

许军英^{1,2}, 刘程豪^{2,3}, 黄浩^{1,2}, 姜慧娇^{1,2}, 董丹^{1,2}, 吴向未^{1,2,3}, 陈雪玲^{1,2}

¹石河子大学医学院基础医学系, 新疆 石河子 832000; ²国家卫生健康委中亚高发病防治重点实验室, 新疆 石河子 832000; ³石河子大学第一附属医院肝胆外科, 新疆 石河子 832000

摘要:目的 基于多组学数据探究膜联蛋白 A2(ANXA2)、膜联蛋白 A5(ANXA5)和膜联蛋白 A11(ANXA11)对肝细胞癌(HCC)预后及肿瘤微环境的影响。方法 收集公共数据集中 HCC 转录组以及临床数据、空间转录组数据,采用生物信息学方法(如生存分析、相关性分析、免疫微环境分析以及富集分析等)分析 ANXA2、ANXA5 与患者预后、肿瘤微环境的影响以及其可能机制;通过免疫荧光实验,检测 ANXA2、ANXA5 和 ANXA11 在肝细胞癌组织表达以及与 CD206 共表达情况;使用人肝细胞癌细胞系 MHCC-97H 培养上清(TCM)处理 THP-1 细胞,qRT-PCR 检测 THP-1 细胞的 IL-10、ANXA2、ANXA5 和 ANXA11 的 mRNA 水平;Western blotting 实验检测 THP-1 细胞 ANXA2、ANXA5、ANXA11 以及 KLF4 的蛋白水平变化;流式细胞术检测巨噬细胞 CD206 和 PD-L1 的表达。结果 生物信息学分析显示 ANXA2、ANXA5 和 ANXA11 在肝细胞癌中表达上调,与肝细胞癌不良预后相关($P<0.05$);GO 分析和 GSEA 富集分析显示,ANXA2、ANXA5 和 ANXA11 与 IL-10、IL-4/IL-13 信号通路正向富集;免疫微环境分析显示,ANXA2、ANXA5 和 ANXA11 转录水平与巨噬细胞浸润呈正相关($P<0.05$)。实验结果显示,ANXA2、ANXA5 与 M2 型巨噬细胞标志 CD206,在人肝细胞癌组织中共表达;使用 TCM 诱导 THP-1 细胞,仅 ANXA2、ANXA5 以及 CD206、PD-L1 表达上调($P<0.01$);使用 ANXA2、ANXA5 蛋白处理 THP-1 细胞,THP-1 细胞 CD206 表达上调($P<0.01$),而 PD-L1 无变化;相关性分析显示,KLF4 转录水平分别与 ANXA2、ANXA5 呈正相关,使用 KLF4 抑制剂 Kenpaullone,可抑制 THP-1 细胞 ANXA2 和 ANXA5 表达($P<0.05$)。结论 肝癌细胞通过上调巨噬细胞 ANXA2 和 ANXA5 表达,促进巨噬细胞向 M2 型极化,进而参与构建肝细胞癌免疫抑制微环境。ANXA2 和 ANXA5 可作为联合免疫治疗的分子靶标。

关键词:肝细胞癌;膜联蛋白 A2;膜联蛋白 A5;肿瘤相关巨噬细胞;CD206

Hepatocellular carcinoma cells induce M2 macrophage polarization through upregulation of ANXA2 and ANXA5 expression

XU Junying^{1,2}, LIU Chenghao^{2,3}, HUANG Hao^{1,2}, JIANG Huijiao^{1,2}, DONG Dan^{1,2}, WU Xiangwei^{1,2,3}, CHEN Xueling^{1,2}

¹Department of Basic Medicine, School of Medicine, Shihezi 832000, China; ²National Health Commission Key Laboratory of Prevention and Treatment for High-Incidence Diseases in Central Asia, Shihezi 832000, China; ³Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832000, China

Abstract: Objective To explore the prognostic value of annexins A2 (ANXA2) and A5 (ANXA5) in hepatocellular carcinoma (HCC) and their impact on tumor microenvironment. **Methods** Public datasets of HCC transcriptome and clinical data and spatial transcriptomic data were used for survival analysis, correlation analysis, immune microenvironment analysis, and enrichment analysis to explore the effects of annexin A2 (ANXA2) and ANXA5 on patient prognosis and tumor microenvironment and the potential mechanisms. Immunofluorescence assays were performed to detect ANXA2, ANXA5, and ANXA11 expressions in HCC tissues and their co-expression with CD206. THP-1 cells were treated with culture supernatant of human HCC MHCC-97H cells (TCM), and the changes in mRNA levels of IL-10, ANXA2, ANXA5, and ANXA11 and the protein levels of ANXA2, ANXA5, ANXA11, and KLF4 were examined using qRT-PCR and Western blotting. Flow cytometry was used to detect the expression of CD206 and PD-L1 in the macrophages. **Results** ANXA2, ANXA5 and ANXA11 expressions were all significantly up-regulated in HCC tissues in correlation with poor patient prognosis. GO and GSEA revealed enrichment of IL-10 and IL-4/IL-13 signaling pathways in tumors overexpressing ANXA2, ANXA5 and ANXA11, whose high expressions were positively correlated with macrophage infiltration. Immunofluorescence staining demonstrated co-expressions of ANXA2 and ANXA5 with M2-macrophage markers in human HCC tissues. The conditioned medium from HCC cells significantly up-regulated the expressions of ANXA2, ANXA5, CD206 and PD-L1 in THP-1 cells, whereas treatment with the recombinant ANXA2 or ANXA5 protein alone increased CD206 expression only. Correlation analysis indicated that KLF4 was positively correlated with both ANXA2 and ANXA5, and inhibition of KLF4 caused significant reduction of ANXA2, ANXA5 and CD206 levels in THP-1 cells. **Conclusion** HCC promotes M2 macrophage polarization by up-regulating ANXA2 and ANXA5 expressions, which contribute to an immunosuppressive microenvironment in HCC and potentially serve as molecular targets for HCC immunotherapy.

Keywords: hepatocellular carcinoma; annexin A2; annexin A5; Tumor-Associated Macrophage; CD206

收稿日期:2026-01-20

基金项目:国家自然科学基金(82573336)

Support by Natural Science Foundation of China (82573336).

作者简介:许军英,讲师,E-mail: sophiaxu4504@foxmail.com

通信作者:陈雪玲,教授,博士生导师,E-mail: chenxueling@shzu.edu.cn

肝细胞癌(HCC)是全球第6大常见恶性肿瘤,同时也是导致癌症相关死亡的第3大原因^[1]。超过90%的HCC发生在慢性肝病背景下^[2],HBV和HCV感染仍是全球HCC的主要诱因^[3,4];此外,代谢功能障碍相关脂肪

性肝病(MASLD),已被公认为肝细胞癌发生的重要驱动因素^[5]。肝细胞癌早期诊断率不足30%,70%~80%的患者初诊即为中晚期^[6,7]。

肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)是肝细胞癌(HCC)肿瘤微环境中丰富的免疫细胞群之一^[8,9]。TAMs以M2样表型为主,该表型与肝细胞癌进展和耐药密切相关。TAM通过促进免疫抑制、肿瘤血管新生和肿瘤干细胞形成,进而促进肝细胞癌进展以及耐药^[9-14]。近年来研究表明,膜联蛋白(ANXAs)家族成员在调控肿瘤相关巨噬细胞表型以及免疫应答中发挥重要作用。如在肝细胞癌中,巨噬细胞ANXA1表达水平上调,其表达水平与PD-L1呈正相关;下调ANXA1的表达可增加M1/M2巨噬细胞比例和促进T细胞活化,从而抑制肝癌细胞增殖和迁移^[15]。在胶质母细胞瘤中,ANXA2和ANXA4主要在M2型巨噬细胞中表达,参与免疫抑制微环境形成^[16]。在非酒精性脂肪性肝炎模型中,ANXA5诱导肝脏巨噬细胞由M1向M2表型极化^[17]。但是,ANXAs家族对肝细胞癌预后以及肿瘤相关巨噬细胞影响尚不清楚。

为探索ANXAs家族对肝细胞癌预后以及肿瘤相关巨噬细胞的影响,对HCC多组学数据进行生物信息学分析,并且通过体外实验使用肝癌细胞培养上清与巨噬细胞THP-1共培养,探究对ANXA2和ANXA5对巨噬细胞极化的影响,为肝细胞癌肿瘤免疫以及靶向治疗,提供新的思路和分子靶点。

1 材料和方法

1.1 生物信息学数据集来源

空间转录组数据集:GSE203612;TCGA-LIHC数据集:TCGA数据库中TCGA-LIHC项目STAR流程的RNAseq数据并提取TPM格式的数据以及临床数据。

1.2 生物信息学数据集信息数据分析

肿瘤与正常组织的基因表达差异分析,使用Wilcoxon Rank Sum Tests分析;使用R语言的survival包单因素Cox生存分析,计算风险比(HR)及其95%置信区间(CI)。采用Sparkle数据库(<https://www.grswsci.top>)肝细胞癌组织切片执行空间转录组分析。采用Kaplan-Meier生存分析方法,使用R语言的survival包进行数据分析,利用survfit函数进行Log-rank检验,评估患者生存曲线的差异是否具有统计学意义。使用R包cluster Profiler进行GSEA富集分析。分析数据为TCGA数据库中TCGA-LIHC数据集,以调整后的 $dp < 0.05$ 、错误发现率 < 0.25 和标准化富集评分 $|NES| > 1$ 为显著富集;利用单样本基因集富集分析(ssGSEA)方法,Spearman算法计算基因与免疫细胞浸润水平的相关性。

1.3 主要试剂以及仪器、细胞培养

1.3.1 主要试剂以及仪器 DMEM培养基、1640培养基;胎牛血清(Viva Cell);胰蛋白酶(Solarbio);PBS(Biosharp);佛波酯PMA(LIANKE);ANXA2蛋白、ANXA5蛋白、肯帕罗酮、KLF4抗体(MCE);抗ANXA2抗体、抗ANXA5抗体、抗ANXA11抗体、抗CD206抗体(ProteinTech);RNA提取试剂盒(Omega);逆转录试剂(ThermoFisher);荧光定量PCR试剂盒(Takara);CD206-FITC、PD-L1-PE(Biolegend);流式细胞仪(Agilent);荧光显微镜(Olympus)。

1.3.2 细胞培养 MHCC-97H细胞(普诺赛),使用含10%胎牛血清的DMEM培养,并收集肿瘤培养细胞上清(TCM)。THP-1细胞培养:THP-1细胞(普诺赛),使用含有10%胎牛血清的1640培养基培养;使用100 ng/mL佛波酯PMA诱导贴壁后,加入TCM共培养48 h。

1.4 免疫荧光检测

本研究所用病理组织切片取自石河子大学第一附属医院,且研究方案已通过伦理委员会审批(伦理批号:KJ2025-290-01)。石蜡切片经脱蜡复水,抗原修复等步骤后加入5%山羊血清封闭;分别加抗CD206抗体(1:200)、抗ANXA2抗体(1:100)、抗ANXA5抗体(1:100)以及抗ANXA11抗体(1:100),4℃孵育过夜;PBST洗脱后,二抗室温避光孵育1 h;再次使用PBST洗脱后,加入含DAPI的封片剂,5 min后置于荧光显微镜观察。

1.5 实时荧光定量PCR

提取总RNA,逆转录为cDNA;取2 μL cDNA,加10 μL SYBR Green Mix、上下游引物各1 μL,补水至20 μL;以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量,使用 β -actin作为内参。引物序列如表1(塞维尔生物合成)。

1.6 流式细胞术

使用细胞刮,收集THP-1细胞,使用PBS洗涤;加入表面抗体PD-L1-PE,4℃避光30 min;洗涤,固定破膜后,加入CD206-FITC室温避光30 min;PBS洗两遍后,加入300 μL PBS重悬,上机检测。设同型对照与单染管。

1.7 统计学分析

所有分析均使用R语言(4.3.3版本)和GraphPad Prism9进行。两组间比较采用 t 检验,多组间的比较则采用方差分析; $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ANXA2、ANXA5和ANXA11在肝细胞癌中表达上调,与肝细胞癌预后不良相关

对TCGA数据库收录的肝细胞癌(LIHC)数据集进行分析,结果显示ANXAs家族表达特征:ANXA1/2/4/

表1 引物序列
Tab.1 Primer sequence for qRT-PCR

Gene	Primer (5'-3')
<i>ANXA2</i>	F: ATATTGCCTTCGCCTACCAGAG R: GCGTCATACTGAGCAGGTGTCTT
<i>ANXA5</i>	F: GACTTCCTGGATTGATGAGC R: GAGGGTTTCATCAGAGCCACAA
<i>ANXA11</i>	F: AAAGGCTTCGGGACGGAT R: AGCCGTCTTGAAGGAAAGTAGGAT
<i>IL-10</i>	F: CTCCGAGATGCCTTCAGCAG R: TCACATGCGCCTTGATGTCT
<i>β-actin</i>	F: CACCCAGCACAATGAAGATCAAGAT R: CCAGTTTAAATCCTGAGTCAAGC

F: Forward primer; R: Reverse primer.

5/6/7/9/11/13在肿瘤组织中上调,而ANXA3、ANXA8和ANXA10 mRNA水平降低($P<0.05$,图1A、B)。单因素Cox回归进一步筛选出4个与总生存(OS)密切相关的成员:ANXA2、ANXA5、ANXA10和ANXA11。其中,ANXA2、ANXA5、ANXA11的风险比(HR)均大于1,提示其高表达是预后不良的危险因素;而ANXA10的HR小于1,表明其上调可能降低死亡风险,发挥潜在的保护作用($P<0.05$,图1C)。PPI网络分析证实,ANXA家族成员在分子功能层面存在相互作用(图1D)。Kaplan-Meier生存分析显示,ANXA2、ANXA5和ANXA11高表达的HCC患者总体生存率降低于低表达患者($P<0.05$,图1E)。

2.2 肝细胞癌组织恶性区域的ANXA2、ANXA5和ANXA11转录水平上调

对GSE203612数据集中LIHC8肝细胞癌组织切片执行空间转录组分析,对形态学表达矩阵进行聚类,结合肿瘤细胞的高拷贝数变特征,鉴定出恶性区域和非恶性组织区域(图2A、B)。采用了Seurat包中的SpatialFeaturePlot函数,对ANXA2、ANXA5和ANXA11在肝细胞癌组织的表达水平分析,结果显示ANXA2、ANXA5和ANXA11在肝细胞癌中表达上调(图2C~H, $P<0.05$)。

2.3 ANXA2、ANXA5和ANXA11 mRNA水平与肝细胞癌巨噬细胞浸润水平呈正相关

对TCGA-LIHC转录组数据进行ssGSEA分析,结果显示,ANXA2、ANXA5和ANXA11与巨噬细胞、NKCD56bright、Th2细胞等浸润呈正相关,与Th17细胞、细胞毒T细胞的浸润呈负相关($P<0.05$,图3A、C、E)。使用GSE203612数据集中LIHC8肝细胞癌组织切片,对ANXA2、ANXA5和ANXA11在肝细胞癌组织的表达水平与肝细胞癌组织免疫细胞浸润情况分析,分析显示ANXA2、ANXA5和ANXA11与巨噬细胞浸润水平呈正相关($P<0.05$,图3B、D、F)。

2.4 ANXA2、ANXA5和ANXA11与免疫抑制及黏附相关基因的mRNA水平呈正相关

正相关基因TOP30显示,ANXA2、ANXA5和ANXA11与ITGAM、LIF和FSCN1等参与黏附、胞外基质降解以及TGF-β1、CXCL8等基因的mRNA水平呈正相关($P<0.05$,图4A~C)。PPI互作网络显示,ANXA2、ANXA5与上述关键基因(ITGAM、FSCN1、MMP2、LIF、TGFβ1、CXCL8、JAK3等)形成紧密互作,而ANXA11仅与ANXA2存在直接关联(图4D)。

2.5 ANXA2、ANXA5和ANXA11与IL-4/IL-13及PD-1信号通路显著正向富集

生物学功能(BP)分析表明,ANXA2、ANXA5和ANXA11与巨噬细胞对集落刺激因子的响应、白细胞介导的炎症反应等生物学过程密切相关($P<0.05$,图5A)。基因富集分析(GSEA)显示,ANXA2、ANXA5和ANXA11与IL-4/IL-13、IL-10和PD-1等信号通路正向富集($P<0.05$,图5B)。

2.6 ANXA2、ANXA5与M2型巨噬细胞标志CD206在肝细胞癌组织中共表达

免疫荧光显示,ANXA2、ANXA5与M2型巨噬细胞标志CD206在肝细胞癌组织中表达上调,且与CD206共定位;而ANXA11在肝细胞癌组织以及癌旁组织表达水平无差异(图6A~C)。使用人肝癌细胞MHCC-97H细胞系的条件培养基TCM,处理巨噬细胞THP-1,ANXA2、ANXA5表达均上调,而ANXA11表达无差异($P<0.05$,图6D)。

2.7 ANXA2与ANXA5诱导巨噬细胞M2型标志CD206表达水平上调

与对照组相比,巨噬细胞CD206、PD-L1和IL-10表达上调($P<0.001$,图7A~C)。为探索巨噬细胞ANXA2、ANXA5上调对巨噬细胞表型的影响,在巨噬细胞培养时分别加入ANXA2、ANXA5纯化蛋白,ANXA2和ANXA5可诱导巨噬细胞IL-10 mRNA水平升高

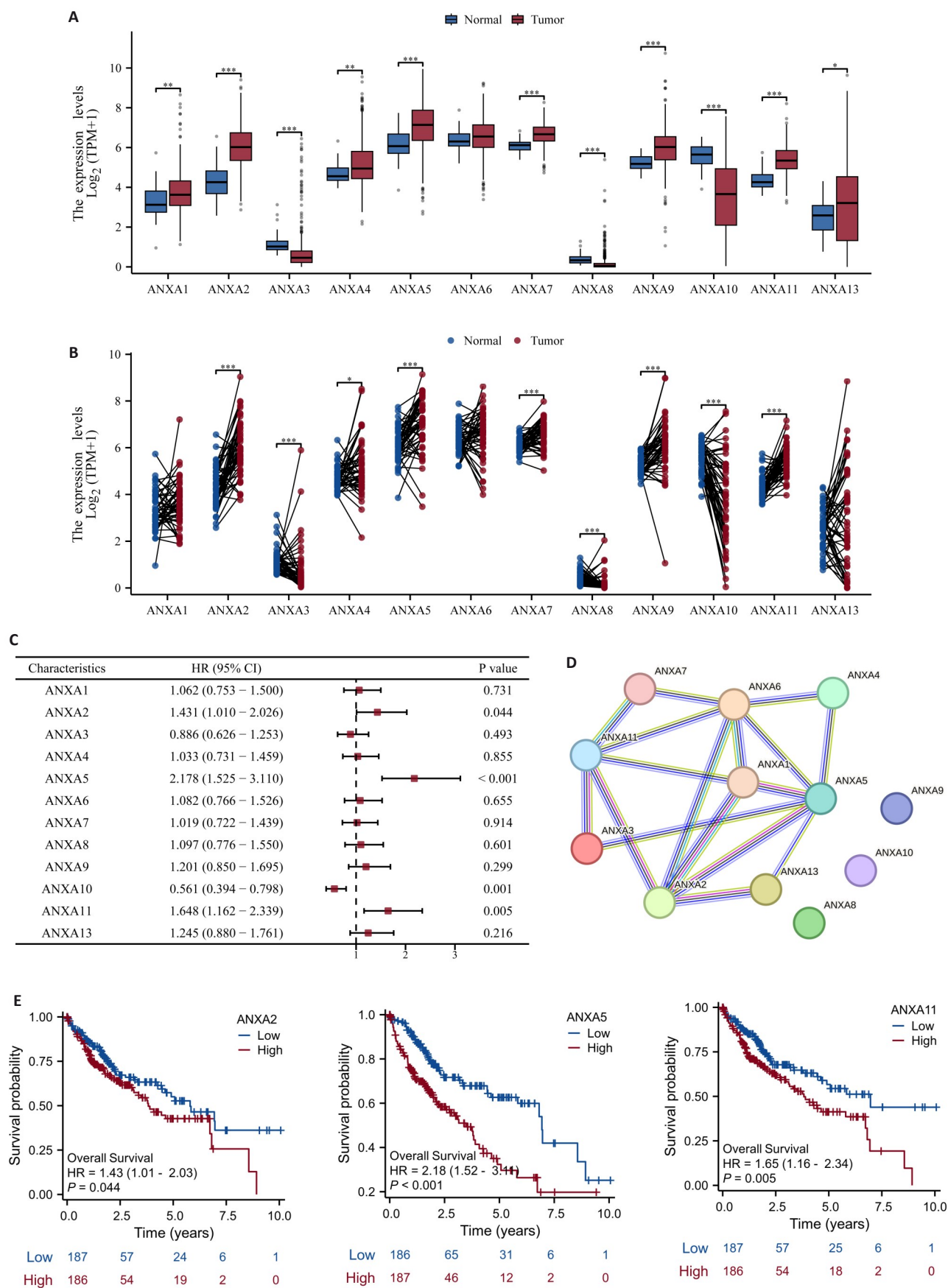


图1 ANXA2、ANXA5和ANXA11在肝细胞癌中表达与预后关系
Fig.1 Expression of ANXA2, ANXA5, and ANXA11 in hepatocellular carcinoma (HCC) and their association with prognosis. **A**, **B**: ANXA family expression in HCC. **C**, **E**: Analysis of the association between the ANXA family and prognosis of HCC. **D**: PPI network analysis of molecular functional relationships within the ANXA family. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

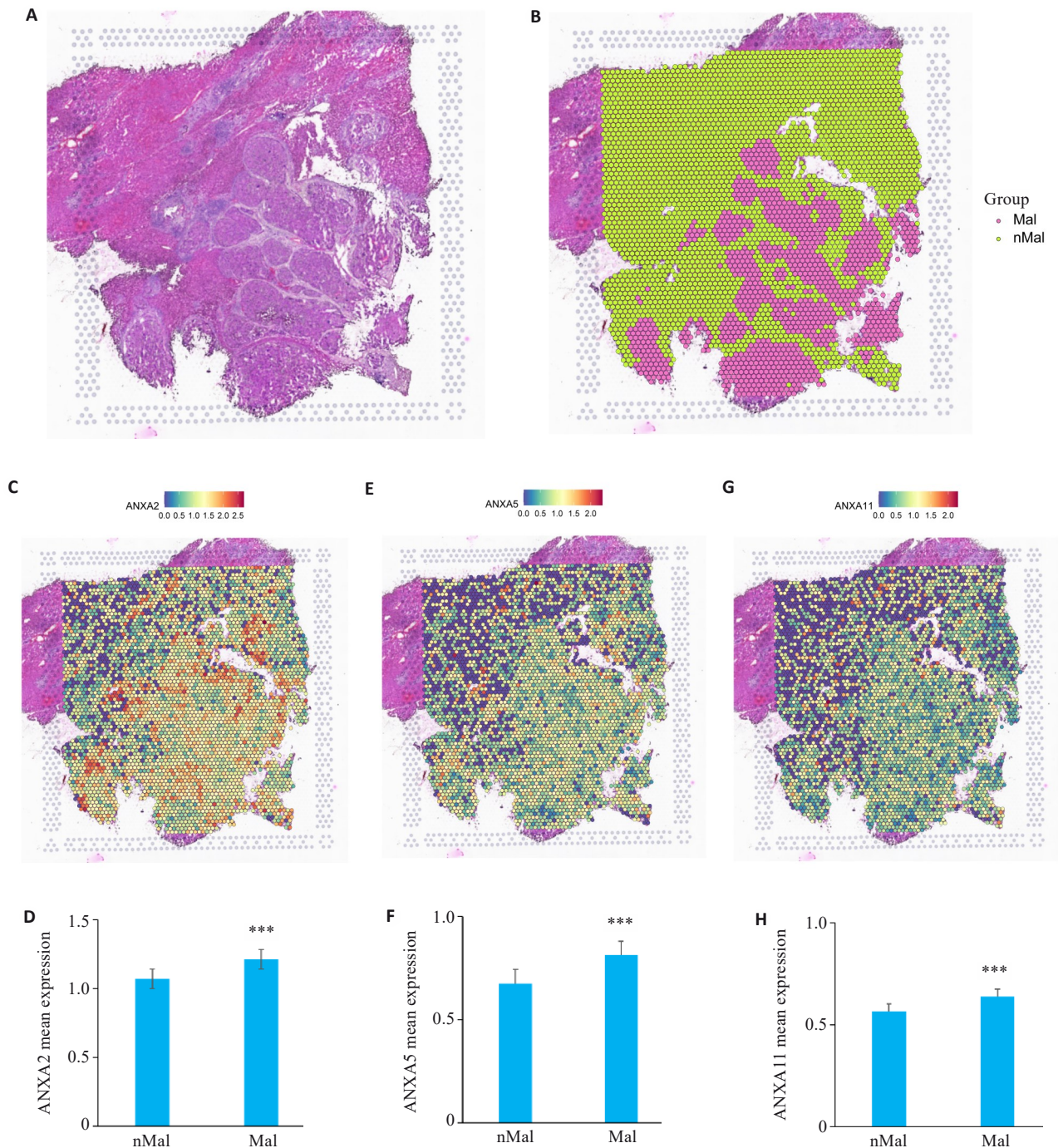


图2 空间转录组数据分析肝细胞癌ANXA2、ANXA5和ANXA11的mRNA水平

Fig.2 Spatial transcriptomic analysis of ANXA2, ANXA5, and ANXA11 mRNA levels in HCC. A-H: Spatial transcriptomic analysis of ANXA2, ANXA5, and ANXA11 mRNA levels in non-malignant (nMal) and malignant (Mal) regions of HCC tissue. *** $P < 0.001$ vs nMal.

($P < 0.001$, 图7D), 而ANXA5处理组巨噬细胞IL-10 mRNA有升高趋势, 但差异无统计学意义图(图7D)。ANXA2和ANXA5均能诱导巨噬细胞M2型标志物CD206表达, 且ANXA2和ANXA5联合使用诱导的M2型标志物CD206表达高于单独使用($P < 0.001$, 图7E), 但ANXA2和ANXA5对PD-L1表达均无影响(图7F)。

2.8 肝癌细胞培养上清通过促进巨噬细胞KLF4表达上调ANXA2、ANXA5水平

ANXA2、ANXA5 mRNA水平与KLF4 mRNA呈

正相关(图8A)。使用肝癌细胞TCM处理THP-1细胞, KLF4表达上调, 而经KLF4抑制剂肯帕酮处理后, KLF4表达明显受到抑制($P < 0.05$, 图8B)。进一步研究发现, 使用KLF4抑制剂可有效逆转TCM诱导的ANXA2、ANXA5表达上调($P < 0.05$, 图8C), 同时显著降低巨噬细胞CD206和PD-L1的表达($P < 0.001$, 图8D)。

3 讨论

本研究通过生物信息学分析, 揭示ANXA2、

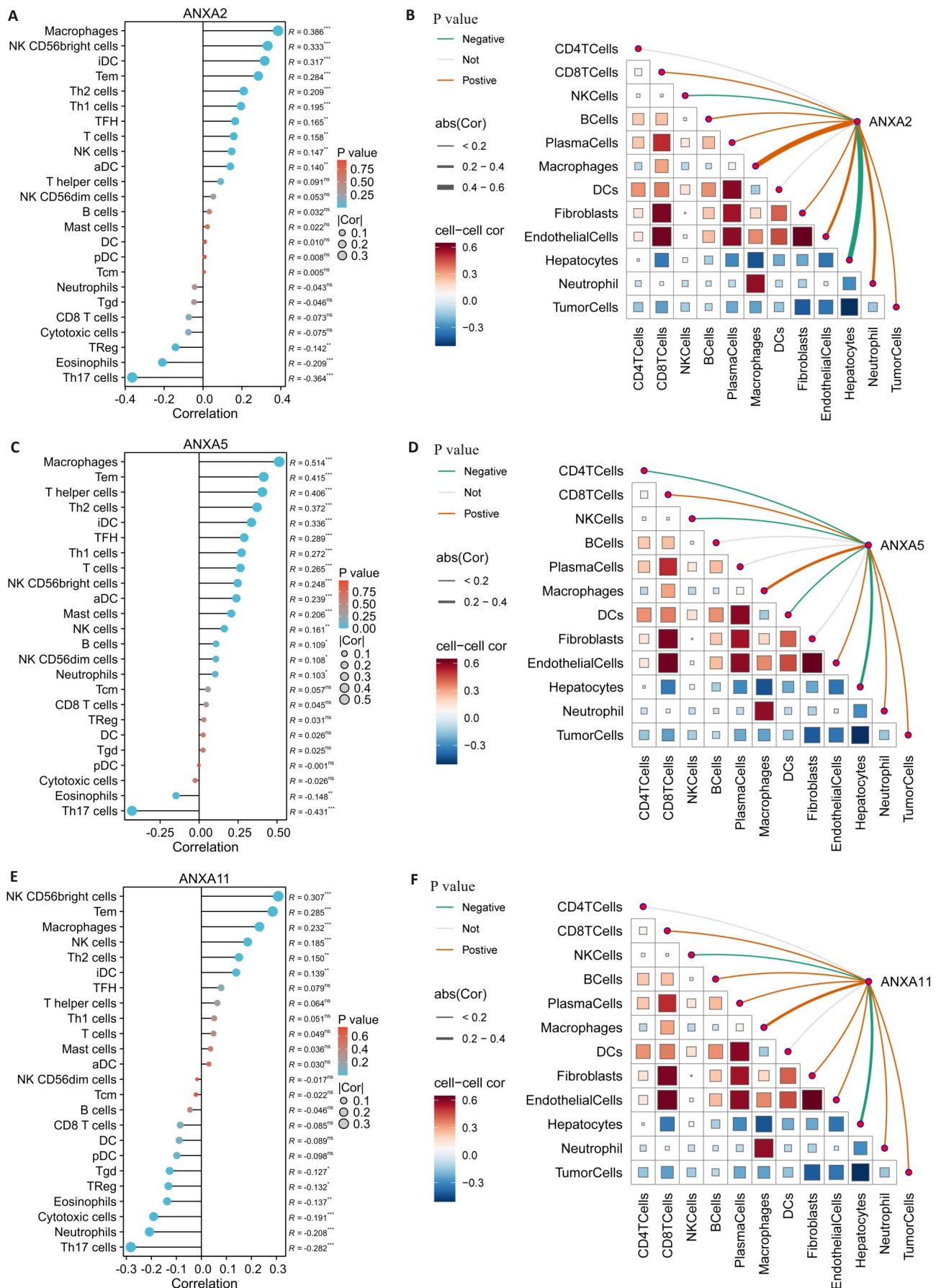


图3 ANXA2、ANXA5和ANXA11的mRNA水平与免疫细胞浸润相关性

Fig. 3 Correlation between expression levels of ANXA2, ANXA5, and ANXA11 and immune cell infiltration. **A**, **C**, **E**: ssGSEA analysis of ANXA2, ANXA5 and ANXA11 mRNA levels in relation to immune-cell infiltration. **B**, **D**, **F**: Spatial transcriptomic analysis of ANXA2, ANXA5 and ANXA11 mRNA levels in relation to immune-cell infiltration.

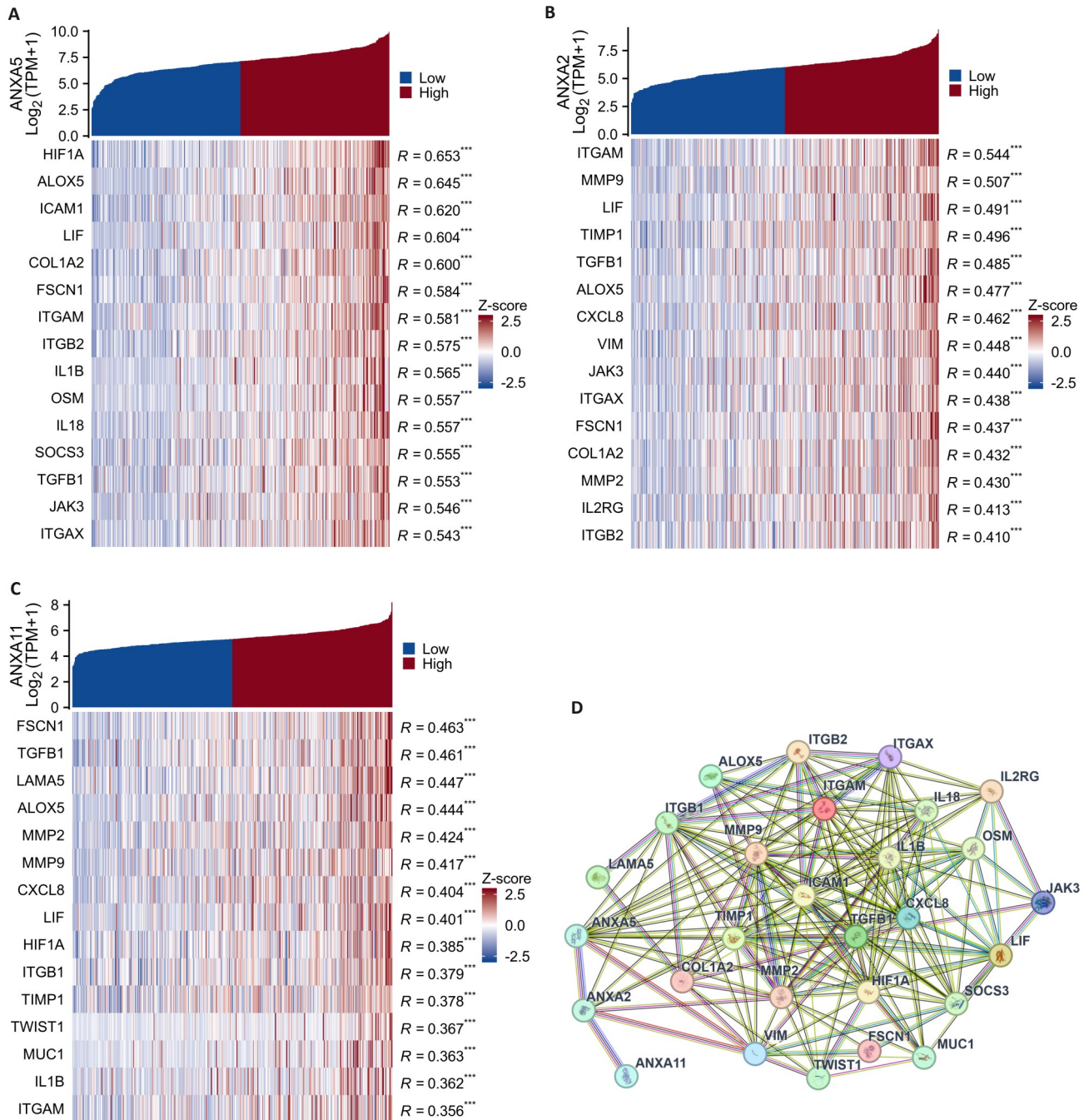


图4 ANXA2、ANXA5和ANXA11与免疫抑制以及黏附基因表达的相关性

Fig.4 Correlation of ANXA2, ANXA5, and ANXA11 with immunosuppressive and adhesion gene expression. A-C: Top 30 co-expressed gene profiling analysis of ANXA2, ANXA5, and ANXA11. D: PPI-based interactome analysis of ANXA2, ANXA5, and ANXA11 together with their top 30 co-expressed genes.

ANXA5和ANXA11在肝细胞癌中表达上调,与肝细胞癌不良预后相关。免疫细胞浸润和空间转录组学分析显示ANXA2、ANXA5和ANXA11与巨噬细胞浸润呈正相关,且与PD-1、IL-4/IL-13信号通路显著正向富集。免疫荧光结果显示,ANXA2、ANXA5与M2型巨噬细胞标志CD206在肝细胞癌组织中共表达,而ANXA11在肝细胞癌组织与癌旁组织表达水平无差异;ANXA2、ANXA5纯化蛋白可诱导巨噬细胞M2型标志CD206表达上调,但是不影响PD-L1的表达。Krüppel样因子4

(KLF4)作为重要的转录因子,是诱导和维持巨噬细胞M2样表型的关键分子^[18, 19]。此外,本研究发现肝癌细胞TCM可通过上调KLF4表达,促进巨噬细胞ANXA2、ANXA5表达。但肝癌细胞TCM未能诱导巨噬细胞ANXA11表达上调;尽管ANXA11与PD-1、IL-4/IL-13信号通路相关显著正向富集;但PPI互作网络显示,ANXA11与参与巨噬细胞黏附、极化及免疫抑制功能的基因(如ITGAM、MMP9/MMP2、LIF、TGF- β 1、CXCL8、JAK3等)不存在紧密互作。以上结果提示,肝

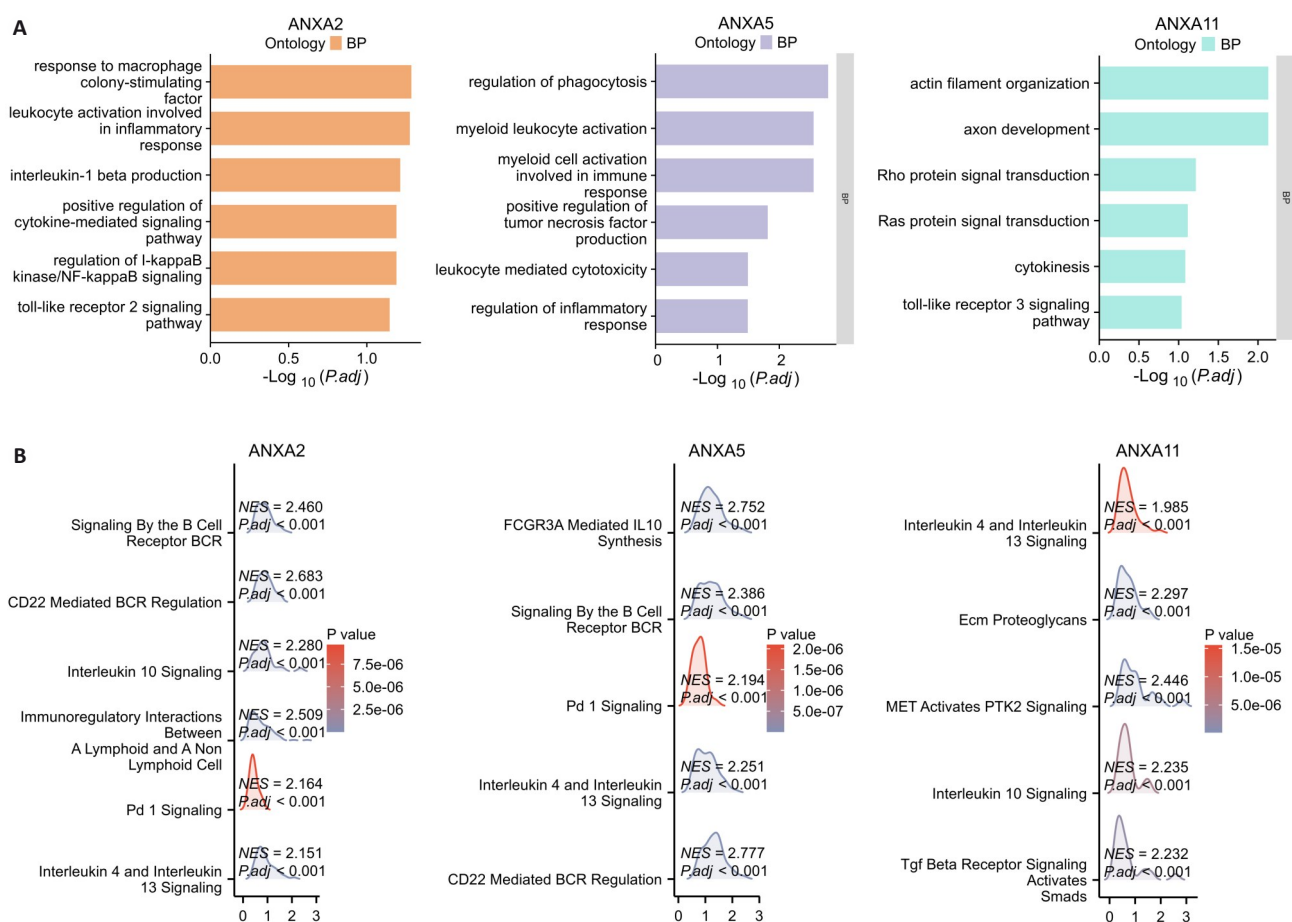


图5 ANXA2、ANXA5和ANXA11与IL-4/IL-13及PD-1信号通路相关

Fig.5 ANXA2, ANXA5, and ANXA11 are associated with IL-4/IL-13 and PD-1 signaling pathways. A, B: GO functional annotation and GSEA enrichment analysis of ANXA2, ANXA5, and ANXA11.

癌细胞TCM可能通过“KLF4-ANXA2/5-CD206”轴驱动肿瘤相关巨噬细胞向M2表型极化,从而塑造免疫抑制微环境;而非通过ANXA11诱导巨噬细胞向M2型极化。

基于免疫细胞浸润和空间转录组学的生物信息学分析显示,ANXA2、ANXA5和ANXA11与巨噬细胞浸润呈正相关。肿瘤微环境中的TAMs与肝细胞癌进展和耐药密切相关^[8,9];免疫荧光结果显示ANXA2、ANXA5均与CD206共定位,这表明ANXA2、ANXA5可能与TAMs趋化以及免疫抑制性表型相关。体外补充ANXA2、ANXA5蛋白可促进CD206表达上调,而不影响PD-L1,说明ANXA2和ANXA5可能通过IL-4/IL-13通路驱动M2型巨噬细胞极化,这与IL-4/IL-13信号正向富集的结果一致。有研究显示,基质金属蛋白酶28(MMP28)可与ANXA2相互作用,驱动TAMs的浸润和M2型极化^[20];在糖尿病模型中,重组ANXA5蛋白促进巨噬细胞从M1向M2表型转变^[21]。多项证据表明,ANXA2与ANXA5可能通过诱导巨噬细胞向M2型极化而发挥相关生物学功能。

KLF4在部分肿瘤中被认为是抑癌基因^[22,23],但在

HBV相关HCC中,HBV X蛋白可通过激活KLF4转录,进而上调HMGB1的表达促进肝细胞癌进展^[24]。此外有研究证实,KLF4是诱导和维持巨噬细胞M2样表型的关键分子^[18]。本研究发现肝癌细胞通过促进巨噬细胞KLF4表达,进而上调巨噬细胞M2型标志CD206以及PD-L1的表达。此外,抑制KLF4,可明显逆转肝癌细胞培养上清诱导的巨噬细胞ANXA2、ANXA5和M2型标志CD206的表达。相关性分析显示,ANXA2、ANXA5 mRNA水平与KLF4 mRNA呈正相关。据此,推测肝癌细胞培养上清可能通过KLF4,驱动巨噬细胞ANXA2、ANXA5的表达上调,进而巨噬细胞M2型标志CD206表达增加。

尽管分析显示,ANXA2、ANXA5与PD-1信号通路正向富集,但体外实验未发现ANXA2、ANXA5对巨噬细胞PD-L1的诱导作用;巨噬细胞上PD-L1的表达主要受IFN- γ -STAT1信号轴调控^[25,26],据此推测,ANXA2与ANXA5不影响巨噬细胞对IFN- γ 的应答,而是通过IL-4/IL-13途径促进巨噬细胞向M2型极化,进而抑制T细胞的功能。尽管本实验证实,KLF4促进巨噬细胞上调ANXA2、ANXA5的表达,但其机制尚未

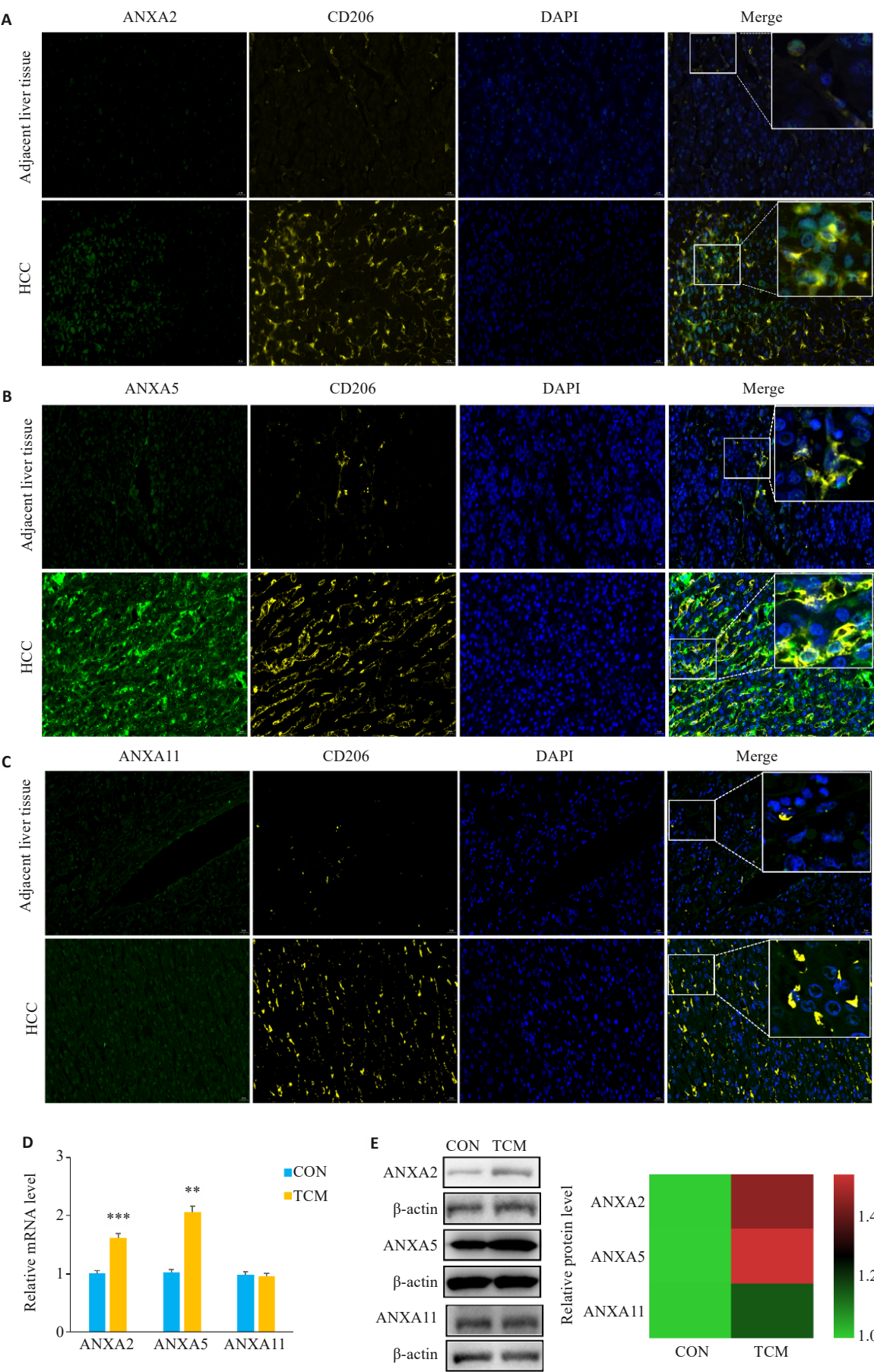


图6 ANXA2、ANXA5与ANXA11在肝细胞癌中表达

Fig.6 Expression of ANXA2, ANXA5, and ANXA11 in HCC tissues. **A-C**: Immunofluorescence staining of the co-expression of ANXA2, ANXA5, and ANXA11 with CD206 in HCC tissues. **D, E**: mRNA and protein levels of ANXA2, ANXA5, and ANXA11 ($n=3$). CON: Control; TCM: Tumor conditioned medium. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs CON group.

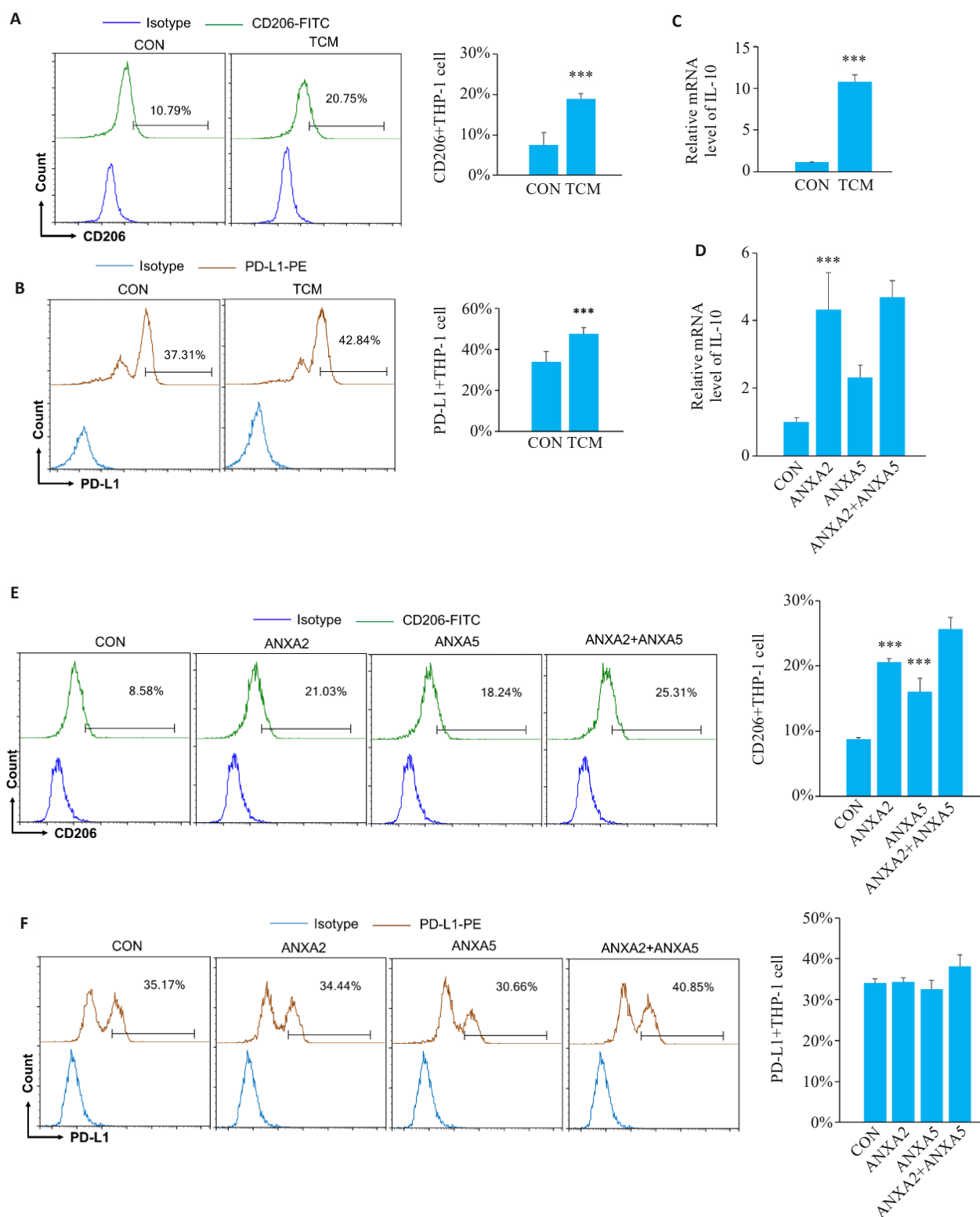


图7 ANXA2与ANXA5诱导巨噬细胞M2型标志CD206表达

Fig.7 ANXA2 and ANXA5 induce the expression of the M2 macrophage marker CD206. **A-C**: flow cytometric analysis of CD206 ($n=5$), PD-L1 ($n=5$) expression and IL-10 ($n=3$) mRNA levels in THP-1 cells after treatment with tumor-conditioned medium (TCM). **D-F**: CD206, PD-L1 expression and IL-10 mRNA level in THP-1 cells induced by ANXA2 and ANXA5 ($n=3$). *** $P<0.001$ vs CON group.

完全阐明。此外,后续研究将通过筛选靶向ANXA2、ANXA5的小分子药物以及体内外实验验证,为肝细胞癌联合免疫治疗提供新方案。

综上,ANXA2与ANXA5通过驱动肿瘤相关巨噬

细胞向M2型极化,参与塑造肝细胞癌免疫抑制性微环境,有望成为HCC预后评估及联合免疫治疗的新型分子靶点。

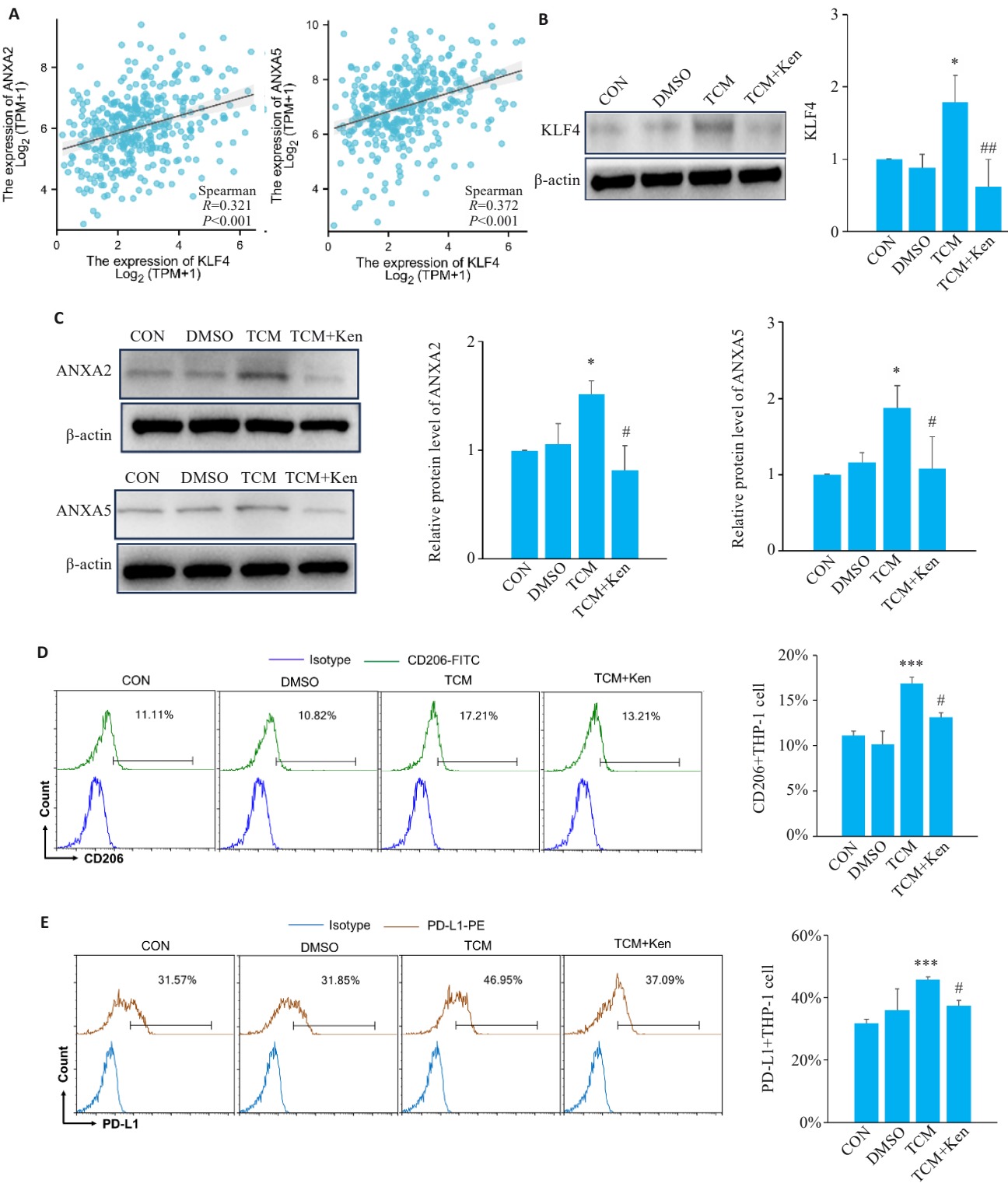


图8 肝癌细胞通过KLF4上调THP-1细胞ANXA2和ANXA5表达
Fig.8 TCM of MHCC-97H cells promotes ANXA2 and ANXA5 expression in THP-1 cells by upregulating KLF4. **A**: Correlation analysis of ANXA2, ANXA5, and KLF4 mRNA levels using TCGA-LIHC transcriptome data ($n=3$). **B**, **C**: Protein levels of KLF4, ANXA2, and ANXA5 of THP-1 cells treated by TCM and Kenpaullone ($n=3$). **D**, **E**: Flow cytometric analysis of CD206 and PD-L1 expression in THP-1 cells ($n=4$). Ken: Kenpaullone. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs CON group; # $P<0.01$, $^{\#}P<0.05$ vs TCM group.

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

[1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36

cancers in 185 countries[J]. CA A Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-63.

[2] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2022, 400(10360): 1345-62.

[3] Danpanichkul P, Duangsonk K, Chen VL, et al. Global burden of HBV-related liver disease: Primary liver cancer due to chronic HBV

- infection increased in over one-third of countries globally from 2000 to 2021[J]. *Hepatology*, 2025, 82(5): 1274-86.
- [4] Khatun M, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus associated hepatocellular carcinoma[J]. *Adv Cancer Res*, 2021, 149: 103-42.
- [5] Vitellius C, Desjonqueres E, Lequoy M, et al. MASLD-related HCC: Multicenter study comparing patients with and without cirrhosis[J]. *JHEP Rep*, 2024, 6(10): 101160.
- [6] Wang WY, Wei C. Advances in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Genes Dis*, 2020, 7(3): 308-19.
- [7] Singal AG, Zhang E, Narasimman M, et al. HCC surveillance improves early detection, curative treatment receipt, and survival in patients with cirrhosis: a meta-analysis[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(1): 128-39.
- [8] Xu WQ, Cheng YL, Guo YH, et al. Targeting tumor associated macrophages in hepatocellular carcinoma[J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 199: 114990.
- [9] Li DM, Zhang T, Guo Y, et al. Biological impact and therapeutic implication of tumor-associated macrophages in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15: 498.
- [10] Singer M, Zhang ZL, Dayyani F, et al. Modulation of tumor-associated macrophages to overcome immune suppression in the hepatocellular carcinoma microenvironment[J]. *Cancers*, 2024, 17(1): 66.
- [11] Chu XY, Tian Y, Lv C. Decoding the spatiotemporal heterogeneity of tumor-associated macrophages[J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 150.
- [12] Nosaka T, Murata Y, Takahashi K, et al. Hepatocellular carcinoma progression promoted by 5-lipoxygenase activity in CD163⁺ tumor-associated macrophages[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114592.
- [13] Wu QC, Zhou WH, Yin SY, et al. Blocking triggering receptor expressed on myeloid cells-1-positive tumor-associated macrophages induced by hypoxia reverses immunosuppression and anti-programmed cell death ligand 1 resistance in liver cancer[J]. *Hepatology*, 2019, 70(1): 198-214.
- [14] Waki Y, Morine Y, Saito Y, et al. Lenvatinib-resistant hepatocellular carcinoma promotes malignant potential of tumor-associated macrophages *via* exosomal miR-301a-3p[J]. *Ann Gastroenterol Surg*, 2024, 8(6): 1084-95.
- [15] Song ZH, Wang X, Liu XH, et al. Targeting of Annexin A1 in Tumor-associated Macrophages as a therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma[J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 213: 115612.
- [16] Wen YJ, Zhou WH, Zhao ZZ, et al. Annexin A's life in pan-cancer: especially in glioma immune cells[J]. *NeuroMolecular Med*, 2025, 27(1): 17.
- [17] Xu F, Guo MM, Huang W, et al. Annexin A5 regulates hepatic macrophage polarization *via* directly targeting PKM2 and ameliorates NASH[J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101634.
- [18] Shao X, Xu PC, Ji LL, et al. Low-dose decitabine promotes M2 macrophage polarization in patients with primary immune thrombocytopenia *via* enhancing KLF4 binding to PPAR γ promoter[J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(7): e1344.
- [19] Pan Y, Hui XY, Hoo RLC, et al. Adipocyte-secreted exosomal microRNA-34a inhibits M2 macrophage polarization to promote obesity-induced adipose inflammation[J]. *J Clin Investig*, 2019, 129(2): 834-49.
- [20] Dong S, Li X, Chen Z, et al. MMP28 recruits M2-type tumor-associated macrophages through MAPK/JNK signaling pathway-dependent cytokine secretion to promote the malignant progression of pancreatic cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2025, 44(1): 60.
- [21] Kang BJ, Jia ZX, Dong YS, et al. Recombinant human annexin A5 accelerates diabetic wounds healing by regulating skin inflammation[J]. *Regen Ther*, 2024, 27: 342-53.
- [22] Ma YZ, Wu L, Liu XW, et al. KLF4 inhibits colorectal cancer cell proliferation dependent on NDRG2 signaling[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(2): 975-84.
- [23] Li Y, Feng RY, Yu X, et al. SLC35E2 promoter mutation as a prognostic marker of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Life Sci*, 2022, 296: 120447.
- [24] Wu DH, Liang H, Wang H, et al. Hepatitis B virus-X protein regulates high mobility group box 1 to promote the formation of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(4): 4418-26.
- [25] Peng X, Zhu YY, Han YQ, et al. Enhancing anti-tumor immunity by targeting BATF and the STAT1/PD-L1 pathway in cervical carcinoma[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2025, 82(1): 353.
- [26] van Duijn A, Willemsen KJ, van Uden NOP, et al. A secondary role for hypoxia and HIF1 in the regulation of (IFN γ -induced) PD-L1 expression in melanoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2022, 71(3): 529-40.

(编辑:经 媛)