

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.01.009

· 临床研究 ·

锌- α 2-糖蛋白1在骨肉瘤组织中的表达及其临床意义

刘大旭¹, 张艳锋¹, 鲜文峰¹, 王刘玉¹, 范兆阳¹, 万全会¹, 李刚²(1. 南阳市第二人民医院 骨科, 河南 南阳 473012; 2. 郑州大学第一附属医院 骨科, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的:**探讨锌- α 2-糖蛋白1(zinc- α 2-glycoprotein 1, AZGP1)在骨肉瘤组织中的表达及其与患者临床病理特征和预后的关系。**方法:**选取2012年8月至2014年8月河南省南阳市第二人民医院骨科收治的62例骨肉瘤患者的癌及癌旁组织标本,用免疫组织化学染色法检测骨肉瘤组织中AZGP1表达。所有患者于术后第2天开始进行随访,截止日期2019年8月31日,均随访满5年,以死亡作为终点事件,记录患者5年内发生终点事件的数量和生存期(overall survival, OS),用Kaplan-Meier法进行生存分析,用Cox比例风险模型进行影响患者OS的多因素分析。**结果:**AZGP1在骨肉瘤组织中阳性表达率显著高于癌旁组织(77.42% vs 32.26%, $P < 0.01$),AZGP1阳性表达率在不同Enneking分期、是否软组织浸润和是否肺转移间比较差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。Kaplan-Meier生存分析结果显示,AZGP1阳性表达患者的平均OS和5年OS率均低于阴性表达患者[(24.19±2.68) vs (43.07±3.70)个月, $P < 0.01$; 18.75% vs 64.29%, $P < 0.01$];AZGP1表达和肺转移是影响骨肉瘤患者预后的风险因素($HR=3.407, 3.647$, 均 $P < 0.05$)。**结论:**AZGP1在骨肉瘤组织中高表达,且与患者病情恶性化指标及预后有关,可能是评估患者预后的潜在标志物。

[关键词] 锌- α 2-糖蛋白1;骨肉瘤;临床病理指标;生存分析;Cox比例风险模型

[中图分类号] R738.1; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)01-0055-05

Expression and clinical significance of zinc- α 2-glycoprotein 1 in osteosarcoma tissues

LIU Daxu¹, ZHANG Yanfeng¹, XIAN Wenfeng¹, WANG Liuyu¹, FAN Zhaoyang¹, WAN Quanhui¹, LI Gang² (1. Department of Orthopedics, the Second People's Hospital of Nanyang City, Nanyang 473012, Henan, China; 2. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of zinc- α 2-glycoprotein 1 (AZGP1) in osteosarcoma tissue and its relationship with clinicopathological features and prognosis of patients. **Methods:** A total of 62 pairs of cancer tissue and adjacent normal tissue samples from patients with osteosarcoma treated in the Department of Orthopedics, Second People's Hospital of Nanyang City were collected from August 2012 to August 2014. The expressions of AZGP1 in osteosarcoma tissues and adjacent tissues were detected by using immunohistochemical staining. All patients were followed up on the second day after the operation. The deadline was August 31, 2019. All patients were followed up for 5 years, with death as the end event. The number of end events within 5 years and overall survival (OS) time of the patients were recorded. Kaplan-Meier method was used for survival analysis, and Cox proportional hazard model was used for multivariate analysis of factors affecting patients' survival. **Results:** The positive expression rate of AZGP1 in the osteosarcoma tissues was significantly higher than that in the adjacent tissues (77.42% vs 32.26%, $P < 0.01$). There were significant differences in the positive expression rates of AZGP1 in patients with different Enneking stages, soft tissue infiltration or not and lung metastasis conditions (all $P < 0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed that the average OS time and 5-year OS rate of patients in the AZGP1 positive expression group were significantly lower than those in the negative expression group [(24.19±2.68) months vs (43.07±3.70) months, $P < 0.01$; 18.75% vs 64.29%, $P < 0.01$]. The lung metastasis and positive expression of AZGP1 were risk factors affecting the prognosis of patients with osteosarcoma ($HR=3.407, 3.647$, all $P < 0.05$). **Conclusion:** AZGP1 is highly expressed in osteosarcoma tissues, and it is related to the malignant indicators and prognosis of patients. It may be a potential marker for evaluating the prognosis of osteosarcoma patients.

[基金项目] 河南省医学科技研究计划联合建设资助项目(No. LHGJ20190168)。Project supported by the Joint Project of Medical Science and Technology Research Plan of Henan Province (No. LHGJ20190168)

[作者简介] 刘大旭(1980-),男,硕士,主治医师,主要从事骨科肿瘤的临床研究,E-mail: 2487774032@qq.com

[通信作者] 李刚(LI Gang, corresponding author),硕士,副主任医师,主要从事骨科肿瘤的临床研究,E-mail: 78832117@qq.com

[Key words] zinc- α 2-glycoprotein 1 (AZGP1); osteosarcoma; clinicopathological indicator; survival analysis; Cox proportional hazard model

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(1): 55-59. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2021.01.009]

骨肉瘤作为一种来源于间质细胞的恶性肿瘤,在儿童和青少年人群中高发,由于该肿瘤进展快、侵袭力强、易早期出现肺部转移^[1],其治疗难度大,具有较高的致死性。尽管现有的治疗方案在提高患者生存质量方面发挥了重要作用,但患者总生存(overall survival, OS)率提高有限,有超过50%的患者仍死于转移^[2]。因此,积极探讨骨肉瘤发病机制,寻找与骨肉瘤侵袭、转移相关的敏感基因,对指导临床诊疗具有重要意义。锌- α 2-糖蛋白1(zinc- α 2-glycoprotein 1, AZGP1)作为一种可溶性糖蛋白,大量存在于人体体液中,且与脂肪代谢密切相关^[3]。近年来研究^[4]发现, AZGP1参与了多种恶性肿瘤发生、发展过程。AZGP1可通过调控糖脂代谢而在肿瘤细胞增殖和侵袭过程中发挥重要作用^[5]。但AZGP1在骨肉瘤发生、发展中的作用研究鲜有报道。本研究通过检测骨肉瘤组织中AZGP1的表达,探讨其在患者临床病理指标间表达差异性,以及与患者预后的相关性,以期为骨肉瘤机制的研究提供参考资料。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2012年8月至2014年8月河南省南阳市第二人民医院骨科收治的62例骨肉瘤患者的临床资料。病例纳入标准:术前未行放疗治疗,术后病理学检查证实为骨肉瘤;均完成随访,临床资料完整。病例排除标准:合并其他恶性肿瘤者。共纳入62例,其中,男性33例,女性29例,年龄8~56岁,平均年龄(23.34±10.51)岁。组织学类型:成骨细胞型29例,成软骨细胞型18例,成纤维骨细胞型15例;肿瘤部位:躯干21例,四肢41例;肿瘤大小:<5 cm 28例,≥5 cm 34例;Eneeking分期:II期33例,III期29例;发生软组织浸润39例,发生肺转移26例。术中留取骨肉瘤组织及癌旁组织(距离肿瘤边缘>5 cm),用4%甲醛固定,石蜡包埋保存。本研究方案征得所在医院伦理委员会批准,所有患者均被告知并签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器

SP免疫组化试剂盒及配套试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司,兔抗人AZGP1单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,EDTA缓冲液购自北京中杉金桥生物技术有限公司,辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记山羊抗兔IgG二抗购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司。

1.3 免疫组化SP法检测骨肉瘤组织中AZGP1表达

取骨肉瘤和癌旁组织标本,连续切片(厚度约4 μ m),脱蜡、梯度乙醇下行至水,浸入EDTA缓冲液微波加热行抗原修复,冷却后用去离子水冲洗,加入3% H₂O₂溶液以灭活内源性过氧化物酶,加入10%山羊血清封闭25 min。滴加兔抗人AZGP1单克隆抗体(1:500)4 $^{\circ}$ C过夜孵育。次日,PBS冲洗3次,滴加HRP标记山羊抗兔IgG二抗(1:800),室温反应30 min,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染,脱水、封片,光学显微镜(\times 200)下观察。用PBS代替一抗作为阴性对照。结果判定:采用半定量法^[6],随机取5个高倍视野,根据着色情况和阳性细胞数进行评分:(1)着色情况:无着色、淡黄、棕黄、黄褐色分别计0、1、2、3分;(2)阳性细胞数:阳性细胞数占比在<5%、5%~<25%、25%~<50%、50%~<75%及>75%分别计0、1、2、3、4分;(3)将着色评分乘以阳性细胞数占比评分,<2分为阴性表达,≥2分为阳性表达。

1.4 病例随访

所有患者于术后第2天开始进行随访,形式包括住院期间查房和出院后电话、复诊、病历追踪等,随访截止日期2019年8月31日,所有患者均随访满5年,以死亡作为终点事件,记录患者5年内发生终点事件的数量及OS。

1.5 统计学处理

使用SPSS 21.0软件对实验数据进行统计分析。计数资料用率值表示,比较采用 χ^2 检验,生存分析采用Kaplan-Meier法,影响患者生存期的多因素分析采用Cox比例风险模型法。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨肉瘤组织中AZGP1高表达

免疫组化SP法染色结果(图1)显示,AZGP1主要表达于细胞质中,少量见于细胞核。AZGP1在骨肉瘤组织中阳性表达率显著高于癌旁组织(77.42% vs 32.26%, $\chi^2=25.529$, $P<0.01$)。

2.2 不同临床病例特征的骨肉瘤组织中AZGP1表达

用 χ^2 检验方法分析结果(表1)显示,AZGP1在不同性别、年龄、组织学类型、肿瘤部位和肿瘤大小间阳性表达率差异比较无统计学意义(均 $P>0.05$),而在不同Eneeking分期、是否软组织浸润和是否肺转移间阳性表达率差异比较有统计学意义(均 $P<0.05$)。

2.3 AZGP1表达与患者OS的关系

62例患者均随访满5年,随访时间2~60个月,

中位随访时间为21.5个月。Kaplan-Meier生存分析结果(图2)显示, AZGP1阳性表达患者的平均OS(24.19 \pm 2.68)个月, 5年OS率为18.75%; AZGP1阴

性表达患者的平均OS为(43.07 \pm 3.70)个月, 5年OS率为64.29%, Log rank检验两者的差异有统计学意义($\chi^2=11.157, P<0.01$)。

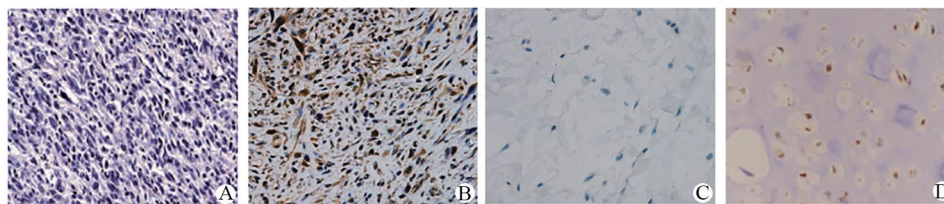


图1 AZGP1在骨肉瘤组织(A阴性, B阳性)和癌旁组织(C阴性, D阳性)中的表达(免疫组化染色, $\times 200$)

Fig.1 Expression of AZGP1 in osteosarcoma tissues (A negative, B positive) and para-cancerous tissues (C negative, D positive) (immunohistochemical staining, $\times 200$)

表1 AZGP1在不同临床病理特征的骨肉瘤组织中表达比较[n(%)]

Tab.1 Comparison of AZGP1 expression in osteosarcoma tissues from patients with different clinicopathologic features [n(%)]

Clinicopathologic feature	N	Expression of AZGP1		χ^2	P
		Positive	Negative		
Age (t/a)				0.429	0.512
≤ 18	40	32(80.00)	8(20.00)		
> 18	22	16(72.73)	6(27.27)		
Gender				0.781	0.377
Male	33	27(81.82)	6(18.18)		
Female	29	21(72.41)	8(27.59)		
Histological type				0.395	0.821
Osteoblast type	29	23(79.31)	6(20.69)		
Chondroblast type	18	13(72.22)	5(27.78)		
Fibroblast type	15	12(80.00)	3(20.00)		
Tumor site				0.652	0.419
Trunk	21	15(71.43)	6(28.57)		
Limbs	41	33(80.49)	8(19.51)		
Tumor size (d/cm)				0.171	0.679
< 5	28	21(75.00)	7(25.00)		
≥ 5	34	27(79.41)	7(20.59)		
Enecking stage				4.666	0.031
II	33	22(66.67)	11(33.33)		
III	29	26(89.66)	3(10.34)		
Soft tissue infiltration				9.134	0.003
Yes	39	35(89.74)	4(10.26)		
No	23	13(56.52)	10(43.48)		
Pulmonary metastasis				5.678	0.017
Yes	26	24(92.31)	2(7.69)		
No	36	24(66.67)	12(33.33)		

2.4 肺转移和AZGP1表达是影响骨肉瘤患者预后的风险因素

变量赋值见表2。Cox比例风险模型结果(表3)显示,肺转移和AZGP1表达是影响骨肉瘤患者预后的风险因素($HR=3.407, 3.647$, 均 $P<0.05$)。

3 讨论

骨肉瘤作为骨科常见的一种恶性程度较高的肿

瘤,起病较为隐匿,但进展快,多数患者临床确诊时已发生远处转移,主要以肺转移为主^[7],致使患者预后不佳,5年OS率较低^[8-9]。因此,积极寻找影响骨肉瘤进展及转移的敏感基因,对指导该肿瘤临床诊疗具有重要意义。AZGP1作为一种功能复杂的蛋白,定位于人染色体7q22.1,由4个外显子和3个内含子组成,可作为脂质动员因子而在调控脂肪代谢中发挥重要作用^[10],参与恶病质的发生过程^[11-12],同时,参

与代谢性疾病的发生及进展过程^[13]。随着研究的深入, AZGP1 在恶性肿瘤发生发展中的作用越来越受到重视。有研究指出, AZGP1 表达缺失可促进肝硬化大鼠进展至肝癌^[14], AZGP1 高表达可抑制胃癌细胞的增殖, 并促进细胞凋亡^[15], 提示 AZGP1 可能作为一种抑癌基因而参与肝癌的发生。亦有研究指出, AZGP1 参与大肠癌 HT-29 细胞的侵袭^[16], 且与前列腺癌细胞的增殖和转移有关^[17], 并参与肝转移性结肠癌的发生过程^[18], 提示 AZGP1 亦可作为一种癌基因而参与肿瘤的恶性进展。本研究结果显示, AZGP1 在骨肉瘤组织中阳性表达率高于癌旁组织, 说明 AZGP1 可能作为一种癌基因而参与骨肉瘤发生过程。AZGP1 在 Eneeking 分期 III 期、发生软组织浸润和肺转移的患者组织中阳性表达率升高, 说明

AZGP1 可能参与骨肉瘤恶性转移过程。

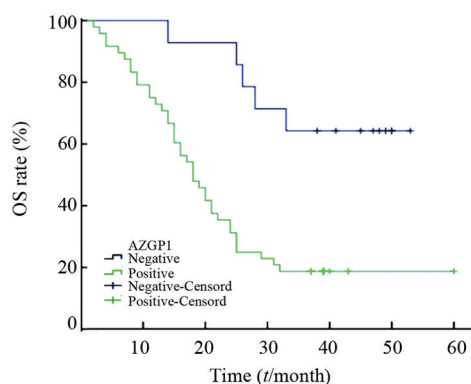


图2 AZGP1 在骨肉瘤组织中表达对患者 OS 的影响
Fig.2 Effect of AZGP1 expression in osteosarcoma tissues on OS of patients

表2 变量赋值
Tab.2 Variable assignment

Variable	Assignment
Gender	0=Female, 1=Male
Age (t/a)	0= \leq 18, 1= $>$ 18
Histological type	0=Osteoblast type, 1=Chondroblast type, 2=Fibroblast type
Tumor site	0=Limbs, 1=Trunk
Tumor size (d/cm)	0= $<$ 5, 1= \geq 5
Eneeking stage	0=II, 1=III
Soft tissue infiltration	0=No, 1=Yes
Pulmonary metastasis	0=No, 1=Yes

表3 影响骨肉瘤患者预后的 Cox 比例风险模型分析

Tab.3 Cox proportional hazard model was used to analyze the affecting factors for the prognosis of patients with osteosarcoma

Index	B	SE	Wald	P	HR	95.0%CI	
						Lower limit	Upper limit
Age (t/a)	-0.193	0.424	0.208	0.648	0.824	0.359	1.892
Gender	0.586	0.344	2.900	0.089	1.796	0.915	3.523
Histological type	0.130	0.136	0.908	0.341	1.139	0.872	1.487
Tumor site	-0.183	0.367	0.250	0.617	0.832	0.405	1.709
Tumor size (d/cm)	-0.642	0.356	3.259	0.071	0.526	0.262	1.057
Eneeking stage	0.284	0.401	0.502	0.478	1.329	0.605	2.916
Soft tissue infiltration	-0.319	0.440	0.527	0.468	0.727	0.307	1.720
Pulmonary metastasis	1.226	0.415	8.721	0.003	3.407	1.510	7.685
AZGP1 expression	1.294	0.547	5.594	0.018	3.647	1.248	10.656

有研究^[19-20]指出, AZGP1 与多种恶性肿瘤预后有关。本研究结果显示, AZGP1 阳性表达患者平均 OS 和 5 年 OS 率均低于阴性表达组, 说明 AZGP1 表达与患者预后有关。Cox 比例风险模型结果显示, 肺转移和 AZGP1 表达是影响骨肉瘤患者预后的风险因素, 进一步说明 AZGP1 表达是骨肉瘤患者预后的影响因素, 可作为预测患者预后的潜在指标。

综上所述, AZGP1 在骨肉瘤组织中呈高表达, 且

与患者病情恶化指标及预后有关, 可能是评估骨肉瘤患者预后的潜在标志物。

[参考文献]

[1] GAO E J, LI Y, ZHAO W G, et al. Necessity of thoracotomy in pulmonary metastasis of osteosarcoma[J/OL]. J Thorac Dis, 2019, 11(8): 3578-3583[2020-07-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6753405/>. DOI:10.21037/jtd.2019.07.65.

- [2] 黄世超, 王丙武, 陈向阳. 血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶在骨肉瘤中的表达及临床意义[J]. 癌症进展, 2019, 17(10): 1212-1214, 1218. DOI:10.11877/j.issn.1672-1535.2019.17.10.27.
- [3] Erratum: Zinc alpha 2 glycoprotein as an early biomarker of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus[J/OL]. J Bras Nefrol, 2019, 41(4): 587[2020-07-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6979566/>. DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-2018-0200er.
- [4] 彭红, 张兴平. 锌- α 糖蛋白研究进展[J]. 现代医学, 2016, 44(10): 1472-1477. DOI:10.3969/j.issn.1671-7562.2016.10.038.
- [5] CAO R Y, KE M, WU Q X, et al. AZGP1 is androgen responsive and involved in AR-induced prostate cancer cell proliferation and metastasis[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 17444-17458. DOI: 10.1002/jcp.28366.
- [6] 王永堂, 王会含, 郭永成, 等. 抑制转录共激活因子 TAZ 和胸苷激酶 1 在骨肉瘤组织的表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(9): 1696-1698. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2019.09.050.
- [7] XI Y M, QI Z H, MA J F, et al. PTEN loss activates a functional AKT/CXCR4 signaling axis to potentiate tumor growth and lung metastasis in human osteosarcoma cells[J]. Clin Exp Metastasis, 2020, 37(1): 173-185. DOI:10.1007/s10585-019-09998-7.
- [8] ZHANG C, GUO X, XU Y, et al. Lung metastases at the initial diagnosis of high-grade osteosarcoma: prevalence, risk factors and prognostic factors. A large population-based cohort study[J]. Revista Paulista De Med, 2019, 137(5): 423-429. DOI: 10.1590/1516-3180.2018.0381120619.
- [9] 陈蔚, 余铃, 陈敬腾, 等. 维替泊芬影响骨肉瘤 MG63 细胞增殖和迁移侵袭的作用机制[J]. 安徽医药, 2019, 23(12): 2337-2341. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.12.002.
- [10] 贾璐, 石洁, 郑建勇. 锌 α 糖蛋白对肝癌 HepG2 细胞增殖与侵袭能力的影响[J]. 药学与临床研究, 2018, 26(4): 241-244. DOI: 10.13664/j.cnki.pcr.2018.04.001.
- [11] ELATTAR S, DIMRI M, SATYANARAYANA A. The tumor secretory factor ZAG promotes white adipose tissue browning and energy wasting[J/OL]. FASEB J, 2018, 32(9): 4727-4743[2020-07-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6266632/>. DOI:10.1096/fj.201701465RR.
- [12] LAU A M, ZAHID H, GOR J, et al. Crystal structure of zinc- α -glycoprotein in complex with a fatty acid reveals multiple different modes of protein-lipid binding[J]. Biochem J, 2019, 476(19): 2815-2834. DOI:10.1042/bcj20190354.
- [13] 彭红, 张兴平, 常颖, 等. 血浆锌 α 糖蛋白与冠状动脉粥样硬化病变程度的相关性分析[J]. 重庆医学, 2018, 47(15): 2004-2006, 2010. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.15.008.
- [14] 廖红雨, 于景霞, 刘婷, 等. 锌 α 糖蛋白对实验性大鼠肝癌的抑制作用[J]. 肝脏, 2016, 21(4): 263-266. DOI: 10.3969/j.issn.1008-1704.2016.04.006.
- [15] LI W B, LIU J C. Overexpression of the zinc- α -glycoprotein accelerates apoptosis and inhibits growth via the mTOR/PTEN signaling pathway in gastric carcinoma cells[J]. Life Sci, 2020, 240: 117117. DOI:10.1016/j.lfs.2019.117117.
- [16] 胡俊, 李原, 黄培林, 等. 锌 α 糖脂蛋白通过调节 ATP 水平影响大肠癌 HT-29 细胞的侵袭能力[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2016, 36(11): 1295-1299. DOI:10.7655/NYDXBNS20161103.
- [17] ZHANG A Y, GROGAN J S, MAHON K L, et al. A prospective multicentre phase III validation study of AZGP1 as a biomarker in localized prostate cancer[J]. Ann Oncol, 2017, 28(8): 1903-1909. DOI:10.1093/annonc/mdx247.
- [18] 董志伟, 柳丽娟, 耿的玉, 等. miRNA-95 在骨肉瘤组织中的表达及其对 MG-63 细胞增殖和侵袭的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(8): 920-926. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.08.013.
- [19] 李雯, 王正根. AZGP1 在消化系统恶性肿瘤中的研究进展[J]. 西南军医, 2019, 21(1): 48-51. DOI:10.3969/j.issn.1672-7193.2019.01.014.
- [20] TIAN B R, HAN X Y, LI G Z, et al. A long intergenic non-coding RNA, LINC01426, promotes cancer progression via AZGP1 and predicts poor prognosis in patients with LUAD[J/OL]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2020, 18: 765-780[2020-07-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7476811/>. DOI:10.1016/j.omtm.2020.08.001.

[收稿日期] 2020-08-10

[修回日期] 2020-11-30

[本文编辑] 党瑞山