DOI:10.16016/j.1000-5404.201407157

论著

锌-α2-糖蛋白在食管鳞癌组织中的表达及预后意义

姚传山,马 磊,赵旭林,李芳芳,贺利民 (473012 河南 南阳,南阳市第一人民医院肿瘤科)

[摘要] **目的** 研究锌-α2-糖蛋白(Zn-alpha2-glycoprotein,ZGP1)在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织中的表达及AZGP1蛋白表达水平对患者预后的影响。**方法** 采用免疫组织化学方法检测112例食管鳞癌组织及25例癌旁正常食管黏膜组织中AZGP1蛋白的表达。分析食管鳞癌组织中AZGP1蛋白表达与临床病理特征的关系及对患者预后的影响。**结果** ESCC组织中AZGP1蛋白高表达率低于癌旁正常食管黏膜组织(47.3% *vs* 76.0%,$\chi^2=6.741$,$P=0.008$);在高-中分化(60.9%)、T1~3分期(61.7%)及临床分期Ⅰ期+Ⅱ期(58.3%)食管鳞癌组织中AZGP1蛋白高表达多($P<0.05$);生存分析表明,AZGP1蛋白高表达组较低表达组具有生存优势,无进展生存期(progression-free survival, PFS)及总生存期(overall survivaL, OS)均延长,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** AZGP1蛋白高表达可能对ESCC有抑制作用,AZGP1蛋白表达水平可预测ESCC患者的预后。

[关键词] 锌-α2-糖蛋白;食管鳞状细胞癌;预后
[中图法分类号] R341; R730.23; R735.1 [文献标志码] A

Expression of AZGP1 protein and its relationship with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma

Yao Chuanshan, Ma Lei, Zhao Xulin, Li Fangfang, He Limin (Department of Oncology, First People's Hospital of Nanyang City, Nanyang, Henan Province, 473012, China)

[**Abstract**] Objective To determine the expression and prognostic value of Zn-alpha2-glycoprotein (AZGP1) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Methods A total of 112 ESCC patients who admitted in the department of thoracic surgery of our hospital from January 2008 to June 2010 were enrolled in this study, and they were all followed up till April 2014. The expression of AZGP1 in their samples of ESCC and 25 adjacent normal esophageal mucosa were detected by immunohistochemistry. Correlations of the expression of AZGP1 in the ESCC with their clinical features and prognosis were analyzed with statistical program SPSS 17.0. Results The high expression of AZGP1 protein was significantly lower in the ESCC tissues than the adjacent normal esophageal mucosa (47.3% *vs* 76.0%, *Chi* square = 6.741, $P=0.008$). The high expression was found in the tumors of high and moderate differentiation (60.9%), of T1-3 stage (61.7%) and clinical stages Ⅰ+Ⅱ (58.3%) (all $P<0.05$). Univariate survival analysis suggested that progression-free survival (PFS) and overall survivaL (OS) were better in the patients with high AZGP1 protein than those with lower ($P<0.05$). Conclusion High AZGP1 protein expression may have some inhibitory effect on ESCC, and its the expression level may predict the prognosis of ESCC patients.

[**Key words**] Zn-alpha2-glycoprotein; esophageal squamous cell carcinoma; prognosis

Corresponding author: He Limin, E-mail: nyhelimin@163.com

[通信作者] 贺利民,E-mail: nyhelimin@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1530.075.html(2014-12-02)

食管癌在恶性肿瘤中的发病率居第6位，在河南等地区有着更高的发病率[1-2]。食管癌在组织病理学及遗传学上是一个异质性疾病，依据传统的组织病理学分类很难推测其预后。食管癌的发生是一个多因素、多步骤的过程，在食管癌的不同进展阶段，均涉及癌基因的激活以及肿瘤抑制基因的失活。癌基因的激活以及肿瘤抑制基因的失活的连续增益为实体瘤的逐步发展提供了必要基础，包括恶性肿瘤形成、发展、浸润及转移[3]。最近，一些新的与食管癌相关的癌基因和抑癌基因已被确定，可能在临床上对食管癌的早期诊断和有效的治疗以及推测预后有重要意义。

锌-α2-糖蛋白（Zn-alpha2-glycoprotein，AZGP1）基因位于染色体7q22，编码是一种41×10³的可溶性糖蛋白，其蛋白质由299个氨基酸组成，包括4个外显子和3个内含子[4]。近年研究表明，AZGP1参与了多种肿瘤的发生和分化，在前列腺癌及乳腺癌，其表达水平与肿瘤的分化程度密切相关[5]。并且，AZGP1是前列腺癌的一个潜在的血清标志物[6]。研究显示，AZGP1在前列腺癌、胰腺癌和其他一些恶性肿瘤中具有肿瘤抑制功能[7-8]。然而AZGP1在食管鳞癌中的作用尚未被评估。本研究通过免疫组织化学法检测食管鳞癌组织及癌旁正常食管黏膜中AZGP1蛋白表达，分析AZGP1蛋白表达与临床病理特征之间的关系，并评估AZGP1蛋白表达对食管鳞癌患者的预后价值。

1 对象与方法

1.1 对象

收集2008年1月至2010年6月在河南省南阳市第一人民医院行手术切除的食管鳞癌标本112例，均经病理学确诊。所有病例无糖尿病、类风湿、甲状腺功能亢进等其他疾病，术前未接受化疗、放疗以及生物免疫治疗。术后开始随访，截止日期为2014年4月30日。生存时间以月为单位，计算自手术之日至肿瘤进展的时间为无进展生存期（progression-free survival，PFS），自手术之日至死亡或最后随访时间为总生存期（overall survivaL，OS）。其中男性73例，女性39例，年龄45～76岁，中位年龄60岁，≥60岁49例，<60岁63例；低分化46例，高-中分化66例；行根治术100例，未行根治术12例；有淋巴结转移60例，淋巴结转移阴性52例；按国际抗癌联盟（international union against cancer，UICC）第7版TNM分期标准，Ⅰ期22例、Ⅱ期26例、Ⅲ期54例、Ⅳ期10例。

1.2 方法

将石蜡包埋的食管鳞癌组织行4 μm连续切片，备免疫组织化学法检测。兔抗人AZGP1多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司，二步法抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒购自丹麦DAKO公司，非免疫山羊血清、苏木精等购自北京中杉金桥生物技术公司。操作步骤参照试剂盒说明书进行。以非免疫兔或小鼠的IgG代替特异性一抗作为阴性对照，以已知的阳性表达组织切片作为阳性对照。

1.3 免疫组化结果的评判

在光学显微镜下观察免疫组织化学切片，评价AZGP1蛋白在食管鳞癌组织及癌旁正常食管黏膜中表达水平。实验结果采用半定量评分标准评估。根据AZGP1蛋白染色强度（不着色为阴性0分，着淡黄色为弱阳性1分，着棕黄色为阳性2分，着棕褐色或出现粗大棕褐色颗粒为强阳性3分）和阳性染色细胞百分率（1%～10%为1分；10%～50%为2分；>50%～75%为3分；75%阳性以上为4分）评分，两者评分相加所得半定量值为染色指数，<4分评判为AZGP1表达水平降低。

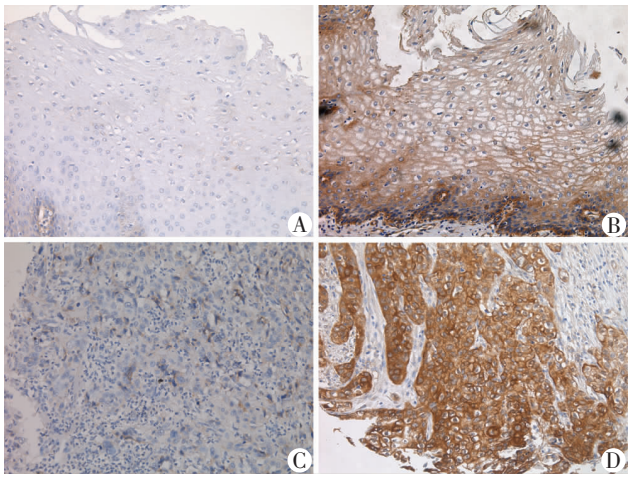
1.4 统计学分析

采用SPSS 17.0统计学软件，比较2组计数资料之间的差别用χ^2检验，采用Kaplan-Meier法计算生存率及描绘生存曲线。

2 结果

2.1 食管鳞癌组织及癌旁正常食管黏膜中AZGP1蛋白的表达

AZGP1蛋白主要表达在食管鳞癌组织及癌旁正常食管黏膜组织的细胞膜和细胞质中（图1）。在112例食管鳞癌组织中AZGP1蛋白高表达53例，低表达59例；在25例癌旁正常食管黏膜中AZGP1蛋白高表达19例，低表达6例；AZGP1蛋白在食管鳞癌组织及癌旁正常食管黏膜中表达水平差别有统计学意义（47.3% *vs* 76.0%，$\chi^2=6.741$，$P=0.008$）。



A：癌旁正常食管黏膜组织中AZGP1蛋白低表达；B：癌旁正常食管黏膜组织中AZGP1蛋白高表达；C：食管鳞癌组织中AZGP1蛋白低表达；D：食管鳞癌组织中AZGP1蛋白高表达

图1 免疫组化检测食管鳞癌组织及癌旁正常食管黏膜中AZGP1蛋白的表达 （S-P ×200）

2.2 食管鳞癌组织中 AZGP1 蛋白表达与临床病理特征的关系

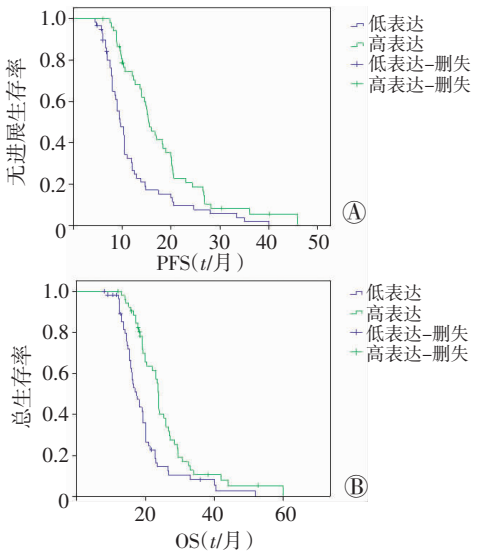
112 例食管鳞癌组织中 AZGP1 蛋白低表达 59 例(52.7%),高表达 53 例(47.3%);AZGP1 蛋白在高-中分化(62.1%)、T1 ~ 3 分期(61.7%)及临床分期Ⅰ期 + Ⅱ期(58.3%)食管鳞癌组织中高表达多,在低分化(60.9%)、T4 分期(63.8%)及临床分期Ⅲ期 + Ⅳ期(60.9%)食管鳞癌组织中低表达多,P 值分别为 0.014、0.008 和 0.033,差异有统计学意义;但 AZGP1 蛋白表达水平与患者的性别、年龄、是否行根治术及淋巴结是否转移等临床特征无关(表 1)。

表 1 AZGP1 蛋白表达与食管鳞癌患者临床病理特征的关系

临床病理特征	n	AZGP1		P 值
		低表达	高表达	
年龄(岁)				0.452
<60	63	34	29	
≥60	49	25	24	
性别				0.508
男	73	38	35	
女	39	21	18	
分化程度				0.014
高分化 + 中分化	66	25	41	
低分化	46	28	18	
根治术				0.237
是	100	51	49	
否	12	8	4	
T 分期				0.008
T1 + T2 + T3	47	18	29	
T4	65	41	24	
淋巴结转移				0.484
无	52	28	24	
有	60	31	29	
临床分期				0.033
Ⅰ期 + Ⅱ期	48	20	28	
Ⅲ期 + Ⅳ期	64	39	25	

2.3 AZGP1 蛋白表达对肺腺癌患者生存的影响

112 例食管鳞癌患者中根据 AZGP1 蛋白表达水平分高表达组及低表达组 2 组,随访显示 PFS 为 4.5 ~ 45.9 个月,AZGP1 蛋白低表达组中位 PFS 为 9.6 个月,AZGP1 蛋白高表达组中位 PFS 为 15.4 个月,2 组差异有统计学意义($\chi^2 = 12.990$,$P < 0.01$)。OS 为 9.0 ~ 60.1 个月,AZGP1 蛋白低表达组中位 OS 为 17.4 个月,AZGP1 蛋白高表达组中位 OS 为 23.8 个月,2 组差异有统计学意义($\chi^2 = 12.225$,$P < 0.01$,图 2)。



A:PFS 生存曲线;B:OS 生存曲线

图 2 AZGP1 蛋白表达水平与食管鳞癌患者关系生存曲线

3 讨论

食管癌的预后与肿瘤细胞的生物学特点密切相关,如肿瘤细胞生长、分化、侵袭等,而这些生物特性则由相关基因决定。研究报道正常口腔组织中 AZGP1 表达水平高于口腔肿瘤组织[9],本研究发现,癌旁正常食管黏膜中 AZGP1 蛋白表达水平高于食管鳞癌组织($P < 0.05$),与上述报道一致,推测 AZGP1 可能为抑癌基因。Descazeaud 等[8]报道了 AZGP1 在 91.1% 的良性增生腺体组织中表达,但只有在 40.7% 低分化肿瘤组织、48.5% 高分化前列腺腺癌组织和 8% 转移癌组织中表达。本研究显示 AZGP1 蛋白在高-中分化、T1 ~ 3 分期及临床分期Ⅰ期 + Ⅱ期食管鳞癌组织中高表达多,在低分化、T4 分期及临床分期Ⅲ期 + Ⅳ期食管鳞癌组织中低表达多($P < 0.05$)。可以推测 AZGP1 蛋白高表达的食管鳞癌患者可能恶性程度较低;而 AZGP1 蛋白低表达的食管鳞癌患者倾向于恶性程度高。这些结果表明 AZGP1 高表达可能对食管鳞癌有抑制作用。

目前 AZGP1 抑制肿瘤的分子机制仍不清楚。AZGP1 属于巨球蛋白家族的一个古老和进化保守的

链接免疫系统。Zorin 等[10]认为巨球蛋白有结合水解酶的能力,可能抑制水解酶介导的肿瘤浸润。并且在同一时间过量的巨球蛋白/水解酶复合物可以激活细胞凋亡[11]。He 等[12]报道称,AZGP1 可下调细胞周期蛋白依赖性激酶,它负责调节细胞周期 G_2 ~ M 过渡,是细胞周期中的限速步骤。这表明 AZGP1 间接地抑制肿瘤的进展。另外,在胰腺癌中 AZGP1 也被认为是肿瘤抑制基因;Kong 等[7]的研究表明,通过抑制 TGF-β 介导的 ERK 信号,AZGP1 基因可诱导间充质细胞转分化。然而,AZGP1 在食管鳞癌中抑制肿瘤的分子机制需进一步研究。

Huang 等[13]研究发现与 AZGP1 mRNA 及蛋白低表达的胃癌患者相比,高表达的胃癌患者的 5 年生存率及总生存率均明显增高($P<0.05$)。本研究发现与 AZGP1 蛋白低表达的食管鳞癌患者相比,高表达的食管鳞癌患者无肿瘤进展生存时间及总生存时间均明显延长。这些结果表明,AZGP1 可以作为一个新的预测食管鳞癌患者预后的生物标记物。

总之,本研究对食管鳞癌组织中 AZGP1 蛋白表达水平做了考察,发现 AZGP1 蛋白表达水平与食管鳞癌患者的临床病理特征如肿瘤分化程度、T 分期及临床分期存在关系,且影响食管鳞癌患者的预后。通过检测 AZGP1 蛋白表达水平可推测食管鳞癌恶性程度,预测食管鳞癌患者预后,从而在治疗上及早实施干预措施。然而,AZGP1 对食管鳞癌抑制作用所涉及的分子机制尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Hongo M, Nagasaki Y, Shoji T. Epidemiology of esophageal cancer: Orient to Occident. Effects of chronology, geography and ethnicity[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(5): 729 – 735.

[2] 庞慧, 解瑞玲, 尚可, 等. 巨噬细胞移动抑制因子和结缔组织生长因子在食管癌中的表达及其与预后的关系[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(4): 372 – 375.

[3] Ma S, Bao J Y, Kwan P S, *et al*. Identification of PTK6, *via* RNA sequencing analysis, as a suppressor of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Gastroenterology, 2012, 143(3):675 – 686. e1 – e12.

[4] Kumar A A, Hati D, Thaker T M, *et al*. Strong and weak zinc binding sites in human zinc-α2-glycoprotein [J]. FEBS Lett, 2013, 587(24):3949 – 3954.

[5] Hale L P, Price D T, Sanchez L M, *et al*. Zinc alpha-2-glycoprotein is expressed by malignant prostatic epithelium and may serve as a potential serum marker for prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 2001,7(4):846 – 853.

[6] Yip P Y, Kench J G, Rasiah K K, *et al*. Low AZGP1 expression predicts for recurrence in margin-positive, localized prostate cancer[J]. Prostate, 2011, 71(15):1638 – 1645.

[7] Kong B, Michalski C W, Hong X, *et al*. AZGP1 is a tumor suppressor in pancreatic cancer inducing mesenchymal-to-epithelial transdifferentiation by inhibiting TGF-beta-mediated ERK signaling[J]. Oncogene, 2010, 29(37): 5146 – 5158.

[8] Descazeaud A, de-la-Taille A, Allory Y, *et al*. Characterization of ZGP protein expression in prostate cancer using a semi-automated microscope system[J]. Prostate, 2006, 66(10): 1037 – 1043.

[9] Saito Y, Kasamatsu A, Yamamoto A, *et al*. ALY as a potential contributor to metastasis in human oral squamous cell carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(4):585 – 594.

[10] Zorin N A, Zorina V N, Zorina R M. Role of proteins of the macroglobulin family in regulation of tumor growth [J]. Ontogenez, 2006, 37(1):12 – 19.

[11] Zorin N A, Zorina V N, Zorina R M. The role of macroglobulin family proteins in the regulation of inflammation[J]. Biomed Khim, 2006, 52(3): 229 – 238.

[12] He N, Brysk H, Tyring S K, *et al*. Zinc-alpha(2)-glycoprotein hinders cell proliferation and reduces cdc2 expression [J]. J Cell Biochem Suppl, 2001, Suppl 36:162 – 169.

[13] Huang C Y, Zhao J J, Lv L, *et al*. Decreased expression of AZGP1 is associated with poor prognosis in primary gastric cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(7):e69155.

(**收稿**:2014-07-24;**修回**:2014-10-11)

(编辑 汪勤俭)