

骨肉瘤患者癌组织中 AHA1 mRNA 和 LOXL2 mRNA 表达与侵袭转移基因 mRNA 表达的相关性及临床意义

沈家亮, 王琳, 尚文强 (华北医疗健康集团峰峰总医院骨科, 河北邯郸 056201)

摘要: **目的** 研究骨肉瘤 (osteosarcoma) 患者癌组织中热休克蛋白 90 ATP 酶激活因子 1 (the activator of HSP90 ATPase-1, AHA1) 和赖氨酰氧化酶样蛋白 2 (lysyl oxidase like-2 protein, LOXL2) 表达与侵袭转移基因 mRNA 表达的相关性及临床意义。**方法** 选取 2016 年 2 月~2017 年 3 月华北医疗健康集团峰峰总医院诊治的 90 例骨肉瘤患者为研究对象。应用实时荧光定量 PCR 检测组织中 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 及侵袭转移基因 Wnt 家族成员 9A (Wnt9a) mRNA, 锌指 E 盒结合同源盒 1 (Zinc finger E-box binding homeobox 1, ZEB1) mRNA, 锌指 E 盒结合同源盒 2 (ZEB2) mRNA, N-钙黏素 (N-cad) mRNA 和波形蛋白 (Vim) mRNA 表达。采用 Pearson 相关分析, 比较不同临床特征骨肉瘤患者 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 表达差异。Kaplan-Meier 生存分析影响 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 表达对骨肉瘤患者预后的影响。单因素及多因素 COX 回归分析影响骨肉瘤患者预后的因素。**结果** 骨肉瘤组织中 AHA1 mRNA (3.16 ± 0.59), LOXL2 mRNA (2.84 ± 0.44) 及侵袭转移基因 Wnt9a mRNA (3.23 ± 0.42), ZEB1 mRNA (2.73 ± 0.39), ZEB2 mRNA (2.52 ± 0.56), N-cad mRNA (2.71 ± 0.65), Vim mRNA (2.81 ± 0.73) 表达均高于癌旁组织 (1.10 ± 0.21 , 0.95 ± 0.18 , 0.79 ± 0.15 , 0.64 ± 0.11 , 0.98 ± 0.19 , 0.68 ± 0.14 , 0.72 ± 0.15), 差异具有统计学意义 ($t=31.206$, 37.716 , 51.903 , 48.931 , 24.706 , 28.964 , 26.605 , 均 $P<0.05$)。骨肉瘤组织中 AHA1 mRNA 与 LOXL2 mRNA 表达呈显著正相关 ($r=0.712$, $P<0.05$)。骨肉瘤组织中 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 与侵袭转移基因 Wnt9a mRNA, ZEB1 mRNA, ZEB2 mRNA, N-cad mRNA, Vim mRNA 表达呈显著正相关 ($r=0.504\sim 0.720$, 均 $P<0.05$)。Enneking 分期 III 期、有软组织浸润和有肺转移骨肉瘤组织中 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 表达高于 Enneking 分期 I~II 期、无软组织浸润和无肺转移患者, 差异具有统计学意义 ($t=14.122\sim 171.054$, 均 $P<0.05$)。AHA1 mRNA 高表达组和低表达组患者五年生存率分别为 36.36% (16/44), 78.26% (36/46)。AHA1 mRNA 高表达组患者五年累积生存率明显低于低表达组, 差异有统计学意义 (Log-rank $\chi^2=16.081$, $P<0.05$)。LOXL2 mRNA 高表达组和低表达组患者五年生存率分别为 34.88% (15/43), 78.72% (37/47)。LOXL2 mRNA 高表达组患者五年累积生存率明显低于低表达组, 差异有统计学意义 (Log-rank $\chi^2=15.880$, $P<0.05$)。肺转移 (OR=1.921, $P<0.05$), Enneking 分期 III 期 (OR=1.906, $P<0.05$), AHA1 mRNA 高表达 (OR=1.405, $P<0.05$), LOXL2 mRNA 高表达 (OR=1.733, $P<0.05$) 是影响骨肉瘤患者不良生存预后的独立危险因素。**结论** 骨肉瘤组织中 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 表达升高, 两者表达与侵袭转移基因表达有关, 是影响骨肉瘤患者不良生存预后的独立危险因素。

关键词: 骨肉瘤; 热休克蛋白 90 ATP 酶激活因子 1; 赖氨酰氧化酶样蛋白 2; 肿瘤侵袭转移

中图分类号: R738.1; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2024) 02-039-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2024.02.008

Correlation between the Expression of AHA1 mRNA and LOXL2 mRNA in Osteosarcoma Patients Tissues with mRNA Expression of Invasion and Metastasis Genes and Their Clinical Significance

SHEN Jialiang, WANG Lin, SHANG Wenqiang (Department of Orthopedics, North China Medical and Health Group Fengfeng General Hospital, Hebei Handan 056021, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between the expression of the activator of HSP90 ATPase-1 (AHA1), lysyl oxidase like-2 protein (LOXL2) in osteosarcoma tissues with mRNA expression of invasion and metastasis genes and their clinical significance. **Methods** A total of 90 osteosarcoma patients diagnosed and treated in North China Medical and Health Group Fengfeng General Hospital from February 2016 to March 2017 were selected as the research object. The expression of AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA and invasion and metastasis genes Wnt family member 9A (Wnt9a) mRNA, zinc finger E-box

基金项目: 河北省“三三三人才工程”资助项目 (C20221129): 骨肉瘤组织中 AHA1 和 LOXL2 表达与侵袭转移基因表达的相关性及临床意义研究。

作者简介: 沈家亮 (1983-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 骨肿瘤, E-mail: sjl19831210@163.com。

通讯作者: 尚文强 (1981-), 男, 本科, 副主任医师, 研究方向: 骨与关节、骨肿瘤, E-mail: 153896276@qq.com。

binding homologous box 1 (ZEB1) mRNA, zinc finger E-box binding homologous box 1 (ZEB2) mRNA, N-cadherin (N-cad) mRNA, and vimentin (Vim) mRNA in tissues were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Pearson correlation analysis was used for correlation analysis. The differences in expression of AHA1 mRNA and LOXL2 mRNA in osteosarcoma patients among different clinical characteristics were compared. Kaplan-Meier survival analysis was used to analyze the effect of AHA1 mRNA and LOXL2 mRNA on the prognosis of osteosarcoma patients. The prognostic factors of osteosarcoma patients were analyzed by univariate and multivariate COX regression. **Results** The expressions of AHA1 mRNA (3.16 ± 0.59), LOXL2 mRNA (2.84 ± 0.44) and invasion and metastasis genes [Wnt9a mRNA (3.23 ± 0.42), ZEB1 mRNA (2.73 ± 0.39), ZEB2 mRNA (2.52 ± 0.56), N-cad mRNA (2.71 ± 0.65) and Vim mRNA (2.81 ± 0.73)] in osteosarcoma tissues were higher than those in paracancerous tissues (1.10 ± 0.21 , 0.95 ± 0.18 , 0.79 ± 0.15 , 0.64 ± 0.11 , 0.98 ± 0.19 , 0.68 ± 0.14 , 0.72 ± 0.15), and the differences were statistically significant ($t=31.206$, 37.716 , 51.903 , 48.931 , 24.706 , 28.964 , 26.605 , all $P<0.05$). There was a significant positive correlation between AHA1 mRNA and LOXL2 mRNA expression in osteosarcoma ($r=0.712$, $P<0.05$). The expressions of AHA1 mRNA and LOXL2 mRNA were significantly positively correlated with the expressions of invasion and metastasis genes (Wnt9a, ZEB1, ZEB2, N-cad, and Vim mRNA) in tumor tissue of osteosarcoma group ($r=0.504\sim 0.720$, all $P<0.05$). The expressions of AHA1 mRNA and LOXL2 mRNA in osteosarcoma tissues with Eneeking stage III, soft tissue infiltration, and lung metastasis were higher than those in patients with Eneeking stage I~II, no soft tissue infiltration, and no lung metastasis, with significant differences ($t=14.122\sim 171.054$, all $P<0.05$). The 5-year survival rates of patients in the AHA1 mRNA high expression group and low expression group were 36.36% (16/44) and 78.26% (36/46), respectively. The 5-year cumulative survival rate of patients in the AHA1 mRNA high expression group was significantly lower than that in the low expression group (Log-rank $\chi^2=16.081$, $P<0.05$). The 5-year survival rates of patients with high and low expression of LOXL2 mRNA were 34.88% (15/43) and 78.72% (37/47), respectively. The 5-year cumulative survival rate of patients in the LOXL2 mRNA high expression group was significantly lower than that in the low expression group (Log-rank $\chi^2=15.880$, $P<0.05$). Lung metastasis (OR=1.921, $P<0.05$), Eneeking stage III (OR=1.906, $P<0.05$), AHA1 mRNA high expression (OR=1.405, $P<0.05$), and LOXL2 mRNA high expression (OR=1.733, $P<0.05$) were independent risk factors affecting the poor survival prognosis of osteosarcoma patients. **Conclusion** The expressions of AHA1 mRNA and LOXL2 mRNA in osteosarcoma were increased, and they were correlated with the expression of invasion and metastasis genes, indicating they may be independent risk factors affecting the poor survival and prognosis of osteosarcoma patients.

Keywords: osteosarcoma; the activator of HSP90 ATPase-1; lysyl oxidase like-2 protein; tumor invasion and metastasis

骨肉瘤 (osteosarcoma) 是源于间充质组织的恶性骨肿瘤, 具有进展快、易转移等临床特点^[1]。目前骨肉瘤的临床治疗有外科手术、放化疗等, 但仍有约 50% 的患者死于肿瘤转移^[2]。寻找影响骨肉瘤侵袭转移的关键机制, 对改善患者临床预后具有重要意义。热休克蛋白 90 ATP 酶激活因子 1 (activator of HSP90 ATPase activity 1, AHA1) 是热休克蛋白 90 (heat shock protein90, HSP90) 的伴侣分子, 能激活 HSP90 的三磷酸腺苷酶活性, 促进蛋白折叠、成熟和运输^[3]。研究发现, AHA1 在肝癌等肿瘤中表达上调, 其能增加肿瘤微卫星不稳定性, 促进肿瘤侵袭转移, 导致患者不良预后^[4]。赖氨酰氧化酶样蛋白 2 (lysyl oxidase like 2, LOXL2) 属于赖氨酰氧化酶基因家族成员, 催化胶原蛋白和弹性蛋白交联^[5]。研究发现, 乳腺癌、肝癌等癌症中 LOXL2 表达上调, 并能诱导肿瘤上皮间充质转化, 促进肿瘤侵袭转移及放化疗耐药^[6-7]。但 AHA1, LOXL2 在骨肉瘤中的表达及临床意义研究报道较少。本研究通过分析骨肉瘤组织中 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 表达与侵袭转移基因表达相关性, 探讨两者的临床预后意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2016 年 2 月~2017 年 3 月华北医疗健康集团峰峰总医院诊治的 90 例骨肉瘤患者为研究对象。纳入标准: ①所有患者均为初次诊治, 术前未接受手术、放化疗及中医药等治疗; ②经病理组织学检查确诊为骨肉瘤; ③患者及家属已签署知情同意书, 能够配合完成随访; ④临床病理资料完整。排除标准: ①继发性骨肉瘤; ②并发其他恶性肿瘤; ③围手术期死亡; ④严重心肺功能不全者。其中, 男性 60 例, 女性 30 例; 年龄 7~58 (24.16 ± 9.68) 岁。组织学类型: 成骨细胞型 44 例, 成软骨细胞型 21 例, 成纤维骨细胞型 25 例; 肿瘤部位: 躯干 31 例, 四肢 59 例; 肿瘤大小: <5 cm 40 例, ≥ 5 cm 50 例; Eneeking 分期: I 期 20 例, II 期 32 例, III 期 38 例; 有软组织浸润 53 例, 有肺转移 38 例; 治疗方案: 手术+术后辅助化疗 25 例, 新辅助化疗+手术+辅助化疗 65 例; 手术方式: 保肢 67 例, 截肢 23 例。本研究方案征得所在医院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 反转录试剂盒 (北京索莱宝生物技术有限公司, 货号 RP1100), 实时荧光定量

PCR 试剂盒（日本 TAKARA 公司，货号 R011），引物由华大公司设计合成，超微量分光光度计（美国赛默飞公司），qPCR 仪（美国 Bio-RAD 公司）。

1.3 方法

1.3.1 实时荧光定量 PCR 法检测组织中 AHA1 mRNA，LOXL2 mRNA 表达：留取骨肉瘤组织及癌旁组织（距离肿瘤边缘 >2 cm 并经病理组织检查明确无癌细胞），加入裂解液后液氮中研磨，3 000 r/min 离心 10 min，离心半径 10 cm，取上清用 Trizol 法提取总 RNA。检测样本 RNA 纯度， $A_{260nm}/A_{280nm}=1.8\sim2.1$ 。将 RNA 反转录为 cDNA 后进行荧光定量 PCR 反应。总体系 20 μ l，包括 2 \times SYBR Green 10 μ l，cDNA 2 μ l，双蒸水 6 μ l，正反向引物各 1 μ l。反应条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 5min，

94 $^{\circ}$ C 变性 30s，60 $^{\circ}$ C 退火 40s，72 $^{\circ}$ C 延伸 30s，共 40 次循环。以 GAPDH 为内参，根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 AHA1 mRNA，LOXL2 mRNA 及侵袭转移基因 Wnt 家族成员 9A（Wnt9a）mRNA，锌指 E 盒结合同源盒 1（zinc finger E-box binding homeobox 1，ZEB1）mRNA，锌指 E 盒结合同源盒 2（zinc finger E-box binding homeobox 2，ZEB2），N 型钙黏素（N-cadherin，N-cad）mRNA，波形蛋白（Vimentin，Vim）mRNA 表达的相对表达量。根据 AHA1 mRNA，LOXL2 mRNA 相对表达量的平均数 3.16，2.84 为临界值，分别分为 AHA1 mRNA 高表达组（ $n=44$ ）和低表达组（ $n=46$ ），LOXL2 mRNA 高表达组（ $n=43$ ）和低表达组（ $n=47$ ）。

表 1		引物序列	
项目	上游引物	下游引物	
AHA1	5'-TTACCAACGAAAGCTATGGCAA-3'	5'-AGTTGTGTCAAACAGTTCCATCA-3'	
LOXL2	5'-TGGAAGTCTTTGACACAAGTGT-3'	5'-GTTTGCCCTAGACTAGGCACA-3'	
Wnt9a	5'-ACGCCACCAACGCTCAACAA-3'	5'-ACAGTGTTTTTCAGCTTATCCGTG-3'	
ZEB1	5'-GTGTGAGGTGACGGAAGTGAG-3'	5'-ACCTGTCCAGTTTAGTTTGACG-3'	
ZEB2	5'-GCCTGACACAAATCTCGTG-3'	5'-GGGTCTACTGACTCTCCATTC-3'	
N-cad	5'-CAAGAGGCGCAAACAAGCC-3'	5'-GGTTGGCAATACCGTCATCC-3'	
Vim	5'-GGAGACGAGTCCAGCTAGTGT-3'	5'-CCACTCCACCCTCCCTTATTTC-3'	
GAPDH	5'-GCGATGGTCATGCAGTCAG-3'	5'-CAGGTGGCAGGTCATTTTCTT-3'	

1.3.2 随访方法：所有患者出院后开始进行定期随访，第 1 年每 3 个月随访 1 次，第 2 至 5 年每半年随访 1 次。随访方式为电话和门诊复查，随访内容为患者随访过程中存活状态、死亡时间及生存时间等资料。随访截止至 2022 年 4 月 1 日。随访终点为随访结束或患者出现死亡。

1.4 统计学分析 数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。符合正态性分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用两独立样本 t 检验。计数资料以率 (%) 表示，组间比较用卡方检验。Pearson 相关分析 AHA1 mRNA，LOXL2 mRNA 与

侵袭转移基因表达的相关性。Kaplan-Meier 法绘制生存曲线分析 AHA1 mRNA，LOXL2 mRNA 与骨肉瘤患者预后的关系。COX 比例风险模型进行单因素及多因素分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织中 AHA1 mRNA，LOXL2 mRNA 及侵袭转移基因的表达 见表 2。骨肉瘤组织中 AHA1 mRNA，LOXL2 mRNA 及侵袭转移基因 Wnt9a mRNA，ZEB1 mRNA，ZEB2 mRNA，N-cad mRNA，Vim mRNA 表达均高于癌旁组织，差异均具有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）。

表 2 组织中 AHA1 mRNA，LOXL2 mRNA 及侵袭转移基因的表达 ($\bar{x} \pm s$)				
项目	癌旁组织 ($n=90$)	骨肉瘤组织 ($n=90$)	t	P
AHA1 mRNA	1.10 \pm 0.21	3.16 \pm 0.59	31.206	0.001
LOXL2 mRNA	0.95 \pm 0.18	2.84 \pm 0.44	37.716	0.001
Wnt9a mRNA	0.79 \pm 0.15	3.23 \pm 0.42	51.903	0.001
ZEB1 mRNA	0.64 \pm 0.11	2.73 \pm 0.39	48.931	0.001
ZEB2 mRNA	0.98 \pm 0.19	2.52 \pm 0.56	24.706	0.001
N-cad mRNA	0.68 \pm 0.14	2.71 \pm 0.65	28.964	0.001
Vim mRNA	0.72 \pm 0.15	2.81 \pm 0.73	26.605	0.001

2.2 骨肉瘤组织 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 与侵袭转移基因表达的相关性 见表3。骨肉瘤组织中 AHA1 mRNA 与 LOXL2 mRNA 表达呈显著正相关 ($r=0.712$, $P=0.001$)。骨肉瘤组织中 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 与侵袭转移基因 Wnt9a mRNA, ZEB1 mRNA, ZEB2 mRNA, N-cad mRNA, Vim mRNA 表达呈显著正相关 (均 $P<0.05$)。

2.3 不同临床病理特征的骨肉瘤组织中 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 表达比较 见表4。Eneeking 分期Ⅲ期、有软组织浸润和有肺转移的骨肉瘤组织中 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 表达高

于Eneeking 分期Ⅰ~Ⅱ期、无软组织浸润和无肺转移患者, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。

表3 骨肉瘤组织中 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 与侵袭转移基因表达的相关性

项 目	AHA1 mRNA		LOXL2 mRNA	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Wnt9a mRNA	0.504	0.001	0.577	0.001
ZEB1 mRNA	0.720	0.001	0.508	0.001
ZEB2 mRNA	0.593	0.001	0.566	0.001
N-cad mRNA	0.589	0.001	0.610	0.001
Vim mRNA	0.710	0.001	0.679	0.001

表4 不同临床病理特征骨肉瘤中 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

类 别		<i>n</i>	AHA1 mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>	LOXL2 mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄 (岁)	≤ 18	52	3.07 ± 0.51	1.731	0.087	2.79 ± 0.40	1.291	0.200
	> 18	38	3.28 ± 0.64			2.91 ± 0.48		
性别	男	60	3.20 ± 0.52	0.948	0.346	2.89 ± 0.38	1.599	0.113
	女	30	3.08 ± 0.65			2.74 ± 0.49		
组织学类型	成骨细胞型	44	3.12 ± 0.55	0.210	0.811	2.81 ± 0.40	0.220	0.803
	成软骨细胞型	21	3.18 ± 0.63			2.85 ± 0.48		
	成纤维骨细胞型	25	3.21 ± 0.59			2.88 ± 0.44		
肿瘤部位	躯干	31	3.06 ± 0.64	1.161	0.249	2.73 ± 0.46	1.846	0.068
	四肢	59	3.21 ± 0.55			2.90 ± 0.39		
肿瘤大小 (cm)	< 5	40	3.03 ± 0.68	1.804	0.075	2.78 ± 0.49	1.159	0.249
	≥ 5	50	3.26 ± 0.53			2.89 ± 0.41		
Eneeking 分期	Ⅰ期	20	1.49 ± 0.64	116.296	0.001	1.26 ± 0.39	171.054	0.001
	Ⅱ期	32	3.18 ± 0.42			3.05 ± 0.37		
	Ⅲ期	38	4.02 ± 0.70			3.49 ± 0.52		
软组织浸润	有	53	3.95 ± 0.55	14.122	0.001	3.50 ± 0.39	14.812	0.001
	无	37	2.03 ± 0.74			1.89 ± 0.64		
肺转移	有	38	4.46 ± 0.65	18.233	0.001	4.07 ± 0.48	22.367	0.001
	无	52	2.21 ± 0.52			1.94 ± 0.42		
治疗方案	手术 + 术后辅助化疗	25	3.32 ± 0.67	1.655	0.102	2.97 ± 0.48	1.778	0.079
	新辅助化疗 + 手术 + 辅助化疗	65	3.10 ± 0.52			2.79 ± 0.41		
手术方式	截肢	23	3.31 ± 0.64	1.537	0.128	2.90 ± 0.47	0.791	0.431
	保肢	67	3.11 ± 0.50			2.82 ± 0.40		

2.4 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 表达对骨肉瘤患者生存预后的影响 见图1。本研究中, 随访时间3~60个月, 中位随访时间为22.3个月, 失访2例, 死亡38例, 五年生存率为57.78% (52/90)。AHA1 mRNA 高表达组和低表达组患者五年生存

率分别为36.36% (16/44), 78.26% (36/46), AHA1 mRNA 高表达组患者五年累积生存率明显低于低表达组, Log-rank 检验两者的差异有统计学意义 ($\chi^2=16.081$, $P=0.001$)。LOXL2 mRNA 高表达组和低表达组患者五年生存率分别为34.88%

(15/43)，78.72% (37/47)，LOXL2 mRNA 高表达组患者五年累积生存率明显低于低表达组，Log-rank 检验两者的差异有统计学意义 (Log-rank $\chi^2=15.880$, $P=0.001$)。

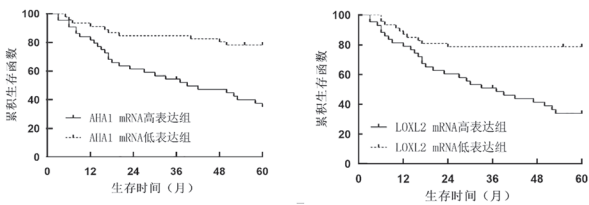


图 1 Kaplan-Meier 曲线分析 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 表达对骨肉瘤患者预后的影响

2.5 影响骨肉瘤患者预后的因素 见表 5, 6, 7。有肺转移、Eneeking 分期Ⅲ期、AHA1 mRNA 高表达、LOXL2 mRNA 高表达是影响骨肉瘤患者不良生存预后的独立危险因素。

表 5 变量赋值	
因 素	赋值
年龄	> 18 岁 vs ≤ 18 岁
性别	男 vs 女
组织学类型	成骨细胞型 vs 成软骨和成纤维细胞型
肿瘤部位	四肢 vs 躯干
肿瘤大小	≥ 5cm vs < 5cm
Eneeking 分期	Ⅲ期 vs Ⅱ期
软组织浸润	有 vs 无
肺转移	有 vs 无
手术方式	保肢 vs 截肢
治疗方案	手术 + 术后辅助化疗 vs. 新辅助化疗 + 手术 + 辅助化疗
AHA1 mRNA	高表达 vs 低表达
LOXL2 mRNA	高表达 vs 低表达

表 6 单因素 COX 比例风险模型分析						
因 素	β	SE	Wald χ^2	P	OR	95%CI
年龄	0.161	0.145	1.233	0.358	1.175	0.884~1.561
性别	0.128	0.110	1.354	0.224	1.137	0.916~1.410
组织学类型	0.134	0.125	1.149	0.579	1.143	0.895~1.461
肿瘤部位	0.122	0.083	2.161	0.223	1.130	0.960~1.329
肿瘤大小	0.313	0.197	2.524	0.180	1.368	0.929~2.012
Eneeking 分期	0.576	0.190	9.190	0.000	1.779	1.226~2.582
软组织浸润	0.308	0.210	2.151	0.234	1.361	0.902~2.054
肺转移	0.415	0.149	7.758	0.000	1.514	1.131~2.028
手术方式	0.120	0.087	1.902	0.324	1.127	0.951~1.337
治疗方案	0.304	0.176	2.983	0.162	1.355	0.960~1.914
AHA1 mRNA	0.563	0.172	10.714	0.000	1.756	1.253~2.460
LOXL2 mRNA	0.621	0.207	9.000	0.000	1.861	1.240~2.792

表 7 多因素 COX 比例风险模型分析						
因 素	β	SE	Wald χ^2	P	OR	95%CI
Eneeking 分期	0.645	0.201	10.297	0.000	1.906	1.285~2.826
肺转移	0.653	0.232	7.922	0.000	1.921	1.219~3.027
AHA1 mRNA	0.340	0.107	10.097	0.000	1.405	1.139~1.733
LOXL2 mRNA	0.550	0.186	8.744	0.000	1.733	1.204~2.496

3 讨论

骨肉瘤是恶性程度较高的骨髓间充质瘤。近年来如新辅助化疗、化疗及优化的手术方法，提高了患者的生存率，但仍有约 1/3 的患者发生复发转移^[8]。因此，有必要探索骨肉瘤进展的分子机制，寻找新的诊断治疗靶点，对改善骨肉瘤患者的临床预后具有重要的临床意义。上皮间质转化是促进肿瘤侵袭转移的关键生物学过程，是肿瘤细胞

丧失上皮极性、细胞之间的黏附性等特征，获得较强侵袭和迁移能力等间质性特征的过程，在骨肉瘤侵袭、转移过程中发挥重要的生物学作用^[9]。本研究中证实，骨肉瘤组织中上皮间质转化通路中 Wnt9a mRNA, ZEB1 mRNA, ZEB2 mRNA, N-cad mRNA 及 Vim mRNA 表达显著升高，与既往研究报道一致^[10]，提示上皮间质转化通路各基因的表达促进骨肉瘤侵袭、转移。

AHA1 基因位于 14q24.3, 是 HSP90 的分子伴侣, 能够与 HSP90 中间结构域结合, 促进 HSP90 中段催化环的构象转换, 激活 HSP90 的三磷酸腺苷酶活性。研究表明, AHA1 参与包括精子发生、囊性纤维化及肿瘤发生等多种生理和病理过程, 是重要的疾病诊断和治疗靶点^[3, 11]。本研究中, 骨肉瘤组织中 AHA1 mRNA 表达升高, 并与 Enecking 分期有关, 提示骨肉瘤中 AHA1 作为一种致癌因子, 促进骨肉瘤的肿瘤进展。肿瘤中 AHA1 的表达受 P53 基因调节。研究表明, DNA 损伤等因素能够上调肿瘤中 P53 基因表达, P53 通过抑制热休克蛋白 1, 下调 AHA1 的表达, 而骨肉瘤中 P53 基因突变^[12], 引起 P53 蛋白功能缺失, 导致 AHA1 的表达上调^[13]。有研究报道, 肿瘤中 c-Abl 激酶能够磷酸化激活 AHA1 的 Y223 位点, 抑制 AHA1 蛋白的泛素化降解, 同时促进 AHA1 与 HSP90 的相互作用, 导致肿瘤细胞恶性增殖^[14]。此外, 骨肉瘤肿瘤细胞中 AHA1 的表达上调还能够激活异柠檬酸脱氢酶 1 (isocitrate dehydrogenase1, IDH1), 促进肿瘤细胞代谢重编程, 促进骨肉瘤的增殖和转移^[15]。本研究中, 骨肉瘤组织中 AHA1 mRNA 表达与软组织浸润和肺转移有关, 提示 AHA1 阳性表达的骨肉瘤肿瘤细胞侵袭及转移能力较强。为进一步明确 AHA1 促进骨肉瘤侵袭转移的机制, 本研究发现, 骨肉瘤组织中 AHA1 mRNA 的表达与侵袭转移基因 Wnt9a mRNA, ZEB1 mRNA, ZEB2 mRNA, N-cad mRNA, Vim mRNA 表达呈正相关, 表明 AHA1 可能是通过促进侵袭转移基因的表达, 促进骨肉瘤的恶性进展。分析其原因, 可能是 AHA1 的表达能激活 Wnt/ β 连环蛋白信号通路, 促进上皮间质转化的发生。ASTL 等^[13]报道, P53 基因缺失小鼠中 AHA1 表达升高, HSP90 的三磷酸腺苷酶活性显著升高, 进而激活 Wnt/ β 连环蛋白信号传导, 上调 ZEB1, ZEB2 等转录因子的表达, 间质性标志物 N-cad, Vim 表达升高, 促进结肠癌肿瘤细胞的侵袭和迁移。本研究中, AHA1 mRNA 高表达骨肉瘤患者的生存预后较差, 是影响患者不良预后的独立危险因素, 表明 AHA1 是新的骨肉瘤患者预后相关肿瘤标志物。分析其原因, 可能与 AHA1 高表达骨肉瘤患者对化疗治疗敏感性降低有关。AHA1 作为 HSP90 的重要辅助因子, 其表达上调能够增强肿瘤细胞对化疗药物的耐药性^[16], 而阻断 AHA1 与 HSP90 的结合后, 能够重新恢复肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[17]。因此, AHA1 可能是一种新的骨肉瘤预后相关肿瘤标志物及潜在的药物靶点, 值得临床深入研究。临床医生可根据其表达水平, 对骨肉瘤患者的预后及化疗敏感性进行评估, 对于高

危患者, 予以积极治疗, 以改善患者生存预后。

LOXL2 是赖氨酰氧化酶样蛋白家族成员, 能够催化 I 型胶原和弹性蛋白相邻原纤维的赖氨酸残基的共价连接, 维持细胞外基质的合成和稳定。近年来发现, LOXL2 在乳腺癌、胰腺癌等恶性肿瘤中表达上调, 其通过组蛋白修饰作用, 降低细胞极性, 增加肿瘤的转移能力^[7, 18]。本研究中, 骨肉瘤组织中 LOXL2 mRNA 表达升高, 与 Enecking 分期有关, 提示 LOXL2 的表达参与骨肉瘤的恶性进展。骨肉瘤中 LOXL2 的表达与非编码 RNA 的调控异常有关。研究发现, 长链非编码 RNA HCP5 可通过靶向抑制微小 RNA-29b-3p, 增强 LOXL2 mRNA 的稳定性, 上调 LOXL2 的表达, 促进骨肉瘤肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[19]。本研究中, 伴有软组织浸润、肺转移骨肉瘤组织中 LOXL2 mRNA 表达较高, 相关性分析亦证实, LOXL2 与侵袭转移基因表达呈显著正相关, 提示 LOXL2 能促进肿瘤局部浸润及远处转移。笔者分析, 可能是 LOXL2 能够激活骨肉瘤中 Wnt 信号通路, 上调骨肉瘤中侵袭转移基因的表达, 促进骨肉瘤侵袭转移的发生。MATSUOKA 等^[20]报道, 骨肉瘤肿瘤细胞中 LOXL2 的表达升高能够促进转录因子复合体结合 Wnt7b 和 Wnt9a 启动子区域, 在转录水平上调 Wnt7b 和 Wnt9a 的表达, 进而激活下游 ZEB1 和 ZEB2 的表达, 促进肿瘤细胞上皮间质转化, 增强骨肉瘤肿瘤细胞侵袭转移能力, 而在使用泛赖氨酰氧化酶抑制剂抑制 LOXL2 表达, 逆转肿瘤细胞上皮间质转化, 抑制肿瘤肺部转移定植。本研究发现, LOXL2 mRNA 高表达骨肉瘤患者的生存预后较差, 是影响骨肉瘤患者不良预后独立危险因素。分析其原因, 可能是 LOXL2 表达升高促进化疗耐药性形成。研究发现, 结直肠癌中 LOXL2 的表达上调能够促进 5-氟尿嘧啶化疗耐药性的形成^[21]。以 LOXL2 为靶点的治疗可恢复化疗治疗的敏感性, 是骨肉瘤预后相关肿瘤标志物和潜在的治疗靶点。

本研究发现, 骨肉瘤中 AHA1 mRNA 与 LOXL2 mRNA 表达呈正相关, 提示两者在骨肉瘤中存在协同作用, 共同促进骨肉瘤的恶性进展。有研究指出, AHA1 在辅助激活 HSP90 后, 能够结合并激活 LOXL2 和半乳糖凝集素 3 结合蛋白, 促进肿瘤细胞侵袭和迁移, 而使用抑制剂抑制该通路后, 能够阻断恶性肿瘤的侵袭和转移^[22]。但目前骨肉瘤中两者之间的具体作用机制及能否成为新的骨肉瘤治疗靶点仍有待深入探索。

综上所述, AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 在骨肉瘤组织中表达升高, 与 Enecking 分期、软组织浸润和肺转移有关。AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA

表达与侵袭转移基因表达有关,两者可能通过促进侵袭转移基因的表达,导致骨肉瘤的恶性进展。临床上,医生可根据 AHA1 mRNA, LOXL2 mRNA 水平评估骨肉瘤患者的预后,具有潜在的临床应用价值。但本研究尚存在不足之处,本研究未在分子细胞实验水平分析 AHA1, LOXL2 对骨肉瘤的促进作用及机制,有待今后继续深入研究。

参考文献:

- [1] EATON B R, SCHWARZ R, VATNER R, et al. Osteosarcoma[J]. *Pediatric Blood Cancer*, 2021, 68 (Suppl 2): e28352.
- [2] GILL J, GORLICK R. Advancing therapy for osteosarcoma[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2021, 18(10): 609-624.
- [3] LIU Xiaochuan, YANG Yenyu, WANG Yinsheng. HSP90 and AHA1 modulate microRNA maturation through promoting the folding of dicer1[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(12): 6990-7001.
- [4] LI Wenli, LIU Jun. The prognostic and immunotherapeutic significance of AHA1 in pancreatic cancer, and its relationship with the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 845585.
- [5] ZHANG Caixia, ZHU Mengjiao, WANG Huijuan, et al. LOXL2 attenuates osteoarthritis through inactivating Integrin/FAK signaling[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 17020.
- [6] WU Sifan, XING Xiaoxia, WANG Yaohui, et al. The pathological significance of LOXL2 in pre-metastatic niche formation of HCC and its related molecular mechanism[J]. *European Journal of Cancer*, 2021, 147: 63-73.
- [7] FERREIRA S, SARAIVA N, RIJO P, et al. LOXL2 inhibitors and breast cancer progression[J]. *Antioxidants*(Ease1), 2021, 10(2): 312.
- [8] YANG Chaofei, TIAN Ye, ZHAO Fan, et al. Bone microenvironment and osteosarcoma metastasis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(19): 6985.
- [9] 姜富祥, 阿尔宾, 高飞, 等. miR-146b-5p 对骨肉瘤细胞增殖抑制及克隆形成的机制研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(3): 37-42, 104.
JIANG Fuxiang, A Erbin, GAO Fei, et al. Study on the mechanism of mir-146b-5p on proliferation inhibition and clonogenesis of osteosarcoma cells[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(3): 37-42, 104.
- [10] YU Xiaojun, GUO Xinzheng, LI Chao, et al. SIRT1-ZEB1-positive feedback promotes epithelial-mesenchymal transition process and metastasis of osteosarcoma[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(3): 3727-3735.
- [11] HU Xinyue, ZHOU Xin, ZHANG Jue, et al. Sphingolipid metabolism is associated with osteosarcoma metastasis and prognosis: Evidence from interaction analysis[J]. *Frontiers in Endocrinology* clausanne, 2022, 13: 983606.
- [12] OTANI S, DATE Y, UENO T, et al. Runx3 is required for oncogenic Myc upregulation in p53-deficient osteosarcoma[J]. *Oncogene*, 2022, 41(5): 683-691.
- [13] ASTL L, STETZ G, VERKHIVKER G M. Allosteric mechanism of the Hsp90 chaperone interactions with cochaperones and client proteins by modulating communication spines of coupled regulatory switches: integrative atomistic modeling of HSP90 signaling in dynamic interaction networks[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2020, 60(7): 3616-3631.
- [14] BIEBL M M, BUCHNER J. P23 and AHA1: distinct functions promote client maturation[J]. *Sub Cellular Biochemistry*, 2023, 101: 159-187.
- [15] ZHENG Diwei, LIU Weihai, XIE Wenlin, et al. AHA1 upregulates IDH1 and metabolic activity to promote growth and metastasis and predicts prognosis in osteosarcoma[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6(1): 25.
- [16] HEIDER M, EICHNER R, STROH J, et al. The IMiD target CRBN determines HSP90 activity toward transmembrane proteins essential in multiple myeloma[J]. *Molecular Cell*, 2021, 81(6): 1170-1186. e10.
- [17] BACKE S J, SAGER R A, MELUNI K A, et al. Emerging link between Tsc1 and FNIP co-chaperones of HSP90 and cancer[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(7): 928.
- [18] ALONSO-NOCELO M, RUIZ-CAÑAS L, SANCHEZ P, et al. Macrophages direct cancer cells through a LOXL2-mediated metastatic cascade in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Gut*, 2023, 72(2): 345-359.
- [19] TAN Jindian, ZHOU Meifeng, YANG Song, et al. Long noncoding RNA HCP5 promotes osteosarcoma cell proliferation, invasion, and migration via the miR-29b-3p-LOXL2 axis[J]. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 2022, 38(10): 960-970.
- [20] MATSUOKA K, BAKIRI L, WOLFF L I, et al. Wnt signaling and Loxl2 promote aggressive osteosarcoma[J]. *Cell Research*, 2020, 30(10): 885-901.
- [21] ZHENG Guili, LIU Yulin, YAN Zexuan, et al. Elevated LOXL2 expression by LINC01347/miR-328-5p axis contributes to 5-FU chemotherapy resistance of colorectal cancer[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2021, 11(4): 1572-1585.
- [22] SAGER R A, KHAN F, TONEATTO L, et al. Targeting extracellular HSP90: a unique frontier against cancer[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022, 17(9): 9825-9836.

收稿日期: 2023-05-17

修回日期: 2023-11-13