

. 论 著 .

AMOTL2 与 FKBP51 表达水平与胶质母细胞瘤病人预后的关系

刘志峰 陈永汉 姜 浩

【摘要】目的 探讨胶质母细胞瘤(GBM)类血管动蛋白-2(AMOTL2)与 FK506 结合蛋白 51(FKBP51)表达变化及临床意义。**方法** 收集 2016 年 6 月~2019 年 6 月手术切除的 GBM 标本 92 例,以取同期颅脑损伤内减压术切除的非肿瘤脑组织 48 例为对照。采用免疫组化染色法检测 AMOTL2、FKBP51 表达。GBM 病人术后随访 2 年,记录无进展生存期和总生存期。**结果** GBM 组织 AMOTL2 低表达率、FKBP51 高表达率均明显高于对照组($P<0.05$)。GBM 组织 AMOTL2 表达水平与 P53、EGFR 呈明显负相关($P<0.05$),FKBP51 表达水平与 P53、EGFR 呈明显正相关($P<0.05$)。Cox 比例回归风险模型分析显示,AMOTL2 低表达、FKBP51 高表达是 GBM 生存预后不良的独立危险因素($P<0.05$)。生存曲线分析显示,AMOTL2 高表达组病人无进展生存期、总生存期较低表达组均明显延长($P<0.05$),FKBP51 高表达组无进展生存期、总生存期较低表达组均明显缩短($P<0.05$)。**结论** GBM 组织 AMOTL2 呈低表达,而 FKBP51 呈高表达,二者均与 P53、EGFR 表达相关,与病人预后密切相关。

【关键词】 胶质母细胞瘤;类血管动蛋白-2;FK506 结合蛋白 51;预后

【文章编号】 1009-153X(2021)10-0780-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Relationship between AMOTL2 and FKBP51 expression and prognoses of glioblastoma patients

LIU Zhi-feng, CHEN Yong-han, JIANG Hao. Department of Neurosurgery, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061001, China

【Abstract】 Objective To explore the expression changes of angiomin-2 (AMOTL2) and FK506 binding protein 51 (FKBP51) in glioblastoma (GBM) tissues and their clinical significance. **Methods** The expression levels of AMOTL2 and FKBP51 were detected in GBM tissues obtained from 92 GBM patients who underwent microsurgery from June 2016 to June 2019 and in non-tumor cerebral tissues obtained from 48 patients (control) with traumatic brain injury who underwent decompression during the same period by immunohistochemical staining. The patients with GBM were followed up for 2 years, and the progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were recorded. **Results** The low expression rate of AMOTL2 and the high expression rate of FKBP51 in GBM tissues were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The expression level of AMOTL2 in GBM tissues was significantly negatively correlated with P53 and EGFR ($P<0.05$), and the expression level of FKBP51 was significantly positively correlated with P53 and EGFR ($P<0.05$). Cox proportional regression risk model analysis showed that low expression of AMOTL2 and high expression of FKBP51 were independent risk factors for poor survival prognoses of GBM patients ($P<0.05$). Survival curve analysis showed that the PFS and OS of patients in the AMOTL2 high-expression group were significantly prolonged compared to the low-expression group ($P<0.05$). The PFS and OS of patients in the FKBP51 high-expression group were significantly shortened compared to the low-expression group ($P<0.05$). **Conclusions** The expression of AMOTL2 in GBM tissue is low, while the expression of FKBP51 is high. Both of them are related to the expression of P53 and EGFR in GBM tissues, and are closely related to the GBM patient's prognosis.

【Key words】 Glioblastoma; Angiomin like-2; FK506 binding proteins 51; Prognosis

胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)是恶性程度最高的颅内原发性肿瘤,目前主要行手术治疗联合化疗、放疗等综合治疗,但因肿瘤呈侵袭性生长,彻底切除难度大,术后易复发,预后很差。近年来,研究发现肿瘤组织多种基因呈异常表达^[1]。研究发现血管动蛋白(angiotin, AMOT)家族成员可

能具有抑癌或致癌作用,类血管动蛋白-2(angiotin like-2, AMOTL2)作为该家族的一员,参与肿瘤进展^[2]。Takaoka 等^[3]发现 FK506 结合蛋白 51(FK506 binding proteins 51, FKBP51)可通过调节 RhoA 和 ROCK 蛋白,对细胞运动进行控制,参与肿瘤细胞侵袭、迁移。本文探讨 AMOTL2、FKBP51 表达水平与 GBM 病人预后的关系,为临床提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象 纳入标准:病理诊断证实为 GBM;年

表 1 GBM 组织 AMOTL2、FKBP51、P53、EGFR 的表达变化及 IDH1 突变情况(例)

组别	AMOTL2 高表达	FKBP51 高表达	IDH1 突变	P53 高表达	EGFR 高表达
GBM 组	24(26.1%)*	43(46.7%)*	45(48.9%)*	48(52.2%)*	52(56.5%)*
对照组	35(72.9%)	11(22.9%)	2(4.2%)	11(22.9%)	7(14.6%)

注:与对照组相应值比,* $P<0.05$;GBM. 胶质母细胞瘤;AMOTL2. 类血管动蛋白-2;FKBP51. FK506 结合蛋白 51;EGFR. 表皮生长因子受体;IDH1. 异柠檬酸脱氢酶 1

龄≥18 岁;首次就诊,之前无放、化疗等;临床资料完善;签署同意书。排除标准:患其他原发性肿瘤;因 GBM 复发入院;患血液系统、自身免疫系统等疾病;入院前 3 个月内有大手术史;既往有精神障碍、脑血管疾病、脑膜炎等病史。

收集 2016 年 6 月~2019 年 6 月手术切除的 GBM 标本 92 例,取同期收治的颅脑损伤内减压术切除的非肿瘤脑组织 48 例为对照组。两组基线资料无统计学差异($P>0.05$,表 1)。

1.2 检测方法 采用免疫组化法分析 AMOTL2、FKBP51 以及异柠檬酸脱氢酶 1(isocitrate dehydrogenase-1, IDH1)、P53、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)表达情况。组织行石蜡包埋,切片厚度为 5 μm。60 ℃烘烤 30 min,脱蜡至水化,PBS 洗涤 3 次×3 min。微波炉内热修复 20 min 修复抗原,PBS 洗涤 3 次×3 min。3%去离子水孵育 15 min,PBS 洗涤 3 次×3 min。10%山羊血清室温反应 15 min。加一抗,37 ℃反应 2 h,4 ℃孵育过夜,PBS 洗涤 3 次×3 min。加二抗,37 ℃孵育 30 min,PBS 洗涤 3 次×3 min。加入辣根过氧化物酶,37 ℃反应 15 min,PBS 洗涤 3 次×3 min。DAB 显色后,苏木素复染,干燥、透明、封片,显微镜下观察。

免疫组化染色评分^[4]:记录高倍视野(×200)下阳

性细胞,以细胞膜、胞浆呈棕黄、棕褐色为阳性(图 1)。染色强度:阳性细胞占 0~5%、6%~25%、26%~50%、51%~75%、>75%分别计 0、1、2、3、4 分。显色程度:无显色、淡黄、棕黄以及棕褐色分别计 0、1、2、3 分。二者乘积为最终得分,0~2 分为阴性(低表达),≥3 分为阳性(高表达)。IDH1 突变蛋白主要表达于细胞质内,以所观察视野内可见棕褐色为阳性突变。

1.3 随访 出院后随访 2 年,包括微信、电话、门诊随访等,记录无进展生存期(术后 1 d 开始至出现肿瘤进展、复发的时间)、总生存期(术后 1 d 开始至死亡的时间)。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件分析;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验;采用 Spearman 相关系数分析相关性;采用多因素 Cox 比例回归风险模型分析生存预后的影响因素;生存曲线分析 FKBP51、AMOTL2 表达水平与病人生存期的关系; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GBM 组织 AMOTL2、FKBP51、P53、EGFR 的表达变化及 IDH1 突变情况 GBM 组织 AMOTL2 低表达率明显高于对照组($P<0.05$),FKBP51、P53、EGFR 高表达率明显高于对照组($P<0.05$),IDH1 突变率明显高于对照组($P<0.05$)。见表 1。

2.2 GBM 组织 AMOTL2、FKBP51 表达水平与 P53、EGFR 表达水平及 IDH1 突变水平的相关性 GBM 组

表 2 GBM 组织 AMOTL2、FKBP51 表达水平与 P53、EGFR 表达水平及 IDH1 突变水平的相关性

指标	AMOTL2		FKBP51	
	r	P	r	P
IDH1	-0.332	0.056	0.297	0.062
P53	-0.602	0.000	0.546	0.021
EGFR	-0.596	0.000	0.437	0.028

注:GBM. 胶质母细胞瘤;AMOTL2. 类血管动蛋白-2;FKBP51. FK506 结合蛋白 51;EGFR. 表皮生长因子受体;IDH1. 异柠檬酸脱氢酶 1

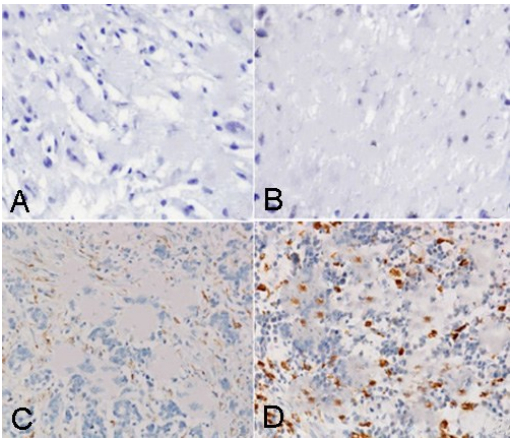


图 1 免疫组化染色检测 GBM 组织 AMOTL2、FKBP51 表达(SP 法,×200)
A. 对照组 AMOTL2 表达;B. GBM 组织 AMOTL2 表达;
C. 对照组 FKBP51 表达;D. GBM 组织 FKBP51 表达

表 3 GBM 病人生存时间影响因素的 Cox 比例回归风险模型分析

影响因素	单因素		多因素	
	风险比(95%置信区间)	P 值	风险比(95%置信区间)	P 值
性别(男=0,女=1)	1.625(0.967~2.731)	0.067		
年龄(<45 岁=0,≥45 岁=1)	1.631(0.914~2.910)	0.098		
术前 KPS 评分(≥80 分=0,<80 分=1)	2.674(0.952~7.511)	0.062		
肿瘤直径(<5 cm=0,≥5 cm=1)	2.714(1.648~4.470)	0.000	2.453(1.711~3.517)	0.000
病程时间(≤30 d=0,>30 d=1)	2.879(1.592~5.206)	0.000	2.630(1.177~5.877)	0.018
肿瘤切除程度(全切除=0,未全切除=1)	2.856(1.674~4.873)	0.000	3.274(1.598~6.708)	0.001
术后辅助放/化疗(无=0,有=1)	0.968(0.952~0.984)	0.000	0.946(0.914~0.979)	0.002
IDH1(未突变=0,突变=1)	0.925(0.889~0.962)	0.000	0.836(0.745~0.938)	0.002
P53(低表达=0,高表达=1)	2.085(1.416~3.070)	0.000	2.515(1.374~4.604)	0.003
EGFR(低表达=0,高表达=1)	2.649(1.527~4.595)	0.000	3.065(1.678~5.598)	0.000
AMOTL2(低表达=0,高表达=1)	0.922(0.896~0.949)	0.000	0.892(0.855~0.931)	0.000
FKBP51(低表达=0,高表达=1)	2.970(1.612~5.472)	0.000	2.948(1.385~6.275)	0.005

注:GBM. 胶质母细胞瘤;KPS. Karnofsky 功能状态;AMOTL2. 类血管动蛋白-2;FKBP51. FK506 结合蛋白 51;EGFR. 表皮生长因子受体;IDH1. 异柠檬酸脱氢酶 1

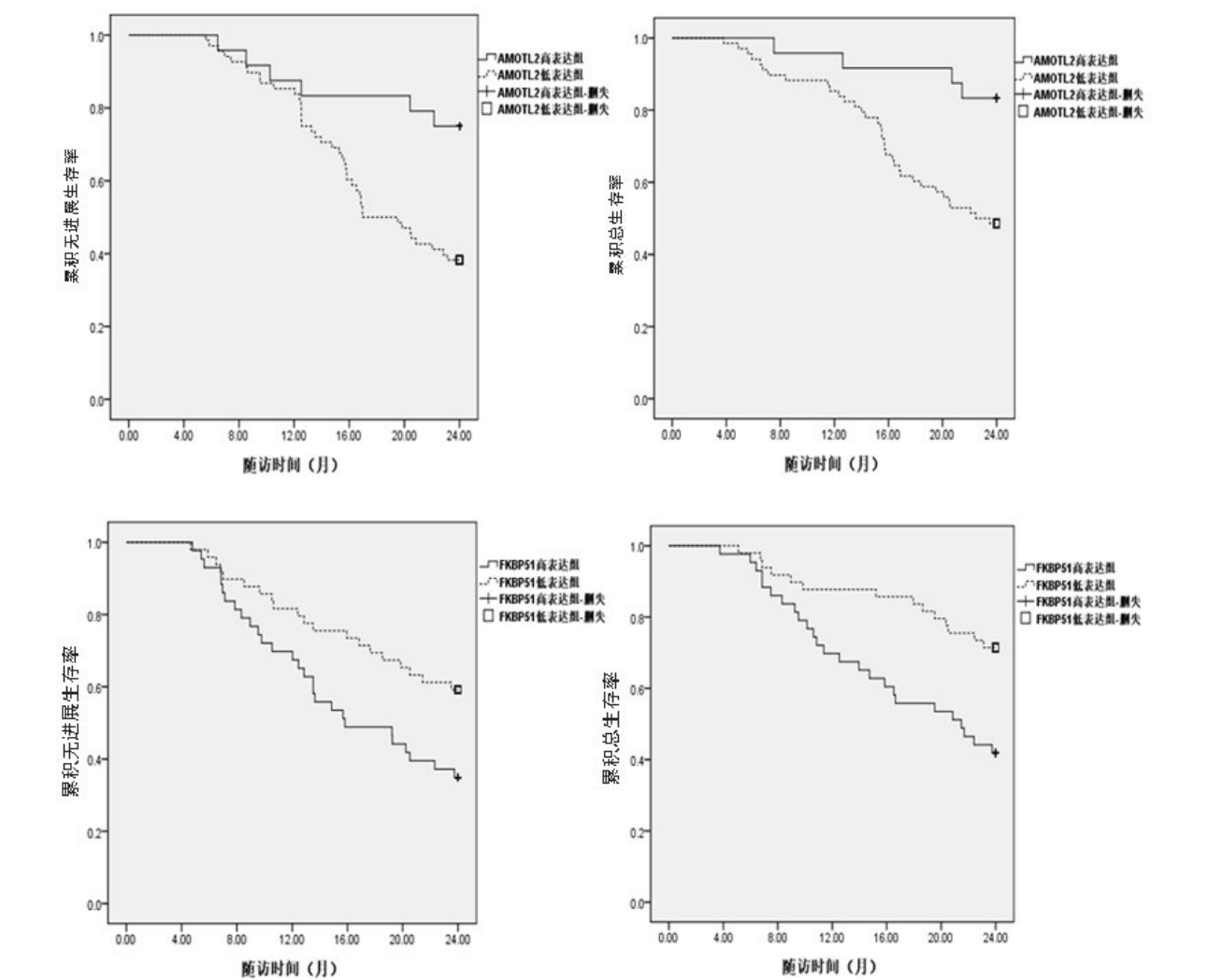


图 2 生存曲线分析FKBP51、AMOTL2表达水平与病人生存期的关系

织 AMOTL2 表达水平与 P53、EGFR 表达水平呈明显负相关 ($P<0.05$), GBM 组织 FKBP51 表达水平与 P53、EGFR 表达水平呈明显正相关 ($P<0.05$)。GBM 组织 AMOTL2、FKBP51 表达水平与 IDH1 突变水平无明显相关性 ($P>0.05$)。见表 2。

2.3 GBM 病人生存时间的影响因素 多因素 Cox 比例回归风险模型分析结果显示,肿瘤直径 ≥ 5 cm、病程时间 >30 d、肿瘤未全切除及 P53、EGFR、FKBP51 高表达是生存预后不良的独立危险因素 ($P<0.05$), 术后辅助放化疗、IDH1 突变、AMOTL2 高表达是生存预后的保护性因素 ($P<0.05$)。见表 3。

2.4 FKBP51、AMOTL2 表达水平与病人生存期的关系 生存曲线分析显示,AMOTL2 高表达组病人无进展生存期、总生存期较低表达组均明显延长 ($P<0.05$), FKBP51 高表达组无进展生存期、总生存期较低表达组均明显缩短 ($P<0.05$)。见图 2。

3 讨论

GBM 恶性程度高,目前治疗手段有限,预后尚不理想,临床需寻求理想标记物为改善 GBM 预后提供思路。研究发现,AMOTL2 是泛素特异性蛋白酶 9X (ubiquitin-specific protease 9X, USP9X) 的靶标,而 USP9X 与肿瘤发生有关,AMOTL2 可能通过 USP9X 的靶向作用参与肿瘤进展^[5]。另有研究认为 FKBP51 在胶质瘤组织内大量表达,可能通过调节程序性细胞死亡配体 1 (programmed death ligand-1, PD-L1) 发挥作用^[6]。本文结果显示,GBM 组织 AMOTL2 呈低表达,而 FKBP51 呈高表达。Chen 等^[7]指出胶质瘤级别越高,AMOTL2 表达下调越明显,可调节 β -catenin 核转位,影响下游靶基因表达,抑制胶质瘤增殖、侵袭。FKBP51 是 FK506 结合蛋白的成员,能与 Beclin-1 结合,使蛋白相互作用改变,对细胞自噬进行调节,影响肿瘤进展^[8]。夏志秀等^[9]研究显示结直肠癌组织 FKBP51 呈明显高表达,浸润越深、肿瘤越大的病人,FKBP51 阳性表达越强。本文结果显示 GBM 组织 AMOTL2、FKBP51 表达与 P53、EGFR 表达有相关性。P53 是 p53 基因突变后的产物,对肿瘤细胞增殖无抑制作用,甚至可促进肿瘤进展^[10]。EGFR 是表皮生长因子家族的重要成员,能将细胞中的传导通路激活,促进肿瘤细胞增殖、迁移^[11]。AMOTL2、FKBP51 与 P53、EGFR 可能通过不同途径调节 GBM 细胞增殖。

本文预后分析显示,AMOTL2 高表达、FKBP51 低表达病人无进展生存期、总生存期更高。Russo 等

^[12]发现 FKBP51 可能通过诱导 PD-L1 表达,形成 FKBP51/PDL-1 轴,影响 GBM 的耐药信号通路。

总之,GBM 组织 AMOTL2 呈低表达,FKBP51 呈高表达,二者与病人预后有关。

【参考文献】

[1] 彭 倩,韩 刚,张志辰,等. 胶质母细胞瘤差异表达基因的生物信息学分析[J]. 现代肿瘤医学,2020,28:58-63.

[2] Meng L, Shen Y, Jiao Y, *et al.* Angiotenin family members: oncogenes or tumor suppressors [J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13 (6): 772-781.

[3] Takaoka M, Ito S, Miki Y, *et al.* FKBP51 regulates cell motility and invasion via RhoA signaling [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(3): 380-389.

[4] 陈 杰. 病理诊断免疫组化手册[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2014. 77.

[5] Kim M, Park SJ, Lee C, *et al.* Role of Angiotenin-like 2 mono- ubiquitination on YAP inhibition [J]. *EMBO Rep*, 2016, 17(1): 64-78.

[6] D'Arrigo P, Russo M, Rea A, *et al.* A regulatory role for the co-chaperone FKBP51s in PD-L1 expression in glioma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 68291-68304.

[7] Chen X, Lu Y, Guo G, *et al.* AMOTL2 knockdown promotes the proliferation, migration and invasion of glioma by regulating β -catenin nuclear localization [J]. *Oncol Rep*, 2021, 46(1): 1-11.

[8] Xia Z, Zhang G, Wang C, *et al.* The role of FKBP51 in the prognosis of ulcerative colitis-associated colorectal cancer [J]. *Adv Med Sci*, 2021, 66(1): 89-97.

[9] 夏志秀,王昌亮,韩彦梁,等. FKBP51 在结直肠癌与正常组织中的表达差异及与临床病理特征的关系[J]. 中国医师杂志,2017,19(3):362-366.

[10] 邢海霞,赵明燕,郭 勇,等. Cat B、p53 在脑胶质瘤组织中的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2019,27(8): 55-59.

[11] 姜振富,李 梅,韦 鸿. 脑胶质瘤 EGFR、KRAS 和 Ki67 蛋白的表达及临床意义[J]. 大连医科大学学报,2017, 39(2):127-131.

[12] Russo M, D'Arrigo P, Hausch F, *et al.* Abstract 2216: Study of PD-L1 regulation and expression in glioblastoma and its role in cancer resistance [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(14 Suppl): 2216-2216.