

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.23.043

# 骨肉瘤组织中同源盒蛋白 2 的表达及其与患者临床特征及预后的关系研究\*

田自开<sup>1</sup> 张红玲<sup>2△</sup> 田晓星<sup>2</sup> 吴兵<sup>1</sup> 庞晓东<sup>1</sup>

(1 解放军总医院第三医学中心骨科 北京 100039; 2 解放军总医院第三医学中心急诊科 北京 100039)

**摘要目的:**探讨骨肉瘤组织中同源盒蛋白 2(Six2)的表达及其与患者临床特征及预后的关系。**方法:**54 例原发性骨肉瘤患者作为本研究的对象。采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及免疫组化探索 Six2 在骨肉瘤组织中的表达。收集患者的临床信息,分析 Six2 与骨肉瘤患者临床特征之间的关系。对患者进行 3 年的随访,记录患者的生存资料信息,绘制生存分析曲线,探索 Six2 的表达与骨肉瘤预后的关系。**结果:**相对于癌旁正常组织,骨肉瘤组织 Six2 基因及蛋白水平呈高表达。Six2 的表达与患者的是否远处转移相关( $P<0.05$ )。Six2 的表达水平越高,骨肉瘤患者的预后越差( $P<0.05$ )。**结论:**Six2 在骨肉瘤组织中高表达,且与不良预后有关,可能参与到骨肉瘤的发生发展中。

**关键词:**骨肉瘤;同源盒蛋白 2;临床特征;预后

**中图分类号:**R711.51;R711.75 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)23-4555-04

## Expression of Sine Oculis Homeobox Homolog 2 in Osteosarcoma and its Relationship with Clinical Characteristics and Prognosis\*

TIAN Zi-kai<sup>1</sup>, ZHANG Hong-ling<sup>2△</sup>, TIAN Xiao-xing<sup>2</sup>, WU Bing<sup>1</sup>, PANG Xiao-dong<sup>1</sup>

(1 Department of Orthopedics, Third Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100039, China;

2 Department of Emergency, Third Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100039, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the expression of Sine oculis homeobox homolog 2 (Six2) in osteosarcoma and its relationship with clinical characteristics and prognosis. **Method:** A total of 54 patients with primary osteosarcoma collected were collected as the subjects of this study. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), and immunohistochemistry were used to explore Six2 expression in osteosarcoma. Clinical information was collected and the relationship between Six2 and clinical characteristics of patients with osteosarcoma was analyzed. Patients were followed up for 3 years, recording patient survival data information, and drawing survival analysis curves to explore the relationship between Six2 expression and osteosarcoma prognosis. **Result:** Six2 was highly expressed in both gene and protein levels in osteosarcoma tissues compared to adjacent normal tissues. The expression of Six2 was correlated with distant metastasis ( $P<0.05$ ). The higher the expression level of Six2, the worse the prognosis in osteosarcoma patients ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Six2 is highly expressed in osteosarcoma tissues and is associated with poor prognosis, which may be involved in the occurrence and development of osteosarcoma.

**Key words:** Osteosarcoma; Sine oculis homeobox homolog 2; Clinical characteristics; Prognosis

**Chinese Library Classification(CLC):** R711.51; R711.75 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2024)23-4555-04

### 前言

骨肉瘤是一种最常见的原发于骨组织的高度恶性肿瘤,表现为不断增殖的肿瘤细胞直接产生骨或骨样组织,具有较强的侵袭性<sup>[1]</sup>。同源盒蛋白(Six)家族编码 6 个蛋白,由同源域(HD)、Six 结构域(SD)、保守的 N 端和酸性 C 端组成<sup>[2]</sup>。Six 家族所编码蛋白的 HD 区域可特异性结合到靶基因的 DNA 序列上,并调控他们的表达<sup>[3]</sup>。此外,SD 区域还可发挥转录调控作用<sup>[4]</sup>。已有研究显示,Six 家族蛋白参与了多种肿瘤的发生发展<sup>[5,6]</sup>,本研究旨在探讨骨肉瘤组织中同源盒蛋白 2(Six2)

的表达及其与患者临床特征及预后的关系,以期揭示 Six2 在骨肉瘤疾病进展中的作用。

### 1 资料和方法

#### 1.1 一般资料

收集 2018 年 3 月~2021 年 3 月我院收集的 54 例原发性骨肉瘤患者作为本研究的对象。本研究获得了我院伦理委员会的批准,所有的取样均获得了患者或监护人的同意并签署知情同意书。其中男性 28 例,女 26 例,年龄 8~30 岁,平均(15.87±6.89)岁。记录每一位患者的相关临床数据,并对患者随访 3

\* 基金项目:2022 年度北京市自然科学基金面上项目(7222178)

作者简介:田自开(1987-),男,本科,主治医师,研究方向:骨科疾病诊治,E-mail: tyg20141123@163.com

△ 通讯作者:张红玲(1986-),女,本科,主治医师,研究方向:急诊医学,E-mail: 13581894023@163.com

(收稿日期:2024-05-10 接受日期:2024-06-09)

年,每3个月进行一次登门或电话随访一次,记录随访数据。患者生存时间为自确诊之日至死亡或最后一次随访时间。纳入标准:(1)术后经组织病理学确诊为骨肉瘤;(2)首次诊断为骨肉瘤,既往无相关手术及用药史;(3)患者医从性较好,愿意配合相关临床检查,愿意提供相关的临床数据资料。排除标准:(1)转移性骨肉瘤;(2)存在其他组织或脏器恶性肿瘤;(3)失访。

### 1.2 Six2 表达检测

**1.2.1 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测** 术中选取患者骨肉瘤组织及相应的骨肉瘤旁组织,一部分样本保存于含 Trizol 试剂的 EP 管中,-80℃保存。实验时取出组织,按照反转录试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒的操作说明,进行样本 Six2 mRNA 扩增:用无菌剪刀剪取骨肉瘤及癌旁正常组织各 100 mg,放入 1 mL EP 管中,随后加入 1 mL Trizol,反复摇匀,按照说明书指示提取组织总 RNA。肿瘤及癌旁组织 RNA 各取 3 μg,按照反转录试剂盒的指示将 RNA 逆转录为 cDNA,点板后在定量 PCR 检测仪上进行荧光定量检测。PCR 引物购自生工生物有限公司。PCR 反应体系 20 μL:Six2 前引物和后引物各 0.5 μL,cDNA 1 μL,Mix(SYBR Green)9 μL,ddH<sub>2</sub>O 9 μL。上机完成后由电脑将荧光信号转换为 CT 值,并得出 copy 数目。采用 GAPDH 对 mRNA 含量的变异进行校正。Six2 精确含量=Six2 拷贝数/内参 GAPDH 拷贝数。

**1.2.2 免疫组化分析** 将每位患者的骨肉瘤组织及癌旁组织切片由两位病理科医师在双盲情况下观察评价结果并进行相应的图片采集。Six2 阳性表达呈棕黄色颗粒,主要分布于细胞

浆,结果判定按照半定量积分法:(1)每个切片随机观察 5 个视野,观察视野下的阳性细胞占总细胞数目的百分比,并根据百分比进行打分:0%计 0 分,0~5%计 1 分,6%~25%计 2 分,26%~50%为 3 分,51%~75%计 4 分,76%~100%计 5 分;(2)按照视野下的染色强度评分:无色为 0 分,黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。根据(1)和(2)两项评分之积判定结果:0 分为 Six2 表达阴性(不表达),≥ 1 分为 Six2 表达阳性,其中 1~2 分为 Six2 低表达(+),3~5 分为 Six2 中表达(++),6~8 分为 Six2 高表达(+++)。

### 1.3 统计学处理

统计学处理和图形绘制采用 SPSS 22.0 软件和 Graphpad Prims 7.0。计量资料( $\bar{X} \pm SD$ )比较采用 t 检验;计数资料采用  $\chi^2$  检验或 wilconxon 检验。以 Kaplan-Meier 生存分析曲线及 Logrank 检验对比不同 Six2 表达的生存情况。 $P < 0.05$  认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Six2 在骨肉瘤组织中的表达

RT-PCR 检测结果显示,骨肉瘤组织中 Six2 mRNA 的表达量( $7.12 \pm 2.11$ ),明显高于癌旁组织( $4.87 \pm 1.13$ )( $t=8.142, P=0.012$ )。再将本研究样本,进行 Six2 阳性评价,结果显示,骨肉瘤组织中 Six2 的表达(阳性表达数)明显高于癌旁正常组织( $Z=2.793, P=0.005, n=54$ )。见表 1。

表 1 骨肉瘤组织和癌旁正常组织的 Six2 表达对比

Table 1 Comparison of Six2 expression between osteosarcoma tissues and adjacent normal tissues

Groups	Six2 expression			
	-	+	++	+++
Osteosarcoma tissues (n=54)	13	12	14	15
Adjacent normal tissue (n=54)	21	20	7	6
Z	2.793			
P	0.005			

### 2.2 Six2 的表达与骨肉瘤患者临床特征的关系

骨肉瘤患者 Six2 的表达与肿瘤远处转移有关( $P < 0.05$ ),与患者性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤直径、肿瘤类型等其它各项指标无关( $P > 0.05$ ),如表 2 所示。

### 2.3 不同 Six2 表达的患者的预后

按 Six2 表达的不同强度(阳性程度),将不表达和较低表达患者归类为 Six2 相对低表达组(25 例),中等表达和较高表达患者归类为相对高表达组(29 例),比较其对应的生存数据。结果显示,Six2 相对低表达组患者生存率 96.00%(24/25)明显高于 Six2 相对高表达组的 72.41%(21/25),差异有统计学意义( $\chi^2=6.648, P=0.000$ )。将其生存资料建立 Kaplan-Meier 时间队列模型,并对低表达组和高表达组的生存率资料进行 Logrank 检验,结果显示,高表达组预后更差( $P < 0.05$ ),见图 1。

## 3 讨论

作为一种转录因子,与 Six1 一样, Six2 也是一种肿瘤促进因子,二者不仅结构上高度同源,在正常的成熟组织中均表达水平低,在恶变组织中表达水平明显升高,且二者存在协同促进作用<sup>[7]</sup>,敲低 Six1 的表达时,肿瘤的恶性行为不会有明显改变,并存在 Six2 的表达升高<sup>[8]</sup>。Six2 参与上皮间质转换(EMT)的调控过程中,促进肿瘤浸润的前沿出芽细胞表达波形蛋白(vimentin)等间质标记物,增强肿瘤细胞与间质细胞的同源性<sup>[9]</sup>。因此,相对于 Six1 而言, Six2 的作用更加广泛,参与的肿瘤调控信号通路更多<sup>[10,11]</sup>。

本研究结果表明 Six2 在骨肉瘤中高表达,且表达越高,骨肉瘤细胞的恶性程度越高,骨肉瘤患者的预后越差。当前鲜有关于 Six2 在骨肉瘤中的研究报道,但在其他上皮肿瘤中报道较多,如 Wan ZH 等<sup>[12]</sup>研究显示在肝细胞癌中, Six2 高表达与患者不良预后相关,上调 Six2 通过 TGF- $\beta$  / Smad 信号通路促

表 2 Six2 的表达与骨肉瘤患者临床特征的关系

Table 2 Relationship between the expression of Six2 and the clinical features of osteosarcoma patients

Clinical features	n	Six2 expression				Z	P	
		-	+	++	+++			
Gender	Male	28	7	6	7	8	0.000	1.000
	Female	26	6	6	7	7		
Age(years)	≤ 15	27	7	6	7	7	0.349	0.727
	>15	27	6	6	7	8		
Tumor location	Femur	19	5	5	5	4	1.870	0.931
	Tibia	17	4	4	5	4		
	Others	18	4	3	4	7		
Tumor diameter(cm)	≤ 5	27	6	5	6	10	1.099	0.272
	>5	27	7	7	8	5		
Tumor differentiation	Low differentiation	15	4	5	3	3	2.927	0.231
	Middle differentiation	29	8	5	9	7		
	High differentiation	10	1	2	2	5		
Tumor Staging ( TNM )	I	7	2	2	1	2	0.465	0.927
	II	14	4	3	3	4		
	III	23	5	4	7	7		
	IV	10	2	3	3	2		
Distant metastasis	Yes	35	4	6	11	14	3.697	0.000
	No	19	9	6	3	1		
Tumor type	General type	38	9	6	12	11	0.812	0.417
	Special type	16	4	6	2	4		

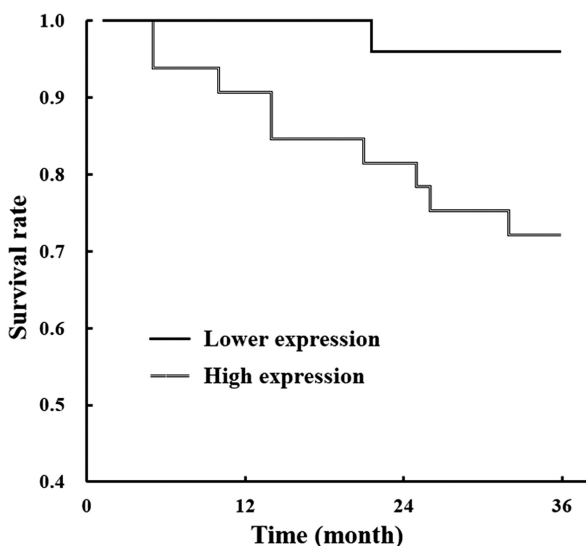


图 1 不同 Six2 表达量患者的生存分析曲线

Fig.1 Survival analysis curve of patients with different Six2 expression level

进肿瘤生长和促进肝癌转移。Cheng N 等<sup>[13]</sup>研究发现 six2 在肾细胞癌组织中的表达显著增加,并且与患者的总生存率呈负相关。此外,six2 基因敲除降低了肾细胞癌细胞的干性,主要表现

在球型形成能力和干性标志物的表达降低。Jiang Y 等<sup>[14]</sup>报道了 Six2 在结肠腺癌中高表达,且 Six2 高表达与患者总生存期相关且是总生存期的独立预测因子, Six2 可能是治疗结肠腺癌有价值的生物标志物和潜在的治疗靶点。Six2 在这些肿瘤中的共同点在于其促进了肿瘤细胞的干性,维持并促进肿瘤细胞的恶性行为。因此推测 Six2 可能同样可以增强骨肉瘤细胞的肿瘤干性,促进骨肉瘤的恶性进展,这有待后续研究的进一步证实。

综上所述, Six2 在骨肉瘤组织中高表达,且与不良预后有关,可能参与到骨肉瘤的发生发展中。然而,本研究并未从分子的角度探索 Six2 是否对骨肉瘤的增殖、侵袭、转移等方面存在影响,有待研究的进一步开展。

参考文献(References)

[1] Zhong L, Wang J, Chen W, et al. Augmenting L3MBTL2-induced condensates suppresses tumor growth in osteosarcoma [J]. Sci Adv, 2023, 9(47): eadi0889.

[2] Catela C, Assimacopoulos S, Chen Y, et al. The Iroquois (Iro/Irx) homeobox genes are conserved Hox targets involved in motor neuron development[J]. bioRxiv [Preprint], 2024, 2024.05.30.596714.

[3] Chen X, Hou Y, Cao Y, et al. A Comprehensive Identification and Expression Analysis of the WUSCHEL Homeobox-Containing

- Protein Family Reveals Their Special Role in Development and Abiotic Stress Response in *Zea mays* L[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 25(1): 441.
- [4] Maragha T, Garcia AP, Shuler C, et al. The six-domain well-being framework in oral health sciences: A pathway from theory to practice [J]. *J Dent Educ*, 2024, 88(2): 157-168.
- [5] Guo L, Li F, Liu H, et al. SIX1 amplification modulates stemness and tumorigenesis in breast cancer[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 866.
- [6] Liu Y, Kong WY, Yu CF, et al. SNS-023 sensitizes hepatocellular carcinoma to sorafenib by inducing degradation of cancer drivers SIX1 and RPS16[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(4): 853-864.
- [7] Ciceri S, Montalvño-de-Azevedo R, Tajbakhsh A, et al. Analysis of the mutational status of SIX1/2 and microRNA processing genes in paired primary and relapsed Wilms tumors and association with relapse[J]. *Cancer Gene Ther*, 2021, 28(9): 1016-1024.
- [8] 贺敏, 陈勇伟. 宫颈鳞状细胞癌中 SIX1、SIX2、MMP11 的表达及临床意义[J]. *癌症进展*, 2019, 17(20): 2429-2432.
- [9] Yang Y, Feng M, Bai L, et al. Comprehensive analysis of EMT-related genes and lncRNAs in the prognosis, immunity, and drug treatment of colorectal cancer[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 391.
- [10] Daren L, Dan Y, Jinhong W, et al. NIK-mediated reactivation of SIX2 enhanced the CSC-like traits of hepatocellular carcinoma cells through suppressing ubiquitin-proteasome system [J]. *Environ Toxicol*, 2024, 39(2): 583-591.
- [11] Perl AJ, Liu H, Hass M, et al. Reduced Nephron Endowment in Six2-TGCTg Mice Is Due to Six3 Misexpression by Aberrant Enhancer-Promoter Interactions in the Transgene [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2024, 35(5): 566-577.
- [12] Wan ZH, Ma YH, Jiang TY, et al. Six2 is negatively correlated with prognosis and facilitates epithelial-mesenchymal transition via TGF- $\beta$ /Smad signal pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2019, 18(6): 525-531.
- [13] Cheng N, Li H, Han Y, et al. Transcription factor Six2 induces a stem cell-like phenotype in renal cell carcinoma cells [J]. *FEBS Open Bio*, 2019, 9(10): 1808-1816.
- [14] Jiang Y, Zhou B, Liang B, et al. Overexpression of *Sine Oculis Homeobox Homolog 2* Predicts Poor Survival and Clinical Parameters of Patients with Colon Adenocarcinoma[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2020, 50(6): 717-725.

## (上接第 4554 页)

- [6] 李永红, 刘玉洁, 赵燕燕, 等. 苍附导痰汤联合通元针法对脾虚痰湿型多囊卵巢综合征患者脂代谢、性激素和子宫内容受性的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2023, 23(3): 519-523.
- [7] 李苗. 仿生物电刺激对人工流产后子宫修复的临床研究 [D]. 新疆:新疆医科大学, 2020.
- [8] 付思思, 岳增辉. 子宫穴考[J]. *河南中医*, 2021, 41(3): 346-348.
- [9] 张华, 陈宇, 覃莹莹. 经皮穴位仿生物电刺激对人流术后患者的子宫内膜厚度及血清表皮生长因子和白细胞介素-1 的影响[J]. *基层中医药*, 2023, 2(1): 92-97.
- [10] 张华, 潘小芳, 李丽娟. 经皮穴位仿生物电刺激促进人流术后子宫内膜修复的临床观察[J]. *广西中医药*, 2019, 42(3): 52-54.
- [11] 陈鸞志, 刘雪英, 姚凤英, 等. 仿生物电刺激联合运动疗法对人工流产后子宫内膜修复的影响 [J]. *河北医药*, 2023, 45(23): 3588-3590, 3594.
- [12] 张宇迪, 卢丹, 孙如意, 等. 仿生物电刺激对薄型子宫内膜患者作用的研究[J]. *中国临床医生杂志*, 2017, 45(2): 93-94.
- [13] 杨梅, 朱茂灵, 王燕娇, 等. 仿生物电刺激在人工流产后促子宫内膜修复和卵巢排卵中的作用[J]. *广西医学*, 2018, 40(3): 330-331.