

• 论 著 •

骨肉瘤中 EMT 相关基因的来源及与患者生存预后的关系分析

彭银斌, 余 彬[△], 秦 辉, 薛 力, 梁益建
(四川省成都市第三人民医院骨科, 四川成都 601131)

摘 要:目的 研究骨肉瘤中上皮间质转化(EMT)相关基因的来源及与患者生存预后的关系。方法 从 Gene Expression Omnibus 数据库中获得 3 个独立的微阵列数据集(GSE36001、GSE39055 和 GSE16091)。GSE39055 和 GSE16091 用于探讨骨肉瘤 EMT、免疫活性、基质活性和肿瘤纯度间的相关性;GSE39055 的总生存率和无病生存率数据用于生存分析。通过 GSE36001 和该院 5 例骨肉瘤标本、5 例基质标本验证骨肉瘤中 EMT 相关基因表达的关键来源。结果 GSE39055 和 GSE16091 中, EMT 评分与免疫评分、基质评分均呈正相关($P < 0.05$), 与肿瘤纯度均呈负相关($P < 0.05$); 肿瘤纯度与免疫评分、基质评分均呈负相关($P < 0.05$)。GSE39055 中, 高 EMT 评分是骨肉瘤患者总生存率、无病生存率下降的危险因素($HR = 4.977, P = 0.003$; $HR = 4.308, P = 0.010$)。GSE36001 中, 骨肉瘤标本 EMT 相关基因表达水平高于基质细胞基因($P < 0.05$); 骨肉瘤标本和基质标本之间 EMT 相关基因的倍数变化(FC)高于基质细胞基因($P < 0.05$)。该院 5 例骨肉瘤标本中 EMT 相关基因表达水平高于基质细胞基因($P < 0.05$); 5 例基质标本中基质细胞基因表达水平高于 EMT 相关基因($P < 0.05$); 骨肉瘤标本和基质标本之间 EMT 相关基因的 FC 高于基质细胞基因($P < 0.05$)。结论 骨肉瘤中 EMT、免疫活性、基质活性和肿瘤纯度之间存在相关性; EMT 相关基因的表达与骨肉瘤患者的生存预后密切相关; 基质细胞是骨肉瘤中 EMT 相关基因表达的关键来源。

关键词:骨肉瘤; 上皮间质转化; 免疫活性; 基质细胞; 肿瘤纯度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.18.015 **中图法分类号:**R738.1

文章编号:1673-4130(2020)18-2239-05 **文献标识码:**A

Analysis of the source of EMT-related genes in osteosarcoma and its relationship with survival prognosis of patients

PENG Yinxiao, YU Bin[△], QIN Hui, XUE Li, LIANG Yijian
(Department of Orthopedics, The Third People's Hospital of Chengdu, Chengdu, Sichuan 601131, China)

Abstract: Objective To study the source of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related genes in osteosarcoma and its relationship with survival prognosis of patients. **Methods** Three independent microarray data sets (GSE36001, GSE39055 and GSE16091) were obtained from the Gene Expression Omnibus database. GSE39055 and GSE16091 were used to explore the correlation between osteosarcoma EMT, immune activity, matrix activity and tumor purity. The overall survival rate and disease-free survival rate data of GSE39055 were used for survival analysis. The key source of EMT-related genes expression in osteosarcoma was verified by GSE36001, 5 osteosarcoma specimens and 5 stromal specimens from the hospital. **Results** In GSE39055 and GSE16091, EMT score was positively correlated with immune score and matrix score ($P < 0.05$), and negatively correlated with tumor purity ($P < 0.05$); tumor purity was negatively correlated with immune score and matrix score ($P < 0.05$). In GSE39055, high EMT score was a risk factor for decreased overall survival and disease-free survival in patients with osteosarcoma ($HR = 4.977, P = 0.003$; $HR = 4.308, P = 0.010$). In GSE36001, the expression level of EMT-related genes in osteosarcoma specimens was higher than that of stromal cell genes ($P < 0.05$); the fold change (FC) of EMT-related genes between osteosarcoma specimens and stromal specimens was higher than that of stromal cell genes ($P < 0.05$). The expression level of EMT-related genes in 5 osteosarcoma specimens in the hospital was higher than that of stromal cell genes ($P < 0.05$); the expression level of stromal cells gene in 5 stromal specimens was higher than that of EMT-related genes ($P < 0.05$); the FC of EMT-related genes between osteosarcoma specimens and stromal specimens was higher than

作者简介:彭银斌,男,主治医师,主要从事骨科的临床与基础研究。 [△] **通信作者,** E-mail:768832674@qq.com。

本文引用格式:彭银斌,余彬,秦辉,等.骨肉瘤中 EMT 相关基因的来源及与患者生存预后的关系分析[J].国际检验医学杂志,2020,41(18): 2239-2243.

that of stromal cell genes ($P < 0.05$). **Conclusion** There is a correlation between EMT, immune activity, matrix activity and tumor purity in osteosarcoma. The expression of EMT-related genes is closely related to the survival prognosis of patients with osteosarcoma. Stromal cells are the key source of EMT-related genes expression in osteosarcoma.

Key words: osteosarcoma; epithelial-mesenchymal transition; immune activity; stromal cell; tumor purity

骨肉瘤是儿童和青少年最常见的骨肿瘤类型,可导致约 9% 的患者死亡^[1-2]。化疗和手术治疗可将骨肉瘤 5 年生存率提高 60%~70%,然而,复发时合并肿瘤转移的患者 5 年生存率低于 30%^[3-4]。因此,探索骨肉瘤的转移机制对于改善患者预后具有重要意义。肿瘤转移始于上皮间质转化(EMT),EMT 是上皮细胞获得间充质表型并具有迁移和侵袭能力的过程^[5]。上皮标志物 E-钙黏蛋白的缺失和间充质标志物的表达增加是 EMT 的特征改变。EMT 促进原代上皮样肿瘤细胞在转移、进展期间获得侵袭性间充质表型,从而引发肿瘤的扩散和血管浸润^[6]。EMT 相关基因可作为骨肉瘤的潜在标志物和治疗靶标。然而,EMT 与骨肉瘤免疫微环境间的关系报道较少。骨肉瘤表达数据中 EMT 相关基因特征的细胞起源,EMT 和免疫活动如何共同影响骨肉瘤患者的生存预后等问题目前尚不明确。本研究基于来自 3 个独立微阵列数据集的基因表达和临床数据,以及本院临床标本的基因表达验证,探讨了骨肉瘤中 EMT 相关基因的来源及与患者生存预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 公共数据库数据 从 Gene Expression Omnibus 数据库(GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)^[7-9]中获得 3 个独立的微阵列数据集(GSE36001、GSE39055 和 GSE16091)。GSE36001 包含 19 例骨肉瘤标本和 6 例基质标本,GSE39055 和 GSE16091 分别包含 37 例和 34 例骨肉瘤标本。

1.1.2 病理组织标本 病理组织标本来源于 2018—2019 年本院骨科确诊为骨肉瘤的患者,共 5 例。于术中分别取骨肉瘤组织和基质组织作为骨肉瘤标本与基质标本,标本收集后采用 RNA 保护液储存,置于 -80℃ 冰箱保存待测。纳入标准:(1)经 CT 或 MRI 等检查明确诊断为骨肉瘤;(2)术前未进行化疗或放疗;(3)临床资料完整。

1.1.3 试剂 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;cDNA 反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒购自宝日医生物技术(北京)有限公司;PCR 仪为赛默飞世尔科技有限公司生产的 Applied Biosystems 7300;实时荧光定量 PCR 引物于 Primer Bank 网站在线获取,由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 EMT 评分 EMT 相关基因标记包含从分子

特征数据库标记基因集(MSigDB, software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/)中获得的 200 个基因^[10]。对于肿瘤基因组图谱中的每个标本,基于 EMT 相关基因表达,通过单样本基因集富集分析(ssGSEA)在 R3.6.1 软件中计算 EMT 评分^[11]。

1.2.2 免疫评分、基质评分和肿瘤纯度 GSE39055 和 GSE16091 用于探讨骨肉瘤 EMT、免疫活性、基质活性和肿瘤纯度间的相关性。使用 R3.6.1 软件的 ESTIMATE 软件包来评估免疫评分和基质评分^[12],用于反映免疫活性与基质活性。采用 ESTIMATE 软件包定义免疫细胞和基质细胞基因特征,从基因表达数据推断免疫成分和基质成分的比例,并将这些单个组分组合以评估肿瘤纯度。

1.2.3 生存分析 GSE39055 的总生存率和无病生存率数据用于生存分析。分别采用 EMT 评分、免疫评分的中位数作为高/低 EMT 评分和高/低免疫评分的界值^[13]。

1.2.4 EMT 相关基因和基质细胞基因的表达分析 GSE36001 用于 EMT 相关基因和基质细胞基因的表达分析。计算骨肉瘤标本和基质标本之间 EMT 相关基因和基质细胞基因的倍数变化(FC)。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 使用实时荧光定量 PCR 检测本院 5 例骨肉瘤标本和 5 例基质标本中 25 种基因的表达水平。方法:Trizol 法提取组织总 RNA,反转录为 cDNA,使用实时荧光定量 PCR 进行 cDNA 模板定量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS25.0 软件对数据进行处理分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;相关性分析采用 Pearson 相关;采用 Kaplan-Meier 法与 Log-Rank 检验进行生存分析;采用 COX 回归进行危险因素分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

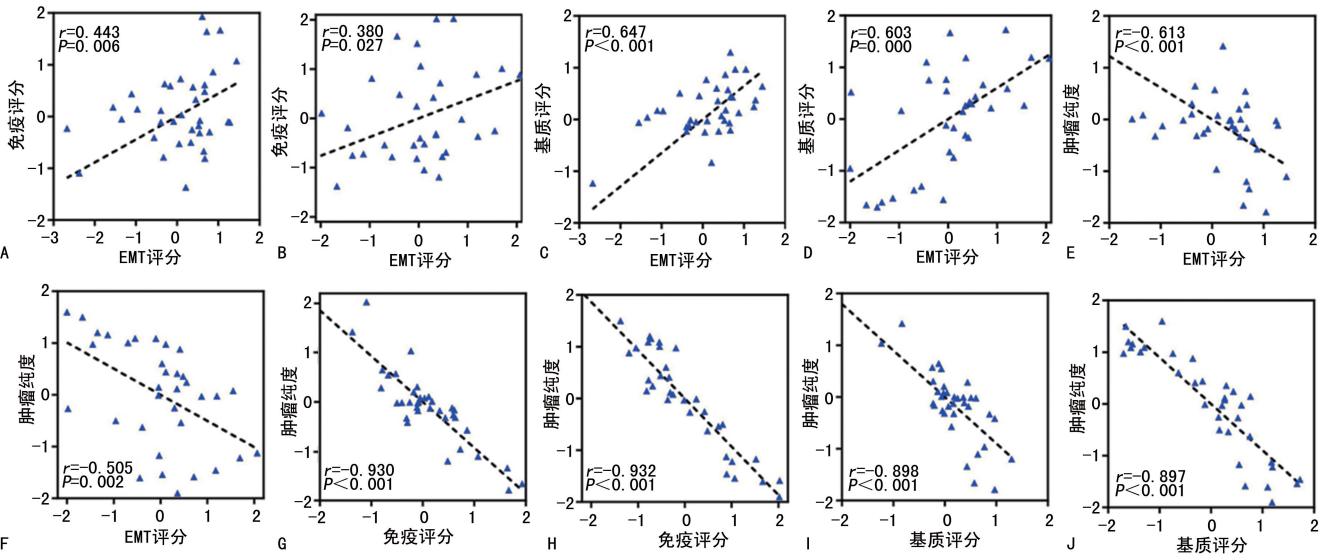
2 结果

2.1 骨肉瘤中 EMT 评分、免疫评分、基质评分和肿瘤纯度间的相关性 GSE39055 和 GSE16091 中,EMT 评分与免疫评分、基质评分均呈正相关($P < 0.05$),与肿瘤纯度均呈负相关($P < 0.05$),见图 1 中 A~F;肿瘤纯度与免疫评分、基质评分均呈负相关($P < 0.05$),见图 1 中 G~J。

2.2 不同 EMT 评分、免疫评分骨肉瘤患者的生存分析 GSE39055 中,高 EMT 评分患者总生存率、无病生存率均低于低 EMT 评分患者($P < 0.05$),高 EMT

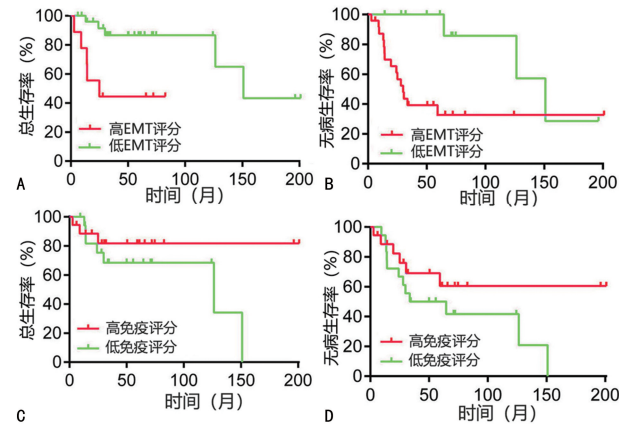
评分是骨肉瘤患者总生存率、无病生存率下降的危险因素($HR=4.977, P=0.003; HR=4.308, P=0.010$), Kaplan-Meier 生存曲线见图 2A、2B;高免疫评分与低免疫评分患者总生存率、无病生存率差异无统计学意

义($P>0.05$),免疫评分不是骨肉瘤患者总生存率、无病生存率下降的危险因素($HR=0.405, P=0.173; HR=0.482, P=0.134$), Kaplan-Meier 生存曲线见图 2C、2D。



注:A、B分别为 GSE39055 和 GSE16091 中 EMT 评分与免疫评分的相关性;C、D 分别为 GSE39055 和 GSE16091 中 EMT 评分与基质评分的相关性;E、F 分别为 GSE39055 和 GSE16091 中 EMT 评分与肿瘤纯度的相关性;G、H 分别为 GSE39055 和 GSE16091 中免疫评分与肿瘤纯度的相关性;I、J 分别为 GSE39055 和 GSE16091 中基质评分与肿瘤纯度的相关性。

图 1 相关性分析结果

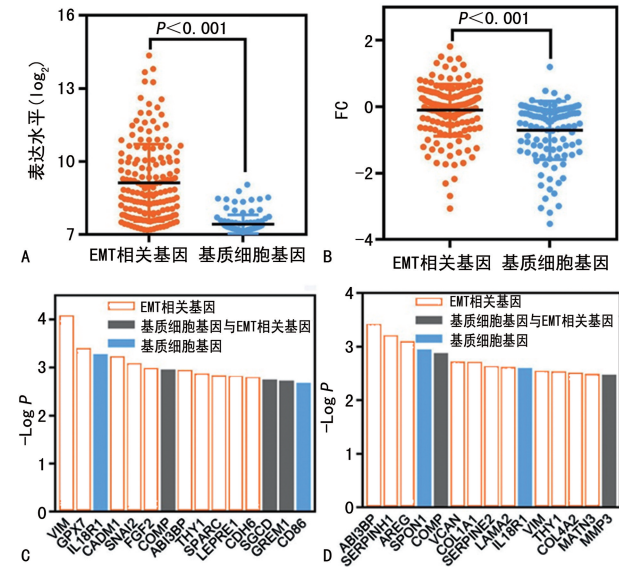


注:A、B分别为 EMT 评分与骨肉瘤患者总生存率、无病生存率的 Kaplan-Meier 生存曲线;C、D 分别为免疫评分与骨肉瘤患者总生存率、无病生存率的 Kaplan-Meier 生存曲线。

图 2 不同 EMT 评分、免疫评分骨肉瘤患者的生存曲线

2.3 EMT 相关基因和基质细胞基因的表达和预后意义 为了探讨骨肉瘤中 EMT 相关基因和基质细胞基因表达间的关系,本研究分析了数据集中基因的表达和临床结局。GSE36001 中,骨肉瘤标本 EMT 相关基因表达水平高于基质细胞基因($P<0.05$),见图 3A。骨肉瘤标本和基质标本之间 EMT 相关基因的 FC 高于基质细胞基因($P<0.05$),见图 3B。根据 EMT 和基质特征评估了单个基因的预后意义,结果显示,在 GSE39055 中,与骨肉瘤患者总生存率最相关的前 15 个基因有 10 个来自 EMT 相关基因,与骨肉瘤患者无病生存率最相关的前 15 个基因有 11 个

来自 EMT 相关基因,见图 3C、3D。



注:A为 GSE36001 中 EMT 相关基因和基质细胞基因的表达水平比较;B为 GSE36001 中 EMT 相关基因和基质细胞基因的 FC 比较;C为 GSE39055 中与骨肉瘤患者总生存率最相关的前 15 个基因;D为 GSE39055 中与骨肉瘤患者无病生存率最相关的前 15 个基因。

图 3 EMT 相关基因和基质细胞基因的表达和预后意义

2.4 验证基质细胞是骨肉瘤 EMT 相关基因表达的关键来源 为了验证骨肉瘤中 EMT 相关基因表达的关键来源,采用实时荧光定量 PCR 检测本院 5 例骨肉瘤标本与 5 例基质标本中上述 25 种基因的表达水平,包括 18 种 EMT 相关基因 (ABI3BP、AREG、

CADM1、CDH6、COL1A1、COL4A2、FGF2、GPX7、LAMA2、LEPRE1、MATN3、SERPINE₂、SERPINH1、SNAI2、SPARC、THY1、VCAN、VIM), 3 种基质细胞基因(CD86、IL18R1、SPON1)及 4 种基质细胞基因和 EMT 相关基因 (COMP、GREM1、MMP3、SGCD)。结果显示,骨肉瘤标本中 EMT 相关基因表达水平高

于基质细胞基因($P<0.05$),见图 4A;基质标本中基质细胞基因表达水平高于 EMT 相关基因($P<0.05$),见图 4B;骨肉瘤标本和基质标本之间 EMT 相关基因的 FC 高于基质细胞基因($P<0.05$),见图 4C。

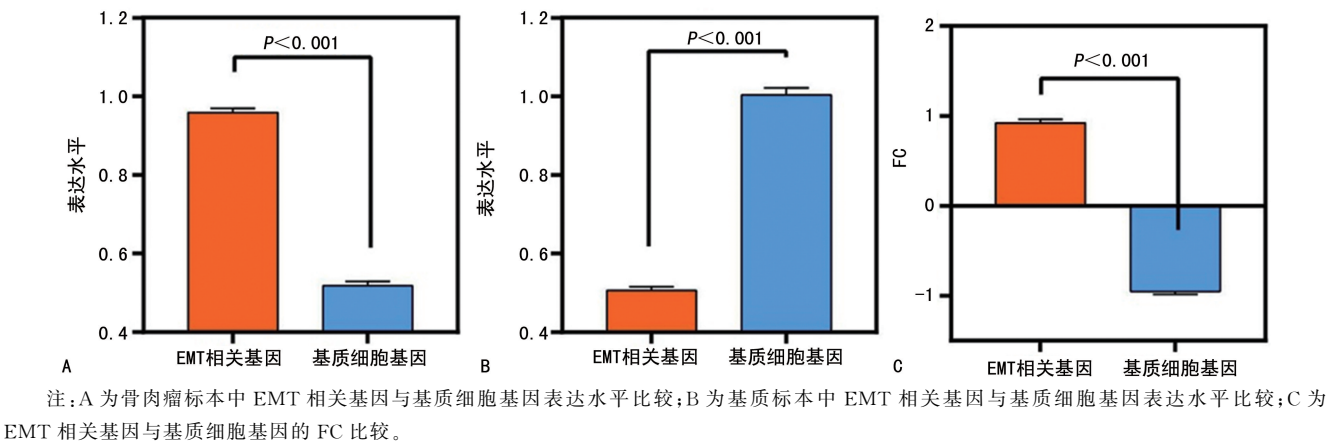


图 4 EMT 相关基因与基质细胞基因表达情况比较

3 讨 论

EMT 是骨肉瘤转移的关键因素^[3-5,14],且越来越多的证据表明,EMT 与人类肿瘤的免疫活性有关^[15-16],但在骨肉瘤中相关报道较少。本研究在 GSE39055 和 GSE16091 数据集中基于基因表达定义了 EMT 的基因特征、免疫活性和基质活性,并进一步分析了 EMT、免疫活性、基质活性和肿瘤纯度间的相关性,结果显示,骨肉瘤中 EMT 评分和免疫评分、基质评分均呈正相关,而肿瘤纯度与 EMT 评分、免疫评分和基质评分均呈负相关,这些发现与尿路上皮癌和结直肠癌的最新相关研究结果一致^[5,17-18]。

本研究结果显示,高 EMT 评分是骨肉瘤患者总生存率、无病生存率下降的危险因素;且在 GSE39055 中,与骨肉瘤患者总生存率最相关的前 15 个基因有 10 个来自 EMT 相关基因,与骨肉瘤患者无病生存率最相关的前 15 个基因有 11 个来自 EMT 相关基因,提示 EMT 相关基因的表达与骨肉瘤患者的生存预后密切相关。此外,本研究发现,免疫评分不是骨肉瘤患者总生存率、无病生存率下降的危险因素。WANG 等^[5]在尿路上皮癌中的相关研究也发现,免疫评分不是患者生存率下降的危险因素,与本研究结果相似,提示在不同肿瘤类型中,免疫活性可能均不会影响患者的生存率。

为了进一步探索骨肉瘤中 EMT 相关基因的表达细胞来源,本研究分析了 GSE36001 数据集和本院 5 例骨肉瘤标本与 5 例基质标本中 EMT 相关基因、基质细胞基因的表达差异。骨肉瘤标本中 EMT 相关基因表达水平高于基质细胞基因;基质标本中基质细胞基因表达水平高于 EMT 相关基因;骨肉瘤标本和基

质标本之间 EMT 相关基因的 FC 高于基质细胞基因。同时,EMT 评分与基质评分呈正相关这一结果提示骨肉瘤标本中基质细胞越多,EMT 相关基因表达越高,所以,基质细胞是骨肉瘤中 EMT 相关基因表达的关键来源。通过使用尿路上皮癌数据集,WANG 等^[5]研究发现,基于基因表达的浸润性 T 细胞和 EMT 水平呈正相关,基质细胞是尿路上皮癌中 EMT 相关基因的主要表达细胞。ISELLA 等^[17]研究发现,EMT 相关基因在基质细胞中高表达,表明 EMT 相关基因可能来源于基质细胞而非上皮癌细胞。

4 结 论

骨肉瘤中 EMT、免疫活性、基质活性和肿瘤纯度之间存在相关性;EMT 相关基因的表达与骨肉瘤患者的生存预后密切相关;基质细胞是骨肉瘤中 EMT 相关基因表达的关键来源。

参考文献

[1] 覃娜,王艳华. 抑癌基因甲基化与骨肉瘤的关系[J]. 基础医学与临床,2019,39(2):256-259.
[2] BIAZZO A,DE PAOLIS M. Multidisciplinary approach to osteosarcoma[J]. Acta Orthop Belg,2016,82(4):690-698.
[3] 陈超,范卫君. 骨与软组织肉瘤肺转移的治疗进展[J]. 介入放射学杂志,2019,28(5):499-503.
[4] SAYLES L C,BREESE M R,KOEHN A L,et al. Genome-informed targeted therapy for osteosarcoma[J]. Cancer Discov,2019,9(1):46-63.
[5] WANG L,SACI A,SZABO P M,et al. EMT and stroma-related gene expression and resistance to PD-1 blockade in urothelial cancer[J]. Nat Commun,2018,9(1):3503-

3507.

[6] LV Y F, DAI H, YAN G N, et al. Downregulation of tumor suppressing STF cDNA 3 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis of osteosarcoma by the Wnt/GSK-3 β /beta-catenin/Snail signaling pathway[J]. Cancer Lett, 2016, 373(2): 164-173.

[7] PAOLONI M, DAVIS S, LANA S, et al. Canine tumor cross-species genomics uncovers targets linked to osteosarcoma progression[J]. BMC Genomics, 2009, 10: 625.

[8] KRESSE S H, RYDBECK H, SKARN M, et al. Integrative analysis reveals relationships of genetic and epigenetic alterations in osteosarcoma [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e48262.

[9] KELLY A D, HAIBE-KAINS B, JANEWAY K A, et al. MicroRNA paraffin-based studies in osteosarcoma reveal reproducible independent prognostic profiles at 14q32[J]. Genome Med, 2013, 5(1): 2-11.

[10] SUBRAMANIAN A, TAMAYO P, MOOTHA V K, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(43): 15545-15550.

[11] HANZELMANN S, CASTELO R, GUINNEY J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data[J]. BMC Bioinformatics, 2013, 14(8): 7-15.

[12] YOSHIHARA K, SHAHMORADGOLI M, MARTINEZ E, et al. Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data[J]. Nat Commun, 2013, 4: 2612.

[13] UHLEN M, ZHANG C, LEE S, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome[J]. Science, 2017, 357(6352): 2507-2513.

[14] JIANG X, ZHANG Z, SONG C, et al. Glaucoalyxin A reverses EMT and TGF- β 1-induced EMT by inhibiting TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway in osteosarcoma[J]. Chem Biol Interact, 2019, 307: 158-166.

[15] LOU Y, DIAO L, CUENTAS E R, et al. Epithelial-mesenchymal transition is associated with a distinct tumor microenvironment including elevation of inflammatory signals and multiple immune checkpoints in lung adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(14): 3630-3642.

[16] MAK M P, TONG P, DIAO L, et al. A patient-derived, pan-cancer EMT signature identifies global molecular alterations and immune target enrichment following epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(3): 609-620.

[17] ISELLA C, TERRASI A, BELLOMO S E, et al. Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome[J]. Nat Genet, 2015, 47(4): 312-319.

[18] ISELLA C, TERRASI A, BELLOMO S E, et al. Corrigendum: stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome[J]. Nat Genet, 2016, 48(10): 1296-1298.

(收稿日期: 2020-01-02 修回日期: 2020-06-25)

(上接第 2238 页)

参考文献

[1] 杨国君, 吕龙. I 型胶原蛋白 C 末端交联肽 (CTX) 与骨质疏松症的相关性研究[J]. 内蒙古医科大学学报, 2018, 40(5): 522-525.

[2] SZULC P, DELMAS P D. Biochemical markers of bone turnover in men[J]. Calcif Tissue Int, 2001, 69: 229-234.

[3] 王抒, 张军宁, 乔田奎. 血清 I 型前胶原氨基端前肽、I 型前胶原羧基端前肽、I 型胶原羧基端肽在骨转移性癌诊断中的应用[J]. 中国临床医学, 2011, 18(4): 456-458.

[4] SUGIMOTO T, NAKAMURA T, NAKAMURA Y, et al. Profile of changes in bone turnover markers during once-weekly teriparatide administration for 24 weeks in postmenopausal women with osteoporosis[J]. Osteoporos Int, 2014, 25(3): 1173-1180.

[5] BAI Y H. Study on the role of bone metabolic-markers in the treatment of postmenopausal osteoporosis in women [J]. Int J Lab Hematol, 2017, 38(20): 2926-2929.

[6] 及金宝, 林兴喜, 朱翔蓉, 等. 骨代谢标志物对社区绝经后骨质疏松症患者发生髋部骨质疏松及骨折的评估作用[J]. 中国全科医学, 2016, 19(14): 1625-1628.

[7] LIU T T, LIU D M, XUAN Y, et al. The association between the baseline bone resorption marker CTX and incident dysglycemia after 4 years[J]. Bone Res, 2017, 5(3): 235-241.

[8] HERRMANN M, SEIBEL M J. The amino and carboxy-terminal corss-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: a comparative review[J]. Clin Chim Acta, 2008, 393(2): 57-75.

[9] 夏维波, 章振林, 林华, 等. 原发性骨质疏松症诊疗指南 (2017)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(3): 281-309.

[10] 王清华, 林坚平, 沈宁江, 等. 根据 I 型胶原氨基端肽、I 型胶原羧基端肽、骨钙素及骨特异性碱性磷酸酶早期诊断骨不连[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(51): 7611-7621.

[11] MOHAMED Y, HAIFA H, DATEL O, et al. The role of biochemical markers of bone turnover in the diagnosis of osteoporosis and predicting fracture risk[J]. Tunis Med, 2014, 92(5): 304-310.

[12] COSMAN F, DEBEUR S J, LEBOFF M S, et al. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis [J]. Osteoporos Int, 2014, 25(10): 2359-2381.

[13] CABRAL H W, ANDOLPHI B F, FERREIRA B V, et al. The use of biomarkers in clinical osteoporosis[J]. Rev Assoc Med Bras, 2016, 62(4): 368-376.

[14] 周文光, 孔悦, 魏培德, 等. 一种全自动高精度化学发光免疫测定仪的研制[J]. 医疗卫生装备, 2013, 34(5): 16-17.

(收稿日期: 2020-01-02 修回日期: 2020-06-15)