

胃 疾 病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002345

胃腺癌中 SIX6 的表达及对预后判断价值的研究

刘爱东¹, 刘时飞¹, 闫 丰¹, 庞久玲²

(1. 华北理工大学附属医院病理科, 唐山 063000; 2. 唐山市工人医院烧伤科, 唐山 064000)

【摘要】目的:检测胃腺癌中同源异型蛋白-6(sine oculis homeobox homolog-6, SIX6)的表达, 分析其对预后判断的价值。**方法:**本实验选择 79 例胃腺癌作为观察组, 选择对应的标本中距肿瘤边缘>3 cm 的正常胃黏膜组织 79 例作为对照组, 均留取新鲜组织及石蜡包埋组织, 应用免疫组化法检测 2 组石蜡包埋组织中 SIX6 蛋白的表达, 应用 Western blot 检测 2 组新鲜标本中 SIX6 蛋白的半定量表达, 应用生存分析法观察 SIX6 与生存时间的关系。应用实时荧光定量 PCR 法检测 15 例胃腺癌和正常胃黏膜组织中 SIX6 mRNA 的表达。**结果:**2 组中 SIX6 表达的阳性率差别有统计学意义(53.2% vs. 6.3%, $\chi^2=41.461$, $P=0.000$)。观察组中 SIX6 的表达与肿瘤的最大径(33.3% vs. 69.8%, $\chi^2=10.446$, $P=0.001$)、浸润深度(21.9% vs. 74.5%, $\chi^2=21.149$, $P=0.000$)、脉管癌栓(44.0% vs. 69.0%, $\chi^2=4.594$, $P=0.032$)、淋巴结转移(31.8% vs. 80.0%, $\chi^2=18.175$, $P=0.000$)和炎细胞浸润程度(25.9% vs. 67.3%, $\chi^2=12.223$, $P=0.000$)有关, 而与性别、年龄和分化程度无明显相关性($P>0.05$)。生存分析显示观察组中 SIX6 的表达与生存时间相关($\chi^2=4.243$, $P=0.040$)。胃腺癌中 SIX6 蛋白的半定量表达(1.21 ± 0.06 vs. 0.92 ± 0.04 , $t=3.85$, $P=0.000$)和 mRNA (1.30 ± 0.18 vs. 0.82 ± 0.11 , $t=2.25$, $P=0.033$)的表达量明显高于正常胃黏膜组织。**结论:**SIX6 蛋白和 mRNA 在胃腺癌组织中表达明显升高, 对肿瘤的形成和发展有一定的调节作用。SIX6 的表达与预后有关。

【关键词】胃腺癌; 同源异型蛋白-6; 预后**【中图分类号】**R73**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-08-18

Expression and significance of sine oculis homeobox homolog-6 in patients with gastric adenocarcinoma

Liu Aidong¹, Liu Shifei¹, Yan Feng¹, Pang Jiuling²

(1. Department of Pathology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology;

2. Department of Burn, Tangshan Gongren Hospital)

【Abstract】Objective: To detect the expression of sine oculis homeobox homolog-6 (SIX6) in gastric adenocarcinoma, and analyze its value in judging prognosis. **Methods:** A total of 79 cases of gastric adenocarcinoma tissue were collected as the observation group, while another 79 cases of normal gastric mucosa tissue with a distance > 3 cm to tumor boundary were collected as the control group. All cases were took the fresh tissue and conducted the paraffin-embedded tissue. Immunohistochemistry was used to detect the expression of SIX6 protein in paraffin-embedded tissue, Western blot was used to detect the semiquantative expression of SIX6 protein in the fresh tissue, survival analysis was used to observe the relationship between SIX6 and survival time, and real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of SIX6 mRNA in 15 cases gastric adenocarcinoma tissue and 15 cases of normal gastric mucosa tissue. **Results:** Positive rate of SIX6 expression in two groups had statistically significant differences in two groups (53.2% vs. 6.3%, $\chi^2=41.461$, $P=0.000$). In the experimental group, expression of SIX6 was correlated with tumors' maximum diameter (33.3% vs. 69.8%, $\chi^2=10.446$, $P=0.001$), infiltrated depth (21.9% vs. 74.5%, $\chi^2=21.149$, $P=0.000$), vascular thrombus (44.0% vs. 69.0%, $\chi^2=4.594$, $P=0.032$), lymph node metastasis (31.8% vs. 80.0%, $\chi^2=18.175$, $P=0.000$) and inflammatory cell infiltration (25.9% vs. 67.3%, $\chi^2=12.223$, $P=0.000$), but not with gender, age and cell differentiation ($P>0.05$). Survival analysis results showed that expression of SIX6 was correlated with survival time ($\chi^2=4.243$, $P=0.040$). Semiquantative expression of SIX6 protein (1.21 ± 0.06 vs. 0.92 ± 0.04 , $t=3.85$, $P=0.000$) and mRNA (1.30 ± 0.18 vs. 0.82 ± 0.11 , $t=2.25$, $P=0.033$) in the experimental group were higher than those in the control group. **Conclusion:** Higher expressions of SIX6 protein and mRNA in the experimental group are significantly

increased in the gastric adenocarcinoma tissue, which plays a certain adjusting role in the formation and development of tumor. SIX6 is correlated with the prognosis of gastric adenocarcinoma.

【Key words】gastric adenocarcinoma; sine oculis homeobox homolog-6; prognosis

作者介绍: 刘爱东, Email: liuaidong303@163.com,

研究方向: 肿瘤分子病理学。

基金项目: 河北省卫生计生委 2018 年度医学科学研究重点计划课题资助项目(编号: 20180793); 2019 年唐山市科学技术研究与发展计划资助项目(编号: 19150207E)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20191112.1127.010.html>

(2019-11-13)

胃腺癌临床上多见,好发人群为中老年人,细胞的分化常较差,常呈浸润性生长,病变进展快,部分患者预后不良。胃腺癌细胞具有高增殖性,影响病变形成和进展的因素较多,不同基因和蛋白异常表达失调是重要的促进因素。同源异型蛋白-6(sine oculis homeobox homolog-6, SIX6)是一种转录调节蛋白,可以调控下游多种基因的表达,对肿瘤细胞的增殖、迁移和凋亡均有一定作用^[1]。近年研究认为, SIX 家族中的相关成员可能是肿瘤转移的促进因子^[2]。本文关注胃腺癌组织中 SIX6 的表达,分析其临床意义及对预后判断的价值。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集 2011 年 4 月至 2014 年 7 月在华北理工大学附属医院确诊为胃腺癌,并行手术治疗的患者作为观察组。样本纳入采用统计学中两样本率纳入的方法,应用公式 $n=2[(u_{\alpha}+u_{\beta}) \times \delta/\sigma]^2+1/4u_{\alpha}^2$, 计算后纳入样本 79 例。纳入标准:具有完整的随访资料;符合 WHO 的病理诊断标准。排除标准:伴有其他器官恶性肿瘤;伴有鳞状细胞分化、神经内分泌分化的肿瘤;术前有放、化疗史。本组共观察 79 例,年龄 34~88 岁,平均 58.7 岁,其中男 42 例,女 37 例。选择对应的标本中距肿瘤边缘>3 cm 的正常胃黏膜组织 79 例作为对照组。均留取新鲜标本(-80℃冰箱中冻存)和石蜡包埋组织。患者或家属均签定知情同意书,研究经医院伦理委员会批准。

1.2 SIX6 蛋白表达的检测及结果判定

1.2.1 免疫组化法检测 样本检测均基于石蜡包埋组织。病理医师取材,应用福尔马林固定后脱水,并进行石蜡包埋,切片取 4 μm 切片后置于胶片上。SIX6 为浓缩液(购自武汉博士德生物技术公司),先行预实验,选择最佳显色的浓度(1:200)用于正式实验。正式实验均应用免疫组化二步法,行 DAB 显色,均由同一检验师操作完成,做好质控工作,减少人为误差。SIX6 的阳性部位是细胞质,以染成棕黄色为阳性细胞。着色强度:无着色为 0 分;弱为 1 分,中为 2 分,强为 3 分。阳性判定:选择上皮细胞集中分布区计数(400 倍),共选择 5 个视野,取平均值,<5%为 0 分,5%~10%为 1 分,以 11%~30%为 2 分,以 31%~50%为 3 分,>50%为 4 分。二者相加为最终评分,≤3 分为阴性,>3 分为阳性。计算肿瘤组织中 SIX6 蛋白表达的阳性率。

1.2.2 Western blot 检测基于新鲜冻存组织。内参应用

GAPDH。取新鲜组织,提取总蛋白,测定试剂盒定量,丙烯酰胺凝胶电泳,经湿转法转到 PVDF 膜,牛奶封闭后稀释好抗体,4℃置于冰箱中过夜,取出后进行洗涤,加入二抗,孵育 2 h,化学发光剂显影,并拍照,用凝胶分析软件对图像进行分析。结果判定应用 Image J V1.47H 软件进行灰度分析,以蛋白与 GAPDH 的比值作为相对表达量进行结果的评定。

1.3 SIX6 mRNA 表达的检测

检测 15 例胃腺癌和 15 例正常胃黏膜新鲜标本中 SIX6 mRNA 的表达。首先提取总 RNA,试剂购自美国 ABI 公司。引物合成由苏州睿赢生物技术公司协助完成。引物上游:5'-ACTGTAAATCGTGCGAACC AAA-3',下游:5'-ATCGGCCCC-ACTCTGCTACCT-3'。U6 为内参。引物上游:5'-TGGAA-CAGAAAGAAAGATGC-3',下游:5'-TTGGATTTCACGAATT-CCG-3'。操作均由同一技术人员操作,严格按实验步骤完成。程序设定:95℃ 10 min;95℃ 25 s,64℃ 20 s,72℃ 20 s,10 个循环;93℃ 25 s,60℃ 35 s,72℃ 20 s,40 个循环。于 60℃ 时采集荧光信号,并读取 Ct 值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示结果。

$$\Delta\Delta Ct = [Ct_{\text{目的基因(样品)}} - Ct_{\text{GAPDH(样品)}}] - [Ct_{\text{目的基因(校正样品)}} - Ct_{\text{GAPDH(校正样品)}}]$$

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行分析,符合正态分布的计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间定量资料的比较采用 t 检验,2 组间计数资料用率表示,采用卡方检验进行比较,应用 K-M 生存分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 2 组中 SIX6 阳性率的比较

观察组中 SIX6 的阳性率均明显高于对照组(表 1,图 1,图 2)。

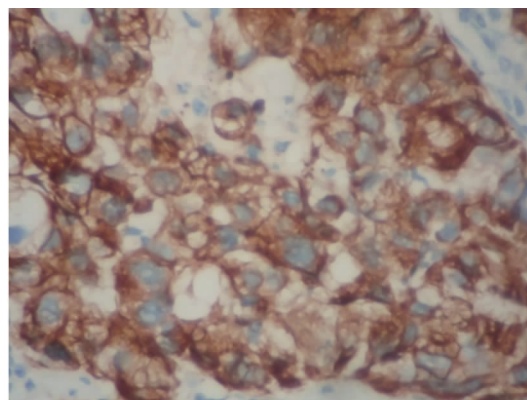


图 1 胃腺癌中 SIX6 阳性表达(400×)

表 1 两组中 SIX6 阳性率的比较(n, %)

组别	阳性	阴性	χ^2 值	P 值	OR 值	95%CI
观察组(n=79)	42(53.2)	37(46.8)	41.461	0.000	1.378	1.323~3.902
对照组(n=79)	5(6.3)	74(93.7)				

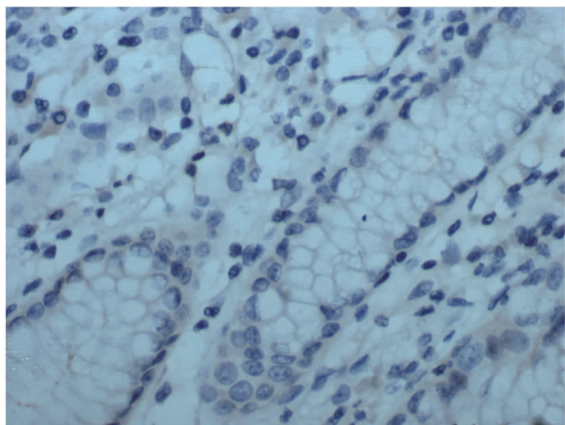


图2 正常胃黏膜中 SIX6 阴性表达 (200 ×)

2.2 观察组不同特征分组中 SIX6 阳性率比较

观察组中 SIX6 的表达与肿瘤的最大径、浸润深度、脉管癌栓、淋巴结转移和炎细胞浸润程度有关,而与性别、年龄及分化程度无明显相关性(表 2)。

表 2 观察组不同特征分组中 SIX6 阳性率比较

临床特征	例数	阳性 (n, %)	阴性 (n, %)	χ^2 值	P 值
性别					
男	42	22(52.4)	20(47.6)	0.022	0.882
女	37	20(54.1)	17(45.9)		
年龄(岁)					
<55	40	17(42.5)	23(57.5)	3.701	0.054
≥55	39	25(64.1)	14(35.9)		
分化程度					
高-中	32	14(43.8)	18(56.3)	1.915	0.166
低	47	28(59.6)	19(40.4)		
脉管癌栓					
无	50	22(44.0)	28(56.0)	4.594	0.032
有	29	20(69.0)	9(31.0)		
肿瘤最大径(cm)					
<5	36	12(33.3)	24(66.7)	10.446	0.001
≥5	43	30(69.8)	13(30.2)		
浸润深度					
未及浆膜	32	7(21.9)	25(78.1)	21.149	0.000
浆膜及以外	47	35(74.5)	12(25.5)		
淋巴结转移					
无	44	14(31.8)	30(68.2)	18.175	0.000
有	35	28(80.0)	7(20.0)		
炎细胞浸润程度					
轻	27	7(25.9)	20(74.1)	12.223	0.000
重	52	35(67.3)	17(32.7)		

2.3 观察组中 SIX6 表达的生存分析

本组患者进行术后 5 年(60 个月)生存时间随访,截止时间为 2019 年 7 月 31 日,随访时间 4~60 个月。存活 17 例,

死亡 57 例,失访 5 例。生存分析显示观察组中 SIX6 的表达与生存时间相关($\chi^2=4.243, P=0.040$),即观察组 SIX6 高表达患者的生存时间短(图 3)。

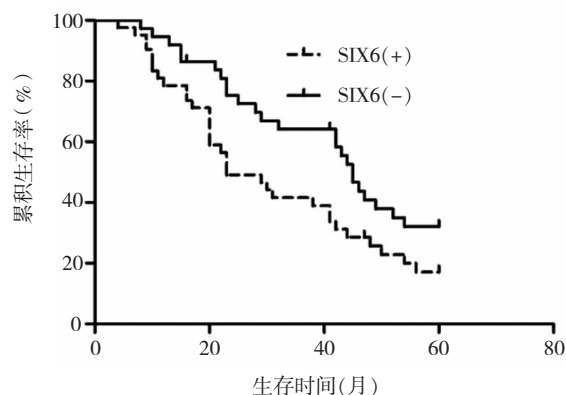
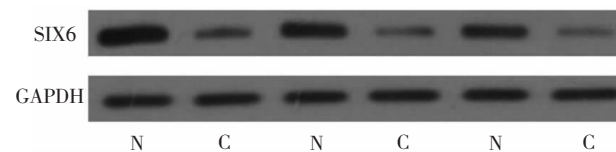


图3 胃腺癌中 SIX6 的表达与生存时间的关系

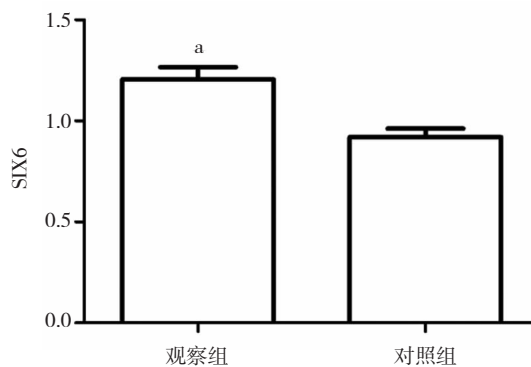
2.4 2 组中 Western blot 检测 SIX6 半定量表达的比较

观察组中 SIX6 的半定量表达为 1.21 ± 0.06 , 对照组中 SIX6 的半定量表达为 0.92 ± 0.04 , 2 组差异有统计学意义($t=3.85, P=0.000$)(图 4)。



注:N,胃腺癌;C:正常胃黏膜组织

A. SIX6 半定量的 Western blot 检验



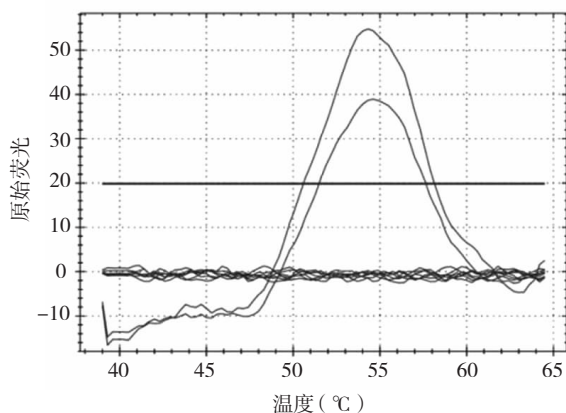
注:a, $P<0.05$

B. SIX6 半定量表达的柱状图

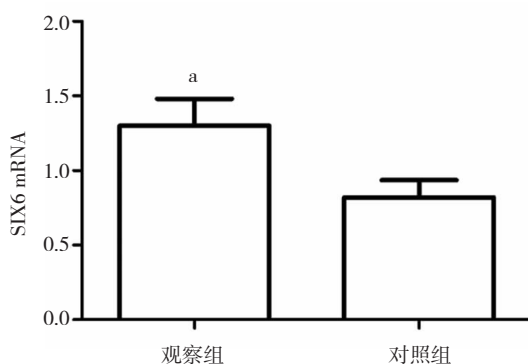
图4 Western blot 检测胃腺癌和正常胃黏膜中 SIX6 的表达

2.5 2 组中 SIX6 mRNA 表达的比较

15 例胃腺癌中 SIX6 mRNA 的表达量为 1.30 ± 0.18 , 15 例正常胃黏膜组织中 SIX6 mRNA 的表达量为 0.82 ± 0.11 , 2 组差异有统计学意义($t=2.25, P=0.033$)(图 5)。



A. 溶解曲线图

注:a, $P < 0.05$

B. 柱状图

图5 实时荧光定量 PCR 检测胃腺癌和正常胃黏膜中 SIX6 mRNA 的表达

3 讨论

胃腺癌被认为来源于胃黏膜的腺上皮,其发生与上皮的异型增生有关。肿瘤的恶性程度高,尤其是低分化肿瘤^[3]。SIX 家族目前共发现 6 个成员,结构上均有 60 个氨基酸的同源盒结构域(homeodomain, HD)和 SIX 结构域,还包括非保守的 N 端和 C 端,它们主要通过 HD 与 DNA 结合,通过 HD 与蛋白作用,共同调控器官的发育过程。其中 SIX1 和 SIX2、SIX3 和 SIX6、SIX4 和 SIX5 具有相似的基因构架。SIX6 是家族中的重要成员,可以作为转录因子发挥作用^[4]。SIX6 在机体的正常组织和细胞中表达极少,当细胞恶性转变后表达量增加。王晓龙等^[5]通过观察结肠腺癌中 SIX6 的表达,发现其在肿瘤中表达升高,可以引起肿瘤细胞分泌更多的

MMP-11,使细胞外的明胶和 IV 型胶原发生降解,对诱导肿瘤细胞的迁移起重要作用。有研究认为 SIX6 与 EYA2 的复合物形成后可以直接激活 TGF- β R1 mRNA 转录水平,促进肿瘤细胞的增殖和迁移^[6]。SIX6 对上皮间质转化有诱导作用,主要是通过对核因子信号通路实现的,使肿瘤细胞具有间质细胞的特征,肿瘤细胞生长加速,肿瘤体积增大,侵袭能力增强^[7-8]。也有研究认为 EYA2 对 SIX6 的抑制凋亡的作用至关重要,EYA2 是磷酸酶,以磷酸化的 Threonine 为底物,调控细胞凋亡和 DNA 修复的组蛋白变异,抑制细胞发生死亡,因此 EYA2 的状态对 SIX6 的功能有一定影响^[4]。

本研究结果显示,观察组中 SIX6 的蛋白和 mRNA 表达水平明显高于对照组,提示二者高表达可以促进肿瘤的形成,具有类似癌基因的作用。本实验中,Western blot 检测 SIX6 蛋白的半定量表达及实时荧光定量 PCR 检测 SIX6 mRNA 的表达均是对免疫组化结果的验证。研究认为,SIX6 在肿瘤中可引起相关因子发生转录后调节多种基因的表达,SIX6 可以对增殖基因调控进而促进肿瘤细胞的增殖,对细胞外基质降解相关基因的调控,引起细胞外基质和基底膜发生降解促进肿瘤细胞的转移,对凋亡基因抑制使细胞形成永生,对转化生长因子进行调节使上皮细胞的功能发生改变^[9]。SIX6 的功能可能更趋于多样性,尤其是作为上游基因可以引起下游多种基因活化,如对 VEGF 表达的调节、对 Wnt 通路的调节等^[10]。观察组中 SIX6 的表达与肿瘤的最大径有关,提示 SIX 可以促进肿瘤的生长。其表达与浸润深度有关,提示 SIX6 参与肿瘤的浸润性生长和局部侵袭作用。SIX6 的表达与脉管癌栓和淋巴结转移有关,提示 SIX6 参与肿瘤细胞的侵袭和淋巴道转移。SIX6 的高表达预示着肿瘤具有较强的转移特征。SIX6 对肿瘤的迁移作用可能与其对黏附素的调节有关,如降低 E-cadherin 的表达,使肿瘤细胞的同质性黏附作用下降,细胞易于离开原发灶,提高 N-cadherin 的表达,使肿瘤的异质性黏附作用升高,肿瘤细胞易于在异质性的介质中定植,形成转移瘤^[11-12]。由于以上因素均为判断肿瘤生物学行为和患者预后的重要因素,因此检测 SIX6 的

表达对判断肿瘤的生物学行为和预后有重要作用,生存分析也直接证实了检测 SIX6 的表达对预后判断的价值,这对判断预后提供了一项客观指标。本研究结果显示 SIX6 的表达与炎细胞浸润程度有关,提示其参与肿瘤细胞周围的炎症反应过程,并促进间质反应的发生,间质反应在一定程度上提示肿瘤细胞的免疫性反应,尤其是 CD4 阳性和 CD8 阳性的 T 淋巴细胞^[13]。间质反应在一定程度上预示着抗肿瘤细胞浸润性的反应,但是其抗肿瘤生长的作用较弱,持续时间较短,可以为肿瘤直接浸润提供疏松的间质环境。SIX6 促进炎症反应的作用是持续性的^[14-15],其机制尚不清楚。本研究未发现 SIX6 与分化程度的关系,提示其对肿瘤细胞由幼稚向成熟的分化过程无明显调节作用,这与 SIX 家族中的其他因子的作用相似^[16]。

总之,SIX6 在胃腺癌组织中表达明显升高,对肿瘤的形成和发展有一定的调节作用。术后组织中 SIX6 的表达与预后有关。

参 考 文 献

- [1] Soucek JJ, Baine MJ, Lin C, et al. Unbiased analysis of pancreatic cancer radiation resistance reveals cholesterol biosynthesis as a novel target for radiosensitisation[J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(6): 1139–1149.
- [2] Liu Q, Li A, Tian Y, et al. The expression profile and clinic significance of the SIX family in non-small cell lung cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9(1): 119.
- [3] 孔繁静, 于红刚, 周中银, 等. 胃癌 Six1 基因启动子甲基化及其在病情及预后评估中的价值[J]. *实用预防医学*, 2017, 24(4): 404–406.
- [4] Sang J, Jia L, Zhao B, et al. Association of three single nucleotide polymorphisms at the SIX1–SIX6 locus with primary openangle glaucoma in the Chinese population[J]. *Sci China Life Sci*, 2016, 59(7): 694–699.
- [5] 王晓龙, 才保加, 刘 宁, 等. 结肠癌中同源盒蛋白 SIX6 和基质金属蛋白酶-11 表达及意义[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(12): 2892–2894.
- [6] Aijaz S, Allen J, Tregidgo R, et al. Expression analysis of SIX3 and SIX6 in human tissues reveals differences in expression and a novel correlation between the expression of SIX3 and the genes encoding isocitrate dehydrogenase and cadherin 18[J]. *Genomics*, 2005, 86(1): 86–99.
- [7] Marienfeld R B, Palkowitsch L, Ghosh S. Dimerization of the I kappa B kinase-binding domain of NEMO is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF- κ B activity[J]. *Mol Cellular Biol*, 2006, 26(24): 9209–9219.
- [8] Xin X, Li Y, Yang X. SIX1 is overexpressed in endometrial carcinoma and promotes the malignant behavior of cancer cells through ERK and AKT signaling[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 3435–3440.
- [9] Kuo JZ, Zangwill LM, Medeiros FA, et al. Quantitative trait locus analysis of SIX1–SIX6 with retinal nerve fiber layer thickness in individuals of european descent[J]. *Am J Ophthalmol*, 2015, 160(1): 123–130.
- [10] Wang L, Liu H. microRNA-188 is downregulated in oral squamous cell carcinoma and inhibits proliferation and invasion by targeting SIX1[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3): 4105–4113.
- [11] 洪 甜, 李 玲, 李文超, 等. 人 Six1 基因缺失突变体对上皮钙黏素 (E-cadherin) 启动子活性的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(2): 224–227.
- [12] 郑志红, 孙秀菊, 邱广蓉, 等. 胃癌癌前和发展阶段中 E-cadherin 基因的突变[J]. *世界华人消化杂志*, 2002, 10(2): 153–156.
- [13] Zhao Y, Zhou H, Ma K, et al. Abnormal methylation of seven genes and their associations with clinical characteristics in early stage non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(4): 1211–1218.
- [14] He Z, Li G, Tang L, et al. SIX1 overexpression predicts poor prognosis and induces radioresistance through AKT signaling in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 1071–1079.
- [15] Ledford KL, Martinez-De Luna RI, Theisen MA, et al. Distinct cis-acting regions control six6 expression during eye field and optic cup stages of eye formation[J]. *Dev Biol*, 2017, 426(2): 418–428.
- [16] Wu DW, Lin PL, Wang L, et al. The YAP1/SIX2 axis is required for DDX3-mediated tumor aggressiveness and cetuximab resistance in KRAS-wild-type colorectal cancer[J]. *Theranostics*, 2017, 7(5): 1114–1132.

(责任编辑:唐秋姗)