

骨肉瘤生物标志物研究进展

朱昱润 张春林

摘要 骨肉瘤是青少年人群中常见的高度恶性肿瘤。目前有效诊断骨肉瘤并预测其肺转移和化疗耐药等预后的生物标志物尚不明确,这一现状限制了骨肉瘤患者生存率的进一步提高。骨肉瘤生物标志物类型多样,作用机制各不相同。它们不仅有助于诊断骨肉瘤并预测其预后,而且有助于确定新的骨肉瘤治疗靶点,具有很好的临床应用潜力。该文就近年骨肉瘤生物标志物相关研究进展进行综述,同时阐述这些研究面临的一些问题与挑战。

关键词 骨肉瘤;生物标志物;预后;基因;蛋白质组学

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2021.02.010

骨肉瘤是最常见的原发性高度恶性骨肿瘤,以增殖的肿瘤细胞直接产生骨或骨样组织为特点,局部侵袭性强且早期即可出现远处转移,5年生存率为50%~60%^[1]。该病好发于15~25岁或青少年长骨干骺端,发生在脊柱和骨盆部位者预后通常不佳。肿瘤早期诊断是确保治疗效果的关键,但因骨肉瘤早期缺乏特异性症状,发现时病情往往已经进一步发展。延误治疗时机、早期转移和化疗耐药等是骨肉瘤患者生存期短、预后不佳的主要原因。

尽快寻找到骨肉瘤生物标志物不仅可以协助其早期筛查和诊断,而且可以为判断其化疗敏感性和预后提供依据,对提升骨肉瘤的临床治疗效果具有重要意义。

1 RNA标志物

1.1 微小RNA

微小RNA(miRNA)是一类内源性、非编码且高度保守的核糖核酸分子,长度较短,由20~25个核苷酸组成,可在调节转录后的基因表达方面发挥关键作用。miRNA表达失调可影响恶性肿瘤的发生与发展,如血清miR-21高表达与肿瘤分期、化疗耐药性和不良预后均显著相关^[2]。另有研究发现,骨肉瘤患者血清miR-375水平明显低于健康人,且血清miR-375水平越低,骨肉瘤患者总生存期越短^[3],这可能与miR-375对骨肉瘤细胞增殖具有抑制作用有关。Shi等^[4]研究发现,miR-375可通过磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Akt)途径抑制骨肉瘤生长。在骨肉瘤组织中miR-

214表达显著上调,这可能与骨肉瘤转移和预后不良有关,miR-214高表达患者肿瘤更大,化疗效果也更差,故其可以作为预测骨肉瘤预后的潜在因素^[5]。此外,骨肉瘤患者血清miR-194水平明显降低,且在不同组织学亚型之间并无显著差异。手术治疗后骨肉瘤患者miR-194表达可上调,而miR-194高表达患者预后较好^[6]。

1.2 环状RNA

环状RNA(circRNA)具有闭环结构,可稳定存在于细胞质中而不被降解,故其可作为肿瘤早期筛查和评价预后的标志物以及新的有效治疗靶点,对阐明肿瘤发生发展的具体机制具有重要意义。

circRNA-0008717是一种在骨肉瘤组织中表达显著上调的环状核糖核酸,其在骨肉瘤中过表达可提高Bmi-1的表达,从而促进骨肉瘤细胞的增殖和侵袭,骨肉瘤患者生存期因此缩短^[7]。在骨肉瘤中过表达的还有circRNA-100876,其高表达患者肿瘤体积更大,分化程度较低,生存期较短。敲除circRNA-100876基因可抑制体外细胞增殖和体内肿瘤生长。miR-136作为circRNA-100876的下游基因,两者表达呈负相关^[8],而miR-136可作为肿瘤抑制基因发挥作用,这也证实了circRNA-100876下调可抑制肿瘤生长。Zhu等^[9]发现,hsa_circRNA_0081001在化疗耐药和肺转移患者血清和组织中高表达,而其在化疗期间无明显升高且术后维持在较低水平则提示患者预后较好。由此可见,hsa_circRNA_0081001可以动态、准确地反映骨肉瘤患者的病情变化,尤其在转移和化疗耐受方面具有预测骨肉瘤进展和预后的临床价值。

1.3 长链非编码 RNA

长链非编码 RNA(lncRNA)是长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA,在染色质重塑、转录及转录后调控、干细胞全能性和神经生长分化等方面具有重要作用。与正常骨细胞系相比,骨肉瘤细胞系 lncRNA HNF1A-AS1、lncRNA CRNDE 和 lncRNA Linc00511 表达均上调。lncRNA CRNDE 介导的骨肉瘤进展可能与 notch1 信号和上皮间质转换失调有关^[10],而 lncRNA HNF1A-AS1 则通过激活 Wnt/ β -连环蛋白信号转导通路促进细胞周期进程和抑制细胞凋亡,最终促进肿瘤细胞增殖^[11]。lncRNA Linc00511 高表达可抑制 miR-765 表达,从而促进肿瘤细胞增殖、集落形成和迁移^[12]。上述 lncRNA 对判断骨肉瘤预后和寻找治疗靶点均具有潜在价值。

lncRNA MEG3 对多种肿瘤均有抑制作用,因此低水平 lncRNA MEG3 是骨肉瘤患者预后不良的标志,患者生存时间会明显缩短,且可能发生肿瘤远处转移^[13]。张鸿程等^[14]发现,lncRNA HOXA11-AS 在骨肉瘤中表达明显下调,而其过表达可抑制裸鼠体内骨肉瘤生长,因此有望成为生物治疗靶点。但目前该作用的分子机制尚不明确,lncRNA HOXA11-AS 可能通过影响表观调控因子活性发挥肿瘤抑制作用。

化疗耐药一直是骨肉瘤治疗的难点。lncRNA LUCAT1 在甲氨蝶呤耐药的骨肉瘤细胞中表达异常上调,提示其可能是影响耐药的关键分子。体内和体外实验研究均发现,敲除 LUCAT1 基因可抑制肿瘤细胞对甲氨蝶呤的抗药性,作用机制可能是通过 miR-200c 上调相关多药耐药蛋白表达^[15]。Zhang 等^[16]研究发现,阿霉素耐药骨肉瘤细胞 lncRNA FOXC2-AS1 表达水平明显高于阿霉素敏感骨肉瘤细胞,lncRNA FOXC2-AS1 可能参与耐药机制,且与预后不良相关。

2 骨肉瘤相关基因异常

p53 是一种抑癌基因,可对细胞周期、DNA 修复和合成及细胞凋亡发挥重要调节作用。一项荟萃分析结果显示,p53 上调与骨肉瘤患者 3 年总生存率降低有关^[17]。相关耐药性研究发现,p53 高表达可提升多药耐药的骨肉瘤细胞系对紫杉醇、顺铂和阿霉素的化疗敏感性,其作用方式可能是通过抑制胰岛素样生长因子-1 受体(IGF-1R)表达或增加促凋亡蛋白 p21 和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达

实现^[18]。

Rb 基因对控制细胞周期至关重要,其发生遗传突变不仅可能导致视网膜母细胞瘤综合征,也可使患者更易患骨肉瘤,散发性骨肉瘤患者常存在 Rb 基因改变^[19]。Rb 基因可通过结合转录因子 E2F 调节细胞周期,Rb 缺失或无功能表型骨肉瘤患者可因 Rb 基因不能与转录因子 E2F 形成稳定复合物导致预后较差^[20]。研究报道,Rb 基因杂合性缺失是骨肉瘤患者预后不良的危险因素^[21]。

先天性血管萎缩性皮肤病色素症(RTS)是一种常染色体隐性遗传疾病,这种染色体突变疾病与骨肉瘤易感性增加有关,携带 RECQL4 基因节段突变的 RTS 患者患骨肉瘤风险明显增加^[22]。RECQL4 可编码修复 DNA 损伤和维持基因组稳定性所需的解旋酶,因此 RECQL4 在骨肉瘤中过表达可能与基因组不稳定有关,从而导致骨肉瘤化疗耐药及预后不良^[23]。Martin 等^[24]发现,在化疗不敏感的骨肉瘤病例中 RECQL4 表达上调,提示 RECQL4 差异表达可能与化疗反应有关,有待进一步研究。

3 胰岛素样生长因子-1 与 IGF-1R

胰岛素样生长因子(IGF)-1 可在抑制细胞凋亡、促进细胞周期进程和血管生成以及各种肿瘤发展和转移等方面发挥关键作用。Zhang 等^[25]发现,IGF-1 可与 IGF-1R 结合,激活 PI3K/Akt 信号转导通路,该途径失调可影响多种病理过程,如骨肉瘤增殖、侵袭和转移。抑制 IGF-1R 可降低骨肉瘤增殖与侵袭,并提高骨肉瘤对多西他赛、顺铂或阿霉素的敏感性^[26]。另一项多变量 Cox 回归分析结果表明,IGF-1R 水平是预测骨肉瘤患者预后的独立因素,IGF-1R 过表达与骨肉瘤转移有关^[27]。

4 基质金属蛋白酶

基质金属蛋白酶(MMP)家族是依赖锌离子和钙离子维持活性的一类蛋白水解酶,MMP-2 和 MMP-9 是该家族的主要成员,通常以酶原的形式分泌。经水解活化后,MMP-2 和 MMP-9 可降解基底膜 IV 型胶原,使基底膜阻止肿瘤细胞移动的能力下降^[28]。大部分肿瘤都会出现 1 种或几种 MMP 上调的情况,且 MMP 高表达常与患者存活率低有关^[29]。MMP 通过切割多种底物发挥作用,最终促进肿瘤细胞迁移、侵袭和血管生成。这些底物既包括细胞外基质的结构成分,也包括生长因子结合蛋白、生长因子前体、受体酪氨酸激酶、细胞粘附分子和其他蛋白酶等。抑制 MMP 分泌可抑制骨肉瘤细

胞生长和转移^[30]。Kunz 等^[31]研究 MMP 与化疗反应的关系,发现 MMP-9 活性降低和 MMP-2 活性升高均会导致患者对化疗反应不良,MMP-2/MMP-9 活性的比率可能是对化疗反应有价值的预后标志物。

5 蛋白标志物

研究证实,许多蛋白可参与肿瘤调控和表达。对正常和肿瘤组织的蛋白表达图谱分别进行研究,可进一步发现并筛选出可靠的生物标志物。

细胞色素(CY)C1 在骨肉瘤组织中过表达。研究发现,沉默 CYC1 基因可以增强肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)促进骨肉瘤细胞凋亡的作用,这一过程主要由线粒体依赖的细胞凋亡途径介导^[32]。miR-661 过表达通过下调 CYC1 提高骨肉瘤细胞对 TRAIL 诱导凋亡的敏感性,从而发挥抗肿瘤作用^[33]。

骨膜素过表达与肿瘤转移和血管生成有关。骨膜素过表达可使患者血管内皮生长因子水平增高,微血管密度变大,不仅与患者存活率呈负相关^[34],还与肿瘤 Enneking 分期、大小和病理分型有关^[35]。

微小染色体维持蛋白(MCM)是细胞周期的重要调节因子,可在 DNA 复制启动和延伸环节中发挥重要作用,MCM 蛋白表达显示细胞具有增殖能力。有研究证实,MCM2 和 MCM3 高表达与骨肉瘤不良预后相关,敲除 MCM2 或 MCM3 基因可有效抑制肿瘤细胞生长^[36],但其相关机制有待进一步阐明。

6 结语

发现生物标志物是将分子和基因组数据转化为临床成果的重要途径,转移和化疗耐药是目前骨肉瘤治疗面临的最大挑战。有关研究可以聚焦于能够确定化疗敏感性及监测肿瘤进展和转移的生物标志物,从而为患者提供个体化治疗方案。

目前,虽然某些潜在的生物标志物已得到大量研究证实,但尚无法应用于临床。其关键在于这些生物标志物特异度和敏感度均较低,无法满足临床需求^[37]。肿瘤的异质性也是问题之一,骨肉瘤的基因组具有多样性,故少数肿瘤样本不能反映疾病整体情况。目前多数研究对象均为小规模样本,其研究结果存在不确定性。经济和商业因素也是影响因素,在生物标志物影响临床决策之前,其有效性需要经过大规模、高成本的随机临床试验证实,才能得到监管机构的认可和批准,权衡风险与收益则使很多

后续研究难以进一步开展^[38]。

参考文献

- [1] Li J, Yang Z, Li Y, et al. Cell apoptosis, autophagy and necroptosis in osteosarcoma treatment [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 44763-44778.
- [2] Yuan J, Chen L, Chen X, et al. Identification of serum MicroRNA-21 as a biomarker for chemosensitivity and prognosis in human osteosarcoma[J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(6): 2090-2097.
- [3] Liu W, Zhao X, Zhang YJ, et al. MicroRNA-375 as a potential serum biomarker for the diagnosis, prognosis, and chemosensitivity prediction of osteosarcoma[J]. *J Int Med Res*, 2018, 46(3): 975-983.
- [4] Shi ZC, Chu XR, Wu YG, et al. MicroRNA-375 functions as a tumor suppressor in osteosarcoma by targeting PIK3CA [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(11): 8579-8584.
- [5] Wang Z, Cai H, Lin L, et al. Upregulated expression of microRNA-214 is linked to tumor progression and adverse prognosis in pediatric osteosarcoma [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2014, 61(2): 206-210.
- [6] Shi L, Xie C, Zhu J, et al. Downregulation of serum miR-194 predicts poor prognosis in osteosarcoma patients[J]. *Ann Diagn Pathol*, 2020, 46: 151488.
- [7] Zhou X, Natino D, Qin Z, et al. Identification and functional characterization of circRNA-0008717 as an oncogene in osteosarcoma through sponging miR-203 [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(32): 22288-22300.
- [8] Jin J, Chen A, Qiu W, et al. Dysregulated circRNA_100876 suppresses proliferation of osteosarcoma cancer cells by targeting microRNA-136[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 15678-15687.
- [9] Zhu KP, Zhang CL, Hu JP, et al. A novel circulating hsa_circ_0081001 act as a potential biomarker for diagnosis and prognosis of osteosarcoma[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1513-1520.
- [10] Li Z, Tang Y, Xing W, et al. LncRNA, CRNDE promotes osteosarcoma cell proliferation, invasion and migration by regulating Notch1 signaling and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Exp Mol Pathol*, 2018, 104(1): 19-25.
- [11] Zhao H, Hou W, Tao J, et al. Upregulation of lncRNA HNF1A-AS1 promotes cell proliferation and metastasis in osteosarcoma through activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(8): 3503-3512.
- [12] Yan L, Wu X, Liu Y, et al. LncRNA Linc00511 promotes osteosarcoma cell proliferation and migration through sponging miR-765[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(5): 7248-7256.
- [13] Tian ZZ, Guo XJ, Zhao YM, et al. Decreased expression of long non-coding RNA MEG3 acts as a potential predictor

- biomarker in progression and poor prognosis of osteosarcoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 8(11): 15138-15142.
- [14] 张鸿程, 宋广元, 谈伟健, 等. lncRNA HOXA11-AS 对骨肉瘤细胞增殖, 迁移和侵袭能力的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(5): 497-502.
- [15] Han Z, Shi L. Long non-coding RNA LUCAT1 modulates methotrexate resistance in osteosarcoma via miR-200c/ABCBI axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 947-953.
- [16] Zhang CL, Zhu KP, Ma XL. Antisense lncRNA FOXC2-AS1 promotes doxorubicin resistance in osteosarcoma by increasing the expression of FOXC2[J]. *Cancer Lett*, 2017, 396: 66-75.
- [17] Fu HL, Shao L, Wang Q, et al. A systematic review of p53 as a biomarker of survival in patients with osteosarcoma[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(6): 3817-3821.
- [18] Ye S, Shen J, Choy E, et al. p53 overexpression increases chemosensitivity in multidrug-resistant osteosarcoma cell lines [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, 77(2): 349-356.
- [19] Walkley CR, Qudsi R, Sankaran VG, et al. Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb, mimics the human disease [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(12): 1662-1676.
- [20] Scott MC, Sarver AL, Tomiyasu H, et al. Aberrant retinoblastoma (RB)-E2F transcriptional regulation defines molecular phenotypes of osteosarcoma [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(47): 28070-28083.
- [21] Feugeas O, Guriec N, Babin-Boilletot A, et al. Loss of heterozygosity of the RB gene is a poor prognostic factor in patients with osteosarcoma [J]. *J Clin Oncol*, 1996, 14(2): 467-472.
- [22] Wang LL, Gannavarapu A, Kozinetz CA, et al. Association between osteosarcoma and deleterious mutations in the RECQL4 gene in Rothmund-Thomson syndrome [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95(9): 669-674.
- [23] Turner NC, Reis-Filho JS. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(4): e178-e185.
- [24] Martin JW, Chilton-Macneill S, Koti M, et al. Digital expression profiling identifies RUNX2, CDC5L, MDM2, RECQL4, and CDK4 as potential predictive biomarkers for neo-adjuvant chemotherapy response in paediatric osteosarcoma [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e95843.
- [25] Zhang J, Yu XH, Yan YG, et al. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 444: 182-192.
- [26] Denduluri SK, Idowu O, Wang Z, et al. Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance [J]. *Genes Dis*, 2015, 2(1): 13-25.
- [27] Wang YH, Han XD, Qiu Y, et al. Increased expression of insulin-like growth factor-1 receptor is correlated with tumor metastasis and prognosis in patients with osteosarcoma [J]. *J Surg Oncol*, 2012, 105(3): 235-243.
- [28] Li H, Qiu Z, Li F, et al. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5): 5865-5870.
- [29] Hadler-Olsen E, Winberg JO, Uhlin-Hansen L. Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(4): 2041-2051.
- [30] Yang JS, Lin CW, Hsieh YS, et al. Selaginella tamariscina (Beauv.) possesses antimetastatic effects on human osteosarcoma cells by decreasing MMP-2 and MMP-9 secretions via p38 and Akt signaling pathways [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 59: 801-807.
- [31] Kunz P, Sähr H, Lehner B, et al. Elevated ratio of MMP2/MMP9 activity is associated with poor response to chemotherapy in osteosarcoma [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 223.
- [32] Li G, Fu D, Liang W, et al. CYC1 silencing sensitizes osteosarcoma cells to TRAIL-induced apoptosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(6): 2070-2080.
- [33] Fan L, Zhu C, Qiu R, et al. MicroRNA-661 enhances TRAIL or STS induced osteosarcoma cell apoptosis by modulating the expression of cytochrome c1 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(5): 1935-1946.
- [34] Hu F, Shang XF, Wang W, et al. High-level expression of periostin is significantly correlated with tumour angiogenesis and poor prognosis in osteosarcoma [J]. *Int J Exp Pathol*, 2016, 97(1): 86-92.
- [35] Hu F, Wang W, Zhou HC, et al. High expression of periostin is dramatically associated with metastatic potential and poor prognosis of patients with osteosarcoma [J]. *World J Surg Oncol*, 2014, 12: 287.
- [36] Cheng DD, Zhang HZ, Yuan JQ, et al. Minichromosome maintenance protein 2 and 3 promote osteosarcoma progression via DHX9 and predict poor patient prognosis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(16): 26380-26393.
- [37] Diamandis EP. The failure of protein cancer biomarkers to reach the clinic: why, and what can be done to address the problem? [J]. *BMC Med*, 2012, 10: 87.
- [38] Brooks JD. Translational genomics: the challenge of developing cancer biomarkers [J]. *Genome Res*, 2012, 22(2): 183-187.

(收稿日期:2020-11-17)

(本文编辑:富饶)