

血清 Six1 与乳腺癌临床病理特征的关系研究

彭 浩 宋立伟 周 正 孙敬文 李 涛

摘 要 **目的** 研究乳腺癌患者血清中的 Six1 (sine oculis homeobox homolog 1) 水平,探讨其与乳腺癌临床病理特征的关系。**方法** 应用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法检测原发性乳腺癌患者 (60 例)、乳腺良性疾病患者 (45 例) 和正常对照者 (20 例) 的血清 Six1 水平。**结果** 乳腺癌患者血清中 Six1 水平明显高于乳腺良性疾病患者及正常对照者,且乳腺良性疾病患者血清 Six1 水平也高于正常对照者 ($P < 0.05$)。乳腺癌患者血清中 Six1 高水平与肿瘤 TNM 分期、组织学分级以及淋巴结转移有关 ($P < 0.05$),与年龄、肿瘤直径无关 ($P > 0.05$)。**结论** Six1 与乳腺癌的发生及其侵袭转移具有相关性,其变化在乳腺癌的转移和预后评测中起重要作用。

关键词 乳腺癌 Six1 临床病理特征

中图分类号 R737

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.06.024

Relationship between Six1 in Serum and the Clinical Pathological Characteristics of Breast Cancer. Peng Hao, Song Liwei, Zhou Zheng, et al. Department of General Surgery, Meitan General Hospital, Beijing 100028, China

Abstract Objective To investigate the level of serum Sine oculis homeobox homolog 1 (Six1) in breast cancer patients and analyze the relationship between its expression and the clinical pathological characteristics of breast cancer. **Methods** The level of serum Six1 was detected in primary breast cancer patients ($n = 60$), breast benign disease patients ($n = 45$), normal control subjects ($n = 20$) by ELISA, and the relationship between the level of serum Six1 and clinical pathological characteristics was studied. **Results** The level of serum Six1 in breast cancer group was higher than that in breast benign disease group and in normal control group. In addition, the level of serum Six1 in breast benign disease group was higher than that in normal control group ($P < 0.05$). The higher level of serum Six1 in breast cancer patients was positively correlated to TNM staging, histological grade, lymph node metastasis ($P < 0.05$) and negatively correlated to age and tumor size ($P > 0.05$). **Conclusion** Six1 is closely related to the genesis and development of breast cancer and may contribute to metastasis and prognosis of it.

Key words Breast cancer; Six1; Clinical pathological characteristics

乳腺癌的发生率在全球范围内居女性恶性肿瘤的首位,并以近 20% 的速度逐年递增,严重危害女性的身心健康。转移是恶性肿瘤重要的生物学特征,是一系列具有内在联系的多因素、多步骤相互作用的结果,涉及肿瘤细胞增殖、新生血管形成、细胞黏附、迁移运动、细胞凋亡等一系列过程。细胞增殖过度、分化不全就可能导致肿瘤发生。细胞增殖分化异常从本质上讲是基因的调控异常。Six1 基因为同源盒基因,是一种在多种生物中均有表达且高度保守的转录因子,不仅参与调控胚胎的正常发育和器官形成,还与多种肿瘤的发生、发展密切相关^[1]。本研究主要通过检测乳腺癌患者血清中的 Six1 水平,了解其与

乳腺癌临床病理特征的关系,旨在探讨 Six1 在乳腺癌发生、发展中的作用。

材料与方法

1. 标本采集:收集 2014 年 1 月~2015 年 12 月笔者医院收治的乳腺癌患者 60 例,均为女性,患者年龄 34~71 岁,平均年龄 45.22 ± 6.71 岁,术前未经放疗和肿瘤生物治疗。所有患者均经术后病理诊断证实,其中,浸润性导管癌 42 例、髓样癌 5 例、小叶癌 7 例、导管内癌 3 例、黏液腺癌 3 例;根据 AJCC 标准进行 TNM 分期,Ⅰ期 19 例、Ⅱ期 21 例、Ⅲ期 11 例、Ⅳ期 9 例;按 SBR 标准进行组织学分级, G_1 16 例、 G_2 21 例、 G_3 23 例。收集同期乳腺良性疾病女性患者 45 例,患者年龄 27~56 岁,平均年龄 42.35 ± 5.38 岁,其中乳腺腺病 25 例、乳腺不典型增生 5 例、乳腺导管内乳头状瘤 8 例、乳腺纤维瘤 7 例。选取同时期体检正常的女性 20 例作为正常对照组,年龄 28~60 岁,

基金项目:国家安全生产监督管理总局科研基金资助项目 (201306)

作者单位:100028 北京,煤炭总医院普外肿瘤科

通讯作者:彭浩,副主任医师,电子信箱:penghao009@sina.com

平均年龄 43.72 ± 4.54 岁。血液标本均于手术前采集。采集患者空腹静脉血 5ml, 经 3000r/min 离心 10min, 提取血清置于 -80°C 冰箱保存, 集中待测。实验所用 Six1 ELISA 试剂盒购自北京易科攀博生物科技有限公司。

2. 实验方法: (1) 标准品的稀释: 在酶标包被板上设标准品孔 10 孔, 在第 1、2 孔中分别加标准品 $100\mu\text{l}$, 再于第 1、2 孔中各加标准品稀释液 $50\mu\text{l}$, 混匀; 然后从第 1、2 孔中各取 $100\mu\text{l}$ 分别加到第 3、4 孔, 再于第 3、4 孔分别加标准品稀释液 $50\mu\text{l}$, 混匀; 依次加样、稀释剩余标准孔。(2) 加样: 分别设空白孔、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 $40\mu\text{l}$, 然后再加待测样品 $10\mu\text{l}$ (样品最终稀释度为 5 倍)。加样后封板, 于 37°C 下温育 30min。(3) 加酶: 洗涤后每孔加入酶标试剂 $50\mu\text{l}$, 空白孔除外。再次温育。(4) 显色: 洗涤后每孔依此加入显色剂 A $50\mu\text{l}$ 、显色剂 B $50\mu\text{l}$, 混匀后 37°C 避光显色 15min。每孔加终止液 $50\mu\text{l}$, 终止反应。(5) 测定: 以空白孔调零, 于紫外分光光度计下 280nm 波长依序测量各孔的吸光度 (A 值)。(6) 计算: 以标准物的浓度与 A 值计算出标准曲线的直线回归方程式, 将样品的 A 值代入方程式, 计算出样品浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。

3. 统计学方法: 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Six1 在不同组别血清中的水平: 乳腺癌患者血清中 Six1 水平明显高于乳腺良性疾病组和正常对照者 ($P < 0.05$), 且乳腺良性疾病患者血清 Six1 水平也高于正常对照者 ($P < 0.05$), 经 LSD 法进行两两比较分析, 乳腺癌组与乳腺良性疾病组、乳腺癌组与正常对照组、乳腺良性疾病组与正常对照组之间的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Six1 在不同组别血清中的水平见表 1。

表 1 Six1 在不同组别血清中的水平		
组别	<i>n</i>	Six1 (ng/ml)
乳腺癌组	60	6.68 ± 2.26
乳腺良性疾病组	45	3.74 ± 0.85
正常对照组	20	1.96 ± 0.38

2. 血清 Six1 水平与乳腺癌临床病理特征的关系: 将年龄、肿瘤大小、TNM 分期、组织学分级及淋巴结转移 5 项临床病理因素与乳腺癌患者血清 Six1 水平进行分析。乳腺癌患者中, 血清 Six1 水平与年龄、肿瘤直径无关 ($P > 0.05$), 与肿瘤 TNM 分期、组织学分级、淋巴结转移密切相关 ($P < 0.05$)。血清 Six1 水平与乳腺癌临床病理特征的关系见表 2。

表 2 血清 Six1 水平与乳腺癌临床病理特征的关系				
临床参数	<i>n</i>	Six1 水平 (ng/ml)	<i>t/F</i>	<i>P</i>
年龄 (岁)			3.472	>0.05
≤60	38	6.58 ± 2.51		
>60	22	6.84 ± 2.02		
肿瘤直径 (cm)			1.815	>0.05
≤2	28	6.53 ± 2.25		
>2	32	6.79 ± 2.78		
TNM 分期			24.347	<0.05
I 期	19	4.68 ± 1.57		
II 期	21	6.82 ± 2.24		
III 期及 IV 期	20	8.73 ± 2.12		
组织学分级			32.633	<0.05
G ₁	16	5.13 ± 2.14		
G ₂	21	6.57 ± 2.03		
G ₃	23	8.87 ± 2.64		
淋巴结转移			9.568	<0.05
有转移	31	8.19 ± 2.06		
无转移	29	5.18 ± 2.23		

讨 论

同源盒基因是一类转录调控因子, 可特异性调节相关基因的表达, 参与多个信号通路的调控, 在细胞增殖、分化、凋亡、形态、黏附及迁移等过程中起到重要作用^[2]。Six 是同源盒基因家族中重要的成员之一, 在人、小鼠、鸡、鱼、果蝇等多种生物体内均有 Six 的表达。Six 家族有 Six1/Six2、Six3/Six6、Six4/Six5 共 6 个亚家族, Six1 基因定位于人染色体 14q23 上, 其编码的蛋白是由一个同源异型结构域 (homeodomain, 61 个氨基酸)、Six 结构域 (Sixdomain, 110 ~ 115 个氨基酸)、氨基端和羧基端组成的复合结构, 通过与 DNA 特定结合来调控下游基因的表达, 在细胞增殖与组织发育过程中起关键作用^[3]。

随着对其生物学功能研究的逐步深入, 研究者发现 Six1 不仅能调控胚胎细胞分化发育, 还能诱导细胞增殖、侵袭和转移, 在肿瘤的发生、发展中发挥关键作用, 因此在肿瘤学领域受到了广泛的关注。研究表明, Six1 通过激活 Cyclin D1、Cyclin A1 和 c - myc 等一系列下游基因以调控细胞周期, 在促进细胞生长和

增殖中起重要作用。Six1 调控异常与肿瘤的发生、发展有关。在人类的多种正常组织中 Six1 表达较低,而在多种肿瘤如卵巢癌、子宫癌、结直肠癌、骨肉瘤等中异常高表达,促进这些肿瘤细胞的增殖、迁移以及上皮间质转化,对肿瘤的转移起到了促进作用^[4]。王彤等^[5]探讨 Six1 在子宫颈癌中的表达及其临床意义,发现 Six1 蛋白阳性表达率在正常子宫颈组织、子宫颈上皮内瘤变组织及子宫颈癌组织中依次增加,子宫颈癌组织中 Six1 蛋白阳性表达率明显高于子宫颈上皮内瘤变组织及正常子宫颈组织, Six1 蛋白阳性表达率与肿瘤体积、淋巴结转移及血行转移有关,提示 Six1 与子宫颈癌的发生、发展密切相关,可能成为预测子宫颈癌侵袭与转移性的分子学指标。Emadi - Baygi 等^[6]研究提示弥漫型胃癌组织中 Six1 基因呈高表达,且表达水平随着组织学分级增高而逐渐上升,与预后不良有关,有可能成为未来评测胃癌疾病预后的潜在的生物学标志物。

Jin 等^[7]发现 Six1 在乳腺癌组织中表达率 (61.8%) 明显高于导管原位癌 (23.1%) 和正常乳腺组织 (6.7%), Six1 高表达与临床分期、淋巴结转移、HER - 2 表达状态和无病生存期 (DFS) 和 5 年总生存期 (OS) 等有关。Six1 高表达与乳腺癌预后不良有关。国内目前有关 Six1 在乳腺癌中的作用研究少有报道。本研究发现,乳腺癌患者中血清 Six1 水平明显高于乳腺良性疾病患者及正常对照者,且乳腺良性疾病患者血清 Six1 水平也高于正常对照者,提示 Six1 可能参与了乳腺组织恶变的整个发展过程。这与宋冠华等^[8]在胰腺癌研究中所得结论有相似之处,其研究显示胰腺癌组织、良性腺瘤组织中 Six1 基因的表达显著高于癌旁组织,提示 Six1 表达是胰腺癌发生的早期事件,可能导致肿瘤向恶性发展。类似在正常组织、良性病变(或低级别恶性肿瘤)、肿瘤组织(或高级别恶性肿瘤)中 Six1 表达呈阶梯状上升表现亦可见于其他组织器官,提示 Six1 在肿瘤发生、发展进程中即参与了肿瘤的发生,也在随后的肿瘤增殖和转移中发挥重要的作用。

Six1 基因参与肿瘤的侵袭转移过程,其机制主要有以下几种:诱导上皮细胞间质恶变、调控 TGF - β 信号通路,与 SMAD 通路协同调节 VEGF - C 表达、激活 Wnt 转导通路等^[9,10]。在乳腺组织中 Cyclin A1 是 Six1 的下游效应分子,乳腺上皮细胞过表达 Six1 基因可导致 Cyclin A1 的表达升高而加速细胞增殖,基因组 DNA 稳定性降低,还可以通过调控 Cyclin A2

和 c - myc 等促进乳腺癌干细胞增生,在乳腺癌发生、发展中起重要作用^[11]。本研究进一步分析了 Six1 与乳腺癌临床病理特征的关系,发现血清 Six1 水平与患者的年龄及肿瘤的大小无关,而与 TNM 分期、组织学分级、淋巴结转移密切相关。提示 Six1 参与了乳腺癌发展的过程,与乳腺癌细胞的侵袭转移密切相关, Six1 可否作为评测乳腺癌侵袭转移高危风险的因素之一尚需大样本及更深层的研究。本实验历时尚短, Six1 与 DFS、OS 等乳腺癌远期疗效指标的关系亦有待于随访后进一步分析。

综上所述,乳腺癌患者血清 Six1 水平明显升高, Six1 在乳腺癌发生、发展进程中发挥了重要的作用。Six1 与乳腺癌的肿瘤 TNM 分期、组织学分级、淋巴结转移等临床病理特征密切相关,与乳腺癌的增殖和转移有着密切的关系。通过对血清 Six1 的检测,有助于从多方面了解乳腺癌的生物学行为,以提高乳腺癌早期诊断方法的敏感度和准确性,合理评估其临床转归,进而在临床治疗上起到一定的指导作用。

参考文献

- 1 Wu W, Ren Z, Li P, *et al.* Six1: a critical transcription factor in tumorigenesis[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(6): 1245 - 1253
- 2 Pearson J C, Lemons D, McGinnis W. Modulating Hox gene function during animal body patterning s[J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(12): 893 - 904
- 3 Del Bene F, Wittbrodt J. Cell cycle control by homeobox genes in development and disease[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2005, 16(3): 449 - 460
- 4 Coletta RD, Cristensen KL, Reichenberger KJ, *et al.* The Six1 homeoprotein stimulate tumorigenesis by reactivation of Cyclin A1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(17): 6478 - 6483
- 5 王彤, 朴龙镇, 崔雪莲, 等. Six1 在宫颈癌组织中的表达及意义 [J]. *天津医药*, 2015, 43(3): 249 - 252
- 6 Emadi - Baygi M, Nikpour P, Emadi - Andani E. SIX1 overexpression in diffuse - type and grade III gastric tumors: Features that are associated with poor prognosis[J]. *Adv Biomed Res*, 2015, 4: 139
- 7 Jin H, Cui M, Kong J, *et al.* Six1 homeobox homolog 1 protein is associated with breast cancer progression and survival outcome[J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 97(2): 247 - 252
- 8 宋冠华, 崔亚洲, 韩金祥. 胰腺癌组织 Six1 表达及其临床意义的研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2009, 16(9): 683 - 686
- 9 Liu D, Li L, Zhang XX, *et al.* SIX1 promotes tumor lymphangiogenesis by coordinating TGF β signals that increase expression of VEGF - C [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(19): 5597 - 5607
- 10 Eisner A, Pazyra - Murphy MF, Durrresi E, *et al.* The Eya1 phosphatase promotes Shh signaling during hindbrain development and oncogenesis[J]. *Dev Cell*, 2015, 33(1): 22 - 35
- 11 Li Z, Tian T, Hu X, *et al.* Six1 mediates resistance to paclitaxel in breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(3): 538 - 543
- 12 Wang CA, Jedlicka P, Patrick AN, *et al.* SIX1 induce lymphangiogenesis and metastasis via upregulation of VEGF - C in mouse models of breast cancer[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(5): 1895 - 1906.

(收稿日期: 2016 - 02 - 02)

(修回日期: 2016 - 02 - 08)