

·临床研究·

基于高通量测序分析骨肉瘤发生和转移的分子特征

许明贤¹, 李瑞希², 郭伟堂¹, 程鸣哲¹, 邹昌业¹

(1. 中山大学附属第一医院骨肿瘤科, 广东 广州 510080; 2. 中山大学附属第一医院影像科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】本研究通过第二代高通量测序(NGS)检测配对骨肉瘤转移灶和原发灶标本,分析骨肉瘤原发灶与转移灶的基因图谱差异,以期发现促进骨肉瘤发生和转移的相关分子及可能机制。【方法】12例转移患者的原发灶与转移灶肿瘤组织样本,使用第二代高通量测序(NGS)进行检测,其中9对panel检测(678个基因)以及3对全外显子检测(WES),分析比较骨肉瘤原发灶与转移灶的基因图谱差异:基因拷贝数变异通过EXCAVATOR检测;DNA层面的融合突变通过Lumpy检测;RNA层面的融合突变通过Defuse + STAR-Fusion,并通过Circos图显示突变的分布;Metascape用于分析差异基因的GO和KEGG信号通路富集;使用Pyclone+Citup / LICHEE进行克隆进化分析。【结果】骨肉瘤基因总体突变模式主要以基因扩增为主,主要包括FLCN(37.5%),GID4(37.5%),TP53(33.3%),ATRX(25%),CALR(25%),CCND3(25%),CCNE1(25%),NOCR1(25%),TFEB(25%),VEGFA(25%)等基因。GO聚类结果提示细胞周期通路突变频率最高。KT1、PLCG2、EGFR这3个基因在转移灶显著富集的信号通路中多次出现,可能与骨肉瘤的转移密切相关。转移灶肿瘤负荷突变(TMB)频率显著高于原发灶($P=0.013$)。3例进行WES检测的转移患者均呈现线性克隆进化,提示骨肉瘤转移基因的突变可能呈次序性累积。同时我们确定了可能在骨肉瘤进展中发挥作用的新候选基因,包括PLCG2、MYO15A与PEX6。【结论】骨肉瘤发生与转移的基因突变模式主要以基因扩增为主,骨肉瘤患者肿瘤负荷突变频率在转移灶中显著高于原发灶,转移患者存在相互关联的线性基因克隆进化。本研究发现了可能在骨肉瘤进展中发挥作用的3个新基因PLCG2、MYO15A和PEX6。

关键词:骨肉瘤;肺转移;第二代高通量测序;基因图谱;基因突变

中图分类号:R738.1

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2022)06-0985-10

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0614

Molecular Characteristics of Osteosarcoma Occurrence and Metastasis Based on High Throughput Sequencing Technology

XU Ming-xian¹, LI Rui-xi², GUO Wei-tang¹, CHENG Ming-zhe¹, ZOU Chang-ye¹

(1. Department of Musculoskeletal Oncology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Radiology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: ZOU Chang-ye; E-mail: zouchy@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】The purpose of this study was to explore the difference in expression of gene between the osteosarcoma metastasis and primary specimens through NGS detection, in order to find the molecular mechanism of inducing osteosarcoma occurrence and metastasis.【Methods】Next generation sequencing (NGS) was used to detect the tumor tissue samples of paired primary and metastatic lesions in 12 patients with metastasis, including 9 pairs of Panel detection (678 genes) and 3 pairs of whole exon detection (WES). Copy number variation was detected by Excavator. DNA mutations were detected by Lumpy fusion, and RNA mutations were detected with Defuse + Star fusion. The distribution of mutations was shown by Circos. Metascape was used to analyze the enrichment of Go and KEGG signal pathways of differential genes.

收稿日期:2022-05-06

基金项目:国家自然科学基金(81001194)

作者简介:许明贤,硕士,研究方向:骨肿瘤,E-mail:hsuningxian@foxmail.com;邹昌业,通信作者,主任医师,研究方向:骨肿瘤,E-mail:zouchy@mail.sysu.edu.cn

Pyclone+Citup/LICHEE was used for clonal evolution analysis.【Results】The most frequent gene mutation mode of osteosarcoma was gene amplification, high-frequency mutation genes were FLCN (37.5%), GID4 (37.5%), TP53 (33.3%), ATRX(25%), CALR(25%), CCND3(25%), CCNE1(25%), NOCR1(25%), TFEB(25%), VEGFA(25%), and the mutation frequency of cell cycle pathway was the highest. KT1, PLCG2 and EGFR were closely related to the metastasis of osteosarcoma. The frequency of tumor mutation burden (TMB) in metastatic lesions was significantly higher than primary lesions ($P = 0.013$). Three patients detected by WES showed linear clonal evolution, suggesting that the mutations of osteosarcoma metastasis genes may be accumulated sequentially. We identified new candidate genes that may play an important role in the progression of osteosarcoma, including PLCG2, MYO15A and PEX6.【Conclusions】The most frequent gene mutation pattern of osteosarcoma occurrence and metastasis is gene amplification, and the frequency of tumor mutation burden (TMB) in metastatic lesions is significantly higher than that in primary lesions. There is an interrelated linear gene clonal evolution in patients with metastasis. This study suggests that PLCG2, MYO15A and PEX6 may play an important role in the progression of osteosarcoma.

Key words: osteosarcoma; lung metastasis; NGS; gene map; gene mutation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43(6):985-994]

骨肉瘤是儿童与青少年最常见的原发恶性肿瘤,初诊未发生转移骨肉瘤患者,经过标准的多药联合化疗以及手术整块切除,术后总体生存率约70%;对于早期诊断时即发生转移的患者,常常提示预后不良,总体生存率仅约25%^[1-2]。研究表明,骨肉瘤原发灶肿瘤与转移灶肿瘤在一些关键基因的突变具有显著性差异^[3-5]。骨肉瘤基因组学的特点是基因组的复杂性和不稳定性,富含重排和体细胞拷贝数改变,因此难以确定用于开发靶向治疗的预后标志物和遗传驱动因素。二代测序技术(NGS)使包括癌症基因组图谱(TCGA)和国际癌症基因组联盟(ICGC)在内的全球癌症基因组测序联合项目能够对超过50 000个癌症基因组进行测序和分析,同样,癌症体细胞突变目录(COSMIC)总结了超过100万个癌症样本中的编码突变,并确定了许多促进癌症形成的复发性遗传事件^[6-8]。随着二代测序技术(NGS)的广泛应用,从基因组层面对骨肉瘤发生和转移的基因变异的图谱分析成为可能。肿瘤遗传图谱已被证明可用于诊断、预后和个体化治疗选择,用于各种常见和罕见的癌症^[9-12]。在本研究中,我们收集12例骨肉瘤肺转移患者的原发灶与转移病灶肿瘤组织样本,通过二代高通量测序(NGS)进行检测分析对比基因组差异,以期寻找与骨肉瘤发生与转移相关的基因,为进一步研究骨肉瘤的发生发展、预后评估和基础研究提供新的思路方向。

1 材料与方法

1.1 样本选择与基因组提取

肿瘤组织及外周血标本取自中山大学附属第一医院骨与软组织肿瘤外科。标本的获取及检测均经患者知情同意,并签署同意书。相关研究符合中山大学附属第一医院伦理规范。DNA使用QIAamp DNA FFPE Tissus Kit柱法提取, RNA使用miRNeasy FFPE试剂盒(217504, Qiagen, Hilden, Germany)提取用于第二代高通量测序(NGS)测序^[9],其中3对进行WES检测和9对进行panel检测678个基因,678个肿瘤相关基因依据OncoKB (precision oncology knowledge base)数据库^[13]发表的肿瘤相关基因进行检测。

患者纳入标准:①确诊为骨肉瘤患者;②患者存在转移;③双病灶标本经病理诊断确认骨肉瘤,且肿瘤细胞含量超过80%,送检第二代高通量测序(NGS)。

1.2 数据处理

根据单核苷酸变异、小片段基因的插入或缺失、基因的重排与融合以及基因拷贝数变异变化对12名骨肉瘤患者的变异进行计数(表1)。使用Pyclone+Citup/LICHEE进行克隆进化分析。Circos图标注突变位点的分布。Metascape软件进行GO分析和KEGG信号通路富集分析。使用Wilcoxon秩和检验, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

表1 软件及参数
Table 1 Software used and parameters

Sample type	Algorithm module	Software version	Remarks
DNA	SNV/INDEL	Lianti (r116)	
	CNV	non WES:EXCAVATOR (v2.2)	
	FUSION/Rearrangement	Lumpy (0.2.13)	
	LongIndel	In-house (V2.6.4)	Default
	HLA	HLA I: OptiType (v1.3.1) HLA II: xHLA (v1.2)	parameters
	MSI	MANTIS (v1.0.5)	
	NAB	I: NetMHCpan-4.0 II: NetMHC II pan-3.2	
RNA	FUSION/Rearrangement	Defuse (v0.7.0) + STAR-fusion (v0.8)	

2 结果

2.1 骨肉瘤基因图谱分析

在本研究中,纳入12对临床患者骨肉瘤样本(其中9对Panel检测以及3对进行WES检测)。纳入12例患者平均年龄13.3岁(10~21)岁,均为初诊Enneking II期患者,其中2例发生骨转移,10例肺转移。截至最后随访日期,12例患者平均无病生存期13.6个月(3~22)月,平均总体生存期24.8个月(7~52)月,11例患者存活,1例患者死亡(表2)。

通过检测患者对照血液样本中的白细胞并过滤胚系突变,从而得到12例患者的体细胞突变。对匹配病灶的基因突变模式进行分析,骨肉瘤体细胞突变主要以基因扩增为主,转移灶替代与截断突变类型比例大于原发灶,基因突变不同类型及比例

(图1)。进一步筛选出骨肉瘤原发灶以及转移灶突变前100的基因(图2)。骨肉瘤原发灶和转移灶中共有高频突变基因,主要包括:FLCN(37.5%),GID4(37.5%),TP53(33.3%),ATRX(25%),CALR(25%),CCND3(25%),CCNE1(25%),NOCR1(25%),TFEB(25%),VEGFA(25%)。但转移灶以FLCN(41.3%)、GID4(41.3%)、CCNE1(25%)、KDR(25%)、KIT(25%)、PDGFRA(25%)、LYN(25%)、PREX2(25%)等基因扩增频率更高(图3)。

2.2 骨肉瘤原发灶及转移灶信号通路富集分析

为探索突变基因的功能,通过GO和KEGG富集分析骨肉瘤原发灶与转移灶的差异基因。GO结果表明,原发灶与转移灶均在细胞周期信号通路突变频率高,说明细胞周期信号通路突变是骨肉瘤发生的主要原因。原发灶WNT、TP53等信号通路突变频率更高,而转移灶MAPK、DDR等信号通路突

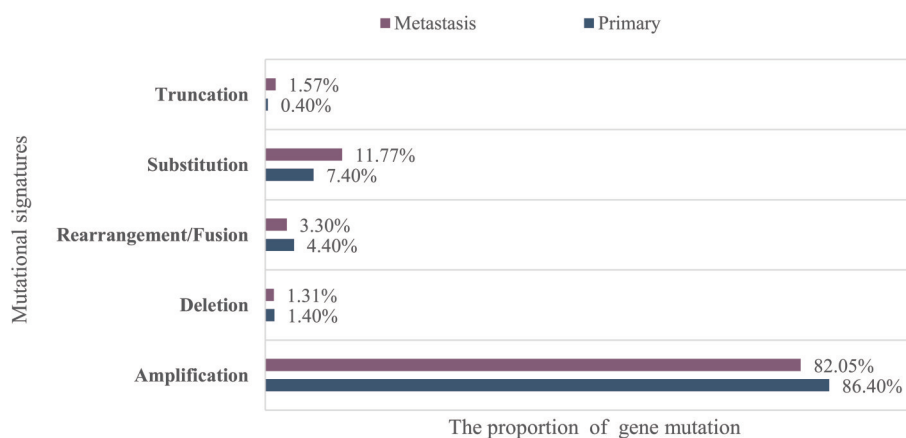


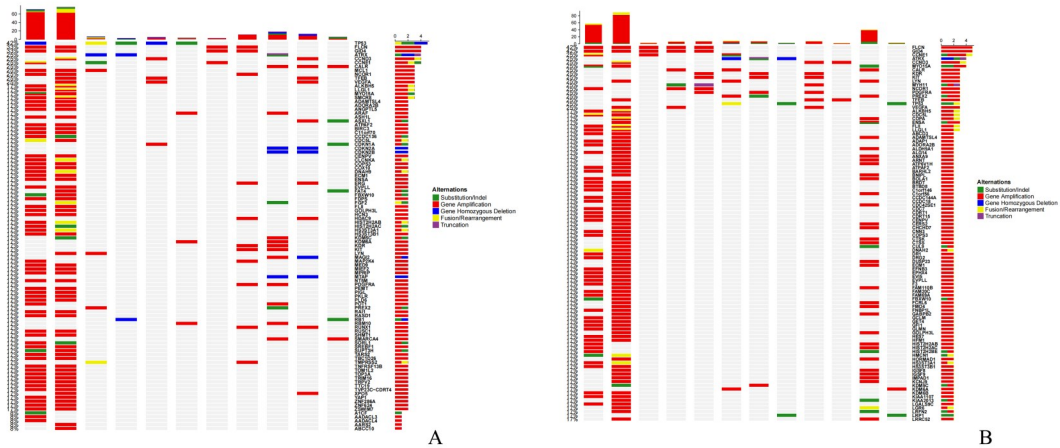
图1 骨肉瘤原发灶与转移灶基因突变类型及比例

Fig. 1 Types and proportion of gene mutations in primary and metastatic osteosarcoma

表2 纳入患者临床特征
Table 2 Clinical characteristics of patients included

Patient	Age	Gender	Enneking stage	Location	Metastasis	State	DFS / months	OS / months
HWK	14	Male	II	Tibia	Lung	Survival	21	35
LJS	10	Male	II	Femur	Lung	Survival	14	23
HWT	13	Male	II	Femur	Lung	Survival	3	19
HJH	14	Male	II	Femur	Bone	Survival	15	18
CXJ	21	Male	II	Tibia	Lung	Survival	16	37
LKY	13	Male	II	Tibia	Lung	Dead	7	21
LZX	12	Female	II	Tibia	Lung	Survival	18	28
LJJ	8	Male	II	Femur	Lung	Survival	12	15
CZY	15	Female	II	Femur	Lung	Survival	18	27
FYL	14	Female	II	Femur	Bone	Survival	5	7
ZYL	13	Female	II	Femur	Lung	Survival	22	52
WCH	13	Male	II	Femur	Lung	Survival	12	16

DFS: disease-free survival; OS: overall survival.



Top100 mutant gene in osteosarcoma. Fig. 2 A showed that the top100 mutant gene in primary of osteosarcoma. Fig. 2 B showed that the top100 mutant gene in metastasis of osteosarcoma.

图2 骨肉瘤top100突变基因

Fig. 2 Top100 mutant gene in osteosarcoma

变频率更高(图4A)。由于研究纳入样本有限,具体主要差异信号通路有待进一步研究。

KEGG 信号通路富集分析提示骨肉瘤原发灶与转移灶主要是在PI3K-Akt、MAPK、RAS、Rap1 信号通路富集,说明这些信号通路突变是骨肉瘤发生发展的主要原因。同时,我们发现FoxO、Prolactin、Phospholipase D、Oxytocin、NF-kappa B、mTOR、HIF-1 等信号通路只在转移灶发现,说明这些通路突变可能是推动骨肉瘤发生转移的原因(图4B-

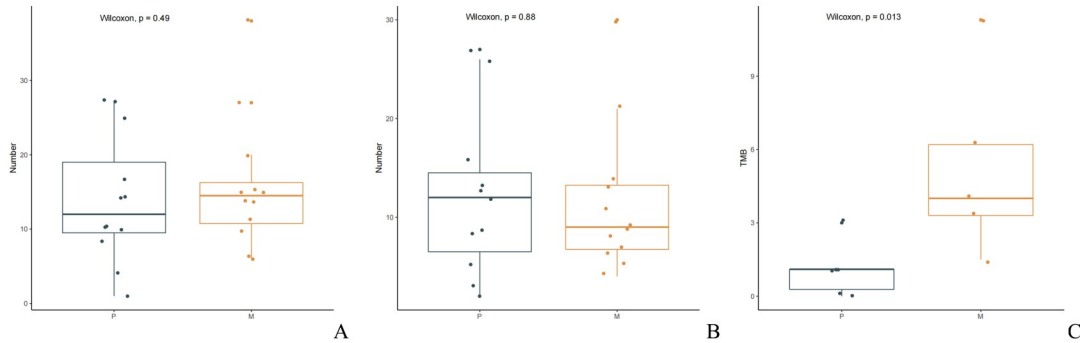
C)。其中 AKT1、PLCG2 和 EGFR 这三个基因在多个转移灶显著富集的通路中重复出现(表3)。

2.3 骨肉瘤原发灶与转移灶的基因突变差异分析

进一步我们分析骨肉瘤原发灶与转移灶染色体基因突变类型,在基因突变数量、基因扩增突变及基因融合上两者无显著性差异。但是,我们发现原发灶肿瘤负荷突变为1.2 mut/Mb,而转移灶肿瘤负荷突变为3.6 mut/Mb,转移灶肿瘤负荷突变(TMB)显著高于原发灶($P=0.013$),差异有统计学

意义(图5)。基因融合分析发现在转移灶1号染色体上新出现 ESRRG-RAD21、DISP1-PLCG2 融合(图6)。进一步分析骨肉瘤原发灶及转移灶拷贝数变异情况,6p21.1、8q13.2、17p11.2、19q12 扩增在原发灶和转移灶中均显著,说明这4个染色体部位

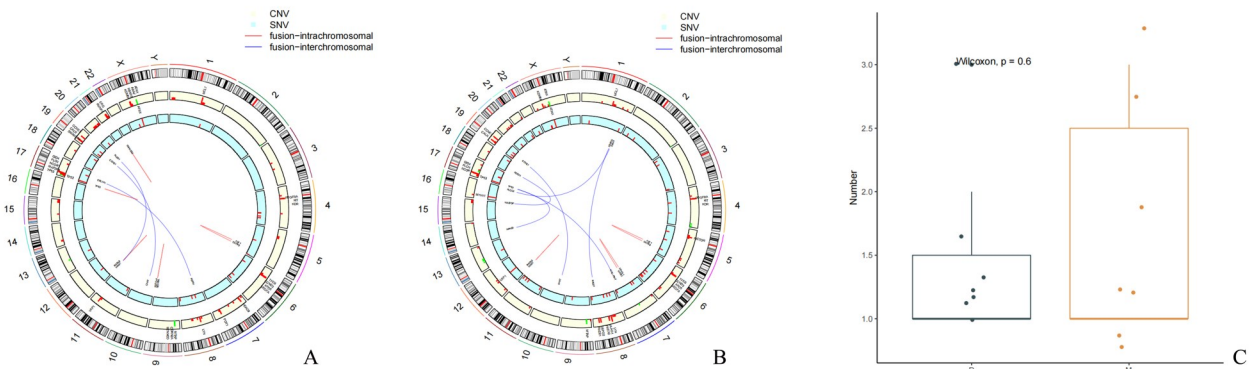
可能是骨肉瘤发生的常见染色体扩增突变区域。同时,我们发现 17p11.2 在转移灶中的拷贝数变异数高于原发灶,我们推测 17p11.2 在骨肉瘤转移过程中起着重要推动作用(图7)。



Gene mutation difference between primary and metastatic osteosarcoma. Fig. 5A showed that the different of total gene mutation frequency. Fig. 5B showed that the different of gene amplification. Fig. 5C showed that the different of tumor mutation burden.

图5 骨肉瘤原发灶与转移灶的基因突变差异分析

Fig. 5 Gene mutation difference between primary and metastatic osteosarcoma



Differential analysis of gene fusion mutations between primary and metastatic osteosarcoma. Fig. 6A showed that the distribution of ESRRG-RAD21 gene fusion mutation sites. Fig. 6B showed that the distribution of DISP1-PLCG2 fusion mutation site. Fig. 6C showed that the gene fusion mutation in primary and metastatic foci of osteosarcoma.

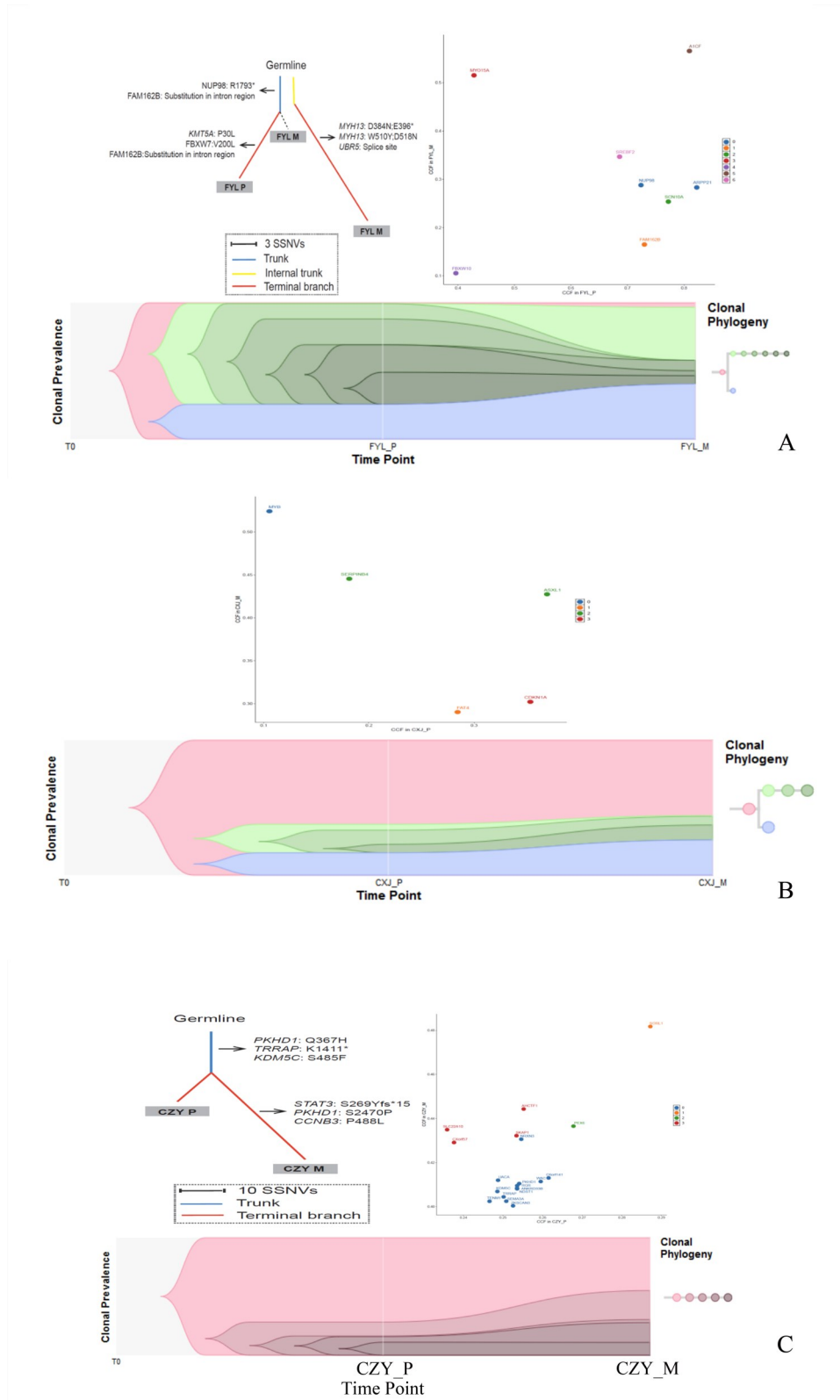
图6 骨肉瘤原发灶与转移灶的基因融合突变差异分析

Fig. 6 Differential analysis of gene fusion mutations between primary and metastatic osteosarcoma

2.4 骨肉瘤克隆进化分析

我们对3例WES检测骨肉瘤患者(FYL, CXJ和CZY)的原发灶和转移灶进行了克隆进化分析,在FYL患者中发现 Internal trunk 突变,说明在骨肉瘤早期已经存在推动转移的基因突变。进一步分析骨肉瘤原发灶和转移灶异质性及克隆结构,发现FYL与CXJ呈克隆平行进化模式,CZY呈克隆线性进化模式。在FYL患者克隆进化呈平行进化模式,共发现7个克隆簇,Cluster6(AICF)为主克隆簇,

Cluster4(MYO15A)主要存在于转移灶中,MYO15A突变可能是FYL早期推动骨肉瘤转移的主要因素(图8A)。在CXJ克隆进化呈平行进化模式,总共发现4个克隆簇,Cluster3(SERPINB4、ASXL1)为主克隆,Cluster1(MYB)主要存在于转移灶中,MYB突变可能是CXJ早期推动骨肉瘤转移的主要因素(图8B)。在CZY患者克隆进化呈线性进化模式,总共发现4个克隆簇,其中Cluster2(SCRL1)为主克隆,Cluster1(NRXN3、UACA、KDM5C、TENM1、TRRAP、



Heterogeneity and clonal structure of primary and metastatic lesions of osteosarcoma. Fig. 8 A showed that heterogeneity and clonal structure of primary and metastatic lesions of osteosarcoma (FYL). Fig. 8 B showed that heterogeneity and clonal structure of primary and metastatic lesions of osteosarcoma (CXJ). Fig. 8 C showed that heterogeneity and clonal structure of primary and metastatic lesions of osteosarcoma (CZY).

图8 骨肉瘤原发灶和转移灶异质性及克隆结构分析

Fig. 8 Heterogeneity and clonal structure of primary and metastatic lesions of osteosarcoma

带或区域 1p11-13、1q10-12、1q21-22、11p15、12p13、17p12-13、19p13 和 22q11-13 最经常重新排列,以及 6q 部分或完全缺失^[23]。研究已普遍发现 2q、6q、8p 和 10p 的 DNA 序列丢失^[24]。在这些染色体异常中,8q、1q 和 17p 的拷贝数增加在骨肉瘤中更具有特异性,在 8q(特别是 8q21.3-22 和 8cen-q13)拷贝数增加的患者表现出较差的无病生存期和较短的总生存期,而在 1q21 拷贝数增加的患者显示出总生存期较短的趋势^[25]。在本研究中发现 1 号染色体新出现 ESRRG-RAD21、DISP1-PLCG2 融合, 6p21.1、8q13.2、17p11.2、19q12 扩增在原发灶和转移灶中均显著,17p11.2 在转移灶中的拷贝数变异数高于原发灶,尤其是位于 17p11.2 染色体中的 FLCN 与 GID4 这两个基因在 12 位患者中均存在基因扩增变异。转移灶染色体间的基因融合突变,拷贝数变异数多于原发灶,说明可能是促进骨肉瘤转移的原因之一,但由于我们纳入研究的样本不足,有待进一步扩大样本验证。

肿瘤负荷突变 (TMB) 是一种对免疫检查点抑制剂敏感性的生物标志物,并且已被证明与对 PD-1 和 PD-L1 阻断免疫治疗的反应比 PD-1 或 PD-L1 表达更显著相关^[26]。全外显子组测序 (WES) 用于测量 TMB 水平,已被证明与免疫治疗的反应有关^[27]。在我们的研究中发现,转移灶肿瘤负荷突变 (TMB) 显著高于原发灶,高度的遗传不稳定性有可能产生新表位,作为免疫介导的肿瘤细胞杀伤的底物。因此,骨肉瘤的复杂基因组和染色体不稳定性为检查点抑制剂的治疗提供了有利条件^[28]。既往研究提示通过抑制 PD-1 可抑制小鼠模型中骨肉瘤的转移,针对肿瘤表面分子的单克隆抗体来增强对肿瘤的免疫反应的主动特异性免疫疗法 (ASI) 在骨肉瘤患者中具有潜在治疗效果^[29]。

细胞积累了由内源性和外部突变过程产生的

细胞变异。这些过程中的每一个都优先促成特定序列环境中某些类型的核苷酸变化。化学疗法可能会导致肿瘤和患者器官的健康组织发生突变,这可能是这些治疗引起的一些长期继发效应的基础。铂类药物,替莫唑胺和放射治疗已经与特定的突变特征相关联,其中一些突变足迹已通过实验得到证实^[30]。本研究纳入的 12 患者样本均接受术前新型辅助治疗,我们认为转移灶肿瘤负荷突变增高可能是由于患者接受化疗所导致,结果提示进一步实验验证骨肉瘤患者接受术前新型辅助治疗导致的突变足迹对了解肿瘤对化疗的耐药性以及解释和预测这些治疗对患者的长期影响至关重要。

肿瘤的克隆进化决定着肿瘤的进程,在本研究中我们发现 3 例 WES 检测患者均呈线性进化,说明患者的发生转移是呈次序形成。单个祖细胞随着驱动基因突变的累积,会经过线性进化同时形成多克隆,多克隆之间也存在突变、竞争和适应。通过 3 位患者的克隆进化分析,我们发现 MYO15A、MYB 和 PEX6 在转移灶突变丰度更高。MYB 已被学者验证为骨肉瘤的新预后因子,但 MYO15A 与 PEX6 与在骨肉瘤领域尚未有报道^[31]。

总之,在本研究中我们发现骨肉瘤转移灶和原发灶基因突变模式主要以基因扩增为主。KT1、PLCG2、EGFR 这三个基因在转移灶显著富集的信号通路中多次出现与骨肉瘤的转移密切相关。12 例患者转移灶肿瘤负荷突变 (TMB) 频率显著高于原发灶,免疫治疗可能对已发生转移的患者具有良好治疗效果。3 例进行 WES 检测的转移患者均呈现线性克隆进化,提示骨肉瘤转移基因的突变可能呈次序性累积。研究中确定了可能在骨肉瘤进展中发挥作用的新候选基因,包括 PLCG2、MYO15A 与 PEX6。

参考文献

- [1] Rainusso N, Wang LL, Yustein JT. The adolescent and young adult with cancer: state of the art—bone tumors[J]. *Curr Oncol Rep*, 2013, 15(4): 296-307.
- [2] Sayles LC, Breese MR, Koehne AL, et al. Genome-informed targeted therapy for osteosarcoma[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(1): 46-63.
- [3] Chen X, Bahrami A, Pappo A, et al. Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma[J]. *Cell Rep*, 2014, 7(1): 104-112.
- [4] Perry JA, Kiezun A, Tonzi P, et al. Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(51): E5564-5573.

- [5] Wu CC, Beird HC, Andrew Livingston J, et al. Immuno-genomic landscape of osteosarcoma [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1008.
- [6] International Cancer Genome C, Hudson TJ, Anderson W, et al. International network of cancer genome projects [J]. *Nature*, 2010, 464(7291): 993-998.
- [7] Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43 (Database issue): D805-811.
- [8] Hutter C, Zenklusen JC. The cancer genome atlas: creating lasting value beyond its data [J]. *Cell*, 2018, 173 (2): 283-285.
- [9] Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing [J]. *J Appl Genet*, 2011, 52(4): 413-435.
- [10] Andersson C, Fagman H, Hansson M, et al. Profiling of potential driver mutations in sarcomas by targeted next generation sequencing [J]. *Cancer Genet*, 2016, 209(4): 154-160.
- [11] Parsons DW, Roy A, Yang Y, et al. Diagnostic yield of clinical tumor and germline whole-exome sequencing for children with solid tumors [J]. *JAMA Oncol*, 2016, 2(5): 616-624.
- [12] Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients [J]. *Nat Med*, 2017, 23(6): 703-713.
- [13] Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, et al. OncoKB: a precision oncology knowledge base [J]. *JCO Precis Oncol*, 2017;PO.17.00011.
- [14] Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(1): 31-46.
- [15] Luo Z, Xiao L, Li J, et al. Integrative analysis reveals driver long non-coding RNAs in osteosarcoma [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(6): e14302.
- [16] Czarnecka AM, Synoradzki K, Firlej W, et al. Molecular biology of osteosarcoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(8): 2130.
- [17] Stricker HM, Rommerswinkel N, Keil S, et al. The phospholipase D inhibitor FIPI potently blocks EGF-induced calcium signaling in human breast cancer cells [J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 43.
- [18] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(10): 721-732.
- [19] Wang J, Ni J, Song D, et al. MAT1 facilitates the lung metastasis of osteosarcoma through upregulation of AKT1 expression [J]. *Life Sci*, 2019, 234: 116771.
- [20] Sun L, Li J, Yan B. Gene expression profiling analysis of osteosarcoma cell lines [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3): 4266-4272.
- [21] Freeman SS, Allen SW, Ganti R, et al. Copy number gains in EGFR and copy number losses in PTEN are common events in osteosarcoma tumors [J]. *Cancer*, 2008, 113(6): 1453-1461.
- [22] Do SI, Jung WW, Kim HS, et al. The expression of epidermal growth factor receptor and its downstream signaling molecules in osteosarcoma [J]. *Int J Oncol*, 2009, 34(3): 797-803.
- [23] Bridge JA, Nelson M, McComb E, et al. Cytogenetic findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 1997, 95 (1): 74-87.
- [24] Tarkkanen M, Karhu R, Kallioniemi A, et al. Gains and losses of DNA sequences in osteosarcomas by comparative genomic hybridization [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(6): 1334-1338.
- [25] Tarkkanen M, Elomaa I, Blomqvist C, et al. DNA sequence copy number increase at 8q: a potential new prognostic marker in high-grade osteosarcoma [J]. *Int J Cancer*, 1999, 84(2): 114-121.
- [26] Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden [J]. *Genome Med*, 2017, 9(1): 34.
- [27] Johnson DB, Frampton GM, Rioth MJ, et al. Targeted next generation sequencing identifies markers of response to PD-1 blockade [J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(11): 959-967.
- [28] Ramos KJ, Somayaji R, Nichols DP, et al. Comparative effectiveness research in pediatric respiratory disease: promise and pitfalls [J]. *Paediatr Drugs*, 2018, 20(1): 1-7.
- [29] Chen C, Xie L, Ren T, et al. Immunotherapy for osteosarcoma: fundamental mechanism, rationale, and recent breakthroughs [J]. *Cancer Lett*, 2021, 500: 1-10.
- [30] Pich O, Muinos F, Lolkema MP, et al. The mutational footprints of cancer therapies [J]. *Nat Genet*, 2019, 51(12): 1732-1740.
- [31] Rihova K, Ducka M, Zambo IS, et al. Transcription factor c-Myb: novel prognostic factor in osteosarcoma [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2022, 39(2): 375-390.

(编辑 祁方昉)