

SEMA3D 在喉癌组织中的表达及临床意义

吴俊志¹,李静佳²,赵 锐¹,朱 鑫¹,冯成敏¹,敬一丹¹,程 瑶¹,张 震¹,邓世山²,刘 海¹
(1. 川北医学院附属医院 耳鼻咽喉头颈外科,四川 南充 637000; 2. 川北医学院 解剖教研室,四川 南充 637000)

摘 要: **目的** 探讨喉癌组织中轴突导向因子 3D(SEMA3D)的表达与患者临床病理特征和预后的关系。**方法** 收集 2015 年 1 月—2016 年 12 月经外科手术切除的喉癌组织及对应癌旁组织标本 61 例,应用免疫组化 SP 法检测 SEMA3D 的表达情况,并对 SEMA3D 与喉癌临床病理特征及预后的关系进行统计学分析。**结果** 免疫组化 SP 法显示,SEMA3D 在喉癌组织中的表达水平显著低于在癌旁正常组织中的表达水平($P < 0.05$)。SEMA3D 表达与患者的临床分期和颈部淋巴结转移密切相关($P < 0.05$)。Kaplan-Meier 生存分析显示,SEMA3D 表达与患者生存率具有相关性($P < 0.001$)。单变量 Log-rank 检验分析显示吸烟、临床分期、颈部淋巴结转移和 SEMA3D 表达与患者预后具有相关性,进一步行 Cox 多因素回归分析发现 SEMA3D 低表达是影响喉癌预后的独立危险因素。**结论** SEMA3D 蛋白低表达是影响喉癌预后的独立危险因素。SEMA3D 蛋白阳性表达的喉癌患者预后较好,有望成为喉癌患者预后评估的新的生物标志物。

关 键 词: 喉癌;SEMA3D;回归分析;免疫组化;预后

中图分类号: R739.65

The expression of SEMA3D and its clinical significance
in human laryngeal cancer

WU Junzhi¹,LI Jingjia²,ZHAO Rui¹,ZHU Xin¹,FENG Chengmin¹,JING Yidan¹, CHENG Yao¹,
ZHANG Zhen¹,DENG Shishan²,LIU Hai¹
(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China; 2. Department of Anatomy, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of Semaphporin 3D in laryngeal cancer tissue and its relationship with clinicopathological characteristics and prognosis of patients. **Methods** Sixty-one laryngeal cancer tissues and normal tissues adjacent to carcinoma were obtained from January 2015 to December 2016. Immunohistochemistry SP staining was used to detect the expression of Semaphporin 3D. The relationships of its expression with clinicopathological characteristics and prognosis were analyzed. **Results** Immunohistochemistry SP method showed that SEMA3D expression was significantly lower in laryngeal cancer tissue than in normal tissue adjacent to carcinoma($P < 0.05$). The expression of SEMA3D was closely related to clinical stage and lymph node metastasis($P < 0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed that SEMA3D expression was correlated with patient survival($P < 0.001$). Univariate Log-rank test showed that smoking, clincial staging, lymphnode metastasis and expression of SEMA3D were associated with the prognosis of patients. Multivariate Coxregression analysis further showed that the low expression of SEMA3D was an independent risk factor affecting the prognosis of laryngeal cancer. **Conclusions** Low expression of SEMA3D protein is an independent risk factor for the prognosis of laryngeal cancer. Laryngeal cancer patients with positive SEMA3D expression show better prognosis than those with negative SEMA3D expression, which indicates that SEMA3D may be a potential biomarker for the prediction of prognosis in patients with laryngeal cancer.

Keywords: Laryngeal cancer; SEMA3D; Regression analysis; Immunohistochemistry; Prognosis

基金项目:四川省教育厅高校创新团队项目(17TD0016);川北医学院校级课题(CBY17-A-YB56)。
第一作者简介:吴俊志,男,在读硕士研究生,住院医师。
通信作者:刘 海,Email:liuhai100@sina.com

喉癌是耳鼻咽喉头颈外科常见的恶性肿瘤,发病率占头颈部恶性肿瘤的20%,我国喉癌发生率为(0.35~1.15)/10万人,其男性发病率高于女性^[1]。目前,国内外对喉癌发生发展的机制研究相对较少,且缺乏对喉癌进行诊断和评估预后的特异性肿瘤标记物。因此,寻找有效的早期诊断和预后判定以及保留喉功能提高生活质量的方法对于治疗喉癌极其重要。

轴突导向因子(semaphorins, SEMAs)广泛分布于神经系统,是一类高度保守的跨膜型或分泌型糖蛋白,其中 semaphorin3 (SEMA3)是唯一表达于脊椎动物的分泌型蛋白^[2],可以通过调节神经轴突的成束与分支,影响突触的形成和导向进而调节神经系统的发育^[3]。轴突导向因子3D(semaphorin3D, SEMA3D)作为轴突导向因子家族中的一员,不仅在神经系统的发育中发挥重要作用,也通过调节神经受体 Neuropilins(NRP)、Plexin 的表达和 cAMP 信号通路、Ras 信号通路的激活,影响恶性肿瘤的发生发展^[4-5]。但目前研究表明,由于 SEMA3D 功能的多样性和受体结合的差异性,导致 SEMA3D 在肿瘤组织中可能发挥不同的生物学效应^[2]。本实验组前期通过敲低泛素特异性蛋白酶7(ubiquitin-specific protease 7, USP7)的表达后发现,喉癌细胞的增殖、迁移能力降低,而凋亡能力增强。将敲低 USP7 后的喉癌细胞通过转录组测序技术发现 SEMA3D 的表达明显增高。因此,本研究采用免疫组化 SP 法分析 SEMA3D 蛋白在喉癌组织中的表达情况以及与喉癌的临床病理特征和预后的相关性。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集川北医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科2015年1月—2016年12月经外科手术切除的喉癌组织及对应癌旁组织标本61例,所有喉癌组织标本均经病理HE染色证实为喉鳞状上皮细胞癌组织,癌旁组织标本中无肿瘤组织。按世界卫生组织(WHO)1998年病理学分级:低分化5例、中分化16例、高分化40例。根据喉癌患者肿瘤原发部位作为临床分型,其中声门上型18例、声门型37例、声门下型6例。根据国际抗癌协会(UICC)的TNM(2002期)分类标准进行临床分期,其中I、II期25例,III、IV期36例。

1.2 免疫组化

免疫组化 SP 法采用博士德生物公司提供

SV0002-IgG 免疫组化检测试剂盒进行操作。人喉癌石蜡标本以4 μm 厚度连续切片,经脱蜡、水化后,经枸橼酸钠缓冲溶液行高温抗原修复,加入 SE-MA3D(美国 Abcam 公司,鼠多抗)一抗(稀释度1:100),4℃ 孵育过夜(夜间孵育时间大于8 h),37℃ 复温60 min,加入羊抗鼠 IgG 抗体-HRP 多聚体,于37℃ 恒温孵箱中孵育40 min,滴加 DAB 显色液后于显微镜下控制显色时间,苏木素复染,自来水返蓝,1% 盐酸酒精分化后梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。以已知阳性组织切片为阳性对照,以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定

显微镜下观察所有组织切片染色,结果采用统一标准,由两位病理科医师于双盲原则下对实验结果进行评判计分。若两位病理科医师评判结果出现异议,则由第3位病理科医师阅片后与前两位商议,统一意见后给出最终结论。本结果判定采用 Formowitz 综合计分法,染色强度评分:0分为无染色;1分为明显高出背景的淡黄色颗粒染色;2分为浅棕黄色颗粒染色;3分为深棕黄色颗粒染色。阳性细胞计数评分:每张组织切片选取5个高倍视野,计数500个细胞染色结果,阳性细胞数<5%为0分;5%~25%为1分;26%~50%为2分;51%~75%为3分;>75%为4分。染色强度评分与染色细胞数评分相加结果<2为阴性表达(-),2~3分为弱阳性表达(+),4~5分为中阳性表达(++),6~7分为高阳性表达(+++)^[6]。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。SEMA3D 表达与喉癌临床病理特征的关系分析采用 χ^2 检验,生存分析用 Kaplan-Meier 法并行 Log-rank 检验,多因素分析用 Cox 风险比例回归模型分析。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 喉癌组织中 SEMA3D 的表达情况

免疫组化结果显示,SEMA3D 主要表达于细胞浆,亦在细胞膜着色。SEMA3D 在喉癌组织中的阳性表达率为26.23%(16/61),低于癌旁组织的73.77%(45/61),差异具有统计学意义($\chi^2=30.142, P<0.001$),见表1、图1、图2。

2.2 SEMA3D 表达与喉癌临床病理特征的关系

SEMA3D 表达与患者临床分期和颈部淋巴结转移有明显关系,而与患者性别、年龄、吸烟、饮酒、临

床分型、分化程度无明显关系(表 2)。

2.3 SEMA3D 表达与喉癌预后的关系

截止随访终点,喉癌患者全组死亡 14 例,失访 5 例,生存 42 例。单因素 Log-rank 检验分析显示 SEMA3D 表达、吸烟、临床分期和颈部淋巴结转移与患者预后有关。随访 5~60 个月,剔除 5 例失访患者,SEMA3D 阳性表达组死亡率 13.33% (2/15),阴性表达组死亡率 29.27% (12/41)。Kaplan-Meier 生存曲线提示 SEMA3D 阳性表达组总体生存率较 SEMA3D 阴性表达组明显升高。进一步行 Cox 风险比例回归模型分析发现 SEMA3D 表达、吸烟、临床分期和颈部淋巴结转移与喉癌预后密切相关,是影响喉癌预后的独立危险因素(图 3、表 3、表 4)。

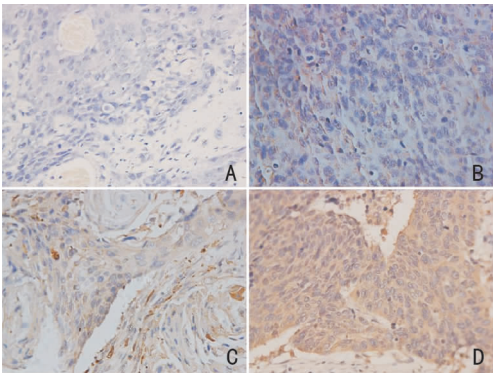


图 1 SEMA3D 在喉癌组织中的表达 (SP ×400) A;SEMA3D 在喉癌细胞呈阴性表达;B;SEMA3D 在喉癌细胞呈低阳性表达;C;SEMA3D 在喉癌细胞呈中阳性表达;D:SEMA3D 在喉癌细胞呈高阳性表达

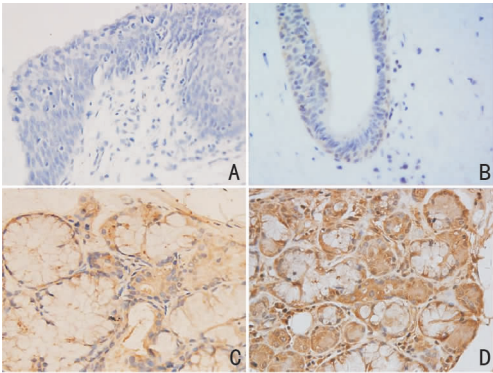


图 2 SEMA3D 在癌旁组织中的表达 (SP ×400) A;SEMA3D 在癌旁细胞呈阴性表达;B:. SEMA3D 在癌旁细胞呈低阳性表达;C;SEMA3D 在癌旁细胞呈中阳性表达;D:SEMA3D 在癌旁细胞呈高阳性表达

表 1 SEMA3D 不同表达强度在喉癌组织及癌旁组织中的比较 (例,%)

组织分类	例数	SEMA3D				阳性率
		-	+	++	+++	
喉癌组织	61	45	13	3		26.23
癌旁组织	61	16	25	20		73.77

表 2 61 例喉癌患者 SEMA3D 表达水平与临床特征的相关性分析 (例)

临床特征	例数	SEMA3D			χ^2	P
		阴性	低阳性	中高阳性		
性别					0.735	0.692
男	59	43	13	3		
女	2	2	0	0		
年龄(岁)					0.248	0.884
≤55	20	14	5	1		
>55	41	31	8	2		
饮酒史					0.900	0.638
是	52	39	11	2		
否	9	6	2	1		
吸烟史					2.160	0.340
是	42	31	10	1		
否	19	14	3	2		
临床分型					3.917	0.417
声门上型	18	12	5	1		
声门型	37	28	8	1		
声门下型	6	5	0	1		
分化程度					4.557	0.336
高分化	40	28	10	2		
中分化	16	14	2	0		
低分化	5	3	1	1		
临床分期					6.298	0.043 *
I、II 期	25	15	7	3		
III、IV 期	36	30	6	0		
颈部淋巴结转移					6.962	0.031 *
有	28	25	3	0		
无	33	20	10	3		

注: * P<0.05 为差异具有统计学意义。

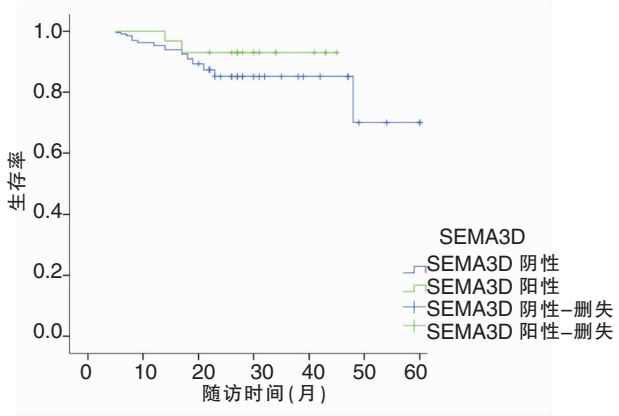


图 3 SEMA3D 表达患者 Kaplan-Meier 法生存曲线

表 3 单因素 Log-rank 分析影响喉癌患者的预后因素

临床特征	Log-rank	P
性别	1. 180	0. 277
年龄	2. 406	0. 121
吸烟史	8. 213	0. 004 *
饮酒史	3. 235	0. 072
临床分期	26. 469	<0. 001 *
临床分型	5. 559	0. 062
分化程度	3. 675	0. 159
颈部淋巴结转移	15. 664	<0. 001 *
SEMA3D 表达	18. 130	<0. 001 *

注: * P <0.05 为差异具有统计学意义。

表 4 Cox 回归模型分析影响喉癌患者的预后因素

临床特征	B	SE	Wald	P	Exp(B)	95% CI
吸烟史	0. 571	0. 179	10. 193	0. 001	0. 565	0. 398 ~ 0. 802
临床分期	0. 396	0. 147	7. 264	0. 007	0. 673	0. 504 ~ 0. 897
颈部淋巴结转移	0. 394	0. 140	7. 923	0. 005	1. 483	1. 127 ~ 1. 951
SEMA3D 表达	0. 632	0. 203	9. 654	0. 002	1. 881	1. 263 ~ 2. 803

3 讨论

喉癌的发生发展是一个多基因参与,多途径共同作用的过程,需要多种特异性蛋白的激活和失活,而这些蛋白的表达或空间结构的改变可能阻止喉癌的恶性生物学行为^[7]。SEMA3 家族蛋白的主要生物学功能与其关键结构域中 7 个 β 螺旋皱褶和一个结构相似的 α 整连蛋白 β 螺旋复合体有关,在多种恶性肿瘤中发挥重要作用^[2,8-9]。SEMA3 蛋白通过与 NRP1 受体结合,增加恶性肿瘤干细胞的不对称分裂,从而调节细胞周期,抑制肿瘤发展^[10]。SEMA3D 作为轴突导向因子家族中的一员,可通过抑制 p-cofilin 蛋白表达水平来破坏细胞骨架蛋白,从而抑制细胞轴突的生长和迁移,也可参与 Wnt/TCF 信号通路和 PI3K/Akt 信号通路促进神经嵴细胞的增殖或抑制静脉上皮细胞的运动和迁移^[11-12]。

有研究报道发现,SEMA3D 影响恶性肿瘤增殖、转移、凋亡、免疫应答和血管生成等恶性生物学行为,与 NRP、Plexin 受体蛋白的表达和 cAMP 信号通路、Ras 信号通路的激活有关^[13-15]。大量实验表明,SEMA3D 在胃癌^[16]、结直肠癌^[17]、神经母细胞瘤^[18]等肿瘤组织中的表达低于癌旁正常组织,其低表达与肿瘤细胞的侵袭、转移和预后密切相关,可通过与肿瘤组织中 NRP 和 Plexin 等受体蛋白结合,阻低血管生成因子的信号传导,发挥抗血管生成作用,从而促进肿瘤凋亡,抑制肿瘤的转移侵袭,且有望成为结直肠癌^[17]、乳腺癌^[19]和胃癌^[16]等肿瘤预后的分子标志物。然而,近年来 Foley 等^[14]的研究发现 SE-

MA3D 在 Annexin A2 介导肌腱蛋白 Tenascin C (TN-C) 促进胰腺导管癌浸润转移中发挥协同作用。因此,SEMA3D 在不同肿瘤的发生发展中,可能发挥着不同的作用,这种复杂而密切的关系使得 SEMA3D 在肿瘤的研究中备受关注。前期研究中我们发现下调喉癌细胞 USP7 的表达后,显著抑制了喉癌细胞的增殖、迁移能力,并促进了喉癌细胞的凋亡,同时引起的 SEMA3D 表达的显著增高。这意味着 SEMA3D 的高表达可能抑制喉癌的迁徙转移。因此本研究组采用免疫组化 SP 法对 SEMA3D 蛋白在喉癌组织中的表达情况以及与喉癌的临床病理特征和预后的相关性进行了进一步研究。

本实验通过免疫组化 SP 法发现 SEMA3D 的表达在癌旁正常组织中明显高于喉癌组织。结合患者临床病理参数进一步分析发现肿瘤组织中 SEMA3D 的表达与患者临床分期和颈部淋巴结转移有关,提示 SEMA3D 可能作为抑癌基因参与喉癌的侵袭转移,这与 Kigel 等^[19]在乳腺癌中的报道基本一致。Kaplan-Meier 法进行生存分析显示,SEMA3D 高表达的患者预后较好。将影响喉癌预后的危险因素进行 Log-rank 检验分析显示,SEMA3D 表达、吸烟、TNM 分期和颈部淋巴结转移与患者预后密切相关,进一步采用多因素 Cox 回归模型分析发现,SEMA3D 阴性表达可作为影响喉癌预后的独立危险因素,这一结果与目前 SEMA3D 在胃癌^[16]、结肠癌^[17]和胶质母细胞瘤^[20]中的研究结果一致。

综上所述,本研究通过免疫组化 SP 法发现 SEMA3D 在喉癌组织的表达低于癌旁正常组织,且 SEMA3D 在喉癌患者肿瘤组织中阴性表达,与患者生存期缩短有关。由此可推断,SEMA3D 蛋白可能在喉癌发生发展中发挥了重要作用,有望成为预测喉癌复发及预后的重要分子标志物及潜在治疗靶点。但本研究未对 SEMA3D 与 USP7 的具体关系和影响喉癌发生发展的具体机制进行分析,将在下一步研究中完善。

参考文献:

[1] Tang ZX, Gong JL, Wang YH, et al. Efficacy comparison between primary total laryngectomy and nonsurgical organ-preservation strategies in treatment of advanced stage laryngeal cancer: A meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97 (21): e10625.

[2] 蔚开慧. 先天性巨结肠患者 SEMA 3C/SEMA 3D 基因突变在肠神经系统中的作用机制研究[D]. 南宁:广西医科大学,

- 2017.
- [3] Takamatsu H, Kumanogoh A, Diverse roles for semaphorin-plexin signaling in the immune system[J]. Trends Immunol, 2012, 33(3): 127–135.
- [4] Sabag AD, Bode J, Fink D, et al. Semaphorin-3D and semaphorin-3E inhibit the development of tumors from glioblastoma cells implanted in the cortex of the brain[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42912.
- [5] Li K, Chen MK, Li LY, et al. The predictive value of semaphorins 3 expression in biopsies for biochemical recurrence of patients with low and intermediate-risk prostate cancer[J]. Neoplasma, 2013, 60(6): 683–689.
- [6] 周洁, 潘芳名, 王晶, 等. Zwint-1 蛋白在头颈部鳞状细胞癌中表达上调及其与临床特征的相关性[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2019, 25(5): 508–512.
- [7] Diaz MS, Tarrado CM, Miranda A, et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy[J]. Pharmacol Ther, 2013, 138(2): 255–271.
- [8] Shahrabi-Farahani S, Wang L, Zwaans BMM, et al. Neuropilin 1 expression correlates with differentiation status of epidermal cells and cutaneous squamous cell carcinomas[J]. Lab Invest, 2014, 94(7): 752–765.
- [9] Shahrabi-Farahani S, Gallottini M, Martins F, et al. Neuropilin 1 Receptor Is Up-Regulated in Dysplastic Epithelium and Oral Squamous Cell Carcinoma[J]. Am J Pathol, 2016, 186(4): 1055–1064.
- [10] Tominaga K, Minato H, Murayama T, et al. Semaphorin signaling via MICAL3 induces symmetric cell division to expand breast cancer stem-like cells[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2019, 116(2): 625–630.
- [11] Ahi EP, Richter F, Sefc KM. A gene expression study of ornamental fin shape in *Neolamprologus brichardi*, an African cichlid species[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17398.
- [12] Aghajanian H, Choi C, Ho VC, et al. Semaphorin 3d and semaphorin 3e direct endothelial motility through distinct molecular signaling pathways[J]. J Biol Chem, 2014, 289(26): 17971–17979.
- [13] Jurcak NR, Rucki AA, Muth S, et al. Axon Guidance Molecules Promote Perineural Invasion and Metastasis of Orthotopic Pancreatic Tumors in Mice[J]. Gastroenterology, 2019, 157(6): 838–850.
- [14] Foley K, Rucki AA, Xiao Q, et al. Semaphorin 3D autocrine signaling mediates the metastatic role of annexin A2 in pancreatic cancer[J]. Sci Signal, 2015, 8(388): ra77.
- [15] Yoshida E, Terao Y, Hayashi N, et al. Promoter-level transcriptome in primary lesions of endometrial cancer identified biomarkers associated with lymph node metastasis[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 14160.
- [16] 俞飞. 基因组调控区遗传变异与胃癌易感性的关联研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2018.
- [17] Wang Z, Ding M, Qian NY, et al. Decreased expression of semaphorin 3D is associated with genesis and development in colorectal cancer[J]. World J Surg Oncol, 2017, 15(1): 67.
- [18] Khan FH, Pandian V, Ramraj S, et al. Reorganization of metastatic miRNAs in the evolution of metastatic aggressive neuroblastoma cells[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 501.
- [19] Kigel B, Varshavsky A, Kessler O, et al. Successful inhibition of tumor development by specific class-3 semaphorins is associated with expression of appropriate semaphorin receptors by tumor cells[J]. PLoS One, 2008, 3(9): e3287.
- [20] Sabag AD, Bode J, Fink D, et al. Semaphorin-3D and semaphorin-3E inhibit the development of tumors from glioblastoma cells implanted in the cortex of the brain[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42912.

(收稿日期: 2019–10–19)

本文引用格式: 吴俊志, 李静佳, 赵锐, 等. SEMA3D 在喉癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2020, 26(4): 416–420. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202004014

Cite this article as: WU Junzhi, LI Jingjia, ZHAO Rui, et al. The expression of SEMA3D and its clinical significance in human laryngeal cancer[J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2020, 26(4): 416–420. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202004014