

SEMA3F、ATF4在喉癌组织中的表达及对术后复发转移的预测

黄金樵,陈秀芬,戴惠婷,潘志勇,胡伟群
(莆田学院附属医院耳鼻咽喉科,福建莆田 351100)

摘要: **目的** 探究神经轴突导向因子(SEMA3F)、转录激活因子4(ATF4)在喉癌组织中表达及对患者术后复发转移的预测价值。**方法** 选取2016年8月~2022年8月于莆田学院附属医院进行喉癌手术治疗的患者60例,将经病理学证实出现术后复发转移的37例患者分为复发转移组,其余未出现术后复发转移的23例患者分为未复发转移组。免疫组化法测定SEMA3F、ATF4蛋白阳性率;RT-PCR法检测SEMA3F、ATF4表达水平。分析SEMA3F、ATF4对喉癌患者术后复发转移的预测价值。**结果** 与非复发转移组对比,复发转移组患者喉癌组织中的SEMA3F蛋白阳性表达降低、ATF4蛋白阳性表达升高;SEMA3F mRNA相对表达量降低,ATF4 mRNA相对表达量升高($P<0.05$)。与未复发转移组相比,复发转移组癌胚抗原(CEA)、糖类抗原199(CA199)、糖类抗原125(CA125)表达水平降低($P<0.05$)。Logistic回归分析显示,CEA、CA199、CA125、SEMA3F、ATF4是喉癌患者术后复发转移的独立危险因素。ROC曲线显示,联合检测预测喉癌术后复发转移的诊断效能显著高于SEMA3F、ATF4单一检测。**结论** SEMA3F、ATF4是喉癌患者术后复发转移的风险预测因子,对喉癌术后复发转移具有较高的预测价值。

关键词: 神经轴突导向因子;转录激活因子4;喉癌;复发

中图分类号: R739.65

文献标志码: A

文章编号: 1004-6879(2024)05-0382-05

Expression of SEMA3F and ATF4 in Laryngeal Carcinoma and Prediction of Postoperative Recurrence and Metastasis

HUANG Jin-qiao, CHEN Xiu-fen, DAI Hui-ting, PAN Zhi-yong, HU Wei-qun

(Department of Otolaryngology, Putian University Affiliated Hospital, Putian, Fujian, 351100, China)

Abstract: **Objective** Exploration (SEMA3F), transcriptional activator 4 (ATF 4) expression in laryngeal cancer tissue and predictive value of postoperative recurrence and metastasis. **Methods** A total of 60 patients who were treated for laryngeal cancer in the Affiliated Hospital of Putian University from August 2016 to August 2022, 37 patients with pathologically confirmed postoperative recurrence and metastasis were divided into recurrence and metastasis group, and the other 23 patients without postoperative recurrence and metastasis were divided into no recurrence and metastasis group. The positive rates of SEMA3F and ATF 4 were determined by immunohistochemistry and SEMA3F and ATF 4 by RT-PCR. The predictive value of SEMA3F and ATF 4 for postoperative recurrence and metastasis in patients with laryngeal cancer was analyzed. **Results** Compared with the non-recurrent metastasis group, SEMA3F expression and ATF 4 expression decreased in laryngeal carcinoma tissue; SEMA3F mRNA expression decreased and ATF4 mRNA expression increased ($P<0.05$). Compared with the unmetastatic group, the expression levels of carcinoembryonic antigen (CEA), sugar antigen 199 (CA199), and sugar antigen 125 (CA125) were decreased in the metastatic group ($P<0.05$). Logistic Regression analysis showed that CEA, CA199, CA125, SEMA3F, and ATF 4 were independent risk factors for postoperative recurrence and metastasis in patients with laryngeal cancer. The ROC curve showed that the diagnostic efficacy of the combination test to predict recurrence and metastasis after laryngeal cancer was significantly higher than the single test of SEMA3F and ATF 4. **Conclusion** SEMA3F, ATF 4 is a risk predictor of postoperative recurrence and metastasis in laryngeal cancer patients, and it

has a higher application value in the diagnosis of recurrence and metastasis after laryngeal cancer surgery.

Key words: Semaphorin 3F; Transcriptional activator 4; Laryngeal cancer; Recrudescence

喉癌为临床头颈部常见恶性肿瘤疾病,疾病的发生是由机体内多基因、多条信号通路进行参与的一个复杂过程,受到环境及遗传因素相互作用的双重调节^[1-2]。临床对于喉癌常采用手术治疗,具有较好效果,但术后易出现复发转移^[3]。喉癌术后复发转移与多种危险因素相关,饮酒、吸烟及职业危险因素暴露等,多种危险因素产生共同作用^[4]。喉癌术后复发转移是临床面临的棘手问题,所以寻找临床对喉癌术后患者预后的指标异常重要^[5]。临床研究得出^[6-7],神经轴突导向因子(Nerve axon-directing factor,SEMA3F)、转录激活因子4(Transcriptional activator 4,ATF4)与喉癌患者术后复发转移之间可能具有紧密关联,临床关于SEMA3F、ATF4共同作用于喉癌患者术后复发转移的相关尚无。所以本文旨分析SEMA3F、ATF4在喉癌患者术后复发转移中的表达及意义。

1 材料与方法

1.1 材料

选取2016年8月~2022年8月于莆田学院附属医院进行喉癌手术治疗的患者60例,将经病理学证实出现术后复发转移的37例患者分为复发转移组,其余未出现术后复发转移的23例患者分为未复发转移组。年龄35~71岁,平均年龄(57.45±3.49)岁,临床分期:I+II期39例,III+IV期21例;中、高分化32例,低分化28例;淋巴结转移26例。

纳入标准:(1)符合中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会头颈外科组对喉癌术后患者的诊断标准^[8];(2)经影像学确诊;(3)术后经病理学检查证实转移复发;(4)首次患病;(5)患者及家属均知情同意。

排除标准:(1)为转移性喉癌;(2)既往存在放疗史;(3)合并其他恶性肿瘤疾病;(4)存在严重心脑血管疾病;(5)存在严重血液性及免疫性疾病;(6)依从性较差;(7)病例资料不齐全。

1.2 指标检测

1.2.1 SEMA3F、ATF4蛋白表达检测 采用免疫组化法测定SEMA3F、ATF4表达,将待检的颊粘膜上皮癌变组织、癌旁组织贴附于经多聚赖氨酸处理过的玻片上,石蜡

切片(切片厚度2 μm)脱蜡至水,并经10%的甲醛溶液进行固定,95%乙醇进行浸泡11 h,3% H₂O₂条件下避光孵育12 min,采用PBS进行3次洗涤,滴加复合物增强剂,并进行石蜡包埋,常温孵育5 min,自来水充分将PBS进行冲洗去除,滴加一抗(鼠抗人),5℃孵育过夜,次日PBS缓冲液洗涤3次,5 min/次,加入DAB显色5 min,根据颜色变化(棕色本底出现)终止反应,复染、梯度乙醇脱水、透明封片,使用电子显微镜(青岛菲优特检测有限公司,型号:JEM-2100)×400进行观察。

1.2.2 SEMA3F、ATF4免疫组化结果判定 由我院3名病理科相关高资历医师采用双盲法使用电子显微镜(青岛菲优特检测有限公司,型号:JEM-2100)×400下随机选取3个视野对SEMA3F、ATF4阳性表达情况进行观察。3者阳性表达的呈现情况均以细胞膜、细胞质出现黄色颗粒为标准。观察SEMA3F、ATF4的染色强度以及细胞染色的比例,进行阳性情况评定。阳性评分的标准参考相应文献^[7]。对于显色强度的计分涵盖了无显色、浅黄色、棕黄色、棕褐色,分别为0、1、2、3分。对于阳性细胞比例的积分涵盖了阳性细胞比例<10%、10%~30%、31%~60%、≥61%,分别计为0、1、2、3分。其中显色强度的积分和阳性细胞比例的积分的乘积为最终结果。而阴性则为0分,阳性均≥1分。

1.2.3 RT-PCR法检测SEMA3F、ATF4表达 手术治疗过程中切取喉癌组织。采用RT-PCR法测定SEMA3F、ATF4表达量,SEMA3F提取分离试剂盒(上海信裕生物科技有限公司)、ATF4提取分离试剂盒(上海沪震实业有限公司),提取组织内RNA,RTFQ-PCR试剂盒反转录反应,将cDNA,产物行PCR扩增。条件参数:预火98℃预变性10 s,取出降温至87℃,变性4 s,迅速降温至65℃,退火13 s,温度保持55℃,延伸42 s,42个循环,重复实验3次。内参GAPDH上游引物:5'-GTCAAGGCTGAGAACGGGAA-3',下游引物:5'-AAATGAGCCCCAGCCTTCTC-3';SEMA3F上游引物:5'-AACACAACCGACTACCGAATC-3',下游引物:

5'-GGCTGCCCAGTGTATAATGAG-3'。ATF4上游引物:5'-ATGACCGAAATGAGCTTCCTG-3',下游引物:5'-GCTGGAGAACCCATGAGGT-3'。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算SEMA3F、ATF4表达量。

1.2.4 电化学发光法检测CEA、CA199、CA125水平 选用德国罗氏公司生产的Elecsys 170电化学发光免疫分析仪检测CEA、CA199、CA125水平。

1.3 统计学处理

采用SPSS 25.0软件进行数据处理。计量资料采用Shapiro-Wilk检验判断,符合正态分布以($\bar{x}\pm s$)表示,组间

两两对比采用独立样本 t 检验,不符合正态分布以中位数[M(P25.P75)]表示,组间比较采用秩和检验,以率(%)表示计数资料采用 χ^2 检验。受试者特征曲线(Receiver operator characteristics curve,ROC)分析SEMA3F、ATF4对喉癌患者术后复发转移的预测价值, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组患者SEMA3F、ATF4蛋白表达对比

与非复发转移组对比,复发转移组患者喉癌组织中SEMA3F蛋白阳性表达降低、ATF4蛋白阳性表达升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表1 2组患者SEMA3F、ATF4蛋白表达对比($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	SEMA3F				ATF4			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
复发转移组	37	25(67.57)	7(18.92)	3(8.11)	2(5.41)	7(18.92)	19(51.35)	10(27.03)	2(5.41)
未复发转移组	23	10(43.48)	8(34.78)	4(17.39)	1(4.35)	12(52.17)	7(30.43)	3(13.04)	1(4.35)
<i>Z</i>				3.145				3.152	
<i>P</i>				0.005				<0.001	

2.2 2组癌组织中SEMA3F、ATF4相对表达量对比

与非复发转移组对比,复发转移组患者喉癌组织中的SEMA3F mRNA相对表达量降低,ATF4 mRNA相对表达量升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 2组癌组织中SEMA3F、ATF4相对表达量对比($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	SEMA3F mRNA	ATF4 mRNA
复发转移组	37	1.94±0.56	3.27±1.04
未复发转移组	23	3.11±1.01	1.98±0.63
<i>t</i>		5.778	5.359
<i>P</i>		<0.001	<0.001

2.3 2组喉癌患者术后复发转移的单因素分析

2组患者TNM分期、淋巴结转移、分化程度相比,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与未转移组相比,转移组CEA、CA199、CA125表达水平降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表3。

表3 2组喉癌患者术后复发转移的单因素分析($\bar{x}\pm s$)

因素		复发转移组 (<i>n</i> =37)	未复发转移组 (<i>n</i> =23)	$\chi^2/t/z$	<i>P</i>
年龄[岁, M(P25.P75)]		61(50.71)	64(52.73)	0.268	1.352
性别(男/女)		33/7	18/5	0.374	0.711
饮酒	是	27(72.97)	16(69.57)	0.081	0.776
	否	10(27.03)	7(30.4)		
吸烟	是	24(64.86)	15(65.22)	0.001	0.978
	否	13(35.14)	8(34.78)		
病灶部位	声门下	14(37.84)	8(34.78)	10.111	0.292
	声门	18(48.65)	14(60.87)		
	声门下	5(13.51)	1(4.35)		
TNM分期	I + II	17(45.95)	19(82.61)	5.083	0.024
	III + IV	20(54.05)	4(17.39)		
淋巴结转移	是	23(62.16)	3(13.04)	13.935	0.001
	否	14(37.84)	20(86.96)		
分化程度	中高分化	12(32.43)	20(86.96)	16.941	0.001
	低分化	25(67.57)	3(13.04)		
术后化疗	是	30(81.08)	21(91.30)	1.163	0.281
	否	7(18.92)	2(8.70)		
CEA[μg/L, M(P25.P75)]		1.34(0.82,2.17)	2.98(1.22,7.48)	4.375	<0.001
CA199[kU/L, M(P25.P75)]		3.21(2.21,7.88)	7.45(2.64,14.39)	6.197	<0.001
CA125[kU/L, M(P25.P75)]		8.52(5.71,10.46)	15.71(8.42,25.22)	7.497	<0.001

2.4 喉癌患者术后复发转移的多因素Logistic回归分析

以喉癌患者是否发生术后复发转移作为因变量(0=否,1=是),TNM分期、淋巴结转移、分化程度、CEA、CA199、CA125、SEMA3F、ATF4为自变量,建立Logistic回

归模型,校正其年龄等混杂因素,最终显示CEA、CA199、CA125、SEMA3F、ATF4是喉癌术后患者复发转移的独立危险因素,见表4。

表4 喉癌患者术后复发转移的多因素Logistic回归分析($\bar{x} \pm s$)

因素	β	SE	Wald χ^2	OR(95%CI)	P
TNM分期	1.341	0.513	5.594	9.878(8.598-11.158)	0.001
淋巴结转移	1.529	0.583	12.258	8.684(7.844-9.524)	0.001
分化程度	1.740	0.683	10.913	8.272(7.392-9.152)	0.001
CEA	1.378	0.137	6.231	1.426(1.212-1.723)	0.001
CA199	1.362	0.126	12.453	1.389(1.146-1.663)	0.001
CA125	0.977	0.164	5.275	1.565(1.212-1.995)	0.001
SEMA3F	1.628	0.624	9.890	7.402(6.502-8.302)	0.001
ATF4	1.529	0.583	12.258	8.684(7.844-9.524)	0.001

2.5 SEMA3F、ATF4对喉癌术后复发转移的预测价值分析

如表5、图1所示,与SEMA3F、ATF4单项诊断相比,联合检测对喉癌术后复发转移的诊断价值较高($P<0.05$)。

表5 SEMA3F、ATF4对喉癌患者术后复发转移的预测价值分析($\bar{x} \pm s$)

指标	AUC	敏感度(%)	特异度(%)	准确度(%)	P	95%CI	截断值
SEMA3F	0.705	70.27(26/37)	78.26(18/23)	73.33(44/60)	0.001	0.636-0.773	2.10
ATF4	0.734	81.08(30/37)	69.57(16/23)	76.67(46/60)	0.001	0.671-0.798	2.31
联合检测	0.891	94.59(35/37)	65.22(15/23)	83.33(50/60)	0.001	0.849-0.933	-

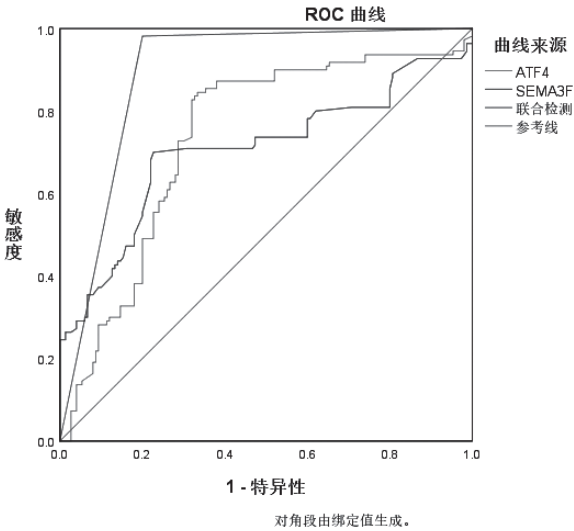


图1 各独立因素对喉癌术后复发转移的ROC曲线分析

3 讨论

SEMA3F存在于染色体3p21.3中,属Semaphorin家族分泌轴突指导分子,在机体神经元发育及轴突传导中发挥作用,还是大脑发育过程中的重要调节因子^[9]。SEMA3F除调节神经系统外,在肿瘤疾病中也起到重要

作用^[10]。研究发现^[11],SEMA3F在肿瘤疾病中均呈高表达,对肿瘤的淋巴转移及预后情况进行体现。临床上关于SEMA3F在喉癌组织中表达的相关研究较少,而在喉癌术后复发转移中暂无相关报道。本研究结果显示,喉癌组织中SEMA3F蛋白阳性表达在术后复发转移中低于未出现复发转移,SEMA3F mRNA相对表达量降低,复发转移组SEMA3F mRNA相对表达量降低。究其原因为,SEMA3F在喉癌中能调节肿瘤细胞数目,使肿瘤细胞增加,促进蛋白酶活性,降解癌细胞,抑制SEMA3F释放。降低SEMA3F表达,能对喉癌术后复发转移产生推动作用。研究显示^[12],在结直肠癌中,低表达SEMA3F淋巴结转移发生率高,得出SEMA3F与淋巴结转移之间存在紧密关联。本研究应用RT-PCR检测喉癌患者术后复发转移,肿瘤细胞中DNA研究结果提示喉癌患者术后复发转移及未复发转移均可表达SEMA3F,但术后发生复发转移患者中SEMA3F含量明显低于未出现术后复发转移患者,提示SEMA3F表达含量可用于评估喉癌患者术后复发转

移的发病风险。

ATF4通过增减谷氨酸转运蛋白表达量,能诱导肿瘤血管新生,为肿瘤细胞远端转移提供营养物质。研究显示^[13],ATF4蛋白,在喉癌组织中呈现上调,诱导肿瘤血管新生,以新生肿瘤血管为通道,通过血液循环进入临近相关组织及远处组织内,从而诱发转移^[14]。还有研究发现^[15],ATF4能激活信号转导转录激活因子3信号通路,抑制E-钙黏蛋白表达,促进肿瘤细胞转移。所以,在喉癌中,ATF4表达上调,抑制胞外基质形成,降低喉癌细胞及其他正常组织细胞间的黏附性,增强喉癌肿瘤细胞侵袭性^[16-17]。本研究结果显示,喉癌组织中ATF4阳性表达,在术后复发转移中显著升高,ATF4 mRNA相对表达量升高,复发转移组ATF4 mRNA相对表达量升高。分析其原因,可能是由于ATF4参与肿瘤血管新生,调节细胞黏附蛋白表达,促进残留癌细胞异常增殖和异常分化过程,造成术后出现复发转移情况。由此得出,ATF4或可能成为喉癌术后复发转移的预测指标。

综上所述,SEMA3F在喉癌术后复发转移中呈现低表达、ATF4在喉癌术后复发转移中均呈现高表达,可对喉癌术后复发转移的诊断、发生发展情况进行预测。

参考文献

- [1] Arboleda LPA, Neves AB, Kohler HF, et al. Overview of glottic laryngeal cancer treatment recommendation changes in the NCCN guidelines from 2011 to 2022[J]. Cancer Rep (Hoboken), 2023, 6(8): e1837.
- [2] Rodrigo JP, López-Álvarez F, Medina JE, et al. Treatment of the neck in residual/recurrent disease after chemoradiotherapy for advanced primary laryngeal cancer[J]. Eur J Surg Oncol, 2024, 50(7): 108389.
- [3] Campbell G, Glazer TA, Kimple RJ, et al. Advances in Organ Preservation for Laryngeal Cancer[J]. Curr Treat Options Oncol, 2022, 23(4): 594-608.
- [4] Mendenhall WM, Morris CG, Amdur RJ, et al. Curative-intent radiotherapy for glottic carcinoma in situ[J]. Head Neck, 2020, 42(12): 3515-3517.
- [5] Hou Y, Yang X, Miao S, et al. Interactive regulation of laryngeal cancer and neuroscience[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021, 1876(1): 188580.
- [6] Wang C, Song D, Huang Q, et al. Advances in SEMA3F regulation of clinically high-incidence cancers[J]. Cancer Biomark, 2023, 38(2): 131-142.
- [7] He F, Zhang P, Liu J, et al. ATF4 suppresses hepatocarcinogenesis by inducing SLC7A11 (xCT) to block stress-related ferroptosis[J]. J Hepatol, 2023, 79(2): 362-377.
- [8] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会头颈外科组,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会头颈学组,李晓明. 喉癌外科手术及综合治疗专家共识[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 49(8): 620-626.
- [9] Knipper K, Lyu SI, Jung JO, et al. Semaphorin 3F (SEMA3F) influences patient survival in esophageal adenocarcinoma[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 20589.
- [10] Kotan LD, Temier G, Cakir AD, et al. Loss-of-function variants in SEMA3F and PLXNA3 encoding semaphorin-3F and its receptor plexin-A3 respectively cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism[J]. Genet Med, 2021, 23(6): 1008-1016.
- [11] 郝芳,单春光,贾巧静,等. 喉癌组织中SEMA3F与NRP2的表达及临床价值[J]. 西部医学, 2022, 34(11): 1641-1645.
- [12] 王勇,宋林繁,杨光,等. 直肠癌患者肿瘤抑制因子SEMA3F、CYLD与miR-454表达水平及其相关性[J]. 中国现代普通外科进展, 2018, 21(2): 106-109.
- [13] 朱小娟,时振国,阮豪杰,等. ATF4在Siewert II型食管胃结合部腺癌中的表达及与长期随访结果的关系[J]. 广东医学, 2023, 44(1): 69-73.
- [14] Hao L, Zhong W, Dong H, et al. ATF4 activation promotes hepatic mitochondrial dysfunction by repressing NRF1-TFAM signalling in alcoholic steatohepatitis[J]. Gut, 2021, 70(10): 1933-1945.
- [15] 刘婉,晋颖,冯晓洁,等. 茯苓酸对结肠癌细胞增殖凋亡、迁移侵袭及PERK/ATF4信号通路蛋白表达的影响[J]. 山东医药, 2023, 63(6): 38-42.
- [16] 要兆旭,彭丽娜,马海斌. 喉癌组织中ATF4、RPL41表达变化及意义[J]. 山东医药, 2021, 61(31): 68-70.
- [17] 杨雪,冯志星,彭丽娜,等. 喉癌组织中转录活性因子4和血管内皮生长因子的表达变化及其意义[J]. 山东医药, 2021, 61(27): 27-31.

(收稿日期:2024-02-18)