

本文引文格式:石凤,王俊利,董明右,等. SEMA4D与头颈部鳞状细胞癌发生发展的生物信息学研究[J]. 右江民族医学院学报, 2021, 43(3): 328-332.

【论著与临床报道】

SEMA4D与头颈部鳞状细胞癌发生发展的生物信息学研究

石凤¹, 王俊利², 董明右², 庞晓霞¹, 李兰¹, 李光景¹, 杨凤莲³

(1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院医学检验学院, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院药学院, 广西 百色 533000)

摘要:目的 通过生物信息学分析 SEMA4D 与头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 发生发展的相关性。**方法** 从癌症基因组图谱数据库(TCGA)中下载 HNSCC 相关临床数据。通过 Wilcoxon 秩和检验分析 SEMA4D 在 HNSCC 及其临床特征中的表达水平, 采用 Spearman 检验计算 SEMA4D 表达水平与 HNSCC 肿瘤突变负荷(TMB)和免疫浸润细胞的相关性, 采用 Kaplan-Meier 法计算 SEMA4D 对 HNSCC 预后的影响。**结果** SEMA4D 在 HNSCC 中的表达水平显著降低, 与肿瘤免疫细胞得分和免疫浸润细胞相关, 高表达 SEMA4D 的 HNSCC 患者预后较好。**结论** 生物信息学研究发现 SEMA4D 降低 HNSCC 的发病风险, 提高患者的预后水平。

关键词: 头颈部鳞状细胞癌; SEMA4D; 免疫浸润细胞; 生物信息学

中图分类号: R739.91

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2021)03-0328-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.03.007

Bioinformatic study of the correlation between SEMA4D and the development of head and neck squamous cell carcinoma

Shi Feng¹, Wang Junli², Dong Mingyou², Pang Xiaoxia¹, Li Lan¹, Li Guangjing¹, Yang Fenglian³

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

2. School of Medical Laboratory, Youjiang Medical University for Nationalities,

Baise 533000, Guangxi, China; 3. School of Pharmacy, Youjiang Medical

University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To analyze the correlation between SEMA4D and the occurrence, development of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) by bioinformatic study. **Methods** Clinical data related to HNSCC were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA). The expression of SEMA4D in HNSCC and its clinical characteristics was analyzed by Wilcoxon rank sum test. Spearman test was conducted to calculate the correlation between the expression of SEMA4D and HNSCC tumor mutation burden (TMB) as well as immune infiltrating cells. Kaplan-Meier method was used to calculate the effect of SEMA4D on the prognosis of HNSCC. **Results** The expression of SEMA4D in HNSCC significantly decreased, which was related to the score of tumor immune cell and immune infiltrating cells. HNSCC patients with high expression of SEMA4D had a better prognosis. **Conclusion** Bioinformatic analysis reveals that SEMA4D reduces the risk of HNSCC and improves the prognosis of patients.

Key words: head and neck squamous cell carcinoma; SEMA4D; immune infiltrating cells; bioinformatic

基金项目: 国家自然科学基金项目(82060293); 2020年右江民族医学院硕士研究生创新计划项目(YXCXJH2020006)

第一作者简介: 石凤(1995—), 女, 在读硕士研究生, 初级技师, 研究方向: 肿瘤的分子生物学研究, E-mail: 1763770474@qq.com

通讯作者简介: 杨凤莲(1980—), 女, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 药物相关的教学改革及中药抗肿瘤活性, E-mail: 396107666@qq.com

头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)是一种常见的头颈部恶性肿瘤,包括口腔肿瘤、口咽肿瘤、喉部肿瘤和鼻咽癌,每年约有 700 000 新增病例数^[1]。HNSCC 的早期临床症状不明显,大多数发现时已进展为中晚期,常累及淋巴结转移,HNSCC 的预后较差,晚期治疗的常规手段包括手术、放化疗等^[2],对患者的身心健康产生很大的影响。轴突导向蛋白 4D(semaphorin 4D, SEMA4D)属于信号素家族成员第Ⅳ类,是一种跨膜糖蛋白,大小为 150 kDa。SEMA4D 包含 SEMA 结构域,半胱氨酸富集区、免疫球蛋白结构域、跨膜区和氨基酸末端信号结构域。SEMA4D 存在两个受体 CD72 和 PlexinB1,配体与受体相结合,通过信号转导通路参与神经系统的调节、免疫细胞的活化、肿瘤新生血管的形成及促进肿瘤的生长、侵袭和迁移能力^[3]。近年来,越来越多的研究表明 SEMA4D 在前列腺癌、乳腺癌和结直肠癌中高表达^[4]。Zhang C 等^[5]研究发现 SEMA4D 通过促进 HNSCC 的上皮-间质细胞转化,进而促进 HNSCC 的转移。HNSCC 是一种复杂的头颈部肿瘤,然而,SEMA4D 在 HNSCC 中的相关性研究较少且其具体作用机制仍需进一步阐明,因此,本研究将通过来自于肿瘤基因组图谱(The cancer genome atlas, TCGA)数据库进行分析 SEMA4D 在泛癌中的表达、SEMA4D 与 HNSCC 的免疫细胞浸润情况以及对 HNSCC 患者的生存期进行相关性分析。

1 材料与方法

1.1 数据获取 从 UCSC Xena 官网(<https://xena.ucsc.edu/>)提取 HNSCC 等 33 个肿瘤的 GDC TCGA 数据。所有的研究数据来源于 TCGA 公共数据库,该数据库数据对外开放,因此,不需要相关医学伦理委员会批准。

1.2 SEMA4D 与 HNSCC 临床特性的相关性 通过 UALCAN(<http://ualcan.path.uab.edu/>)在线数据库分析 SEMA4D 表达水平与 HNSCC 患者的肿瘤分级、淋巴结转移和 HPV16 感染情况的相关性。

1.3 SEMA4D 与 HNSCC 免疫浸润细胞的相关性 输入癌症的基因转录组数据,通过 R 语言 3.6.0 的“estimate”包对 HNSCC 转录组数据进行免疫细胞得分,分析 SEMA4D 与 HNSCC 患者的免疫细胞得分及免疫浸润细胞[CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、调节性 T 细胞(Treg)、自然杀伤细胞、中性粒细胞和巨噬细胞]的相关性。

1.4 Kaplan-Meier 法分析 HNSCC 患者的生存分析 通过 SEMA4D 表达水平的中位值将 HNSCC 患者分为两组,分别为高表达 SEMA4D 组和低表达 SEMA4D 组。采用 Kaplan-Meier 分析 SEMA4D 表达水

平与 HNSCC 患者总体生存期(患者从确诊为 HNSCC 开始至患者因任何原因导致死亡的时间)的关系。

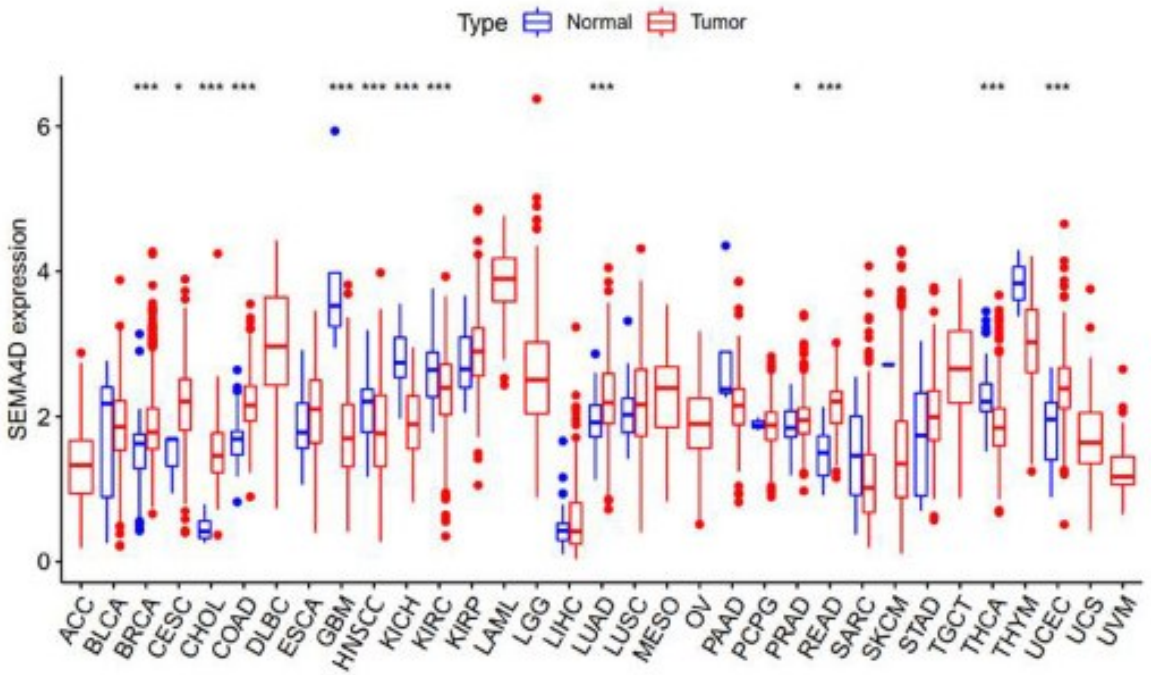
1.5 统计学方法 通过 Perl 软件对 TCGA 来源的肿瘤转录组数据的基因编号转化,通过 Wilcoxon 检验分析 SEMA4D 表达水平与 HNSCC 患者的肿瘤分级、淋巴结转移和 HPV16 感染是否有关;通过 Spearman 相关性检验计算 SEMA4D 表达水平与 HNSCC 免疫细胞得分和免疫浸润细胞的相关性;通过 Kaplan-Meier 法分析 SEMA4D 表达水平与 HNSCC 患者总体生存期是否有关,本研究检验结果均通过 R 语言 3.6.0 软件分析计算所得。 $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SEMA4D 在肿瘤组织中的表达 将下载的 GDC TCGA 转录组数据,通过 Perl 命令提取所需要的输入文件,包括基因名称、SEMA4D 在肿瘤组织中的表达水平、组织类型和肿瘤类型。通过 R 语言 3.6.0 “ggpubr”包对 SEMA4D 在肿瘤组织和正常组织中的表达绘制箱线图,结果如图 1 所示,SEMA4D 在 HNSCC 中的表达水平相对于正常组织降低,差异具有统计学意义($P < 0.001$)。

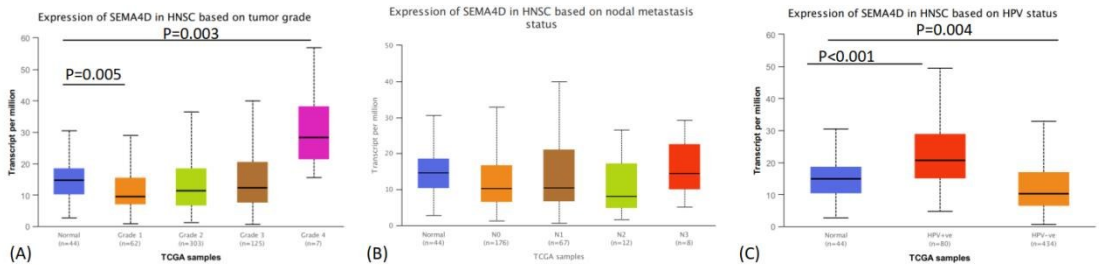
2.2 SEMA4D 与 HNSCC 临床特征的分层分析 以上结果显示,SEMA4D 在 HNSCC 中的表达相对于正常组织显著降低,为了进一步探讨 SEMA4D 在 HNSCC 亚组中的相对表达信息,本研究通过 UALCAN 在线网站对 SEMA4D 表达水平与 HNSCC 临床特征的相关性进行分层分析。研究结果显示:SEMA4D 在肿瘤分级 I 级中的表达水平相对于正常组显著降低($P = 0.005$),而在肿瘤分级 IV 中的表达水平相对于正常组显著升高($P = 0.003$)。由于肿瘤分级 IV 的样本量仅为 7 例,因此,平均表达水平升高具有偏倚性(见图 2A)。此外,SEMA4D 在 HPV16 感染患者中的表达水平升高,而在 HPV16 阴性患者中的表达水平降低。然而,SEMA4D 与 HNSCC 患者的淋巴结转移无关,见图 2B、图 2C。

2.3 SEMA4D 与 HNSCC 的 TMB 和 MSI 肿瘤突变负荷(tumor mutation burden, TMB)和微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)是多种肿瘤的有效预后标志物和免疫治疗反应指标。通过分析基因在肿瘤中与 TMB 和 MSI 的相关性,以探讨基因活性与肿瘤突变的关系。通过 Spearman 对 SEMA4D 与 HNSCC 进行 TMB 和 MSI 分析,研究发现 SEMA4D 与 HNSCC 的 TMB 和 MSI 不具有统计学意义,表明 SEMA4D 与 HNSCC 突变可能不具有相关性,见图 3。



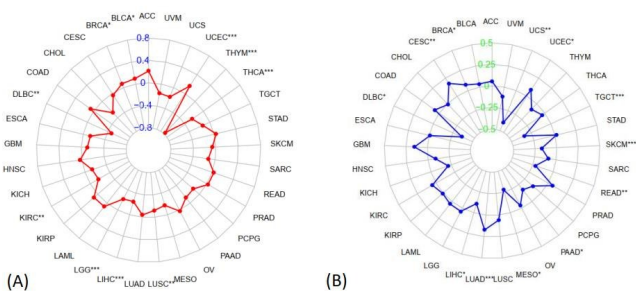
注：蓝色：SEMA4D 在正常组织中的表达量；红色：SEMA4D 在肿瘤组织中的表达量。
* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$ 。

图 1 SEMA4D 在肿瘤组织中的表达



注：A:SEMA4D 与 HNSCC 患者肿瘤分级的相关性分析；B:SEMA4D 与 HNSCC 患者淋巴结转移的相关性分析；C:SEMA4D 与 HNSCC 患者 HPV16 感染状态的相关性分析。

图 2 SEMA4D 在 HNSCC 亚组中的表达水平



注：A: TMB; B: MSI。

图 3 SEMA4D 与泛癌 TMB 和 MSI 的相关性

2.4 SEMA4D 与免疫细胞浸润 通过 R 语言 3.6.0 “estimate”包计算 HNSCC 的免疫细胞得分,分析其与

SEMA4D 表达水平的相关性。研究发现:SEMA4D 表达水平与 HNSCC 免疫细胞得分呈正相关,相关系数为 0.37,见图 4。进一步通过 R 语言 3.6.0 的 Spearman 相关性检验对 SEMA4D 表达水平与 HNSCC 免疫浸润细胞进行分析。研究发现 SEMA4D 表达水平与 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞和调节性 T 细胞呈正相关,而与自然杀伤细胞、中性粒细胞和巨噬细胞呈负相关,见图 5。

2.5 SEMA4D 与 HNSCC 患者生存期的相关性分析

将 SEMA4D 在不同肿瘤中的表达水平根据均值为两组,分别为 SEMA4D 高表达组和 SEMA4D 低表达组,采用 Kaplan-Meier 分析 SEMA4D 表达水平与 HNSCC 患者总体生存期的关系。结果显示:SE-

MA4D 高表达增加 HNSCC 患者的总体生存期 ($P = 0.013$), 见图 6。

3 讨论

SEMA4D, 也被称之为 CD100, 是信号素超家族的 SEMA 成员, 最初发现于免疫细胞。SEMA4D 在静息 T 细胞中高表达, 在静息 B 细胞和抗原提呈细胞中低表达。研究发现, SEMA4D 通过与受体 CD72 结合, 参与免疫系统调节过程, 促进 B 细胞和抗原提呈细胞的激活和成熟, 抑制单核细胞的迁移能力。然而, SEMA4D 与受体 Plexin-B1 结合, 参与神经系统调节, 调节肿瘤相关巨噬细胞, 促进肿瘤新生血管的形成, 为肿瘤细胞的生长提供营养物质, 进而促进肿瘤细胞的生长、侵袭和迁移^[6]。血管内皮生长因子 (VEGF) 在血管形成的生理和病理状态下都发挥着至关重要的作用, 促进血管内皮细胞的生长和增殖, 抑制血管内皮细胞的凋亡, 维持血管的渗透脆性。Chen Y 等^[7]研究发现 SEMA4D 与 VEGF 表达水平呈正相关, 并协同促进卵巢癌的血管形成。HNSCC 排列肿瘤第六位, 由于其肿瘤位置隐蔽, 发病初期不易察觉, 转移性高等特点, 使 HNSCC 患者的生存率不超过 50%^[8]。既往研究表明^[5], 上皮-间质细胞转换是肿瘤发生转移的重要标志, CD100-Plexin-B1 通过激活 Vav1-*rac1*/RhoAPAK1 通路促进 HNSCC 上皮-间质细胞转换, 导致肿瘤发生转移。另一项研究发现^[9], SEMA4D 调节成骨细胞中核因子 κ B 配体 (RANKL) 受体, 与胰岛素样生长因子-I (IGF-I) 正向调节, 促进 HNSCC 肿瘤的破骨形成和骨转移。然而, SEMA4D 作为一种免疫相关因子, 参与免疫系统的调节, SEMA4D 是否通过促进肿瘤免疫逃逸进而导致 HNSCC 的发生, 以及 SEMA4D 与 HNSCC 患者的预后仍需进一步阐明。

本研究通过生物信息学研究发现 SEMA4D 在膀胱移行细胞癌 (BRCA)、宫颈癌 (CESC)、胆管癌 (CHOL)、结肠癌 (COAD)、肺腺癌 (LUAD)、前列腺癌 (PRAD)、直肠癌 (READ)、子宫内膜癌 (UCEC) 等肿瘤中高表达, 然而在胶质母细胞瘤 (GBM)、头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC)、肾细胞癌 (KICH)、肾透明细胞癌 (KIRC) 和甲状腺癌 (THCA) 中低表达。该研究结果与 Zhang C 等^[5]和 Takada H 等^[9]的研究结论相反。通过 UALCAN 在线数据库进一步分析 SEMA4D 与 HNSCC 患者的肿瘤分期、淋巴结转移和 HPV16 感染情况的相关性, 研究发现 SEMA4D 表达水平与肿瘤分级呈负相关, 并且降低 HPV16 阴性 HNSCC 患者中的表达水平, 而与肿瘤淋巴结转移不具有相关性。在发达国家, HNSCC 的发病率逐渐下降, 然而, 由 HPV 感染的 HNSCC 患者逐渐增加, 主要类型为 HPV16 (70.7%), 其感染后的机体清除率最低^[10]。TMB 和 MSI 有效地反映了肿瘤的预后生物标志物和治疗指标, 提示基因活性与肿瘤突变相关性。本研究未发现

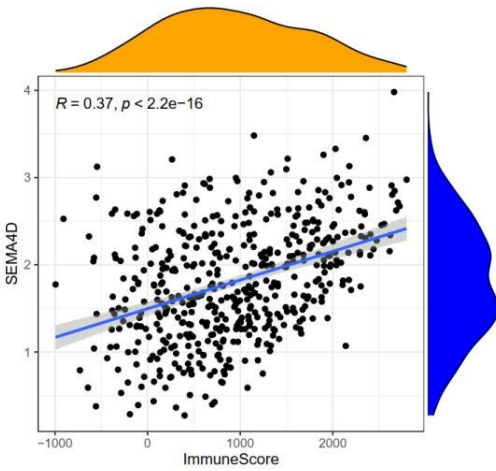
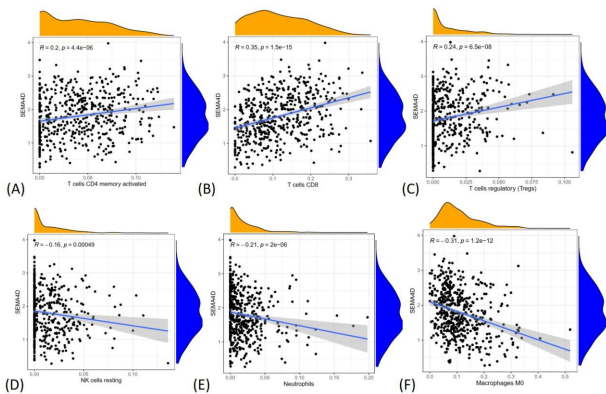


图 4 SEMA4D 与 HNSCC 免疫细胞得分的相关性



注: A: CD4⁺ T 细胞; B: CD8⁺ T 细胞; C: 调节性 T 细胞 (Treg); D: 自然杀伤细胞; E: 中性粒细胞; F: 巨噬细胞。

图 5 SEMA4D 与免疫浸润细胞的相关性

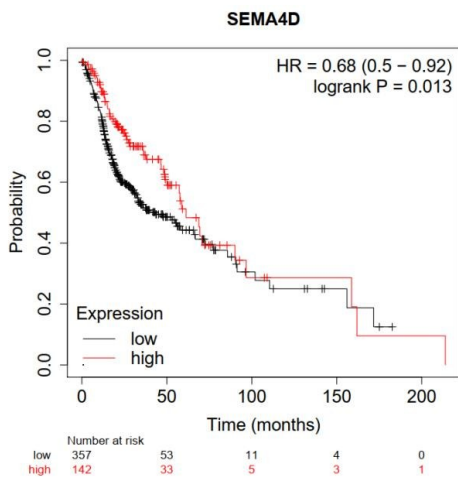


图 6 SEMA4D 与 HNSCC 的总体生存期相关性

SEMA4D 与 HNSCC 的 TMB 和 MSI 有关。SEMA4D 作为一种免疫相关性细胞因子,来源于免疫细胞,参与免疫细胞的激活和活化,通过分析 SEMA4D 与免疫细胞得分和肿瘤免疫浸润细胞的相关性,研究发现 SEMA4D 与 HNSCC 的免疫细胞得分呈正相关。并与 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞和调节性 T 细胞呈正相关,而与自然杀伤细胞、中性粒细胞和巨噬细胞呈负相关。CD8⁺Treg 细胞和 CD4⁺Treg 细胞参与机体免疫抑制能力,维持机体免疫稳态、免疫耐受和抗抑制免疫排斥反应。然而,在肿瘤中,研究发现,CD8⁺T/Treg 细胞比例更有效判断机体免疫抑制能力,其比例增加促进肿瘤细胞发生免疫逃逸,进而引起肿瘤的发生^[11-12]。因此,SEMA4D 在 HNSCC 中的作用机制,是否与 CD8⁺Treg 细胞和 CD4⁺Treg 细胞有关,仍需深入阐明。进一步对 SEM4D 与 HNSCC 的生存期进行分析,研究结果显示,SEMA4D 高表达患者的总体生存期较好。

综上所述,本研究发现 SEMA4D 在 HNSCC 患者和肿瘤分级为 I 级患者中的表达水平显著降低,并与免疫细胞得分和肿瘤免疫浸润细胞相关,其表达水平越低,预后越差。该生物信息学研究表明 SEMA4D 在 HNSCC 中为保护基因,与其他研究结论存在差异。可能存在以下几点因素:第一,该研究群体均来自于 TCGA 数据库,可能存在基因种族人群差异,造成研究结论不一致。第二,该研究人群来源区域未知,可能存在样本选择偏倚以及环境因素影响。本文初步探讨 SEMA4D 在 HNSCC 免疫浸润细胞的相关性,SEMA4D 是否直接影响 CD8⁺Treg 细胞和 CD4⁺Treg 细胞的表达水平,仍需进一步深入研究。

参考文献;

[1] Cohen EEW, Bell RB, Bifulco CB, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC)[J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1):184-215.

- [2] Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 52(2):228-240.
- [3] 孙博,李乐平,王金申. 轴突导向蛋白 4D 在肿瘤发病中的作用及对结直肠癌的意义[J]. *中国现代普通外科进展*, 2020, 23(2):126-129.
- [4] Yang Y, Wang J, Li H, et al. Association between prognosis and SEMA4D/Plexin-B1 expression in various malignancies: A meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(7):e13298-13311.
- [5] Zhang C, Qiao HJ, Guo WN, et al. CD100-plexin-B1 induces epithelial-mesenchymal transition of head and neck squamous cell carcinoma and promotes metastasis [J]. *Cancer Lett*, 2019, 455:1-13.
- [6] Chng ES, Kumanogoh A. Roles of Sema4D and Plexin-B1 in tumor progression[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9:251-260.
- [7] Chen Y, Zhang L, Liu WX, et al. VEGF and SEMA4D have synergistic effects on the promotion of angiogenesis in epithelial ovarian cancer[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2018, 23:2-14.
- [8] 党瑶,皇甫辉,秦艺骁,等. 头颈部鳞状细胞癌转移机制及其影响因素研究进展[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2021, 35(1):78-82.
- [9] Takada H, Ibaragi S, Eguchi T, et al. Semaphorin 4D promotes bone invasion in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(2):625-632.
- [10] Tumban E. A current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers[J]. *Viruses*, 2019, 11(10):922-941.
- [11] Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity[J]. *Int Immunol*, 2016, 28(8):401-409.
- [12] Flippe L, Bézie S, Anegón I, et al. Future prospects for CD8⁺ regulatory T cells in immune tolerance[J]. *Immunol Rev*, 2019, 292(1):209-224.

收稿日期:2021-04-04;修回日期:2021-04-12