

· 临床论著 ·

基于公共数据库分析肿瘤坏死因子受体超家族成员-4 在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义

饶兴旺, 朱凯铨, 陈帅男, 施丽彩, 李贺, 林刃舆
温州医科大学附属第一医院耳鼻喉科, 浙江 温州 325000

摘要: **目的** 通过多个数据库资料结合临床样本分析喉鳞状细胞癌(鳞癌)患者中肿瘤坏死因子受体超家族成员(TNFRSF)4 表达水平的变化,研究 TNFRSF4 在喉鳞癌发生发展中的作用。**方法** 根据高通量基因表达(GEO)数据库和癌症基因组图谱(TCGA)数据库转录组表达谱数据筛选出差异表达的基因,结合基因表达谱数据动态分析(GEPIA)数据库对差异基因 TNFRSF4 进行表达水平预测和生存分析;同时通过 3 例患者的喉鳞癌组织与癌旁组织标本进行 qRT-PCR 和 Western blot 验证,基于 TCGA 的临床数据绘制 K-M 生存曲线图并进行 Cox 回归分析。采用基因集富集分析探究与 TNFRSF4 在喉鳞癌中作用有关的信号通路。**结果** 数据库和临床样本中,喉鳞癌组中 TNFRSF4 的表达高于正常组($P < 0.05$),且 TNFRSF4 高表达组的生存率高于 TNFRSF4 低表达组($P < 0.01$)。多因素的 Cox 回归分析显示,TNFRSF4 表达水平($HR: 0.430, 95\% CI: 0.229 \sim 0.806, P = 0.009$)、性别($HR: 0.424, 95\% CI: 0.204 \sim 0.882, P = 0.022$)、淋巴结分期($HR: 2.010, 95\% CI: 1.055 \sim 3.831, P = 0.034$)和远处转移($HR: 3.706, 95\% CI: 1.152 \sim 11.922, P = 0.028$)四个因素共同对患者的总生存时间产生影响。基因集富集分析的结果显示,与 TNFRSF4 表达最显著相关的信号通路有细胞黏附分子、JAK-STAT 信号通路、T 细胞受体信号通路、B 细胞受体信号通路、原发性免疫缺陷和自身免疫性甲状腺疾病。**结论** TNFRSF4 高表达可能是喉鳞癌患者预后良好的生物标志物。

关键词: 喉鳞状细胞癌; 肿瘤坏死因子受体超家族成员-4; 癌症基因组图谱数据库; 高通量基因表达数据库; 基因表达谱数据动态分析数据库; 预后

中图分类号: R739.65 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2024)01-0100-05

Expression and clinical significance of tumor necrosis factor receptor superfamily 4 in laryngeal squamous cell carcinoma

RAO Xingwang, ZHU Kaiquan, CHEN Shuainan, SHI Licai, LI He, LIN Renyu

Department of Otolaryngology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China

Abstract: **Objective** To analyze the changes in tumor necrosis factor receptor superfamily (TNFRSF) 4 expression levels in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) patients through multiple database data combined with clinical samples, and to study the role of TNFRSF4 in the occurrence and development of LSCC. **Methods** Based on Gene Expression Omnibus (GEO) database and The Cancer Genome Atlas (TCGA) database, the differentially expressed gene was screened out. The expression level prediction and survival analysis of TNFRSF4 were performed using Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) database. Western blot and qRT-PCR were performed on LSCC and adjacent tissue samples from three patients. K-M curve was drawn based on TCGA clinical data, and Cox regression analysis was performed. Finally, gene set enrichment analysis was performed to explore signaling pathways related to the role of TNFRSF4 in LSCC. **Results** In the database and clinical samples, the expression of TNFRSF4 in the LSCC group was higher than that in the normal group ($P < 0.05$), and the survival rate of the high TNFRSF4 expression group was higher than that of the low TNFRSF4 expression group ($P < 0.01$). Multivariate Cox regression analysis showed that the expression level of TNFRSF4 ($HR: 0.430, 95\% CI: 0.229 \sim 0.806, P = 0.009$), gender ($HR:$

0.424, 95% CI: 0.204–0.882, $P=0.022$), lymph node staging ($HR: 2.010$, 95% CI: 1.055–3.831, $P=0.034$) and distant metastasis ($HR: 3.706$, 95% CI: 1.152–11.922, $P=0.028$) collectively affect the overall survival time of patients. The results of gene set enrichment analysis showed that the most significantly correlated signaling pathways with TNFRSF4 expression included cell adhesion molecule, JAK-STAT signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, primary immunodeficiency, and autoimmune thyroid disease.

Conclusion High expression of TNFRSF4 may be a biomarker for good prognosis of patients with LSCC.

Keywords: Laryngeal squamous cell carcinoma; Tumor necrosis factor receptor superfamily 4; The Cancer Genome Atlas database; Gene Expression Omnibus database; Gene Expression Profiling Interactive Analysis database; Prognosis

Fund program: Wenzhou Science and Technology Bureau Project (Y20220853)

喉癌是头颈部最常见的原发性恶性肿瘤^[1]。喉鳞状细胞癌(鳞癌)是最常见的组织学亚型,占95%以上^[2]。由于解剖结构的特殊性,喉癌患者术后往往会出现发音和呼吸功能受损,导致生活质量低下^[3]。传统的标准治疗方案以多学科治疗为主,包括手术、化疗、放疗或两者结合,但预后仍不尽如人意^[4]。因此,阐明喉癌发生发展的分子机制对改善喉癌患者的预后和治疗效果具有重要意义。

肿瘤坏死因子受体超家族(tumor necrosis factor receptor superfamily, TNFRSF)成员-4是一种能够使Treg细胞失活并促进CD8⁺T细胞分化和扩增的关键分子^[5-6]。许多研究表明,TNFRSF4在肿瘤的发生和进展中起关键作用^[7-9]。TNFRSF4表达阳性的T细胞能够降低肿瘤免疫微环境中抑制因素的水平,且能有效抑制肿瘤侵袭和转移^[10]。约50%的原发性结肠癌中存在TNFRSF4高表达的淋巴细胞,且TNFRSF4表达阳性的淋巴细胞越多,患者总体生存时间越长^[8]。但是TNFRSF4和喉鳞癌之间的关系国内外的研究较少。本研究利用多个数据库的数据及3例临床喉鳞癌及癌旁组织标本进行验证,探讨TNFRSF4在喉鳞癌患者预后中的作用及其潜在的机制。

1 材料与方法

1.1 样本收集 收集2022年1月至12月温州医科大学附属第一医院活检并且确诊的喉鳞癌患者3例。术中取肿瘤组织及癌旁组织,离体20 min内置于液氮中保存,随后于-80℃冰箱中保存备用。本研究经温州医科大学附属第一医院伦理委员会批准,审批号:伦审字(科)[2022]53号。本研究所有患者均已签署知情同意书。

1.2 数据库数据下载 数据来自高通量基因表达(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)和癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库(<https://www.cancer.gov/>),GEO数据来自GSE51985和GSE59102,总计包

括38个喉鳞癌数据和23个正常对照组数据。从TCGA数据库中共获得12个正常样本和111个喉鳞癌样本,同时,还提取了性别、年龄、肿瘤(T)分期和生存时间等临床特征数据。

1.3 基因表达谱数据动态分析(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA)数据库验证和统计分析 根据TNFRSF4的中位数表达值将肿瘤样本分为两组(TNFRSF4高表达和TNFRSF2低表达)。采用Kaplan-Meier法和log-rank检验对TNFRSF4进行生存分析。生存分析结果在GEPIA数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)中进行验证,该数据库是一个新开放的交互式网络服务器,用于癌症和正常基因表达谱分析。

1.4 qRT-PCR检测 使用TRIzol试剂(Thermo, 15596026)提取3例患者喉鳞癌组织及癌旁组织标本中的RNA;使用反转录试剂盒(诺唯赞, R211-01/02)生成cDNA;应用Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix(诺唯赞, Q712),于荧光定量PCR仪中进行扩增。反应条件设定:95℃ 5 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 反应40个循环。以GAPDH作为内部参考基因,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算TNFRSF4相对表达量。TNFRSF4引物为: Forward Primer 5'-CTA CAA GCC TGG AGT TGA CTG-3', Reverse Primer 5'-AGA TTG CGT CCG AGC TAT TG-3'; GAPDH引物为: Forward Primer 5'-GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT-3', Reverse Primer 5'-GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG-3'。

1.5 Western blot验证TNFRSF4的表达水平 将3组标本中提取的总蛋白质适量加样至聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。然后将其转移到PVDF膜上,Western转移缓冲液1×(20%甲醇稀释),恒定电压(120 V, 1 h)。在5%脱脂牛奶中加入0.1% TBST,阻断PVDF 1 h。封闭后,PVDF与一抗在TBST中4℃孵育过夜,然后在TBST中洗涤3次,每次5 min,然后与稀释于TBST中的合适的过氧化物酶偶联二抗孵育1 h。与二抗孵育后,再用TBST洗涤3次,用增强化学发光法显示结合的二抗。以GAPDH作为内参。

1.6 基因集功能富集分析 应用 3.0 版基因集富集分析 (GSEA) 软件 (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) 进行功能富集分析。首先,根据数据库样本中其他基因表达与 TNFRSF4 表达之间的相关性,在 GSEA 中对相关基因进行排序。随后,进行基因集富集分析以确定低 TNFRSF4 表达数据集和高 TNFRSF4 表达数据集之间的重要信号通路。注释基因集文件 (c2.cp.kegg.v7.0.symbols.gmt 和 h.all.c2.v7.2.symbols.gmt) 作为参考。每次分析进行 1 000 次基因集排列。表型标记为 TNFRSF4 的表达水平。此外, $P < 0.05$ 和假发现率 (FDR) q 值 < 0.25 的基因集的信号通路被认为是显著的。

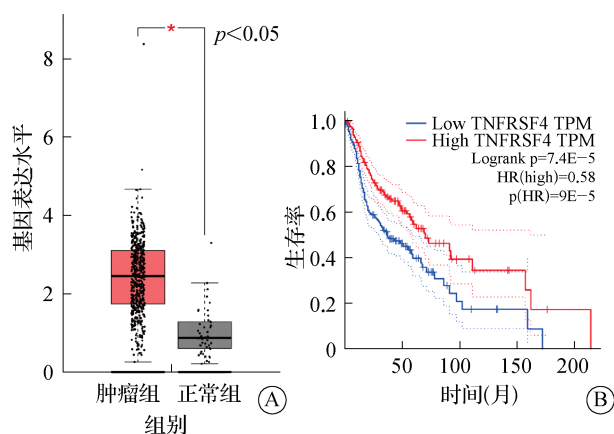
1.7 统计学方法 使用 R v4.1.0 软件和 GraphPad Prism v.9.4.2 软件进行统计分析。t 检验用于比较两组之间的差异。所有实验至少重复 3 次。单变量 Cox 回归分析用于确定与生存率相关的临床特征;多变量 Cox 回归分析用以消除 TNFRSF4 表达和其他临床特征对生存率的影响。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GEPIA 数据库中的 TNFRSF4 结果 GEPIA 数据库中,头颈鳞癌组中 TNFRSF4 的表达高于正常组 ($P < 0.05$,图 1A)。且 TNFRSF4 高表达组的生存率高

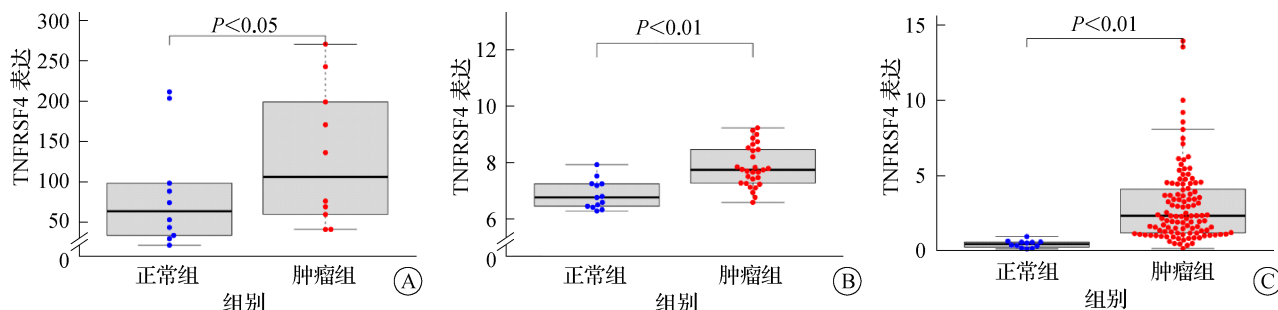
于 TNFRSF4 低表达组 ($P < 0.01$,图 1B)。

2.2 目标基因 TNFRSF4 的表达水平差异 通过下载 GEO 数据库中 GSE51985 和 GSE59102 的喉鳞癌的测序数据以及 TCGA 数据库中的测序数据,对喉鳞癌患者和正常组的 TNFRSF4 表达水平进行分析,发现肿瘤样本中 TNFRSF4 的表达水平显著高于正常组织 ($P < 0.05$,图 2)。qRT-PCR 检测结果 (图 3A) 和 Western blot 结果 (图 3B) 显示 TNFRSF4 蛋白在本院样本肿瘤组织中的表达显著高于癌旁正常组织 ($P < 0.05$)。



注:A为喉鳞癌组和正常组 TNFRSF4 表达水平比较;B为头颈鳞癌患者 TNFRSF4 表达水平与的总体生存率之间的关系。

图 1 GEPIA 数据库中的结果
Fig. 1 Results in GEPIA database



注:A为 GSE51985;B为 GSE59102;C为 TCGA。

图 2 不同数据集中的 TNFRSF4 表达水平比较
Fig. 2 Comparison of TNFRSF4 expression levels in different datasets

2.3 验证 TNFRSF4 与喉鳞癌患者预后的关系 根据 TCGA 数据库中的生存数据,Kaplan-Meier 生存分析图表明,TNFRSF4 低表达的患者总体生存率低于高表达的患者 ($P = 0.013$)。见图 4。

2.4 Cox 回归分析 根据 TNFRSF4 的表达情况和 TCGA 数据库中喉鳞癌患者的临床特征,进行单因素及多因素 Cox 回归分析。单因素的 Cox 回归分析显示,TNFRSF4 表达水平 ($HR: 0.480, 95\% CI: 0.269 \sim 0.855, P = 0.013$)、性别 ($HR: 0.297, 95\% CI: 0.151 \sim$

$0.586, P < 0.001$)、肿瘤分期 ($HR: 1.803, 95\% CI: 1.363 \sim 2.656, P = 0.034$)、淋巴结分期 ($HR: 1.857, 95\% CI: 1.035 \sim 3.333, P = 0.038$) 和远处转移 ($HR: 4.860, 95\% CI: 1.670 \sim 14.146, P = 0.004$) 五个因素对患者生存率的影响有统计学意义。在多因素的 Cox 回归分析中,TNFRSF4 表达水平 ($HR: 0.430, 95\% CI: 0.229 \sim 0.806, P = 0.009$)、性别 ($HR: 0.424, 95\% CI: 0.204 \sim 0.882, P = 0.022$)、淋巴结分期 ($HR: 2.010, 95\% CI: 1.055 \sim 3.831, P = 0.034$) 和远处转移

($HR:3.706, 95\%CI: 1.152 \sim 11.922, P=0.028$) 四个因素共同对患者的总生存时间产生影响。

2.5 基于基因集富集分析的 TNFRSF4 相关潜在信号通路 基因集富集分析的结果显示,与 TNFRSF4 表达最显著相关的信号通路有细胞黏附分子、JAK-STAT 信号通路、T 细胞受体信号通路、B 细胞受体信号通路、原发性免疫缺陷和自身免疫性甲状腺疾病。上述通路的详细信息见表 1。

表 1 基于基因集富集分析的 TNFRSF4 相关潜在信号通路
Tab. 1 TNFRSF4 related potential signaling pathways based on gene set enrichment analysis

通路名称	NES	P 值	FDR-q 值
KEGG—细胞黏附分子	2.009	<0.001	0.003
KEGG—JAK-STAT 信号通路	1.650	0.021	0.117
KEGG—T 细胞受体信号通路	1.967	<0.001	0.005
KEGG—B 细胞受体信号通路	1.669	0.026	0.107
KEGG—原发性免疫缺陷	1.937	<0.001	0.006
KEGG—自身免疫性甲状腺疾病	2.186	0.002	0.002

注:NES 为标准化富集分数,基因集通路的 P 值<0.05 并且 FDR-q 值<0.25 被认为差异有统计学意义。

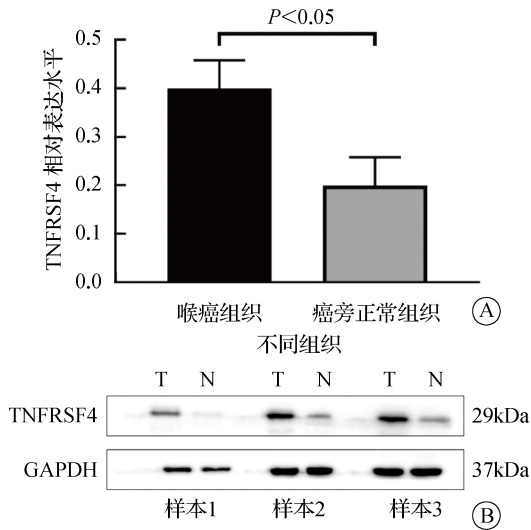
3 讨论

喉癌作为头颈外科最为常见的恶性肿瘤^[1-3],虽然其治疗方法不断进步,喉癌患者的生存率有所提高,但是晚期喉癌患者的预后并没有显著改善^[11-12]。因此,有必要深入研究肿瘤发生发展的分子机制来提高喉癌患者的生存率。

TNFRSF4 又名 OX40,是活化的 T 淋巴细胞上的一种共刺激免疫检查点分子^[13-14]。先前的研究表明 TNFRSF4 是一种能够使调节性 T 细胞(Treg)失活并促进 CD8⁺T 细胞分化和扩增的关键分子^[5-6],在许多基本生物学中起着重要作用,如细胞增殖、迁移、侵袭和转移等过程^[15-17]。研究表明疾病中异常表达的 TNFRSF4 可作为多种肿瘤早期诊断和预后的评估生物标志物,例如皮肤黑色素瘤、结直肠癌和非小细胞肺癌等^[7-9]。Weinberg 等^[18]报道,以 TNFRSF4 为靶向的免疫治疗能显著发挥抗乳腺癌和黑色素瘤的作用。另外,TNFRSF4 又能抑制 Treg 的免疫抑制效应,从而增加 CD4⁺T 细胞增殖,发挥一定程度的抗肿瘤效应,这可能与喉癌组织 TNFRSF4 高表达的患者预后较好有关^[19]。

本研究借助 GEO 数据库和 TCGA 数据库中的基因表达谱数据进行分析,相对于正常对照组,TNFRSF4 在喉鳞癌组织中显著高表达。利用 TCGA 数据中的喉癌患者临床数据进行生存分析发现,TNFRSF4 高表达的喉癌患者生存率更好,这与 GEPIA 中的结果一致。利用临床病理样本进行 qPCR 和蛋白质免疫印迹实验来验证 TNFRSF4 在喉鳞癌组织和癌旁组织中表达水平差异,结果显示 TNFRSF4 在喉鳞癌组织中高表达,这与数据分析结果一致。

有文献报道 TNFRSF4 相关通路与癌症发生发展有关。JAK-STAT 信号通路与肿瘤发生的调节有关,该通路与卵巢癌和非小细胞肺癌的总体生存率降低



注:A 为 qRT-PCR 结果;B 为 Western blot 检测结果;T 为喉癌组织;N 为癌旁组织。

图 3 临床样本中两组 TNFRSF4 表达水平差异比较

Fig. 3 Comparison of TNFRSF4 expression levels between two groups in clinical samples

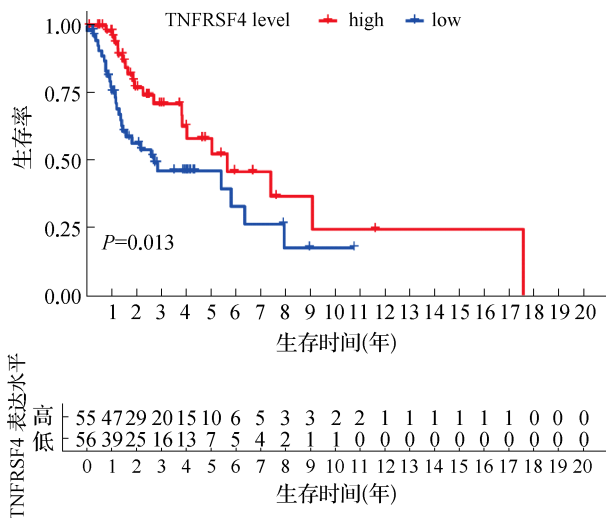


图 4 基于 TCGA 数据库中的生存数据绘制的 K-M 生存分析图

Fig. 4 K-M survival analysis graph based on survival data in TCGA database

有关^[20]。de Méndez 等^[21]报道细胞黏附因子可以作为侵袭性宫颈癌形成的标志物,这对于其他肿瘤的研究具有一定的借鉴意义。上皮细胞黏附分子在乳腺癌、食管癌特别是喉癌中的表达及其临床意义被广泛报道^[22]。此外,T细胞和B细胞在肿瘤发生发展中的作用也越来越受到重视^[23]。上述研究进一步说 TNFRSF4 可能通过这些通路的作用与喉癌的发生相关。

尽管本研究从公共数据库中挖掘出喉鳞癌的样本信息,结果表明 TNFRSF4 基因的表达水平与喉鳞癌患者预后有关,但本研究仍然存在一些不足之处:一是研究集中在 mRNA 和蛋白质表达水平,缺乏相关信号通路的深入研究。二是样本量相对不足。因此进一步的实验研究对于阐明喉鳞癌中 TNFRSF4 的作用机制至关重要。此外,从所有数据库中获取的信息有一定的时效性,随着数据库资料的改进和更新有可能导致不同结果。

综上所述,本研究主要探讨 TNFRSF4 与喉鳞癌发生发展的关系,寻找 TNFRSF4 在喉鳞癌组织中的表达差异,并通过 TNFRSF4 筛选出更关键的作用通路,为后期研究提供新的依据。同时可能为临床上喉鳞癌的早期筛查、早期治疗和预后提供新的思路。

利益冲突 无

参考文献

- [1] Chatenoud L, Garavello W, Pagan E, et al. Laryngeal cancer mortality trends in European countries[J]. *Int J Cancer*, 2016, 138(4):833-842.
- [2] Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, et al. An update on larynx cancer[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 31-50.
- [3] Baird BJ, Sung CK, Beadle BM, et al. Treatment of early-stage laryngeal cancer: a comparison of treatment options[J]. *Oral Oncol*, 2018, 87: 8-16.
- [4] Anderson G, Ebadi M, Vo K, et al. An updated review on head and neck cancer treatment with radiation therapy[J]. *Cancers*, 2021, 13(19): 4912.
- [5] Croft M. Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134)[J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28: 57-78.
- [6] Sadeghirad H, Liu N, Monkman J, et al. Compartmentalized spatial profiling of the tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma identifies immune checkpoint molecules and tumor necrosis factor receptor superfamily members as biomarkers of response to immunotherapy[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1135489.
- [7] Wong PF, Wei W, Smithy JW, et al. Multiplex quantitative analysis of tumor-infiltrating lymphocytes and immunotherapy outcome in metastatic melanoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25: 2442-2449.
- [8] Davis Elizabeth J, Juan M, Rebecca K, et al. First-in-human phase I/II, open-label study of the anti-OX40 agonist INCAGN01949 in patients with advanced solid tumors[J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(10): e004235.
- [9] Massarelli E, Lam VK, Parra ER, et al. High OX-40 expression in the tumor immune infiltrate is a favorable prognostic factor of overall survival in non-small cell lung cancer[J]. *J Immunotherapy Cancer*, 2019, 7: 351.
- [10] Bell RB, Leidner RS, Crittenden MR, et al. OX40 signaling in head and neck squamous cell carcinoma: overcoming immunosuppression in the tumor microenvironment[J]. *Oral Oncol*, 2016, 52: 1-10.
- [11] Forastiere AA, Ismaila N, Lewin JS, et al. Use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(11): 1143-1169.
- [12] Zeng W, Li YW, Lu EY, et al. CYP1A1 rs1048943 and rs4646903 polymorphisms associated with laryngeal cancer susceptibility among Asian populations: a meta-analysis[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(2): 287-293.
- [13] Aspeslagh S, Postel-Vinay S, Rusakiewicz S, et al. Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy[J]. *Eur J Cancer*, 2016, 52: 50-66.
- [14] Müller D. Targeting co-stimulatory receptors of the TNF superfamily for cancer immunotherapy[J]. *BioDrugs*, 2023, 37(1): 21-33.
- [15] Liu Y, He S, Wang XL, et al. Tumour heterogeneity and intercellular networks of nasopharyngeal carcinoma at single cell resolution[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 741.
- [16] Webb GJ, Hirschfield GM, Lane PJJ. OX40, OX40L and autoimmunity: a comprehensive review[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2016, 50(3): 312-332.
- [17] Hinterbrandner M, Rubino V, Stoll C, et al. Tnfrsf4-expressing regulatory T cells promote immune escape of chronic myeloid leukemia stem cells[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(23): e151797.
- [18] Weinberg AD, Rivera MM, Prell R, et al. Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity[J]. *J Immunol*, 2000, 164(4): 2160-2169.
- [19] Lai C, August S, Albibas A, et al. OX40+ regulatory T cells in cutaneous squamous cell carcinoma suppress effector T-cell responses and associate with metastatic potential[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22: 4236-4248.
- [20] Hu XY, Li J, Fu MR, et al. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 402.
- [21] de Méndez MT, Bosch AL. Abnormal immunoexpression of cell adhesion molecules (CAMs) in cervical cancer[J]. *Int J Surg Pathol*, 2011, 19(6): 733-742.
- [22] Shiozaki H, Tahara H, Oka H, et al. Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers[J]. *Am J Pathol*, 1991, 139(1): 17-23.
- [23] Ito SE, Shirota H, Kasahara Y, et al. IL-4 blockade alters the tumor microenvironment and augments the response to cancer immunotherapy in a mouse model[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(11): 1485-1496.

收稿日期:2023-06-29 修回日期:2023-07-28 编辑:李方