

SEMA3B 在胃癌中的表达及临床意义

徐建波, 彭建军, 石鹏, 欧信德, 何裕隆

中山大学附属第一医院 胃肠外科中心, 广东 广州 510080

【摘要】 目的 探讨 Semaphorin-3B(SEMA3B)在胃癌细胞中的表达及其与胃癌患者临床病理特征及预后的关系。方法 用 RT-qPCR 检测 20 对新鲜的胃癌与癌旁组织中 SEMA3B 基因 mRNA 表达水平,用免疫组织化学的方法检测 27 对石蜡包埋的胃癌与癌旁组织样品中蛋白表达水平。同时利用 TCGA 和 GEO 数据库中的相关数据对胃癌与正常胃黏膜中 SEMA3B 基因 mRNA 水平进行差异分析。利用免疫组织化学的方法检测 232 例胃癌组织中 SEMA3B 蛋白的表达水平,进一步分析 SEMA3B 蛋白表达水平与胃癌患者的临床病理特征及预后的关系。结果 与正常胃黏膜相比,SEMA3B 基因在胃癌组织中的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低。胃癌组织中,SEMA3B 蛋白表达水平与肿瘤细胞分化程度($P<0.001$)、肿瘤长径($P<0.05$)、M 分期($P<0.05$)及 TNM 分期($P<0.05$)显著相关。此外,SEMA3B 在胃癌中的低表达与胃癌患者术后更高的死亡风险相关,多因素 Cox 回归分析表明 SEMA3B 蛋白表达水平可作为提示胃癌患者预后的独立因素 ($HR=1.616, 95\%CI: 1.121-2.332, P=0.010$)。结论 SEMA3B 在胃癌组织中显著低表达,SEMA3B 蛋白低表达与胃癌患者的不良预后密切相关。SEMA3B 的表达水平可作为胃癌患者预后的分子指标。

【关键词】 SEMA3B; 胃癌; 临床病理特征; 预后

Expression and clinical significance of SEMA3B in gastric cancer

XU Jian-bo, PENG Jian-jun, SHI Peng, OU Xin-de, HE Yu-long

Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510080, P.R.China

Corresponding author: HE Yu-long, E-mail: heyulong@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the relationship between the expression of Semaphorin-3B (SEMA3B) and clinicopathological features and its effect on prognosis of patients with gastric cancer. **Methods** Fresh-frozen tissue and Paraffin-embedded tissues samples were used to investigate SEMA3B mRNA and protein expression in gastric cancer tissues and adjacent normal tissues by reverse transcription-quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and immunohistochemical (IHC) staining, respectively. Datasets from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Gene Expression Omnibus (GEO) were also used to analyze SEMA3B mRNA expression in gastric cancer and normal gastric mucosa. The correlations between SEMA3B expression and clinicopathological characteristics and prognosis of patients with gastric cancer were investigated in 232 gastric cancer tissue samples by IHC staining. **Results** The mRNA and protein expression of SEMA3B in gastric cancer were both significantly lower than normal gastric mucosa. In gastric cancer specimens, low SEMA3B expression was associated with poorly differentiated histological classification ($P<0.001$), larger tumor size ($P<0.05$) and advanced M stage ($P<0.05$) and TNM stage ($P<0.05$). Moreover, multivariate regression analysis indicated that low SEMA3B expression of gastric cancer was also associated with an increased risk of death ($HR=1.616; 95\%CI: 1.121-2.332, P=0.010$). **Conclusions** Our results show that low level of SEMA3B correlates with poor prognosis in patients with gastric cancer. SEMA3B expression can serve as a prognostic biomarker for patients with gastric cancer.

【Key words】 SEMA3B; Gastric cancer; Clinicopathological features; Prognosis

胃癌是全球高发的消化道恶性肿瘤之一,尽管外科手术及放化疗等辅助诊疗措施在不断进步,但是进展期胃癌仍然是一种高致死性疾病^[1]。方便有效的预测患者预后的方法对胃癌患者术后

的辅助治疗具有重要的指示作用, 鉴定新的生物标志物来预测胃癌患者的预后具有重要意义。

Semaphorin 家族由一类膜相关的分泌蛋白组成, 是神经发育过程中轴突引导的重要成分之一^[2,3]。其中, SEMA3 家族成员编码的分泌蛋白可与神经菌素(Neuropilins)和丛状蛋白(Plexins)在细胞表面形成复合物。神经菌毛蛋白提供 SEMA3 分子的结合位点, 而丛状蛋白负责信号转导^[4]。Semaphorin-3B (SEMA3B) 是 SEMA3 家族的重要成员之一, 可作为抑癌基因, 通过抑制增殖及诱导凋亡等方式抑制乳腺癌、肺癌及卵巢癌等多种恶性肿瘤的生长^[5-9]。SEMA3B 在胃癌中的作用尚不明确, 本文研究胃癌中 SEMA3B 的表达水平, 并探讨 SEMA3B 表达水平与胃癌患者临床病理特征及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料 20 例新鲜胃癌及配对的癌旁组织来自中山大学附属第一医院胃肠外科中心经全胃或部分胃切除术治疗的胃癌患者。胃癌和正常胃黏膜的石蜡包埋组织来自中山大学附属第一医院病理科。本研究共纳入 232 例接受全胃或部分胃切除并淋巴结清扫术的胃癌患者。纳入标准: (1)病理组织学确诊为胃腺癌; (2)行胃癌切除并淋巴结清扫; (3)术前未接受治疗; (4)有完整的临床病理资料。排除标准: (1)病理组织学确诊为非腺癌(鳞癌及神经内分泌癌等); (2)行姑息性手术或单纯活检; (3)术前接受新辅助化疗; (4)临床病理资料不完整。纳入病例包括 159 例男性和 73 例女性, 年龄在 27 至 83 岁之间(平均 58.6 岁)。对患者进行了 1 至 84 个月的随访, 中位随访时间为 51.2 个月。根据第六版 UICC/AJCC 的 TNM 分期手册进行胃癌的病理诊断和分期^[10]。

1.2 RNA 提取与 RT-qPCR 通过 RNA isolation plus (TaKaRa, Japan) 试剂从标本组织中提取 RNA, 每 20 uL 反应体系中加入 1 ug 总 RNA, 按照 Primer Script TM RT Reagent (TaKaRa, Japan) 的操作说明进行逆转录得到单链 cDNA。相对表达量通过 ABI 7900HT instrument (Applied Biosystems, USA) 仪器进行实时定量 PCR 检测, 按照 SYBR green detection system (Takara, Japan) 操作说明以 10 uL 体系进行反应, GAPDH 作为内参。所使用的引物组的寡核苷酸序列如下: SEMA3B (Forward:

5'-ACATTGGTACTGAGTGCATGAAC-3', Reverse: 5'-GCCATCCTCTATCCTTCCTGG-3'); GAPDH (Forward: 5'-ACAACCTTGGTATCGTGGAAGG-3', Reverse: 5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3')。

1.3 免疫组织化学染色及评分 石蜡包埋组织载玻片脱蜡, 然后在 EDTA 缓冲液(pH 8.9)中于 105°C 加热 5 分钟进行抗原修复, 然后自然冷却 30 分钟。在 3%过氧化氢中封闭 10 分钟, 再用 10%正常山羊血清封闭 30 分钟后, SEMA3B 抗体(稀释比例 1:200, Abcam)4°C 孵育过夜, 使用抗兔抗体室温孵育 30 分钟。随后使用二氨基联苯胺(DAB)作为底物进行染色, 并通过 Mayer 的苏木精染色显示了细胞核。利用 Quickscore 方法^[11]用于评估 SEMA3B 表达水平。强度评分按强染色、中等染色、弱染色和阴性, 依次评定为 3、2、1 和 0 分, 面积评分, 按视野中染色的胃癌细胞占总胃癌细胞的百分比给予 1-6 分, 1=0-4%, 2=5-19%, 3=20-39%, 4=40-59%, 5=60-79%, 6=80-100%。强度评分乘以面积评分, 得到范围为 0-18 分的总评分。当总评分为 12 或更高时, 评定为 SEMA3B 高表达; 当分数为 10 或更低时, 评定为低表达。

1.4 统计分析 使用 SPSS Statistics (20.0 版本) 和 GraphPad Prism (6.0 版本) 进行统计分析和图形绘制。使用 *t* 检验分析两组之间 SEMA3B 基因 mRNA 表达的差异。使用双侧 χ^2 分析 SEMA3B 表达与临床病理特征之间关系的显著性。使用 Kaplan-Meier 方法绘制生存曲线, 并使用 Log-rank 检验比较组间差异。单因素和多因素分析采用 Cox 比例风险回归模型。以 $P < 0.05$ 定义为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SEMA3B 在胃癌中低表达 我们首先通过 RT-qPCR 检测了 20 对新鲜胃癌与癌旁组织中的 SEMA3B 基因 mRNA 表达量。我们发现, 与配对的癌旁组织相比, SEMA3B 基因 mRNA 表达量在胃癌组织中显著降低(图 1A)。这一结果与 TCGA 数据库中 375 例胃癌组织和 32 例正常胃黏膜组织的测序数据相一致(图 1B)。GEO 数据库中来自 GSE19826 芯片的 12 对配对的胃癌组织和癌旁组织, 来自 GSE26942 芯片的 202 例胃癌组织和 12 例癌旁组织和来自 GSE29272 芯片的 134 对配对的胃癌组织和癌旁组织中 SEMA3B 基因的 mRNA

表达数据皆表明 SEMA3B 基因在胃癌组织中低表达(图 1C-E)。为了探究 SEMA3B 基因在胃癌中的蛋白表达情况,我们通过免疫组化的方法对 27 对胃癌和癌旁组织的 SEMA3B 蛋白水平进行检测。结果表明,SEMA3B 蛋白在正常胃黏膜和胃癌组织中均定位于细胞质中。在所有正常胃黏膜组织的胃腺体中,SEMA3B 均大量表达。其中,SEMA3B 蛋白表达与胃黏膜腺体结构相关,胃腺深层细胞中 SEMA3B 的表达比胃凹中的表面粘膜细胞含量更丰富(图 2A)。在 27 对配对的胃癌样品中,SEMA3B 的表达具有多种形式,其中 8 个样品呈强阳性,15 个样品呈中等阳性,3 个样品呈弱阳性,1 个样品呈阴性(图 2B)。以上表明,胃癌组织中 SEMA3B 蛋白表达明显低于正常胃黏膜(图 2C)。

2.2 SEMA3B 表达量与胃癌临床病理特征的关系

我们进一步用免疫组化的方法检测了 232 例胃癌

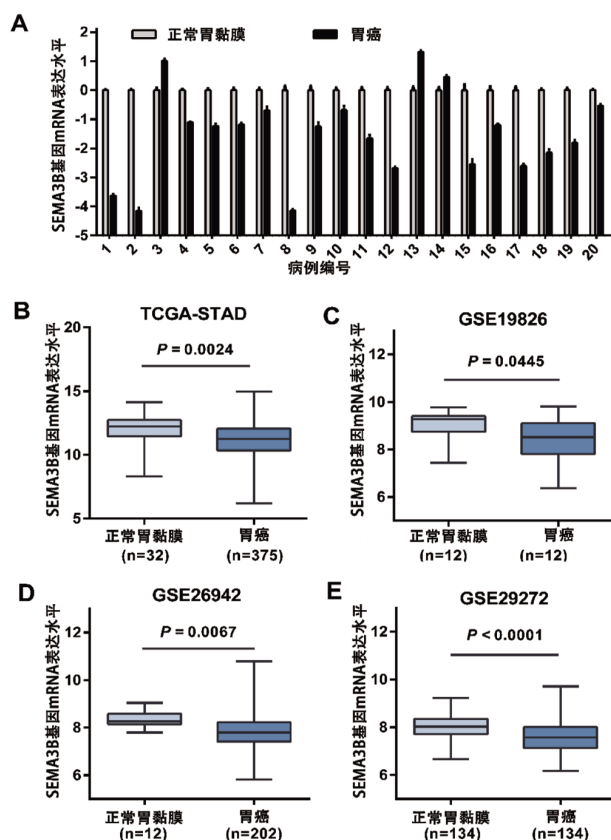


图 1 SEMA3B 在胃癌组织中低表达

(A) 新鲜胃癌与配对癌旁组织中 SEMA3B 基因 mRNA 表达水平(B)TCGA 数据库中胃癌与正常胃黏膜组织测序数据中 SEMA3B 基因 mRNA 表达水平 (C-E)GEO 数据库中 GSE19826(C)、GSE26942(D)及 GSE29272(E)数据集中胃癌及正常胃黏膜组织 SEMA3B 基因 mRNA 表达水平。

组织中 SEMA3B 蛋白的表达,并利用 Quickscore 方法评估 SEMA3B 表达水平。正常胃黏膜 SEMA3B 蛋白表达水平较高,Quickscore 总评分均达到 12。因此我们将总评分 ≥ 12 被评定为 SEMA3B 高表达,而总评分 < 12 被评定为 SEMA3B 低表达。根据这一判别标准,119 例(51.3%)原发性胃癌病例归为 SEMA3B 低表达组,而另外的 113 例(48.7%)归为 SEMA3B 高表达组。进一步对 SEMA3B 表达水平与胃癌患者临床病理特征之间的关系进行评估。结果显示,SEMA3B 表达水平与胃癌组织分化程度、肿瘤长径、M 分期和 TNM 分期显著有关,差异具统计学意义(表 1)。

2.3 SEMA3B 表达与胃癌预后

本研究的病例中位随访时间为 51.2 个月,并在随访终点共 123 名患者(53.0%)死亡。中位总生存时间为 64.4 ± 11.6 个月,5 年总生存率为 50.7%。其中,SEMA3B 低表达组的胃癌患者 5 年总生存率显著低于 SEMA3B 高表达组的胃癌患者(39.5% vs. 62.6%, $P < 0.001$, 图 3A)。通过比较 SEMA3B 低表达组和高表达组的无进展生存期的 Kaplan-Meier 曲线(图 3B),呈现出一致的结果,即 SEMA3B 的低表达预示着胃癌患者较差的预后。此外,我们分别在 TNM 分期 I/II 期(图 3C-3D)及 III/IV 期(图 3E-3F)胃癌中探索 SEMA3B 表达的预后指示作用。在 I/II 期胃癌中,SEMA3B 低表达组和高表达组中的 5 年总生存率分别为 70.1%和 89.7%。在 III/IV 期胃癌中,SEMA3B 低表达组和高表达组的 5 年总生存率分

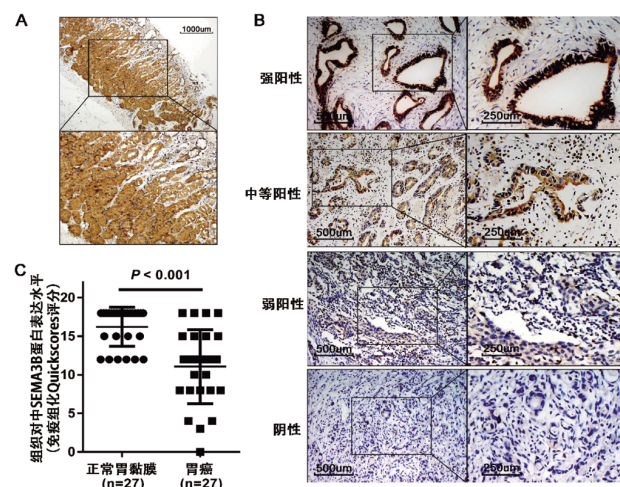


图 2 免疫组织化学染色检测胃癌及癌旁组织中 SEMA3B 蛋白表达水平

(A)SEMA3B 在正常胃腺体中表达丰富 (B) 胃癌组织中 SEMA3B 表达强、中等、弱阳性及阴性 (C) 胃癌组织中 SEMA3B 蛋白表达水平显著低于癌旁组织。

别为 25.0% 和 40.4%。比较两组患者的无进展生存期,也得到了类似的结果。以上结果表明,胃癌组织中 SEMA3B 低表达与患者的不良预后相关。

我们进一步评估胃癌中 SEMA3B 表达及临床病理特征预测患者预后的价值。单因素 Cox 回归分析显示,SEMA3B 表达水平与性别、年龄、分化程度、肿瘤长径、肿瘤部位以及 T、N、M 分期都与胃癌患者的总生存期密切相关(表 2)。为了纠正混杂因素的影响,使用逐步前进法进行多因素 Cox

表 1 SEMA3B 表达与胃癌患者临床病理特征的关系

临床病理参数	例数	SEMA3B 表达水平		P 值
		低表达	高表达	
性别				0.875
男	159	81	78	
女	73	38	35	
年龄(岁)				0.870
<50	47	25	22	
≥50	185	94	91	
分化程度				<0.001
高或中分化	79	23	56	
低或未分化	153	96	57	
肿瘤长径				0.019
≤4cm	109	47	62	
>4cm	123	72	51	
肿瘤部位				0.061
上 1/3	55	22	33	
中 1/3	34	19	15	
下 1/3	89	43	46	
累及两部位及以上	54	35	19	
T 分期 ^a				0.218
T1	19	8	11	
T2	30	11	19	
T3	137	73	64	
T4	46	27	19	
N 分期 ^a				0.059
N0	78	36	42	
N1	80	36	44	
N2	41	24	17	
N3	33	23	10	
M 分期 ^a				0.030
M0	182	87	95	
M1	50	32	18	
TNM 分期 ^a				< 0.050
IA	14	5	9	
IB	21	7	14	
II	52	24	28	
IIIA	47	21	26	
IIIB	21	13	8	
IV	77	49	28	

注:a:采用第六版 UICC/AJCC 的 TNM 分期系统进行肿瘤分期。

回归分析,发现在校正了肿瘤长径、肿瘤浸润深度、淋巴结转移和远处转移等因素的影响后,SEMA3B 低表达依旧与胃癌患者的不良预后相关($HR = 1.616; 95\% CI: 1.121 - 2.332, P = 0.010$) (表 2)。以上结果提示,SEMA3B 蛋白表达水平可能是胃癌患者的独立预后因素。

3 讨论

肿瘤进展是一个多步骤的过程,需要多个促癌或抑癌基因突变和(或)表达改变。本研究发现 SEMA3B 基因 mRNA 和蛋白质表达均显著低于正常胃黏膜,这提示 SEMA3B 可能在胃癌发生发展过程中发挥抑癌作用。正常人类基因组中,SEMA3B 基因位于染色体 3p21.3 片段。在肺癌、乳腺癌和胃癌发生发展过程中,染色体 3p21.3 片段常存在等位基因的丢失^[5,6,12,13]。在非小细胞肺癌的

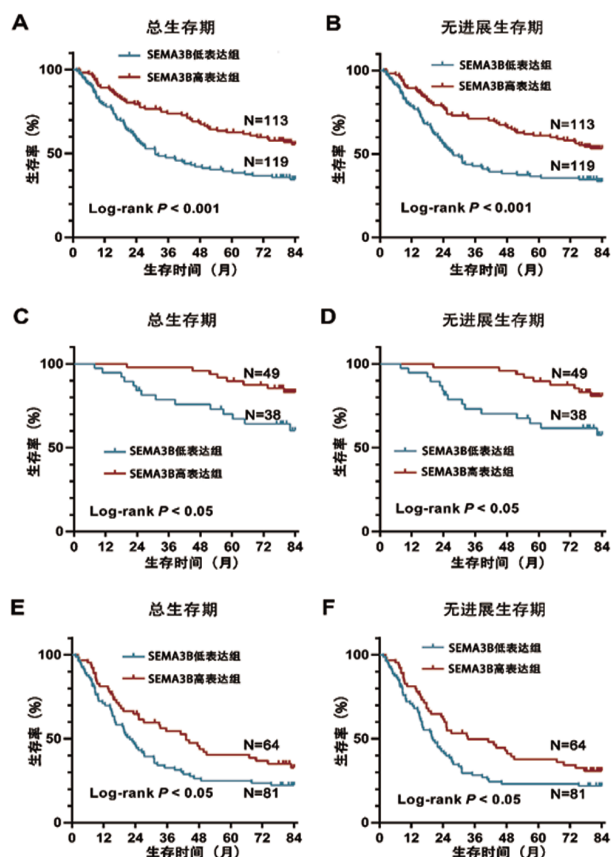


图 3 SEMA3B 低表达与胃癌患者不良预后相关

(A-B)胃癌组织中 SEMA3B 低表达与患者更低的总生存期(A)和无进展生存期(B)相关(C-D)I、II 期胃癌组织中 SEMA3B 低表达与患者更低的总生存期(C)和无进展生存期(D)相关(E-F)III、IV 期胃癌组织中 SEMA3B 低表达与患者更低的总生存期(E)和无进展生存期(F)相关。

表2 单因素与多因素 Cox 回归分析

变量	单因素 Cox 回归分析				多因素 Cox 回归分析 ^b			
	HR	95%CI		P 值	HR	95%CI		P 值
		下限	上限			下限	上限	
性别								
男	1							
女	1.535	1.068	2.206	0.020				
年龄(岁)								
<50	1							
≥50	0.649	0.430	0.980	0.040				
分化程度								
高或中分化	1							
低或未分化	2.068	1.369	3.123	0.001				
肿瘤长径								
≤4cm	1				1			
>4cm	2.839	1.932	4.172	< 0.001	1.566	1.038	2.362	0.032
肿瘤部位				0.009				
上 1/3	1							
中 1/3	0.986	0.552	1.763	0.962				
下 1/3	0.755	0.470	1.214	0.247				
累及两部分及以上	1.649	1.019	2.668	0.042				
T 分期 ^a				< 0.001				0.007
T1	1				1			
T2	1.588	0.308	8.183	0.581	1.929	0.372	10.001	0.434
T3	7.907	1.942	32.195	0.004	5.622	1.365	23.153	0.017
T4	20.893	5.019	86.980	< 0.001	7.569	1.739	32.946	0.007
N 分期 ^a				< 0.001				0.002
N0	1				1			
N1	2.150	1.274	3.627	0.004	1.356	0.788	2.331	0.271
N2	5.910	3.426	10.196	< 0.001	2.823	1.567	5.084	0.001
N3	6.528	3.716	11.465	< 0.001	2.174	1.164	4.060	0.015
M 分期 ^a								
M0	1				1			
M1	4.378	2.997	6.396	< 0.001	2.069	1.304	3.284	0.002
SEMA3B 表达水平								
高表达	1				1			
低表达	1.934	1.344	2.782	< 0.001	1.616	1.121	2.332	0.010

注:a:采用第六版 UICC/AJCC 的 TNM 分期系统进行肿瘤分期。

b:多因素回归纳入的对象有性别,年龄,分化程度,肿瘤部位,肿瘤长径,T、N、M 分期,SEMA3B 表达水平。用逐步前进法(Forward Stepwise (Conditional LR))筛选有意义的因素。

发生过程中,SEMA3B 基因可通过启动子高甲基化和等位基因缺失的双重机制而失去作用^[12,14]。此外,肿瘤组织中高表达 Furin 样前蛋白转化酶,该酶的蛋白水解作用使 SEMA3B 蛋白的活性降低,从而帮助肿瘤细胞逃避 SEMA3B 的抗血管生成等抑癌作用^[15]。因此,可能存在多种机制导致 SEMA3B 在胃癌组织中低表达,这有待进一步研究证实。

本研究中,胃癌组织 SEMA3B 表达水平与肿

瘤分化程度、肿瘤长径、M 分期和 TNM 分期显著有关。胃癌组织中 SEMA3B 低表达与患者的不良预后相关。这些结果提示,SEMA3B 可能在胃癌的发生发展过程中起抑制作用。既往研究显示,SEMA3B 可以通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 途径从而抑制肺癌和乳腺癌细胞的增殖并诱导其凋亡^[7]。此外,SEMA3B 还可以通过与神经菌素 1(Neuropilin 1, Nrp1)结合,抑制内皮细胞生长,从而起到血管生成抑制的作用^[9]。准确评估胃

癌患者术后的预后,以准确了解患者的病情并确定最佳的辅助治疗策略,是胃癌综合诊疗过程中重要的一个环节,因而寻找能够预测胃癌患者预后的生物标志物十分重要。我们的研究显示,在校正了肿瘤长径、肿瘤浸润深度、淋巴结转移和远处转移等因素的影响后,SEMA3B低表达依旧与胃癌患者的不良预后相关($HR=1.616$; $95\%CI: 1.121-2.332$, $P=0.010$),提示SEMA3B蛋白表达水平可作为胃癌患者的独立预后因素。然而,SEMA3B在胃癌组织中具体的生物学功能及其作用机制尚不明确。

综上所述,胃癌组织中SEMA3B显著低表达,且SEMA3B低表达预示患者的不良预后,SEMA3B表达水平可以作为提示胃癌患者术后预后的生物标志物。但是,SEMA3B在胃癌组织中具体的生物学功能及其作用机制仍需进一步的研究。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Nakamura F, Kalb R G, Strittmatter S M. Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance [J]. *J Neurobiol*, 2000, 44(2): 219-29.
- [3] Tamagnone L, Comoglio P M. Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond [J]. *Trends Cell Biol*, 2000, 10(9): 377-83.
- [4] Raper J A. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2000, 10(1): 88-94.
- [5] Castro-Rivera E, Ran S, Thorpe P, et al. Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(31): 11432-7.
- [6] Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M, et al. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3 p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(24): 13954-9.
- [7] Castro-Rivera E, Ran S, Brekken R A, et al. Semaphorin 3B inhibits the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway through neuropilin-1 in lung and breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(20): 8295-303.
- [8] Tse C, Xiang R H, Bracht T, et al. Human Semaphorin 3B (SEMA3B) located at chromosome 3 p21.3 suppresses tumor formation in an adenocarcinoma cell line [J]. *Cancer Research*, 2002, 62(2): 542-6.
- [9] Sakurai A, Doci C L, Gutkind J S. Semaphorin signaling in angiogenesis, lymphangiogenesis and cancer [J]. *Cell Res*, 2012, 22(1): 23-32.
- [10] Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. American Joint Committee on Cancer (AJCC) cancer staging manual. 6th ed. New York, NY: Springer; 2002.
- [11] Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas [J]. *J Clin Pathol*, 1995, 48(9): 876-8.
- [12] Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, et al. Allelic loss on chromosome 3 p21.3 and promoter hypermethylation of Semaphorin 3B in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Research*, 2003, 63(12): 3352-5.
- [13] Schneider B G, Pulitzer D R, Brown R D, et al. Allelic imbalance in gastric cancer: an affected site on chromosome arm 3 p [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 1995, 13(4): 263-71.
- [14] Liu Z, Li W, Lei Z, et al. CpG island methylator phenotype involving chromosome 3 p confers an increased risk of non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(6): 790-7.
- [15] Varshavsky A, Kessler O, Abramovitch S, et al. Semaphorin-3B is an angiogenesis inhibitor that is inactivated by furin-like pro-protein convertases [J]. *Cancer Research*, 2008, 68(17): 6922-31.