

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.09.025

◆ 校庆约稿 ◆



冯俊

专家简介

冯俊(1976-),男,博士,留欧归国学者,主任医师,硕士研究生导师,川北医学院第二临床医学院·南充市中心医院副院长。2001年毕业于川北医学院,2012年毕业于四川大学华西临床医学院获得医学博士学位。四川省学术技术带头人后备人选,四川省卫计委学术技术带头人后备人选,四川省首届“新时代健康卫士”,四川省耳鼻咽喉头颈外科学会理事、四川省耳鼻咽喉头颈外科学会头颈外科委员会常务委员,四川省医学会耳鼻咽喉头颈外科咽喉头颈组委员,四川省变态反应学会第二、三届委员,南充市耳鼻咽喉质控中心副主任,《西部医学》第五届编委会编委。主要从事头颈肿瘤防治的研究工作,负责四川省科技厅重点项目 1 项、四川省教育厅重点项目及南充市科技局科研项目 2 项;发表核心期刊论文 30 余篇,其中 3 篇被 SCI 期刊收录。应用类研究《ATM 基因对头颈部鳞癌放射敏感性影响的实验研究》获四川省 2013 年度医学科技奖三等奖。

TLR4 mRNA 和 TCF21 mRNA 在喉癌组织中的表达及其与临床病理的相关性

杨湘,马鹏,冯俊

(南充市中心医院耳鼻咽喉头颈外科,四川南充 637000)

【摘要】目的: 探究 Toll 样受体 4(TLR4)、转录因子 21(TCF21)在喉癌组织中的表达及其与临床病理的相关性。**方法:** 选择 95 例喉癌患者的喉癌组织及癌旁正常组织,实时荧光定量 PCR 技术分别检测喉癌组织及癌旁正常组织中 TLR4 mRNA 及 TCF21 mRNA 表达水平,并分析其与临床病理参数之间的相关性。**结果:** 与癌旁正常组织相比,喉癌组织的 TLR4 mRNA 表达升高($P < 0.05$),TCF21 mRNA 降低($P < 0.05$)。TLR4 mRNA 及 TCF21 mRNA 表达与癌组织分化程度、浸润深度、淋巴结转移、临床分期的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。癌组织的 TLR4 mRNA 表达水平与 TCF21 mRNA 表达呈负相关性($r = -0.454, P < 0.001$)。**结论:** TLR4 mRNA 高表达和 TCF21 mRNA 低表达可能促进喉癌细胞恶性增殖及转移,检测喉癌组织 TLR4 和 TCF21 mRNA 指标对评估喉癌恶性程度、转移潜能及预后具有积极的指导意义。

【关键词】 喉癌;TOLL 样受体 4;转录因子 21;mRNA;临床病理特征

【中图分类号】 R739.75 **【文献标志码】** A

Expression of TLR4 mRNA and TCF21 mRNA in laryngeal carcinoma and their correlation with clinicopathology

YANG Xiang, MA Peng, FENG Jun

(Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of Toll like receptor 4(TLR4) and transcription factor 21(TCF21) in laryngeal carcinoma and their correlation with clinicopathological. **Methods:** 95 patients with laryngeal cancer were selected for the study, and their laryngeal cancer tissues and adjacent normal tissues were collected as experimental samples. The expression of TLR4 and tcf21 mRNA was detected by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-PCR), and the correlation between the positive expression and clinicopathological parameters was analyzed. **Results:** The expression level of TLR4 mRNA in laryngeal carcinoma tissues was significantly higher than the adjacent normal tissues($P < 0.05$), while the expression level of TCF21 mRNA in laryngeal carcinoma tissues was significantly lower than the adjacent normal tissues($P < 0.05$). In laryngeal carcinoma, the expression of TLR4 mRNA and TCF21 mRNA was significantly different in the degree of differentiation, depth of invasion, lymph node metastasis and clinical stage($P < 0.05$). The expression of TLR4 and TCF21 was negatively correlated in laryngeal carcinoma($P < 0.05$). **Conclusion:** The high expression of TLR4 and low expres-

作者简介: 杨湘(1984-),女,硕士,主治医师。E-mail:956399591@qq.com

通讯作者: 冯俊。E-mail:flj20041201@163.com

sion of TCF21 may promote the malignant proliferation and metastasis of laryngeal carcinoma cells. The detection of these two indicators has positive guiding significance for evaluating the malignant degree, metastatic potential and prognosis of laryngeal carcinoma.

[Key words] Laryngeal carcinoma; Toll like receptor 4; Transcription factor 21; mRNA; Pathological features

喉癌是临床较常见的咽喉恶性肿瘤,发生率占全身恶性肿瘤的 5% ~ 7%,且有侵袭能力强、易复发、易转移、预后差等特点,严重威胁着患者身心健康^[1]。早期喉癌采用手术、放化疗、基因疗法等综合手段进行治疗,可获得较好的疗效,但大多数患者在确诊时病情已进展到中晚期,疗效欠佳。因此,了解喉癌的生长、转移机制,及早确诊对于患者治疗及预后改善具有重要的意义。近年来,随着喉癌发生率逐渐升高,恶性肿瘤发生发展的分子机制引起学者的重视。TOLL 样受体 (TLRs) 是核因子 κ B (NF- κ B) 的潜在激活剂,已有大量研究证实其是炎症病变与恶性肿瘤发生间的桥梁^[2],在胰腺癌、肺癌中呈高表达^[3]。转录因子 21 (TCF21) 属于碱性螺旋-环-螺旋 (bHLH) 蛋白家族成员之一,对促进细胞生长、分化具有一定的调控作用,当前已被证实其在肺癌、乳腺癌、肾癌等多种癌症中可作为抑癌基因参与肿瘤发生发展^[4]。然而,关于 TLR4、TCF21 在喉癌中的具体表达情况及其临床意义、相关机制等仍未明确。本研究旨在探究 TLR4 mRNA、TCF21 mRNA 在喉癌组织中的表达情况,初步分析潜在机制,为喉癌的临床诊断及治疗提供新依据。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选择 2018 年 11 月至 2020 年 6 月南充市中心医院收治的 95 例喉癌患者为研究对象,术前均完善颈部增强 CT、电子纤维喉镜、病理活检确诊为喉鳞状细胞癌,且在手术前未接受过放化疗。其中男性 86 例,女性 9 例;年龄 45 ~ 76 岁,平均 (58.09 ± 7.55) 岁;癌症位置:声门型 59 例,声门上型 30 例,声门下型 6 例;组织学分化:低分化 40 例,中分化 29 例,高分化 26 例;淋巴结转移情况: N_0 37 例, N_1 36 例, N_2 22 例;浸润深度: T_{1-2} 69 例, T_{3-4} 26 例;临床分期:I 期 41 例,II 期 34 例,III 期 12 例,IV 期 8 例。在手术过程中,留取喉癌组织以及距离喉癌 3 ~ 6cm 的癌旁正常组织作为实验样本,样本取出后迅速将其存放到装有 RNALATER 溶液的冻存管中,在 -80 °C 中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 仪器和试剂 PCR 扩增仪 (美国应用生物系统公司);微量高速离心机 (上海锦玟仪器设备有限公司);可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司)。TRIzol 总 RNA 提取试剂 (上海联迈生物工程

有限公司);TCF21、TLR4 引物序列 (上海英骏生物技术有限公司);cDNA 第一链合成试剂盒 (上海烜雅生物科技有限公司);invitrogen 反转录试剂盒 (北京优尼康生物有限公司);cDNA 逆转录试剂盒 (北京百奥莱博科技有限公司)。

1.2.2 TLR4 mRNA、TCF21 mRNA 表达水平测定

采用 RT-PCR 技术,具体如下:(1)总 RNA 提取:提取样本组织中的总 RNA,严格按照 TRIzol 总 RNA 提取试剂说明书进行操作。取 2 μ L RNA 样本,用 SP-723/723 PC 可见分光光度计在 260 nm 下的吸光度测定定量样本组织中定量 RNA 浓度。检测 RNA 在 260 nm、280 nm 下的吸光度分析 RNA 纯度测定,记录 OD260/OD280,所有样本的 OD260/OD280 比值要求为 1.7 ~ 2.0,低于此必须提示提取的 RNA 含有蛋白质杂质,需应用氯仿重新提纯。同时应用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。(2)cDNA 合成:以总 RNA 作为模板,应用 invitrogen 反转录试剂盒合成 cDNA。取 0.2 mL 经 DEPC 处理过的 PCR 管,冰浴条件下在 PCR 管内配置反转录反应液。(3)RT-qPCR 反应:按照 cDNA 逆转录试剂盒说明书进行 TLR4 和 TCF21 引物合成操作。在 PCR 管内依次加入:1 μ L 反转录产物,基因上游与下游引物各 0.25 μ L,PCR 反应 mix 12.5 μ L,并加入 ddH₂O 是管内溶液体积达到 25 μ L。混匀 PCR 管内溶液,将其置于 PCR 仪中按照反应条件 (95 °C 2 min,95 °C 15 s,58 °C 45 s,共 28 个循环)完成 RT-qPCR 反应。反应结束后,将样品存放到 -20 °C 冰箱中备用。内参 GAPDH 引物 (扩增片段 116 bp),上游序列:5'-CTC AGA CAC CAT GGG GAA GGT GA-3',下游序列:5'-ATG ATC TTG AGG CTG TTG TCA TA-3';TLR4 引物 (扩增片段 356 bp),上游序列 TLR4:5'-GCC GGA AAG TTA TTG TGG TGG T-3',下游序列:5'-ATG GGT TTT AGG CGC AGA GTT T-3';TCF21 引物 (扩增片段 127bp),上游序列:5'-TGC GTT CGC TAC ATA CAA GGT G-3',下游序列:5'-TCT GTG ACT TGG CGT CTC GG-3'。(4)计算 TLR4 mRNA、TCF21 mRNA 表达水平:同一样本不同基因在不同 PCR 管中机械能,扩增后对扩增曲线、溶解曲线进行分析,获得循环阈值 (C_T 值),最后通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算 TLR4 mRNA、TCF21 mRNA 在喉癌组织内相对表达水平 ($\Delta\Delta C_T$ 值 = 喉癌组织 ΔC_T (目的基因) - 癌旁组织 ΔC_T (目的基因), ΔC_T 值 = C_T 目的基因 - C_T 内参基因)。

1.3 观察指标

(1) 喉癌组织、癌旁组织中 TLR4 mRNA、TCF21mRNA 表达水平;(2) TLR4 mRNA、TCF21 mRNA 表达水平与喉癌患者组织分化程度、淋巴结转移情况、临床分期、病理特征、浸润深度等临床病理特征的关系。(3) 喉癌组织中 TLR4 mRNA、TCF21 mRNA 表达水平的相关性。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析与处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以[$n(\%)$]表示,采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Pearson 相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 喉癌组织与癌旁组织 TLR4 mRNA、TCF21 mRNA 表达水平比较

喉癌组织的 TLR4 mRNA 表达水平高于癌旁正

常组织($P < 0.05$),而喉癌组织 TCF21 mRNA 表达水平较癌旁正常组织降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 喉癌组织与癌旁组织 TLR4、TCF21mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组织	TLR4 mRNA	TCF21 mRNA
喉癌组织($n=95$)	10.54 ± 2.73	0.53 ± 0.21
癌旁组织($n=95$)	8.04 ± 2.03	1.08 ± 0.24
t 值	7.143	16.590
P 值	<0.001	<0.001

2.2 喉癌组织不同病理特征 TLR4、TCF21mRNA 表达水平比较

在喉癌组织中,TLR4 mRNA、TCF21 mRNA 表达水平与癌组织分化程度、浸润深度、淋巴结转移、临床分期的差异有统计学意义($P < 0.05$),而在病灶位置、肿瘤大小、病理形态的差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 喉癌组织不同病理特征 TLR4、TCF21mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

病理特征	例数	TLR4 mRNA	t/F 值	P 值	TCF21 mRNA	t/F 值	P 值
病灶位置			0.124	0.884		10145	0.323
声门型	59	10.08 ± 2.06			0.50 ± 0.13		
声门上型	30	9.88 ± 2.34			0.47 ± 0.10		
声门下型	6	10.26 ± 1.95			0.44 ± 0.11		
癌组织分化程度			59.969	<0.001		30.025	<0.001
高分化	40	8.32 ± 1.79			0.67 ± 0.19		
中分化	29	11.21 ± 1.79			0.50 ± 0.17		
低分化	26	13.21 ± 1.88			0.35 ± 0.12		
肿瘤大小			1.003	0.319		0.914	0.363
<5 cm	42	9.34 ± 2.17			0.46 ± 0.15		
≥5 cm	53	9.76 ± 1.91			0.43 ± 0.14		
病理形态			1.401	0.248		2.617	0.056
菜花型	17	9.48 ± 1.98			0.45 ± 0.08		
溃疡型	40	9.92 ± 2.06			0.37 ± 0.15		
结节型	25	9.25 ± 2.26			0.46 ± 0.12		
包块型	13	10.67 ± 2.50			0.41 ± 0.12		
浸润深度			3.707	<0.001		6.454	<0.001
T_{1-2}	69	9.28 ± 2.11			0.50 ± 0.11		
T_{3-4}	26	11.41 ± 3.34			0.33 ± 0.12		
淋巴结转移			8.929	<0.001		23.199	<0.001
N_0	37	9.12 ± 2.57			0.52 ± 0.11		
N_1	26	10.60 ± 2.02			0.39 ± 0.13		
N_2	22	11.56 ± 1.72			0.31 ± 0.11		
临床分期			13.747	<0.001		14.434	<0.001
I 期	41	8.90 ± 1.69			0.54 ± 0.14		
II 期	34	9.93 ± 1.46			0.46 ± 0.12		
III 期	12	11.04 ± 0.82			0.34 ± 0.08		
IV 期	8	12.0 ± 1.12			0.31 ± 0.11		

2.3 喉癌组织中 TLR4 mRNA、TCF21 mRNA 表达水平与各种病理特征的相关性

相关性分析显示,喉癌组织中 TLR4 mRNA 表达水平与癌组织分化程度呈负相关,与浸润深度、淋巴结转移、临床分期呈正相关 ($P < 0.05$); TCF21 mRNA 表达水平与组织分化程度呈正相关,与浸润深度、淋巴结转移、临床分期呈负相关 ($P < 0.05$); 癌组织的 TLR4 mRNA 表达水平与 TCF21 mRNA 表达呈负相关性 ($r = -0.454, P < 0.001$)。见表 3。

表 3 喉癌组织中 TLR4、TCF21 mRNA 表达水平与各种病理特征的相关性

	癌组织分化程度		浸润深度		淋巴结转移		临床分期	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
TLR4 mRNA	-0.749	<0.001	0.359	<0.001	0.393	<0.001	0.558	<0.001
TCF21 mRNA	0.628	<0.001	-0.556	<0.001	-0.576	<0.001	-0.559	<0.001

3 讨论

在临床上,早期喉癌容易被漏诊,但此阶段的病灶经手术、化疗治疗后会达到临床治愈的标准,而中晚期喉癌虽易确诊,但患者即使进行综合手段治疗后仍会有呼吸、吞咽、发音功能障碍等问题,使其生存率、生存质量严重降低^[5]。因此,早期诊断早治疗至关重要。当前,关于喉癌病因的相关研究报道较多,但其分子机制尚无明确的研究结果,而且针对喉癌的基因疗法、靶向治疗效果仍有效,故在分子水平上对喉癌的发生、发展机制进行研究为临床热门话题,能够在一定程度上提升喉癌的诊治水平^[6]。

文献报道^[7]慢性炎症可显著升高癌症的发生风险,Toll 样受体 (TLR) 家族为参与非特异性免疫的模式识别受体,其能够介导机体免疫反应、慢性炎症反应的发生发展而且对肿瘤生物学特性也有一定的影响^[8]。TLR4 为 I 型跨膜蛋白受体,定位于 17 号染色体,TLR4 在前炎症因子与特异性配体结合后可被激活,使 TLR4 信号传导至下游通路,促使炎症反应发生,与此同时也能够诱导细胞增殖、分化^[9]。大量研究证实 TLR4 可经过多种方式参与肿瘤发生、发展^[10]。相关研究^[11]指出,炎性配体可通过 TLR4 信号通路使体内的 NF- κ B 被激活,进而参与炎症发展为肿瘤这一病理过程。Galle 等^[12]研究显示,HSP70 1A 蛋白为炎症的内生性配体之一,其能够促使癌细胞的 TLR4 表达水平升高,释放大量的 HMGB1 物质,进而通过 TLR4 通过激活 NF- κ B,增强 Hep-2 喉癌细胞凋亡抵抗性,促使癌细胞增殖分化。本研究结果显示,喉癌组织中的 TLR4 mRNA

表达水平较癌旁正常组织要高 ($P < 0.05$),且其表达水平与癌组织分化程度呈负相关,与浸润深度、淋巴结转移、临床分期呈正相关 ($P < 0.05$),可能与 TLR4 与自身配体结合后产生的一系列级联反应有关。TLR4 可通过一系列信号转导(如髓样分化因子 88 依赖途径和非依赖途径),上调抗原递呈细胞,激活特异性免疫应答,帮助机体抵抗病原微生物的感染和修复损伤的组织,但是当 TLR4 传导通路持续或异常活化可能会介导炎症通路,引起炎症反应,促使肿瘤免疫逃逸。Shyam 等^[13]的研究也发现,TLR4 信号通路能够刺激 TNF- α 等促炎物质大量分泌,进而参与到肿瘤新生血管形成,或促使癌细胞黏附、迁移,导致癌细胞侵袭、转移,进一步说明了 TLR4 mRNA 可能参与喉癌的发生、发展。

本研究还发现喉癌组织的 TCF21 mRNA 表达较癌旁组织要低 ($P < 0.05$),且其表达水平与癌组织分化程度呈正相关,与浸润深度、淋巴结转移、临床分期呈负相关 ($P < 0.05$)。TCF21 为近年新发现的抑癌基因中的一种,属于 bHLH 家族成员之一,被证实可影响细胞增殖、分化等生理过程的转录调控因子^[14]。Wei 等^[15]的研究发现约有 80% 以上的喉癌患者会出现 TCF21 甲基化或 TCF21 表达下调,也正式由于其表达下调致使细胞 DNA 修复基因的生理功能异常,难以及时修复损伤 DNA 结构,对细胞生长分化产生一定抑制作用,进而引起抑制细胞异常增殖的能力有所降低,诱发癌症。另有研究^[16-17]报道,过表达 TCF21 能够通过细胞周期、细胞凋亡相关因子的表达水平产生调控作用,进而阻止人喉癌细胞株 Hep-2 增殖分化,促进细胞凋亡,故 TCF21 可成为喉癌诊断或靶向治疗的潜在作用位点。此外,本研究显示癌组织的 TLR4 mRNA 表达水平与 TCF21 mRNA 表达呈负相关性 ($r = -0.454, P < 0.001$),提示 TCF21 能够负性调节喉癌组织 TLR4 表达,并可抑制细胞的侵袭、转移能力,但其具体机制仍有待进一步深入研究。

综上,TLR4 高表达、TCF21 低表达在喉癌发生发展过程中发挥着重要的作用,两者具有一定的相关性,相互作用可能促进喉癌细胞恶性增殖分化,故检测 TLR4、TCF21 表达水平有望成为喉癌患者病理特征判断的主要生物学指标,为本病诊疗提供可靠的依据。

参考文献

- [1] 雷大鹏,潘新良.中晚期喉癌的治疗选择[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2019,54(5):398-400.
- [2] 魏蓉,李新月.miRNA 与 TLRs 信号通路在牙周病发生发展过程中作用机制的研究进展[J].北京口腔医学,2020,28(6):

355 - 358.

- [3] Idris K, Gonul KS, Tugba S, *et al.* Variations in Toll-like Receptor and Nuclear Factor-Kappa B Genes and the Risk of Glioma[J]. *Br J Neurosurg*, 2019, 33(2):165 - 170.
- [4] Yang X, Ren Y, Yue C, *et al.* Overexpression of OsbHLH107, a Member of the Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family, Enhances Grain Size in Rice (*Oryza Sativa L.*) [J]. *Rice (N Y)*, 2018, 11(1):41.
- [5] 蔡波. 三种不同手术方式治疗早期声门型喉癌的疗效及对患者呼吸功能、吞咽功能和发音情况的影响[J]. *中国医师杂志*, 2019, 21(7):1078 - 1080.
- [6] 张红蕾, 李大鹏, 李佳, 等. 喉癌分子切缘及临床因素与喉癌预后相关性[J]. *医学临床研究*, 2018, 35(5):886 - 888, 892.
- [7] Chin-Yap L, Aditya A, Ahmed FN, *et al.* Signal Transducer and Activator of Transcription (STATs) Proteins in Cancer and Inflammation: Functions and Therapeutic Implication [J]. *Front Oncol*, 2019, 21(9):48.
- [8] 江现强, 曾家耀. Toll 样受体与肿瘤相关性及其在靶向治疗中的作用研究进展[J]. *广西医学*, 2018, 40(19):2328 - 2331.
- [9] 李婷, 邓树豪, 董昭兴. Toll 样受体 4 与肺纤维化相关的研究进展[J]. *医学综述*, 2019, 25(17):3371 - 3375.
- [10] 张询, 袁彩霞, 林园园, 等. 晚期糖基化终末产物 AGEs 通过牙周膜成纤维细胞的 TLR4 途径促进牙周炎症[J]. *口腔医学研究*, 2020, 36(11):1007 - 1011.
- [11] 贺娜, 胡辉歌, 麻婧, 等. TLR4/NF- κ B 信号通路分子在胃癌中的表达及其与胃癌临床病理特征的相关性[J]. *胃肠病学*, 2018, 23(2):88 - 91.
- [12] Galle WK, Eric H, Suzanne H, *et al.* Spatiotemporal Expression of Endogenous TLR4 Ligands Leads to Inflammation and Bone Erosion in Mouse Collagen-Induced Arthritis [J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(11):2629 - 2638.
- [13] Shyam KB, Anurag P, Vishnu CR, *et al.* Chemotherapy Induces Secretion of Exosomes Loaded With Heparanase That Degrades Extracellular Matrix and Impacts Tumor and Host Cell Behavior [J]. *Matrix Biol*, 2018, (65):104 - 118.
- [14] 王美玲. TCF21 在非小细胞肺癌组织中的表达及其对肺癌细胞迁移能力的影响[J]. *国际呼吸杂志*, 2018, 38(22):1685 - 1688.
- [15] Wei J, Zhang L, Li J, *et al.* MicroRNA-205 promotes cell invasion by repressing TCF21 in human ovarian cancer [J]. *J Ovarian Res*, 2017, 10(1):33.
- [16] 杨庆军. TCF21 对喉癌 Hep-2 细胞生物学行为的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(8):1576 - 1582.
- [17] 郑末. TCF21 基因与肿瘤关系的研究进展[J]. *现代诊断与治疗*, 2016, 27(2):228 - 229.