

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.08.020

NTN4 对肾透明细胞癌的临床应用价值

杨广建

山东省聊城市人民医院检验科,山东聊城 252000

摘要:目的 探讨神经导向因子 4 (NTN4) 在肾透明细胞癌 (ccRcc) 中的临床应用价值。方法 运用 TCGA、UALCAN 和 HPA 数据库,比较 NTN4 的信使 RNA (mRNA) 在癌旁组织及 ccRcc 组织中的表达水平,以及 NTN4 蛋白在正常肾脏组织和 ccRcc 组织中的表达水平,采用 survminer 包的 surv_cutpoint() 函数确定 NTN4 表达水平的最佳截断值,并以此为截点将患者分为 NTN4 高表达组与 NTN4 低表达组,并分析 NTN4 表达水平与 ccRcc 患者临床特征的关系及其对 ccRcc 患者预后的影响。绘制受试者工作特征 (ROC) 曲线分析 NTN4 对 ccRcc 的诊断价值。采用 Kaplan-Meier 生存曲线和 Log-Rank 检验分析 NTN4 高表达组和 NTN4 低表达组的生存情况。采用单因素和多因素 Cox 回归分析 ccRcc 预后的危险因素。比较 ccRcc 组织和正常肾脏组织的 NTN4 的启动子甲基化水平 (Beta 值),利用基因集富集分析 (GSEA) 探讨 NTN4 在 ccRcc 组织中的潜在机制并构建列线图预测模型,且采用 Calibration 校准曲线进行模型验证。结果 从 TCGA 数据库中筛选出 72 例癌旁组织和 533 例 ccRcc 组织样本数据 (其中 72 例样本为配对组织)。533 例 ccRcc 组织中 NTN4 的 mRNA 表达水平低于癌旁组织,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 72 例配对 ccRcc 组织中 NTN4 的 mRNA 表达水平低于癌旁组织,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。UALCAN 数据库分析结果显示,ccRcc 组织中 NTN4 蛋白表达水平低于正常肾脏组织,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。NTN4 高表达组有 384 例患者,NTN4 低表达组有 149 例患者。NTN4 低表达组和 NTN4 高表达组 ccRcc 患者组织学分级、病理学分期、肿瘤大小及局部浸润范围 (T 分期)、远处转移情况 (M 分期) 比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。ROC 曲线分析结果显示,NTN4 诊断 ccRcc 的曲线下面积为 0.881 (95% CI: 0.847~0.916),最佳截断值为 6.68,灵敏度为 0.65,特异度为 0.94。Kaplan-Meier 生存曲线分析结果显示,NTN4 高表达组 ccRcc 患者的预后情况优于 NTN4 低表达组 ccRcc 患者 ($P < 0.05$)。单因素与多因素 Cox 回归分析结果显示,NTN4 低表达、年龄 > 60 岁、M 分期为 M1 是 ccRcc 患者预后不良的独立危险因素 ($P < 0.05$)。与正常肾脏组织相比,ccRcc 组织中 NTN4 的 Beta 值明显升高 ($P < 0.05$)。列线图模型的 Calibration 校准曲线分析结果显示,列线图模型的 C-index 为 0.728。GSEA 结果显示,NTN4 相关基因主要富集在 RNA 剪接、胞吞作用、泛素介导的蛋白质降解、神经营养因子信号通路等相关途径。结论 NTN4 在 ccRcc 组织中表达水平下降,且有望作为预测 ccRcc 患者预后的生物标志物。

关键词:肾透明细胞癌; 神经导向因子 4; 癌症基因组图谱; 诊断; 预后

中图法分类号: R737.11

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2024)08-1123-07

Clinical application value of NTN4 in clear cell renal cell carcinoma

YANG Guangjian

Department of Clinical Laboratory, Liaocheng People's Hospital, Liaocheng, Shandong 252000, China

Abstract: Objective To investigate the clinical application value of nerve guidance factor 4 (NTN4) in clear cell renal cell carcinoma (ccRcc). **Methods** TCGA, UALCAN and HPA databases were used to compare the expression level of NTN4 messenger RNA (mRNA) in adjacent tissues and ccRcc tissues, and the expression level of NTN4 protein in normal kidney tissues and ccRcc tissues. The surv_cutpoint() function of survminer package was used to determine the best cut-off value of NTN4 expression level, and the patients were divided into NTN4 high expression group and NTN4 low expression group according to the best cut-off value. The relationship between NTN4 expression level and clinical characteristics of ccRcc patients and its effect on prognosis of ccRcc patients were analyzed. Receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn to analyze the diagnostic value of NTN4 in ccRcc patients. Kaplan-Meier survival curve and Log-Rank test were used to analyze the survival of NTN4 high expression group and NTN4 low expression group. Univariate and multivariate Cox regression analysis were used to analyze the risk factors of ccRcc prognosis. NTN4 promoter

methylation level (Beta value) was compared between ccRcc and normal kidney tissues. Gene set enrichment analysis (GSEA) was used to explore the potential mechanism of NTN4 in ccRcc tissues and construct a nomogram prediction model, and Calibration curve was used to verify the model. **Results** A total of 72 adjacent tissues and 533 ccRcc tissues (including 72 paired tissues) were selected from TCGA database. The expression level of NTN4 mRNA in 533 ccRcc tissues was significantly lower than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). The expression level of NTN4 mRNA in 72 ccRcc tissues was significantly lower than that in adjacent non-cancerous tissues ($P < 0.05$). The results of UALCAN database analysis showed that the expression level of NTN4 protein in ccRcc tissues was significantly lower than that in normal kidney tissues ($P < 0.05$). There were 384 patients in the NTN4 high expression group and 149 patients in the NTN4 low expression group. There were significant differences in histological grade, pathological stage, tumor size, local invasion (T stage) and distant metastasis (M stage) between NTN4 low expression group and NTN4 high expression group ($P < 0.05$). ROC curve analysis showed that the area under the curve of NTN4 for the diagnosis of ccRcc was 0.881 (95%CI: 0.847–0.916). The best cut-off value was 6.68, the sensitivity was 0.65, and the specificity was 0.94. Kaplan-Meier survival curve analysis showed that the prognosis of ccRcc patients in the NTN4 high expression group was better than that in the NTN4 low expression group ($P < 0.05$). Univariate and multivariate Cox regression analysis showed that low expression of NTN4, age > 60 years and M stage of M1 were independent risk factors for poor prognosis of ccRcc patients ($P < 0.05$). Compared with normal kidney tissues, the Beta value of NTN4 was significantly increased in ccRcc tissues ($P < 0.05$). The Calibration curve analysis results of the nomogram prediction model showed that the C-index of the nomogram model was 0.728. GSEA results showed that NTN4-related genes were mainly enriched in RNA splicing, endocytosis, ubiquitin-mediated protein degradation, neurotrophic factor signaling pathway and other related pathway. **Conclusion** The expression of NTN4 is decreased in ccRcc, and it may be used as a biomarker for predicting the prognosis of ccRcc patients.

Key words: clear cell renal cell carcinoma; neural guidance factor 4; the cancer genome atlas; diagnosis; prognosis

肾癌是泌尿系统常见肿瘤之一,且发病率呈逐年上升趋势,肾透明细胞癌(ccRcc)是最常见的肾癌类型,占原发性肾癌的60%~80%^[1]。由于ccRcc对化疗药物不敏感,所以局灶性ccRcc主要的治疗方式为手术切除,这也导致ccRcc晚期患者的治疗方式有限^[2]。近年来,随着对ccRcc分子生物学和遗传学的深入研究,ccRcc靶向治疗和免疫检查点抑制剂治疗取得了多项突破和重大进展^[1]。目前,晚期ccRcc的治疗方式已经从既往经典的靶向治疗发展到靶向免疫联合治疗^[3]。然而,联合治疗会增加患者不良反应管理难度和经济负担^[2]。因此,深入研究ccRcc的病理、生理机制,发现新的生物标志物和治疗靶点,对早期诊断、治疗和改善ccRcc患者的预后具有重要意义。神经导向因子4(NTN4)最初被认为是神经元发育过程中分泌的层粘连蛋白样轴突引导蛋白,在除中枢神经系统外的非神经细胞中广泛表达,并通过调节多种细胞功能从而影响组织发育和肿瘤进展^[4]。已有研究证明NTN4可参与多种肿瘤的进展和转移过程,并且根据不同癌症类型表现出“促肿瘤”和“抑肿瘤”的双重作用^[5],有望成为诊断肿瘤、预测预后的生

物标志物。迄今为止,NTN4在ccRcc发生、发展中的作用及其病理、生理机制,以及其表达水平与临床特征的关系尚未明确。因此,有必要探讨NTN4在ccRcc的病理、生理机制,以及其参与肿瘤调控的相关通路,寻找其上下游的关键调节因子。本研究以NTN4作为切入点,寻找ccRcc新的治疗靶点,如开发其上下游关键因子的抑制剂或激动剂以达到治疗目的。本研究分析了NTN4在ccRcc组织中的表达水平变化及其可能的调控机制,以及NTN4与临床病理特征的关系,评估了其对ccRcc的临床应用价值,构建了预后预测模型。此外,本研究进行了基因集富集分析(GSEA),从功能角度探讨了NTN4参与调控ccRcc发生、发展的潜在机制。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 数据来源 从TCGA数据库(<http://cancergenome.nih.gov/>)下载并整理ccRcc项目STAR流程的RNAseq数据,提取标准化后TPM(每千个碱基转录每百万映射读取的转录本)格式的数据(2023年3月下载的最新发布数据),同时下载ccRcc患者的临床数据。整合相关数据[NTN4的信使RNA(mR-

NA)表达水平、患者生存状态、随访时间、年龄、性别、组织学分级、病理学分期、肿瘤大小及局部浸润范围(T分期)、淋巴结受累程度(N分期)、远处转移情况(M分期)],去除重复及无临床信息的样本。

1.2 方法

1.2.1 NTN4 蛋白表达水平分析 利用 UALCAN 数据库(<http://ualcan.path.uab.edu>)分析正常肾脏组织和 ccRcc 组织中 NTN4 蛋白表达水平的差异。利用 HPA 数据库(<https://www.proteinatlas.org/>)查询 NTN4 蛋白在正常肾脏组织与 ccRcc 组织中的免疫组织化学染色结果。

1.2.2 GSEA 为了探讨 NTN4 在 ccRcc 组织中的潜在机制,本研究进行了 NTN4 基因表达水平与其他基因的 Pearson 相关分析,根据相关性对基因进行排序。从 GSEA 官方网站(<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>)下载“c2_cp.kegg.v2023.1.Hs.symbols”作为参考基因集。用 clusterProfiler 包(4.6.2 版本)进行 GSEA, P 校正方法为 Benjamini & Hochberg 法。筛选显著富集的基因集(校正后 $P < 0.05$ 和控制错误发现率 $q < 0.05$)。

1.2.3 NTN4 启动子甲基化水平分析 利用 UALCAN 数据库(<https://ualcan.path.uab.edu>)分析正常肾脏组织和 ccRcc 组织中 NTN4 启动子甲基化水平的差异。以 Beta 值表示 DNA 甲基化水平,范围从 0~1,Beta 值越高表示启动子甲基化水平越高。

1.2.4 NTN4 表达分组的最佳截断值选择 使用 survminer 包的 surv_cutpoint()函数确定 NTN4 表达水平的最佳截断值,并以此为截点将患者分为 NTN4 高表达组与 NTN4 低表达组。

1.2.5 预后模型构建及验证 使用 survival 包进行比例风险假设检验并进行 Cox 回归分析,筛选出独立危险因素,使用 rms 包构建列线图模型、Calibration 校正曲线(每次重复抽样的样本量为 200 例,抽样次数为 200 次),并分别进行可视化分析^[6]。

1.3 统计学处理 采用 R 4.2.2 统计软件进行数据分析处理。mRNA 表达水平转换方式为 $\log_2$ (TPM+1)。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;等级资料比较采用秩和检验。绘制受试者工作特征(ROC)曲线分析 NTN4 对 ccRcc 患者的诊断价值。采用 Kaplan-Meier 生存曲线和 Log-Rank 检验分析 NTN4 高表达组和 NTN4 低表达组的生存情况。采用单因素和多因素 Cox 回归分析影响 ccRcc 预后不良的危险因素。以 $P < 0.05$

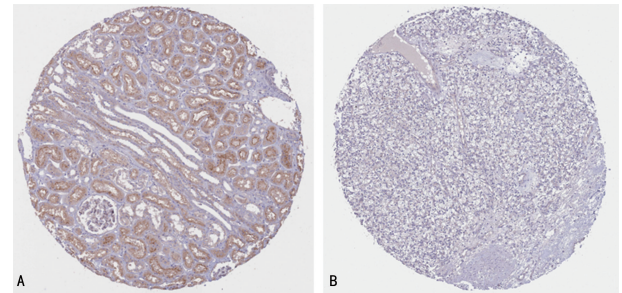
为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ccRcc 组织、癌旁组织中 NTN4 的 mRNA 表达水平比较 从 TCGA 数据库中筛选出 72 例癌旁组织和 533 例 ccRcc 组织样本数据(其中 72 例样本为配对组织)。533 例 ccRcc 组织中 NTN4 的 mRNA 表达水平(6.05 ± 1.30)低于癌旁组织(7.83 ± 0.88),差异有统计学意义($t = 10.53, P < 0.05$);72 例配对 ccRcc 组织中 NTN4 的 mRNA 表达水平(6.36 ± 1.27)低于癌旁组织(7.83 ± 0.88),差异有统计学意义($t = 8.28, P < 0.05$)。

2.2 ccRcc 组织、正常肾脏组织的 NTN4 蛋白表达水平比较 UALCAN 数据库分析结果显示,ccRcc 组织中 NTN4 蛋白表达水平[0.000(-0.690~0.811)]低于正常肾脏组织[2.087(1.789,2.537)],差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 NTN4 蛋白在正常肾脏组织与 ccRcc 组织中的免疫组织化学染色结果比较 HPA 数据库中免疫组织化学染色结果显示,正常肾脏组织中肾小管细胞抗体染色程度为中度水平,肾小球细胞抗体染色程度为低水平;ccRcc 组织中抗体染色均为阴性。见图 1。



注:A 为正常肾脏组织的免疫组织化学染色结果;B 为 ccRcc 组织的免疫组织化学染色结果。

图 1 NTN4 蛋白在正常肾脏组织与 ccRcc 组织中的免疫组织化学染色结果

2.4 NTN4 低表达组和 NTN4 高表达组 ccRcc 患者不同临床病理特征分布情况比较 经 survminer 包的 surv_cutpoint()函数确定 NTN4 表达水平的最佳截断值为 5.496,并以此为截点将患者分为 NTN4 高表达组(384 例)与 NTN4 低表达组(149 例)。NTN4 低表达组和 NTN4 高表达组 ccRcc 患者组织学分级、病理学分期、T 分期、M 分期情况比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而年龄、性别、N 分期比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.5 NTN4 对 ccRcc 的诊断及患者预后的预测价值 ROC 曲线分析结果显示,NTN4 诊断 ccRcc 患者的曲线下面积为 0.881(95%CI:0.847~0.916),最佳截断值为 6.68,灵敏度为 0.65,特异度为 0.94。NTN4 低表达组存活 69 例,死亡 80 例。NTN4 高表

达组存活 289 例,死亡 95 例。Kaplan-Meier 生存曲线分析结果显示,NTN4 高表达组 ccRcc 患者的预后情况优于 NTN4 低表达组 ccRcc 患者(Log-Rank $\chi^2=39.94,P<0.05$)。见图 2、3。

表 1 NTN4 低表达组和 NTN4 高表达组 ccRcc 患者不同临床病理特征分布情况比较[n(%)]

组别	n	年龄(岁)		n	性别	
		≤60	>60		女	男
NTN4 低表达组	149	70(46.98)	79(53.02)	149	50(33.56)	99(66.44)
NTN4 高表达组	384	194(50.52)	190(49.48)	384	138(35.94)	246(64.06)
χ^2/Z		0.538			0.266	
P		0.463			0.606	

组别	n	组织学分级			
		G1	G2	G3	G4
NTN4 低表达组	144	1(0.69)	39(27.08)	56(38.89)	48(33.33)
NTN4 高表达组	381	13(3.41)	190(49.87)	150(39.37)	28(7.35)
χ^2/Z		64.080			
P		<0.001			

组别	n	病理学分期			
		I 期	II 期	III 期	IV 期
NTN4 低表达组	148	42(28.38)	18(12.16)	50(33.78)	38(25.68)
NTN4 高表达组	382	225(58.90)	39(10.21)	73(19.11)	45(11.78)
χ^2/Z		43.154			
P		<0.001			

组别	n	T 分期			
		T1	T2	T3	T4
NTN4 低表达组	149	45(30.20)	23(15.44)	72(48.32)	9(6.04)
NTN4 高表达组	384	228(59.38)	46(11.98)	108(29.13)	2(0.52)
χ^2/Z		47.641			
P		<0.001			

组别	n	N 分期		n	M 分期	
		N0	N1		M0	M1
NTN4 低表达组	88	79(89.77)	9(10.23)	142	106(74.65)	36(25.35)
NTN4 高表达组	168	161(95.83)	7(4.17)	359	316(88.02)	43(12.00)
χ^2/Z		3.620			13.703	
P		0.057			<0.001	

注:部分样本临床病理特征资料不全。

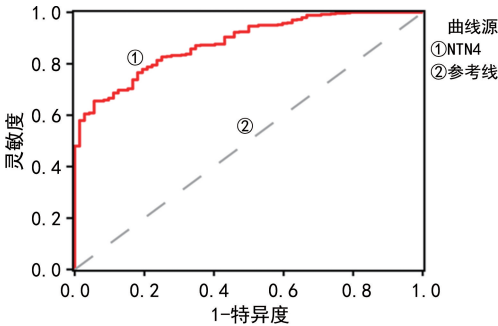


图 2 NTN4 诊断 ccRcc 的 ROC 曲线

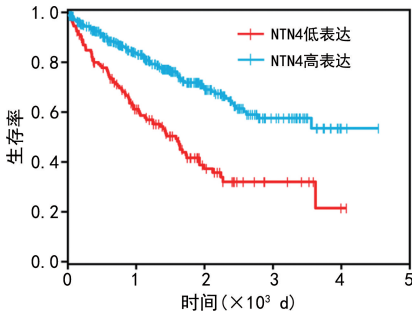


图 3 NTN4 预测 ccRcc 患者预后不良的 Kaplan-Meier 生存曲线

2.6 影响 ccRcc 患者预后的单因素与多因素 Cox 回归分析 533 例患者中,存活 358 例,死亡 175 例。单因素 Cox 回归分析结果显示,NTN4 的表达水平、年龄、组织学分级、T 分期、N 分期、M 分期、病理学分期是 ccRcc 患者预后的影响因素($P<0.05$)。以生存状态作为因变量(死亡=1,存活=0),将单因素 Cox 回归分析中差异有统计学意义的 T 分期(T1 和 T2=0, T3 和 T4=1)、N 分期(N0=0, N1=1)、M 分期

(M0=0,M1=1)、组织学分级(G1 和 G2=0,G3 和 G4=1)、病理学分期(I 期和 II 期=0, III 期和 IV 期=1)、年龄(≤ 60 岁=0, >60 岁=1)、NTN4(低表达=0,高表达=1)作为自变量,纳入多因素 Cox 回归分析,结果显示,NTN4 低表达、年龄 >60 岁、M 分期为 M1 是 ccRcc 患者预后不良的独立危险因素($P<0.05$)。见表 2。

表 2 影响 ccRcc 患者预后的单因素与多因素 Cox 回归分析

因素	单因素分析		多因素分析	
	HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
T 分期	3.112(2.301~4.210)	<0.001	1.442(0.637~3.262)	0.380
N 分期	3.268(1.737~6.149)	<0.001	1.325(0.653~2.690)	0.436
M 分期	4.297(3.150~5.862)	<0.001	2.820(1.670~4.764)	<0.001
病理学分期	3.784(2.760~5.188)	<0.001	1.083(0.432~2.719)	0.864
组织学分级	2.642(1.881~3.711)	<0.001	1.343(0.805~2.241)	0.259
年龄	1.807(1.331~2.454)	<0.001	1.601(1.044~2.455)	0.031
性别	0.940(0.691~1.279)	0.693	—	—
NTN4 表达	0.395(0.294~0.533)	<0.001	0.468(0.293~0.747)	0.001

注:—表示无数据。

2.7 ccRcc 组织和正常肾脏组织 NTN4 的 Beta 值比较及 GSEA ccRcc 组织 NTN4 的 Beta 值[0.043(0.037,0.050)]高于正常肾脏组织[0.033(0.029,0.040)],差异有统计学意义($P<0.05$)。GSEA 结果显示,NTN4 相关基因主要富集到 RNA 剪接、胞吞作用、泛素介导的蛋白质降解、神经营养因子信号通路等相关途径。

2.8 构建列线图预测模型 纳入 NTN4 表达、年龄、M 分期构建列线图模型,并绘制 Calibration 校准曲线,结果显示,列线图模型的 C-index 为 0.728(95%CI:0.709~0.747, $P<0.05$)。见图 4、5。

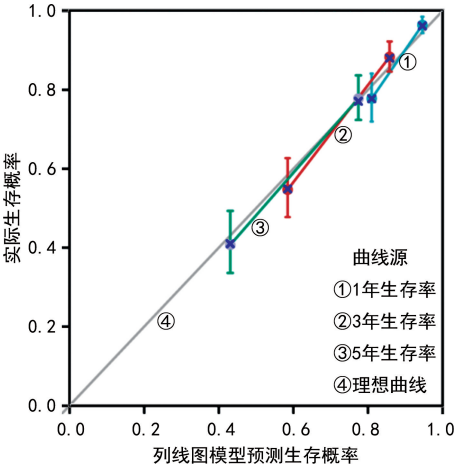


图 5 列线图模型的 Calibration 校准曲线

3 讨论

NTN4 在组织发育和肿瘤进展中发挥重要作用,已被证明通过多种信号通路影响肿瘤的发生与发展过程。然而,NTN4 的具体功能可能取决于疾病类型^[5],例如,在胃癌中,NTN4 通过受体激活 JAK/Stat3、Akt/PI3K 和 ERK/MAPK 信号通路促进胃癌细胞的增殖和侵袭^[7];在结直肠癌中,NTN4 结合其受体介导抗肿瘤血管生成,从而抑制肿瘤生长及侵袭^[8];在乳腺癌中,NTN4 通过抑制上皮-间质转化,降低基底膜刚度,阻断 Wnt/ β -catenin 通路抑制乳腺癌的发生和发展^[5]。尽管有上述这些研究,但 NTN4 在 ccRcc 组织中的表达水平及其临床意义仍不清楚。因

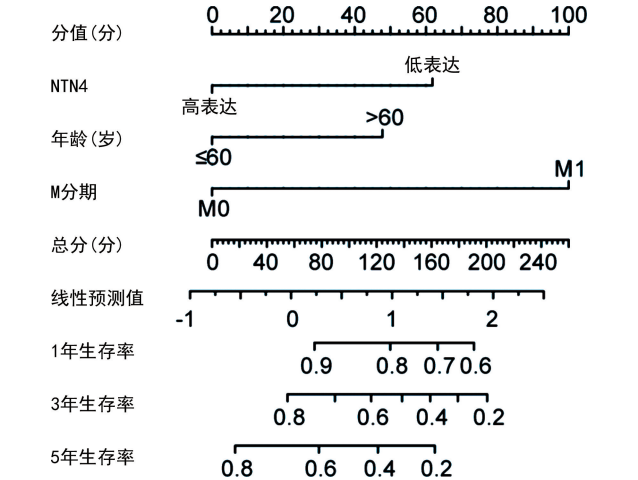


图 4 预测 ccRcc 患者预后的列线图模型

此,本研究运用高通量数据结合多组学技术,探讨了 NTN4 在 ccRcc 组织中的表达水平,分析了其对 ccRcc 患者预后的预测价值及 NTN4 在 ccRcc 中的潜在机制。

本研究结果显示,相比于癌旁、正常肾脏组织,ccRcc 组织中 NTN4 的 mRNA 表达水平和蛋白表达水平均下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。NTN4 启动子甲基化水平分析结果显示,相比于正常肾脏组织,ccRcc 组织中 NTN4 的 Beta 值升高,提示 ccRcc 组织中 NTN4 启动子甲基化水平升高,而启动子甲基化通常可以抑制转录,在一定程度上解释了 ccRcc 组织中 NTN4 表达水平降低的原因。ROC 曲线分析结果显示,在将 6.68 作为最佳截断值的情况下,NTN4 诊断 ccRcc 的灵敏度为 0.65,而特异度高达 0.94,说明 NTN4 检出 ccRcc 患者的能力一般,而排除患者的能力较强。因此,可以将检测 NTN4 表达水平作为排除诊断予以应用,同时 NTN4 也可联合其他指标辅助诊断 ccRcc。另外,本研究结果显示,NTN4 低表达组和 NTN4 高表达组 ccRcc 患者组织学分级、病理学分期、T 分期、M 分期情况比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),Kaplan-Meier 生存曲线分析结果显示,NTN4 高表达组 ccRcc 患者的预后情况优于 NTN4 低表达组($P < 0.05$)。单因素与多因素 Cox 回归分析结果也显示,NTN4 低表达、年龄 > 60 岁、M 分期为 M1 是 ccRcc 患者预后不良的独立危险因素($P < 0.05$)。本研究纳入上述 3 个独立危险因素构建了列线图预测模型,并绘制了 Calibration 校准曲线进行模型验证,结果显示,该模型 C-index 可达到 0.728,表明该模型可较准确地预测 ccRcc 患者的预后,表现出良好的临床适用性。提示 NTN4 可能在 ccRcc 的发生、发展中具有重要的调控作用,因此,本研究进行了 GSEA,结果显示,NTN4 可通过多种途径参与调控 ccRcc 的进展,如 RNA 剪接、胞吞作用、泛素介导的蛋白质降解、神经营养因子信号通路等。为揭示 NTN4 在 ccRcc 组织中发挥调控作用的潜在机制提供了方向。近年的研究表明,选择性剪接失调不是癌症的偶然关联,而是一种几乎普遍存在的基本分子特征,在肿瘤发生、发展过程中发挥重要作用。癌症相关剪接失调可通过多种机制促进肿瘤发生,包括促进细胞增殖、减少细胞凋亡、增强细胞迁移和转移潜能、抵抗化疗和免疫逃逸等^[9-10]。有研究表明,异质核糖核蛋白 A1 介导的含卷曲螺旋结构域蛋白 50 选择性剪接通过锌指蛋白 395 促进 ccRcc 的进展^[11]。胞吞作用已经从最初的营养吸收途径演化为复杂的多种胞吞途径,在营养供应、黏附、信号传导和细胞迁移等的调控中起重要作用,也可以影响药物稳

定性、治疗效果及免疫细胞功能。紊乱的胞吞作用具有致癌潜力,涉及癌症的发生、发展和调节^[12-13]。细胞胞吞途径的改变可改变细胞功能,影响肿瘤的许多特征。在肿瘤细胞中,每一种胞吞途径都可能失调,而不同类型肿瘤中的这些变化是异质性和复杂的。有研究报道,内吞介导的氨基酸补充促进嫌色肾癌的癌细胞增殖和存活^[14]。神经系统分布于全身,对运动、感觉、器官和组织的发育、稳态、再生及可塑均具有重要调控作用^[15-16],表明神经系统对癌症表型具有类似的调控作用。一系列恶性肿瘤的各种临床前模型表明,神经系统活动可以控制癌症的发生,并有力地影响癌症的进展和转移。同时,癌症也会重塑和劫持神经系统的结构和功能^[17]。在胰腺导管腺癌(PDAC)小鼠模型中观察到肿瘤交感神经控制释放的慢性应激诱导的去甲肾上腺素刺激 PDAC 细胞中表达的 β_2 肾上腺素能受体,从而促进神经生长因子和脑源性神经营养因子的表达和分泌,产生自分泌和旁分泌效应,共同加速肿瘤发生^[15]。蛋白质稳态包括获得正确的蛋白结构、定位和具有更高秩序的复合物,以及合适的蛋白水平,其对细胞功能至关重要,错误定位、含量过度或因错误折叠或其他损伤导致的异常都会损伤细胞。由泛素介导的蛋白降解系统(UPS)是调节蛋白稳态的关键过程,其紊乱可导致易发包括肿瘤在内的多种疾病。有研究人员认为,通过 UPS 中降解决定子突变和 E3 泛素连接酶突变可能参与至少 10% 的多系统肿瘤的发生和进展^[18-19]。另外有研究表明,蛋白酶体亚基通过泛素化降解 I κ B α 蛋白,激活核因子- κ B 信号转导通路,从而影响 ccRcc 的恶性进展^[20]。前面的分析显示 NTN4 在 ccRcc 中表现出“抑肿瘤”作用,作用机制可能为在生理浓度下 NTN4 通过相应结构域结合其配体,抑制下游“促肿瘤”信号通路(如在乳腺癌中,NTN4 通过阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制乳腺癌的发生和发展)或维持“抑肿瘤”信号通路激活,维持机体正常代谢。启动子 DNA 甲基化可影响转录并参与肿瘤形成。而在 ccRcc 组织中,NTN4 启动子甲基化水平明显升高,抑制 NTN4 表达,导致 RNA 剪接失调、胞吞作用紊乱、泛素介导的蛋白质降解异常、神经营养因子信号通路障碍等,各种因素共同导致 NTN4 不能发挥其“抑肿瘤”作用,从而造成 ccRcc 的发生与发展。因此,可以 NTN4 为切入点,寻找新的 ccRcc 治疗靶点,如寻找导致 NTN4 启动子甲基化水平升高的关键因子^[21],开发关键甲基转移酶的抑制剂或去甲基化酶的激动剂,降低其甲基化水平,提高 NTN4 表达水平;探寻 NTN4 下游通路的关键因子,开发其激动剂或抑制剂,抑制“促肿瘤”信号通路或激活“抑肿瘤”信号通路,从而达到抑制肿

瘤发生、发展的目的。然而,NTN4 上下游的关键调节因子仍未明确,其如何通过上述信号通路影响 ccRcc 的发生与进展的具体机制仍需进一步研究。

综上所述,NTN4 在 ccRcc 组织中的表达水平下降,与临床特征密切相关,而且可以作为预测 ccRcc 患者预后的生物标志物。构建的预测模型具有较好的准确度与临床应用价值。另外,也为 ccRcc 寻找新的治疗靶点提供了理论支持和方向。然而,本研究所用的数据来源于公共数据库,尚缺少基础试验的验证,存在一定的局限性。尽管如此,仍为 NTN4 在 ccRcc 组织中的作用机制提供了新的研究思路。

参考文献

[1] YU Z Y, LV Y F, SU C, et al. Integrative single-cell analysis reveals transcriptional and epigenetic regulatory features of clear cell renal cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2023, 83(5):700-719.

[2] LI Y Z, LIH T S M, DHANASEKARAN S M, et al. Histopathologic and proteogenomic heterogeneity reveals features of clear cell renal cell carcinoma aggressiveness[J]. Cancer Cell, 2023, 41(1):139-163.

[3] 李长岭, 齐隽, 陈立军, 等. 晚期肾透明细胞癌一线靶向治疗的优化选择中国专家共识[J]. 临床泌尿外科杂志, 2022, 37(5):329-337.

[4] LI L, HUANG Y L, GAO Y G, et al. EGF/EGFR upregulates and cooperates with Netrin-4 to protect glioblastoma cells from DNA damage-induced senescence[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1):1215.

[5] YANG H, TING X, GENG Y H, et al. The risk variant rs11836367 contributes to breast cancer onset and metastasis by attenuating Wnt signaling via regulating NTN4 expression[J]. Sci Adv, 2022, 8(23):eabn3509.

[6] TONG Y X, CUI Y K, JIANG L M, et al. Clinical characteristics, prognostic factor and a novel dynamic prediction model for overall survival of elderly patients with chondrosarcoma: a population-based study[J]. Front Public Health, 2022, 10:901680.

[7] LV B, SONG C H, WU L J, et al. Netrin-4 as a biomarker promotes cell proliferation and invasion in gastric cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(12):9794-9806.

[8] EVENO C, BROQUERES-YOU D, FERON J G, et al. Netrin-4 delays colorectal cancer carcinomatosis by inhibiting tumor angiogenesis[J]. Am J Pathol, 2011, 178(4):1861-1869.

[9] BRADLEY R K, ANCZUKÓW O. RNA splicing dysregulation and the hallmarks of cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2023, 23(3):135-155.

[10] MATSUSHIMA S, AJIRO M, IIDA K, et al. Chemical induction of splice-neoantigens attenuates tumor growth in a preclinical model of colorectal cancer[J]. Sci Transl Med, 2022, 14(673):eabn6056.

[11] SUN G L, ZHOU H, CHEN K, et al. HnRNP A1-mediated alternative splicing of CCDC50 contributes to cancer progression of clear cell renal cell carcinoma via ZNF395[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1):116.

[12] BANUSHI B, JOSEPH S R, LUM B, et al. Endocytosis in cancer and cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2023, 23(7):450-473.

[13] CHEN H Y, SONG H L, LUO Y F, et al. Transcytosis mediated deep tumor penetration for enhanced chemotherapy and immune activation of pancreatic cancer[J]. Adv Funct Mater, 2023, 33(28):2214937.

[14] XIAO Y, RABIEN A, BUSCHOW R, et al. Endocytosis-mediated replenishment of amino acids favors cancer cell proliferation and survival in chromophobe renal cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2020, 80(24):5491-5501.

[15] HANAHAN D, MONJE M. Cancer hallmarks intersect with neuroscience in the tumor microenvironment[J]. Cancer Cell, 2023, 41(3):573-580.

[16] SHI D D, GUO J A, HOFFMAN H I, et al. Therapeutic avenues for cancer neuroscience: translational frontiers and clinical opportunities[J]. Lancet Oncol, 2022, 23(2):e62-e74.

[17] MANCUSI R, MONJE M. The neuroscience of cancer[J]. Nature, 2023, 618(7965):467-479.

[18] MARTÍNEZ-JIMÉNEZ F, MUIÑOS F, LÓPEZ-ARRIBILLAGA E, et al. Systematic analysis of alterations in the ubiquitin proteolysis system reveals its contribution to driver mutations in cancer[J]. Nat Cancer, 2020, 1(1):122-135.

[19] LU Y, ZOU R R, GU Q, et al. CRNDE mediated hnRNP A2B1 stability facilitates nuclear export and translation of KRAS in colorectal cancer[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(9):611.

[20] HUANG T T, TIAN W, ZHOU Q Q, et al. Upregulation of Rpn10 promotes tumor progression via activation of the NF-κB pathway in clear cell renal cell carcinoma[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2021, 53(8):988-996.

[21] LIANG W W, LU R J H, JAYASINGHE R G, et al. Integrative multi-omic cancer profiling reveals DNA methylation patterns associated with therapeutic vulnerability and cell-of-origin[J]. Cancer Cell, 2023, 41(9):1567-1585.