

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.04.006

文章编号: 1005-8982(2016)04-0029-04

临床论著

核因子 E2 相关因子 2 在肺腺癌中的表达及临床意义

冯稳, 张冰, 于庆凯

[郑州大学附属肿瘤医院(河南省肿瘤医院) 病理科, 河南 郑州 450003]

摘要: **目的** 研究核因子 E2 相关因子 2(以下简称转录因子 Nrf2)在肺腺癌组织中的表达及临床意义。**方法** 收集本院胸外科手术治疗的肺腺癌组织标本 88 例,正常肺组织标本 20 例,应用免疫组织化学法,检测组织标本中 Nrf2 的表达水平。**结果** Nrf2 在正常肺组织中阳性表达率低于 10%,在肺腺癌组织中的阳性表达率为 69.3%,在有淋巴结转移的肺腺癌组织中 Nrf2 的阳性表达率为 73.3%。低分化组腺癌组 Nrf2 阳性表达率(84.6%)明显高于中分化组(76.4%)和高分化组(70.7%)。**结论** 转录因子 Nrf2 在肺腺癌组织中表达上调,与肺腺癌的组织分化程度、淋巴转移具有一定的相关性。

关键词: 肺;腺癌;Nrf2;免疫组织化学

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Expression and clinical significance of Nrf2 in pulmonary adenocarcinoma

Wen Feng, Bing Zhang, Qing-kai Yu

(Cancer Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Henan Provincial Cancer Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China)

Abstract: **Objective** To study the expression and clinical significance of signal molecule Nrf2 in pulmonary adenocarcinoma tissues. **Methods** 88 tissue samples of pulmonary adenocarcinoma and 20 normal lung tissues were collected as research subject. The expressions of Nrf2 in lung tissues were identified by immune histochemistry. **Results** The positive expression rate of Nrf2 was less than 10 % in normal lung tissue, while it was 69.3 % in tissue samples of pulmonary adenocarcinoma, and 73.3 % in samples combined with metastasis of lymph nodes. The positive expression rate of Nrf2 was higher in poorly differentiated group (84.6 %) than that in middle (76.4 %) and high differentiation group (70.7 %). **Conclusion** The expression of Nrf2 was upregulated in tissues of pulmonary adenocarcinoma, and it was related with the degree of differentiation and lymph node metastasis of lung adenocarcinoma.

Keywords: lung; adenocarcinoma; Nrf2; immune histochemistry

肺腺癌(lung adenocarcinoma)是肺癌的一种,属于非小细胞癌,是目前临床常见的肺癌类型,也是非吸烟人群中最常见的肺癌类型^[1]。随着我国工业化进程加快,雾霾等极端恶劣天气的增多,肺腺癌的发病率逐年增高且呈年轻化趋势,该病早期症状较少、发病迅猛、死亡率高,对患者身体健康造成严重影响,如何早期诊断及准确评价肿瘤的分期对于临床

治疗具有十分重要的意义。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2)(以下简称转录因子 Nrf2)是近些年新发现的协同刺激分子 B7 家族成员,具有独特的生物学功能,它广泛表达于多种肿瘤组织,却极少在正常人体组织中表达^[2],该特性对肿瘤的治疗及预后具有重要研究价值。因此,本实验应用免疫组织化学法检测 Nrf2 在肺腺癌

收稿日期:2015-09-08

[通信作者] 于庆凯, E-mail: yuqingkai@hotmail.com

组织中的表达并研究分析其在肺腺癌诊断及预后判断方面的临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集郑州大学附属肿瘤医院 2014 年 8 月-2015 年 8 月胸外科手术治疗的肺癌组织标本 88 例。其中,男性 42 例,女性 46 例;平均(64.31 ± 4.22)岁;低分化 13 例,中分化 34 例,高分化 41 例;所有患者均符合最新肺癌诊断标准^[1],来院前均未接受其他治疗。收集正常肺组织 20 例作为对照,其中女性 9 例,男性 11 例;平均(63.42 ± 3.72)岁,无肺系及其他脏器疾病,符合健康人群诊断标准。两者在性别、年龄方面差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 取材和病理切片的制备

手术切除新鲜肺组织标本后急送病理科,每例患者留取癌组织及癌旁正常肺组织标本各一块,以甲醛溶液固定 24 h 以上,制备石蜡包块,制作连续切片(厚度 $4 \mu\text{m}$,德国 Leica 切片),分别常规以苏木素-伊红(HE)染色、Nrf2 免疫组织化学染色,显微镜(Olympus 公司, BX43, 日本)下观察并拍照。

1.3 免疫组织化学染色法

采用 Vectastin ABC 试剂(VECTOR 实验室, NG EA CLSA),通过生物素-链菌卵白素-过氧化酶方法进行,切除的组织标本用甲醛溶液固定,石蜡包埋,组织切片的厚度为 $4 \mu\text{m}$,将其置于玻璃片上,用二甲苯脱蜡,在梯度乙醇内水化,在 900 w 微波加热 2 s,进行抗原修复后,于 0.3% 的过氧化氢 H_2O_2 中浸泡 30 min 阻断内源性抗原,用 PBS 洗 3 次,用 10% 正常的血清卵白以阻断背景非特异性的染色,加上一抗置于湿盒内孵育一夜。一抗为小鼠抗 Nrf2(1:1 000 稀释)(Abcam 公司,美国)。用 PBS 洗后,生物素包被的马抗鼠抗体孵育 30 min 后用 PBS 洗 3 次,再用卵白素连接的过氧化物酶孵育 30 min。与二氨基联苯胺(PAD)孵育后观察,然后用苏木素复染。以正常小鼠的 IgG 代替一抗作为阴性对照组。

1.4 Nrf2 的表达分析

通过光学显微镜分别观察在胞膜上和胞浆内计数阳性染色的细胞个数,分析 Nrf2 的表达情况。在 $\times 400$ 倍镜下随机选择 5 个肿瘤区域进行细胞计数。阳性细胞的密度根据阳性细胞的百分比来进行半定量分级:(-): 表达 $< 10\%$;(+): 表达 $10\% \sim$

30% ;(++) : 表达 $31\% \sim 60\%$;(+++): 表达 $61\% \sim 80\%$;(++++): 表达 $> 81\%$ 。根据染色情况,将这些标本分为两组:阴性($< 10\%$);阳性($10\% \sim 100\%$)。

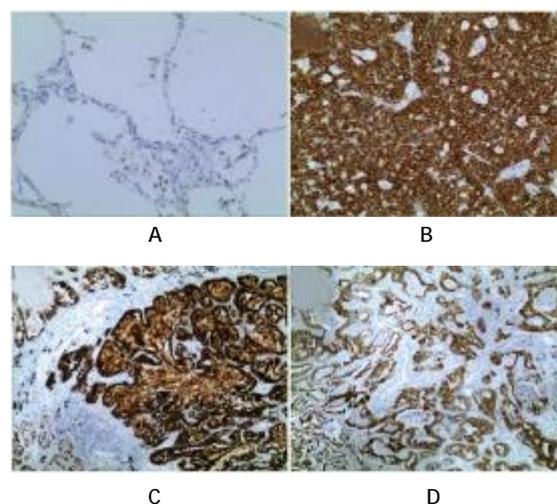
1.5 统计学方法

采用 SAS 分析软件包,通过 Fisher 精确检验来分析的 Nrf2 表达与临床病理因素之间的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Nrf2 在肺腺癌组织及正常肺组织中的表达

在正常肺组织中,几乎不表达 Nrf2(-)。但是 Nrf2 在肺腺癌细胞上的表达形式非常弥散,在细胞膜或胞浆内或在两者内均有表达。在低分化组肺腺癌组织 Nrf2 阳性表达(++++),显著高于中分化肺腺癌(+++)、高分化肺腺癌(++)。随机选择其中的 1 次检测结果见附图。



A: 正常肺组织阴性表达 Nrf2(-); B: 低分化肺腺癌组织阳性表达 Nrf2(++++); C: 中分化肺腺癌组织阳性表达 Nrf2(+++); D: 高分化肺腺癌组织阳性表达 Nrf2(++)。

附图 不同肺组织 Nrf2 免疫组织化学染色结果 ($\times 100$)

2.2 Nrf2 的表达与临床病理因素的相关性

Nrf2 的表达在肺腺癌患者的年龄、性别、有无吸烟史等因素方面差异无统计学意义($P > 0.05$),而在腺癌的分化程度、TNM 分期等方面差异有统计学意义($P < 0.05$)。组织病理检查结果发现,Nrf2 在 20 例正常肺组织中阳性表达率低于 10% ,在 88 例肺腺癌组织中的阳性表达率为 69.5% ,在合并有淋巴结转移的 60 例肺腺癌组织中 Nrf2 的阳性表达率为 73.3% 。低分化组肺腺癌组织 Nrf2 阳性表达率(84.6%)高于中分化组(76.5%)和高分化组(70.7%), $P = 0.021$ 。见附表。

附表 不同临床病理因素影响下 Nrf2 的表达情况

因素	例数	Nrf2 的表达 例(%)		F 值	P 值
		阳性	阴性		
年龄					
<60 岁	40	18(45.0)	22(55.0)	1.92	0.322
≥60 岁	48	25(52.1)	23(47.9)		
性别					
男	42	27(64.3)	15(35.7)	2.57	0.620
女	46	24(52.2)	22(47.8)		
吸烟史					
有	46	28(60.9)	18(39.1)	3.43	0.700
无	42	22(52.4)	20(47.6)		
肿瘤类型					
腺癌	88	61(69.3)	27(30.7)	8.91	0.045
分化程度					
低	13	11(84.6)	2(15.4)	9.03	0.021
中	34	26(76.5)	8(23.5)		
高	41	29(70.7)	12(29.3)		
淋巴结转移情况					
0	28	10(35.7)	18(64.3)	1.27	0.067
≥1	60	44(73.3)	16(26.7)		

3 讨论

我国每年新增约 100 万肺癌患者,80%的病理类型是非小细胞肺癌,其中又以肺腺癌的发病率上升最为明显,目前约占 40%以上^[4],多好发于女性及无吸烟史患者,目前发病率已居世界首位,严重威胁人类健康^[5-6]。早期诊断是防治此病的关键,目前随着生物技术的发展,针对肺腺癌的检测手段层出不穷,提高了临床诊断率。

在肿瘤的发生、发展过程,介导细胞免疫的主要是 T 淋巴细胞,而在 T 细胞活化、耐受的免疫调节过程中,B7-CD28 家族成员介导的 T 淋巴细胞共刺激信号传导途径起着至关重要的作用,它既可以正性调节增强 T 细胞免疫应答,也可以负性调节减弱 T 细胞的免疫应答,对于各种腺癌的治疗及预后具有重要的参考价值^[7]。NRF2 是最新发现的 B7-CD28 家族一员,人 Nrf2 位于第 9 号染色体 15q 24.1,由 7 个外显子和 6 个内显子组成,位于一个具有免疫调节功能的基因座内^[8]。可以通过与靶细胞表面相应受体结

合,抑制 T 细胞免疫应答,发挥负性调控的功能,在癌组织中异常表达,而在正常组织中不表达。本课题研究结果显示,Nrf2 在 20 例正常肺组织切片中阴性表达,而在 88 例肺腺癌组织标本中有 69.3%的阳性表达率,这表明 Nrf2 表达升高可以提示肿瘤的发生,可以作为检测腺癌的一个重要标记物。据近几年的研究表明,Nrf2 分子异常表达于肺癌、膀胱癌等组织内,与肿瘤的预后相关性^[9-10]。Nrf2 是一个转录因子,并可负性调节 T 细胞免疫介导的免疫反应,虽然其确切的机制尚不明确,但本课题实验结果证实合并有淋巴结转移的 60 例肺腺癌组织中 Nrf2 的阳性表达率为 73.3%,在低分化组肺腺癌组织 Nrf2 阳性表达率为 84.6%,显著高于中分化(76.5%)及高分化组(70.7%)。提示 Nrf2 表达水平与患者的年龄、性别、有无吸烟等无关,而与腺癌细胞的分化程度、淋巴结转移相关。根据最新研究^[11-13]证实,Nrf2 在肺癌、肝癌、胰腺癌中的表达与年龄、性别、肿瘤大小无相关性,而与生存期、肿瘤浸润程度、肿瘤组织类型相关,另据 Zhou 等^[14]研究表明,Nrf2 强表达的肝癌

患者发生远处转移的时间早,患者生存期短。Sasaki 等^[15]研究发现,Nrf2 基因突变与肺癌的预后有关。因此笔者推测在肺腺癌的诊断方面 Nrf2 具有独特的生物标记价值,有可能会成为评价肺腺癌分期和淋巴结转移的指标之一。

综上所述,Nrf2 具有独特的生物学特性,与肺腺癌的组织分化程度、淋巴转移具有一定的相关性,可以作为肺腺癌疾病诊断及预后的重要参考指标之一,但对 Nrf2 在肿瘤组织发生、发展过程的作用机制还有待进一步的研究。

参 考 文 献:

- [1] 卞春安,李忠佑,许有涛,等. 突变型 P53 蛋白在肺腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国肺癌杂志, 2015, 18(1): 23-28.
- [2] 郑文键,张协军,黄国栋. Nrf2 信号通路在各系统肿瘤中的研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2014, 8(19): 3520-3524.
- [3] 石远凯,孙燕,丁翠敏,等. 中国埃克替尼治疗非小细胞肺癌专家共识(2015 版)[J]. 中国肺癌杂志, 2015, 18(7): 397-400.
- [4] 于琳,张华. 2014 中国肺癌高峰论坛访谈录[J]. 循证医学, 2014, 14(3): 136-144.
- [5] 叶超,何斐,李晓玉,等. 女性非小细胞肺癌患者预后影响因素分析[J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41(7): 771-776.
- [6] 覃宇奇. 肺腺癌临床病理研究的进展情况[J]. 临床和实验医学杂志, 2015, 14(9): 783-785.
- [7] 冯稳,于庆凯,张冰,等. 共信号分子 B7-H3 在人肺腺癌中的表达及意义[J]. 广东医学, 2015, 36(12): 1869-1871.
- [8] Parker AS, Heckman MG, Sheinin Y, et al. Evaluation of B7-H3 expression as a biomarker of biochemical recurrence after salvage radiation therapy for recurrent prostate cancer [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011, 79(5): 1343-1349.
- [9] 朱翔,梁莉,柳晨,等. Nrf2 在 EGFR 基因突变肺腺癌中的表达及其与 EGFR-TKIs 疗效间的相关性研究[J]. 中国肺癌杂志, 2014, 17(2): 155-162.
- [10] Prasad KN. Simultaneous activation of nrf2 and elevation of dietary and endogenous antioxidant chemicals for cancer prevention in humans[J]. J Am Coll Nutr, 2015, 33(7): 1-10.
- [11] Bauer AK, Hill T 3rd, Alexander CM. The involvement of NRF2 in lung cancer [J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, 2: 746432.
- [12] 李春,邓晔,郭瑶雪,等. Nrf2/ARE 信号通路与肝脏疾病的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(4): 363-366.
- [13] Hayes AJ, Skouras C, Haugk B, et al. Keap1-Nrf2 signalling in pancreatic cancer[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2015, 65(8): 288-299.
- [14] Zhou Z, Luther N, Ibrahim GM, et al. B7-H3, a potential therapeutic target, is expressed in diffuse intrinsic pontine glioma[J]. J Neurooncol, 2013, 111(3): 257-264.
- [15] Sasaki H, Suzuki A, Shitara M, et al. Genotype analysis of the NRF2 gene mutation in lung cancer[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(5): 1135-1138.

(张蕾 编辑)