Keap1-Nrf2-ARE 信号通路在胃腺癌细胞中的表达及意义

沈　磊[1]，张平平[2]，杨海涛[3]

（1.合肥市第三人民医院，安徽 合肥 230001；2.安徽医科大学基础医学院，安徽 合肥 230001；3.安徽医科大学第三附属医院，安徽 合肥 230001）

摘　要：［目的］检测 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路相关蛋白在胃腺癌组织中的表达，探讨其作用和临床意义。［方法］选择 64 例胃腺癌组织，对应的癌旁组织为对照，应用免疫组织化学的方法检测癌组织及对照组织中细胞核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）以及抗氧化应答元件(ARE)的表达。［结果］胃癌组织中 Nrf2、ARE 的表达水平分别为 1.78±0.34、1.69±0.45，均显著高于癌旁组织(0.47±0.16、0.52±0.22)，差异有统计学意义（P<0.001）。胃癌低/中分化患者中，Nrf2、ARE 的阳性表达率分别为 79.1%、88.4%，均显著高于高分化患者（P<0.05）；TNM 分期Ⅲ、Ⅳ期患者 Nrf2、ARE 的阳性表达率分别为 81.4%和 90.7%，均显著高于Ⅰ、Ⅱ期患者，差异有统计学意义（P<0.05）；有淋巴结转移患者 Nrf2、ARE 的阳性率分别为 80.5%和 92.7%，显著高于无淋巴结转移的患者（P<0.05）。相关性分析显示 Nrf2 与 ARE 蛋白在胃腺癌组织中的表达呈显著正相关（χ^2=17.322，P<0.001）。［结论］胃腺癌患者癌组织中 Nrf2 与 ARE 蛋白表达上调，Keap1-Nrf2-ARE 信号通路与胃腺癌的发生发展密切相关。

主题词：Keap1-Nrf2-ARE；胃腺癌；表达

中图分类号：R735.2　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1671-170X(2019)08-0703-04

doi：10.11735/j.issn.1671-170X.2019.08.B005

Expression and Clinical Significance of Keap1-Nrf2-ARE Signaling Pathway in Gastric Adenocarcinoma

SHEN Lei[1]，ZHANG Ping-ping[2]，YANG Hai-tao[3]

（1. *The Third People's Hospital of Hefei*，*Hefei* 230001，*China*；2.*Basic Medical College of Anhui Medical University*，*Hefei* 230001，*China*；3. *Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University*，*Hefei* 230001，*China*）

Abstract：［Objective］To investigate the expression of Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway-related protein in gastric adenocarcinoma and its clinical significance. ［Method］The expression of nuclear factor E2-related factor 2(Nrf2) and anti-oxidant responsive element(ARE) in 64 samples of gastric adenocarcinoma and the corresponding adjacent tissues were detected with immunohistochemistry. ［Results］The expression levels of Nrf2 and ARE in cancer tissues were 1.78±0.34 and 1.69±0.45，which were significantly higher than those in adjacent tissues(P<0.05). The positive rates of Nrf2 and ARE in poor and moderately differentiated tumors was 79.1% and 88.4% in cancer tissues，which were higher than those in well differentiated tumors(P<0.05). The positive rates of Nrf2 and ARE was 81.4% and 90.7% in TNM stage Ⅲ and Ⅳ patients，which were significantly higher than those in stage Ⅰ and Ⅱ gastric adenocarcinoma.(P<0.05). In patients with lymph node metastasis，the positive rates of Nrf2 and ARE was 80.5% and 92.7%，which were significantly higher than those of patients without lymph node metastasis (P<0.05). Correlation analysis showed a significant positive correlation between Nrf2 and ARE protein expression in gastric adenocarcinoma tissues(χ^2=17.322，P<0.001). ［Conclusion］The expression of Nrf2 and ARE protein are up-regulated in the cancer tissues of patients with gastric adenocarcinoma，indicating that Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway may be closely related to the occurrence and development of gastric adenocarcinoma.

Subject words：Keap1-Nrf2-ARE；gastric adenocarcinoma；expression

胃癌死亡率较高，化疗、放疗及手术不能取得好的疗效且治疗进展缓慢是其主要原因，肿瘤转移及复发是导致死亡的最终原因[1]。靶向药物在晚期胃癌的治疗中展现出明显的优势[2]。目前信号传导系统异常活化及缺陷与肿瘤间的关系是肿瘤分子生物

基金项目：安徽省自然科学基金青年项目(1808085QH277)

通信作者：沈磊，主治医师，硕士；合肥市第三人民医院肿瘤科，安徽省合肥市望江东路 204 号(230001)；E-mail：Chinashenlei@163.com

收稿日期：2018-11-07；**修回日期**：2019-01-17

学的研究热点之一，生物治疗的新兴领域扩展到了信号传导干预。Keap1-Nrf2-ARE 信号通路与恶性肿瘤及相关疾病的发生、发展关系密切[3]。关于胃腺癌受到氧化应激的影响目前的报道较少，本文旨在探讨 ARE 及 Nrf2 两个氧化应激过程中的主要因子在胃腺癌组织中的表达及其与肿瘤的发展、发生的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2017 年 3 月至 2018 年 3 月在安徽医科大学第三附属医院普外科及合肥市第三人民医院肿瘤科就诊、病理分析确诊为胃腺癌的患者的癌症组织，共 64 例，其中男性 41 例、女性 23 例，年龄 56±12.78 岁，术前均未经过放化疗以及免疫治疗。TNM Ⅰ/Ⅱ期 21 例，Ⅲ/Ⅳ期 43 例，有淋巴结转移 41 例，无淋巴结转移 23 例。取其癌旁组织为对照（癌旁组织是指距离癌组织 2cm 范围内的正常组织）。患者均签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器

ARE 抗体（上海艾比玛特生物科技有限公司）；Nrf2 抗体（武汉博士德生物科技有限公司），辣根过氧化物酶（上海生工生物科技有限公司），DAB 试剂盒（上海生工生物科技有限公司），倒置显微系统（日本 OLYMPUS），石蜡切片机（德国 SLEE CUT4062）。

1.3 免疫组织化学染色

通过二甲苯对石蜡切片进行两次脱蜡过程，对脱蜡后的组织进行酒精梯度清洗：二甲苯孵育 5 min，弃去二甲苯，加入新的二甲苯继续孵育 5 min，无水乙醇洗涤 3 min，无水乙醇Ⅱ洗涤 3 min，95%乙醇洗涤 3 min，80%乙醇 洗涤 3 min，而后 PBS 洗涤 3 次，每次 3min；将切片至含有 0.01M 的柠檬酸缓冲液中，对切片进行恢复，并放入微波炉，加热 15min，冷却至室温；取出石蜡切片，置于含有 3%的双氧水中 10~15min，以防止内源性过氧化物酶对切片组织的损伤，之后用 1×PBS 缓冲液冲洗 3 次，每次 3min；按照 1:500 的比例加入 Nrf2 抗体，对石蜡组织切片进行室温孵育 1h 或者 4℃孵育过夜，之后用 1×PBS 缓冲液冲洗 3 次，每次 3min；按照 1:1000 的比例加入辣根过氧化物酶标记的二抗，对石蜡组织切片进行室温孵育 40min，之后用 1×PBS 缓冲液冲洗 3 次，每次 3min；加入 DAB 试剂盒中的显色剂，室温孵育 5~10min，然后清水冲洗；再进行苏木精复染室温孵育 3~5min，清水冲洗；对染色后的切片进行梯度酒精水化处理，然后树胶封片观察。采用上述同样的操作方法，对组织切片中的 ARE 蛋白进行免疫组织化学染色观察。

1.4 结果判断

定性判断标准[4]：Nrf2 或 ARE 蛋白阳性以细胞核或细胞质内有棕黄色颗粒。每张切片随机选取 5 个高倍镜视野（×400）进行观察，计算阳性细胞数的平均百分比，分为 0~4 分：0 分（0~1%）、1 分（1%~10%）、2 分（10%~50%）、3 分（50%~80%），4 分（80%~100%）；根据染色强度评分为：细胞未着色为 0 分，淡黄色为 1 分，黄色为 2 分，棕黄色或棕褐色为 3 分。两者得分相乘，0~4 分为阴性表达，5~12 分为阳性表达。

定量结果判断：对免疫组化结果进行灰度值分析。采用显微成像系统对免疫组织化学染色后的切片进行拍照，并对图片使用 Image Pro Plus 6.0 进行处理分析，将染色阳性颗粒的灰度单位转换为吸光单位，测量其密度（optical density，OD）值，以此作为其阳性表达的半定量。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析，以（$\bar{x}\pm s$）表示计量资料，两组间比较采用 t 检验，计数资料采用 χ^2 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Nrf2 和 ARE 表达情况

Nrf2 和 ARE 蛋白阳性染色主要位于癌组织细胞胞质中，细胞胞核也有少数表达，而癌旁组织中阳性染色很少，见 Figure 1。64 例胃腺癌组织中，Nrf2 阳性表达 45 例（70.31%），ARE 阳性表达 52 例（81.3%）；癌旁组织中的阳性率分别为 25.00%（16/64）和 29.69%（19/64），差异均有统计学意义（χ^2=26.339，$P<0.001$；χ^2=34.443，$P<0.001$）。进一步对两者表达进行灰度值分析发现，癌组织中 Nrf2 和 ARE 蛋白的表达水平较癌旁组织均显著升高，差异均有统计学意义（$P<0.001$），见 Table 1。

2.2 癌组织中 Nrf2、ARE 表达与胃腺癌临床病理特征的关系

胃癌组织中 Nrf2 及 ARE 蛋白的阳性表达率在

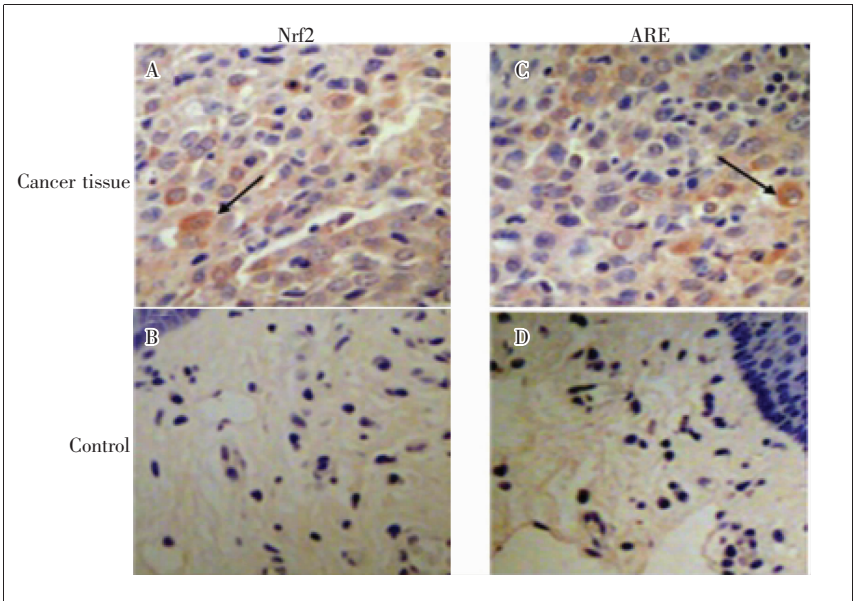

Figure 1　Expression of Nrf2 and ARE in normal gastric mucosa and gastric cancer tissues (×400)

Table 1　Comparison of OD values of Nrf2 and ARE proteins in immunohistochemical gray value analysis

Index	Cancer tissue	Control	*t*	*P*
Nrf2	1.78±0.34	0.47±0.16	27.89	<0.001
ARE	1.69±0.45	0.52±0.22	18.69	<0.001

Table 2　The influencing factors of Nrf2 and ARE expression in gastric adenocarcinoma

Index	Nrf2				ARE			
	Positive (%)	Negative (%)	χ^2	*P*	Positive (%)	Negative (%)	χ^2	*P*
Gender								
Male	29(70.7)	12(29.3)	0.010	0.922	34(82.9)	7(17.1)	0.211	0.646
Female	16(69.6)	7(30.4)			18(78.3)	5(21.7)		
Age(years)								
<50	18(72.0)	7(28.0)	0.056	0.813	19(76.0)	6(24.0)	0.742	0.389
⩾50	27(69.2)	12(30.8)			33(84.6)	6(15.4)		
Pathological grading								
Middle / low differentiation	34(79.1)	9(20.9)	4.815	0.028	38(88.4)	5(11.6)	4.363	0.037
Highly differentiated	11(52.4)	10(47.6)			14(66.7)	7(33.3)		
TNM								
Ⅰ/Ⅱ	10(47.6)	11(52.4)	7.711	0.006	13(61.9)	8(38.1)	7.678	0.006
Ⅲ/Ⅳ	35(81.4)	8(18.6)			39(90.7)	4(9.3)		
Lymph-node metastasis								
No	12(52.2)	11(47.8)	5.659	0.017	14(60.9)	9(39.1)	3.129	0.002
Yes	33(80.5)	8(19.5)			38(92.7)	3(7.3)		

Table 3　Correlation analysis between Nrf2 and ARE expression

Nrf2	ARE		χ^2	*P*
	Positive(%)	Negative(%)		
Pasitive	43(67.2)	2(3.1)	17.322	<0.001
Negative	9(14.1)	10(15.6)		

年龄及性别分组中，与癌旁正常组织相比差异均无统计学意义（*P*>0.05）。对临床因素分析发现，在低/中分化的患者中，Nrf2、ARE的阳性表达率分别为79.1%及88.4%，与高分化患者相比，差异均有统计学意义（*P*<0.05）；在TNM分期为Ⅲ、Ⅳ期患者中，Nrf2、ARE阳性表达率分别为81.4%和90.7%，均高于Ⅰ、Ⅱ期患者，差异均有统计学意义（*P*<0.05）；在淋巴结转移患者中，Nrf2、ARE的阳性率分别为80.5%、92.7%，均显著高于无淋巴结转移患者（*P*<0.05）。见Table 2。

2.3　胃腺癌组织中Nrf2、ARE表达相关性分析

64例胃腺癌患者中，43例患者ARE与Nrf2均阳性，占67.2%，10例患者Nrf2与ARE均阴性，占15.6%。Spearman相关性分析显示，ARE与Nrf2表达呈正相关（χ^2=17.322，*P*<0.05）。见Table 3。

3　讨　论

Keap1-Nrf2-ARE通路是内源性抗氧化应激通路中的信号通路，机体的内源性抗氧化应答能显著被诱导，其中可激活内源性抗氧化应答的为Nrf2，是细胞抗氧化反应的核心转录因子[5]。有研究发现细胞抗氧化反应中最主要的调节者为Keap1（接头蛋白）和Nrf2（核转录因子）[6]。细胞质蛋白伴侣分子Keap1的双甘氨酸序列DGR在生理状态下被位于细胞质中处于无活性状态的Nrf2通过N端的Neh2区域以二聚体的形式结合，使蛋白酶体降解促进泛素化后的Nrf2，使Nrf2的含量水平稳

定的维持在较低状态，使抗氧化物及酶类等保护细胞的物质的表达处于基础水平，细胞状态则保持稳定[7]。Keap1-Nrf2-ARE 信号通路在正常情况下因致癌物激活时，体内其他毒物或致癌物质通过启动相关代谢酶的表达和转录而被清除，癌症因细胞修复功能及氧化应激提高而得以避免 [8]。Keap1-Nrf2-ARE 信号通路虽然可对致癌因素耐受提高，但其被异常激活时，则会促进癌变[9]。研究表明，Keap1 在肿瘤细胞内突变引起 Nrf2 丧失负性调节作用，Nrf2 持续活化并过度高表达，肿瘤组织中抗氧化酶的表达因 Nrf2 功能丧失而产生紊乱，从而导致肿瘤的发生[10]。有学者在对胰腺癌的体外与体内的研究中发现，Nrf2 下游抗氧化酶及 Nrf2 的表达可被 Nrf2 抑制剂 PIK-75 降低[11]。有学者发现，肿瘤细胞的多重耐药性与 Nrf2 在肺癌患者中的表达升高关系密切。谢家祺等[12]通过对乳腺癌研究发现，乳腺癌组织中 Nrf2-AR 通路相关蛋白表达显著升高。但 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路在胃腺癌中少有报告[13]。

本研究通过收集胃腺癌患者的癌组织以及癌旁组织，采用免疫组织化学的方法，检测 Nrf2 以及 ARE 蛋白在患者癌组织以及癌旁组织中的表达。结果发现，与癌旁组织相比，癌组织中 Nrf2 以及 ARE 蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$）；进一步分析 Nrf2 以及 ARE 的表达影响因素发现，Nrf2 及 ARE 蛋白的表达与肺腺癌患者的性别、年龄无关，而与患者分化程度、TNM 分期以及淋巴结转移密切相关；相关性分析显示胃腺癌组织中 Nrf2 与 ARE 蛋白表达呈显著正相关（$\chi^2=17.322$，$P<0.05$），表明 Nrf2 与 ARE 蛋白在胃腺癌的发展过程中存在协同作用。

综上所述，在胃腺癌中，Nrf2 与其下游靶基因 ARE 共同参与胃腺癌的发生发展过程，与胃腺癌的 TNM 分期以及是否发生淋巴结转移密切相关，可能会成为胃腺癌诊断的标志物与治疗靶点，有助于进一步了解 Keap1-Nrf2-ARE 通路与胃腺癌的关系，但具体作用机制还需进一步研究。

参考文献：

[1] Zuo TT,Zheng RS,Zeng HM,et al. Epidemiology of stomach cancer in China [J]. Chin J Clin Oncol,2017,44(1):52–58.[左婷婷,郑荣寿,曾红梅,等. 中国胃癌流行病学现状[J]. 中国肿瘤临床,2017,44(1):52–58.]

[2] Li YJ,Liu HT,Zhang M,et al. Progress in small-molecule tyrosine kinase inhibitors for the treatment of advanced gastric cancer [J]. Chin J Clin Pharmacol,2018,34(22):2646–2649.[李亚静,刘洪涛,张明,等. 晚期胃癌小分子靶向治疗的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志,2018,34(22):2646–2649.]

[3] Lu MC,Ji JA,Jiang ZY,et al. The Keap1-Nrf2-ARE pathway as apotential preventive and therapeutic target:An Update[J]. Med Res Rev,2016,36(5):924–963.

[4] Lu XZ. The expression of Nrf2 and HO-1 in bladder transitional cell carcinoma and their clinical significance[D]. Shijiazhuang:Hebei Medical University,2013.[卢新喆. Nrf2 和 HO-1 在膀胱移行细胞癌中的表达及临床意义[D].石家庄:河北医科大学,2013.]

[5] Liu C,Peng YB,Wang Z,et al. Research progress of Keap1- Nrf2-ARE signaling pathway in multi-organ disease[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine,2015,(2):239–243.[刘冲,彭御冰,王忠. Keap1-N rf2-ARE 信号通路在多器官疾病中的研究进展[J]. 中国临床医学,2015,(2):239–243.]

[6] Song Y,Li H,Yan HZ,et al. Research progress on the relationship between Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus[J]. Chinese Journal of Gerontology,2015,(10):2878–2879.[宋媛,李虹,闫海震,等. Keap1-Nrf2-ARE 信号通路与 2 型糖尿病氧化应激相关性研究进展 [J]. 中国老年学,2015,(10):2878–2879.]

[7] Alloul-Ramdhani M ,Tensen CP ,Ghalbzouri AE. Performance of the N/TERT epidermal model for skin sensitizer identification via Nrf2-Keap1-ARE pathway activation[J]. Toxicol In Vitro,2014,28(5):982–989.

[8] Jang M,Cho IH . Sulforaphane ameliorates 3-nitropropionic acid-induced striatal toxicity by activating the Keap1-Nrf2-ARE pathway and inhibiting the MAPKs and NF-κB pathways[J]. Mol Neurobiol,2016,53(4):2619–2635.

[9] Pan H,Wang HD. Dual functions of nuclear factor-E2-related factor 2 in cancer [J]. J Med Postgra,2012,25(5):549–551.[潘灏,王汉东. Nrf2 对肿瘤的双重作用[J]. 医学研究生学报,2012,25(5):549–551.]

[10] Hast BE ,Goldfarb D ,Mulvaney KM ,et al. Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination [J]. Cancer Res,2013,73(7):2199–2210.

[11] Duong HQ,Hong YB,Kim JS,et al. Inhibition of checkpoint kinase 2 (CHK2)enhances sensitivity of pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine[J]. J Cell Mol Med,2013,17(10):1261–1270.

[12] Xie JQ,Liu Y,Huo NN. The abnormal expression of Nrf2/ARE signaling pathway in breast cancer:Apotential target for breast cancer intervention [J]. Journal of Modern Oncology,2016,24 (7):1065–1067.[谢家祺,刘毅,霍楠楠. 乳腺癌中 Nrf2 /ARE 信号通路异常表达的探讨[J].现代肿瘤医学,2016,24 (7):1065–1067.]

[13] Yang B,Ma YF,Liu Y. Elevated Expression of Nrf-2 and ABCG2 involved in multi-drug resistance of lung cancer SP cells[J]. Drug Res,2014,65(10):526–531.