

乙酰肝素酶及 NF-E2 相关因子对吸烟相关 喉鳞状细胞癌的影响

卜川¹ 魏日富¹ 朱忠寿¹ 李海燕¹ 刘亚超²

[摘要] 目的:通过对吸烟相关喉鳞状细胞癌患者乙酰肝素酶(HPA)及 NF-E2 相关因子(NRF2)的表达情况的分析,进一步探讨二者对吸烟相关喉鳞状细胞癌的预后影响。方法:连续性收集 2014—2015 年 84 例喉鳞状细胞癌患者的临床资料,根据吸烟指数分为 3 组:重度吸烟组 30 例、轻中度吸烟组 20 例及无吸烟组 34 例。分别检测 3 组患者血清抗氧化指标及喉癌组织 HPA 和 NRF2 的表达水平,结合患者临床资料探讨其与患者预后及临床分期之间的关系。结果:①Ⅲ~Ⅳ期喉鳞状细胞癌患者癌组织中 HPA 及 NRF2 均呈高表达;Ⅰ~Ⅱ期喉鳞状细胞癌患者癌组织中 HPA 及 NRF2 均呈低表达。②重度吸烟组 NRF2 表达水平显著高于轻中度吸烟组和无吸烟组(均 $P < 0.05$),且在分期较高的喉鳞状细胞癌患者中其 NRF2 表达水平均高于分期较低者;③ HPA 及 NRF2 的表达与喉鳞状细胞癌患者的临床分期有关($P < 0.05$)。结论:与非吸烟患者比较,重度吸烟喉鳞状细胞癌患者面临更加严重的氧化应激压力,喉鳞状细胞癌患者 HPA 及 NRF2 的表达水平与其临床病理分期有关,HPA 及 NRF2 高表达可能促使喉鳞状细胞癌患者临床分期升级。

[关键词] 喉肿瘤;乙酰肝素酶;NF-E2 相关因子

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2016.15.004

[中图分类号] R739.65 **[文献标志码]** A

Effects of HPA and NF-E2 related factor on smoking related laryngeal squamous cell carcinoma

BO Chuan¹ WEI Ri fu¹ ZHU Zhongshou¹ LI Hai yan¹ LIU Yachao²

(¹Department of ENT Surgery, Ningde Hospital, Ningde, 352100, China; ²Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Hebei North University)
Corresponding author: BO Chuan, E-mail: bochuan4321@qq.com

Abstract Objective: To further explore the prognostic effects of Heparanase(HPA) and NF-E2 related factor (NRF2) on smoking related laryngeal squamous cell carcinoma, we detect the expression of HPA and NRF2 on smoking related laryngeal squamous cell carcinoma patients. **Method:** Continuously collected 84 patients with laryngeal squamous cell carcinoma in the Ningde Hospital from 2014 to 2015. All patients were divided into three groups according to smoking index: group A (severe smoking patients with laryngeal carcinoma 30 cases), group B(mild to moderate smokers 20 cases) and group C (no smoking in laryngeal carcinoma patients with 34 cases). Antioxidative indices in serum and the expression of HPA and NRF2 in three groups of patients were detected, and to explore their relationship with prognosis and clinical staging of patients. **Result:** The HPA and NRF2 were highly expressed in the cancer tissues of patients with stage Ⅲ-Ⅳ, while the expression of HPA and NRF2 in patients with stage Ⅰ-Ⅱ was low. The expression level of NRF2 in group A was significantly higher than that of group B and group C($P < 0.05$) as well as the NRF2 expression levels in higher stage patients with laryngeal cancer were higher than those of low stages. The expression of HPA and NRF2 is related to the pathological stage in laryngeal squamous cell carcinoma patients($P < 0.05$). **Conclusion:** Compared with non smoking patients, severe smoking patients with laryngeal cancer will face more severe oxidative stress. The expression of HPA and NRF2 in laryngeal squamous cell carcinoma patients is related to the pathological stage.

Key words laryngeal neoplasms; heparanase; NRF2

喉癌是头颈部最常见的恶性肿瘤之一,其发病率逐年增加,喉癌中以声门癌比例最高,超过 50%^[1-2],流行病学结果证实吸烟是导致喉癌发生的重要环境因素,据统计重度吸烟喉癌患者死亡率要比不吸烟者高出近 20 倍。烟草中的有害物质可

导致细胞内分子氧的持续减少氧自由基如: O_2^- 、 H_2O_2 、 OH^- 等增多。人类抗氧化基因 NRF2 是一种氧化应激基本表达的关键转录因子,存在于全身多个器官,它的缺失或激活障碍直接引起细胞对应激源的敏感性变化,对肿瘤的发生发展有重要作用。乙酰肝素酶(HPA)能够降解胞外基质(ECM)中的多糖侧链,在多种肿瘤的侵袭和转移中起重要作用。本研究采用免疫组织化学方法检测喉鳞状

¹ 宁德市医院耳鼻咽喉外科(福建宁德,352100)

² 河北北方学院附属第一医院耳鼻咽喉头颈外科
通信作者: 卜川, E-mail: bochuan4321@qq.com

细胞癌组织中 HPA 表达情况, Western Blot 法检测其 NF-E2 相关因子(NRF2)的表达情况,旨在分析其与喉鳞状细胞癌发展与转移的关系,为临床治疗和预后提供理论和实践依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

所有组织标本均来源于宁德市医院耳鼻喉外科 2014-01-01—2015-01-01 行手术切除的 84 例喉鳞状细胞癌患者喉癌组织经石蜡包埋。患者年龄 29~78 岁,平均(59.72±10.74)岁。根据是否吸烟将上述患者分为重度吸烟组 30 例,平均年龄(52.4±5.8)岁;轻中度吸烟组 20 例,平均年龄(60.4±4.2)岁;无吸烟组 34 例,平均年龄(58.2±3.9)岁。研究所有人的吸烟记录,并根据吸烟指数分为重度吸烟组:1 包/d,吸烟年限不低于 10 年或者平均吸烟 2 包/d,超过 5 年;轻中度吸烟组:<1 包/d,吸烟年限>1 年;无吸烟组:从未有过吸烟史。所有患者术前均未接受过放、化疗,术后均经 2 位资深病理医师病理确诊为喉鳞状细胞癌。临床分期按国际抗癌协会(UICC)及 1997 年修订的 TNM 分期标准,其中 I~II 期 33 例,III~IV 期 39 例。所有入选者均来自同一地域。患者与志愿者均没有服用激素,同时患有其他疾病的患者或志愿者被排除。签署知情同意后捐献静脉血,所有的参与者都明确目前研究的范围。

1.2 试剂与方法

取上述喉癌组织,切成 5 μm 薄片 2 张,分别行常规苏木精-伊红染色及免疫组织化学(链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物技术,SABC)染色并测定 HPA 蛋白。兔抗人 HPA 单克隆抗体购自美国 Gen Script 公司,即用型 SABC 免疫组织化学染色试剂盒及 DAB 显色试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司,抗兔 SP 试剂盒为美国 ZYMED 公司产品。采用免疫组织化学 SABC 法,HPA 单克隆抗体工作浓度为 1:100。每次染色均设对照作为染色质量控制标准,用已知阳性乳腺癌组织切片作为阳性对照,0.01 mol/L PBS 缓冲液取代一抗作阴性对照,具体操作步骤严格按说明书进行。

提取各分组中食管癌及癌旁组织中总蛋白。4℃、12 000 r/min 离心 20 min,取上清,-20℃保存备用。NRF2 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,按每

孔上样量 50 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,稳压冰浴电泳转至硝酸纤维素膜上,5%脱脂牛奶封闭 2 h,一抗 4℃孵育过夜(NRF2,1:1 000;β-actin,1:5 000),兔抗人红外荧光标记二抗(1:20 000),Odyssey 双色红外荧光扫描系统检测,计算蛋白相对值=蛋白 D(λ)值/G APD HDD(λ)值。

1.3 结果判断

在全面观察每一张片后,随机选取 20 个视野,在 400 倍高倍显微镜下进行阳性细胞计算及背景评判。采用双盲的原则由 2 位病理科医生阅片。镜下判定标准:HPA 阳性表达主要定位于细胞质和细胞膜,呈棕褐色颗粒状着色;以细胞核、细胞质内或细胞膜上出现黄色染色为阳性标记。依据阳性细胞多少及背景进行综合评分,参照半定量评分方法,每张切片随机选取 5 个高倍视野(×400)观察:将阳性细胞百分数和细胞染色强度分为 4 级,并分别记为 0、1、2、3 分,阳性细胞<25%为 0 分、25%~49%为 1 分、50%~74%为 2 分、≥75%为 3 分;无显色为 0 分、浅黄色为 1 分、桔黄色为 2 分、棕黄色为 3 分。将 2 项计分相加后除以 2 得出最后评分,将 0 分定为阴性(-),0.5~1.0 分为弱阳性(+),1.5~2.0 分为阳性(++),2.5~3.0 分为强阳性(+++)。将阴性与弱阳性表达合并归为低表达,而阳性与强阳性表达则合并归为高表达。

取喉鳞状细胞癌患者癌组织及癌旁组织分别作 Western Blot 分析,以 beta-actin 作内参,通过 imageJ 软件分析条带灰度值,将 NRF2 条带灰度值除以 β-actin 作均一化,如果均一化后癌组织 NRF2 条带灰度值比癌旁组织 NRF2 条带灰度值>1.5,则判断为 NRF2 在癌组织中为高表达。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计学分析,组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。NRF2 蛋白表达量的比较采用 Independent-Samples *t* 检验。

2 结果

2.1 患者年龄、性别、吸烟情况及临床分期情况

重度吸烟组、轻中度吸烟组和无吸烟组在年龄、性别、吸烟情况及临床分期上差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 喉鳞状细胞癌患者年龄、性别、吸烟情况及临床分期情况分布

组别	例数		年龄/岁	烟龄/年	I~II 期	III~IV 期
	男	女				
重度吸烟组	18	12	52.4±5.8	21.6±4.3	14	16
轻中度吸烟组	13	7	60.4±4.2	18.6±6.2	7	13
无吸烟组	20	14	58.2±3.9	—	22	12

2.2 Western-blot 检测 I ~ II 期、III ~ IV 期喉癌患者 NRF2 表达情况

NRF2 的表达量与喉癌临床分期相关,NRF2 蛋白在喉鳞状细胞癌组织表达相对量(0.821 ± 0.178)明显高于癌旁组织中的表达相对量(0.213 ± 0.112),见图 1a,2 组比较差异有统计学意义($t=5.252, P<0.01$);III ~ IV 期患者喉癌组织中 NRF2 相对于 I ~ II 期呈高表达(图 1b~c);在 $\times 400$ 倍高倍显微镜下喉癌组织常规苏木精-伊红染色及免疫组织化学(链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物技术,SABC)进行染色检测 HPA 的表达情况(HPA 阳性表达主要定位于细胞质和细胞膜,呈棕褐色颗粒状着色,见图 1d)。

2.3 HPA 和 NRF2 基因在喉鳞状细胞癌患者癌组织中的表达情况及其与喉鳞状细胞癌临床-病理分期关系

Western Blot 结果显示,HPA 和 NRF2 在 3 组喉鳞状细胞癌患者癌组织中均有不同程度的表达,HPA 在重度吸烟组、轻中度吸烟组、无吸烟组喉鳞状细胞癌患者中高表达率分别为 96.67%(29/30)、80.00%(16/20)、82.35%(28/34);NRF2 在 3 组喉鳞状细胞癌患者中高表达率分别为 90.00%(27/30)、75.00%(15/20)、73.53%(25/34),其差异均有统计学意义($P<0.05$)。

HPA 和 NRF2 在喉癌患者中的表达与病情恶化程度有关,有淋巴结转移及远处淋巴结转移 III ~ IV 期喉癌患者二者均呈显著高表达率,且差异有统计学意义($P<0.01$),见表 2。

3 讨论

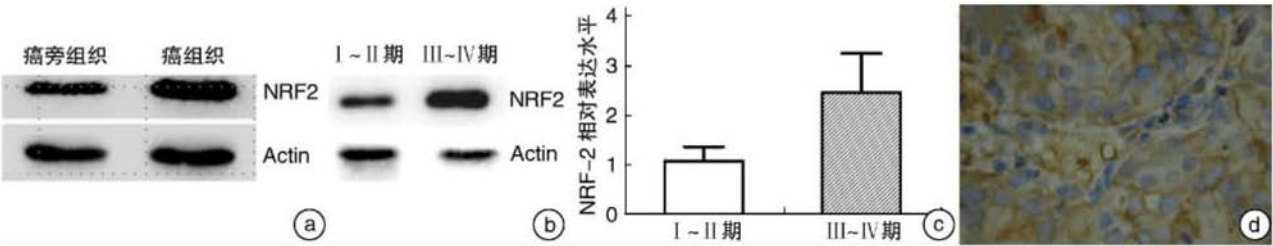
喉鳞状细胞癌近年来发病率有逐年增高的趋势,占呼吸道肿瘤的 65%~70%,我国高发区域以东北地区为主。随着现代医学对肿瘤治疗手段的进步和对喉癌发病的分子机制认识的提高,喉癌患者的术后生活质量不断得到改善,但是总体来说 5 年生存率并没有明显提高^[3],多数患者最终死于癌症的复发和转移。肿瘤的侵袭和转移也是绝大多数肿瘤的晚期临床表现,也是导致患者死亡的主要

表 2 不同病理分级喉鳞状细胞癌患者 HPA 和 NRF2 表达阳性率比较

临床病理参数	例数	HPA	NRF2
年龄/岁			
≤50	36	89.33	82.29
>50	48	84.12	86.55
性别			
男	43	90.72	83.73
女	41	79.45	75.94
淋巴结转移			
无	41	36.45 ¹⁾	51.60 ¹⁾
有	43	89.84	84.67
远处转移			
无	54	70.06 ²⁾	90.12 ²⁾
有	30	100.13	95.56
TNM 分期			
I ~ II 期	37	36.47 ³⁾	51.71 ³⁾
III ~ IV 期	47	89.91	84.69

与有淋巴结转移比较,¹⁾ $P<0.01$;与有远处转移比较,²⁾ $P<0.01$;与 III ~ IV 期比较,³⁾ $P<0.01$ 。

因素。目前人们对于恶性肿瘤的侵袭和转移机制并不完全了解,针对性的治疗方案也寥寥无几,疗效也不甚理想。因此,积极寻找肿瘤侵袭转移和预后相关因素,为肿瘤患者提供预防性治疗和预警,对于改善预后,提高肿瘤患者的生存率具有重要意义。研究表明,肿瘤的侵袭转移与细胞外基质 ECM 的降解密切相关。HPA 作为内糖苷酶,可以特异性地降解基膜和胞外基质中的硫酸乙酰肝素多糖(HSPG)上的糖基侧链,而 HSPG 是基膜和胞外基质的重要组成成分,其多糖侧链对于许多生物活性分子的稳定和隔离起着重要作用。在正常组织中,HPA 处于低表达或失活状态,但在淋巴瘤、胃癌、肾癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌和宫颈癌等恶性肿瘤组织中,HPA 普遍存在高表达。已经有文献报道 HPA 与恶性肿瘤的侵袭转移关系密切,同时 HPA 还参与肿瘤血管生成。HPA 在肿瘤细胞中的高表达可降解血管外和胞外



a: NRF2 在喉鳞状细胞癌组织和癌旁组织中的表达相对量;b~c: NRF2 在 I ~ II 期、III ~ IV 期相对表达水平;d: 喉癌组织常规苏木精-伊红染色及免疫组织化学检查。

图 1 Western-blot 检测 I ~ II 期、III ~ IV 期喉癌患者 NRF2 的表达情况

基质中的乙酰肝素糖蛋白,破坏胞外基质和基膜结构的完整性,降低其屏障功能,促进肿瘤细胞的侵袭和浸润。因此,HPA 是肿瘤侵袭转移治疗的重要靶点,一项用 HPA 抑制剂对人恶性黑色素瘤的实验性治疗结果也支持 HPA 作为治疗靶点的有效性^[4-5]。目前很多研究都表明抗氧化蛋白参与了肿瘤的发生,吸烟会直接摄入外源活性氧(ROS),并间接导致内源性 ROS 的产生,从而增加机体的氧化负担^[6]。机体中过量的 ROS 会导致胞内脂质、蛋白和 DNA 等物质的氧化损伤,从而诱发氧化应激反应,继而导致疾病的发生。机体中存在多种抗氧化物,可以直接清除体内的 ROS,防止氧化应激反应的产生,而吸烟导致的氧化应激压力会使机体抗氧化酶表达下调。NRF2 作为多种抗氧化基因的上游调控元件,可以激活下游多种抗氧化酶的表达,如 SOD、CAT、GSH-Px 等。有研究报道,肿瘤细胞生长过程中会产生更多的 ROS,提示 ROS 可能会对肿瘤的发展起到一定的作用。Manjunath 等^[7]研究表明,喉鳞状细胞癌患者肿瘤组织中的 ROS 含量比癌旁组织中更高。吸烟作为呼吸道肿瘤的重要诱因,对肿瘤的发生发展起着重要作用。Suresh 前瞻性研究了喉鳞状细胞癌患者血清丙二醛浓度和三价铁还原抗氧化能力水平,以评估氧化应激在癌症发生中的作用^[7]。我们在前期的研究工作中发现,吸烟相关的喉鳞状细胞癌其血清抗氧化酶水平表达下降,氧化应激呈激发状态^[8]。相比非吸烟患者,重度吸烟喉癌患者将面临更加严重的氧化应激压力,喉鳞状细胞癌患者 NRF2 的表达水平高低与其病理分期有关。目前吸烟在喉癌发生发展中的分子机制尚不明确,因此进一步研究吸烟对喉鳞状细胞癌生长和侵袭转移机制,可以为日后的临床治疗和诊断提供重要的理论基础。我们发现 HPA 在促使喉癌患者临床病理升级上发挥了重要作用。本研究结果显示 HPA 和 NRF2 在喉鳞状细胞癌肿瘤组织中均存在高表达,并且随着临床病理的分级升级其 HPA 及 NRF2 均呈现高表达,提示 HPA 和 NRF2 在喉鳞状细胞癌的发生发展密切

相关。氧化应激指标表明喉鳞状细胞癌重度吸烟患者面临着更高的氧化应激压力,癌组织中 NRF2 的表达上调与其病理分级存在明显相关性,肿瘤临床-病理分级越高,其 NRF2 水平越高。HPA 和 NRF2 的过表达显著促进了喉鳞状细胞癌的发展,且在其侵袭转移中扮演了重要的角色。上述研究结果表明,HPA 和 NRF2 有望成为喉鳞状细胞癌临床治疗诊断和预后的靶标分子。

参考文献

- [1] SJOGREN E V. Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma[M]//BAATENBURG DE JONG R J, ed. Prognosis in head and neck cancer. London: Taylor and Francis, 2006:37-70.
- [2] DAVIS R K, KELLY S M, PARKIN J L, et al. Selective management of early glottic cancer[J]. Laryngoscope, 1990, 100:1306-1309.
- [3] ALMADORI G, BUSSU F, CADONI G, et al. Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: towards an integrated clinicobiological approach[J]. Eur J Cancer, 2005, 41:683-693.
- [4] LEE H C, CHANG D E, YEOM M, et al. Gene expression profiling in hypo thalamus of immobilization-stressed mouse using cDNA microarray[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005, 135:293-300.
- [5] GAUTAM A, FERRO V, WILSON E, et al. PI-88, a heparanase inhibitor showing promising evidence of patient benefit in phase II clinical trials[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11:9037S-9037S.
- [6] CSORDAS A, BERNHARD D. The biology behind the atherothrombotic effects of cigarette smoke[J]. Nat Rev Cardiol, 2013, 10:219-230.
- [7] MANJUNATH M K, ANNAM V, SURESH D R. Significance of free radical injury in laryngeal and hypopharyngeal cancers[J]. Laryngol Otol, 2010, 124:315-317.
- [8] 刘亚超,喇彩凤,魏洁,等. 过氧化氢酶对吸烟相关喉鳞状细胞癌发病的影响[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2015, 29(15):1346-1349.

(收稿日期:2016-04-21)