

• 论著——研究报告 •

Nrf2 和 ERK 通路在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义*

陈亚敏¹ 魏仑¹ 林旭¹ 张文静¹ 吴靖芳¹ 薛刚²

[摘要] 目的:探讨核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)及 ERK 信号通路在甲状腺乳头状癌(PTC)中的表达及临床意义。方法:免疫组织化学法检测 PTC 组织芯片中 Nrf2、ERK₂ 和 p-ERK_{1/2} 的表达;Western blot 检测 Nrf2、ERK₂、p-ERK_{1/2} 蛋白在 PTC、癌旁组织及正常甲状腺组织中的相对含量;实时定量 PCR 检测 Nrf2 mRNA 在 PTC、癌旁组织及正常甲状腺组织中的转录水平。结果:Nrf2、ERK₂、p-ERK_{1/2} 蛋白在 PTC 中高表达,在癌旁组织中弱阳性或阴性表达($P<0.01$)。Nrf2、ERK₂、p-ERK_{1/2} 蛋白在淋巴结转移和临床 III~IV 期组明显高于无淋巴结转移组和临床 I~II 期组($P<0.05$),且 Nrf2 蛋白与 ERK₂ 和 p-ERK_{1/2} 蛋白呈正相关($r=0.7232$ 和 $r=0.6686$, $P<0.05$)。Western blot 结果显示 PTC 组织 Nrf2、ERK₂、p-ERK_{1/2} 含量高于癌旁和正常组织($P<0.01$)。PTC 组 Nrf2 mRNA 转录水平明显高于癌旁及正常组织($P<0.01$)。结论:Nrf2 与 PTC 的进展有关,推测 Nrf2 高表达与 ERK₂ 通路有关。

[关键词] 核因子 E2 相关因子 2;甲状腺乳头状癌;ERK₂; p-ERK_{1/2}

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2017.12.011

[中图分类号] R736.1 [文献标志码] A

Expression and clinical significance of Nrf2 and ERK pathway in papillary thyroid carcinoma

CHEN Yamin¹ WEI Lun¹ LIN Xu¹ ZHANG Wenjing¹ WU Jingfang¹ XUE Gang²

(¹Basic Medical College, Zhangjiakou, 075000, China; ²Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, First Affiliated Hospital, Hebei North University)

Corresponding author: WU Jingfang, E-mail: wjfxg@163.com; XUE Gang: E-mail: xgwjfg@163.com

Abstract Objective: To explore the expression and clinical significance of nuclear factor erythroid-2 related factor 2(Nrf2) and ERK signal in papillary thyroid carcinoma(PTC). **Method:** PTC microarray were detected by immunohistochemical method(IHC). The expression of Nrf2, ERK₂ and p-ERK_{1/2} in PTC, para-carcinoma and normal thyroid tissue were detected by Western blot. The transcriptional level of Nrf2 mRNA in PTC, para-carcinoma and normal thyroid tissue were detected by real-time quantitative PCR(qPCR) method. **Result:** Nrf2, ERK₂, p-ERK_{1/2} protein were high expression in group of lymph node metastasis PTC and negative or weak positive expression in para-carcinoma tissue($P<0.01$). And the proteins of clinical stage III-IV of PTC groups express higher than without lymph node metastasis group and clinical stage I-II of PTC group($P<0.05$). The expression of Nrf2 protein was positively correlated with ERK₂ and p-ERK_{1/2} protein in PTC($r=0.7232$, $r=0.6686$, $P<0.05$). The Western blot results of Nrf2, ERK₂, p-ERK_{1/2} had a higher level in PTC than those of paracarcinoma and normal thyroid tissue($P<0.01$). The level of Nrf2 mRNA were higher than those of paracarcinoma and normal thyroid tissue($P<0.01$). **Conclusion:** High expression of Nrf2 may be associated with the progression of papillary thyroid carcinoma, and may relate to the high expression and activity of ERK pathway.

Key words nuclear factor erythroid-2 related factor 2; papillary thyroid carcinoma; extracellular protein kinase 2; p-ERK_{1/2}

甲状腺具有很高的抗氧化能力,特定的抗氧化剂/解毒酶的酶类可能是甲状腺细胞维持内稳态减轻氧化损伤的核心因素。核因子 E2 相关因子 2

(Nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2) 是 Moi 等^[1]于 1994 年发现的一种 CNC(cap'n-collar)家族核转录因子,介导组织的氧化应激转录调节。Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)是 Nrf2 的细胞内源性抑制剂,Keap1 及 Nrf2 上游激酶 ERK 和 PI3K 等均可调节 Nrf2 抗氧化反应原件活化^[2-3]。甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma,

* 基金项目:河北省重大医学科研课题(No:ZD2013052); 张家口市科技攻关计划(No:1411043H,1611055H)

¹河北北方学院基础医学院(张家口,075000)

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:吴靖芳, E-mail: wjfxg@163.com; 薛刚, E-mail: xgwjfg@163.com

PTC)是头颈部最常见的恶性肿瘤,发病率约占甲状腺癌的 80%^[4]。Nrf2 对肿瘤存在双重作用:在正常组织中具有抑制肿瘤形成的作用,但是在肿瘤细胞中的异常持续活化会导致肿瘤的发生发展^[5]。肺癌、乳腺癌过度表达和激活 Nrf2,促进肿瘤细胞的增殖,对放疗产生耐受性,与患者的恶性生物学特性和不良预后有关^[6-7]。ERK 异常活化与癌基因活化、抑癌基因失活有关。Cong 等^[3]研究证明 ERK 信号级联调节 Nrf2 表达和活化并部分通过 Nrf2 控制人胶质母细胞瘤 U251 细胞活力。本实验旨在探讨 PTC 中 Nrf2 及 ERK 的表达、活化及临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 手术标本 临床手术样品来自河北北方学院第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科 2015—2016 年期间资料完整的 PTC 及癌旁标本各 20 例以及甲状腺腺瘤手术切除标本周围正常组织 20 例。经患者知情同意后,每例取典型癌组织、癌及腺瘤旁 1 cm 外组织 100 mg 液氮冻存,用于免疫印迹及 real-time PCR 检测。

1.1.2 组织芯片 OD-CT-EdThy03 组织芯片购自上海芯超生物科技有限公司,62 个点(癌及癌旁各 31 点),点直径 2.0 mm,芯片厚度 4 μ m。其中男 9 例,女 22 例,年龄 13~77 岁,平均(51.6 \pm 8.4)岁。根据 TNM(UICC)分期标准,Ⅰ~Ⅱ期 11 例,Ⅲ~Ⅳ期 20 例。31 例 PTC 中合并颈淋巴结转移癌 15 例。

1.1.3 主要试剂 兔 Nrf2、ERK₂、p-ERK_{1/2} 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 生物技术公司,兔 β -actin 抗体、兔 Streptavidin-HRP 试剂盒、生物素标记的羊抗兔/鼠二抗工作液(康为世纪),浓缩型 DAB 显色试剂盒购于中杉金桥。蛋白提取试剂盒(普利莱基因技术有限公司),ECL 化学发光试剂盒(联科生物技术有限公司)。Trizol、单链 cDNA 合成试剂盒(广州复能),Fast SYBR[®] Green Master Mix(赛默飞)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 石蜡切片及芯片常规脱蜡至水,0.01 mol/L 的 PBS 洗涤 3 min \times 3, pH6.0 的枸橼酸缓冲液修复抗原,3%的 H₂O₂ 封闭 20 min 以消除内源性过氧化物酶。滴加一抗(兔 Nrf2、ERK₂、p-ERK_{1/2})工作浓度 1:100,4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 洗 3 min \times 3 次,滴加二抗(羊抗兔 IgG)37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,0.01 mol/L 的 PBS 洗涤 3 min \times 3 次,滴加三抗(辣根酶标记链霉卵白素)37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,PBS 洗 3 min \times 3 次,DAB 显色。苏木精复染、脱水、透明、中性树胶封片。阴性对照以 PBS

代替一抗,其余步骤相同。在光学显微镜下观察 Nrf2、ERK₂、p-ERK_{1/2} 在 PTC 中的表达。

1.2.2 Western blot 癌及癌旁组织各 100 mg 用于提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,按每孔 50 μ g 蛋白质样品上样,进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,60 V 恒压转膜,奶粉封闭,分别孵育一抗(Nrf2、ERK₂、p-ERK_{1/2} 1:300, β -actin 效价为 1:5 000),4 $^{\circ}$ C 过夜,加入辣根过氧化物标记的山羊抗兔/鼠抗体(1:5 000),ECL 发光显色,Image J 分析条带灰度,以目的蛋白条带的灰度与 β -actin 的灰度比值表示蛋白的表达水平。

1.2.3 Real-time quantitative PCR (qPCR) 检测 Nrf2 mRNA 的转录水平 液氮研磨三组甲状腺组织,trizol 提取总 RNA,反转录成 cDNA,按照 Real-time PCR 试剂盒说明书配制预混试剂,设定程序进行 Real-time qPCR 反应。结果以 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算 Nrf2 mRNA 转录水平。引物由北京赛百盛生物工程技术有限公司合成。Nrf2 上游引物 5'-CGGTATGCAACAGGACATTG-3',下游引物 5'-GTTTGGCTTCTGGACTTGA-3'; β -actin 上游引物 5'-CCTGGGCATGGAGTCTGTG-3',下游引物 5'-AGGGGCCGGACT CGTCATAC-3'。

1.3 结果判定

采用双盲法,切片以 200 倍拍照,以细胞质或核内出现棕色颗粒为阳性染色细胞。染色结果判定标准为半定量分级法,按着色强弱和阳性细胞率计分:①无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,黄褐色为 3 分;②阳性范围:阳性细胞 <5% 计 0 分,5%~25% 计 1 分,26%~50% 计 2 分,>50% 计 3 分。两者之和为该患者组织评分值, \leq 2 分为阴性(-),3~4 分为阳性(+),5~6 分为强阳性(++)^[8]。各组阳性病例(+~++)与总病例之比即为该指标的表达阳性率。

1.4 统计学处理

以 SPSS 18.0 对各组数据进行统计。Nrf2、ERK₂ 和 p-ERK_{1/2} 表达阳性率采用 χ^2 检验(当理论频数 <5 时,采用 Fisher's 确切概率法),相关分析采用 Spearman 等级相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Nrf2、ERK₂ 和 p-ERK_{1/2} 三种蛋白在 PTC 中的表达

Nrf2 阳性产物为棕黄色物质,主要定位于胞质,癌组织中表达强度高,而癌旁组织呈弱阳性或不表达(图 1、2);ERK₂、p-ERK_{1/2} 蛋白阳性产物为棕黄色颗粒,ERK₂ 主要表达于胞质和胞膜(图 3、4),p-ERK_{1/2} 蛋白表达于胞核和部分胞质(图 5、6)。PTC 中 Nrf2、ERK₂ 和 p-ERK_{1/2} 阳性率分别

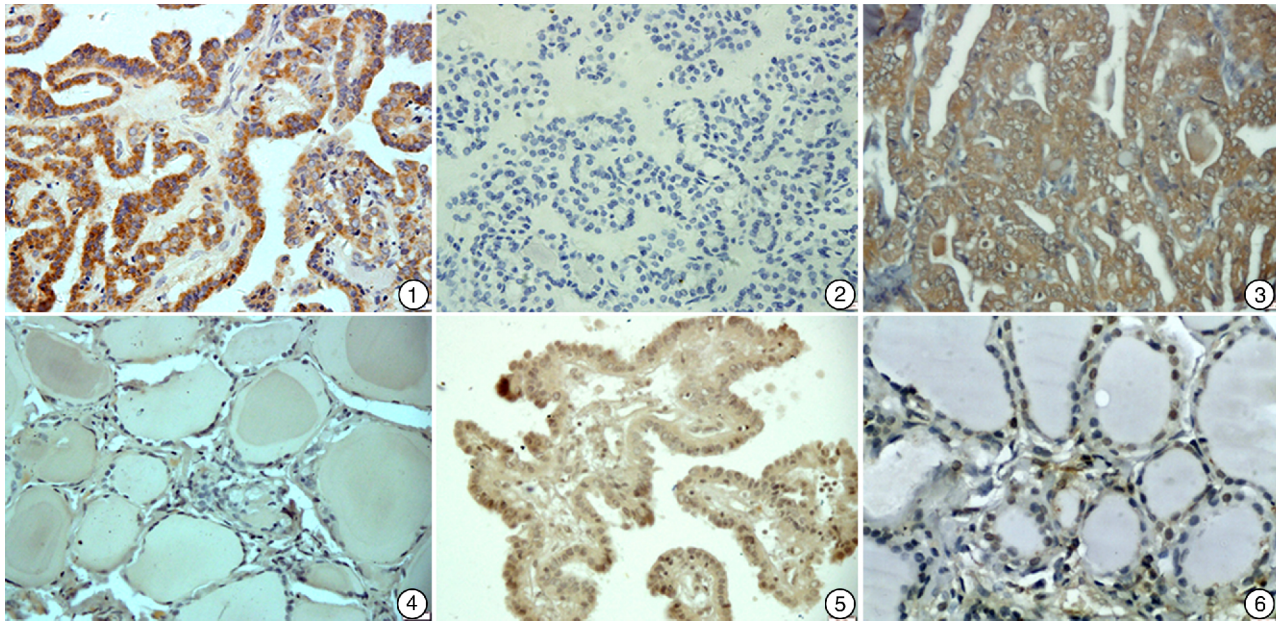


图 1 Nrf2 在 PTC 组织中的表达; 图 2 Nrf2 在癌旁组织中的表达; 图 3 ERK₂ 在 PTC 组织中的表达; 图 4 ERK₂ 在癌旁组织中的表达; 图 5 p-ERK_{1/2} 在 PTC 组织中的表达; 图 6 p-ERK_{1/2} 在癌旁组织中的表达

为 83.87% (26/31)、87.10% (27/31) 和 77.42% (24/31), 明显高于癌旁组织 12.90% (4/31)、9.68% (3/31) 和 3.23% (1/31), $P < 0.01$ 。

2.2 Nrf2、ERK₂ 和 p-ERK_{1/2} 与 PTC 临床病理特征的关系

Nrf2、ERK₂、p-ERK_{1/2} 在临床 III ~ IV 期阳性率显著高于 I ~ II 期, 分别为 95.00% vs 63.64%、100.00% vs 63.64% 和 90.00% vs 54.55% ($P < 0.05$); Nrf2、ERK₂、p-ERK_{1/2} 阳性率在淋巴结转移者显著高于无淋巴结转移者, 分别为 100.00% vs

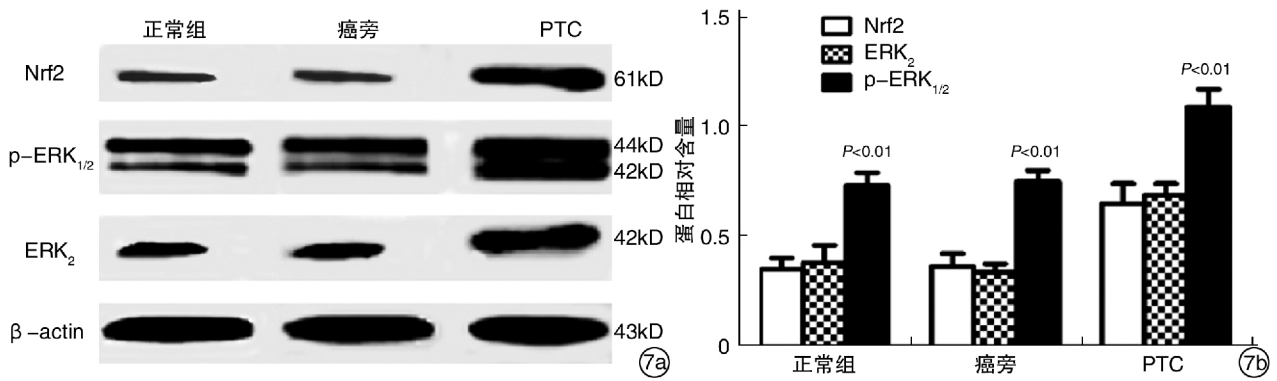
68.75%、100.00% vs 75.00% 和 93.33% vs 62.50% ($P < 0.05$); 三者阳性率与性别、年龄、肿瘤直径无关, 见表 1。Spearman 等级相关分析表明, Nrf2 阳性病例与 ERK₂、p-ERK_{1/2} 的阳性表达呈明显正相关 ($r = 0.7232, P = 0.02$; $r = 0.6686, P = 0.013$)。

2.3 Western blot 结果

Nrf2、ERK₂、p-ERK_{1/2} 三种蛋白反应条带在 PTC 组中表达均高于癌旁组织及正常组织, $P < 0.01$ (图 7)。

表 1 PTC 临床病理参数与 Nrf2、ERK₂、p-ERK_{1/2} 的关系

临床病理参数	例数	Nrf2			ERK ₂			p-ERK _{1/2}		
		+	χ^2	P	+	χ^2	P	+	χ^2	P
性别										
男	9	7(77.78)	0.337	0.613	7(77.78)	0.948	0.560	6(66.67)	0.812	0.368
女	22	19(86.36)			20(90.91)			18(81.82)		
年龄/岁										
<45	20	17(85.00)	0.051	1.000	18(90.00)	0.409	0.601	16(80.00)	0.208	0.649
≥45	11	9(81.82)			9(81.82)			8(72.73)		
直径/cm										
≤2	8	6(75.00)	0.607	0.583	6(75.00)	1.359	0.268	5(62.50)	1.329	0.335
>2	23	20(86.96)			21(91.30)			19(82.61)		
TNM 分期										
I ~ II	11	7(63.64)	4.990	0.025	7(63.64)	8.080	0.010	6(54.55)	4.940	0.026
III ~ IV	20	19(95.00)			20(100.00)			18(90.00)		
淋巴结转移										
有	15	15(100.00)	5.410	0.020	15(100.00)	4.170	0.041	14(93.33)	4.070	0.044
无	16	11(68.75)			12(75.00)			10(62.50)		



7a: Western blot 结果; 7b: 相对定量统计结果。

图 7 Nrf2、ERK₂、p-ERK_{1/2}在正常组织、癌旁和 PTC 组织中的免疫印迹结果

2.4 PTC、癌旁及正常组织中 Nrf2 mRNA 的转录水平

qPCR 结果显示: PTC 组 Nrf2 mRNA 转录水平明显高于癌旁及正常组织(图 8), $P < 0.01$, 癌旁及正常组织中 Nrf2 mRNA 水平无明显差别。

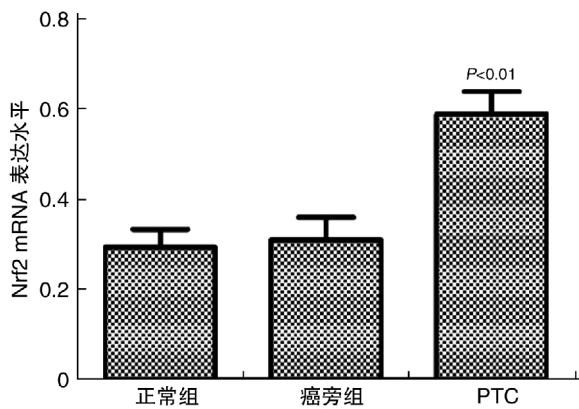


图 8 Nrf2 mRNA 在正常组织、癌旁和 PTC 组织中的转录水平

3 讨论

Nrf2 是细胞内调控氧化应激反应的重要元件, 能增强细胞对氧化应激的耐受能力, 保护机体免受致癌物损伤。几乎所有细胞都可表达 Nrf2, 生理状态下, Nrf2 和 Keap1 结合锚定在胞质, 被泛素蛋白酶体途径降解。当受到诱导物的刺激, 富含巯基基团的 Keap1 构象发生改变, Nrf2 从 Keap1 上解离下来, 易位到细胞核, 并激活各种细胞保护基因的转录。本研究发现 Nrf2 在 PTC 中高表达, 阳性率为 83.87%, 在癌旁组织低表达或不表达, 阳性率为 12.90% ($P < 0.01$)。阳性信号大部分位于细胞质, 偶见核阳。并且 Nrf2 与淋巴结转移和临床分期有关。Lin 等^[9] 研究发现结肠癌中 Nrf2 细胞质(cNrf2)阳性患者比核阳性患者的总生存率低, 胞质阳性患者的肿瘤侵略性更强, cNrf2 上调

PMSD4, PMSD4 反过来又促进 Nrf2 的核输出, 促进肿瘤的侵袭。推测本实验中 Nrf2 胞质阳性的 PTC 侵袭性更强。肿瘤可以阻断 Nrf2 信号通路, 主要途径就是通过 Nrf2 或 Keap1 突变与基因杂合性丢失, 使 Nrf2 和 Keap1 不能正常结合, Nrf2 无法通过正常的泛素化途径降解而在细胞内积累, 使 Nrf2 水平升高, 促进肿瘤的生长^[10]。Nrf2 高表达可以促进细胞的增殖。siRNA 抑制 Nrf2 的表达后, 小细胞肺癌增殖明显减慢, 细胞多停滞在 G1 期。天然的抗氧化剂 α 硫辛酸对氧化损伤导致的细胞损害是通过产生活性氧簇, 继而诱导 HO-1 表达, 激活血管平滑肌细胞中 p44/42 MAPK 通路和 Ap-1 实现的^[11]。siRNA 干扰 Nrf2 基因可增强喉癌 Hep2 细胞系对顺铂的敏感性^[12]。大量研究表明, 细胞外调节蛋白激酶 MAPK 在多种细胞反应过程如细胞生长、分化中起着重要的调控作用, 例如转移、增生和生存, 可以被各种刺激活化。Liu 等^[13] 发现齐墩果酸(oleanolic acid, OA) 促进癌细胞中 ERK 依赖的 Nrf2 表达, 反之, Nrf2 的表达能够抑制 OA 诱导的 ROS 发生。Zipper 等^[14] 发现 ERK 可能间接促进 Nrf2 的核转位, MEK/ERK 信号通路可诱导 Nrf2 的激活。其可能机制是 ERK 通过使 Nrf2 磷酸化导致 Nrf2 构象发生改变, 从而使 Nrf2 与 Keap1 解偶联而入核。研究发现 ERK 在 PTC 中高表达, 比癌旁组织明显增高, 且相关性分析显示 Nrf2 和 ERK₂, p-ERK_{1/2} 均为正相关性。推测在 PTC 中 Nrf2 上调与 ERK 通路有关。具体机制后续将在细胞水平验证。

本研究结果提示 PTC 高表达 Nrf2 与乳头状癌的进展有关, 且与 ERK 及其磷酸化水平有关。

参考文献

[1] MOI P, CHAN K, ASUNIS I, et al. Isolation of NF-E2-related factor 2(Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91:

- 9926—9930.
- [2] MARTINEZ V D, VUCIC E A, PIKOR L A, et al. Frequent concerted genetic mechanisms disrupt multiple components of the NRF2 inhibitor KEAP1/CUL3/RBX1 E3-ubiquitin ligase complex in thyroid cancer[J]. Mol Cancer, 2013,12:124—124.
- [3] CONG Z X, WANG H D, WANG J W, et al. ERK and PI3K signaling cascades induce Nrf2 activation and regulate cell viability partly through Nrf2 in human glioblastoma cells[J]. Oncol Rep, 2013, 30: 715—722.
- [4] KIM W B. A closer look at papillary thyroid carcinoma[J]. Endocrinol Metab (Seoul), 2015, 30: 1—6.
- [5] KIM J, KEUM Y S. NRF2, a Key Regulator of Antioxidants with Two Faces towards Cancer[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016:2746457.
- [6] KAWASAKI Y, ISHIGAMI S, ARIGAMI T, et al. Clinicopathological significance of nuclear factor (erythroid-2)-related factor 2 (Nrf2) expression in gastric cancer[J]. BMC Cancer, 2015,15: 5—5.
- [7] FURFARO A L, TRAVERSO N, DOMENICOTTI C, et al. The Nrf2/HO-1 Axis in Cancer Cell Growth and Chemoresistance[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 1958174.
- [8] 李成军, 薛明学, 韩璐荣. 鼻咽癌中 Testin 的表达与鼻咽癌患者临床病理特征的关系[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016,30(4):310—313.
- [9] LIN P L, CHANG J T, WU D W, et al. Cytoplasmic localization of Nrf2 promotes colorectal cancer with more aggressive tumors via upregulation of PSMD4[J]. Free Radic Biol Med, 2016, 95:121—132.
- [10] TAGUCHI K, MOTOHASHI H, YAMAMOTO M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution[J]. Genes Cells, 2011,16: 123—140.
- [11] CHENG P Y, LEE Y M, SHIH N L, et al. Heme oxygenase-1 contributes to the cytoprotection of alpha-lipoic acid via activation of p44/42 mitogen-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells[J]. Free Radic Biol Med, 2006,40: 1313—1322.
- [12] 徐吉, 周争, 李吉平. siRNA 干扰 NF-E2 相关因子 2 对喉鳞状细胞癌化疗敏感性的影响[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2015, 23(4): 381—385.
- [13] LIU J, MA L, CHEN X, et al. ERK inhibition sensitizes cancer cells to oleanolic acid-induced apoptosis through ERK/Nrf2/ROS pathway[J]. Tumour Biol, 2016,37: 8181—8187.
- [14] ZIPPER L M, MULCAHY R T. Erk activation is required for Nrf2 nuclear localization during pyrrolidine dithiocarbamate induction of glutamate cysteine ligase modulatory gene expression in HepG2 cells[J]. Toxicol Sci, 2003,73:124—134.

(收稿日期:2017-02-11)

重组人 IL-11 治疗对放化疗鼻咽癌患者预后的影响

潘雅¹ 吴慧² 李媛³

[摘要] 目的:探讨重组人 IL-11 治疗对放化疗鼻咽癌患者预后的影响。方法:将 78 例鼻咽癌患者按随机信封抽签原则分为观察组与对照组各 39 例,对照组给予常规放化疗,观察组在对照组治疗的基础上给予重组人 IL-11 治疗,两组都完成 2 个周期治疗。结果:观察组总有效率(87.2%)高于对照组(59.0%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。观察组在治疗期间放射性口腔黏膜炎 0 级 14 例, I 级 6 例, II 级 14 例, III 级 5 例;对照组 0 级 28 例, I 级 5 例, II 级 4 例, III 级 2 例,总体比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗后观察组与对照组的血清 CRP 分别为(5.32±1.92)mg/L 和(12.44±2.48)mg/L,明显低于治疗前的(24.59±3.14)mg/L 和(24.12±2.87)mg/L(均 $P < 0.05$);治疗后,观察组血清 CRP 明显低于对照组($P < 0.05$)。治疗后观察组与对照组的疼痛评分明显低于治疗前($P < 0.05$);治疗后,观察组疼痛评分低于对照组($P < 0.05$)。结论:重组人 IL-11 治疗在放化疗鼻咽癌患者中的应用能促进血清 CRP 表达下降,缓解疼痛,减轻放射性口腔黏膜炎,从而提高预后疗效。

[关键词] 鼻咽肿瘤;重组人 IL-11;放化疗;口腔黏膜炎;疼痛

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2017.12.012

[中图分类号] R739.63 [文献标志码] A

¹海南医学院第一附属医院耳鼻喉科(海口,570203)

²海南医学院第一附属医院口腔科

³海南医学院第一附属医院麻醉科

通信作者:吴慧, E-mail:wuhui397@163.com