

HPA 及 NRF2 与喉鳞状细胞癌发生和发展的相关性研究

邱新峰,程万民[△]

(天津市第五中心医院耳鼻喉科 300450)

[摘要] **目的** 探讨乙酰肝素酶(HPA)及核因子 E2 相关因子 2(NRF2)在喉鳞状细胞癌中的表达及意义。**方法** 收集 2015 年 2 月至 2017 年 2 月该院保存的喉鳞状细胞癌标本 81 份为病例组,同时选取 77 份声带息肉病理标本为对照组。采用免疫组织化学法检测 HPA 表达;Western blot 检测 NRF2 表达。**结果** 病例组和对照组的 HPA 阳性表达率和 NRF 表达量分别为 81.48%、19.48%和 0.844±0.113、0.202±0.094,差异有统计学意义($P<0.05$);有淋巴结转移、TNM 分期为Ⅲ~Ⅳ期患者 HPA 阳性表达率分别为 93.02%和 94.87%,明显高于无淋巴结转移和Ⅰ~Ⅱ期患者($P<0.05$);中低分化患者 HPA 阳性表达率分别为 93.75%和 100.00%,明显高于高分化患者($P<0.05$);有淋巴结转移、TNM 分期为Ⅲ~Ⅳ期患者 NRF2 水平分别为 0.901±0.122 和 0.885±0.105,明显高于无淋巴结转移和Ⅰ~Ⅱ期患者($P<0.05$);中低分化患者 NRF2 水平分别为 0.854±0.101 和 0.878±0.099,明显高于高分化患者($P<0.05$)。**结论** 喉鳞状细胞癌患者 HPA 及 NRF2 表达明显升高,与淋巴结转移、TNM 分期及病理分级有关。

[关键词] 喉肿瘤;乙酰肝素酶;NF-E2 相关因子;喉鳞状细胞癌;临床病理

[中图分类号] R76 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)12-1628-04

Study on the relationship between HPA and NRF2 and the occurrence and development of laryngeal squamous cell carcinoma

QIU Xinfeng, CHEN Wanmin[△]

(Department of Otolaryngology, The No. 5 Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of heparanase (HPA) and NF-E2 associated factor (NRF2) in laryngeal squamous cell carcinoma. **Methods** We collected 81 cases of laryngeal squamous cell carcinoma in our hospital from February 2015 to February 2017 as group A, and then selected 77 cases of polyp of vocal cord pathological specimens as group B. The expression of HPA was detected by immunohistochemistry, and the expression of NRF2 was detected by western blot. **Results** The positive expression rate of HPA and the expression of NRF in the group A and B were 81.48%, 19.48% and 0.844±0.113, 0.202±0.094, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The positive expression rates of HPA in patients with lymph node metastasis and TNM stage Ⅲ to Ⅳ were 93.02% and 94.87%, which were significantly higher than those without lymph node metastasis and stage Ⅰ to Ⅱ ($P<0.05$). The positive expression rates of HPA in patients with low and middle differentiation were 93.75% and 100.00%, which were significantly higher than those with high differentiation ($P<0.05$). The expression of NRF2 in patients with lymph node metastasis and TNM stage Ⅲ to Ⅳ were 0.901±0.122 and 0.885±0.105, which significantly higher than those without lymph node metastasis and stage Ⅰ to Ⅱ ($P<0.05$). The expression of NRF2 in patients with moderate and low differentiation were 0.854±0.101 and 0.878±0.099, which were significantly higher than patients with stage Ⅰ to Ⅱ ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of HPA and NRF2 in laryngeal squamous cell carcinoma are significantly increased, which are related to lymph node metastasis, TNM stage and pathological grade.

[Key words] laryngeal neoplasms; heparanase; NF-E2 associated factor; laryngeal squamous cell carcinoma; clinical pathology

喉鳞状细胞癌是较为常见的口腔上皮恶性肿瘤,临床预后较差。流行病学研究显示,喉鳞状细胞癌的发病率为 0.5%~1.7%,在部分地区的发病率更高,

可上升 3~4 倍^[1]。近年来基础领域的研究显示,生物学因子的改变可影响喉鳞状细胞的增殖、癌细胞的侵袭或转移等病理过程,促进早期上皮性恶性肿瘤的

进展^[2-3]。乙酰肝素酶(heparanase, HPA)能够分解细胞外基质,为癌细胞的转移提供条件,而核因子 E2 相关因子 2(NF-E2 associated factor, NRF2)能够影响到氧化应激损伤或者氧自由基的传递,促进早期鳞状细胞的病变^[4]。为了进一步揭示 HPA 及 NRF2 与喉鳞状细胞癌发生、发展的相关性,本研究收集 2015 年 2 月至 2017 年 2 月本院保存的喉鳞状细胞癌标本 81 份,观察二者的异常表达,研究其与患者临床病理特征间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 2 月至 2017 年 2 月本院保存的喉鳞状细胞癌标本 81 份(病例组),标本来源患者中男 52 例,女 29 例,平均年龄(51.42±8.92)岁。纳入标准:(1)患者临床病理资料保存完整;(2)经病理确诊为喉鳞状细胞癌;(3)术前未接受过放疗等治疗;(4)患者及家属知情同意并签署同意书。排除标准:(1)临床病理资料不完整;(2)合并其他原发性肿瘤。同时选取声带息肉病理标本 77 份(对照组),标本来源患者中男 42 例,女 35 例,平均年龄(50.89±9.10)岁。两组受试者年龄、性别比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法 采用石蜡切片脱蜡至水,切片厚度 3 mm,3% H₂O₂ 室温孵育 5 min,采用去离子水冲洗 3 次,每次 3 min,采用浓度为 10% 牛奶蛋白(1 g 蛋白加入 100 mL 纯水)封闭,室温孵育 5 min,加入 HPA 抗体(鼠来源,购自南京碧云天生物科技有限公司),37 °C 孵育 2 h,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,每次 5 min,滴加 HRP 标记的二抗(兔来源,购自罗氏检测公司),37 °C 孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,然后加入硝基四氮唑蓝/5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸(NBT/BCIP)色剂显色 5 min,复染,脱水,透明,封片,镜下观察。OLIPICS 电子显微镜购自上海精密仪器有限公司,配套试剂购自南京泰康生物科技有限公司。

1.2.2 Western blot 检测 冰上分离出组织,置于预冷的研钵中液氮研磨至粉末状。冰上静置 60 min,室温下 20 000 r/min 离心 60 min,取出下层沉淀。按总蛋白 80 g 计算上样容积,按照比例为 3:1 或者 4:1 的比例上 TBS 缓冲液,加入 20 μL 缓冲液后于 45 V 电压下进行电泳操作,脱脂蛋白封闭 2 h,加入 NRF2 抗体(鼠来源,购自南京碧云天生物科技有限公司)各 10 μL 后室温下孵育 2 h,2 h 后加入二抗(兔来源,购自南京凯基生物科技有限公司)。采用日本 Panasoic 公司生存的 HSO-900 系统影像分析仪器进行图像分析。

1.2.3 免疫组织化学结果判断 HPA 阳性表达主要定位于细胞质和细胞膜,呈棕黄色染色。每张切片选取 5 个高倍镜视野,将阳性细胞比例及染色强度分为 4 个等级,分别对应 0、1、2、3 分。其中阳性细胞比

例小于 25% 为 0 分,≥25%~<50% 为 1 分,≥50%~<75% 为 2 分,≥75% 为 3 分;无染色为 0 分,浅黄色为 1 分,橘黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。将阳性细胞比例及染色强度得分相加后除 2 得出最终分数,其中得分小于 1.5 分为阴性,≥1.5 分为阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用独立样本 *t* 检验,多组间比较使用方差分析,两两比较采用 LSD 检验。计数资料用率表示,组间比较使用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 HPA 及 NRF2 表达比较 病例组和对照组的 HPA 阳性表达率和 NRF 表达量分别为 81.48%、19.48% 和 0.844±0.113、0.202±0.094,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1、2。

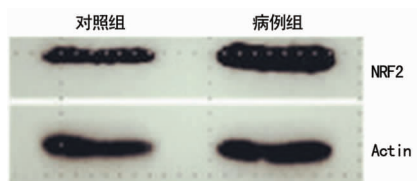
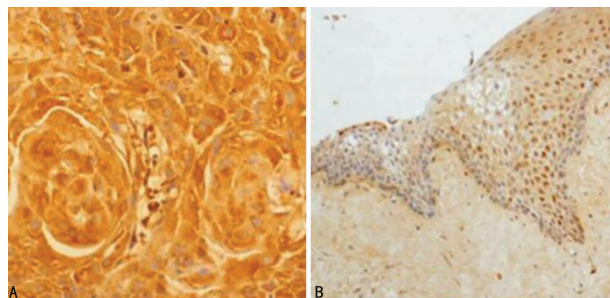


图 1 Western blot 检测图



A: 病例组(SP, ×400); B: 对照组(SP, ×200)

图 2 两组 HPA 阳性表达免疫组织化学图

2.2 患者 HPA 阳性表达与病理特征的关系 不同年龄、性别和病灶部位患者 HPA 阳性表达率比较差异无统计学意义($P>0.05$);有无淋巴结转移,不同的病理分化、TNM 分期患者 HPA 阳性表达率比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 患者 HPA 阳性表达与病理特征的关系

项目	n	HPA 阳性表达[n(%)]	χ^2	P
年龄(岁)			0.147	>0.05
≤50	45	36(80.00)		
>50	36	30(83.33)		
性别			0.049	>0.05
男	52	42(80.77)		
女	29	24(82.76)		
病灶部位			0.162	>0.05
声门上型	42	33(78.57)		
声门型	33	27(81.82)		

续表 1 患者 HPA 阳性表达与病理特征的关系

项目	n	HPA 阳性表达[n(%)]	χ^2	P
声门下型	6	5(83.33)		
淋巴结转移			8.092	<0.05
有	43	40(93.02)		
无	38	26(68.42)		
病理分化			14.269	<0.05
高	37	23(62.16)		
中	32	30(93.75)		
低	12	12(100.00)		
TNM 分期			8.938	<0.05
I~II 期	42	29(69.05)		
III~IV 期	39	37(94.87)		

2.3 患者 NRF2 表达与病理特征的关系 不同年龄、性别和病灶部位患者 NRF2 表达比较差异无统计学意义($P>0.05$);有无淋巴结转移,不同的病理分化、TNM 分期患者 NRF2 水平比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 患者 NRF2 水平与病理特征的关系

临床病理特征	n	NRF2 水平($\bar{x}\pm s$)	F/t	P
年龄(岁)			-0.137	>0.05
≤ 50	45	0.841 \pm 0.102		
> 50	36	0.844 \pm 0.093		
性别			0.343	>0.05
男	52	0.845 \pm 0.084		
女	29	0.838 \pm 0.095		
病灶部位			2.013	>0.05
声门上型	42	0.838 \pm 0.101		
声门型	33	0.843 \pm 0.094		
声门下型	6	0.845 \pm 0.112		
淋巴结转移			-3.864	<0.05
有	43	0.901 \pm 0.122		
无	38	0.803 \pm 0.104		
病理分化			20.104	<0.05
高	37	0.810 \pm 0.085		
中	32	0.854 \pm 0.101		
低	12	0.878 \pm 0.099		
TNM 分期			-3.799	<0.05
I~II 期	42	0.801 \pm 0.094		
III~IV 期	39	0.885 \pm 0.105		

3 讨 论

喉鳞状细胞癌的发生主要考虑与遗传、吸烟或者放射性因素等有关,特别是在吸烟人群中,喉鳞状细胞癌的发病率高于 55%^[5]。喉鳞状细胞癌的临床预

后较差,5 年生存率小于 36%,中位生存时间不足 36 个月^[6-7]。一项样本量为 334 例,且临床分期为中晚期的喉鳞状细胞癌治疗随访研究显示,疾病的治疗总体有效率小于 30%,治疗后的复发率及远处转移率较高^[8-9],病死率持续性维持在较高的水平^[10]。对喉鳞状细胞癌发生、发展过程中相关生物学机制进行研究,不仅可以为喉鳞状细胞癌的生物学靶向治疗提供参考,还可以为喉鳞状细胞癌的临床预后随访提供可靠的实验室指标。

HPA 的结构上包含了 3~4 个糖蛋白配体结构,能够在结合细胞外基质的同时促进其分解,通过分解细胞外胶原纤维 IV 或者胶原纤维 V 等,降低细胞间的紧密连接程度,为癌细胞的早期增殖或者转移提供空间;NRF2 能够在细胞水平影响到氧化应激代谢,促使氧自由基传递异常导致的细胞氧化损伤,以及喉鳞状上皮早期增殖调控异常,影响到癌细胞的持续性病变的发生^[11-12]。已有的研究探讨了 NRF2 及 HPA 等在喉癌患者中的异常表达,但缺乏对于其与患者临床病理特征间的关系研究,此为本次研究的创新点。

本次研究发现,喉癌组患者的病灶组织中 HPA 及 NRF2 表达水平均明显高于正常对照组织,提示 HPA 及 NRF2 二者可能参与到了喉鳞状细胞癌的早期发生过程,HPA 及 NRF2 的高表达可以从下列两个方面影响到喉癌的进展:(1)HPA 的高表达能够提高癌细胞的早期变形及突破基底膜的能力,促使其早期临床分期的进展;(2)NRF2 的高表达能够使三磷酸腺苷(ATP)能量代谢利用障碍,促进线粒体氧化应激异常,导致喉鳞状细胞的细胞增殖调控紊乱。有研究者在探讨喉癌患者的发病机制的过程中发现,HPA 及 NRF2 在喉癌患者血清及病灶组织中均存在一定程度的异常表达,且相关表达水平越高,患者病情越重、临床远期预后越差^[13-14]。在探讨不同的临床特征与生物学因子的关系过程中发现,有淋巴结转移、TNM 分期为 III~IV 期患者 HPA 阳性表达率更高,提示 HPA 可显著影响到淋巴结的转移等病理过程。从机制上考虑 HPA 对于相关临床病理特征的影响主要为:(1)HPA 促进了癌细胞对于淋巴结内皮细胞的黏附能力,提高了其通过淋巴结转移的风险;(2)HPA 能够影响到癌组织对于临床正常口腔组织或者器官的浸润,促进临床分期的进展。同时本研究发现 HPA 可以显著影响到癌细胞的分化程度,加剧癌细胞分化不良或者低分化的风险。在探讨 NRF2 与喉癌患者临床特征的关系过程中,本研究也发现 NRF2 与患者的淋巴结转移、临床分期等特征具有明显的关系,这些均提示了 NRF2 等与喉癌病情有密切联系。HPA 及 NRF2 可能在下列两个方面发挥了一定的协同作用,从而促进了喉癌特别是鳞状细胞癌的发生:(1)HPA 及 NRF2 的高表达均可能影响乙酰基团的

修饰及羧基末端的空间结构,干预喉癌上皮细胞的增殖、分化;(2)HPA 及 NRF2 的协同表达可能影响核转录因子的转录活性,增加癌细胞 DNA 异常增殖的风险。但更为具体的内在机制的探讨,仍然需要后续基础研究证实。

综上所述,喉鳞状细胞癌患者 HPA 及 NRF2 表达明显升高,与淋巴结转移、TNM 分期及病理分级有关,值得进一步研究。但本研究对于相关生物学因子的多元线性回归的研究不足,存在一定的局限。

参考文献

[1] HAH J H, SIM S, AN S, et al. Evaluation of the prevalence of and factors associated with laryngeal diseases among the general population[J]. *Laryngoscope*, 2015, 125(11):2536-2542.

[2] ESKIIZMIR G, TANYERI TOKER G, CELIK O, et al. Predictive and prognostic factors for patients with locoregionally advanced laryngeal carcinoma treated with surgical multimodality protocol[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2017, 274(3):1701-1711.

[3] HERNANDEZ-MORATO I, SHARMA S, PITMAN M J. Changes in neurotrophic factors of adult rat laryngeal muscles during nerve regeneration [J]. *Neuroscience*, 2016, 333(6):44-53.

[4] 卜川,魏日富,朱忠寿,等. 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[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 30(15):1191-1194.

[5] 朱奕,王胜资. 吸烟相关性喉癌发生机制的研究进展[J].

中国眼耳鼻喉科杂志, 2015, 15(3):213-215.

[6] 乐飞,罗文政,唐亿华,等. 喉癌患者不同手术方式临床疗效及预后影响因素的探究[J]. *中国当代医药*, 2014, 21(15):31-33.

[7] 李铭仪,林辉,刘锦全,等. 局部晚期声门上喉癌的治疗与预后分析[J/CD]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2014, 8(18):3391-3393.

[8] 刘珂,钱立庭,高劲. 手术联合放疗治疗喉癌的疗效及预后因素分析[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2013, 18(10):910-913.

[9] 李翔宇,王吉选,孙海燕,等. T₃、T₄ 期声门型喉癌患者出现颈部淋巴结转移的相关因素分析[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2015, 29(17):1517-1518.

[10] 王驰,宁博. 两种不同手术方式对喉癌患者治疗预后的影响比较[J/CD]. *全科口腔医学电子杂志*, 2015, 2(8):127-128.

[11] 时胜武,侯学东,周彬. 乙酰肝素酶在喉鳞状细胞癌组织中的表达和细胞定位与预后的关系[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 30(19):1552-1556.

[12] 谢芳,董频. 喉癌预后相关因素的研究进展[J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 2014, 22(4):317-320.

[13] LI-QIAO Y, JIAN-WEI Z, JING-JIE L, et al. The risk factors of intraoperative anesthesia adverse events in children with laryngeal diseases[J]. *J Clin Anesth*, 2016, 34(6):535-539.

[14] REIS J G C, REIS C S M, COSTA D C S D, et al. Factors associated with clinical and topographical features of laryngeal tuberculosis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4):e0153450.

(收稿日期:2017-09-22 修回日期:2017-12-26)

(上接第 1627 页)

explosion with possible traumatic brain injury in need of neurosurgical intervention [J]. *JAMA Surg*, 2016, 151(10):954-958.

[6] 常谦,刘俊,岑键昌. 改良 Fisher 分级与破裂动脉瘤患者症状性脑血管痉挛的关系[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2012, 20(7):1209-1210.

[7] 张坤,罗祺,陈儂. 持续腰池引流后 Hunt-Hess 的重新评估对动脉瘤破裂患者治疗的影响[J]. *临床神经外科杂志*, 2013, 10(1):12-13.

[8] 黄志伟,李学东,覃军,等. 支架辅助栓塞急性期颅内宽颈破裂动脉瘤的并发症危险因素分析[J]. *中华神经外科杂志*, 2016, 32(4):380-384.

[9] 梁晓东,王子亮,李天晓,等. 替罗非班在颅内破裂动脉瘤介入治疗术中预防性应用研究[J]. *介入放射学杂志*, 2015, 24(12):1034-1038.

[10] AVDAGIC S S, BRKIC H, AVDAGIC H, et al. Impact of comorbidity on early outcome of patients with subarachnoid hemorrhage caused by cerebral aneurysm rupture [J]. *Med Arch*, 2015, 69(5):280-283.

[11] 潘东峰,蒙加强. 手术时机选择对老年颅内动脉瘤破裂患者临床疗效及预后的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(19):4851-4854.

[12] KIM J H, SU L E, HUH C, et al. Delayed vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage in behcet syndrome[J]. *J Cerebrovasc Endovasc Neurosurg*, 2016, 18(1):27-31.

[13] 赵恺,欧一博,何跃,等. 脑血管痉挛和手术时机对颅内破裂动脉瘤患者预后的影响[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2012, 17(6):328-330.

[14] HASHIMOTO H, KAMEDA M, YASUHARA T, et al. A case of unexpected symptomatic vasospasm after clipping surgery for an unruptured intracranial aneurysm[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(3):E25-27.

[15] 赵明娟,张晓鹏,刘娜,等. 显微手术治疗颅内破裂动脉瘤后脑血管痉挛(CVS)发生的影响因素[J]. *中国卫生标准管理*, 2016, 7(8):83-85.

(收稿日期:2017-09-12 修回日期:2017-12-18)