

NFE2L3 在直肠癌中的表达及预后意义

赛 恺^{1,2}, 余昌俊¹

摘要 目的 探索转录因子(NF-E2)相关因子3(NFE2L3)在直肠癌(RC)患者中的表达水平及其与临床预后指标的相关性。方法 应用癌症相关数据库 GEPIA 和 Oncomine 中 NFE2L3 基因的表达水平和预后行生物信息预测; 回顾性分析 66 对 RC 与配对癌旁组织, 行免疫组化的方法检测 NFE2L3 基因蛋白表达; 而后通过 Kaplan-Meier 单因素和 Cox 多因素分析研究 NFE2L3 表达水平与 RC 患者预后的关系。结果 GEPIA 和 Oncomine 数据库均预测到 NFE2L3 基因 mRNA 水平在 RC 组织中显著高于正常组织($P < 0.05$)。GEPIA 数据库显示 NFE2L3 基因高表达的 RC 患者临床预后优于低表达者($P = 0.041$), 且该结果与免疫组化结果相一致, RC 组织中 NFE2L3 蛋白高表达($P < 0.001$), 且临床预后优于低表达者($P = 0.009$)。多因素及单因素生存分析结果提示: NFE2L3 蛋白表达水平是 RC 患者预后的独立预测因子。结论 NFE2L3 基因在 RC 中高表达, 可以作为预测 RC 患者预后良好的独立预测因子, 有望成为未来 RC 患者治疗的新靶点。

关键词 直肠癌; NFE2L3; 预后; 生物信息学

中图分类号 R 735.3+7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)06-0972-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.029

直肠癌(rectal cancer, RC)是常见的恶性消化道肿瘤, 当前根治性手术仍然是其主要的治疗方法, 但仍有 40%~50% 的患者因术后复发或转移而死亡^[1]。寻找预测预后的有效生物学指标是当下 RC 诊疗的研究热点。转录因子(nuclear factor-erythroid 2, NF-E2)相关因子 3(NF-E2-related factor 3, NFE2L3, 又称 Nrf3)是 NF-E2 家族的第三个家族成员, 主要的生物学作用是诱导抗氧化作用基因的表达^[2]。近期有研究表明^[3-5], NFE2L3 在血液系统、乳腺癌等多种恶性肿瘤中呈显著高表达, 且与患者

预后有着密切关系, 但 NFE2L3 在 RC 中的表达及预后意义目前仍未见明确报道。该研究利用免疫组化验证结合生物信息学预测的方法探讨 NFE2L3 在 RC 中的表达水平及其与临床预后指标的相关性。

1 材料与方法

1.1 生物信息学预测 选择癌症相关数据库(gene expression profiling interactive analysis, GEPIA)^[6]和 Oncomine^[7]进行生物信息学预测, 具体实施步骤如下: 输入基因名称“NFE2L3”和癌症类型中选择“直肠腺癌”检索分析 NFE2L3 基因 mRNA 的相对表达水平, 按其表达水平高低降序排列, 排名前 50% 定义为 NFE2L3 高表达(46 例), 余下定义为 NFE2L3 低表达(46 例)。运用 Kaplan-Meier 法绘制“NFE2L3 基因表达水平-患者的总生存期(overall survival, OS)关联曲线。

1.2 RC 标本及患者相关临床信息 回顾性收集 2008 年 4 月~2016 年 12 月在安徽医科大学第一附属医院普外科的 RC 患者癌、配对癌旁组织石蜡标本 66 对, 术后病理均证实直肠腺癌。患者相关的临床信息见表 2。本研究已经安徽医科大学伦理委员会审批, 所有患者已签署知情同意书。

1.3 免疫组化及结果判读 相关标本应用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin-peroxidase, SP)对进行检测。一抗为 NFE2L3 兔多克隆抗体(货号: HPA055889)购自美国 Sigma 公司, 工作浓度为 1:200。染色结果: 利用盲法测定, 两名病理医师对每一张切片进行独立判断, 参照此前已报道的判读方法^[8], 根据染色阳性细胞数(percentage of positive cells, PP)乘以染色强度(staining intensity, SI)的百分比计算免疫反应性评分(immunoreactive score, IRS), 评分标准为: SI(0~3 分): 0 为阴性, 1 为弱阳性, 2 为中度阳性, 3 为强阳性; PP(0~4 分): 0 为阴性, 1 为 1%~25%, 2 为 26%~50%, 3 为 51%~75%, 4 为 76%~100%。结合 IRS 评分范围为 0~12 分, 若 IRS > 4 分, 定义为 NFE2L3 高表达; 若 IRS ≤ 4 分, 评为 NFE2L3 低表达。

2019-02-28 接收

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究重大项目(编号: KJ2018ZD017)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院普外科, 合肥 230002

² 安徽省儿童医院普外科, 合肥 230002

作者简介: 赛 恺 男 本科;

余昌俊 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: Yuchangjun321@163.com

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析。RC 与正常对照组之间阳性表达率的比较采用 χ^2 检验。Kaplan-Meier 法(log-rank test) 进行单因素生存分析,而后将在单因素生存分析有意义的因素代入进行 Cox 多因素生存分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NFE2L3 在 RC 中呈显著高表达 GEPIA 数据库中共检索到含有 NFE2L3 基因表达信息的 RC 92 例,正常对照 318 例见图 1A; 其中共有 5 项关于“直肠癌 vs 正常对照组”的研究在 Oncomine 数据库中检索到,该研究涉及到有 NFE2L3 基因表达水平的信息见图 1B,结果均显示:与正常对照组比较,NFE2L3 基因 mRNA 在 RC 中呈现显著高表达,差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。经免疫组化 SP 法进一步验证上述结果显示,NFE2L3 蛋白主要表达于 RC 细胞核中,在 RC 中表达呈现高表达(66.7%)显著低于配对癌旁正常组织(15.2%),见图 2,差异有统计学意义($P < 0.001$),见表 1。此蛋白表达结果与利用癌症相关数据库预测的 mRNA 表达结果相一致。

表 1 NFE2L3 在 RC 及配对癌旁组织中的蛋白表达水平

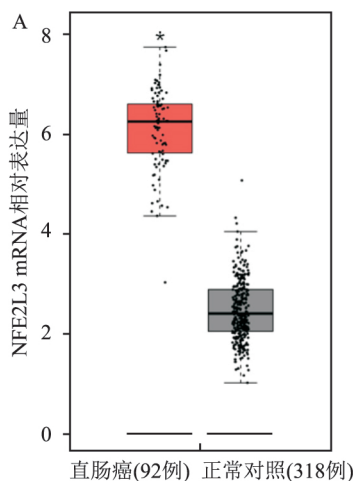
标本类型	NFE2L3 表达水平(% n)		χ^2 值	P 值
	高表达	低表达		
直肠癌组织	66.7(44/66)	33.3(22/66)	36.228	< 0.001
配对癌旁组织	15.2(10/66)	84.8(56/66)		

2.2 NFE2L3 表达与 RC 患者临床病理参数的关

系 随后,对 RC 中 NFE2L3 差异表达水平与患者的各项临床病理参数的关系进行检测,见表 2。NFE2L3 的差异表达水平仅与有无脉管侵犯有关,差异有统计学意义($P = 0.013$),而与患者性别、年龄、有无淋巴结侵犯、组织学分级、肿瘤大小、TNM 分期及浸润深度无关。

表 2 NFE2L3 差异表达水平与 RC 患者各临床病理参数的关系

参数	n	NFE2L3 表达水平		χ^2 值	P 值
		高表达	低表达		
性别					
男	25	17	8	0.032	0.858
女	41	27	14		
年龄(岁)					
≤ 60	45	31	14	0.314	0.575
> 60	21	13	8		
淋巴结侵犯					
阴性	35	26	9	1.947	0.163
阳性	31	18	13		
组织学分级					
I ~ II	41	28	13	0.129	0.720
III ~ IV	25	16	9		
肿瘤大小(cm)					
≤ 5	29	19	10	0.031	0.861
> 5	37	25	12		
脉管侵犯					
阴性	51	38	13	6.212	0.013
阳性	15	6	9		
TNM 分期					
I ~ II	36	23	13	0.275	0.600
III ~ IV	30	21	9		
浸润深度					
T1 + T2	37	25	12	0.031	0.861
T3 + T4	29	19	10		



B NFE2L3在5项直肠癌研究中的Meta分析结果

Median Rank	P-value	Gene
128.0	1.79E-24	NFE2L3

图解

- 1.Rectal Adenocarcinoma vs.Normal
Gaedcke Colorectal,Genes Chromosomes
Cancer,2010
- 2.Rectal Adenocarcinoma vs.Normal
Kaiser Colon,Genome Biol,2007
- 3.Rectal Mucinous Adenocarcinoma vs. Normal
Kaiser Colon,Genome Biol,2007
- 4.Rectal Adenocarcinoma vs.Normal
TCGA Colorectal,No Associated Paper,2011
- 5.Rectal Mucinous Adenocarcinoma vs.Normal
TCGA Colorectal,No Associated Paper,2011

1 5 10 25 25 10 5 1
Not measured

基因排名:指该基因在每个研究中的中位排名(Median Rank)
基因P值:指与基因中位排名分析得出的P值(p-Value)

图 1 癌症相关数据库预测 NFE2L3 基因在 RC 中高表达

A: GEPIA 数据库预测结果; B: Oncomine 数据库预测结果; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$

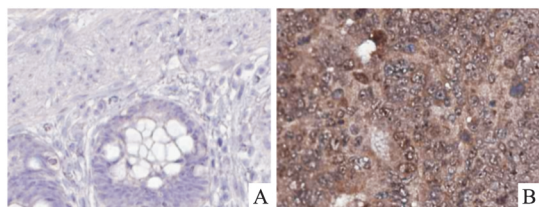


图2 免疫组化法检测 NFE2L3 在 RC 及癌旁正常组织的蛋白表达水平 SP × 100

A: NFE2L3 在癌旁正常组织中低表达; B: NFE2L3 在 RC 组织中高表达

2.3 NFE2L3 预测 RC 患者临床预后的价值 随后对 RC 患者的预后与 NFE2L3 基因的差异表达水平的关系进行研究。GEPIA 数据库预测显示: RC 患者中 NFE2L3 基因 mRNA 高表达者的预后显著好于其低表达患者 ($P = 0.041$), 见图 3A, 经进一步免疫组化 SP 法检测得到相似的结论, RC 患者中 NFE2L3 蛋白高表达者的总生存时间显著好于其低表达者, 差异有统计学意义 ($P = 0.009$), 见图 3B; Kaplan-Meier 单因素生存分析结果示: NFE2L3 差异表达水平、脉管侵犯、TNM 分期及浸润深度是决定 RC 患者总生存时间差异的关键因素, 见表 3; 将该

表 3 RC 患者的 Kaplan-Meier 单因素生存分析 ($\bar{x} \pm s$)

单参数	时间(月)	95% CI	χ^2 值	P 值
NFE2L3 表达水平				
低表达	47.746 ± 4.566	38.797 ~ 56.696	6.849	0.009
高表达	76.438 ± 3.988	68.621 ~ 84.255		
性别				
男	77.145 ± 5.478	66.408 ~ 87.882	0.305	0.581
女	68.137 ± 5.123	58.096 ~ 78.179		
年龄(岁)				
≤60	67.073 ± 4.607	58.044 ~ 76.103	2.064	0.151
>60	81.161 ± 6.032	69.338 ~ 92.984		
淋巴结侵犯				
阴性	72.843 ± 4.792	63.450 ~ 82.235	0.321	0.571
阳性	68.827 ± 5.806	57.447 ~ 80.206		
组织学分级				
I ~ II	72.425 ± 4.935	62.753 ~ 82.098	0.002	0.967
III ~ IV	70.015 ± 5.770	58.706 ~ 81.323		
肿瘤大小(cm)				
≤5	75.621 ± 5.288	65.256 ~ 85.986	0.679	0.410
>5	67.790 ± 5.228	57.543 ~ 78.038		
脉管侵犯				
阴性	74.375 ± 4.036	66.464 ~ 82.287	3.984	0.046
阳性	58.891 ± 8.844	41.556 ~ 76.226		
TNM 分期				
I ~ II	77.553 ± 5.273	67.217 ~ 87.888	7.336	0.007
III ~ IV	64.736 ± 5.163	54.617 ~ 74.856		
浸润深度				
T1 + T2	77.820 ± 4.955	68.108 ~ 87.532	7.535	0.006
T3 + T4	62.962 ± 5.309	52.556 ~ 73.368		

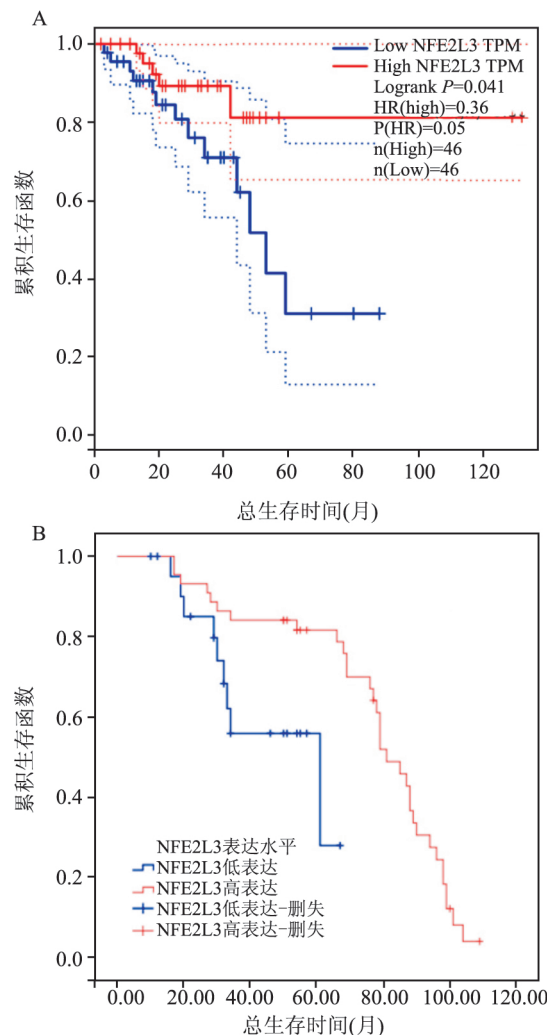


图 3 基于 NFE2L3 表达水平差异绘制总生存曲线

A: NFE2L3 mRNA 表达水平与总生存期曲线(Kaplan-Meier 法); B: NFE2L3 蛋白表达水平与总生存曲线(Kaplan-Meier 法)

4 个单因素代入 Cox 多因素生存分析后, 显示如下: NFE2L3 表达水平可作为 RC 患者预后的独立预测因子 ($P = 0.012$)。见表 4。

表 4 RC 患者的 Cox 多因素生存分析值

多因素	HR 值	95% CI	P 值
NFE2L3 表达水平(低 vs 高)	0.274	0.101 ~ 0.749	0.012
TNM 分期(I ~ II vs III ~ IV)	1.857	0.835 ~ 4.133	0.129
浸润深度(T1 + T2 vs T3 + T4)	1.872	0.888 ~ 3.947	0.100
脉管侵犯(阴性 vs 阳性)	1.244	0.542 ~ 2.858	0.606

3 讨论

目前在霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、乳腺癌、大肠癌、睾丸癌、胰腺癌等多种恶性肿瘤中均发现 NFE2L3 呈现显著高表达水平^[3-5, 9-10], 但有关

该基因到底扮演着促癌基因还是抑癌基因的角色却存在着不同的研究发现。Chevallard et al^[11]最早利用 NFE2L3 基因缺陷的小鼠模型发现,该基因缺失后的小鼠对致癌物苯并芘的敏感性高度增加,其 T 细胞淋巴瘤细胞淋巴瘤的发病率显著升高,且死亡率亦增加,提示该转录因子在造血系统恶性肿瘤中具有保护作用,发挥着抑癌基因的角色。另一方面, Wang et al^[10]证实 NFE2L3 在胰腺癌中呈明显高表达,并与患者淋巴结转移及 TNM 分期呈正相关性,且高表达 NFE2L3 的患者生存期更短,其机制与其调控血管内皮生长因子 A 表达促进肿瘤血管生成有关,该结果提示 NFE2L3 又具有促癌基因的角色。而在大肠癌的研究中出现了更为有趣的现象:国内学者^[12-14]利用全基因组寡核苷酸技术筛选出 NFE2L3 为大肠癌高表达基因,并在体外实验中发现 NFE2L3 可抑制大肠癌细胞株 LoVo 和肝癌细胞株 SMMC-7721 的细胞生长,但对细胞凋亡无明显影响;国外 Chowdhury et al^[15]通过实验证实 NFE2L3 可通过刺激 U2AF 同源基序激酶 1 基因的表达在体外促进大肠癌细胞株 DLD-1 的细胞增殖,但它们在另一种大肠癌细胞株 HCT116 中也发现 NFE2L3 可显著抑制其细胞增殖。本实验采用生物信息学的方法预测到 NFE2L3 基因在 RC 组织中的表达明显高于正常对照组(P 均 < 0.05);进一步应用免疫组化 SP 法对 66 例 RC 及配对的癌旁组织进行检测显示: NFE2L3 蛋白在 RC 组织中显著升高,且与配对癌旁组织相比,差异有统计学意义($P < 0.001$)。这一真实数据结果与生物信息学预测结果相一致,同时也与 NFE2L3 基因在前述其它恶性肿瘤中的高表达情况相吻合。该结果提示: NFE2L3 基因在恶性肿瘤发展、发生等生物学进程中起着关键的作用。

继而对 NFE2L3 表达水平与 RC 预后进行研究,经相关性分析显示: NFE2L3 的差异表达与 RC 患者有无脉管侵犯有关;经 Cox 多因素生存分析显示: NFE2L3 基金的高表达可作为预测 RC 患者预后良好的独立预测因子,该结果与利用 GEPIA 公共数据库直肠癌数据预测的生存分析结果相一致,提示 NFE2L3 高表达与 RC 患者预后良好相关,该基因可能参与 RC 转移、生长等过程并发挥重要调节作用。

而针对 NFE2L3 在上述不同恶性肿瘤中既有发挥促癌基因的作用亦有抑癌基因的作用,甚至在大肠癌不同细胞株中扮演着相反的角色,这一现象也提示: NFE2L3 在肿瘤中所发挥的调控作用存在着

较大的异质性,未来仍需要进一步深入探索,剖析其在具体瘤种中的特异性作用及其分子机制。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer Statistics 2017 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30.
- [2] Blank V, Andrews N C. The Maf transcription factors: regulators of differentiation [J]. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22(11): 437-41.
- [3] Willenbrock K, Küppers R, Renné C, et al. Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma [J]. *Haematologica*, 2006, 91(5): 596-604.
- [4] Rhee D K, Park S H, Jang Y K. Molecular signatures associated with transformation and progression to breast cancer in the isogenic MCF10 model [J]. *Genomics*, 2008, 92(6): 419-28.
- [5] 陈恩碧, 邹继彬, 黄勇波, 等. CTHRC1 和 NFE2L3 在结直肠癌组织中的表达及相关性 [J]. *中国当代医药*, 2012, 19(16): 8-9.
- [6] Tang Z, Li C, Kang B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W98-102.
- [7] Rhodes D R, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, et al. OncoPrint 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18 000 cancer gene expression profiles [J]. *Neoplasia*, 2007, 9(2): 166-80.
- [8] Wang W, Zhang M, Peng Y, et al. Ubiquitin associated protein 2-like (UBAP2L) overexpression in patients with hepatocellular carcinoma and its clinical significance [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 4779-88.
- [9] Almstrup K, Ottesen A M, Sonne S B, et al. Genomic and gene expression signature of the pre-invasive testicular carcinoma in situ [J]. *Cell Tissue Res*, 2005, 322(1): 159-65.
- [10] Wang H, Zhan M, Yang R, et al. Elevated expression of NFE2L3 predicts the poor prognosis of pancreatic cancer patients [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(17): 2164-74.
- [11] Chevallard G, Paquet M, Blank V. Nfe2l3 (Nrf3) deficiency predisposes mice to T-cell lymphoblastic lymphoma [J]. *Blood*, 2011, 117(6): 2005-8.
- [12] 许红民, 王强, 白雪娟, 等. 利用全基因组寡核苷酸筛选大肠癌差异表达基因 [J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25(9): 1109-13.
- [13] 王强, 李晓利, 白雪娟, 等. Nrf3 基因对大肠癌 LoVo 细胞系生长的影响 [J]. *军医进修学院学报* 2008, 29(4): 262-4.
- [14] 李晓利, 王强, 白雪娟, 等. Nrf3 基因对肝癌 SMMC7721 细胞系的体外研究 [J]. *军医进修学院学报*, 2010, 31(9): 924-6.
- [15] Chowdhury A M M A, Katoh H, Hatanaka A, et al. Multiple regulatory mechanisms of the biological function of NRF3 (NFE2L3) control cancer cell proliferation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12494.

网络出版时间: 2019-5-30 10:51 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190527.1649.024.html>

染色体微阵列分析技术在 210 例发育迟缓 / 智力低下患儿中的应用

李红, 童光磊, 张敏, 鲍劲松, 李司南, 周陶成, 易昕, 蔡云飞, 董文旭, 陈露露, 康倩倩, 陈婧

摘要 目的 探讨染色体微阵列分析技术(CMA)在检查核型分析未见异常的发育迟缓/智力低下(DD/ID)患儿方面的应用价值。方法 选取210例DD/ID伴或不伴其他异常患儿,分为2组:单纯性DD/ID组($n=90$),复杂性DD/ID组($n=120$ 例,合并癫痫23例、头颅磁共振异常36例、心血管系统19例、多发结构畸形42例)。提取其外周血DNA,采用CGXv1.18-plex基因芯片进行全基因组拷贝数变异(CNVs)检测,查询国际病理性CNV数据库(ClinVar、DECIPHER、OMIM等)、DGV数据库,检索PubMed数据库相关文献,对

CNVs致病性进行分析。结果 在210例DD/ID患儿中检出83例染色体拷贝数异常,检出率为39.5%。其中,检出已知致病的常见微缺失/微重复综合征66例;罕见综合征1例(Kleefstra综合征)。可疑致病变异的微缺失/微重复9例,可能良性变异1例,临床意义不明6例。结论 CMA可以明显提高DD/ID患儿遗传学病因的诊断率,对于患儿的治疗及其父母的再生育具有重要的指导意义。因此可以作为DD/ID患儿的一线诊断方法。

关键词 智力低下;发育迟缓;染色体微阵列分析;拷贝数变异;儿童

中图分类号 R 725.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)06-0976-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.030

2019-03-19 接收

基金项目:安徽省卫生计生委科研计划项目(编号:2017ek006);安徽省科技厅重点研究与开发计划项目(编号:1804h08020254)

作者单位:安徽省儿童医院神经康复科,合肥 230051

作者简介:李红,女,硕士,副主任医师;

童光磊,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: Tong704@sina.com

发育迟缓/智力低下(developmental delay/intellectual disability, DD/ID)是一组在18周岁前发病,以认知功能障碍和社会适应能力缺陷为特征的疾

Expression of NFE2L3 in rectal cancer and its prognostic significance

Sai Kai^{1,2}, Yu Changjun¹

(¹Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of General Surgery, Anhui Provincial Children's Hospital, Hefei 230002)

Abstract **Objective** To explore the expression of NFE2L3 and its prognostic significance in patients with rectal cancer(RC). **Methods** Using the data of the cancer database gene expression profiling interactive analysis(GEPIA) and Oncomine, the expression levels and prognosis of genes NFE2L3 were used for bioinformatics prediction. 66 cases of RC patients tissue samples and paired normal tissues were collected retrospectively to examine the NFE2L3 protein expression level by immunohistochemical staining. The relationship between NFE2L3 expression level and prognosis of rectal cancer patients was analyzed by Kaplan-Meier univariate and Cox multivariate factors. **Results** Both GEPIA and Oncomine databases predicted that NFE2L3 mRNA levels in rectal cancer tissues were significantly higher than those in normal tissues ($P < 0.05$). GEPIA data showed that patients with high NFE2L3 mRNA levels had significantly better prognosis than patients with low expression ($P = 0.041$). Subsequent immunohistochemical results confirmed the above prediction results. NFE2L3 protein levels in RC were highly expressed ($P < 0.001$) compared with those in normal tissues, and the prognosis was better than that of patients with low expression of NFE2L3 ($P = 0.009$). Multivariate and univariate survival analyses revealed that NFE2L3 high expression could be used as an independent predictor of good prognosis in RC patients. **Conclusion** NFE2L3 gene is highly expressed in rectal cancer, and highly expressed NFE2L3 can be used as an independent predictor of good prognosis in rectal cancer patients. NFE2L3 gene is expected to be a new target for the treatment of patients with rectal cancer in the future.

Key words rectal cancer; NFE2L3; prognosis; bioinformatics