

## Keap1/Nrf2 信号通路在非小细胞肺癌氧化应激机制中的作用

王兰荣<sup>1</sup>, 曹旻<sup>1</sup>, 张伟<sup>2</sup>, 刘萌萌<sup>3</sup>, 王晓翠<sup>1</sup>, 魏丽<sup>3</sup>, 李蕾<sup>1</sup>

1. 郑州市第三人民医院肿瘤内科, 河南 郑州 450000;

2. 郑州人民医院影像科, 河南 郑州 450000;

3. 郑州市第三人民医院病理科, 河南 郑州 450000

**【摘要】** 目的 检测非小细胞肺癌(NSCLC)组织中 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Keap1)、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 蛋白表达水平, 分析其与临床病理参数、氧化应激指标的相关性, 为临床治疗提供潜在靶点。方法 选取 2017 年 4 月至 2020 年 4 月郑州市第三人民医院收治的 100 例 NSCLC 患者为研究对象, 免疫组化法检测并比较癌组织、癌旁组织中 Keap1、Nrf2 蛋白表达水平; 比较不同临床病理参数患者 Keap1、Nrf2 蛋白表达水平; 比较不同 Keap1、Nrf2 蛋白表达患者血清超氧化物歧化酶(SOD)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、丙二醛(MDA)水平, 并采用 Spearman 法分析 SOD、iNOS、MDA 与临床病理参数的相关性, 采用 Pearson 法分析 SOD、iNOS、MDA 与 Keap1、Nrf2 蛋白水平的相关性; 比较不同 Keap1、Nrf2 蛋白表达患者的生存率。结果 癌组织、癌旁组织 Keap1 蛋白阳性率分别为 77.00%、53.00%, Nrf2 蛋白阳性率分别为 74.00%、45.00%, Keap1 蛋白 OD 值分别为 0.41±0.07、0.33±0.05, Nrf2 蛋白 OD 值分别为 0.39±0.06、0.31±0.06, 癌组织 Keap1、Nrf2 蛋白阳性率及 OD 值明显高于癌旁组织, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); Keap1 蛋白阳性表达与病理分级、T 分期呈正相关 ( $r=0.569、0.574, P<0.01$ ), Nrf2 蛋白阳性表达与病理分级、T 分期呈正相关 ( $r=0.527、0.539, P<0.01$ ); Keap1 蛋白阳性者、阴性者的血清 SOD 水平分别为 (86.78±9.14) U/mL、(115.07±12.13) U/mL, MDA 水平分别为 (4.42±0.82) mmol/L、(3.24±0.56) mmol/L, iNOS 水平分别为 (22.74±4.31) U/mL、(15.59±3.02) U/mL, Nrf2 蛋白阳性者、阴性者血清 SOD 水平分别为 (84.94±9.12) U/mL、(117.06±12.37) U/mL, MDA 水平分别为 (4.48±0.85) mmol/L、(3.21±0.52) mmol/L, iNOS 水平分别为 (23.02±4.28) U/mL、(15.64±3.10) U/mL, Keap1、Nrf2 蛋白阳性者血清 SOD 水平明显低于阴性者, MDA、iNOS 水平明显高于阴性者, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); Keap1、Nrf2 蛋白表达与 SOD 呈负相关 ( $r=-0.612、-0.614, P<0.01$ ), 与 MDA、iNOS 呈正相关 ( $r_{\text{Keap1}}=0.609、0.614, P<0.01$ ;  $r_{\text{Nrf2}}=0.610、0.608, P<0.01$ ); Keap1、Nrf2 蛋白阳性表达者 3 年生存率为 85.71%、83.78%, 明显低于阴性表达者的 95.65%、100.00%, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。结论 NSCLC 组织中 Keap1、Nrf2 蛋白表达水平升高, 且与病理分级、T 分期密切相关, 该信号通路活化可参与氧化应激反应过程, 且对预判患者预后具有一定临床意义。

**【关键词】** 非小细胞肺癌; 氧化应激; Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1; 核因子 E2 相关因子 2; 超氧化物歧化酶; 诱导型一氧化氮合酶; 丙二醛

**【中图分类号】** R734.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2024)01-0010-05

**Role of Keap1/Nrf2 signaling pathway in the mechanism of oxidative stress in non-small cell lung cancer.** WANG Lan-rong<sup>1</sup>, CAO Yang<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>2</sup>, LIU Meng-meng<sup>3</sup>, WANG Xiao-cui<sup>1</sup>, WEI Li<sup>3</sup>, LI Lei<sup>1</sup>. 1. Department of Oncology, Zhengzhou Third People's Hospital, Zhengzhou 450000, Henan, CHINA; 2. Department of Imaging, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450000, Henan, CHINA; 3. Department of Pathology, Zhengzhou Third People's Hospital, Zhengzhou 450000, Henan, CHINA

**【Abstract】 Objective** To detect the expression levels of Kelch-like epichlorohydrin-related protein-1 (Keap1) and nuclear factor E2 related factor-2 (Nrf2) proteins in non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues, analyze their correlation with clinical pathological parameters and oxidative stress indicators, and provide potential targets for clinical treatment. **Methods** A total of 100 NSCLC patients admitted to Zhengzhou Third People's Hospital from April 2017 to April 2020 were selected as the research subjects, and immunohistochemical method was used to detect and compare the expression levels of Keap1 and Nrf2 proteins in cancer tissues and adjacent tissues. The expression levels of Keap1 and Nrf2 proteins in patients with different clinical pathological parameters were compared. The levels of serum superoxide dismutase (SOD), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and malondialdehyde (MDA) in patients with different Keap1 and Nrf2 protein expressions were compared, and the correlation between SOD, iNOS, MDA and clinical pathological parameters was analyzed using Spearman's method. The correlation between SOD, iNOS, MDA and Keap1 and Nrf2 protein levels was analyzed using Pearson's method. The survival rate of patients with different Keap1 and Nrf2 protein expressions was compared. **Results** The positive rates of Keap1 protein in cancer tissue and adjacent tissue were 77.00% and 53.00%, respectively, and the positive rates of Nrf2 protein were 74.00% and 45.00%, respectively. The OD values of Keap1 protein were 0.41±0.07 and 0.33±0.05, respectively, and the OD values of Nrf2 protein were 0.39±0.06 and 0.31±0.06, respectively. The positive rates and OD values of Keap1 and Nrf2 proteins in cancer tissue were significantly

基金项目: 河南省郑州市科技惠民计划项目(编号: 2021KKJHM0010)。

第一作者: 王兰荣(1982—), 女, 硕士, 副主任医师, 主要研究方向为肿瘤疾病的临床治疗工作。

通讯作者: 曹旻(1975—), 男, 主任医师, 主要研究方向为肿瘤疾病的临床治疗工作, E-mail: zhailihong121ZLH@163.com。

higher than those in adjacent tissues, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The positive expression of Keap1 protein was positively correlated with pathological grading and T staging ( $r = 0.569, 0.574, P < 0.01$ ), while the positive expression of Nrf2 protein was positively correlated with pathological grading and T staging ( $r = 0.527, 0.539, P < 0.01$ ). The serum SOD levels of Keap1 protein positive and negative individuals were  $(86.78 \pm 9.14) \text{ U/mL}$ ,  $(115.07 \pm 12.13) \text{ U/mL}$ , MDA levels were  $(4.42 \pm 0.82) \text{ mmol/L}$ ,  $(3.24 \pm 0.56) \text{ mmol/L}$ , and iNOS levels were  $(22.74 \pm 4.31) \text{ U/mL}$ ,  $(15.59 \pm 3.02) \text{ U/mL}$ , respectively. The serum SOD levels of Nrf2 protein positive and negative individuals were  $(84.94 \pm 9.12) \text{ U/mL}$ ,  $(117.06 \pm 12.37) \text{ U/mL}$ , MDA levels were  $(4.48 \pm 0.85) \text{ mmol/L}$ ,  $(3.21 \pm 0.52) \text{ mmol/L}$ , and iNOS levels were  $(23.02 \pm 4.28) \text{ U/mL}$  and  $(15.64 \pm 3.10) \text{ U/mL}$ , respectively. The serum SOD levels of Keap1 and Nrf2 protein positive individuals were significantly lower than those of negative individuals, while MDA and iNOS levels were significantly higher than those of negative individuals, with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). The expression of Keap1 and Nrf2 proteins was negatively correlated with SOD ( $r = -0.612, -0.614, P < 0.01$ ), and positively correlated with MDA and iNOS ( $r_{\text{Keap1}} = 0.609, 0.614, P < 0.01$ ;  $r_{\text{Nrf2}} = 0.610, 0.608, P < 0.01$ ). The 3-year survival rates of patients with positive expression of Keap1 and Nrf2 proteins were 85.71% and 83.78%, significantly lower than 95.65% and 100.00% of those with negative expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression levels of Keap1 and Nrf2 proteins in NSCLC tissue are elevated and closely related to pathological grading and T staging. The activation of this signaling pathway can participate in the oxidative stress response process and has certain clinical significance in predicting patient prognosis.

**【Key words】** Non-small cell lung cancer; Oxidative stress; Kelch-like epichlorohydrin-related protein-1; Nuclear factor E2 related factor 2; Superoxide dismutase; Inducible nitric oxide synthase; Malondialdehyde

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)发病率占据肺癌的75%~80%。肿瘤细胞进展快且易扩散转移,临床常采用手术、放疗等进行治疗,但5年生存率低于60%<sup>[1-2]</sup>。氧化应激是由活性氧(ROS)生成量增加所致,ROS积累可诱导肺癌细胞凋亡,清除ROS可阻止癌细胞凋亡,即肺癌细胞存活依赖于癌细胞自身抗氧化能力<sup>[3]</sup>。Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白-1(kelch-like epichlorohydrin-associated protein-1, Keap1)/核因子E2相关因子2(nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)信号通路在癌症中发挥重要调控作用,氧化应激可激活Keap1,促使Keap1-Nrf2复合物裂解,Nrf2转移至细胞核内,可激活下游靶基因表达,参与肺癌发生发展过程<sup>[4]</sup>。Nrf2可维持氧化还原稳态,ROS侵袭细胞时,Nrf2可进入细胞核,结合抗氧化反应元件(ARE)转录编码各种抗氧化蛋白、代谢酶基因,抑制氧化应激反应<sup>[5-6]</sup>。目前氧化应激、Keap1/Nrf2信号通路在NSCLC发生过程中的机制尚未明确。基于此,本研究尝试分析Keap1/Nrf2信号通路与临床病理参数、氧化应激指标的相关性,探讨其在NSCLC氧化应激机制中的作用,为临床研制新药提供参考依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取2017年4月至2020年4月郑州市第三人民医院收治的100例NSCLC患者为研究对象。纳入标准:符合NSCLC诊断标准<sup>[7]</sup>;术前未接受放疗、免疫治疗者;预计生存期 $\geq 6$ 个月;符合手术适应证、禁忌证;Karnofsky功能状态评分 $\geq 70$ 分;签署知情同意书。排除标准:合并凝血功能障碍、肝肾功能障碍、其他恶性肿瘤者;伴有急/慢性感染者;伴有精神疾病者;既往腹部相关外科手术史者。所有患者均行肺癌根治性切除术,术中收集癌组织、癌旁组织(距离癌组织5 cm范围内正常组织),其中男性63例,女性37例;年龄46~67岁,平均 $(56.32 \pm 3.16)$ 岁;体质指数(BMI)17~30 kg/m<sup>2</sup>,平均 $(23.16 \pm 2.03)$  kg/m<sup>2</sup>;病理类

型:鳞癌58例、腺癌42例;病理分级<sup>[8]</sup>: I~II级51例、III级49例;T分期<sup>[9]</sup>: T<sub>1</sub>~T<sub>2</sub> 53例、T<sub>3</sub>~T<sub>4</sub> 47例;N分期: N<sub>0</sub> 55例、N<sub>1</sub>~N<sub>2</sub> 45例。本研究经郑州市第三人民医院医学伦理委员会批准。

## 1.2 方法

**1.2.1 免疫组化法检测癌组织、癌旁组织中Keap1、Nrf2蛋白表达** 取癌组织、癌旁组织标本放入10%中性甲醛溶液内过夜,冲洗后经不同梯度浓度乙醇脱水,并进行石蜡包埋,连续切片(厚4  $\mu\text{m}$ ),依据免疫组化试剂盒(北京博奥森生物公司)进行操作:采用二甲苯脱蜡,放入柠檬酸盐缓冲液(0.01 mol/L)中修复抗原,使用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗两次,加入3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>孵育10 min, PBS清洗两次后使用羊血清封闭液封闭30 min,滴加羊抗人Keap1(1:150)、Nrf2抗体(1:200),在4℃条件下孵育过夜,滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗羊二抗(1:1000),在37℃条件下孵育1 h,使用二氨基联苯(DAB)显色(北京博奥森生物公司),苏木素(上海碧云天公司)复染,依次经过脱水、透明、中性树脂封片后,使用CX23型光学显微镜(日本Olympus公司)观察蛋白表达情况。结果判定标准<sup>[10]</sup>:200倍光学显微镜下观察细胞膜、细胞质染色程度,无染色(-),浅黄色(+),棕黄色(++),黄褐色(+++),以+、++、+++纳入阳性表达。采用Image Pro Plus 6.0处理分析图片,染色阳性颗粒灰度单位转换为吸光单位,检测其平均光密度值(OD),以OD值作为其阳性表达的半定量。

**1.2.2 检测血清超氧化物歧化酶(SOD)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、丙二醛(MDA)水平** 所有患者于入组时采集外周静脉血5 mL,常规离心后分离血清,参照试剂盒(南京建成生物工程研究所),黄嘌呤氧化酶法检测超氧化物歧化酶(SOD)、硫代巴比妥酸法检测丙二醛(MDA)、比色法检测诱导型一氧化氮合酶(iNOS)水平。

**1.2.3 随访** 治疗结束后以门诊复查、电话问询

等方式随访,随访时间为 3 年,每隔 6 个月随访 1 次,统计随访期间生存率。

1.3 观察指标 (1)比较不同组织、不同临床病理参数患者中 Keap1、Nrf2 蛋白表达水平,分析其与临床病理参数相关性。(2)比较不同 Keap1、Nrf2 蛋白表达患者 SOD、MDA、iNOS 水平,并分析 SOD、iNOS、MDA 与临床病理参数和 Keap1、Nrf2 蛋白水平的相关性。(3)比较不同 Keap1、Nrf2 蛋白表达患者的生存率。

1.4 统计学方法 应用统计学软件 SPSS24.0、GraphPad Prism 5.0 进行数据分析。计量资料符合正态分布,以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验;计数资料比较采用  $\chi^2$  检验;采用 Spearman 法分析 Keap1、Nrf2 蛋白表达与临床病理参数相关性;采用 Pearson 法分析 Keap1、Nrf2 蛋白表达与 SOD、MDA、iNOS 水平相关性;采用 Kaplan-Meier 法分析生存率,组间比较采用 Log-rank 检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 癌组织及癌旁组织 Keap1/Nrf2 信号通路相

关蛋白表达水平比较 NSCLC 患者癌组织 Keap1 蛋白、Nrf2 蛋白阳性率及 OD 值明显高于癌旁组织,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。

表 1 癌组织及癌旁组织 Keap1/Nrf2 信号通路相关蛋白表达水平比较[例(%), $\bar{x}\pm s$ ]

**Table 1 Comparison on the expression levels of Keap1/Nrf2 signaling pathway related proteins in cancer tissue and adjacent tissues [n (%),  $\bar{x}\pm s$ ]**

组织	例数	Keap1 蛋白		Nrf2 蛋白	
		阳性率	OD 值	阳性率	OD 值
癌组织	100	77 (77.00)	0.41±0.07	74 (74.00)	0.39±0.06
癌旁组织	100	53 (53.00)	0.33±0.05	45 (45.00)	0.31±0.06
<i>t</i> / $\chi^2$ 值		12.659	9.300	17.450	9.428
<i>P</i> 值		0.001	0.001	0.001	0.001

2.2 Keap1/Nrf2 信号通路相关蛋白表达与临床病理参数的关系

2.2.1 不同临床病理参数患者 Keap1/Nrf2 信号通路相关蛋白表达比较 病理分级 I~II 级、T 分期 T<sub>1</sub>~T<sub>2</sub> 患者癌组织 Keap1 蛋白、Nrf2 蛋白阳性率明显低于病理分级 III 级、T 分期 T<sub>3</sub>~T<sub>4</sub> 患者,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 2。

表 2 不同临床病理参数患者 Keap1/Nrf2 信号通路相关蛋白表达比较(例)

**Table 2 Comparison on the expression levels of Keap1/Nrf2 signaling pathway related protein among patients with different clinical pathological parameters (n)**

病理参数	例数	Keap1 蛋白					$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值	Nrf2 蛋白					$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
		-	+	++	+++	阳性率(%)			-	+	++	+++	阳性率(%)		
病理类型							0.027	0.870						0.001	0.971
鳞癌	58	13	14	20	11	77.59			15	13	19	11	74.14		
腺癌	42	10	11	14	7	76.19			11	10	14	7	73.81		
病理分级							4.120	0.042						4.673	0.031
I~II 级	51	16	14	16	5	68.63			18	14	14	5	64.71		
III 级	49	7	11	17	14	85.71			8	9	18	14	83.67		
T 分期							5.244	0.022						5.685	0.017
T <sub>1</sub> ~T <sub>2</sub>	53	17	13	17	6	67.92			19	13	16	5	64.15		
T <sub>3</sub> ~T <sub>4</sub>	47	6	12	16	13	87.23			7	10	16	14	85.11		
N 分期							1.260	0.262						0.607	0.436
N <sub>0</sub>	55	15	14	19	7	72.73			16	11	20	8	70.91		
N <sub>1</sub> ~N <sub>2</sub>	45	8	11	14	12	82.22			10	12	12	11	77.78		

2.2.2 Keap1/Nrf2 信号通路相关蛋白表达与临床病理参数的相关性 经 Spearman 相关性分析可知,NSCLC 患者癌组织 Keap1 蛋白、Nrf2 蛋白阳性表达与病理类型、N 分期无关( $P>0.05$ ),与病理分级、T 分期呈正相关( $P<0.05$ ),见表 3。

表 3 Keap1/Nrf2 信号通路相关蛋白表达与临床病理参数的相关性  
**Table 3 Correlation between the expression of Keap1/Nrf2 signaling pathway related proteins and clinical pathological parameters**

项目	分类	病理类型	病理分级	T 分期	N 分期
Keap1 蛋白	<i>r</i> 值	0.102	0.569	0.574	0.127
	<i>P</i> 值	0.227	0.001	0.001	0.314
Nrf2 蛋白	<i>r</i> 值	0.114	0.527	0.539	0.135
	<i>P</i> 值	0.235	0.001	0.001	0.396

2.3 Keap1/Nrf2 信号通路相关蛋白表达与氧化应激指标的关系

2.3.1 不同 Keap1/Nrf2 信号通路相关蛋白表达患者 SOD、MDA、iNOS 水平比较 NSCLC 癌组织 Keap1 蛋白、Nrf2 蛋白阳性者血清 SOD 水平明显低于 Keap1 蛋白、Nrf2 蛋白阴性者,而 MDA、iNOS 水平明显高于 Keap1 蛋白、Nrf2 蛋白阴性者,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 4。

2.3.2 Keap1/Nrf2 信号通路相关蛋白表达与 SOD、MDA、iNOS 水平的相关性 经 Pearson 相关性分析可知,NSCLC 患者癌组织 Keap1 蛋白、Nrf2 蛋白表达与 SOD 呈负相关( $P<0.05$ ),与 MDA、iNOS 呈正相关( $P<0.05$ ),见表 5。

表 4 不同 Keap1/Nrf2 信号通路相关蛋白表达患者 SOD、MDA、iNOS 水平比较( $\bar{x}\pm s$ )Table 4 Comparison of SOD, MDA, and iNOS levels among patients with different Keap1/Nrf2 signaling pathway related protein expression ( $\bar{x}\pm s$ )

项目	例数	SOD (U/mL)	MDA (mmol/L)	iNOS (U/mL)
Keap1 蛋白				
阳性	77	86.78±9.14	4.42±0.82	22.74±4.31
阴性	23	115.07±12.13	3.24±0.56	15.59±3.02
<i>t</i> 值		12.037	6.455	7.418
<i>P</i> 值		0.001	0.001	0.001
Nrf2 蛋白				
阳性	74	84.94±9.12	4.48±0.85	23.02±4.28
阴性	26	117.06±12.37	3.21±0.52	15.64±3.10
<i>t</i> 值		14.020	7.149	8.068
<i>P</i> 值		0.001	0.001	0.001

表 5 Keap1/Nrf2 信号通路相关蛋白表达与 SOD、MDA、iNOS 水平的相关性

Table 5 Correlation between the expression of Keap1/Nrf2 signaling pathway related proteins and the levels of SOD, MDA, and iNOS

项目	分类	SOD (U/mL)	MDA (mmol/L)	iNOS (U/mL)
Keap1 蛋白	<i>r</i> 值	-0.612	0.609	0.614
	<i>P</i> 值	0.001	0.001	0.001
Nrf2 蛋白	<i>r</i> 值	-0.614	0.610	0.608
	<i>P</i> 值	0.001	0.001	0.001

2.4 不同 Keap1、Nrf2 蛋白表达患者的生存率比较 NSCLC 癌组织 Keap1 蛋白、Nrf2 蛋白阳性表达患者 3 年生存率分别为 85.71% (66/77)、83.78% (62/74)，明显低于阴性表达患者的 95.65% (22/23)、100.00% (26/26)，差异均有统计学意义( $P<0.05$ )，见图 1。

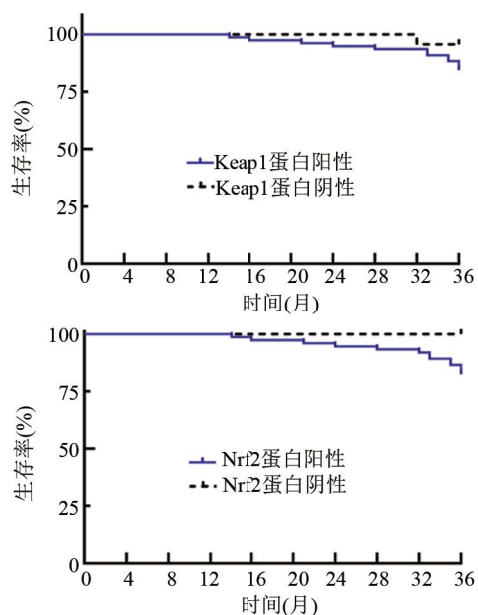


图 1 生存曲线

Figure 1 Survival curve

### 3 讨论

NSCLC 发病机制可能与癌基因激活、抑癌基因失

活、氧化应激反应等有关，NSCLC 发生过程中可产生大量 ROS、超氧阴离子等，影响肿瘤生长微环境，而氧化-抗氧化系统失衡导致大分子物质代谢紊乱，促进 NSCLC 发生发展<sup>[11-13]</sup>。

氧化应激状态时 Keap1 蛋白构象变化，Keap1 可作为 Cul3-Rbx E3 泛素连接酶复合物适配器激活 Nrf2，Nrf2 转移至细胞核内，可调控细胞内转录活动，激活抗氧化基因，共同调节机体氧化应激反应<sup>[14-16]</sup>。但有研究发现氧化应激水平较高时，Nrf2 持续活化导致其聚集于细胞核内，Nrf2 可与 Kruppel 样转录因子 9 启动子结合，引起肿瘤组织内部缺氧、微环境，促进肿瘤组织快速生长<sup>[17-18]</sup>。本研究结果显示，癌组织 Keap1 蛋白、Nrf2 蛋白阳性率及 OD 值高于癌旁组织，且与病理分级、T 分期呈正相关，提示 NSCLC 中可能存在高氧化环境，可影响癌细胞氧化应激状态，促使 Keap1/Nrf2 信号通路活化，以增强癌细胞抗氧化能力，可为癌细胞生长转移提供有利条件。病理分级、临床分期升高预示病情严重程度加重，且与预后密切相关<sup>[19-20]</sup>。结合本研究结果分析其原因可能为 Keap1/Nrf2 信号通路激活可改变细胞氧化还原状态，影响肿瘤细胞内环境，激活下游靶基因，促使细胞异常增殖，进一步促进 NSCLC 转移。

氧化应激与肿瘤细胞凋亡密切相关，ROS 低水平时可促进癌细胞增殖、侵袭，而 ROS 高水平可诱导癌细胞凋亡，其中 SOD 属于抗氧化酶，MDA、iNOS 属于氧化酶，其中 MDA 水平升高反映细胞膜损伤加重；SOD 可清除氧自由基，减轻机体氧化损害；iNOS 在肿瘤中呈高表达，生物体内合成一氧化氮(NO)，NO 在多种肿瘤进展中发挥作用，一氧化氮合酶(NOS)调节 NO 合成 iNOS，iNOS 在多种肿瘤中高表达，下调其表达可抑制癌细胞迁移、侵袭<sup>[21-22]</sup>。癌细胞存活依赖于本身氧化应激防御能力，正常生理条件下，氧化-抗氧化体系可防止氧化应激损伤，病理条件下，氧化-抗氧化体系失衡，促使机体氧化损伤，破坏肿瘤细胞 DNA，改变肿瘤微环境<sup>[23-24]</sup>。本研究结果显示 NSCLC 癌组织 Keap1、Nrf2 蛋白阳性者血清 SOD 水平低于阴性者，MDA、iNOS 水平高于阴性者，提示 NSCLC 患者体内存在氧化-抗氧化紊乱状态，且与 Keap1/Nrf2 信号通路异常表达有关。本研究分析发现 NSCLC 患者癌组织 Keap1 蛋白、Nrf2 蛋白表达与 SOD 呈负相关，与 MDA、iNOS 呈正相关。Keap1 持续激活 Nrf2 可促使其丧失功能，即该通路抗氧化作用减弱，而癌细胞氧化应激水平升高，促使癌细胞被清除<sup>[25-27]</sup>。由此推测 NSCLC 细胞持续受到氧化因子刺激时，Keap1/Nrf2 信号通路抗氧化与癌细胞氧化应激处于失衡状态，而未被充分利用的 Nrf2 发生泛素化，进而加重癌细胞氧化应激反应程度。同时本研究结果显示，癌组织 Keap1 蛋白、Nrf2 蛋白阳性表达者 3 年生存率低于阴性表达者，提示 Keap1/Nrf2 信号通路活化与 NSCLC 患者预后密切相

关,并可能作为判断患者预后的潜在生物学标志物。

综上所述,Keap1/Nrf2 信号通路在 NSCLC 氧化应激反应中具有调控作用,NSCLC 癌组织中 Keap1 蛋白、Nrf2 蛋白表达水平升高,可共同参与 NSCLC 发生发展过程,可以作为新的基因监测方向,同时该通路对氧化应激影响可能有助于指导临床治疗。

#### 参考文献

- [1] Li H, Lin PH, Gupta P, et al. MG53 suppresses tumor progression and stress granule formation by modulating G3BP2 activity in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 118-128.
- [2] Wu W, Geng Z, Bai H, et al. Ammonium ferric citrate induced ferroptosis in non-small-cell lung carcinoma through the inhibition of GPX4-GSS/GSR-GGT axis activity [J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18(8): 1899-1909.
- [3] Ma P, Han W, Meng C, et al. LINC02389/miR-7-5p regulated cisplatin resistance of non-small-cell lung cancer progression, oxidative stress, and cisplatin resistance through sponging miR-7-5p and may provide therapeutic targets for NSCLC via Promoting Oxidative Stress [J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2022, 22(1): 176-186.
- [4] Zhang S, Duan S, Xie Z, et al. Epigenetic therapeutics targeting NRF2/KEAP1 signaling in cancer oxidative stress [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13(1): 924817-924827.
- [5] Weiss-Sadan T, Ge M, Hayashi M, et al. NRF2 activation induces NADH-reductive stress, providing a metabolic vulnerability in lung cancer [J]. *Cell Metab*, 2023, 35(3): 487-503.
- [6] Thiruvengadam M, Venkidasamy B, Subramanian U, et al. Bioactive compounds in oxidative stress-mediated diseases: targeting the NRF2/ARE signaling pathway and epigenetic regulation [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(12): 1859-1869.
- [7] General Office of the National Health Commission. Clinical practice guideline for primary lung cancer (2022 Version) [J]. *Medical Journal Of Peking Union Medical College Hospital*, 2022, 13(4): 549-570. 国家卫生健康委办公厅. 原发性肺癌诊疗指南(2022年版)[J]. *协和医学杂志*, 2022, 13(4): 549-570.
- [8] Suh YJ, Lee HJ, Kim YT, et al. Added prognostic value of CT characteristics and IASLC/ATS/ERS histologic subtype in surgically resected lung adenocarcinomas [J]. *Lung Cancer*, 2018, 120(1): 130-136.
- [9] Samejima J, Yokose T, Ito H, et al. Prognostic significance of blood and lymphatic vessel invasion in pathological stage IA lung adenocarcinoma in the 8<sup>th</sup> edition of the TNM classification [J]. *Lung Cancer*, 2019, 137(1): 144-148.
- [10] Zhu XY, Ma DC, Wang BM, et al. Expression and clinicopathological correlation of Keap1-Nrf2 signal pathway protein in non-small cell lung cancer [J]. *Chinese Journal of Disease Control & Prevention*, 2018, 22(9): 938-942. 朱学应, 马冬春, 王保明, 等. 非小细胞肺癌中 Keap1-Nrf2 信号通路蛋白的表达及与临床病理相关性分析[J]. *中华疾病控制杂志*, 2018, 22(9): 938-942.
- [11] Kuo KT, Lin CH, Wang CH, et al. HNMT upregulation induces cancer stem cell formation and confers protection against oxidative stress through interaction with HER2 in non-small-cell lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1663-1673.
- [12] Kan J, Huang H, Jiang Z, et al. Arenobufagin promoted oxidative stress-associated mitochondrial pathway apoptosis in A549 non-small-cell lung cancer cell line [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 20(1): 171-181.
- [13] Geng J, Yang K. circCCND1 regulates oxidative stress and FGF9 to enhance chemoresistance of non-small cell lung cancer via sponging miR-187-3p [J]. *DNA Cell Biol*, 2021, 40(5): 675-682.
- [14] Sun C, Han B, Zhai Y, et al. Dihydroanthranone I inhibits ovarian tumor growth by activating oxidative stress through Keap1-mediated Nrf2 ubiquitination degradation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 180(20): 220-235.
- [15] Yang C, Wang T, Zhao Y, et al. Flavonoid 4,4'-dimethoxychalcone induced ferroptosis in cancer cells by synergistically activating Keap1/Nrf2/HMOX1 pathway and inhibiting FECH [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 188(1): 14-23.
- [16] Wang J, Lu Q, Cai J, et al. Nestin regulates cellular redox homeostasis in lung cancer through the Keap1-Nrf2 feedback loop [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5043-5053.
- [17] Escoll M, Lastra D, Robledinos-Antón N, et al. WIP modulates oxidative stress through NRF2/KEAP1 in glioblastoma cells [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(9): 773-783.
- [18] Shi Q, Jin X, Zhang P, et al. SPOP mutations promote p62/SQSTM1-dependent autophagy and Nrf2 activation in prostate cancer [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(6): 1228-1239.
- [19] Wang XL, Cai YR, Shen J, et al. The expression of CD133 protein in non-small cell lung cancer tissue and its relationship with clinical pathological parameters [J]. *Shanxi Medical Journal*, 2021, 50(6): 972-975. 王小兰, 蔡毅然, 沈娟, 等. CD133 蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达及其与临床病理参数之间的关系[J]. *山西医药杂志*, 2021, 50(6): 972-975.
- [20] Deng Q, Cheng WW, Chen L. Correlation of high-density lipoprotein cholesterol, ferritin and integrin  $\alpha_3$  with the pathological characteristics, survival and Prognosis of patients with stage IV non-small cell lung cancer [J]. *The Practical Journal of Cancer*, 2022, 37(10): 1591-1595. 邓青, 程蔚蔚, 陈岚. 高密度脂蛋白胆固醇、铁蛋白、整合素  $\alpha_3$  与 IV 期非小细胞肺癌病理特征及患者生存预后的相关性[J]. *实用癌症杂志*, 2022, 37(10): 1591-1595.
- [21] Jia XB, Zhang Q, Xu L, et al. Lotus leaf flavonoids induce apoptosis of human lung cancer A549 cells through the ROS/p38 MAPK pathway [J]. *Biol Res*, 2021, 54(1): 7-17.
- [22] Skórska KB, Placzkowska S, Prescha A, et al. Serum total SOD activity and SOD1/2 concentrations in predicting all-cause mortality in lung cancer patients [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14(11): 1067-1077.
- [23] Tajvidi E, Nahavandizadeh N, Pournaderi M, et al. Study the antioxidant effects of blue-green algae Spirulina extract on ROS and MDA production in human lung cancer cells [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2021, 28(1): 101139-101149.
- [24] Giatromanolaki A, Tsolou A, Daridou E, et al. iNOS expression by tumor-infiltrating lymphocytes, PD-L1 and prognosis in non-small-cell lung cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(11): 3276-3286.
- [25] Hassanein EHM, Althagafy HS, Atwa AM, et al. Taurine attenuated methotrexate-induced intestinal injury by regulating NF- $\kappa$ B/iNOS and Keap1/Nrf2/HO<sup>-1</sup> signals [J]. *Life Sci*, 2022, 311(2): 121180-121190.
- [26] Li X, Mu J, Lin Y, et al. Combination of cyanidin-3-O-glucoside and cisplatin induces oxidative stress and apoptosis in HeLa cells by reducing activity of endogenous antioxidants, increasing bax/bcl-2 mRNA expression ratio, and downregulating Nrf2 expression [J]. *J Food Biochem*, 2021, 45(7): e13806-e13816.
- [27] Fu D, Wang C, Yu L, et al. Induction of ferroptosis by ATF3 elevation alleviates cisplatin resistance in gastric cancer by restraining Nrf2/Keap1/xCT signaling [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2021, 26(1): 26-36.

(收稿日期:2023-06-30)