

# WWOX 抑癌基因和 Nrf2 转录因子在胆囊癌组织中的表达及相关性研究

程邦君 赵登秋 邬叶锋 汤建燕

**【摘要】 目的** 研究 WWOX 抑癌基因和 Nrf2 转录因子在原发性胆囊癌(PGC)组织中的表达及其与临床病理的关系,以及 WWOX 和 Nrf2 表达的相关性。**方法** 收集胆囊癌标本 54 例、胆囊腺瘤标本 20 例、慢性胆囊炎标本 20 例。应用免疫组织化学方法检测 WWOX 蛋白和 Nrf2 蛋白的表达情况,同时收集胆囊癌患者的临床病理资料,并将结果进行分析。**结果** (1) WWOX 蛋白在胆囊癌、胆囊腺瘤及慢性胆囊炎组织中阳性表达率分别为 48.1% (26/54)、75.0% (15/20) 和 85.0% (17/20), 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。WWOX 蛋白阳性表达与病理学分级( $P < 0.01$ )、Nevin 分期( $P < 0.05$ )、淋巴结转移( $P < 0.01$ )有关。(2) Nrf2 蛋白在胆囊癌、胆囊腺瘤及慢性胆囊炎组的阳性表达率分别为 66.7% (36/54)、20.0% (4/20) 及 5.0% (1/20), 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。Nrf2 蛋白阳性表达水平与病理学分级( $P < 0.05$ )、Nevin 分期( $P < 0.01$ )、淋巴结转移( $P < 0.01$ )有关。(3) WWOX 阳性表达与 Nrf2 阳性表达均与患者的性别、年龄、病理类型及是否伴有结石无显著关系( $P > 0.05$ )。(4) WWOX 阳性表达与 Nrf2 阳性表达呈负相关( $r = -0.420, P < 0.01$ )。**结论** WWOX 和 Nrf2 表达可能是反映胆囊癌发生、进展、生物学行为和预后的重要生物学标记物; WWOX 和 Nrf2 蛋白在胆囊癌中的表达呈明显的相关性,可能在胆囊癌的发生中起协同作用。

**【关键词】** 胆囊肿瘤; 免疫组织化学; WWOX; Nrf2

**Expressions and clinicopathologic correlation of WWOX tumor suppressive gene and Nrf2 transcription factor in gallbladder carcinoma** CHENG Bang-jun, ZHAO Deng-qiu, WU Ye-feng, TANG Jian-yan. Department of Hepatobiliary Surgery, The Sixth Affiliated People's Hospital of Jinshan Branch, Shanghai 201500, China  
Corresponding author: ZHAO Deng-qiu, Email: zhaodengqiu@tom.com

**【Abstract】 Objective** To investigate expressions of WWOX tumor suppressive gene and Nrf2 transcription factor protein in gallbladder carcinoma and analyze its relation with clinical pathology, and its expression correlation. **Methods** Expressions of WWOX and Nrf2 were determined by an immunohistochemical method in 54 cases with carcinoma of gallbladder, 20 with adenoma of gallbladder and 20 with chronic cholecystitis. The clinical pathology data from patients with carcinoma of gallbladder was analyzed. **Results** The positive rates of WWOX and Nrf2 protein in carcinoma of gallbladder, adenoma of gallbladder and chronic cholecystitis were 48.1% (26/54) and 66.7% (36/54), 75.0% (15/20) and 20.0% (4/20), 85.0% (17/20) and 5.0% (1/20), respectively. The positive expression of WWOX in carcinoma of gallbladder was significantly lower than those in adenoma of gallbladder and cholecystitis ( $P < 0.05$ ), however, the corresponding expression of Nrf2 protein was significantly higher than those in adenoma of gallbladder and cholecystitis ( $P < 0.05$ ). Both expressions of WWOX and Nrf2 protein in gallbladder carcinoma had significant correlation with pathological grade ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ), Nevin staging ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ) and lymph node metastasis ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Based on this findings, we could see the expression of WWOX in carcinoma of gallbladder was negative correlation with expression of Nrf2 protein ( $r = -0.420, P < 0.01$ ). **Conclusions** The expressive levels of WWOX and Nrf2 might be important biological markers for reflection the carcinogenesis, progression, biological behaviors; Both expressions of WWOX and Nrf2 protein in gallbladder carcinoma have significant correlation, suggesting they may play a synergistic effect in the carcinogenesis of gallbladder carcinoma.

**【Key words】** Gallbladder neoplasms; Immunohistochemistry; WWOX; Nrf2

原发性胆囊癌(primary gallbladder carcinoma, PGC)是胆道外科系统中最常见的恶性肿瘤,其因高度的恶性生物学行为和临床治疗效果极差而备受肝胆外科界关注,近年来随着基因研究的进展,PGC发病的分子学机制也逐渐成为研究热点。WWOX基因是近几年发现的一种新的候选抑癌基因,其位于染色体16q23.3~q24.1区域,跨越了整个常见染色体脆性位点FPA16D,研究表明,在人类大多数恶性肿瘤中WWOX基因表达下调或缺失,而该基因上调或恢复将抑制肿瘤的生长<sup>[1]</sup>。Nrf2(nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2)是细胞防御的重要转录因子,其通过调控II相解毒酶和抗氧化蛋白的表达对抗外源性刺激,在多种疾病中发挥作用;但近几年研究发现Nrf2在多种肿瘤中过度转录激活,并通过调节肿瘤组织中抗氧化酶的表达造成肿瘤的耐药性从而促进了肿瘤的生长<sup>[2]</sup>。WWOX和Nrf2蛋白分别在多种恶性肿瘤中存在异常表达,但联合检测两者在原发性胆囊癌中的表达及相关性研究,目前文献报道尚少。本实验应用免疫组化法通过检测胆囊癌组织中WWOX和Nrf2蛋白的表达情况,探讨WWOX和Nrf2在胆囊癌发生发展中的意义及相互关系,并分析其与胆囊癌预后的关系。

## 资料和方法

### 一、一般资料

收集上海市第六人民医院金山分院2000年1月至2010年6月具有完整病例资料、手术切除并病理证实的原发性胆囊癌石蜡存档标本54例,均为甲醛固定标本,男16例,女38例,年龄23~84岁,中位年龄66岁,其中<60岁的17例,≥60岁的37例。54例胆囊癌中,腺癌(包括乳头状腺癌、黏液腺癌和管状腺癌)46例,未分化癌5例,其他类型癌3例。按病理学分级高分化22例,中分化19例,低分化13例。按Nevin分期,I~III期15例,IV~V期39例;有淋巴结转移37例。合并胆囊结石43例。所有胆囊癌均为原发性,术前未进行任何抗肿瘤治疗。另取同期胆囊良性病例20例无局部恶变的胆囊腺瘤标本和20例慢性胆囊炎标本作为对照组。每个石蜡标本重新切片,常规行HE染色再次确诊,并将组织病理分化、分类资料补充齐全。所有的手术标本均经10%甲醛固定,石蜡包埋后行4 μm连续切片。

### 二、试剂及方法

WWOX兔抗人多克隆抗体为台湾Abnova公司产品(产品货号:PAB1091),按1:100稀释后作为一抗。Nrf2兔抗人多克隆抗体为美国CST公司产品(产品货号:4399S),按1:1000稀释后作为一抗。SP染色试剂

盒及DAB显色试剂盒购自上海江莱生物公司。采用免疫组化SP法,染色步骤严格按照说明书进行。用PBS液代替一抗作阴性对照,用已知阳性的肿瘤标本作为阳性对照。

### 三、阳性细胞判断标准

WWOX以肿瘤细胞质内出现棕黄色至深棕黄色颗粒为阳性细胞。Nrf2阳性主要表现在肿瘤的细胞质或细胞核内出现棕黄色颗粒至棕褐色颗粒。WWOX及Nrf2表达判断采用定量法,即根据阳性细胞数和染色深度计分,每例随机抽取5个高倍镜视野,根据每个视野的阳性细胞率,取其平均值。以阳性细胞数计分,<5%为0分、5%~24%为1分、25%~49%为2分、50%~74%为3分、75%~100%为4分。以阳性细胞表达的染色深度计分,基本不着色为0分、染色为淡黄色者为1分、黄色或棕黄色为2分、棕黄色或棕褐色3分。将二者得分相乘,0~2分为表达阴性,>2分为表达阳性。见图1~8。

### 四、统计学分析

采用SAS V8.1统计学软件分析及数据处理,行 $\chi^2$ 检验,或行 $\times$ 列的 $\chi^2$ 检验,相关分析采用Spearman相关检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. WWOX、Nrf2在原发性胆囊癌、慢性胆囊炎及胆囊腺瘤中的表达:WWOX和Nrf2阳性表达分别为胞质或胞核内出现棕黄色至棕褐色颗粒。54例胆囊癌中,WWOX表达阳性表达为26例,明显低于慢性胆囊炎及胆囊腺瘤;Nrf2阳性表达为36例,明显高于慢性胆囊炎及胆囊腺瘤,见表1。

表1 WWOX和Nrf2在胆囊良恶性病变中的表达情况[例,(%)]

类型	例数	WWOX 阳性	Nrf2 阳性
胆囊癌	54	26(48.1)	36(66.7)
胆囊腺瘤	20	15(75.0) <sup>a</sup>	4(20.0) <sup>c</sup>
慢性胆囊炎	20	17(85.0) <sup>b</sup>	1(5.0) <sup>d</sup>

注:与胆囊癌比较,<sup>a</sup>: $\chi^2 = 5.466, P = 0.019$ ;<sup>b</sup>: $\chi^2 = 9.715, P = 0.002$ ;<sup>c</sup>: $\chi^2 = 12.798, P = 0.000$ ;<sup>d</sup>: $\chi^2 = 22.200, P = 0.000$

2. WWOX的表达与原发性胆囊癌临床病理特征的关系:54例原发性胆囊癌中,低分化组WWOX表达的阳性率为15.4%,显著低于高、中分化组(72.7%、42.1%, $\chi^2 = 11.191, P < 0.01$ );肿瘤Nevin分期IV~V期WWOX表达的阳性率为38.5%,显著低于I~III期WWOX表达的阳性率(73.3%, $\chi^2 = 4.738, P < 0.05$ );有淋巴结转移者WWOX表达的阳性率为32.4%,显著

低于无淋巴结转移者 WWOX 表达的阳性率(82.3%,  $\chi^2 = 11.553, P < 0.01$ )。WWOX 的表达与患者的性别、年龄、病理类型及是否伴有结石无显著关系( $P > 0.05$ ),见表2。

3. Nrf2 的表达与原发胆癌临床病理特征的关系;Nrf2 的表达与患者的性别、年龄、病理类型及是否伴有结石无显著关系( $P > 0.05$ ),而与病理学分级( $P < 0.05$ )、Nevin 分期( $P < 0.01$ )、淋巴结转移( $P < 0.01$ )有关,见表2。

4. 原发性胆癌中 WWOX 与 Nrf2 表达的相关性;26 例 WWOX 阳性表达者中表达 Nrf2 阳性为 12 例(46.2%),28 例 WWOX 阴性表达者中表达 Nrf2 阳性 24 例(85.7%),经 Spearman 相关分析两者的表达呈负相关( $r = -0.420, P < 0.01$ ),见表3。

5. WWOX 和 Nrf2 的表达与原发胆癌术后生存率的关系;54 例中经电话或专科门诊分别随访 1~5 年,其中有 8 例(14.8%)失访。WWOX 阳性和阴性表

达患者术后 1、3、5 年生存率分别为 61.9%、38.1%、9.5% 和 36.0%、12.0%、0%、前者显著高于后者( $P < 0.05$ )。Nrf2 阳性和阴性表达患者术后 1、3、5 年生存率分别为 31.0%、13.8%、0% 和 58.9%、35.3%、5.9%,前者显著低于后者( $P$  均  $< 0.05$ )。

### 讨 论

原发性胆癌临床过程隐匿,恶性程度高,在我国消化道肿瘤中居第五位,但在胆道恶性肿瘤中却居首位。早期诊断困难,容易合并周围脏器侵犯和淋巴结转移,手术效果较差,术后生存率低,但胆癌的发生也同其他肿瘤一样是一个多阶段、多因素作用的结果,与基因的表达和改变密不可分。WWOX 是 2000 年 Bednarek 等<sup>[3]</sup>应用鸟枪基因测序技术,在染色体普通脆性位点(common fragile of sites, CFSs) FRA16D(16q23.32q24.1)区域克隆出的新基因,对该基因在细胞系、肿瘤组织、实验动物中的表达及生物学功能研究

表2 WWOX、Nrf2 表达与原发胆癌临床特征关系[例,(%)]

临床特征	例数	WWOX 表达				Nrf2 表达			
		-	+	$\chi^2$ 值	P 值	-	+	$\chi^2$ 值	P 值
性别				0.176	0.675			1.110	0.292
男性	16	9(56.2)	7(43.8)			7(43.8)	9(56.2)		
女性	38	19(50.0)	19(50.0)			11(28.9)	27(71.1)		
年龄				0.012	0.914			2.103	0.147
<60 岁	17	9(52.9)	8(47.1)			8(47.1)	9(52.9)		
≥60 岁	37	19(51.4)	18(48.6)			10(27.0)	27(73.0)		
病理类型				0.547	0.761			1.774	0.412
腺癌	46	24(62.2)	22(47.8)			14(30.4)	32(69.6)		
未分化癌	5	3(60.0)	2(40.0)			2(40.0)	3(60.0)		
其他癌	3	1(33.3)	2(66.7)			2(66.7)	1(33.3)		
病理学分级				11.191	0.004			8.722	0.013
高分化	22	6(27.3)	16(72.7)			12(54.5)	10(45.5)		
中分化	19	11(57.9)	8(42.1)			5(26.3)	14(73.7)		
低分化	13	11(84.6)	2(15.4)			1(7.7)	12(92.3)		
Nevin 分期				4.738	0.034			10.385	0.007
I~III 期	15	4(26.7)	11(73.3)			10(66.7)	5(33.3)		
IV~V 期	39	24(91.5)	15(38.5)			8(20.5)	31(79.5)		
淋巴结转移				11.553	0.003			20.671	0.000
无转移	17	3(17.7)	14(82.3)			13(76.5)	4(23.5)		
有转移	37	25(67.6)	12(32.4)			5(13.5)	32(86.5)		
是否伴结石				0.040	0.841			0.057	0.811
无结石	11	6(54.5)	5(45.5)			4(36.4)	7(63.6)		
有结石	43	22(51.2)	21(48.8)			14(32.6)	29(67.4)		

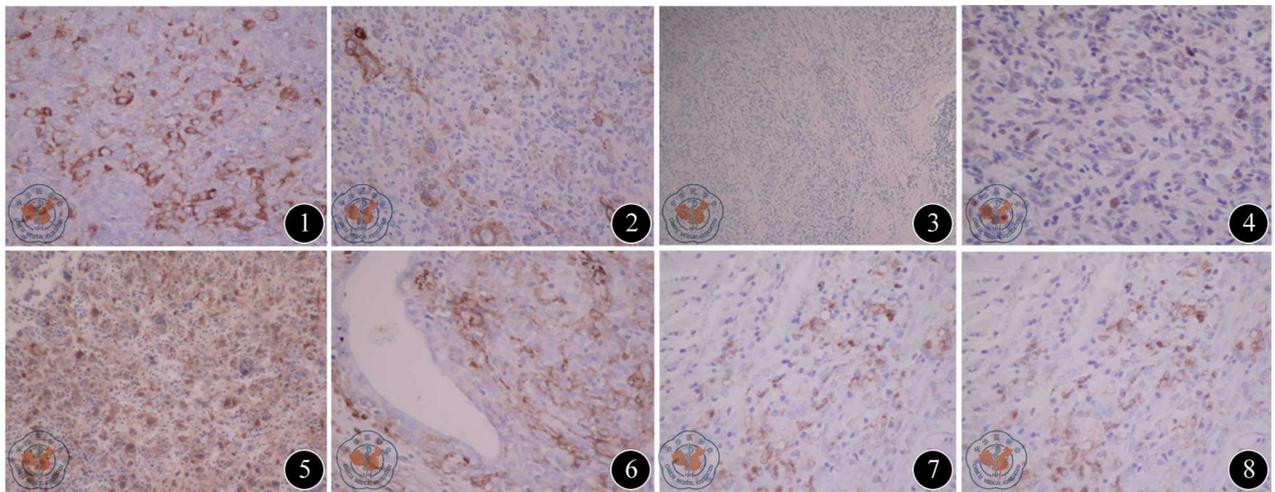


图1 WWOX在胆囊癌组织中的阳性表达(SP×400) 图2 WWOX在胆囊癌组织中的阴性表达(SP×400) 图3 WWOX在胆囊腺瘤组织中的阴性表达(SP×400) 图4 WWOX在胆囊腺瘤组织中的阴性表达(SP×400) 图5 Nrf2在胆囊癌组织中的阳性表达(SP×400) 图6 Nrf2在胆囊癌组织中的阴性表达(SP×400) 图7 Nrf2在胆囊炎组织中的阴性表达(SP×400) 图8 Nrf2在胆囊腺瘤组织中的阴性表达(SP×400)

表3 WWOX与Nrf2表达的相关性(例)

WWOX	Nrf2		合计	r 值	$\chi^2$ 值	P 值
	+	-				
+	12	14	26	-0.420	9.490	0.008
-	24	4	28			
合计	36	18	54			

提示,该基因可能为一个肿瘤抑制基因,在环境致癌物等作用易失活。WWOX 蛋白含有 414 个氨基酸,是一种促凋亡蛋白,参与多种信号转导途径。Aqeilan 等<sup>[4]</sup>对鼠类的研究中发现 WWOX 在外界压力和凋亡的刺激下,因 Tyr33 磷酸化而活化,下调凋亡抑制因子 Bcl-2 和 Bcl-xL,上调原凋亡蛋白 P53,从而增强 TNF 的细胞毒作用,并能与 P53 形成复合物共同介导细胞凋亡。有文献报道<sup>[5-7]</sup>,在人类乳腺癌、卵巢癌、肺癌、前列腺癌、消化道恶性肿瘤如食道癌、胃癌、结直肠癌等多种肿瘤中 WWOX 呈现低表达,并与肿瘤病理学分级、Nevin 及淋巴结转移有关,还发现过度表达的 WWOX 可以诱导肿瘤细胞凋亡并抑制其生长。在本研究表明,在 54 例胆囊癌中,有 26 例患者癌组织中 WWOX 表达阳性,而在胆囊腺瘤及慢性胆囊炎组织中 WWOX 表达多为阴性或弱阳性;低分化者阳性表达率明显低于高分化者,Nevin 分期 IV~V 期者阳性表达率明显低于 I~III 期者,有淋巴结转移者阳性表达率亦明显低于无淋巴结转移者,与文献报道相一致<sup>[5-7]</sup>。WWOX 蛋白在胆囊癌中的表达明显缺失,而且与病理分级和临床分期及淋巴结转移有关,WWOX 表达的缺失使得诱导细胞凋亡的能力降低,细胞无序增殖,导致肿瘤发生。因此我们推测 WWOX 蛋白在胆囊癌的发

生及预后中起了重要作用,有可能成为判断胆囊癌预后的重要指标,修复胆囊癌细胞中的 WWOX 基因有可能成为今后治疗此肿瘤的热点。

Nrf2 属于 Cap'n'Collar 家族的转录因子,是细胞防御机制中的关键转录因子,由 Moi 等<sup>[8]</sup>于 1994 年作为结合在  $\beta$ -珠蛋白基因启动子 NF-E2 重复序列的因子被克隆出来。其具有高度保守的碱性亮氨酸拉链结构,它通过与上游的抗氧化反应元件(ARE)的结合,调控下游 ARE 依赖的 II 相解毒酶及抗氧化酶基因的转录活性,在调节氧化还原反应即 II 相解毒酶和内源性抗氧化剂表达的起中枢作用,对于化学防癌、急慢性损伤、炎症性病变、自身免疫性疾病有重大意义<sup>[9]</sup>。本实验研究结果表明,Nrf2 在胆囊癌组织中的表达较高(66.7%),而在胆囊腺瘤及慢性胆囊炎组织中的表达较低,分别为 20.0% 和 5.0%。胆囊癌组织中 Nrf2 的阳性表达与患者性别、年龄、病理类型及胆囊内是否伴有结石均无关,分化程度低、Nevin 分期 I~III 期者及不伴有淋巴结转移者的患者癌组织中 Nrf2 表达的阳性率不高,而分化程度高、Nevin 分期 IV~V 期者及伴有淋巴结转移者的患者癌组织中 Nrf2 表达的阳性率明显增高。由此推断 Nrf2 的阳性表达参与了原发性胆囊的发生发展,Nrf2 与原发性胆囊癌的分化、转移有关。目前有文献报道<sup>[10]</sup>有大量的化学预防剂被证明可以诱导 Nrf2,进而提高 ARE 介导的 II 相代谢酶的转录水平,最后促进致癌物质的去毒化和失活。而 Nrf2 作为编码 II 相代谢酶的重要转录因子,为人类与癌症的斗争创造了一个新的平台。

关于胆囊癌组织中 WWOX 和 Nrf2 蛋白表达的相关性、相互调节机制及与预后的关系,目前文献报道尚

少。本研究结果表明 WWOX 或 Nrf2 阳性表达组患者的生存率与阴性组相比有明显差异。在 WWOX 表达阳性的胆囊癌中, Nrf2 阳性表达率(46.2%)明显低于 WWOX 表达阴性者(85.7%)。这说明 Nrf2 通常在 WWOX 表达阴性的胆囊癌中表达,两者呈负相关关系。但这种相关性的机制目前尚不清楚,有待进一步研究。也有文献报道<sup>[11-14]</sup>, WWOX 可能与 P53、P73、ErbB4、AP-2 $\gamma$  等相关细胞因子结合,促进细胞的凋亡有关。

综上所述,联合检测胆囊癌组织中 WWOX 与 Nrf2 的表达,从不同的方面了解胆囊癌的生物特性,借以判断其恶性程度及预后,具有重要的临床意义。开展以 WWOX 与 Nrf2 为靶点的基因治疗,为今日临床中针对胆囊癌治疗的诸多手段(包括手术、放化疗)提供了一条新的治疗思路。

### 参 考 文 献

- [1] O'Keefe LV, Richards RI. Common chromosomal fragile sites and cancer: Focus on FRA16D. *Cancer Lett*, 2006, 232: 37-47.
- [2] Shibata T, Kokubu A, Gotoh M, et al. Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterology*, 2008, 135: 1358-1368.
- [3] Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, et al. WWOX, a Novel WW Domain-containing Protein Mapping to Human Chromosome 16q23.3-24.1, a Region Frequently Affected in Breast Cancer. *Cancer Res*, 2000, 60: 2140-2145.
- [4] Aqeilan RI, Hagan JP, Aqeilan HA, et al. Inactivation of the WWOX Gene accelerates forestomach tumor progression in vivo. *Cancer Res*, 2007, 67: 5606-5610.
- [5] Xiong Z, Hu S, Wang Z. Cloning of WWOX gene and its growth-inhibiting effects on ovarian cancer cells. *Journal of Huazhong University of Science Technology: Medical Sciences*, 2010, 30: 365-369.
- [6] Baykara O, Demirkaya A, Kaynak K, et al. WWOX gene may contribute to progression of non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Tumor Biology*, 2010, 31: 315-320.
- [7] Maeda N, Semba S, Nakayama S, et al. Loss of WW domain-containing oxidoreductase expression in the progression and development of gastric carcinoma; clinical and histopathologic correlations. *Virchows Arch*, 2010, 457: 423-432.
- [8] 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91: 9926-9930.
- [9] Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47: 89-116.
- [10] 陈楠, 胡容, 郭青龙. Nrf2 在肿瘤化学预防中的研究进展. *药物生物技术*, 2010, 17: 452-456.
- [11] Aqeilan RI, Pekarsky Y, Herrero JJ, et al. Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *PNAS*, 2004, 101: 4401-4406.
- [12] Chang NS, Hsu LJ, Lin YS, et al. WW domain-containing oxidoreductase: a candidate tumor suppressor. *Trends in Molecular Medicine*, 2007, 13: 12-22.
- [13] Aqeilan RI, Donati V, Gaudio E, et al. Association of WWOX with ErbB4 in breast cancer. *Cancer Res*, 2007, 67: 9330-9336.
- [14] Guler G, Iliopoulos D, Guler N, et al. WWOX and Ap2 $\gamma$  Expression Levels Predict Tamoxifen Response. *Clinical Cancer Res*, 2007, 13: 6115-6121.

(收稿日期: 2011-12-02)

(本文编辑: 马超)