

NRF2在胃癌免疫治疗中潜在的指导意义

董晨¹, 王莎莎¹, 王艳¹, 吕静¹, 刘家妮¹, 丁怡心¹, 邱文生^{1,2*}

¹青岛大学附属医院肿瘤内科, 山东 青岛

²重庆医科大学生物医学工程学院超声医学国家重点实验室, 重庆

收稿日期: 2024年1月29日; 录用日期: 2024年2月23日; 发布日期: 2024年2月29日

摘要

目的: 核因子E2相关因子2 (NRF2)是一种转录因子, 在多种肿瘤类型中发挥着双重作用。本研究旨在研究NRF2在胃癌中的表达情况, 明确其在免疫疗法中的预后意义, 并探索其与免疫细胞浸润之间的关联。方法: 我们采用PCR技术探究NRF2与PD-L1在转录水平上的调控关系。并对在2020年1月1日至2022年12月31日期间在青岛大学附属医院接受一线治疗的晚期胃癌患者进行筛选, 收集了相关患者的胃镜或手术标本, 通过免疫组化方法检测NRF2的表达水平。我们评估了不同表达水平患者的一线无进展生存期。此外, 利用TIMER和TISIDB数据库, 我们评估了NRF2的差异表达以及其与免疫微环境的关系。结果: 研究发现NRF2与PD-L1在转录水平上存在明显的正调控关系。在青岛大学附属医院接受治疗的患者队列中, 我们观察到NRF2表达升高的病例中, 相对于化疗, 免疫疗法表现出更佳的疗效。此外, 在线数据库分析显示NRF2表达与免疫微环境之间存在显著相关性。结论: NRF2通过调节PD-L1可能在免疫相关过程中扮演关键角色, 因此对指导胃癌患者的免疫疗法具有重要意义。该研究为设计新型靶向药物提供了深刻的见解。

关键词

胃癌, NRF2, 免疫治疗, PD-L1, 生物标志物

Potential Guiding Significance of NRF2 in Immunotherapy for Gastric Cancer

Chen Dong¹, Shasha Wang¹, Yan Wang¹, Jing Lv¹, Jiani Liu¹, Yixin Ding¹, Wensheng Qiu^{1,2*}

¹Department of Oncology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

²State Key Laboratory of Ultrasound in Medicine and Engineering, College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing

Received: Jan. 29th, 2024; accepted: Feb. 23rd, 2024; published: Feb. 29th, 2024

*通讯作者。

文章引用: 董晨, 王莎莎, 王艳, 吕静, 刘家妮, 丁怡心, 邱文生. NRF2 在胃癌免疫治疗中潜在的指导意义[J]. 临床医学进展, 2024, 14(2): 4668-4686. DOI: 10.12677/acm.2024.142647

Abstract

Objective: Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (NRF2) is a transcription factor and has a dual role in distinct tumour types. Herein, we aimed to explore the expression of NRF2 in gastric cancer, determine its prognostic significance for immunotherapy, and establish its relationship with immune cell infiltration. **Methods:** We used PCR to explore the regulatory relationship between NRF2 and PD-L1 at the transcriptional level. We screened patients with advanced gastric cancer who received first-line treatment in the Affiliated Hospital of Qingdao University from 2020-1-1 to 2022-12-31. Their gastroscopic or surgical specimens were collected and the expression of NRF2 was detected by immunohistochemical method. We assessed first-line progression-free survival. The differential expression of NRF2 and its association with the immune microenvironment were assessed using the TIMER and TISIDB databases. **Results:** We identified a clear positive regulatory association between NRF2 and PD-L1 at the transcriptional level. Additionally, within the patient cohort treated at the Affiliated Hospital of Qingdao University, we observed a superior efficacy of immunotherapy compared to chemotherapy in cases exhibiting elevated NRF2 expression. Furthermore, analyses of online databases indicate a substantial correlation between NRF2 expression and the immune microenvironment. **Conclusion:** NRF2 can be an important immune-related factor capable of regulating PD-L1. NRF2 may hold critical implications for guiding immunotherapy in patients with gastric cancer. The study provides insights for the design of novel targeted drugs.

Keywords

Gastric Cancer, NRF2, Immunotherapy, PD-L1, Biomarker

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胃癌具有高发病率和死亡率,已成为了全球范围内一项严峻的公共卫生问题。据 2020 年统计,胃癌在 36 种癌症中居第 5 位,全球新确诊病例超过 108 万例[1]。对于改善患者的预后和总体生存状况,早期诊断显得至关重要,晚期诊断往往导致预后不良,并限制了对化疗或姑息治疗的有效干预[2]。近期,免疫疗法作为一种颇受关注的治疗策略,在晚期胃癌中表现出巨大潜力[3]。在免疫治疗中,免疫应答始于免疫系统对抗原(病原体或异常细胞表面的特定分子)的识别,并导致免疫系统中各种类型的细胞被激活,包括 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞等。这些细胞通过相互作用和释放细胞因子等方式,协同合作来执行免疫活性。由于免疫应答的复杂性,该疗法在患者中的效果存在显著差异[4]。因此,确立可预测患者预后的生物标志物,对于更精准地指导治疗方法具有重要意义。

核因子 E2 相关因子 2 (NRF2),由 NFE2L2 基因编码,包含七个 Neh 结构域,是一种在所有细胞类型中表达的转录因子。在肿瘤发生中,NRF2 发挥着双重作用。一方面,通过激活生物转化,NRF2 可预防化学致癌的发生,另一方面,NRF2 的过度表达与某些肿瘤的发展和药物耐药性有关[5] [6] [7]。据报道,在胃癌患者中,NRF2 呈阳性表达的患者总体生存明显低于呈阴性表达者[8]。此外,通过细胞研究和动物实验的充分支持,NRF2 已被确定为黑色素瘤中程序性死亡配体 1 (PD-L1)的一个关键上游调控因子[9]。

鉴于 PD-L1 作为免疫疗法的主要靶点, 可以推测 NRF2 表达与免疫疗法预后之间存在一定关联。

本研究旨在深入探讨胃癌中 NRF2 和 PD-L1 表达之间的相互关系, 评估其在临床上的重要意义, 并分析它们与肿瘤免疫微环境之间的关联。我们的研究结果强调了 NRF2 在胃癌免疫疗法中可能充当指导因素的潜在作用。

2. 材料和方法

2.1. 细胞系和培养

人类胃上皮细胞系(HGC-27)来源于 Procell Life Science & Technology Co., Ltd.并在本实验室中得以维护。所有细胞系均在 Dulbecco's Modified Eagle's 培养基(Invitrogen)中培养, 添加 10%的胎牛血清(Hyclone), 并置于 37°C 和 5% CO₂ 的培养环境中。

2.2. RNA 提取和反转录 - 定量 PCR (RT-qPCR)

每个细胞系的总细胞 RNA 采用 TRIzol™试剂(Invitrogen)依照制造商提供的方案进行提取。RT-qPCR 扩增的引物序列如下: Nrf2 的前向引物为 5'-GCTGAACGCCCCATACAACAAAATC-3', 反向引物为 5'-CTCAGGACTTGATGGTCACTGCTTG-3'; GAPDH 作为内参的前向引物为 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3', 反向引物为 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'。对于每个样本, Nrf2 的表达水平均被调整为 GAPDH 的表达水平。

2.3. 患者和样本

本研究纳入了在 2020 年 1 月至 2022 年 12 月期间在青岛大学附属医院肿瘤科二病区就诊的 30 名确诊为胃癌的患者。纳入标准包括: (1) 经过病理学诊断确认为胃癌; (2) 接受晚期一线化疗且>2 周期的患者; (3) 具有完整的病历记录; (4) 一线治疗前在青岛大学附属医院留存肿瘤标本。排除具有其他类型恶性肿瘤史、其他肿瘤类型的转移以及临床记录不完整的患者。所有患者均签署知情同意书。我们回顾性收集了这 30 名患者的临床病理数据, 包括性别、PD-L1 综合阳性评分(CPS)、是否存在肝转移和腹膜转移。本研究遵循赫尔辛基宣言, 经青岛大学附属医院伦理委员会批准。

2.4. 免疫组化分析

我们采集了这 30 名患者的胃癌组织石蜡样本, 随后进行了切片处理。对这些组织样本进行免疫组织化学染色, 以评估 NRF2 的表达情况。

采用 H-score 系统对 NRF2 表达的强度进行评估, 该系统使用以下公式进行计算: $H\text{-Score} = \sum(p_i \times i)$, 其中 p_i 表示阳性信号像素面积/细胞数量的比例; i 代表着色强度。H 分数通过将(弱强度百分比 $\times 1$)、(中等强度百分比 $\times 2$)和(强强度百分比 $\times 3$)的值相加而确定。根据中位数分数, 患者被分为两组: 高 NRF2 表达组和低 NRF2 表达组。最后, 由一位病理学家对结果进行确认。

2.5. 评估

所有患者均为晚期患者, 通过胃镜活检或姑息手术标本进行了原发性胃癌的病理学诊断。所有标本由两位经验丰富的病理学家独立进行病理诊断, 且在审查过程中对患者的临床和复发数据一律不知情。无进展生存(PFS)定义为从一线治疗开始的日期到首次记录到进展或最后一次随访且未进展的日期之间。每位患者在一线治疗期间遵循规律的随访计划, 该计划要求每两个月进行一次检查, 包括体格检查、实验室检查和影像研究。在这些影像检查中, 主要采用动态增强计算机断层扫描(CT)。

2.6. 统计分析

数据使用 SPSS 27.0.1 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) 进行分析。数据以数值和百分比形式呈现, 并经过 Fisher 的精确检验。对 PFS 采用 Kaplan-Meier 方法和 log-rank 检验进行评估。所有收集的参数都通过 Cox 比例风险模型进行单变量和多变量生存分析。多因素回归分析使用 logistic 回归的前向选择方法。统计学上显著定义为 $p < 0.05$ 。

2.7. 数据库分析

TIMER 和 TISIDB 数据库被用于进行差异表达分析, 探索 NFE2L2 与免疫微环境之间的关系。在 TIMER 分析中, 我们选择了 EPIC 算法[10]。

3. 结果

3.1. 揭示转录调控: PD-L1 作为 NRF2 的靶点

为了确认 NRF2 对 PD-L1 转录的调控, 我们分别将两种类型的 siRNA 引入 HGC27 细胞, 以降低 NRF2 的表达, 并将空载体 siRNA 引入 HGC27 细胞作为对照。使用 RT-qPCR 评估 PD-L1 mRNA 的表达, 并分析 PD-L1 mRNA 水平。在 HGC27 细胞中沉默 NRF2 显著降低了 PD-L1 mRNA 的表达(图 1), 证实了 NRF2 在 PD-L1 调控中的关键作用。这些发现表明 PD-L1 可能受 NRF2 的调控。

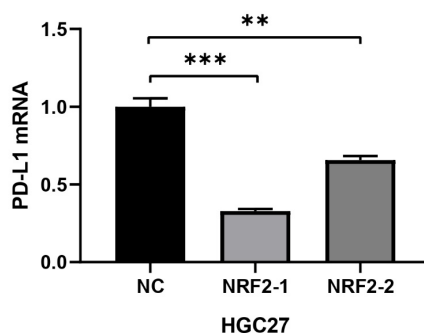


Figure 1. RT-PCR analysis of NRF2 expression post siRNA transfection

图 1. RT-PCR 分析 siRNA 转染后 NRF2 的表达

3.2. 患者的临床病理特征

本回顾性研究共纳入 30 名胃癌患者。对所有患者进行了免疫组织化学分析, 结果显示 NRF2 在胃癌细胞的细胞膜和细胞质中表达。在 400×放大倍数下分别观察到 NRF2 高表达和低表达(图 2)。

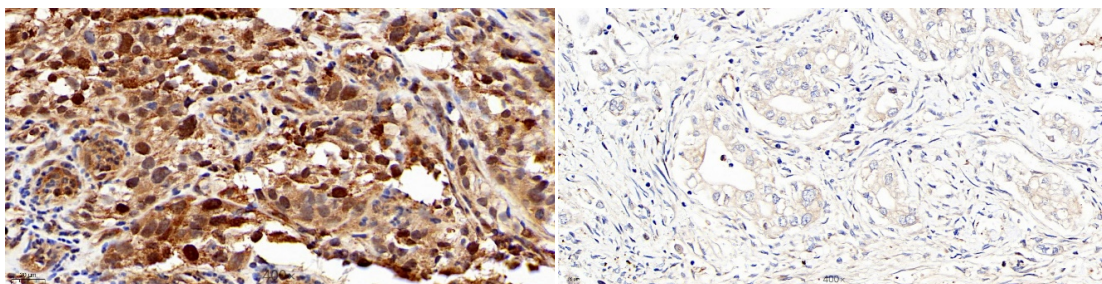


Figure 2. Microscopic observations of NRF2 overexpression and underexpression

图 2. NRF2 高表达和低表达的镜下表现

在入组的 30 名患者中，男性有 21 名(70.0%)，女性有 9 名(30.0%)。接受化疗联合免疫治疗的患者有 22 名(73.3%)，仅接受化疗的患者有 8 名(26.7%)。有 8 名患者(26.7%)伴有肝转移，9 名患者(30.0%)伴有腹膜转移。所有患者均被诊断为 IV 期疾病。根据 NRF2 表达水平的中位数，入组患者被分为两个亚组，表 1 展示了纳入患者的全面临床病理特征。在 NRF2 的高表达组和低表达组中，在性别($p = 1.00$)、肝转移($p = 0.215$)、腹膜转移($p = 0.426$)、PD-L1 表达($p = 1.00$)和治疗方案($p = 0.215$)方面均未观察到显著差异。

Table 1. The correlation between clinical pathological characteristics and the expression levels of NRF2 in gastric cancer patients (n = 30)

表 1. 胃癌患者临床病理特征和 NRF2 的表达水平的相关性(n = 30)

变量	全组人群	NRF2 表达水平		p 值
	n = 30	低表达(n = 15)	高表达(n = 15)	
治疗方式				0.215
免疫联合化疗	22 (73.3)	9 (60.0)	13 (86.7)	
单纯化疗	8 (26.7)	6 (40.0)	2 (13.3)	
性别				1.00
女性	9 (30.0)	4 (26.7)	5 (33.3)	
男性	21 (70.0)	11 (73.3)	10 (66.7)	
肝转移				0.215
是	8 (26.7)	6 (40.0)	2 (13.3)	
否	22 (73.3)	9 (60.0)	13 (86.7)	
腹膜转移				0.426
是	9 (30.0)	3 (20.0)	6 (40.0)	
否	21 (70.0)	12 (80.0)	9 (60.0)	
PD-L1 CPS 评分				1.00
<5	11 (42.3)	5 (38.5)	6 (46.2)	
≥5	15 (57.7)	8 (61.5)	7 (53.8)	

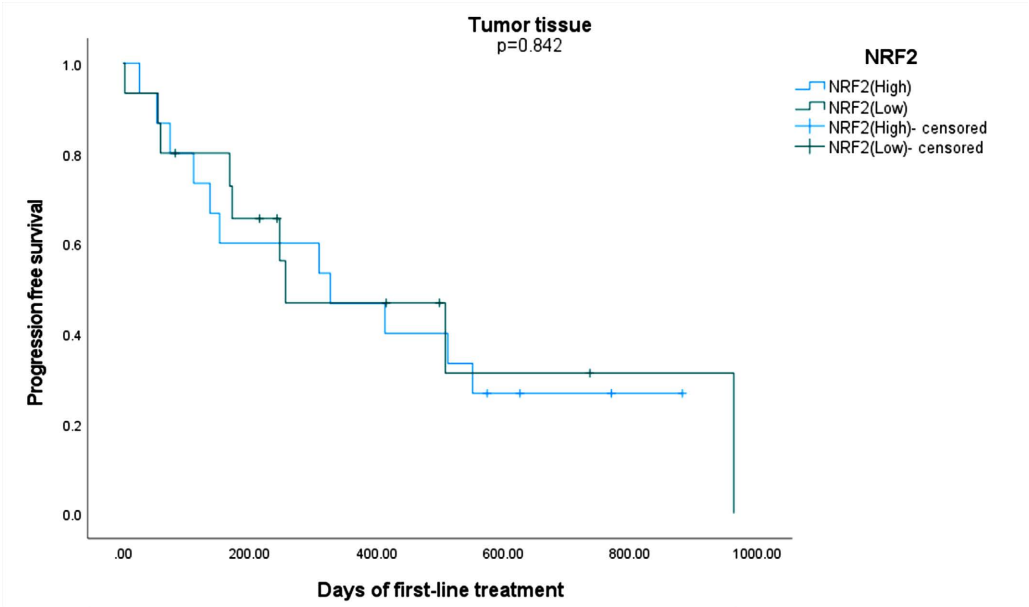
3.3. NRF2 高表达患者中免疫疗法的显著 PFS 优势

我们采用 RECIST 1.1 标准评价了治疗方式的疗效，并深入研究了其与 Nrf2 表达之间的关联(表 2)。在本研究中，共有 22 例患者接受了免疫联合治疗，其中 77%的患者采用了纳武利尤单抗(17/22)，9%的患者使用了信迪利单抗(2/22)，而 14%的患者则选择了卡瑞丽珠单抗(3/22)。在免疫联合治疗组中，有 13 例患者表现为 NRF2 低表达，而 9 例患者表现为 NRF2 高表达。在 NRF2 低表达的患者中，30.8%的患者在接受治疗后表现出缓解(4/13)，而在 NRF2 高表达的患者中，有 44.4%的患者表现出了缓解(4/9)，这一结果明显优于应用于低表达患者群体的疗效水平。此外，共有 8 例患者接受了单纯化疗，其中 2 例为 NRF2 低表达，而 6 例为 NRF2 高表达。在 NRF2 低表达的患者中，未观察到患者在接受治疗后表现出缓解；然而，在 NRF2 高表达的患者中，有 50%的患者在接受治疗后表现出缓解(3/6)。

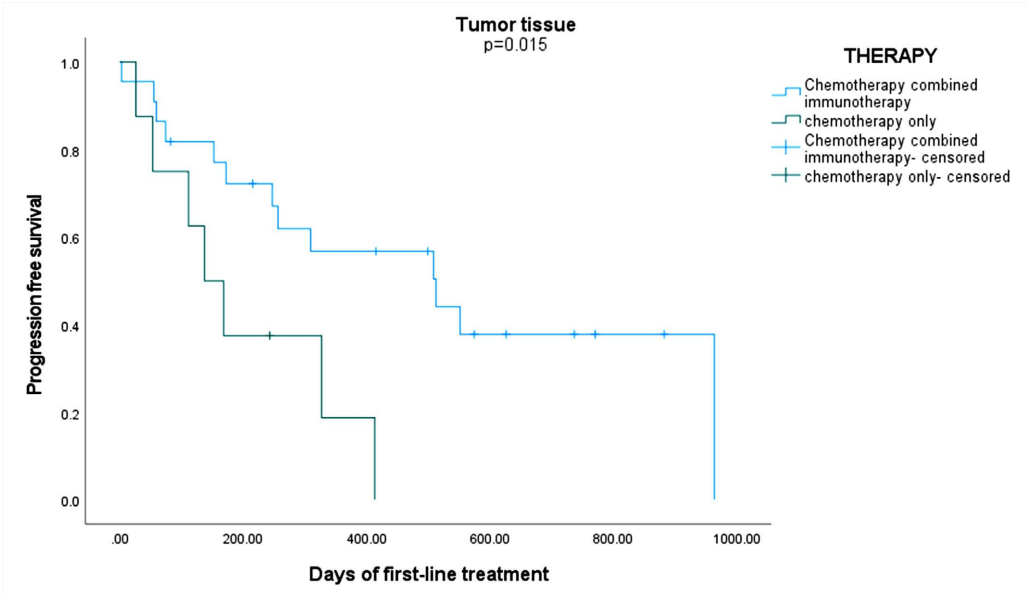
我们首先对 NRF2 高表达与低表达患者的一线 PFS 进行比较，结果显示两组之间没有达到统计学显著差异($p = 0.842$) (图 3(a))。然后分析比较了不同治疗方式下的 PFS。与仅接受化疗的患者相比，接受化疗和免疫疗法联合治疗的患者 PFS 表现出了显著改善($p = 0.015$) (图 3(b))。

Table 2. The association between optimal therapeutic efficacy and the expression levels of NRF2
表 2. 最佳治疗疗效和 NRF2 的表达水平的关联

疗效响应	单纯化疗(n = 8)		免疫治疗联合化疗(n = 22)	
	NRF2 低表达 (n = 2)	NRF2 高表达 (n = 6)	NRF2 低表达 (n = 13)	NRF2 高表达 (n = 9)
CR	0	0	1	0
PR	0	3	3	4
SD	2	1	6	4
PD	0	2	3	1



(a)



(b)

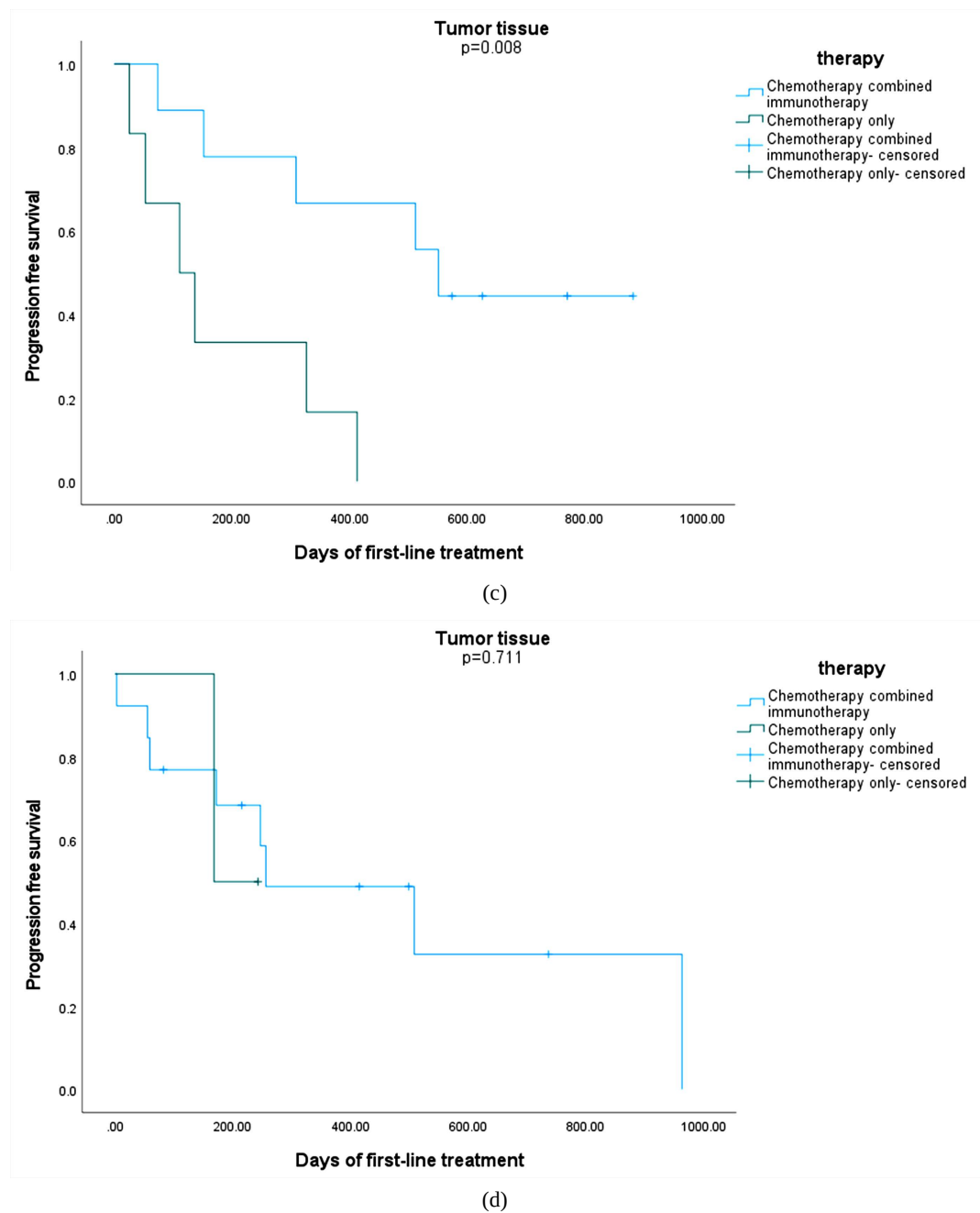


Figure 3. (a) Kaplan-Meier survival analysis based on NRF2 expression; (b) Kaplan-Meier survival analysis based on treatment modality; (c) Kaplan-Meier survival analysis based on the treatment modality in the NRF2 overexpression group; (d) Kaplan-Meier survival analysis based on the treatment modality in the NRF2 underexpression group

图 3. (a) 基于 NRF2 表达的 Kaplan-Meier 生存分析; (b) 基于治疗方式的 Kaplan-Meier 生存分析; (c) NRF2 高表达组中基于治疗方式的 Kaplan-Meier 生存分析; (d) NRF2 低表达组中基于治疗方式的 Kaplan-Meier 生存分析

为深入分析, 我们将 NRF2 高表达和低表达的患者分别研究。在 NRF2 高表达的患者队列中, 接受化疗和免疫疗法联合治疗的患者相较于仅接受化疗的患者表现出显著更好的 PFS ($p = 0.008$) (图 3(c))。1 年 PFS 率分别为 16.67% (1/6) 和 66.67% (6/9)。然而, 在 NRF2 低表达的患者中未观察到这一发现($p = 0.711$)

(图 3(d))。我们进一步采用 COX 比例风险回归模型研究了各种临床特征与一线患者 PFS 之间的相关性(表 3)。单变量分析表明,在整个晚期患者中,仅接受化疗与 PFS 存在显著关联(HR = 3.27, 95% CI: 1.20, 8.93),而性别、肝转移、腹膜转移、PD-L1 CPS 评分与 PFS 无关。在 NRF2 表达高于平均水平的亚组中,与接受联合免疫疗法的患者相比,仅接受化疗的患者预后较差(HR = 5.58, 95% CI: 1.36, 22.92),而没有腹膜转移的患者预后较好(HR = 0.14, 95% CI: 0.02, 0.86)。考虑到这些因素的临床意义,我们将所有变量纳入多变量分析。对于整个人群,我们未发现独立的预后因子。然而值得注意的是,在 NRF2 高表达的患者中,我们发现治疗模式是一个独立的预后因子,接受仅化疗的患者预后较差于接受免疫联合治疗的患者(HR = 4.51, 95% CI: 1.06, 19.22) (表 4)。

Table 3. Cox proportional hazards regression for PFS in a cohort of 30 patients
表 3. 30 名患者 PFS 的 COX 比例风险回归

特征	单因素分析		多因素分析	
	HR (95%CI)	<i>p</i> 值	HR (95%CI)	<i>p</i> 值
NRF2				
高表达	1.00 [Reference]			
低表达	0.91 (0.36, 2.29)	0.842		0.978
治疗方式				
免疫治疗联合化疗	1.00 [Reference]			
单纯化疗	3.27 (1.20, 8.93)	0.021		0.054
性别				
女性	1.00 [Reference]			
男性	0.82 (0.31, 2.17)	0.694		0.440
肝转移				
是	1.00 [Reference]			
否	0.82 (0.31, 2.16)	0.684		0.802
腹膜转移				
是	1.00 [Reference]			
否	0.69 (0.25, 1.89)	0.474		0.477
PD-L1 CPS 评分				
<5	1.00 [Reference]			
≥5	1.35 (0.47, 3.82)	0.578		0.269

Table 4. Cox proportional hazards regression for PFS in a subgroup of 15 patients with high NRF2 expression
表 4. 15 名 NRF2 高表达患者 PFS 的 COX 比例风险回归

特征	单因素分析		多因素分析	
	HR (95%CI)	<i>p</i> 值	HR (95%CI)	<i>p</i> 值
治疗方式				
免疫治疗联合化疗	1.00 [Reference]		1.00 [Reference]	
单纯化疗	5.58 (1.36, 22.92)	0.017	4.51 (1.06, 19.22)	0.042

续表

性别			
女性	1.00 [Reference]		
男性	1.47 (0.39, 5.61)	0.572	0.939
肝转移			
是	1.00 [Reference]		
否	1.35 (0.39, 4.64)	0.632	0.794
腹膜转移			
是	1.00 [Reference]		
否	0.14 (0.02, 0.86)	0.034	0.164
PD-L1 CPS 评分			
<5	1.00 [Reference]		
≥5	0.75 (0.20, 2.84)	0.670	0.455

在我们的研究中, 研究结果提示接受了免疫联合治疗的患者出现了 3 例免疫相关性疾病, 分别是免疫性肺炎、免疫性肠炎、溃疡性结肠炎, 而仅接受化疗的患者不良反应多为消化道症状及中性粒细胞的减低。

3.4. NRF2 表达与免疫微环境相关

为了更进一步验证 NFE2L2 在胃癌组织中的表达情况, 我们借助 TIMER 数据库对比了恶性肿瘤和相应正常组织中 NFE2L2 的表达水平。分析结果提示, 在胃腺癌(STAD)组织中 NFE2L2 呈现显著的过表达(图 4)。此外, 本研究利用 TIMER 数据库探索了 NFE2L2 表达与胃癌中免疫细胞浸润的相关性, 我们观察到 NFE2L2 的表达与自然杀伤细胞(NK 细胞) ($p = 2.69e^{-03}$)、CD4+T 细胞($p = 4.22e^{-11}$)、内皮细胞($p = 1.82e^{-02}$)以及 CD8+T 细胞($p = 1.31e^{-3}$)的表达之间存在显著相关性(图 5)。

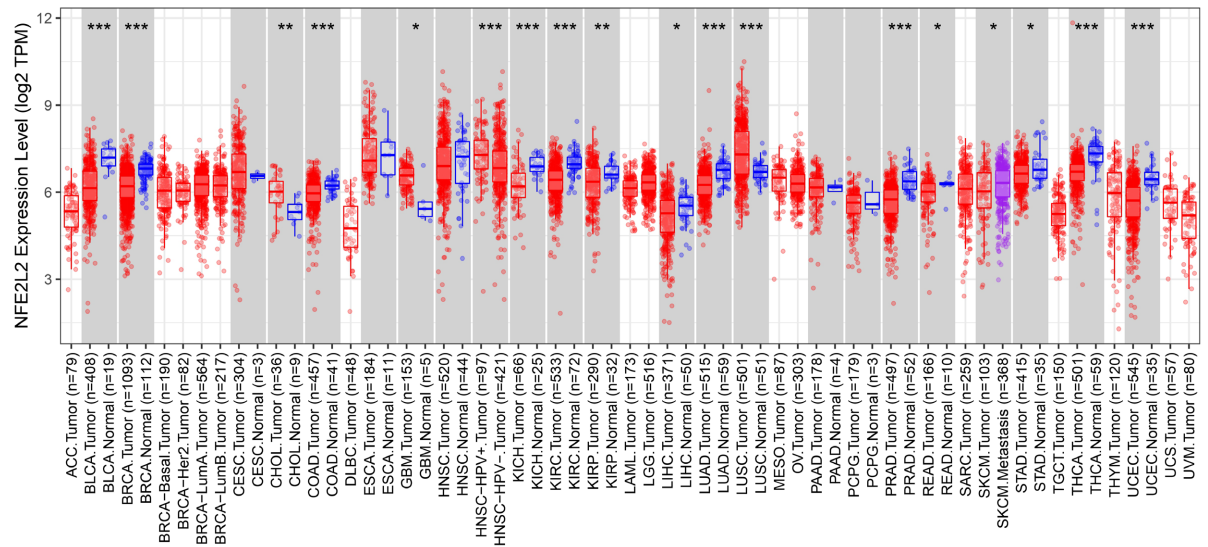


Figure 4. Analysis of differential NRF2 expression patterns in various cancer types using the TIMER database

图 4. TIMER 数据库分析不同癌症类型中 NRF2 表达模式的差异

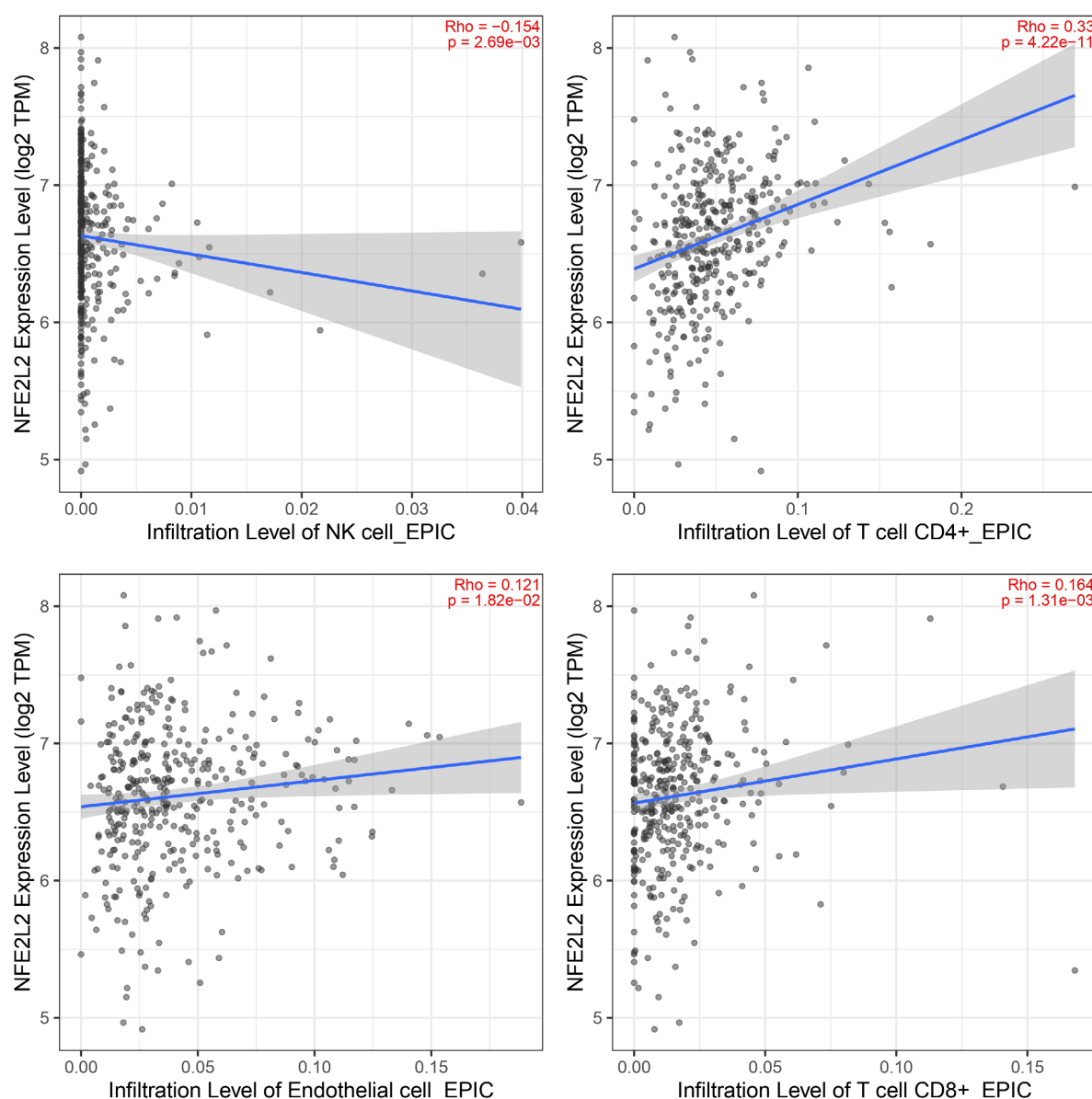


Figure 5. The correlation between NFE2L2 expression and immune cell infiltration in STAD

图 5. NFE2L2 表达与 STAD 免疫细胞浸润的相关性

通过 TISIDB 数据库的深入分析, 结果显示 NFE2L2 在免疫调控分子上发挥着关键作用。其同免疫抑制分子具有正向相关性, 包括 TGFB1、IL10RB、ADORA2A 和 CD274 (PD-L1) (图 6), 同时与免疫刺激分子亦具有相关性, 如 TNFSF15、TNFSF13、TNFSF4、TNFRSF25、TNFRSF18、TNFRSF13C、TNFRSF13B、TNFRSF9 等(图 7)。此外, NFE2L2 与 B2M 的相关性可能使其在主要组织相容性复合体 (MHC) 中发挥作用(图 8)。在肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)方面, NFE2L2 的表达与 CD4、树突状细胞(DCs)、CD56bright、CD56dim、不成熟 DCs、巨噬细胞、Th17 和 Tregs 等免疫细胞类型相关(图 9)。然而, 免疫亚型和分子亚型与 NFE2L2 的表达并未显示出明显的关系(图 10)。此外, NFE2L2 还调控了一些趋化因子, 如 CCL28、CCL25、CCL21 和 CCL20 (图 11), 以及相应的受体, 如 CXCR5、CCR10 和 CCR8 (图 12), 在调节免疫过程中发挥了调控作用。

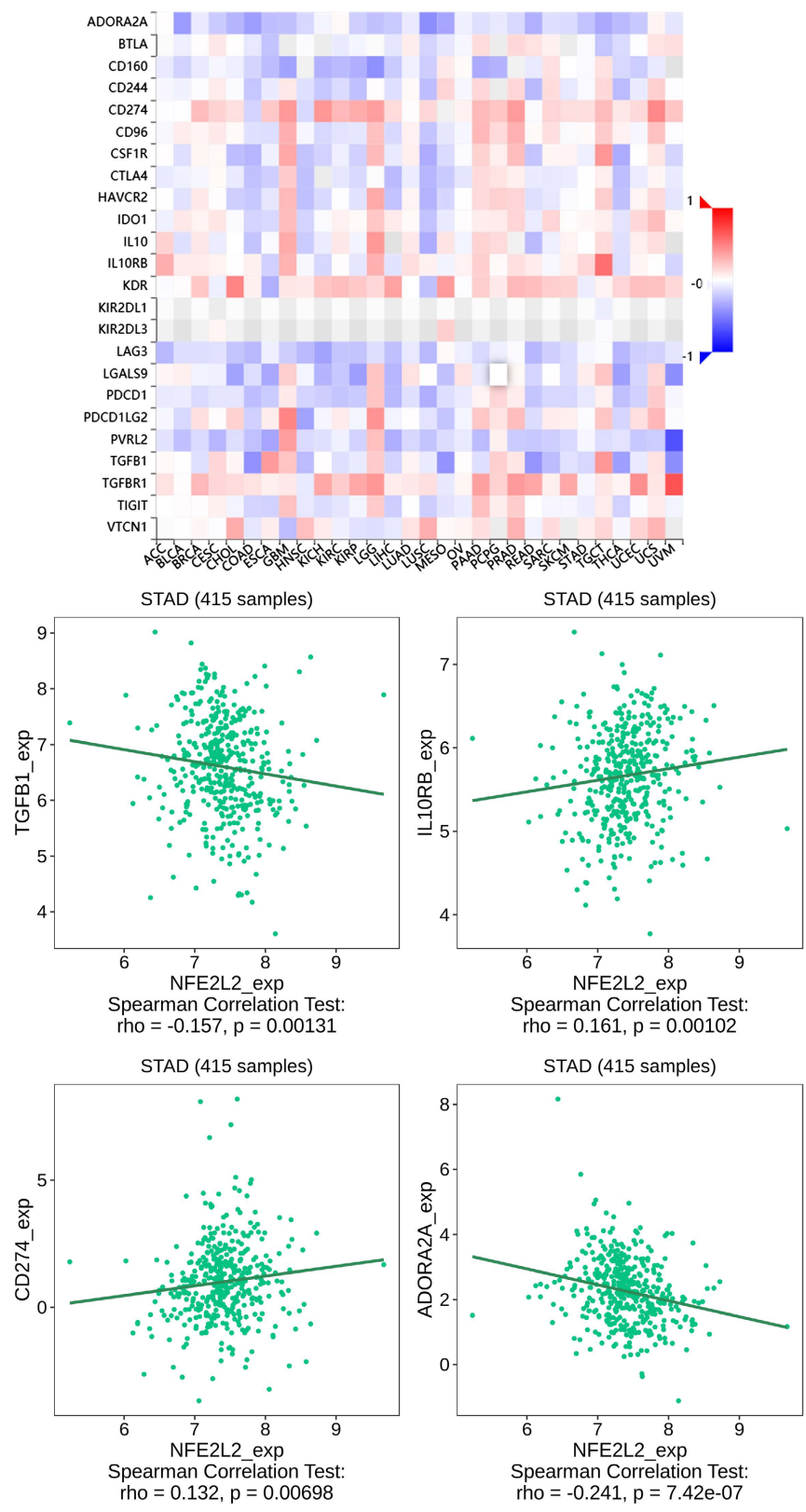
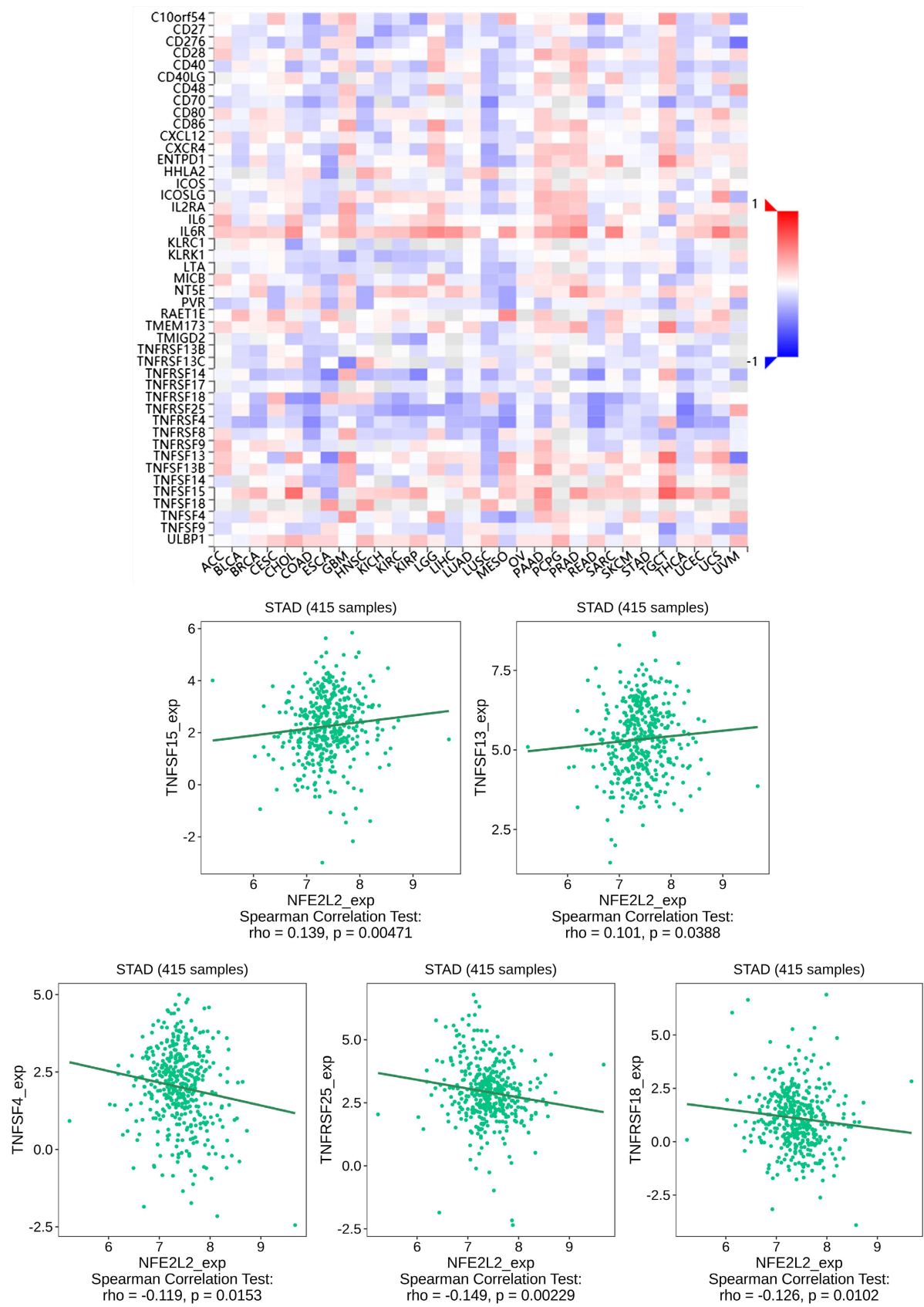


Figure 6. The correlation between NFE2L2 expression and immune checkpoint molecules
图 6. NFE2L2 表达与免疫抑制分子的相关性



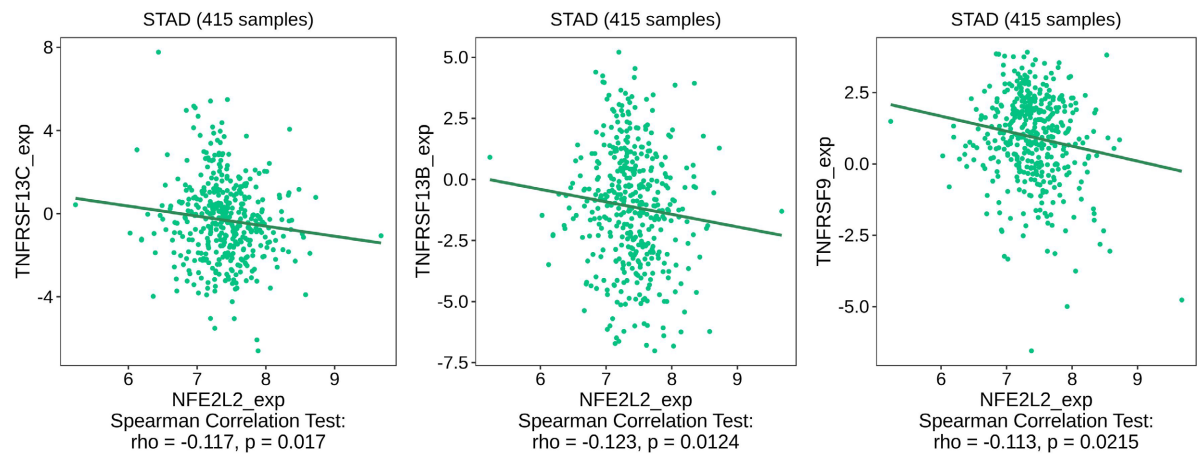


Figure 7. The correlation between NFE2L2 expression and immune stimulatory molecules
图 7. NFE2L2 表达与免疫刺激分子的相关性

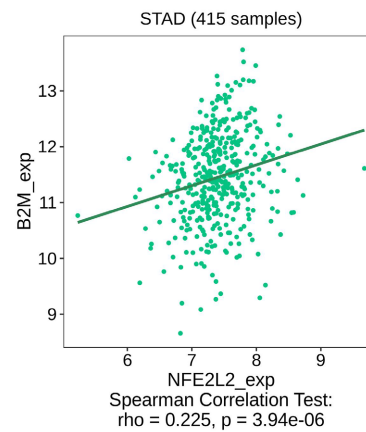
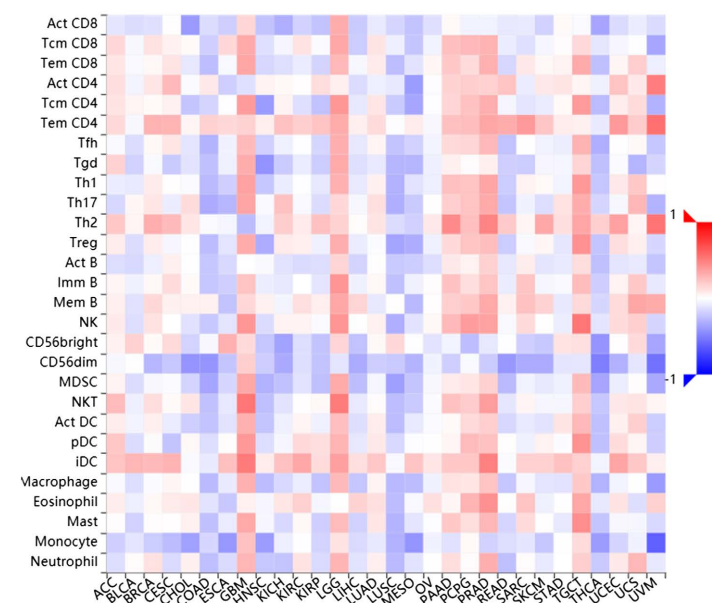


Figure 8. The correlation between NFE2L2 expression and MHC molecules
图 8. NFE2L2 表达与 MHC 分子的相关性



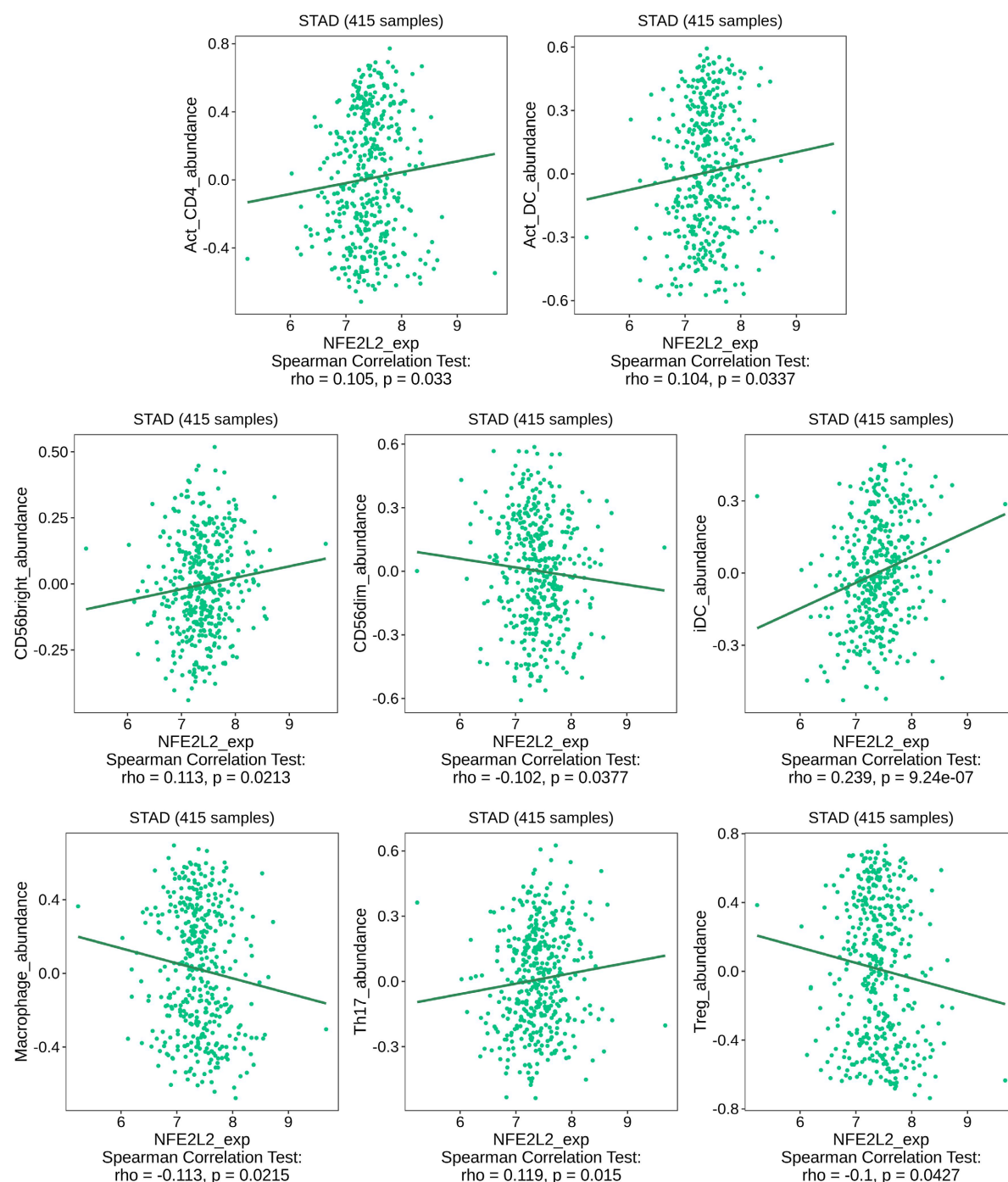


Figure 9. The correlation between NFE2L2 expression and TILs

图 9. NFE2L2 表达与 TILs 的相关性

4. 讨论

胃癌是一种全球性的疾病，由于常在晚期被诊断，胃癌具有较高的死亡率，是癌症相关死亡的第三大主要原因[2] [11]。化疗在改善局部晚期、不能切除或转移性胃癌患者的生存和生活质量方面，发挥着关键作用[12] [13]。化疗可以抑制肿瘤生长，减小肿瘤体积，提高手术切除率，甚至将不可切肿瘤转化为

可切，常常通过影像学检查或者血检验等方式来评估疗效。然而，随着肿瘤免疫学的进展，免疫疗法已逐渐成为治疗各种癌症的一种前沿手段，使某些晚期肿瘤患者得以延长生存。对于包括胃癌在内的各种癌症，针对 PD-1/PD-L1 或 CTLA-4 的免疫检查点抑制剂已显示出充满希望的前景[14] [15] [16]。然而，免疫疗法新靶点的匮乏以及受益群体范围的模糊使免疫治疗仍然是一个持续存在的挑战。因此，我们旨在探讨 NRF2 在免疫疗法应答和胃癌患者预后中的作用。

NRF2，又称为核因子 E2 相关因子 2，是一种被 NFE2L2 基因编码的转录因子。它作为细胞抗氧化应答的关键环节，其活性通过与 Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1)的相互作用来调控[17] [18]。KEAP1/NRF2 转录活性的失调已被认为与多种疾病的发病机制有关，强调了它在细胞稳态中的关键作用[19] [20] [21]。然而，NRF2 在癌症中的激活作用是复杂的，需要进一步的研究[10] [17] [22] [23] [24] [25]。此外，肿瘤中 NRF2 表达与癌症发生过程的关系仍然不明确。

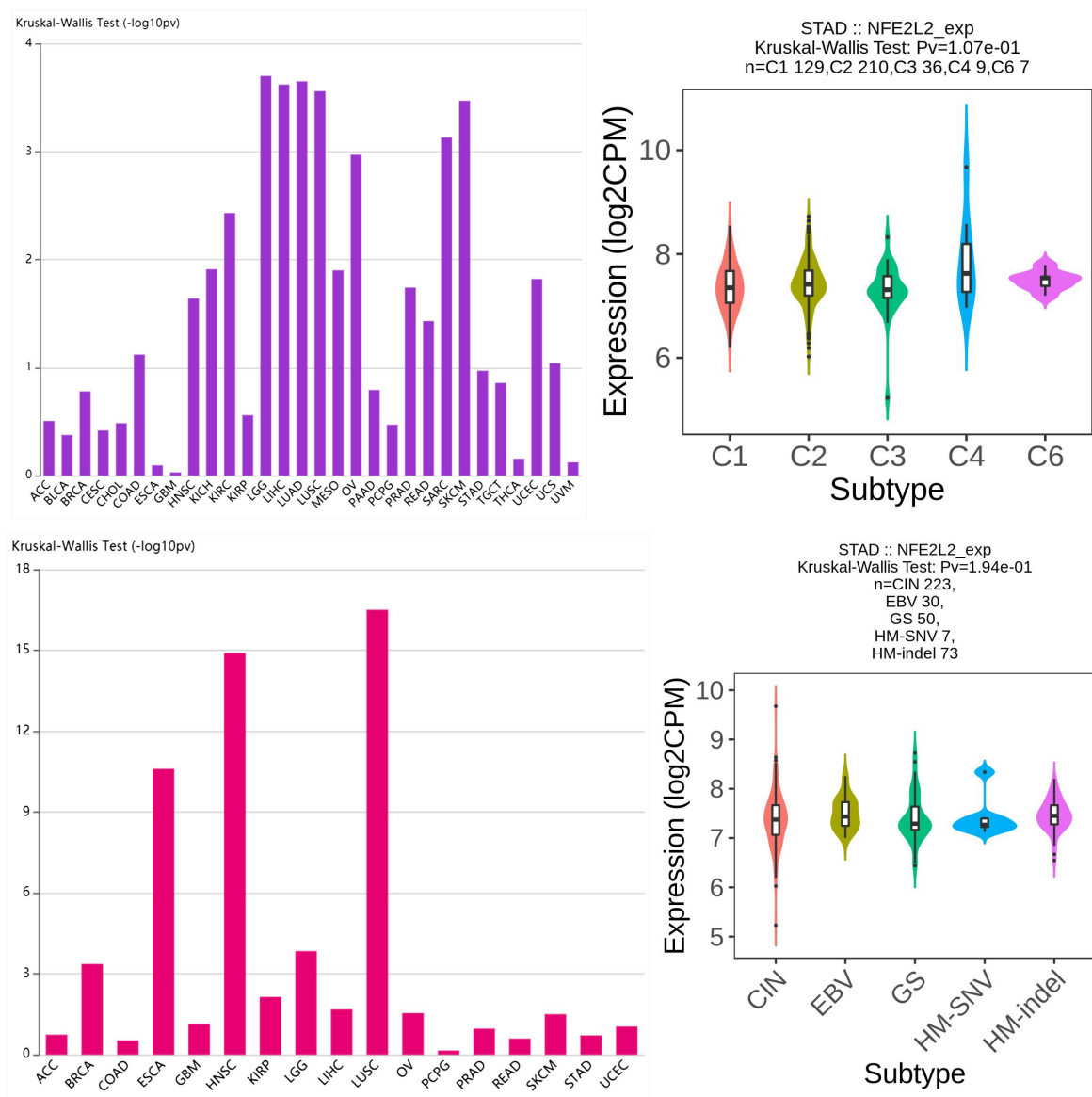


Figure 10. The correlation between NFE2L2 expression and immune types and molecular subtypes
图 10. NFE2L2 表达与免疫类型及分子亚型的相关性

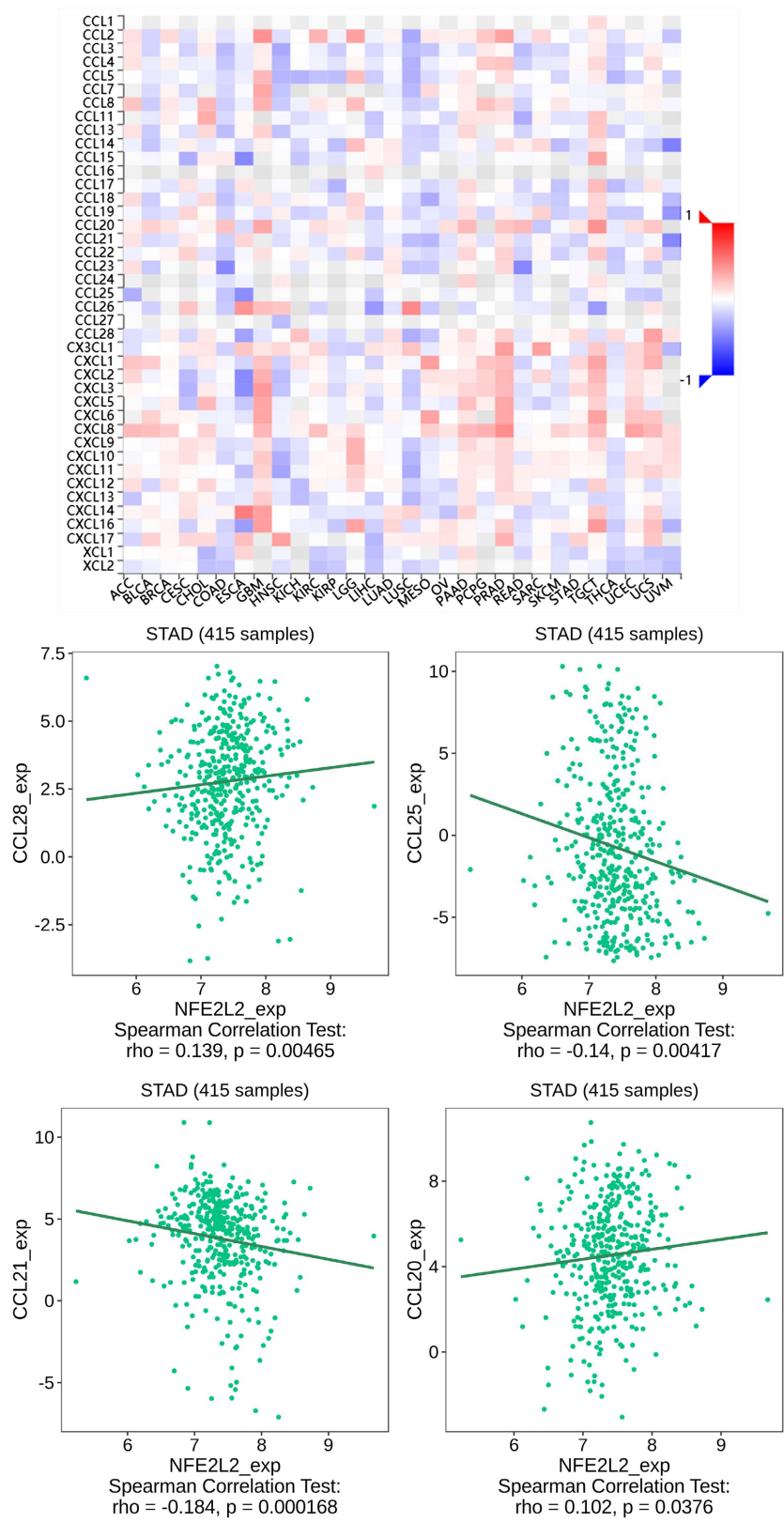


Figure 11. The correlation between NFE2L2 expression and chemokines

图 11. NFE2L2 表达与趋化因子的相关性

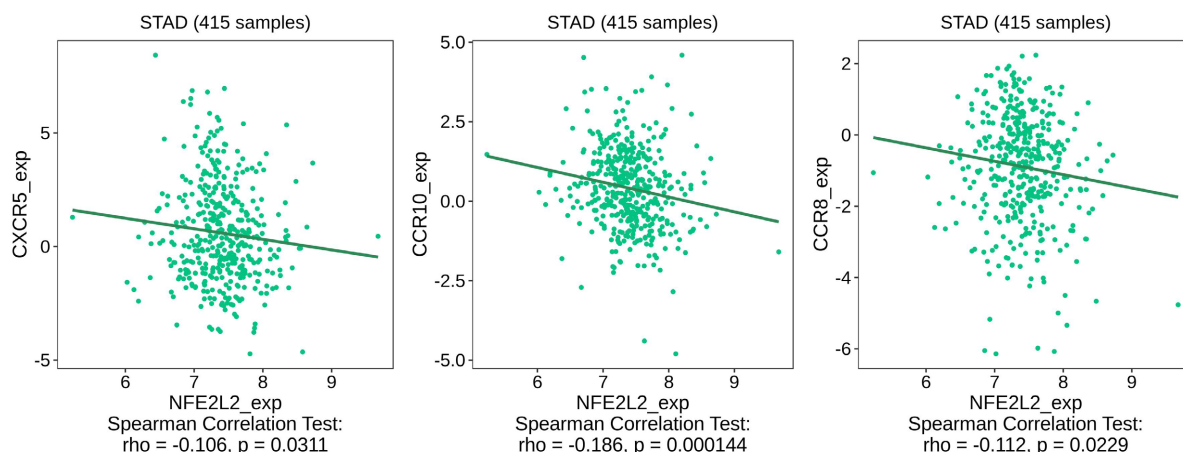


Figure 12. The correlation between NFE2L2 expression and chemokine receptors

图 12. NFE2L2 表达与趋化因子受体的相关性

在胃癌患者中, 升高的 NRF2 表达与癌症的进展和药物耐药性有关[8] [26] [27] [28], 这表明 NRF2 在肿瘤发生中发挥着重要的作用。先前的研究报道了 NRF2 在黑色素瘤中直接调控 PD-L1 的转录。在 18 个 PD-L1 高表达的标本中, 所有(100%)标本检测到 NRF2 的阳性表达, 但在 33 个 PD-L1 低表达的标本中, 只有 23 个(69.7%)标本检测到 NRF2 的阳性表达。PD-L1 的表达与 NRF2 显著相关($r = 0.7768$, $p < 0.0001$, $n = 92$) [7]。在本研究中, 我们通过 PCR 观察到, 在 NRF2 下调条件下, PD-L1 的表达水平降低, 这与先前的研究结果一致。鉴于 NRF2 的下调导致 PD-L1 表达降低, 我们对晚期胃癌患者进行了生存分析。统计数据显示, 在所有患者中, 接受免疫联合治疗的患者的 1 年 PFS 率为 86.36% (19/22), 而仅接受化疗的患者的率为 12.5% (1/8)。在高 NRF2 表达人群中, 接受免疫联合治疗的胃癌患者与仅接受化疗的患者相比, 1 年一线 PFS 率更高(66.67% vs. 16.67%)。在低表达组中没有类似的发现。使用 COX 比例风险回归模型的单因素和多因素分析发现, 是否接受联合免疫治疗是高 NRF2 表达人群的独立预后因素。本研究的对象都是晚期患者, 他们多数进行活检以获得少量病变组织进行诊断。这一人群可能需要进一步的诊断或治疗, 在伦理上, 针对这一群体的研究必须选择在采集后保留足够组织样本的方式进行。为了增加样本量, 我们努力收集在青岛大学附属医院存储的病理标本。我们希望通过这项研究提供具有指导性的临床证据。

为确认 NRF2 表达与胃癌(STAD)中免疫细胞浸润的关联, 我们使用 TIMER 数据库进行分析, 发现 NFE2L2 表达与 CD4+、CD8+、NK 和内皮细胞的存在呈正相关。值得注意的是, CD8+ 和 CD4+ T 细胞浸润在肿瘤中具有显著的预后价值[29] [30] [31]。此外, 通过 TISIDB 数据库的分析, 我们进一步研究了 NRF2 表达与胃癌患者肿瘤免疫微环境之间的关系, 揭示了 NRF2 表达与 TILs (肿瘤浸润淋巴细胞)、免疫调节因子和趋化因子之间的显著相关性。

在肿瘤微环境(TME)中, 除了癌细胞外, 还包含一系列免疫细胞、基质细胞、内皮细胞和癌相关成纤维细胞[32] [33]。肿瘤微环境在肿瘤逃逸和免疫治疗预后中起着重要作用[32] [34] [35] [36] [37]。基于我们的研究结果, 我们推测 NRF2 在胃癌进展中与浸润的免疫细胞相互作用, 从而影响肿瘤免疫微环境和癌症预后。多种免疫细胞的积聚可能归因于 CD8+ T 淋巴细胞的浸润, 后者可能通过从细胞表面触发特定信号的释放来吸引其他免疫细胞。这一机制似乎调节了免疫细胞参与肿瘤发生过程[38]。我们的研究全面考察了细胞实验、临床试验和生物信息学分析, 为 NRF2 作为免疫疗法潜在标志物提供了系统的证据。这种潜在的关联可能源于其对 PD-L1 或免疫微环境的调节。然而, 值得注意的是, 我们的研究缺乏

动物实验, 并且由于可用的足够组织标本有限, 目前的研究仅包括了数十名患者。为了全面阐明 NRF2 在胃癌免疫疗法中的作用, 需要进行更深入的基础实验和更大规模的临床研究。

基金项目

北京市希思科临床肿瘤学研究基金项目(Y-HR2018-185); 山东省医药卫生科技发展计划项目(202103030554)。

参考文献

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] Smyth, E.C., Nilsson, M., Grabsch, H.I., *et al.* (2020) Gastric Cancer. *The Lancet*, **396**, 635-648. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31288-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31288-5)
- [3] Joshi, S.S. and Badgwell, B.D. (2021) Current Treatment and Recent Progress in Gastric Cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 264-279. <https://doi.org/10.3322/caac.21657>
- [4] Hegde, P.S. and Chen, D.S. (2020) Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. *Immunity*, **52**, 17-35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.011>
- [5] Rojo De La Vega, M., Chapman, E. and Zhang, D.D. (2018) NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell*, **34**, 21-43. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.022>
- [6] Gambardella, V., Gimeno-Valiente, F., Tarazona, N., *et al.* (2019) NRF2 through RPS6 Activation Is Related to Anti-HER2 Drug Resistance in HER2-Amplified Gastric Cancer. *Clinical Cancer Research*, **25**, 1639-1649. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2421>
- [7] Singh, A., Daemen, A., Nickles, D., *et al.* (2021) NRF2 Activation Promotes Aggressive Lung Cancer and Associates with Poor Clinical Outcomes. *Clinical Cancer Research*, **27**, 877-888. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-1985>
- [8] Kawasaki, Y., Ishigami, S., Arigami, T., *et al.* (2015) Clinicopathological Significance of Nuclear Factor (Erythroid-2)-Related Factor 2 (Nrf2) Expression in Gastric Cancer. *BMC Cancer*, **15**, Article No. 5. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1008-4>
- [9] Zhu, B., Tang, L., Chen, S., *et al.* (2018) Targeting the Upstream Transcriptional Activator of PD-L1 as an Alternative Strategy in Melanoma Therapy. *Oncogene*, **37**, 4941-4954. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0314-0>
- [10] Sturm, G., Finotello, F., Petitprez, F., *et al.* (2019) Comprehensive Evaluation of Transcriptome-Based Cell-Type Quantification Methods for Immuno-Oncology. *Bioinformatics*, **35**, I436-I445. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz363>
- [11] Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., *et al.* (2019) Estimating the Global Cancer Incidence and Mortality in 2018: GLOBOCAN Sources and Methods. *International Journal of Cancer*, **144**, 1941-1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- [12] Lordick, F. (2020) Chemotherapy for Resectable Microsatellite Instability-High Gastric Cancer? *The Lancet Oncology*, **21**, 203. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30012-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30012-7)
- [13] Smyth, E.C., Verheij, M., Allum, W., *et al.* (2016) Gastric Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Annals of Oncology*, **27**, V38-V49. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw350>
- [14] Högnér, A. and Moehler, M. (2022) Immunotherapy in Gastric Cancer. *Current Oncology*, **29**, 1559-1574. <https://doi.org/10.3390/curroncol29030131>
- [15] Chen, K., Wang, X., Yang, L., *et al.* (2021) The Anti-PD-1/PD-L1 Immunotherapy for Gastric Esophageal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis and Literature Review. *Cancer Control*, **28**. <https://doi.org/10.1177/1073274821997430>
- [16] Liang, H., Li, Z., Huang, Z., *et al.* (2022) Prognostic Characteristics and Clinical Response to Immunotherapy Targeting Programmed Cell Death 1 for Patients with Advanced Gastric Cancer with Liver Metastases. *Frontiers in Immunology*, **13**, Article 1015549. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1015549>
- [17] Shibata, T., Ohta, T., Tong, K.I., *et al.* (2008) Cancer Related Mutations in NRF2 Impair Its Recognition by Keap1-Cul3 E3 Ligase and Promote Malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 13568-13573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806268105>

- [18] Jin, X., Zheng, Y., Chen, Z., *et al.* (2021) Integrated Analysis of Patients with KEAP1/NFE2L2/CUL3 Mutations in Lung Adenocarcinomas. *Cancer Medicine*, **10**, 8673-8692. <https://doi.org/10.1002/cam4.4338>
- [19] Dempke, W.C.M. and Reck, M. (2021) KEAP1/NRF2 (NFE2L2) Mutations in NSCLC—Fuel for a Superresistant Phenotype? *Lung Cancer*, **159**, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2021.07.006>
- [20] Zhou, J., Zheng, Q. and Chen, Z. (2022) The Nrf2 Pathway in Liver Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **10**, Article 826204. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.826204>
- [21] Farkhondeh, T., Pourbagher-Shahri, A.M., Azimi-Nezhad, M., *et al.* (2021) Roles of Nrf2 in Gastric Cancer: Targeting for Therapeutic Strategies. *Molecules*, **26**, Article 3157. <https://doi.org/10.3390/molecules26113157>
- [22] Tao, S., Rojo De La Vega, M., Chapman, E., *et al.* (2018) The Effects of NRF2 Modulation on the Initiation and Progression of Chemically and Genetically Induced Lung Cancer. *Molecular Carcinogenesis*, **57**, 182-192. <https://doi.org/10.1002/mc.22745>
- [23] Johnson, N.M., Egner, P.A., Baxter, V.K., *et al.* (2014) Complete Protection Against Aflatoxin B(1)-Induced Liver Cancer with a Triterpenoid: DNA Adduct Dosimetry, Molecular Signature, and Genotoxicity Threshold. *Cancer Prevention Research*, **7**, 658-665. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0430>
- [24] Garufi, A., Pistritto, G., D'Orazi, V., *et al.* (2022) The Impact of NRF2 Inhibition on Drug-Induced Colon Cancer Cell Death and P53 Activity: A Pilot Study. *Biomolecules*, **12**, Article 461. <https://doi.org/10.3390/biom12030461>
- [25] Pillai, R., Hayashi, M., Zavitsanou, A.M. and Papagiannakopoulos, T. (2022) NRF2: KEAPing Tumors Protected. *Cancer Discovery*, **12**, 625-643. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0922>
- [26] Shibata, T., Kokubu, A., Gotoh, M., *et al.* (2008) Genetic Alteration of Keap1 Confers Constitutive Nrf2 Activation and Resistance to Chemotherapy in Gallbladder Cancer. *Gastroenterology*, **135**, 1358-1368.E4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.06.082>
- [27] Yang, Y., Wang, X., Zhang, J., *et al.* (2022) Abnormal Phenotype of Nrf2 Is Associated with Poor Prognosis through Hypoxic/VEGF-A-Rap1b/VEGFR2 Pathway in Gastric Cancer. *Aging*, **14**, 3293-3312. <https://doi.org/10.18632/aging.204013>
- [28] Yu, S., Wu, T., Wang, J., *et al.* (2018) Combined Evaluation of Expression of CXCR4 and Nrf2 as Prognostic Factor for Patients with Gastric Carcinoma. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **18**, 388-393. <https://doi.org/10.2174/1871520617666171103112019>
- [29] Han, S., Zhang, C., Li, Q., *et al.* (2014) Tumour-Infiltrating CD4⁺ and CD8⁺ Lymphocytes as Predictors of Clinical Outcome in Glioma. *British Journal of Cancer*, **110**, 2560-2568. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.162>
- [30] Glaire, M.A., Domingo, E., Sveen, A., *et al.* (2019) Tumour-Infiltrating CD8⁺ Lymphocytes and Colorectal Cancer Recurrence by Tumour and Nodal Stage. *British Journal of Cancer*, **121**, 474-482. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0540-4>
- [31] Thihe, A.A., Chen, X., Koh, V.C.Y., *et al.* (2020) Higher Densities of Tumour-Infiltrating Lymphocytes and CD4⁺ T Cells Predict Recurrence and Progression of Ductal Carcinoma *in Situ* of the Breast. *Histopathology*, **76**, 852-864. <https://doi.org/10.1111/his.14055>
- [32] Lei, X., Lei, Y., Li, J.K., *et al.* (2020) Immune Cells within the Tumor Microenvironment: Biological Functions and Roles in Cancer Immunotherapy. *Cancer Letters*, **470**, 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.11.009>
- [33] Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, **144**, 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- [34] Liu, D.H.W., Kim, Y.W., Sefcovicova, N., *et al.* (2023) Tumour Infiltrating Lymphocytes and Survival after Adjuvant Chemotherapy in Patients with Gastric Cancer: Post-Hoc Analysis of the CLASSIC Trial. *British Journal of Cancer*, **128**, 2318-2325. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02257-3>
- [35] Lee, J.Y., Kannan, B., Lim, B.Y., *et al.* (2022) The Multi-Dimensional Biomarker Landscape in Cancer Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, Article 7839. <https://doi.org/10.3390/ijms23147839>
- [36] Poznanski, S.M., Singh, K., Ritchie, T.M., *et al.* (2021) Metabolic Flexibility Determines Human NK Cell Functional Fate in the Tumor Microenvironment. *Cell Metabolism*, **33**, 1205-1220.E5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.03.023>
- [37] Zhang, A., Zhang, J., Li, X., *et al.* (2021) HPMSCs Inhibit the Expression of PD-1 in CD4⁺IL-10⁺ T Cells and Mitigate Liver Damage in a GVHD Mouse Model by Regulating the Crosstalk Between Nrf2 and NF-κB Signaling Pathway. *Stem Cell Research & Therapy*, **12**, Article No. 368. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02407-5>
- [38] Yu, P., He, W., Zhang, Y., *et al.* (2022) SFRP4 Is a Potential Biomarker for the Prognosis and Immunotherapy for Gastric Cancer. *Journal of Oncology*, **2022**, Article ID: 8829649. <https://doi.org/10.1155/2022/8829649>