

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.19.024

NFE2L1 在食管鳞癌中的表达及临床意义*

周琳¹ 卫秦川² 王豫椒¹ 徐美翔¹ 熊文东¹ 刘霞³ 任勇刚^{1Δ}

(1 川北医学院基础医学院 四川南充 637000; 2 川北医学院眼视光学系 四川南充 637000;

3 川北医学院法医学系 四川南充 637000)

摘要 目的:通过检测食管鳞癌标本中核因子 E2 相关因子 1(NFE2L1)的表达情况,探究 NFE2L1 在食管鳞癌发生发展中的作用,为食管鳞癌的诊治以及预后评估提供新的思路。**方法:**收集我校附院 2016-2017 年经病理组织学检查诊断为食管鳞癌的手术标本 40 例及其对应的癌旁组织并从 NCBI 数据库下载 GEO 测序数据,应用定量 PCR、免疫组化和生物信息分析等方法检测分析 NFE2L1 基因的表达情况。**结果:**在食管鳞癌组织中,NFE2L1 表达阳性 31 例(77.5%),癌旁组织阳性表达 17 例(42.5%),两组比较差异显著有统计学意义($P<0.001$);进一步发现 NFE2L1 的阳性表达与肿瘤分化程度和淋巴转移相关($P<0.05$)。但在不同年龄、性别、浸润深度及不同部位之间差异无统计学意义。GEO 数据分析结果显示 NFE2L1 在食管鳞癌组织显著高表达($P<0.01$),只是未达到显著差异表达的阈值标准(即变化倍数小于 2 倍)。**结论:**NFE2L1 在食管鳞癌中高表达,表达的高低与食管鳞癌的发生进展密切相关。

关键词:转录因子 NFE2L1;食管鳞癌;免疫组化;生物信息

中图分类号:R735.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)19-3706-06

Expression and Clinical Significance of NFE2L1 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma*

ZHOU Lin¹, WEI Qin-chuan², WANG Yu-jiao¹, XU Mei-xiang¹, XIONG Wen-dong¹, LIU Xia³, REN Yong-gang^{1Δ}

(1 School of Basic Medical Sciences, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, 637000, China;

2 Department of Ophthalmology, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, 637000, China;

3 Department of Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, 637000, China)

ABSTRACT Objective: This article aims to explore the role of NFE2L1 in the development of esophageal squamous cell carcinoma and offer a new idea for the treatment and prognosis evaluation of esophageal squamous cell carcinoma. **Methods:** Through collecting 40 cases of surgical specimens which were diagnosed as esophageal squamous cell carcinoma and its corresponding para-cancerous tissues in NSMC's affiliated hospital from 2016 to 2017 and downloading GEO sequencing data from the NCBI database, the expression of NFE2L1 will be analyzed from quantitative PCR, immunohistochemistry and bioinformatics analysis. **Results:** NFE2L1 expression was positive in 31 esophageal cancer tissues(77.5%) and 17 paracancerous tissues (42.5%), the remarkable difference between the two groups was statistically significant ($P<0.001$). This article revealed further that NFE2L1's positive expression was correlated with the degree differentiation of Tumor Cell and the transfer of lymphatic metastasis ($P<0.05$). However, there was no statistic significance in different age, gender, depth of infiltration and different parts. GEO analysis showed that NFE2L1 was highly expressed in esophageal squamous cell carcinoma ($P<0.01$), but it did not reach the threshold criterion of significant difference (i.e. the change multiple was less than 2 times). **Conclusions:** NFE2L1 is highly-expressed in esophageal squamous cell carcinoma and its expression is closely related to the occurrence and development of esophageal cancer.

Key words: Transcription factor NFE2L1; Esophageal Squamous Cell Carcinoma; Immunohistochemistry; Bioinformatics

Chinese Library Classification(CLC): R735.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)19-3706-06

前言

食管鳞状细胞癌又称食管鳞癌,是我国最为常见的消化道恶性肿瘤之一^[1]。食管鳞癌恶性程度极高且预后不良,并呈现明

显的地域分布特点,这提示在食管鳞癌的发生过程中,可能存在遗传易感性和环境因素等差异^[2]。转录因子 NFE2L1 (nuclear factor-erythroid 2 related factor 1)又称为 NRF1,属于 CNC 蛋白家族成员之一,与其同家族的还有 NRF2 和 NRF3。跨膜因子

* 基金项目:四川省科技计划项目(2017JY0130);川北医学院博士启动基金项目(CBY16-QD07);四川省大学生创新创业训练计划项目(201710634002)

作者简介:周琳(1994-),本科,主要研究方向:生物化学与分子生物学,E-mail:1225254243@qq.com

Δ 通讯作者:任勇刚(1986-),博士,讲师,主要研究方向:肿瘤生物学,E-mail:rygqfy@163.com,电话:0817-3352032

(收稿日期:2018-04-11 接受日期:2018-05-09)

NFE2L1 的主要生理学功能是维持机体氧化还原稳态,诱导细胞抗氧化作用基础构成性基因的表达^[3],譬如在氧化应激状态下诱导 NQO1,HO-1,GST 等^[4,5]。已有研究也表明 NFE2L1 在肿瘤发生进程中发挥重要作用,尤其在肝癌组织低表达并证实 NFE2L1 扮演抑癌基因角色^[6],而 NFE2L1 在食管鳞癌的恶变进程中扮演何种角色并无报道^[7],基于此,我们采用组织免疫学、分子生物学、生物信息学方法分析检测食管鳞癌组织 NFE2L1 的表达情况,并分析其与临床病理特征的相关性,探讨 NFE2L1 在食管鳞癌发生发展中的作用,为下一步深入研究 NFE2L1 在食管鳞癌的发病机制提供理论依据和病理基础,为早期预防食管鳞癌病变寻找新的切入点。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集我校附院 2016-2017 年经病理组织学检查诊断食管鳞癌的手术样本 40 例,男 28 例,女 12 例,患者年龄 45-72 岁,发病部位:食管下段 6 例、中段 22 例、上段 12 例;分化程度:低分化 16 例、中高分化 24 例;浸润深度:粘膜下层 12 例,浅肌层 6 例,深肌层 7 例,全层 15 例;淋巴结转移:无 26 例,有 14 例。所有患者均未有放疗与化疗及免疫治疗,切除标本均保存有完整的临床病历资料。本研究涉及伦理部分均已获得川北医学院医学伦理委员会批准。

1.2 标本的采集与处理

40 例标本均在离体 30 min 内取材,分别取自癌灶、癌旁 3 cm 以上。手术标本取下后,用于提取 RNA 的组织立即置入液氮冷冻保存,用于免疫组织化学检测的标本经 4%多聚甲醛固定 24 h,而后进行脱水,包埋,切片处理,切片厚度 3~5 μm ,组织切片分别用于 HE 染色和免疫组织化学染色。

1.3 免疫组化学法检测

NFE2L1 mAb 为 CST 公司产品(#8052)。免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,免疫组织化学染色采用两步法,操作步骤严格按照说明书进行。石蜡组织切片经常规脱蜡和水化,加 3%过氧化氢 50 μL ,常温下孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次,洗涤时间 2 min;而后将切片浸于柠檬酸盐缓冲液修复组织抗原 30 min, PBS 洗涤 3 次;再滴加 5% BSA 封闭液,室温封闭 10 min,封闭完成后滴加 1:50 稀释的 NFE2L1 一抗,4℃孵育过夜,一抗孵育完成后用 PBS 洗涤 3 次,每次 2 min;滴加聚合 HRP 标记抗兔 IgG,37℃孵育 30 min, PBS 洗涤

3 次,每次 2 min;最后 DAB 显色,显微镜下控制染色程度,经蒸馏水冲洗,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片保存,以备镜检。实验设计时用 PBS 代替 NFE2L1 一抗作为阴性对照,阳性对照为已知 NFE2L1 蛋白表达阳性的肝癌旁组织切片。

NFE2L1 蛋白作为跨膜核转录因子,主要在胞质中表达,也有在细胞核中定位。根据显微镜视野下阳性细胞在同类细胞中所占比例计分^[8,9]:阳性细胞占同类细胞比例小于 10%计 0 分;阳性细胞占同类细胞比例介于 11%~25%计 1 分;阳性细胞占同类细胞比例介于 26%~50%计 2 分;阳性细胞占同类细胞比例大于 50%计 3 分。根据阳性细胞免疫组化染色强度计分:不染色计 0 分;浅黄色计 1 分;黄色计 2 分;棕黄色计 3 分。阳性细胞占比计分与阳性细胞染色强度计分相加 0~1 分为阴性,2~3 分为+,4~5 分为++,6 分为++(>4 分认为高表达,统计为阳性)。

1.4 实时荧光定量 RT-PCR 检测

利用天根公司组织 RNA 提取试剂盒(DP431)提取组织中的总 RNA,采用 BIO-RAD Real-Time PCR 反应系统,Prime-Script RT reagent Kit with gDNA Eraser(RR047A),SYBR Premix Ex Taq II (Takara,RR820A)以及目的基因特异上下游引物对目的基因片段进行扩增,逆转录 PCR 引物为 Oligo(dT),Real-time PCR 反应中 NFE2L1 和 beta-actin(内参)的引物均由南京金斯瑞生物技术公司合成,具体的引物序列如下:NFE2L1, forward: 5'-GCTGGACACCATCTCTGAATC-3',reverse: 5'-CCT-TCTGCTTCATCTGTCGC-3';beta-actin, forward: 5'-CATGTAC-GTTGCTATCCAGGC-3',reverse:5'-CTCCTTAATGTCACGCA-CGAT-3'。荧光定量 RT-PCR 按说明书操作进行,每样本 3 个复孔,以减少操作误差。

1.5 GEO 数据分析

下载 NCBI GEO 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中的食管鳞癌基因表达谱芯片数据,数据下载时间为 2017 年 7 月,数据集概况如表 1 所示。根据各个平台提供的芯片注释信息将探针转换为基因名称。利用 R^[10](Version3.4.0)软件包 limma 提供的经验贝叶斯方法对基因表达值进行线性建模,进行癌 vs.癌旁差异分析。检验后得到相应的 P.Value 值,使用 Benjamini & Hochberg 方法进行多重检验校正^[11],得到校正后 P 值即 adj.P.Value。差异表达阈值均为 adj.P.Value<0.05 且 $|\log_2\text{FC}|>1$ (即 2 倍变化)。

表 1 食管鳞癌基因表达谱 GEO 数据信息

Table 1 GEO data information of gene expression profiles in esophageal squamous cell carcinoma

	GEO accession	Tumor	Adjacent	Platform
Esophageal	GSE23400	53	53(paried)	Affymetrix Human Genome U133A Array
Cancer	GSE38129	30	30(paried)	Affymetrix Human Genome U133A Array

1.6 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。目标基因在食管鳞癌组织和配对癌旁组织中的相对表达量比较采用配对 t 检验;目标基因在食管鳞癌组织和配对癌旁组织中的阳性表达率采用配对 χ^2 检验分析;目标基因在食管鳞癌组织中表达与临床病

理资料的关系采用 χ^2 检验,所有检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NFE2L1 在食管鳞癌组织和癌旁组织中的表达情况

NFE2L1 蛋白主要表达于胞质,也有定位于细胞核。阳性组织中 NFE2L1 染色为棕褐色,且呈片状分布(图 1),阴性对照组织中未见棕黄色颗粒,少量见浅黄色颗粒。免疫组化方法检测 NFE2L1 在食管鳞癌组织中的表达情况,结果显示肿瘤组

组织中 NFE2L1 阳性表达率为 77.5%(31/40),明显高于配对的癌旁组织中 NFE2L1 的表达情况(17/40, 42.5%),差异具有统计学意义($\chi^2=10.208, P<0.001$,表 2)。

表 2 NFE2L1 在食管鳞癌及癌旁组织中的表达
Table 2 Expression of NFE2L1 in esophageal squamous cell carcinoma and paracancerous tissue

Groups	n	NFE2L1 [n (%)]	
		+	-
Esophageal squamous cell carcinoma	40	31(77.5%) **	9(22.5%)
Paracancerous tissue	40	17(42.5%)	23(57.5%)

注:与癌旁组织比较, **P<0.001。
Note: compared with the paracancerous tissue, **P<0.001.

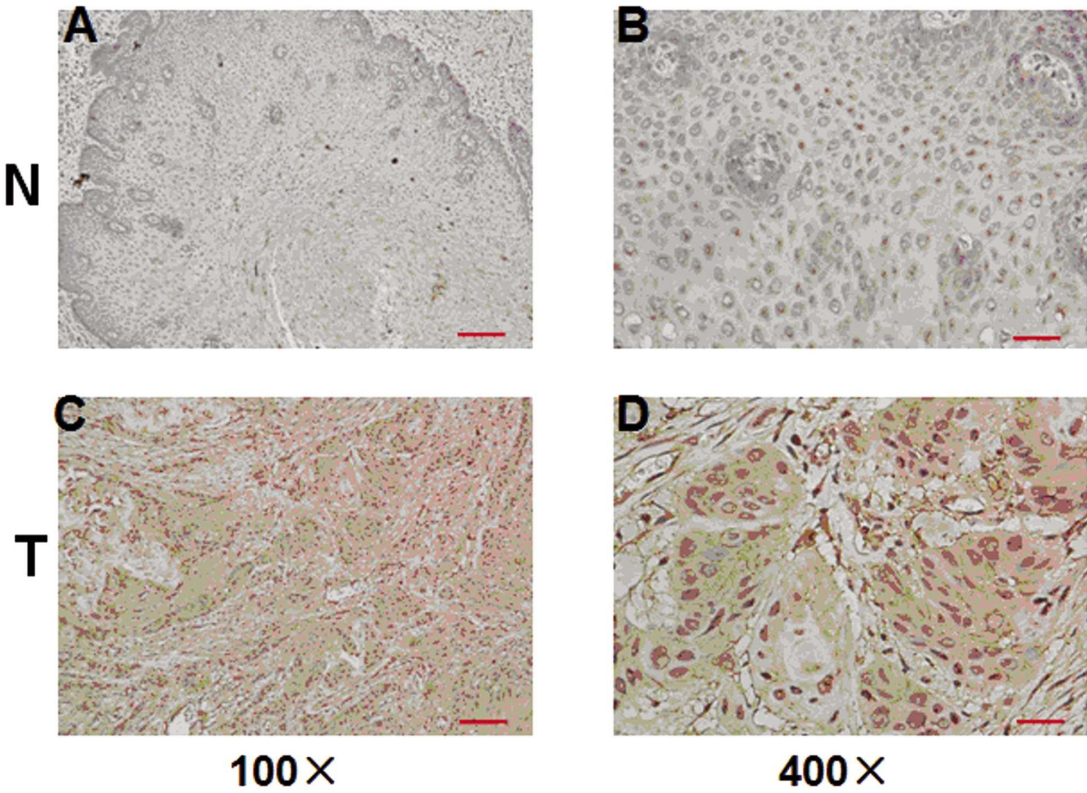


图 1 NFE2L1 在食管鳞癌和癌旁组织中的表达

Fig.1 Expression of NFE2L1 in esophageal squamous cell carcinoma and paracancerous tissue

Note: A, B: Immunohistochemical staining of NFE2L1 in paracancerous tissue; C, D: Immunohistochemical staining of NFE2L1 in cancer tissue.
T: cancer tissue, N: paracancerous tissue.

2.2 NFE2L1 表达与食管鳞癌临床病理因素的关系

Real-time PCR 方法检测 40 例配对的食管鳞癌组织 NFE2L1 mRNA 的表达量。结果显示, 在 34 例肿瘤组织中, NFE2L1 mRNA 表达量明显高于癌旁组织, 而癌旁组织中 NFE2L1 mRNA 表达量高于癌组织的只有 15 例(部分结果见图 2), 差异具有统计学意义($\chi^2=19.012, P<0.001$)。

结合临床病例特征, 我们发现 NFE2L1 的表达情况与肿瘤分化程度, 淋巴结转移密切相关($P<0.05$), 但与患者性别, 年龄, 浸润深度无显著统计学意义($P>0.05$)(见表 3)。

2.3 GEO 数据分析 NFE2L1 在食管鳞癌组织和癌旁组织中的

表达情况

按照方法部分所述, 得到 GSE23400 和 GSE38129 数据中食管鳞癌 NFE2L1 目标基因差异分析结果。在数据集 GSE23400 和 GSE38129 中, NFE2L1 基因均有上调趋势(图 3), 但未达到显著差异表达的阈值标准(变化倍数小于 2 倍)。

3 讨论

食管鳞癌作为高发消化道恶性肿瘤, 对人类健康以及生活质量造成严重影响。随着生活水平的日益提高, 食管鳞癌的发病率也逐年升高, 而对食管鳞癌的发病机制仍知之甚少, 食管

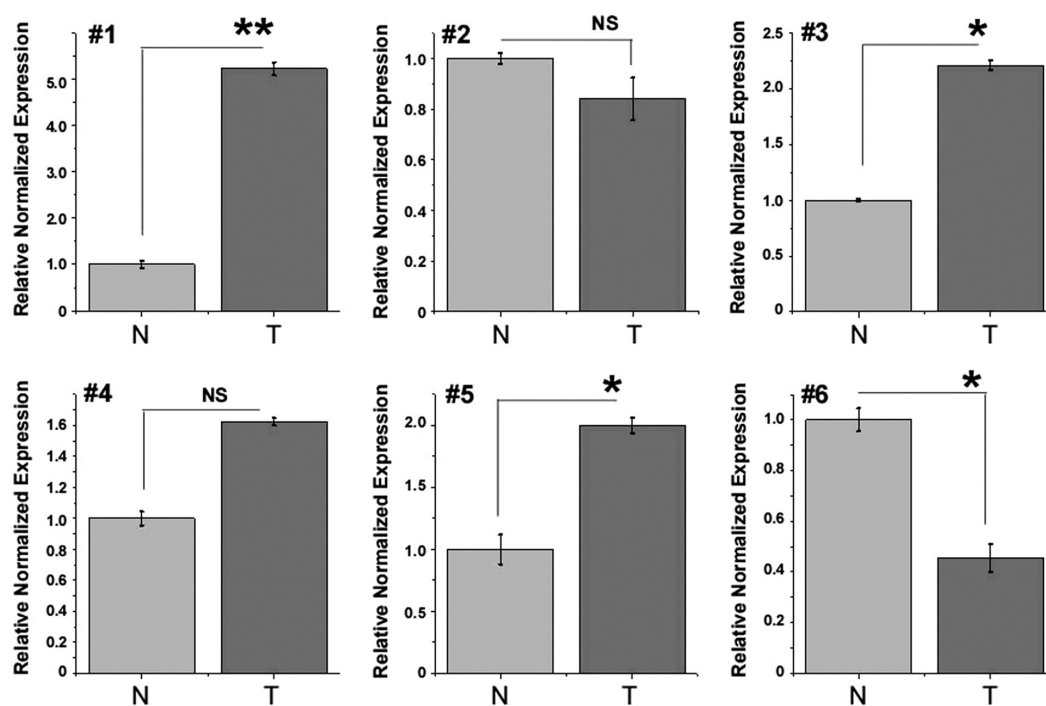


图2 定量PCR检测NFE2L1在食管鳞癌和癌旁组织中的表达

Fig.2 Expression of NFE2L1 in esophageal squamous cell carcinoma and paracancerous tissues was detected by quantitative PCR

Note: compared with the paracancerous tissue in each group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, NS: not significant,

#1-#6: sample number, T: cancer tissue, N: paracancerous tissue.

表3 食管鳞癌组织中NFE2L1的表达与临床病理特征关系

Table 3 Expression of NFE2L1 in esophageal squamous cell carcinoma and its relationship with clinicopathological characteristics

Clinicopathological characteristics	n	NFE2L1		Positive rate	χ^2	P
		Positive	Negative			
Age (year)						
<60	8	6	2	75.0%	0.036	0.849
≥ 60	32	25	7	78.1%		
Gender						
Male	28	22	6	78.6%	0.062	0.804
Female	12	9	3	75.0%		
Lymph node metastasis*						
Yes	14	7	7	50.0%	9.341	0.002
No	26	24	2	92.3%		
Degree of differentiation*						
Poorly differentiated	16	15	1	93.8%	4.308	0.044
Middle and high differentiation	24	16	8	66.7%		
Depth of infiltration						
Submucous layer	12	9	3	75.0%	0.099	0.952
Superficial myometrium	6	5	1	83.3%		
Deep myometrium	7	5	2	71.4%		
The whole layer	15	12	3	80.0%		
Position						
Upper	12	10	2	83.3%	3.072	0.215
Center	22	18	4	81.8%		
Lower	6	3	3	50.0%		

注:癌组织中目标蛋白阳性表达比较,* $P < 0.05$ 。Note: Positive expression of target protein in cancer tissue, * $P < 0.05$.

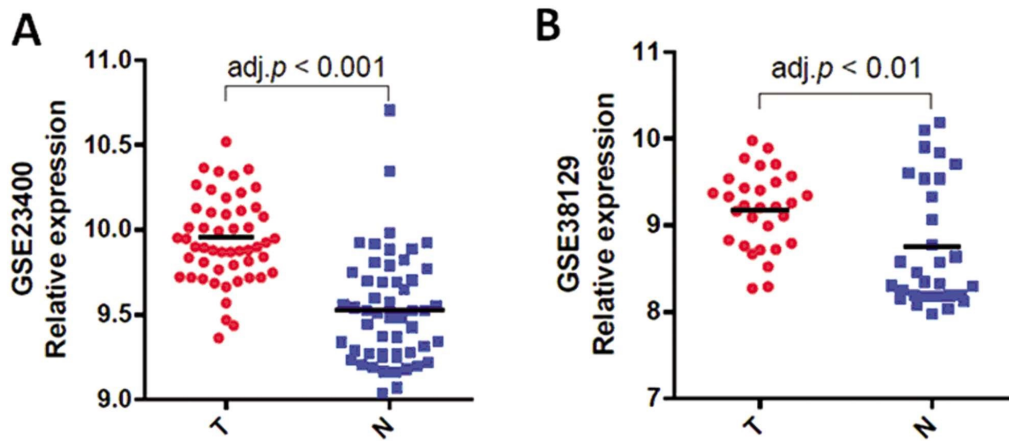


图3 GEO分析 NFE2L1 在食管鳞癌和癌旁组织中的表达

Fig.3 GEO analysis NFE2L1 expression in esophageal squamous cell carcinoma and paracancerous tissue

Note: A: GSE23400 database NFE2L1 expresses scatter plot; B: GSE38129 database NFE2L1 expresses scatter plot.

T: cancer tissue, N: paracancerous tissue.

鳞癌的诊治率却迟迟未见有所改善。理清食管鳞癌发病机制的遗传因素,对于早期预防诊治食管鳞癌具有重要意义。食管鳞癌的发生发展是一个多基因参与,多因素打击积累的过程^[12]。已有研究证实,食管鳞癌的发生不仅与饮食生活习惯密切相关,也与 P53 等抑癌基因的失活和 ras、c-myc 等原癌基因激活有关^[13]。NFE2L1 作为跨膜核转录因子,已证实其在肝癌发生发展进程中发挥抑癌因子功能,这是第一次为 NFE2L1 与肿瘤的相关性提供了直接证据^[6]。此后,随着对 NFE2L1 研究的不断深入,越来越多的证据表明 NFE2L1 与细胞 EMT 的发生转移密切相关。有研究就发现在人源肝癌细胞系中通过下调 NFE2L1 表达可以调节 EMT 发生进而促进肝癌细胞转移增殖^[14]。然而 NFE2L1 在食管鳞癌发展过程中的作用到目前为止尚不明确。本研究通过免疫组化、定量 PCR 和生物信息等方法检测 NFE2L1 在食管鳞癌组织中的表达,并分析其与患者临床病理学特征的相关性,探讨转录因子 NFE2L1 在食管鳞癌发生发展中的作用,为下一步深入研究 NFE2L1 在食管鳞癌的发病机制提供理论基础。

转录因子 NFE2L1 也称为 NRF1,属于碱性亮氨酸拉链家族成员,定位于染色体 17q21.32,编码 772 个氨基酸,蛋白分子量约 120 kDa^[15]。NFE2L1 作为高度保守的调节性转录因子,主要参与维持细胞稳态和生命系统的生理完整性。当出现多种应力刺激(如氧化剂、外源性药物)和病理生理刺激(如炎症、老化)时,机体氧化还原稳态失衡,诱导激活碱性亮氨酸拉链家族(bZIP)成员,进而调节抗氧化相关基因(如 NQO1 等)表达^[16,17]。通常,bZIP 蛋白与异源小 Maf 蛋白结合组成二聚体,进一步通过抗氧化应激元件(ARE)和/或亲电反应元件(EpRE)结合于靶基因启动子序列,调节表达抗氧化蛋白、解毒酶、代谢酶和 26S 蛋白酶体亚基等^[18-20]。除此之外,NFE2L1 在调节胚胎发育和组织生理稳态上也扮演着重要角色,Chan JY 等证明当 NFE2L1 全基因敲除后小鼠死亡于胚胎期^[21],而 Xu 等证明成年小鼠肝细胞内 NFE2L1 条件敲除后形成脂肪肝并恶变为肝癌^[22]。进一步研究证实,相对于高分化肝癌组织,低分化肝癌组织 NFE2L1 显著低表达,并扮演抑癌基因角色,这可能是通过

促进细胞 EMT 转化,参与肿瘤的发生和进展。

Ren^[6]等的研究结果显示 NFE2L1 在肝癌细胞系的表达明显低于肝正常细胞的表达,但在食管鳞癌组织中的表达尚不清楚。本研究通过对多例食管鳞癌组织 NFE2L1 表达量的实时定量 RT-PCR 和免疫组化检测,发现 NFE2L1 在食管鳞癌组织中表达明显高于癌旁组织中的表达。结合 NFE2L1 缺失促进细胞 EMT 进程,我们推测 NFE2L1 的差异表达与食管鳞癌的发生发展存在相关性。值得注意的是,EMT 的重新编程被认为是胚胎形成所必需的基础。这也正好吻合全基因敲除 NFE2L1 的小鼠死亡于胚胎发育期。明显的,EMT 转化发生在胚胎发育和细胞癌变转移的十字路口。这可能促使食管鳞癌细胞在肿瘤发展初期接受 EMT 转化获得离开原发肿瘤的能力,侵入周围组织并扩散到机体内,从而导致对机体的损伤^[23]。同时,NFE2L1 作为一种细胞核内转录因子,调节激活基因表达的主要方式是能够结合至特殊的 DNA 序列(如 ARE 的 5'-TGACGC-3'),进而通过细胞核中转录依赖的活性调节细胞增殖、迁移、凋亡及血管生成有关的基因,如 Bcl2、PCNA、CCND1 等^[18]。这提示 NFE2L1 参与了食管鳞癌的发生进展。

食管鳞癌的发生一般经历单纯性增生、非典型增生、原位癌和浸润性癌的病理变化过程,但 NFE2L1 基因在上述不同阶段的调节作用仍未知。已有研究发现肝细胞癌中 NFE2L1 的表达与细胞增殖分化有关。本次实验结果发现,NFE2L1 参与食管鳞癌的发生和发展,对食管鳞癌的形成可能具有促进作用。结合临床病理资料进一步发现,NFE2L1 的表达随着食管鳞癌分化程度、淋巴结转移度的加重而增强(见表 3),提示 NFE2L1 的改变会伴随食管鳞癌的发展而呈现明显上调趋势。但在实时荧光定量 RT-PCR 检测中,食管鳞癌中 NFE2L1 的阳性表达率与免疫组化结果存在一定差异,这可能是在 RNA 合成和蛋白翻译过程中存在差异调节机制,也可能是不同遗传背景因素造成的差异表达。结合临床病理资料进一步发现,NFE2L1 的表达与年龄、性别、肿瘤浸润深度均无明显统计学意义(见表 3)。生物信息分析也更进一步支持前期实验结论。总结上述资料可以看出,NFE2L1 表达在食管鳞癌组织中随着癌变进程而增强。

这初步证明了 NFE2L1 高表达是食管鳞癌预后不良的分子指标之一。

食管鳞癌早期筛查诊断的金标准仍然是内镜活组织检测和病理组织学检测,应用此方法能够鉴别出 2%~5% 的早期食管鳞癌患者和 15%~20% 的无症状癌前病变患者。选择方便可靠的材料检测 NFE2L1 的变化,对于食管鳞癌及其他癌症的早期诊断都是十分重要的^[24]。虽然组织中 NFE2L1 的表达与肿瘤的发生发展相关,但其作为肿瘤早期诊断筛查的方法,存在取材不易和创伤较大的问题。因此,寻找与 NFE2L1 相关的 microRNA 进行实时荧光定量 RT-PCR 检测,因其稳定性好、灵敏度高,将为食管鳞癌和其他肿瘤的检测带来新的希望。同时,我们还会进行预后随访,以确定食管鳞癌患者的 5 年生存率与临床病理的关系。

总之,NFE2L1 是一潜在的肿瘤相关基因,可能与食管鳞癌等肿瘤发生发展密切相关,但其具体机制尚不清楚,尚需进一步研究明确其功能,该分子有望作为诊断食管鳞癌的分子标志物和治疗靶标。我们下一步将构建 NFE2L1 基因靶向敲除/敲入的 Cas9 质粒并结合慢病毒载体,转染食管鳞癌细胞系,获得敲除/高表达 NFE2L1 基因的细胞系,并在此基因工程细胞系上研究其对食管鳞癌细胞增殖、侵袭、转移等行为的影响,并明确 NFE2L1 在食管鳞癌增殖迁移中的分子调节机制。

参考文献(References)

- [1] Meves V, Behrens A, Pohl J. Diagnostics and early diagnosis of esophageal cancer[J]. *Viszeralmedizin*, 2015, 31(5): 315-318
- [2] Wanqing Chen, Rongshou Zheng, Peter D Baade, et al. Cancer Statistics in China 2015[J]. *CA CANCER J CLIN*, 2016, 66(2): 115-32
- [3] Gasiorek JJ, Blank V. Regulation and function of the NFE2 transcription factor in hematopoietic and non-hematopoietic cells[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72: 2323-2335
- [4] Tsujita T, Peirce V, Baird L, et al. Transcription factor Nrf1 negatively regulates the cystine/glutamate transporter and lipid-metabolizing enzymes[J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34: 3800-3816
- [5] Zheng H, Fu J, Xue P, et al. CNC-bZIP protein Nrf1-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22(10): 819-831
- [6] Ren Y, Qiu L, Zhang Y, et al. TALENs-directed knockout of the full-length transcription factor Nrf1 α that represses malignant behaviour of human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23775
- [7] Sykietis GP, Bohmann D. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease[J]. *Sci Signal*, 2010, 3(112): re3
- [8] 王颖,江波,应伟,等.VEGF-A 在食管鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J].*现代生物医学进展*, 2016, 16(15): 2956-2958
Wang Ying, Jiang Bo, Ying Wei, et al. Expression and Clinical Significance of VEGF-A in Esophageal Squamous Cell Carcinoma [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16(15): 2956-2958
- [9] 毛景涛,叶尔买克·唐沙哈尔,沈辉,等.Nrf2 在食管鳞癌组织中的表达及意义[J].*细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(11): 1231-1233
Mao Jing-tao, Ermek·Tangsakar, Shen Hui, et al. Expression and clinical significance of Nrf2 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2011, 27(11): 1231-1233
- [10] Smyth GK. Limma: linear models for microarray data, in *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor* [J]. Springer, 2005, 1: 397-420
- [11] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139-140
- [12] Kim T, Grobmyer SR, Smith R, et al. Esophageal cancer-the five year survivors[J]. *J Surg Oncol*, 2011, 103(2): 179-183
- [13] Zhang T, Li H, Zhang Y, et al. Expression of proteins associated with epithelial-mesenchymal transition in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3): 3042-3048
- [14] Roussos ET, Keckesova Z, Haley JD, et al. AACR special conference on epithelial-mesenchymal transition and cancer progression and treatment[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(19): 7360-7364
- [15] Hirotsu Y, Higashi C, Fukutomi T, et al. Transcription factor NF-E2-related factor 1 impairs glucose metabolism in mice[J]. *Genes Cells*, 2014, 19(8): 650-665
- [16] Ohtsuiji M, Katsuoka F, Kobayashi A, et al. Nrf1 and Nrf2 play distinct roles in activation of antioxidant response element-dependent genes[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(48): 33554-33562
- [17] Lee CS, Lee C, Hu T, et al. Loss of nuclear factor E2-related factor 1 in the brain leads to dysregulation of proteasome gene expression and neurodegeneration [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(20): 8408-8413
- [18] Zhang Y, Li S, Xiang Y, et al. The selective post-translational processing of transcription factor Nrf1 yields distinct isoforms that dictate its ability to differentially regulate gene expression [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12983
- [19] Radhakrishnan SK, den Besten W, Deshaies RJ. p97-dependent retrotranslocation and proteolytic processing govern formation of active Nrf1 upon proteasome inhibition[J]. *Elife*, 2014, 3: e01856
- [20] Zhao R, Hou Y, Zhang Q, et al. Cross-Regulations among NRFs and KEAP1 and Effects of their Silencing on Arsenic-Induced Antioxidant Response and Cytotoxicity in Human Keratinocytes[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2012, 120: 583-589
- [21] Chan JY, Kwong M, Lu R, et al. Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor, Nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice[J]. *EMBO J*, 1998, 17(6): 1779-1787
- [22] Xu ZR, Chen LY, Leung L, et al. Liver-specific inactivation of the Nrf1 gene in adult mouse leads to nonalcoholic steatohepatitis and hepatic neoplasia [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102: 4120-4125
- [23] De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(2): 97-110
- [24] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(30): 10513-10518