

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.16.005
文章编号: 1005-8982 (2018) 16-0022-07

宫颈癌细胞系中 HPV 感染与 GRP78、JNK 及 CHOP 表达的相关性分析 *

刘卿¹, 郭兵¹, 秦娟²

(1. 贵州医科大学 病理生理学教研室, 贵州 贵阳 550004 ;
2. 贵州省贵阳市妇幼保健院, 贵州 贵阳 550003)

摘要: 目的 探讨宫颈癌细胞系中 HPV (HPV) 感染状态与内质网应激相关蛋白表达之间的相关性。**方法** 采用免疫组织化学法、Western blot、逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 分别检测 GRP78、JNK 及 CHOP 蛋白和 mRNA 在 HPV16 (+) Siha、HPV18 (+) HeLa 及 HPV (-) C33a 3 种宫颈癌细胞系中的表达水平, 并采用统计学分析其表达的差异性。**结果** 免疫组织化学法结果显示, GRP78 蛋白在高危型 HPV16 (+) Siha 和 HPV18 (+) HeLa 的表达高于 HPV (-) C33a ($P < 0.05$), 内质网应激相关蛋白 JNK、CHOP 在 HPV16 (+) Siha 和 HPV18 (+) HeLa 的表达高于 HPV (-) C33a ($P < 0.05$)。RT-PCR 及 Western blot 结果显示, GRP78、JNK 及 CHOP mRNA 及蛋白表达在 HPV16 (+) Siha 和 HPV18 (+) HeLa 细胞株中高于 HPV (-) C33a 细胞株 ($P < 0.05$)。**结论** 宫颈癌中 GRP78 和内质网应激相关蛋白 JNK、CHOP 的表达与 HPV 亚型相关, 内质网应激相关蛋白可能参与了宫颈癌的发生与发展。

关键词: 宫颈癌; 人乳头瘤病毒; 内质网应激蛋白

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Correlations of HPV infection with GRP78, JNK and CHOP expressions in cervical cancer cell lines*

Qing Liu¹, Bing Guo¹, Juan Qin²

(1. Department of Pathophysiology, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China;
2. Guiyang Maternal and Child Health Care Hospital, Guiyang, Guizhou 550003, China)

Abstract: Objective To investigate the correlations of HPV infection with the expressions of endoplasmic reticulum stress related proteins in cervical cancer cell lines. **Methods** Immunocytochemistry, Western blot and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were employed to detect the protein and mRNA expression levels of glucose-regulated protein 78 (GRP78), C-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) in HPV16-positive SiHa, HPV18-positive HeLa and HPV-negative C33a cervical cancer cell lines. Statistical methods were applied to analyze the statistical differences of their expressions. **Results** The results of immunocytochemistry showed that GRP78 protein levels of high-risk HPV16-positive SiHa and HPV18-positive HeLa cells were significantly higher than that of HPV-negative C33a ($P < 0.05$), and endoplasmic reticulum stress related proteins JNK and CHOP also had notably higher expressions in high-risk HPV16-positive SiHa and HPV18-positive HeLa cells than in the HPV-negative C33a cells ($P < 0.05$). RT-PCR and Western blot results showed that the mRNA levels of GRP78, JNK and CHOP in HPV16-positive SiHa cells and HPV18-positive

收稿日期: 2017-08-30

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: NS2015-36)

[通信作者] 郭兵, E-mail: qiling2199@163.com

Hela cells were significantly higher than those in HPV-negative C33a cells ($P < 0.05$). **Conclusions** HPV subtypes are strongly associated with the expressions of GRP78 and endoplasmic reticulum stress related proteins JNK and CHOP, and endoplasmic reticulum stress related proteins may be involved in the occurrence and development of cervical cancer.

Keywords: cervical cancer; human papilloma virus (HPV); endoplasmic reticulum stress related proteins

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤, 发病率在女性恶性肿瘤中位居第 2 位^[1]。高危型人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV) 感染已被证实是导致宫颈病变和宫颈癌的首要因素^[2]。高危型 HPV 目前有 15 种, 如 HPV16、18、31、33 和 35 等, 主要引起宫颈癌等恶性肿瘤^[2]。葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78), 亦称免疫球蛋白重链结合蛋白 (Bip), 系内质网上的一种应激蛋白, 其参与蛋白质的修饰、折叠及转运^[3]。近期研究发现, GRP78 与肿瘤的发生发展密切相关, 其在神经胶质母细胞瘤、肺癌、食管癌、肝癌及胰腺癌等多种恶性肿瘤中都显示高表达^[4-6]。GRP78 和增强子结合蛋白同源蛋白(enhancer-binding protein homologous protein, CHOP) 是 ERS 的 2 个经典标志物^[7]。C-Jun 氨基末端激酶 (C-Jun NH2-terminal kinase, JNK) 是一类丝裂原活化蛋白激酶蛋白 (mitogen-activated protein kinase, MAPK), JNK 信号通路可被细胞因子、应激等多种因素激活, 其参与细胞的增殖与分化、形态维持、骨架构建、细胞凋亡及恶变^[8]。近来有研究表明, 内质网应激蛋白参与了肿瘤和炎症疾病的发生与发展, 其他内质网应激蛋白 CHOP、JNK 也有表达增高^[9-12]。

本实验选取 HPV 阳性的 2 个细胞系 Hela (HPV18 型) 和 Siha (HPV16 型) 以及 HPV 阴性的细胞系 C33A, 探讨不同 HPV 感染状态与内质网应激蛋白 GRP78、JNK 及 CHOP 表达之间的关系, 为进一步分析 HPV 感染诱导宫颈癌的内在分子机制提供一定的实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞来源 人宫颈癌细胞株 3 种: HPV18 (+) Hela、HPV16 (+) Siha 及 HPV (-) C33a (购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基、胰酶、胎牛血清 (美国 Gibco 公司), 一抗: JNK (兔抗人源)、GRP78 (兔抗人); CHOP (兔抗人)、内参一抗 F-actin (兔来源) (英国 Abcam 公司), 二抗: 羊抗兔 IgG (美国 Sigma 公司),

逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司), ELIVISION™ 试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司)、Trizol (美国 Invitrogen 公司)。

1.2 主要方法

1.2.1 细胞复苏、培养、传代及冷冻 Siha 细胞系为 HPV16 型 (HPV16+) 宫颈腺癌细胞系, Hela 细胞系为 HPV18 型 (HPV18+) 宫颈鳞癌细胞系, C33a 为 HPV 阴性 (HPV-) 的宫颈鳞癌细胞系。细胞复苏遵守快融的原则, 先将水浴锅调至 37℃, 从液氮罐里拿出冻存管迅速放入 37℃ 水浴箱中, 使其迅速融化, 用吸管吸出细胞悬液, 注入离心管并加入 4 ml 的完全培养液, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入适量的培养液吹打, 使其形成悬浮液。Siha 细胞、Hela 细胞、C33a 细胞培养条件均一致: 将细培养于含 10% 优质胎牛血清和 1% 青霉素 - 链霉素双抗的 DMEM 培养基中, 24 ~ 48 h 换液 1 次, 于 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。细胞融合度达至 90% 左右时, 在超净工作台上操作, 弃除旧培养基, 用 PBS 洗 3 次, 25 cm 培养瓶加入胰酶消化液约 0.5 ~ 1.0 ml, 置 37℃ 培养箱约 1.5 min, 轻轻振动瓶底使细胞全部脱落, 加入完全培养基 3 ml, 轻轻吹打成细胞悬液, 收集至离心管中离心弃上清液, 再加入完全培养液吹打成细胞悬液, 按照 1 : 2 的比例传代至培养瓶内, 置 37℃ 培养箱。细胞冻存时遵守慢冻的原则, 选择对数期生长的细胞, 最好是已经传代培养 4、5 代后的细胞。离心, 去上清液留细胞沉淀, 加入冻存液 (10% 的 DMSO+90% 胎牛血清) 后吹打混匀, 以每管 1 ml 分装到细胞冷冻保存管中。

1.2.2 细胞免疫组织化学法 取 3 个宫颈癌细胞系的细胞爬片各 1 张, 1 × PBS 洗 3 次, 2 ~ 3 min; 4% 多聚甲醛固定 15 min (1 滴), 空气干燥 5 min; 然后浸泡于 0.5% Triton X-100 中使细胞膜破裂, 1 × PBS 洗 3 次, 各 2 ~ 3 min; 3% 过氧化氢 H₂O₂ 1 滴浸润玻片 20 min, 1 × PBS 洗 3 次, 2 ~ 3 min; 滴入 BSA (封闭血清) 1 滴, 36℃ 温箱孵育 20 min, 滴加一抗 (JNK 抗体、GRP78 抗体、CHOP 抗体, 稀释倍数 1 : 100) 50 μl/ 孔板, 置于湿盒内, 4℃ 过夜。1 × PBS 洗 3 次,

各 5 min。二抗工作液孵育(湿盒) 37℃ 30 min。PBS 清洗标本 3 次, 各 5 min。C 液(湿盒) 37℃ 30 min。PBS 清洗标本 3 次, 各 5 min。操作完成后使用 DAB 显色液显色, 用蒸馏水冲洗玻片以终止反应, 然后使用苏木苏复染以使细胞核着色, 蒸馏水冲洗以及 PBS 冲洗玻片返蓝, 最后用中性树脂封片, 然后置于显微镜下观察, 拍照记录实验结果。以 PBS 代替 JNK 抗体、GRP78 抗体、CHOP 抗体作为对照, 细胞核及细胞质呈黄色为阳性表达。显微镜下进行观察拍照, 使用 IPP6.0 软件进行计数。阳性细胞百分比 = 阳性细胞数 / 细胞总数 × 100%, 阳性细胞百分比评分判定标准: 1 分: 阳性染色细胞数 ≤ 25%; 2 分: 阳性染色细胞数占 25% ~ 49%; 3 分: 阳性细胞数 ≥ 50%。染色强度评分: 0 分 - 无染色, 1 分 - 淡黄色, 2 分 - 黄色, 3 分 - 棕黄色。随机选取 5 个视野的平均得分作为切片的最终评分, 最终组织判断评分 = 阳性细胞百分比评分 × 染色强度评分。根据最终组织判断评分分为 4 个等级: 0 ~ 1 分为阴性(-), 2 ~ 3 分为弱阳性(+), 4 ~ 6 分为阳性(++), 7 ~ 9 分为强阳性(+++)。

1.2.3 Western blot 从 6 孔版中收集细胞, 加入细胞裂解液裂解将提取的蛋白质用 BCA 蛋白定量试剂盒定量后分装保存(-80℃); 12% 的 SDS-PAGE 电泳(5 μg 上样量)蛋白样品分离后转移至 PVDF 膜; 封闭, 杂交[用 blocking buffer 将目的抗体稀释至适当的浓度, 一抗(稀释浓度 1 : 500, 内参一抗的稀释浓度为 1 : 1 000), TBST 漂洗(3 次 × 5 min)]; 用封闭液将二抗稀释成一定浓度(1 : 1 000), TBS-T 漂洗(4 次 × 5 min); ECL 显色, 曝光液按 A 液 : B 液 1 : 1 混匀后均匀覆盖在整片膜上, 反应 2 min 放入曝光仪曝光检测。以 β-actin 蛋白为内对照, 用 ImageJ 软件分析 GRP78、JNK 及 CHOP 蛋白条带与 β-actin 蛋白条带像素灰度。

1.2.4 RNA 的提取 将 1 ml Trizol 加到 6 孔板中裂解细胞, 放置 5 min, 加入 0.2 ml 氯仿, 混匀后室温静置 3 min。10 000 r/min 离心 10 min。取上清, 加入等体积的异丙醇, 静置 10 min。10 000 r/min 离心 10 min。弃上清, 加入 1 ml 75% 乙醇 / 管。7 500 r/min 离心 5 min。弃上清, 用适量 DEPC 水溶解沉淀。使用紫外分光光度计(Nano Drop1000)测定 RNA 的浓度和纯度。

1.2.5 RT-PCR ①按照 TaKaRa 公司逆转录试剂盒说明书配制总体积 20 μl 的逆转录反应体系(2 × RT

buffer 10 μl, 6N 随机引物(100 pmol/ul) 1 μl, RT-mix 1 μl, 模板(RNA) 5 μl, DEPC 水 3 μl); ②逆转录反应条件的设置: 25℃ 10 min, 42℃ 50 min, 85℃ 5 min; 各组 RNA 逆转录为 cDNA; ③根据 PCR 反应系统的组成和要求, 设计 20 μl 的反应体系(2 × PCR premix Taq) 10 μl, Primers F(10 μmol/ul) 1 μl, Primers R(10 μmol/ul) 1 μl, 模板*(cDNA) 2 μl, DEPC 水 6 μl(引物序列见表 1); ④ PCR 反应条件: 94℃ 3 min, 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s(循环 28 次), 72℃ 5 min 在 PCR 扩增仪上进行扩增。将 15 μl PCR 产物置于 1.2% 琼脂糖凝胶(内含 0.5 μg/ml 溴化乙啶 Ethidium Bromide, EB)电泳分离后于凝胶成像仪中进行图像处理, 观察各组目的基因的表达情况并将各电泳条带做灰度分析定量分析实验结果。

表 1 引物序列及扩增片段长度

基因	引物序列	片段长度 /bp
GRP78	正向: GTCCTATGTCGCCTTCACTCC	137
	反向: GCACAGACGGGTCATTCCAC	
JNK	正向: GCTGGAATTATTCATCGGGAC	159
	反向: GATGACCTCGGGTGCTCTG	
CHOP	正向: AACCAGGAAACGAAACAGAG	192
	反向: TTCACCATTCGGTCAATCAGA	

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间两两比较时先进行单因素方差齐性检验, 方差齐性时采用 Tukey HSD 法; 方差不齐时采用非参数检验中的两独立样本秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

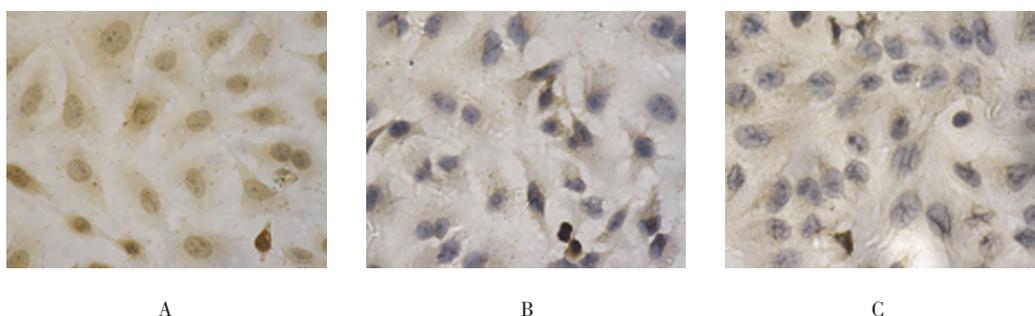
2.1 GRP78、JNK 及 CHOP 蛋白的免疫组织化学检测结果

免疫组织化学染色结果可见: Siha 细胞呈多角形, GRP78 在细胞浆和细胞核染色均出现棕黄色颗粒(见图 1A), 免疫组织化学评分为(8.400 0 ± 1.341 6)分; Hela 细胞形态与 Siha 类似, 细胞胞浆染色主要为黄色, 较 Siha 细胞稍弱(见图 1B), 免疫组织化学评分为(5.200 0 ± 1.095 5)分; C33a 细胞较小, 外形呈圆形且细胞核较大, GRP78 在 C33a 细胞中的染色主要为淡黄色, 胞核染色主要为淡黄色(见图 1C, 1D), 免疫组织化学评分为(2.200 0 ± 0.836 7)分。

免疫组织化学染色结果可见: Siha 细胞也呈现多角形, JNK 在细胞浆和细胞核内染色, 均出现棕黄色颗粒(见图 2A), 免疫组织化学评分为 (7.8000 ± 1.6432) 分; HeLa 细胞形态与 Siha 类似, 胞浆染色较深, 胞核的染色较 Siha 细胞稍弱(见图 2B), 免疫组织化学评分为 (4.8000 ± 1.0955) 分; C33A 细胞较小, 外形呈圆形且细胞核较大, JNK 在 C33A 细胞中细胞浆和胞核染色均较弱(见图 2C), 免疫组织化学评分为 (1.8000 ± 0.8367) 分。免疫组织化学染色结果可见: HeLa 细胞呈现多角形, CHOP 在细胞浆和细胞核内染色, 均出现棕黄色颗粒, 免疫组织化学评分为 (7.2000 ± 1.6432) 分; HeLa 细胞形态与 Siha 类似,

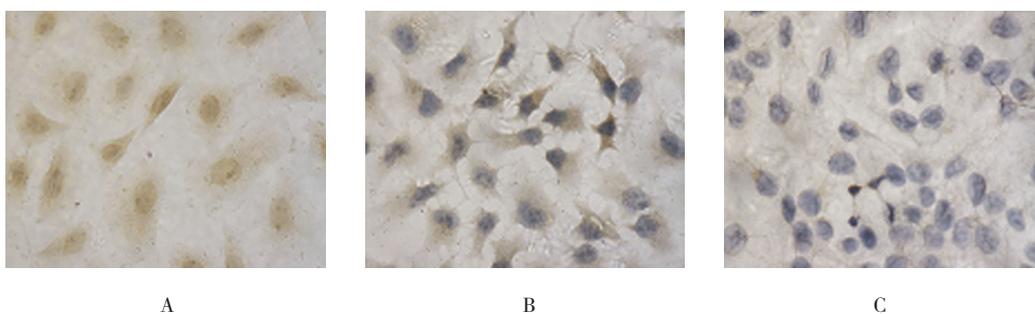
CHOP 在 HeLa 细胞系中的染色与 Siha 细胞的染色结果类似, 胞浆染色较深, 但胞核的染色较 Siha 细胞稍弱, 免疫组织化学评分为 (4.2000 ± 1.0955) 分; C33A 细胞较小, 外形呈圆形且细胞核较大, CHOP 在 C33A 细胞中的染色极弱, 细胞浆染色较弱(见图 3), 免疫组织化学评分为 (1.4000 ± 0.5099) 分。

GRP78、JNK 及 CHOP 在 3 种细胞的免疫组织化学评分方差齐性 ($F=38.973$ 、 29.348 和 24.269 , 均 $P=0.000$), Tukey HSD 检验结果表明 GRP78 蛋白表达在 HPV16 (+) Siha 中高于 HPV18 (+) HeLa、HPV (-) C33a, 在 HPV (-) C33a 细胞中 GRP78 表达极低; 同时内质网应激相关蛋白 JNK 和 CHOP 蛋白在宫颈癌细



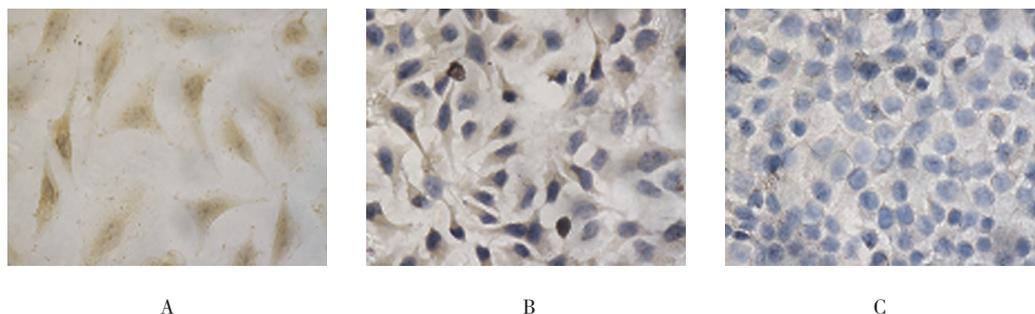
A: HPV16 (+) Siha; B: HPV18 (+) HeLa; C: HPV (-) C33a

图 1 GRP78 在 3 种细胞株中的表达 ($\times 400$)



A: HPV16 (+) Siha; B: HPV18 (+) HeLa; C: HPV (-) C33a

图 2 JNK 在 3 种细胞株中的表达 ($\times 400$)



A: HPV16 (+) Siha; B: HPV18 (+) HeLa; C: HPV (-) C33a

图 3 CHOP 在 3 种细胞株中的表达 ($\times 400$)

胞 HPV16 (+) 的 Siha 表达也高于 HPV18 (+) HeLa、HPV (-) C33a, 见表 2~4。

2.2 宫颈癌细胞中 GRP78、JNK 及 CHOP 蛋白的 Western bolt 检测结果

从图 4 和表 5 可知, GRP78 蛋白在 HPV16 (+)

Siha、HPV18 (+) HeLa 表达强于 HPV (-) C33a ($P < 0.05$), JNK 和 CHOP 在 HPV (+) 的 2 个宫颈癌细胞系 HeLa 和 Siha 中表达强于 HPV (-) 的宫颈癌细胞 C33A ($P < 0.05$)。从图 4 灰度分析直方图中可以更直观地看出以上结果 (灰度分析的数值为每个条带的灰度值

表 2 GRP78 在 3 种细胞株中表达水平的多重比较

细胞 (I)	细胞 (J)	均值差 (I-J)	S _e	P 值	95%CI	
					下限	上限
HPV16 (+) Siha	HPV18 (+) HeLa	3.200 00	0.702 38	0.002	1.326 2	5.073 8
	HPV (-) C33a	6.200 00	0.702 38	0.000	4.326 2	8.073 8
HPV18 (+) HeLa	HPV16 (+) Siha	-3.200 00	0.702 38	0.002	-5.073 8	-1.326 2
	HPV (-) C33a	3.000 00	0.702 38	0.003	1.126 2	4.873 8
HPV (-) C33a	HPV16 (+) Siha	-6.200 00	0.702 38	0.000	-8.073 8	-4.326 2
	HPV18 (+) HeLa	-3.000 00	0.702 38	0.003	-4.873 8	-1.126 2

表 3 JNK 在 3 种细胞株中表达水平的多重比较

细胞 (I)	细胞 (J)	均值差 (I-J)	S _e	P 值	95%CI	
					下限	上限
HPV16 (+) Siha	HPV18 (+) HeLa	3.000 00	0.783 16	0.006	0.910 6	5.089 4
	HPV (-) C33a	6.000 00	0.783 16	0.000	3.910 6	8.089 4
HPV18 (+) HeLa	HPV16 (+) Siha	-3.000 00	0.783 16	0.006	-5.089 4	-0.910 6
	HPV (-) C33a	3.000 00	0.783 16	0.006	0.910 6	5.089 4
HPV (-) C33a	HPV16 (+) Siha	-6.000 00	0.783 16	0.000	-8.089 4	-3.910 6
	HPV18 (+) HeLa	-3.000 00	0.783 16	0.006	-5.089 4	-0.910 6

表 4 CHOP 在 3 种细胞株中表达水平的多重比较

细胞 (I)	细胞 (J)	均值差 (I-J)	S _e	P 值	95%CI	
					下限	上限
HPV16 (+) Siha	HPV18 (+) HeLa	3.000 00	0.832 67	0.009	0.778 6	5.221 4
	HPV (-) C33a	5.800 00	0.832 67	0.000	3.578 6	8.021 4
HPV18 (+) HeLa	HPV16 (+) Siha	-3.000 00	0.832 67	0.009	-5.221 4	-0.778 6
	HPV (-) C33a	2.800 00	0.832 67	0.014	0.578 6	5.021 4
HPV (-) C33a	HPV16 (+) Siha	-5.800 00	0.832 67	0.000	-8.021 4	-3.578 6
	HPV18 (+) HeLa	-2.800 00	0.832 67	0.014	-5.021 4	-0.578 6

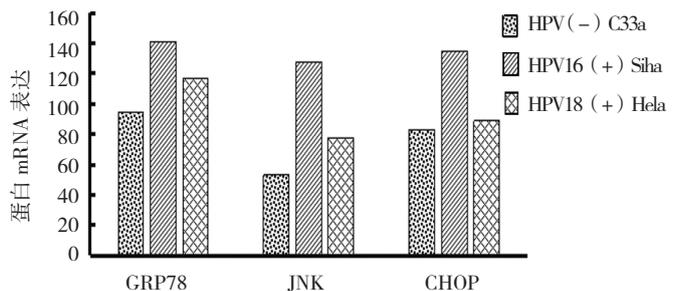
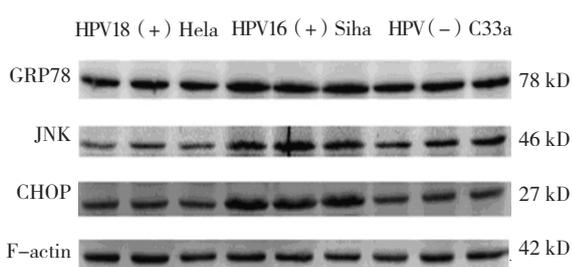


图 4 Western blot 及灰度分析结果

表 5 Western blot 检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CHOP	GRP78	JNK
HPV(-) C33a	73.45 ± 3.27	94.84 ± 1.31	53.35 ± 2.56
HPV16 (+) Siha	134.93 ± 7.85	140.63 ± 10.65	127.82 ± 7.20
HPV18 (+) HeLa	88.74 ± 2.42	116.86 ± 4.11	77.46 ± 4.75

与相应的 β -actin 灰度的比值)。

2.3 不同 HPV 亚型宫颈癌细胞中 JNK、GRP78 及 CHOP mRNA 表达结果

从图 5 和表 6 可知, GRP78 mRNA 在 HPV16 (+) Siha、HPV18 (+) HeLa 表达高于 HPV(-) C33a ($P < 0.05$), JNK 和 CHOP mRNA 表达在 HPV16 (+) Siha、HPV18 (+) HeLa 也高于 HPV(-) C33a ($P < 0.05$)。

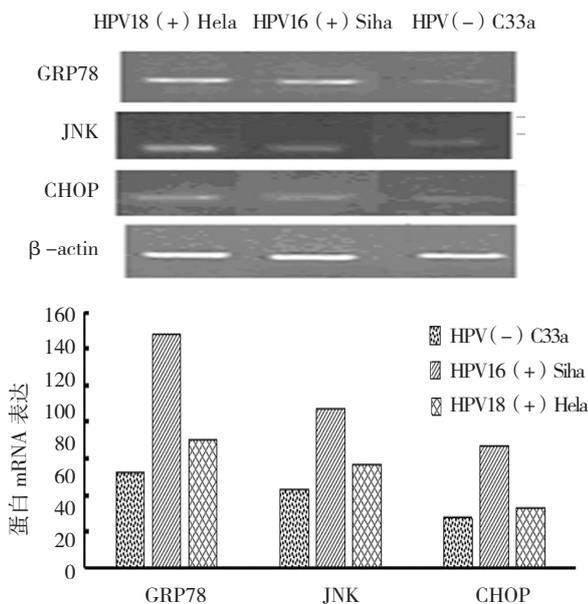


图 5 RT-PCR 及灰度分析结果

表 6 RT-PCR 检测结果

组别	CHOP	GRP78	JNK
HPV(-) C33a	0.166 ± 0.009	0.101 ± 0.008	0.106 ± 0.005
HPV16 (+) Siha	0.348 ± 0.027	0.508 ± 0.051	0.267 ± 0.005
HPV18 (+) HeLa	0.214 ± 0.009	0.265 ± 0.006	0.125 ± 0.006

3 讨论

宫颈癌每年新发病 50 万, 其中 40 万在发展中国家 (80%)^[13]。高危型人乳头瘤病毒 (HPV) 感染已被证实是导致宫颈病变和宫颈癌的首要因素^[13]。HPV

病毒根据病毒致病力大小分为: 低危型和高危型两大类。高危型 HPV 目前有 15 种, 如 HPV16、18、31、33 和 35 等, 主要引起宫颈癌等恶性肿瘤。宫颈癌也是一种炎症疾病, 炎症反应是由感染、组织损伤以及组织内环境的异常变化所激发的一种适应性应答反应。慢性感染可造成机体发生反复的、继发性损伤、修复反应及组织内环境的紊乱, 调控肿瘤的发生和发展。

内质网是真核细胞中一种重要的细胞器, 外界的许多不良刺激会导致细胞内质网稳态失衡, 会出现蛋白质未折叠或者错误折叠, 它们聚集在内质网上, 会损伤内质网的正常生理功能, 该现象即内质网应激 (ERS)。近来有研究表明, 内质网应激与肿瘤发生、发展密切相关, 这主要与内质网应激介导的细胞凋亡有关^[14]。

葡萄糖调节蛋白 78 亦称免疫球蛋白重链结合蛋白 (Bip), 系内质网上的一种应激蛋白, 在内质网应激下 GRP78 表达增高, 通过表达的提高以维持内质网稳定从而保护细胞, 其参与蛋白质的修饰、折叠和转运。在内质网中, GRP78 可促进蛋白质的正确折叠, 维持内质网正常功能。当 ERS 早期, 内质网分子伴侣蛋白 GRP78 表达上调促进错误折叠或者未折叠蛋白的正确折叠、恢复内质网 Ca^{2+} 转运, 有助于增强细胞对损伤的抵抗力, 促进细胞存活。但是, 当持续过强的 ERS 时, GRP78 与内质网跨膜蛋白双链 RNA 依赖的蛋白激酶样内质网激酶解离, 启动 PERK/eIF2 α (真核转录起始因子 2 α) 通路, 活性转录因子 4 (ATF4) 表达增强, ATF4 与增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP) 基因启动子结合后, CHOP 表达增高导致细胞色素 C 释放增加, 启动 Caspase 凋亡级联反应, 最终导致细胞凋亡。此外, GRP78 也与 1 型跨膜蛋白激酶 (RE1) 脱离, IRE1 发生自身磷酸化和二聚化而被激活, 引起凋亡信号因子 C-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 的活化, 最终引起细胞凋亡。

近期研究发现, GRP78 与肿瘤的发生发展密切相关, 其在神经胶质母细胞瘤、肺癌、食管癌、肝癌及胰腺癌等多种恶性肿瘤中都显现高表达。CHOP 系内质网相关促凋亡蛋白和内质网特异性转录因子, 其在哺乳动物细胞中广泛表达。正常情况下, CHOP 少量表达于真核细胞的细胞浆中, 当 ERS 时 CHOP 大量聚集并表达于细胞核中, 通过启动 Caspase 凋亡级联反应, 最终导致细胞凋亡。有研究表明, CHOP 在人脑胶质

瘤中高表达,正常脑组织中低表达^[16]。C-Jun 氨基末端激酶(JNK)系凋亡信号因子,它是一类丝裂原活化蛋白激酶蛋白,JNK 信号通路可被应激等多种因素激活,它参与细胞的增殖与分化、细胞凋亡及恶变。大量实验表明,JNK 信号通路在细胞分化、细胞凋亡、应激反应以及多种人类疾病发生与发展中起至关重要的作用,JNK 信号通路功能失调可造成慢性炎症、肿瘤等多种疾病。有研究报道,JNK 在肿瘤组织中的活性明显高于正常组织,表明 JNK 可能参与肿瘤的形成。综上可知,GRP78、CHOP 及 JNK 的表达与肿瘤的发生与发展有紧密的相关性。

本研究从细胞学领域通过免疫组织化学方法、Western blot 检测内质网应激相关蛋白 GRP78、JNK 及 CHOP 的表达情况,RT-PCR 检测 GRP78、JNK 及 CHOP mRNA 表达,以及差异是否有统计学意义。得出实验结果:GRP78 蛋白在高危型 HPV16(+)、HPV18(+)感染的宫颈细胞中的蛋白含量高于 HPV(-)感染的宫颈细胞,同时内质网应激相关蛋白 JNK、CHOP 在 高危型 HPV16(+) Siha、HPV18(+) Hela 中也有较高表达,进一步证实内质网应激相关蛋白 GRP78、CHOP 及 JNK 与不同 HPV 亚型相关,由此可推理出内质网应激蛋白可能参与宫颈癌的发生与发展。

本文通过细胞实验测定不同 HPV 亚型感染的宫颈癌细胞中 GRP78、CHOP 及 JNK 蛋白的表达,以及差异是否有统计学意义,提供 GRP78、CHOP 及 JNK 与 HPV 感染相关性的实验室依据,结果提示内质网应激可能参与宫颈癌的发生与发展,而且与高危型 HPV 感染相关,并可能广泛参与宫颈癌的病理过程。

参 考 文 献:

- [1] BRIANTI P, DE FLAMMINEIS E, MERCURI S R. Review of HPV-related diseases and cancers[J]. *New Microbiol*, 2017, 40(2): 80-85.
- [2] FRAENKEL P G. Anemia of inflammation: A review[J]. *Med Clin North Am*, 2017, 101(2): 285-296.
- [3] PRASAD M, PAWLAK K J, BURAK W E, et al. Mitochondrial metabolic regulation by GRP78[J]. *Sci Adv*, 2017, 3(2): e1602038.
- [4] LIZARDO M M, MORROW J J, MILLER T E, et al. Upregulation of glucose-regulated protein 78 in metastatic cancer cells is necessary for lung metastasis progression[J]. *Neoplasia*, 2016, 18(11): 699-710.
- [5] TSAI S F, TAO M, HO L, et al. Isochailactone-induced DDIT3 causes ER stress-PERK independent apoptosis in glioblastoma multiforme cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3): 4051-4061.
- [6] YANG H, FAN S, AN Y, et al. Bisdemethoxycurcumin exerts pro-apoptotic effects in human pancreatic adenocarcinoma cells through mitochondrial dysfunction and a GRP78-dependent pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 83641-83656.
- [7] JIAN L, LU Y, LU S, et al. Chemical chaperone 4-phenylbutyric acid reduces cardiac ischemia/reperfusion injury by alleviating endoplasmic reticulum stress and oxidative stress[J]. *Med Sci Monit*, 2016(22): 5218-5227.
- [8] KIM H I, HONG S H, KU J M, et al. Tonggyu-tang, a traditional Korean medicine, suppresses pro-inflammatory cytokine production through inhibition of MAPK and NF-kappaB activation in human mast cells and keratinocytes[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 186.
- [9] WANG G, ZHANG T, SUN W, et al. Arsenic sulfide induces apoptosis and autophagy through the activation of ROS/JNK and suppression of Akt/mTOR signaling pathways in osteosarcoma[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017(106): 24-37.
- [10] HSIEH M J, CHEN J C, YANG W E, et al. Dehydroandrographolide inhibits oral cancer cell migration and invasion through NF-kappa B-, AP-1-, and SP-1-modulated matrix metalloproteinase-2 inhibition[J]. *Biochem Pharmacol*, 2017(130): 10-20.
- [11] ZHU Y, JIANG Y, SHI L, et al. 7-O-Geranylquercetin induces apoptosis in gastric cancer cells via ROS-MAPK mediated mitochondrial signaling pathway activation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017(87): 527-538.
- [12] MAXWELL T, CHUN S Y, LEE K S, et al. The anti-metastatic effects of the phytoestrogen arctigenin on human breast cancer cell lines regardless of the status of ER expression[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(2): 727-735.
- [13] WANG F, TANG Q, LV G, et al. Comparison of computed tomography and magnetic resonance imaging in cervical cancer brachytherapy: A systematic review[J]. *Brachytherapy*, 2017, 16(2): 353-365.
- [14] MAENG H J, SONG J H, KIM G T, et al. Celecoxib-mediated activation of endoplasmic reticulum stress induces de novo ceramide biosynthesis and apoptosis in hepatoma HepG2 cells mobilization[J]. *BMB Rep*, 2017, 50(3): 144-149.
- [15] ONO K, ISE M, IKEBE D, et al. Successful treatment with biweekly CHOP for bone marrow relapse of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm[J]. *Rinsho Ketsueki*, 2017, 58(2): 150-154.
- [16] TUNGKUM W, JUMNONGPRAKHON P, TOCHARUS C, et al. Melatonin suppresses methamphetamine-triggered endoplasmic reticulum stress in C6 cells glioma cell lines[J]. *J Toxicol Sci*, 2017, 42(1): 63-71.

(张西倩 编辑)