

# 内质网应激相关因子 PERK 和 ATF6 在结肠癌中的表达及意义

高 磊<sup>1,2</sup> 冯丹丹<sup>1,2\*</sup> 戴发亮<sup>1,2,3</sup> 董仕桢<sup>1,2,4</sup> 吴玉丹<sup>1,2,4</sup> 轩青霞<sup>1,2</sup> 陈 攀<sup>1,2</sup> 金建军<sup>1,2</sup> 高 强<sup>1,2,5</sup>

**摘要** 目的 探讨内质网应激相关因子蛋白激酶 R 样内质网调节激酶 (PERK) 和活化转录因子 6 (ATF6) 在结直肠癌组织中的表达情况, 分析 PERK 和 ATF6 在结肠癌发生发展中的作用。方法 选择手术切除结肠癌组织及距离病变组织 5 cm 以上正常组织, 采用实时荧光定量 PCR 技术 (RT-PCR) 检测 PERK 和 ATF6 的 mRNA 表达情况, 免疫组织化学法 (IHC)、Western blot 法检测 PERK 和 ATF6 蛋白的表达情况, 并结合临床病理特征, 分析其与结肠癌发生、发展之间的关系。结果 肿瘤组织 ATF6 和 PERK mRNA 表达均较正常组织下调 ( $P < 0.05$ )。IHC 和 Western blot 结果显示 PERK 和 ATF6 在结肠癌中的表达均显著低于正常组织 ( $P < 0.05$ )。PERK 和 ATF6 主要定位于上皮细胞中。结论 PERK 和 ATF6 在结肠癌中的表达水平下降说明缺乏适当的内质网应激反应可能在肿瘤的发生机制中起作用。

**关键词** 蛋白激酶 R 样内质网调节激酶; 活化转录因子 6; 结肠癌; 内质网应激; 未折叠蛋白反应

中图分类号 R 574.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)09-1280-05  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.005

结肠癌是人类最常见的消化道恶性肿瘤之一, 全球每年可导致近 70 万人死亡<sup>[1-2]</sup>。近年来, 随着人们饮食习惯和饮食结构的改变以及人口老龄化, 我国结肠癌的发病率和病死率均呈上升趋势<sup>[3]</sup>。结肠癌的发生是结肠正常上皮细胞在环境因素和遗传等多种因素的作用下经过多个步骤逐步发生发展的过程<sup>[4]</sup>。内质网是细胞内蛋白合成、加工, 以及  $Ca^{2+}$  贮存的主要场所, 由于氧化应激、缺氧和炎症因子等因素引起的内质网功能紊乱、未折叠蛋白或错

误折叠蛋白积聚、 $Ca^{2+}$  平衡失调等状态, 称为内质网应激, 为缓解内质网应激而出现的一系列后续反应称为未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR)<sup>[5]</sup>。UPR 可以调控蛋白合成、减少进入内质网的蛋白, 并降解未折叠或错误折叠的蛋白质, 使细胞恢复正常生理状态, 另一方面内质网应激也可以导致活性氧产生和炎症相关基因表达增加, 当内质网应激过强或时间过长, 则将可诱导细胞凋亡。内质网应激时, 通过 3 个不同的信号通路激活 UPR, 分别为蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R like endoplasmic reticulum kinase, PERK)、活化转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 和通路肌醇需求酶 1 通路<sup>[6]</sup>。

内质网应激状态下导致 PERK 和 ATF6 与 GRP78 解离, 从而激活 PERK 和 ATF6 通路。PERK 通路可以抑制蛋白质的翻译和合成。ATF6 是一个内质网膜结合转录因子, 参与多种细胞功能的调控<sup>[7]</sup>。PERK 和 ATF6 通路均可介导 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 表达, 从而诱导细胞凋亡。说明这两个通路在癌的发生发展中有一定的作用。PERK 和 ATF6 在结肠癌中的功能及作用机制目前尚不明确。该研究主要利用分子生物学手段, 对 PERK 和 ATF6 在结肠癌中的表达情况进行检测, 进而分析 PERK 和 ATF6 在结肠癌发生发展中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** 收集 2014 年 9 月~2015 年 8 月河南科技大学第一附属医院行结肠癌根治术切除的患者标本, 患者的基本情况见表 1。提取 mRNA 用 TRIzol Regent 购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒和定量 PCR 试剂购自大连宝生物工程有限公司; 所有引物由上海生工生物工程股份有限公司合成 (表 2); PERK 抗体和 ATF6 抗体均购自英国 Abcam 公司; SABC 免疫组织化学检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; 浓缩型 DAB 显色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

## 1.2 方法

2017-04-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81370487)

作者单位: <sup>1</sup> 河南科技大学临床医学院, 洛阳 471023

河南科技大学第一附属医院<sup>2</sup> 消化内科、<sup>3</sup> 肝胆外科、<sup>4</sup> 检验科, 洛阳 471023

<sup>5</sup> 首都医科大学附属北京康复医院消化内科, 北京 100114

作者简介: 高 磊, 男, 硕士, 副主任医师;

高 强, 男, 教授, 主任医师, 责任作者, E-mail: gaoq@ccmu.edu.cn

\* 对本文具有同等贡献

**1.2.1 取材** 取手术切除的结肠癌组织以及距离癌组织 5 cm 以上正常结肠组织,于预冷的无菌水中清洗后,吸去多余水分,分成 3 份,其中 1 块于 10% 福尔马林固定后制备石蜡切片,用于免疫组化及 HE 染色,其余 2 份液氮速冻后快速转入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存,用于蛋白及 mRNA 提取。

表 1 结肠癌组织临床特征

临床特征	n (%)
性别	
男	23 (47.9)
女	25 (52.1)
年龄(岁)	
$\leq 60$	17 (35.4)
$> 60$	31 (64.6)
吸烟史	
有	9 (18.7)
无	39 (81.3)
饮酒	
是	4 (8.3)
否	44 (91.7)
肿瘤形态	
隆起型	17 (35.4)
溃疡型	31 (64.6)
肿瘤分化程度	
高分化	13 (27.0)
中低分化	35 (73.0)
浸润深度	
T1 + T2	6 (12.5)
T3 + T4	42 (87.5)
淋巴结转移	
有	16 (33.3)
无	32 (66.7)
远处转移	
M0	44 (91.7)
M1	4 (8.3)
临床分期	
I + II	23 (47.9)
III + IV	25 (52.1)

### 1.2.2 RT-PCR 反应提取 mRNA 及合成 cDNA

TRIzol 法提取总 mRNA,用核酸定量仪测定纯度和浓度。取 mRNA 2  $\mu\text{g}$ ,按照逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA, $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。RT-PCR:冰上配制 25  $\mu\text{l}$  反应体系:cDNA 2  $\mu\text{l}$ ,SYBR Premix EX Taq II(2  $\times$ ) 12.5  $\mu\text{l}$ ,DEPC 水 8.5  $\mu\text{l}$ ,上下游引物各 1.0  $\mu\text{l}$ (10  $\mu\text{mol/L}$ )。于 BIO-RAD Real-time PCR 仪 CFX96 中进行扩增,反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,57  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s 共 40 个循环。结果以 Ct 值表示,每个样本 3 个复孔, $\beta$ -actin 作为内参基因,退火温度为 60  $^{\circ}\text{C}$ ,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法分析

mRNA 相对表达量。

表 2 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
PERK	F: CCTGCTCGAATCTTCCTACAA	158
	R: CCTCTTCTTCGATTTTCATCACTATC	
ATF6	F: AAATGACAAAAGCCCTGATGG	125
	R: GAACCCATCCTCGAAGTTCA	
$\beta$ -actin	F: CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT	116
	R: AGCACTGTGTTGGCGTACAG	

**1.2.3 蛋白质提取及 Western blot 检测** 蛋白质提取:取 40 ~ 60 mg 组织,加入 1 ml RIPA 裂解液,匀浆器充分匀浆后离心取上清液。BCA 法测定蛋白浓度。Western blot 实验步骤:根据实验需要稀释蛋白,100  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min,加 20 min 样品进行 SDS-PAGE 后,将蛋白转移到 PVDF 膜上进行 Western blot,PERK 抗体和 ATF6 抗体一抗工作浓度为 1 : 2 000,二抗稀释比例为 1 : 2 000。ECL 显色试剂盒显色 1 min,成像系统成像,所得条带通过 Image J 进行灰度分析。

**1.2.4 免疫组化** PERK 抗体和 ATF6 抗体一抗工作浓度为 1 : 500,DAB 显色 5 min,苏木精复染。在光学显微镜下进行观察,每张切片随机选择 10 个视野,每个视野观察 100 个细胞。染色细胞比率评分标准:<5% 计 0 分,5% ~ 25% 计 1 分,26% ~ 50% 计 2 分,51% ~ 75% 计 3 分,76% ~ 100% 计 4 分;染色强度评分标准:细胞质内无染色计 0 分,淡黄色计 1 分,棕色计 2 分,棕褐色计 3 分,根据两项评分之积得免疫组织化学染色评分:-(0 分),+( < 4 分),+(4 ~ 7 分),+(8 ~ 12 分)。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 进行统计学分析,研究结果均用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用两独立样本的  $t$  检验进行统计学分析,检验水准为  $\alpha = 0.05$ , $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PERK 和 ATF6 mRNA 在结肠癌中表达下降

通过 RT-PCR 法对结肠癌患者结肠癌及对应正常结肠中 PERK 和 ATF6 mRNA 表达水平变化情况进行分析,结果显示,结肠癌中 PERK 和 ATF6 mRNA 的表达水平比相应正常组织表达水平下降,分别为正常组织的 40% 和 50% ( $t = 2.505, 2.121$ ,  $P < 0.05$ ) 见图 1。

### 2.2 PERK 和 ATF6 蛋白在结肠癌中的表达情况

通过 Western blot 和免疫组织化学法对 PERK 和

ATF6 蛋白在结肠癌及相应正常结肠组织中表达情况进行检测,Western blot 结果显示:PERK 和 ATF6 在结肠癌的表达均下降,分别为正常结肠组织 50% 和 30% ( $t=2.768、2.881, P<0.05$ ),见图 2。

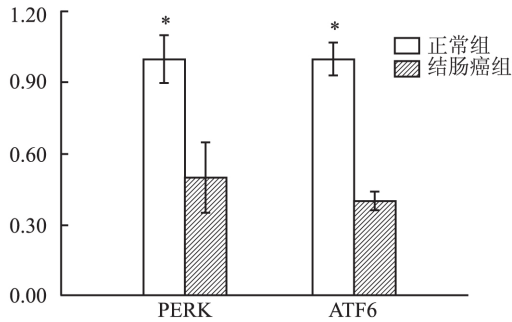


图1 PERK 和 ATF6 mRNA 在结肠癌及正常组织中的表达情况与结肠癌组织比较: \*  $P<0.05$

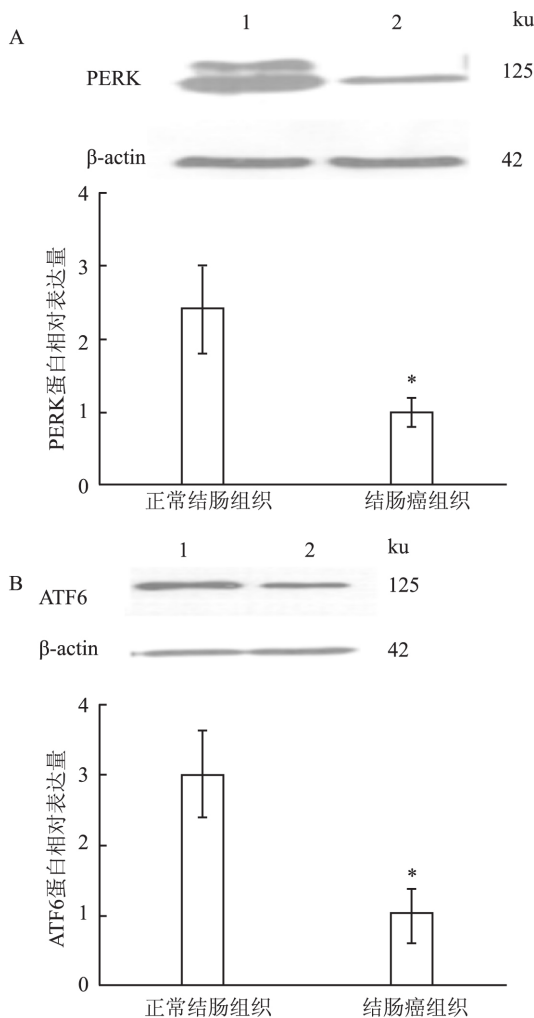


图2 PERK 和 ATF6 蛋白在结肠癌以及相应正常结肠中的表达情况

A: PERK 在结肠癌以及相应正常结肠中的表达情况比较; B: ATF6 蛋白在结肠癌以及相应正常结肠中的表达情况比较; 1: 结肠癌组织; 2: 正常结肠组织; 与正常结肠组织比较: \*  $P<0.05$

2.3 免疫组化结果 PERK 主要定位于结肠上皮细胞胞质中,且在结肠癌中的表达显著低于相应正常结肠组织(图 3A、B)。ATF6 与 PERK 相似,主要定位于结肠上皮细胞胞质中,在刷状缘上有表达。整体在正常结肠肠腺组织中下部表达多于上部;结肠癌中的表达显著低于相应正常结肠组织(图 3C、D)。免疫组织化学评分显示 PERK、ATF6 在正常结肠组织为 ( $5.6 \pm 2.3$ ) vs ( $4.4 \pm 1.8$ ),结肠癌组织为 ( $3.0 \pm 1.3$ ) vs ( $2.0 \pm 1.1$ ),与正常结肠组织比较,差异有统计学意义 ( $t = 2.467、2.901, P < 0.05$ )。

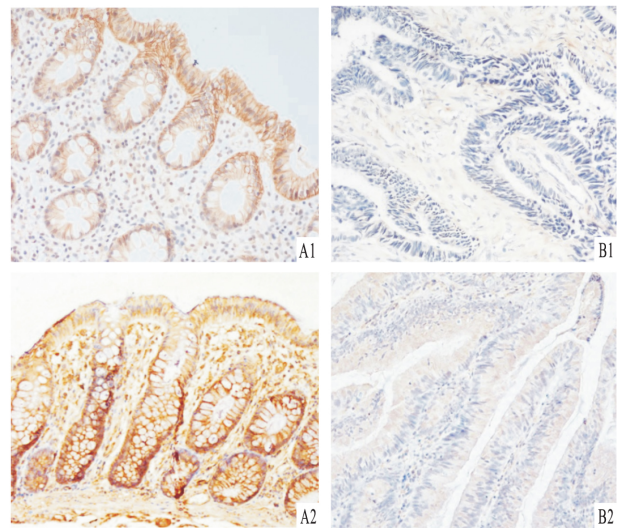


图3 PERK 和 ATF6 在结肠癌以及相应正常结肠中的 DAB 显色表达情况  $\times 200$   
A: 正常结肠组织; B: 结肠癌组织; 1: PERK; 2: ATF6

2.4 PERK 和 ATF6 表达与结肠癌患者临床病理指标间的关系 分析 PERK 和 ATF6 mRNA 和蛋白表达与结肠癌患者各项临床病理指标之间的关系,提示 PERK 或 ATF6 表达分别与患者性别、年龄、吸烟饮酒史以及肿瘤形态、分化程度、浸润转移、临床分期等因素无关 ( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

近年来,越来越多的研究<sup>[8]</sup>证明,内质网应激与肿瘤的发生发展有紧密的联系。本研究中 PERK 在人结肠癌组织中表达明显减少,说明内质网应激 PERK 通路在结肠癌组织中受到抑制。PERK 为应激条件下细胞恢复稳态提供了时间和条件<sup>[9]</sup>。最近的研究<sup>[10]</sup>表明结肠癌 CHOP 表达降低。动物实验显示 PERK 参与胰腺癌和肺癌的发病机制<sup>[11]</sup>。本实验结果表明 PERK 在结肠癌的病理机制中发挥

作用,结肠癌组织中 PERK 通路被抑制,CHOP 表达减低<sup>[10]</sup>,这也可能与结肠癌发病机制有关。

ATF6 在 UPR 中发挥着重要作用。本研究结果显示,在结肠癌组织中 ATF6 的基因和蛋白表达水平也明显下降,说明其在结肠癌发生发展的过程中也起到一定的作用。ATF6 在结肠癌中表达明显降低,可能的原因是在结肠癌发生时,肿瘤细胞已适应局部缺氧、总体能量水平低下的环境,同时为了进行蛋白质的合成满足肿瘤组织增殖的需要,ATF6 通路在正常细胞中内质网应激时的作用受到抑制,在结肠肿瘤组织中表现为 ATF6 在基因转录和蛋白质合成水平下降。ATF6 在正常结肠腺组织中下部表达较多,表明 ATF6 可能在结肠黏膜上皮的正常生长成熟过程中起到一定作用;ATF6 应该位于内质网,但在研究中显示刷状缘也有 ATF6 表达,这种表达的功能尚需进一步研究。

本研究结果显示肿瘤组织由于细胞调节机制的特点,内质网应激相关因子 ATF6 的表达下降反而对 UPR 起到了抑制作用。做为转录因子,ATF6 调控的分子包括内质网应激相关 GRP78、XBP1 伴侣蛋白以及促凋亡因子 CHOP<sup>[6]</sup>。ATF6 下调将会影响凋亡相关信号分子的表达和功能,有助于肿瘤生长。激活 ATF6 介导信号通路的内质网应激所导致的细胞凋亡途径可能为抑制肿瘤生长提供新的治疗思路。代恩勇等<sup>[12]</sup>在研究诱导大肠癌 Caco-2 细胞凋亡效应时发现环巴胺抑制大肠癌 Caco-2 细胞增殖,在这个过程中 ATF6 下调,解释这种下调与其促进细胞凋亡机制有关。本研究结果与代恩勇的结果差别的原因尚不明确,需要进一步研究。

综上所述,本研究中内质网应激蛋白 PERK 和 ATF6 表达水平在结肠癌组织中表达下调,表明内质网应激在结肠癌的发生发展中有着一定的作用,本研究结果可能为结肠癌发病机制的研究提供新的思路,为发现新的治疗结肠癌靶点提供理论依据。

## 参考文献

- [1] Rabeneck L, Horton S, Zauber A G. Colorectal Cancer [M]. Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3), 2015.
- [2] Li L, Ma B B. Colorectal cancer in Chinese patients: current and emerging treatment options [J]. *Onco Targets Ther*, 2014, 7: 1817-28.
- [3] Liu S, Zheng R, Zhang M, et al. Incidence and mortality of colorectal cancer in China, 2011 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27(1): 22-8.
- [4] Raskov H, Pommergaard H C, Burcharth J, et al. Colorectal carcinogenesis-update and perspectives [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(48): 18151-64.
- [5] Hotamisligil G S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 900-17.
- [6] Parmar V M, Schröder M. Sensing endoplasmic reticulum stress [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 738(738): 153-68.
- [7] Xiong Z, Jiang R, Zhang P, et al. Transmission of ER stress response by ATF6 promotes endochondral bone growth [J]. *J Orthop Surg Res*, 2015, 10(1): 141.
- [8] Khan I, Paul S, Jakhar R, et al. Novel quercetin derivative TEF induces ER stress and mitochondria-mediated apoptosis in human colon cancer HCT-116 cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 789-99.
- [9] Mei Y, Thompson M D, Cohen R A, et al. Endoplasmic reticulum stress and related pathological processes [J]. *J Pharmacol Biomed Anal*, 2013, 1(2): 1000107.
- [10] Piton N, Wason J, Colasse, et al. Endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response and development of colon adenocarcinoma [J]. *Virchows Arch*, 2016, 469(2): 145-54.
- [11] Atkins C, Liu Q, Minthorn E, et al. Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(6): 1993-2002.
- [12] 代恩勇,张桂珍,卢振霞,等.环巴胺诱导大肠癌 Caco-2 细胞凋亡效应和线粒体蛋白质组学研究 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2011, 37(3): 407-12.

## Expression and significance of endoplasmic reticulum stress chaperone PERK and ATF6 in colon cancer

Gao Lei<sup>1,2</sup>, Feng Dandan<sup>1,2</sup>, Dai Faliang<sup>1,2,3</sup>, et al

<sup>(1) College of Clinical Medicine, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023;</sup>

<sup>2) Dept of Gastroenterology and Hepatology, <sup>3) Dept of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023)</sup></sup>

**Abstract Objective** To explore the expression of endoplasmic reticulum (ER) stress chaperone pancreatic ER

## 间歇性低氧对离体小鼠胸主动脉舒张功能的影响

程文慧 范一菲 沈帆 沈兵 钟明奎

**摘要** 目的 研究不同时间的间歇性低氧对离体小鼠胸主动脉舒张功能的影响。方法 将离体的胸主动脉分为对照组和间歇性低氧组(IH组),分别放入正常培养箱和IH培养箱内培养。应用血管张力测定技术,观察间歇性低氧6、12、24 h对离体培养的小鼠胸主动脉舒张功能的影响。结果 与对照组相比,间歇性低氧6 h的血管内皮舒张功能差异无统计学意义;间歇性低氧12 h和24 h的血管内皮依赖性舒张明显减弱( $P < 0.01$ ),内皮非依赖性舒张低浓度(1~10 nmol/L)表现减弱,增大硝普钠浓度,内皮非依赖性舒张差异无统计学意义。结论 长时间间歇性低氧培养血管可以使离体血管内皮功能紊乱和血管平滑肌受损。

**关键词** 间歇性低氧;血管培养;血管内皮功能障碍

中图分类号 R 331.33;R 363.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)09-1284-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.006

阻塞性睡眠呼吸综合征(obstructive sleep apnea syndrome, OSAS)是一种常见的睡眠呼吸障碍性疾

2017-04-01 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81070066);安徽省教育厅自然科学重点科研项目(编号:KJ2010A176);安徽医科大学博士科研基金(编号:XJ201221)

作者单位:安徽医科大学基础医学院生理学教研室,合肥 230032

作者简介:程文慧,女,硕士研究生;

钟明奎,男,博士,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:mingkuizhong@ahmu.edu.cn

病,由于睡眠过程中反复发生的低通气和呼吸暂停,使机体处于一种间歇性低氧(intermittent hypoxia, IH)与再氧合交替出现的特殊内环境状态,OSAS患者的重要损伤机制及主要病理生理学特点是发生IH和呼吸中断,IH被认为是引起一系列心血管疾病的危险因素<sup>[1]</sup>。血管内皮细胞在参与物质交换、血管形成、防止血小板聚集和血栓形成方面具有重要作用。血管内皮障碍的发生也与高血压、动脉粥样硬化等多种心血管疾病密切相关<sup>[2]</sup>。该研究旨在通过对离体血管进行不同时间的IH培养,观察IH对离体血管内皮功能的影响,为防治IH导致的血管内皮功能障碍提供实验依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 动物** 雄性昆明种小鼠,25~30 g,清洁级,由安徽医科大学实验动物中心提供。自由摄食和饮水,通风良好,室温维持在(20±5)℃。

**1.1.2 仪器与主要试剂** DMT myograph 610 M张力测定系统(丹麦DMT公司);CO<sub>2</sub>培养箱(上海一恒仪器公司);IH控制仪(上海鑫野半导体科技有限公司);胎牛血清(美国Clark公司);DMEM培养液(美国Gibco公司);青霉素链霉素溶液(上海碧云天生物技术有限公司);U46619、乙酰胆碱(ace-

kinase-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor 6 (ATF6) in human colon cancer. **Methods** Curative tissues of colon cancer and tumor-adjacent tissues more than 5 cm away from lesioned tissues were collected from the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology from September. PERK and ATF6 mRNA level was detected by real-time quantitative PCR (RT-PCR), immunohistochemistry (IHC) and Western blot were used to detect protein levels of PERK and ATF6. The relationship of the clinical pathological features of these patients with expression of PERK or ATF6 was analyzed. **Results** PERK and ATF-6 mRNA were down-regulated in cancer tissues compared to their corresponding tumor-adjacent tissues ( $P < 0.05$ ). In consistent with gene expression, PERK and ATF6 protein were also down-regulated in colon cancer ( $P < 0.05$ ). IHC showed that PERK and ATF6 were mainly located in the cytoplasm of colonic epithelial cells. **Conclusion** ER stress was involved in the tumorigenesis of colon cancer.

**Key words** activating transcription factor 6; colon cancer; endoplasmic reticulum stress; pancreatic ER kinase-like ER kinase; unfolded protein response