

内质网 PERK/eIF-2 α 信号通路在宫颈癌中的表达及其临床意义

何配配, 陈珂, 徐珺, 汪志霞, 严雪梅

(南京明基医院/南京医科大学附属明基医院妇科, 江苏南京 210000)

[摘要] **目的** 探讨内质网应激蛋白激酶 R 样内质网激酶(stress protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)/真核启动因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF-2 α) 信号通路在宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)和宫颈癌(cervical carcinoma, CC)中的表达及其对肿瘤进程的影响。**方法** 收集 2022 年 1 月至 2023 年 4 月在南京明基医院进行诊治的 CC 患者的宫颈活检标本 58 例为宫颈癌组, 选取同期 52 例宫颈上皮内瘤变(CIN II 级、CIN III 级)作为对照组, 选取同期 34 例健康子宫患者的宫颈组织为正常组。Western blot 法检测内质网介导相关蛋白的表达; 免疫组织化学法检测 PERK/eIF-2 α 在 CC 中的染色状况。将 HeLa 细胞分为对照组、pcDNA3.1-NC 组、过表达 PERK 组、sh-NC 组、干扰 PERK 组, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性, 免疫荧光染色观察细胞内上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)表达, 应用流式细胞术检测细胞凋亡与周期分布, Transwell 实验评估细胞迁移与侵袭能力。**结果** 随着 CIN 分级程度的增加, PERK/eIF-2 α 表达升高($P < 0.05$), 且 CC 组织 PERK/eIF-2 α 表达显著高于 CIN 组织($P < 0.05$); 与 pcDNA3.1-NC 组比较, 过表达 PERK 组细胞增殖活性升高, 细胞内 E-cadherin 荧光表达明显减弱($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达下调($P < 0.05$), 促进细胞增殖、迁移与侵袭, 抑制细胞凋亡($P < 0.05$); 与 sh-NC 组比较, 干扰 PERK 组细胞增殖活性降低, 细胞内 E-cadherin 荧光表达则明显增强($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达上调($P < 0.05$), 抑制细胞增殖、迁移与侵袭, 促进细胞凋亡($P < 0.05$)。**结论** 内质网应激 PERK/eIF-2 α 在子宫内瘤变和 CC 组织中表达升高, 抑制其表达能够降低 CC 肿瘤细胞增殖, 从而减缓肿瘤进程。

[关键词] 宫颈癌; 内质网应激; 应激蛋白激酶 R 样内质网激酶; 真核启动因子 2 α

[中图分类号] R582.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2026)07-0028-09

Expression and Clinical Significance of the Endoplasmic Reticulum PERK/eIF-2 α Signaling Pathway in Cervical Cancer

HE Peipei, CHEN Ke, XU Jun, WANG Zhixia, YAN Xuemei

(Department of Gynecology, Nanjing Mingji Hospital /Benji Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing Jiangsu 210000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of the endoplasmic reticulum stress protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)/eukaryotic initiation factor 2 α (eIF-2 α) signaling pathway in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical carcinoma (CC), and its impact on tumor progression. **Methods** A total of 58 cervical biopsy specimens from patients diagnosed with cervical cancer (CC) treated at Nanjing Mingji Hospital from January 2022 to April 2023 were collected as the cervical cancer group. Concurrently, 52 cases of cervical intraepithelial neoplasia (CIN II and CIN III) were selected as the control group, and 34 cases of healthy uterine tissues from the same period were chosen as the normal group. Western blot was used to detect the expression of endoplasmic reticulum-mediated related proteins; immunohistochemistry was employed to assess the staining status of PERK/eIF-2 α in CC tissues. HeLa cells were divided into the following groups: control group, pcDNA3.1-NC group, overexpressed PERK group, sh-NC group, and PERK interference group. Cell proliferation activity was detected using the CCK-8 assay, and the expression of epithelial cadherin (E-cadherin) was observed by

[收稿日期] 2025-07-14

[基金项目] 江苏省妇幼健康科研项目(F202178)

[作者简介] 何配配(1984~), 女, 江苏南京人, 医学学士, 主治医师, 主要从事妇科研究工作。

[通信作者] 陈珂, E-mail: jiaguli12378@163.com

immunofluorescence staining. Apoptosis and cell cycle distribution were analyzed by flow cytometry, and cell migration and invasion ability were evaluated by Transwell assay. **Results** With increasing CIN grade, the expression of PERK/eIF-2 α increased ($P < 0.05$), and its expression in CC tissues was significantly higher than that in CIN tissues ($P < 0.05$). Compared with the pcDNA3.1-NC group, cells in the PERK overexpression group enhanced proliferation activity, markedly reduced intracellular E-cadherin fluorescence expression ($P < 0.05$), and downregulated E-cadherin protein expression ($P < 0.05$), accompanied by promotion of cell proliferation, migration, and invasion, as well as inhibition of apoptosis ($P < 0.05$). In contrast, compared with the sh-NC group, cells in the PERK interference group showed decreased proliferation activity, significantly increased intracellular E-cadherin fluorescence expression ($P < 0.05$), upregulated E-cadherin protein expression ($P < 0.05$), along with inhibition of cell proliferation, migration, invasion, and promotion of apoptosis ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of the endoplasmic reticulum stress-related PERK/eIF-2 α pathway is upregulated in uterine intraepithelial neoplasia and CC tissues. Inhibition of its expression can reduce the tumor cell proliferation in CC, thereby slowing tumor progression.

[**Key words**] Cervical cancer; Endoplasmic reticulum stress; Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase; Eukaryotic initiation factor 2 α

宫颈癌(cervical cancer, CC)是一种严重危害妇女健康的恶性肿瘤,其发病率逐年升高,并且呈现年轻化的特点^[1-2]。高级别鳞状上皮内病变(high grade squamous intraepithelial lesions, HSIL)是癌前病变,可发展为浸润性CC,如果不及时干预,大约20%的HSIL病例(CIN II/CIN II~III)可能在十年内发展为宫颈浸润性癌^[3-4]。内质网(endoplasmic reticulum, ER)在细胞内脂质和蛋白质合成中起着至关重要的作用。胞内稳态变化可诱发以蛋白错误折叠、在ER中积聚为特点的内质网应激(ER stress, ERS),引起非折叠蛋白应答(unfolded protein response, UPR)^[5]。研究强调ERS与肿瘤的发展、侵袭深度和转移密切相关^[6-8]。肿瘤微环境中的各种细胞应激源可破坏内质网稳态,触发内质网应激、UPR激活,形成正反馈循环。蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)通过磷酸化介导真核起始因子2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF-2 α)的活化。该途径导致PERK/eIF-2 α 信号转导,激活CHOP介导的细胞凋亡^[9-11]。临床研究表明,在CC组织中,PERK/eIF-2 α 表达水平显著升高,提示PERK/eIF-2 α 与CC的发生和进展存在潜在关联^[10]。本研究评估了PERK/eIF-2 α 在正常宫颈组织、宫颈上皮内瘤变和CC组织中的表达水平。通过研究PERK/eIF-2 α 在CC细胞中的表达抑制作用,观察ERS介导的PERK/eIF-2 α 对CC发生发展的调控作用。

1 材料与方法

1.1 资料收集

收集2022年1月至2023年4月在南京明基

医院进行诊治的CC患者的宫颈活检标本58例为宫颈癌组,选取同期52例宫颈上皮内瘤变(CIN II级、CIN III级)作为对照组,选取同期34例健康子宫患者的宫颈组织为正常组。所有纳入研究的病例均经活检组织行苏木精-伊红染色,由两名以上具有副主任医师及以上职称的病理医师独立阅片并作出诊断^[12]。CC患者年龄23~69岁,发病平均年龄(43.45 ± 13.36)岁;宫颈上皮内瘤变(CIN II级、CIN III级)年龄23~69岁,平均年龄(45.46 ± 13.16)岁;健康子宫患者的宫颈组织,年龄24~72岁,平均年龄(46.12 ± 15.72)岁。三组试验者年龄具有可比性($H = 0.471$, $P = 0.790$)。

纳入标准^[13]: (1)年龄在25~40岁的育龄期子宫颈HSIL患者; (2)经南京明基医院病理学系两名副高级以上医生共同参与,经阴道镜下细胞学检查确诊为HSIL; (3)所有患者在手术前进行高风险人乳头瘤病毒筛查; (4)患者记录完整,子宫颈锥切除的程度符合规范,术后随访效果良好。排除标准^[13]: (1)未怀孕的育龄妇女; (2)有子宫颈病变者行过锥切术; (3)伴有其它恶性肿瘤和免疫性疾病的患者; (4)医疗记录不全,随访效果差。针对本研究内容,所有患者及家属均知晓且签署同意书,并获得南京明基医院伦理委员会批准(M20230711116)。

1.2 主要材料与试剂

CC细胞系HeLa(中国科学院上海生科院细胞资源中心)。DAB显色试剂盒、RIPA裂解液(上海翌圣生物科技有限公司), Lipofectamine™2000(美国Invitrogen公司), PVDF膜和Matrigel胶(美国Corning公司), CCK-8检测试剂盒(凯杰生物工程(深圳)有限公司), DAPI(美国康宁公司),

异硫氰酸荧光素标记的山羊抗兔 IgG 及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(美国 Abcam 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组化(immunohistochemistry, IHC)法检测宫颈组织中 PERK/eIF-2 α 表达 取三组试验者的组织样本,用 4% 多聚甲醛浸渍、固定、去水、石蜡包埋、5 μ m 厚的切片。采用免疫组化方法,检测子宫内膜内质网应激相关蛋白 PERK、eIF-2 α 的表达。取 5% 含血清,38 $^{\circ}$ C 温育 40 min, PBS 缓冲后,以 ESR 为引物,于 4 $^{\circ}$ C 温育一夜。取下后于室温下置 30 min,加入二抗孵育,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 洗 3 次, DAB 显色、苏木素复染、无水、二甲苯透明、封片、光镜下,对染后的组织切片进行染色、蛋白质的表达及影像学分析。

当细胞中出现黄褐色颗粒时,说明有 PERK 及 eIF-2 α 的蛋白表达。为了更加精确的计算,笔者以阳性细胞的比例和染色强度为评判标准^[13],如果两个数值之和小于等于 2,表示这个数值大于等于 2。阳性细胞计数的标准^[13]:细胞百分比>75% 计 4 分;染色强度评分标准为:无染色(阴性),占比<5% 计 0 分;占比 5%~25% 计 1 分;占比 26%~50% 计 2 分;占比 51%~75% 计 3 分;染色为黄色(弱阳性),1 分;染色为棕黄色(阳性),2 分;染色棕褐色(强阳性),3 分。将两项评分相乘得出最终评分结果。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 反应测定 6 组宫颈组织中 PERK/eIF-2 α mRNA 表达 采用 Real-time PCR 法检测内质网介导的 PERK、eIF-2 α 的表达及内质网相关蛋白 ATF6、CHOP、XBP-1 和 Caspase12 的表达 mRNA 表达量。取宫颈组织加入裂解液 1 mL,研磨 30 s;加入 Trizol 试剂研磨均匀并在 20 min 后转移至 EP 管中;加入氯仿后震动器上震荡 30 min,在 0 $^{\circ}$ C 11000 r/min 条件下离心 20 min,取水相;加入异丙醇混匀后静置 10 min,在 0 $^{\circ}$ C 12000 r/min 条件下离心 10 min,

弃上清液;加入 75% 乙醇,800 r/min 离心 5 min,弃上清液;加入适量的 RNase-free 水,得到总 RNA,测定 RNA 的浓度和纯度。使用反转录试剂盒合成 cDNA。冰上配置 PCR 反应液,进行 RT-qPCR,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因表达量,并分析数据。使用引物如下,引物序列见表 1。

1.3.3 细胞分组与转染 以 HeLa 细胞为对照,以正常培养 HeLa 细胞为对照;在 HeLa 细胞系中加入过表达负调控的过表达质粒;用 pcDNA-PERK 过表达质粒,将其转入 HeLa 细胞即表达 PERK 组(pcDNA-PERK);在 HeLa 细胞 sh-NC 组中导入负控制的干扰表达质粒;用 sh-PERK 基因干扰质粒对 HeLa 细胞进行转染即干扰 PERK 组(sh-PERK)。在转染之前,先将其接种于细胞平板上,并进行 24 h 的常规培养。按照 LipofectamineTM2000 将细胞进行成组培养,直至达到 75% 的细胞融合后,将质粒转染至 HeLa 细胞并进行瞬间转染。然后,通过免疫印迹、RT-qPCR 法检测转染效果,之后收集各组细胞,进行后续实验。

1.3.4 Western blot 测定 6 组宫颈组织中 ERS 介导 PERK/eIF-2 α 蛋白表达水平的表达 按照试剂盒操作将细胞裂解液 RIPA 和 PMSF 加入到收集的各组 HeLa 细胞中提取总蛋白,冰上研磨组织为匀浆,在 14000 r/min 条件下离心 10 min 后弃沉淀保留上清,使用检测样品的蛋白浓度将样品稀释为合适浓度。制备 12% 的分离胶、5% 浓缩胶的 SDS-PAGE 凝胶电泳跑胶,样品和 Marker 每孔分别 10 μ L 上样,在 70 V 30 min、120 V 2 h 的条件下电泳,在 200 mA 100 min 的条件下使用湿转法转膜。将 PVDF 膜浸在 5% 脱脂牛奶中 1 h 封闭,加入一抗[PERK(1:100)、eIF-2 α (1:200)、CHOP(1:100)、XBP-1(1:200)、Caspase12(1:100)、ATF6(1:100)、p-eIF2 α (1:100)、ATF4(1:200)]抗体,4 $^{\circ}$ C 摇床上孵育过夜,加入二抗室温摇床孵育 1 h。TBST 摇洗 10 min,重复 3 次,加入 ECL 发光反应液(A 液:B 液=

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	上游引物	下游引物
GRP78	5'-ACTCCCATTCTTCCACCTTTG-3'	5'-CCCTGTTGCTGTAGCCATATT-3'
Calpain2	5'-AGTCGGTCTTTCTCAGTGGG-3'	5'-CCATGTCGCAATCTGTCAGG-3'
CHOP	5'-GAAC-CAACTCACGTCCAACC-3'	5'-CTTTCCCAAATAC-GCCTCGG-3'
GAPDH	5'-CAAGTTCAACGGCACAGTCA-3'	5'-CCCCATTTGATGTTAGCGGG-3'
XBP1	5'-CCTGCCTGCTGGATGCTTA-3'	5'-GGGAAAGAGTTCACTGGCAAA-3'
ATF6	5'-AACCAGTCCTTGCTGTTGCT-3'	5'-GGGAAAGAGTTCACTGGCAAA-3'
ATF4	5'-CACCGCAACATGACCGAAAT-3'	5'-GACTGACCAACCCATCCACA-3'

1:1), 显影观察, Image J 软件进行数据分析。

1.3.5 CCK-8 法检测细胞增殖活性 将 HeLa 细胞接种于含 10% FBS 培养基中, 37℃、5% CO₂ 条件下培养。当细胞生长融合达到 80%~90% 时, 用胰蛋白酶将其分开, 按 1:3 传代。取生长状态良好的 HeLa 细胞, 用 PBS 重新吹打重悬, 调整其密度为 1×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板, 每孔 200 μ L。在培养 0、24、48、72 h 时, 每孔加入适量 CCK-8 与细胞培养基的稀释液试剂, 继续孵育 2 h。酶标仪的波长调节为 450 nm, 检测各孔的光密度(optical density, OD)值。以 OD450 值代表细胞增殖活性。

1.3.6 免疫荧光染色观察 E-cadherin 表达 各组用 PBS 清洗 3 次, 以 4% 聚甲醛固定 30 min, 用 PBS 冲洗, 10 min 后用 0.1% TritonX-100 渗透 10 min, 用 PBS 冲洗, 在室温下用 5% 牛血清封闭 10 min。加入单克隆抗体后, 在室温下放置孵育 2 h, 用 PBS 冲洗 3 遍, 然后加入双抗, 于室温避光下孵育 0.5 h, 然后用 DAPI 染料染色核 10 min。所有标本均经冲洗、封片、荧光显微镜及图像分析。

1.3.7 Transwell 实验检测细胞迁移、侵袭能力 全培养基中生长至对数期, 随后用无血清培养基饥饿 12 h。

迁移实验: 向下室加入 600 μ L 含 10% FBS 的完全培养基作为趋化因子; 上室加入 200 μ L 无血清培养基中悬浮细胞(5×10^4 细胞/孔, 具体细胞数可根据细胞系生长特性优化), 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。

侵袭实验: 在上室膜表面预先加入稀释的 Matrigel(1:6 稀释), 37℃ 固化 1 h 后, 按迁移实验方法将细胞加入上室并孵育 48 h。孵育结束后, 弃去上室培养基并用棉签小心擦去上室未穿膜细胞; 随后用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 蒸馏水冲洗 2 次并用 0.1% 晶体紫染色 10~20 min, 最后用流水轻洗并晾干。显微镜下计数每个膜上 3 个随机视野穿膜细胞数, 取平均值作为每孔细胞数。每组设 3 孔技术重复, 且至少做 3 次独立实验。

1.3.8 流式细胞术检测细胞凋亡 将对数生长期细胞按实验设计组处理后, 用将细胞用胰酶消化, 然后用 PBS 清洗 2 次, 将 $1 \times$ Annexin V 结合缓冲液中再悬浮 1×10^6 个/mL。提取 100 μ L 的悬浮液(约 1×10^5), 加入 5 μ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀后避光孵育 10~15 min; 随后加入 5~10 μ L Propidium Iodide (PI, 50 μ g/mL), 在室温避光下即时或在 5~10 min 内上机检测。数据分析采用

FlowJo 根据 Annexin V/PI 的四象限区分活细胞(Annexin V-/PI-), 早期凋亡(Annexin V+/PI-), 晚期凋亡/坏死(Annexin V+/PI+)并计算凋亡总率(早期+晚期)。每组至少重复 3 次。

1.4 统计学分析

本研究采用 GraphPad Prism 9.0 软件对实验数据进行统计分析。首先, 使用 Shapiro-Wilk 检验对各组数据的正态性进行检验, 并采用 Levene 检验评估方差齐性。若数据符合正态分布且方差齐性, 则以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析(factor analysis of variance, ANOVA), 成对比较使用 Tukey's HSD 检验; 若方差不齐, 则采用 Dunnett's T3 检验。若数据不符合正态分布, 则以中位数及四分位间距 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 成对比较采用 Mann-Whitney U 检验。所有检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CC 患者 PERK/eIF-2 α 与临床病理参数的关系

IHC 半定量分析显示, PERK 和 eIF-2 α 的蛋白表达随病理分级升高而逐渐增强。PERK 总评分在正常组、CIN II、CIN III 及宫颈癌(CC)组分别为 (1.00 ± 0.00) 分、 (4.67 ± 1.15) 分、 (7.67 ± 1.53) 分和 (12.00 ± 0.00) 分; eIF-2 α 总评分分别为 (1.00 ± 0.00) 分、 (4.67 ± 1.15) 分、 (7.67 ± 1.53) 分和 (12.00 ± 0.00) 分, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。Spearman 秩相关分析结果显示, PERK 表达与病理分级呈显著正相关($r = 0.979$, $P < 0.001$), eIF-2 α 表达亦与病理分级呈正相关($r = 0.973$, $P < 0.001$), 见图 1、图 2。

2.2 各组组织中 PERK/eIF-2 α 通路及 ERS 相关指标蛋白表达水平比较

与正常组相比, CIN II、CIN III 中 PERK、p-eIF-2 α 表达上调, ERS 相关指标 ATF4、ATF6、CHOP、XBP-1、Caspase12 表达升高($P < 0.05$); 且上调趋势与病理分级的进展呈正相关($P < 0.05$), 见图 3。

2.3 细胞转染结果

HeLa 细胞转染后, 经 RT-qPCR 检测转染效果和 Western blot 检测转染效果发现, 与 pcDNA3.1-NC 组比较, 过表达 PERK 组细胞中 PERK/eIF-2 α 蛋白与 mRNA 相对表达量显著上调($P < 0.05$)。与

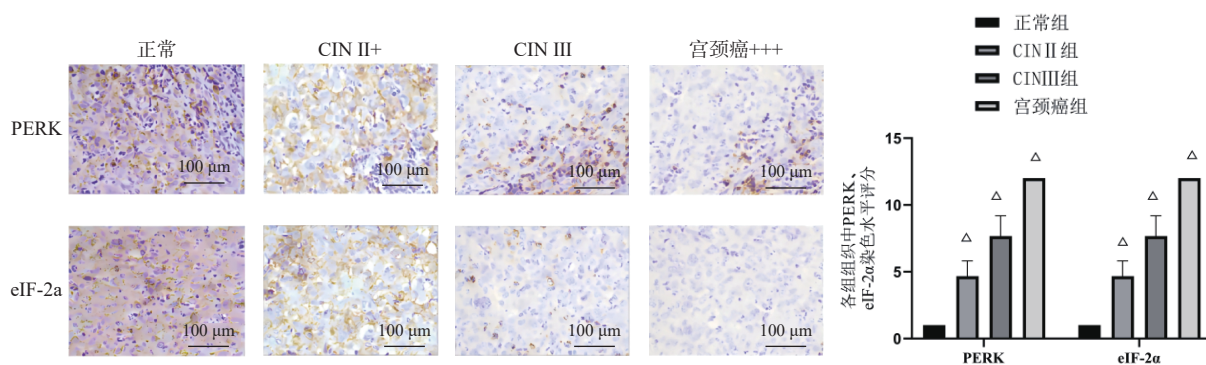


图 1 各组组织中 PERK、eIF-2 α 染色水平 ($\times 100$) ($\bar{x} \pm s$, $n_i = 3$)

Fig. 1 PERK and eIF-2 α staining levels in tissues of each group ($\times 100$) ($\bar{x} \pm s$, $n_i = 3$)

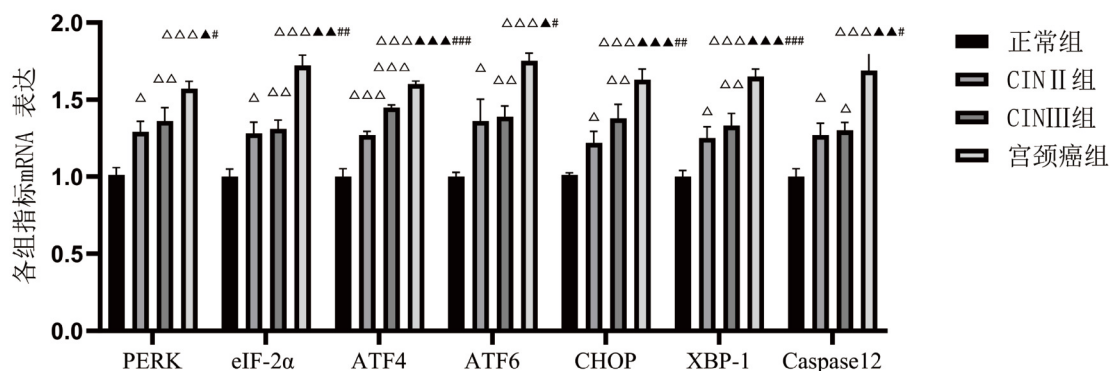


图 2 各组组织中 PERK、eIF-2 α 、ATF4、ATF6、CHOP、XBP-1 和 Caspase12 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n_i = 6$)

Fig. 2 Comparison of mRNA expression of PERK, eIF-2 α , ATF4, ATF6, CHOP, XBP-1, and Caspase12 in tissues of each group ($\bar{x} \pm s$, $n_i = 6$)

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与正常组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 与 CIN II 组相比, $\Delta^{\Delta} P < 0.05$, $\Delta^{\Delta\Delta} P < 0.01$, $\Delta^{\Delta\Delta\Delta} P < 0.001$; 与 CIN III 组相比, $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$, $\#\#\#P < 0.001$ 。

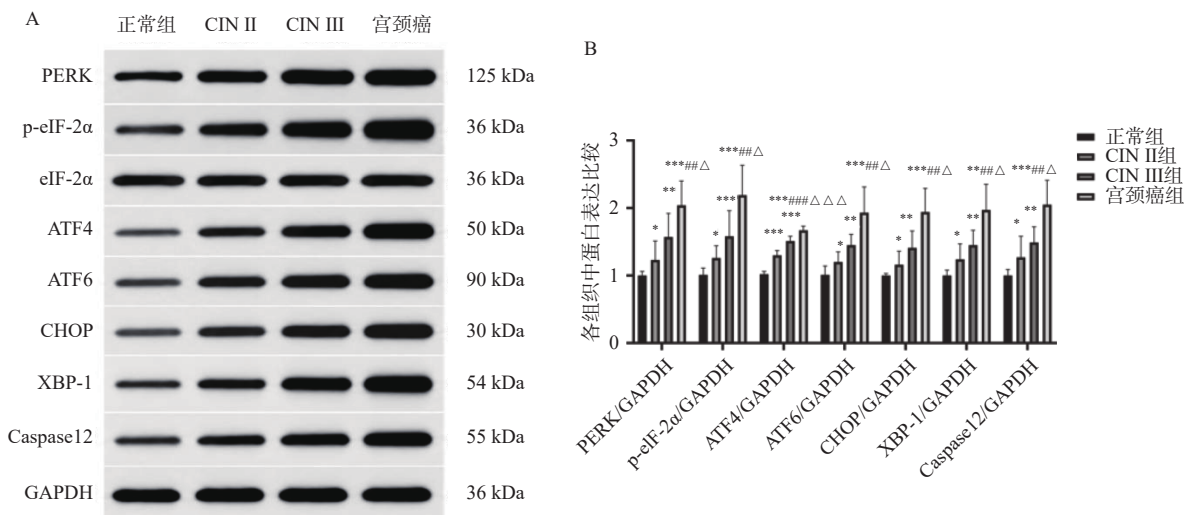


图 3 Western blot 检测各组组织中 PERK/eIF-2 α 通路及内质网相关指标蛋白条带及各组组织中 PERK、p-eIF-2 α 、ATF4、ATF6、CHOP、XBP-1 和 Caspase12 蛋白表达比较分析 ($\bar{x} \pm s$, $n_i = 3$)

Fig. 3 Western blot analysis of PERK/eIF-2 α pathway proteins and endoplasmic reticulum-related protein bands in tissues of each group, and comparative analysis of PERK, p-eIF-2 α , ATF4, ATF6, CHOP, XBP-1, and Caspase12 protein expression ($\bar{x} \pm s$, $n_i = 3$)

A: Western blot 检测各组组织中 PERK/eIF-2 α 通路及内质网相关指标蛋白条带; B: 各组组织中 PERK、p-eIF-2 α 、ATF4、ATF6、CHOP、XBP-1 和 Caspase12 蛋白表达比较分析。与正常组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; 与 CIN II 组相比, $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$, $\#\#\#P < 0.001$; 与 CIN III 组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

sh-NC 组比较, 干扰 PERK 组细胞中 PERK/eIF-2 α 蛋白与 mRNA 相对表达量显著下调($P < 0.05$), 见图 4。

2.4 CCK-8 法检测细胞增殖活性

各组 HeLa 细胞增殖活性测定结果如下: 与 pcDNA3.1-NC 组比较, 72 h 后过表达 PERK 组细

胞增殖活性显著升高($P < 0.01$), 见图 5A。与 sh-NC 组比较, 72 h 后干扰 PERK 组细胞增殖活性显著降低($P < 0.01$), 见图 5B。

2.5 免疫荧光检测敲减/过表达 PERK 对 HeLa 细胞增殖的影响

与 pcDNA3.1-NC 组比较, 过表达 PERK 组细

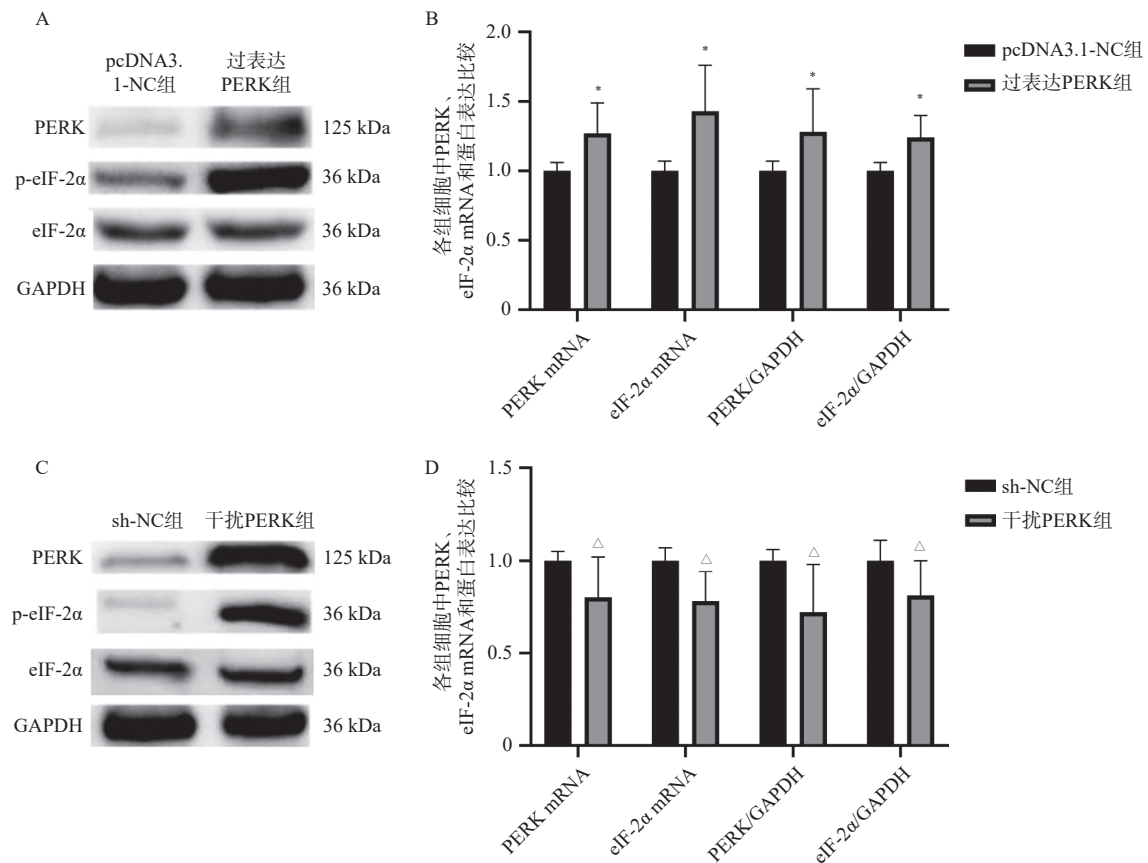


图 4 各组 HeLa 细胞中 PERK、eIF-2 α 蛋白表达条带及 PERK、eIF-2 α mRNA 和蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$, $n_i = 3$)

Fig. 4 PERK and eIF-2 α protein expression bands in HeLa cells of each group, and comparison of PERK and eIF-2 α mRNA and protein expression ($\bar{x} \pm s$, $n_i = 3$)

A: 各组 HeLa 细胞中 PERK 蛋白表达条带; B: 各组细胞中 PERK、eIF-2 α mRNA 和蛋白表达比较; C: 各组 HeLa 细胞中 eIF-2 α 蛋白表达条带; D: 各组细胞中 eIF-2 α mRNA 和蛋白表达比较。与 pcDNA3.1-NC 组相比, $*P < 0.05$; 与 sh-NC 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

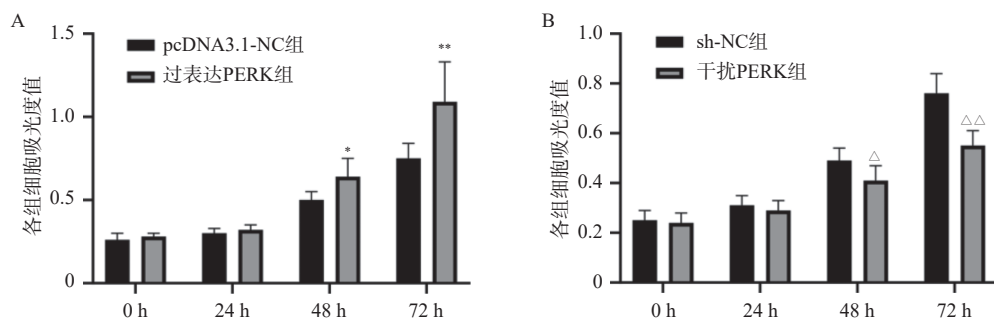


图 5 各组细胞吸光度值比较($\bar{x} \pm s$, $n_i = 6$)

Fig. 5 Comparison of absorbance values among cell groups ($\bar{x} \pm s$, $n_i = 6$)

A: pcDNA3.1-NC 组和表达 PERK 组吸光度值比较; B: sh-NC 组与干扰 PERK 组吸光度值比较; 与 pcDNA3.1-NC 组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与 sh-NC 组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

胞内绿色荧光减弱,表明 E-cadherin 表达下降($P < 0.05$);与 sh-NC 组比较,干扰 PERK 组细胞内绿色荧光增强,表明 E-cadherin 表达升高($P < 0.05$),见图 6。

2.6 Transwell 实验检测细胞迁移、侵袭能力

与 pcDNA3.1-NC 组比较,过表达 PERK 组细胞内细胞迁移与侵袭能力增强;与 sh-NC 组比较,

干扰 PERK 组细胞内细胞迁移与侵袭能力减弱,见图 7、图 8。

2.7 流式细胞仪检测敲减/过表达 PERK 对 HeLa 细胞凋亡的影响

与 pcDNA3.1-NC 组比较,过表达 PERK 组细胞内细胞凋亡率下降;与 sh-NC 组比较,干扰 PERK 组细胞内细胞凋亡率上升,见图 9,表 2。

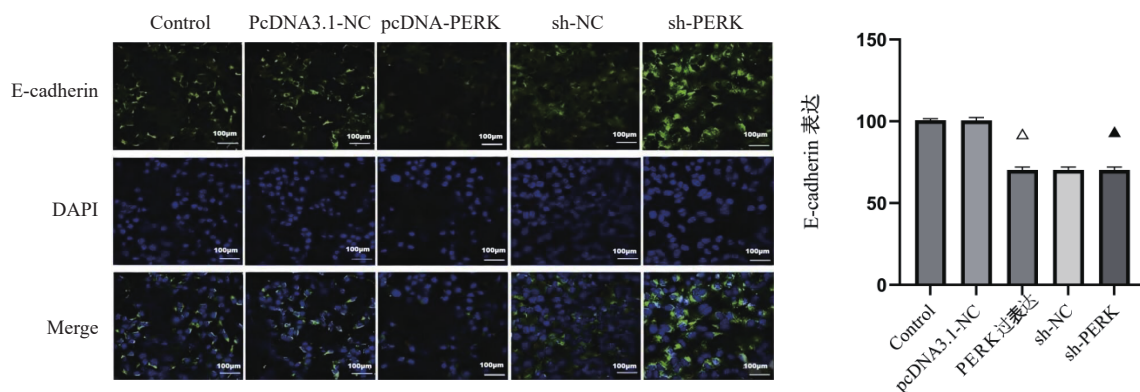


图 6 各组 HeLa 细胞转化标志物 E-cadherin 表达检测($\times 100$)($n_i = 3$)

Fig. 6 Expression of the transformation marker E-cadherin in HeLa cells of each group ($\times 100$) ($n_i = 3$)

注:与 pcDNA3.1-NC 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 sh-NC 组比较, $^{\blacktriangle}P < 0.05$ 。

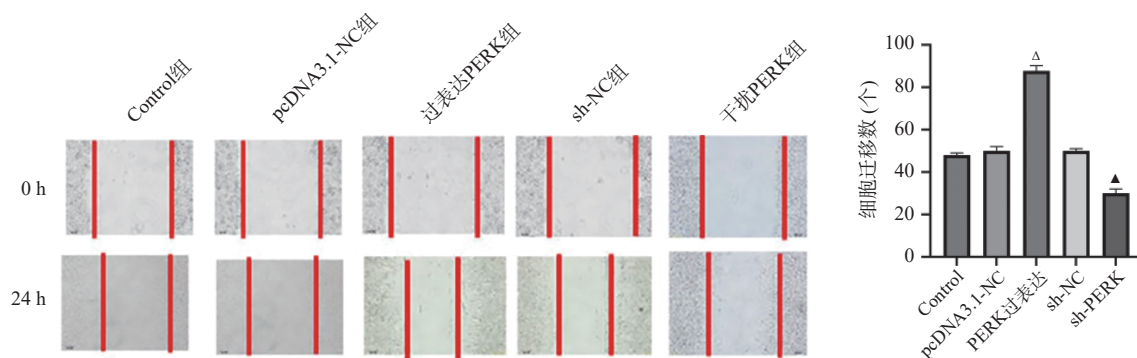


图 7 Transwell 实验检测细胞迁移能力($n_i = 3$)

Fig. 7 Cell migration ability assessed by Transwell assay ($n_i = 3$)

与 pcDNA3.1-NC 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 sh-NC 组比较, $^{\blacktriangle}P < 0.05$ 。

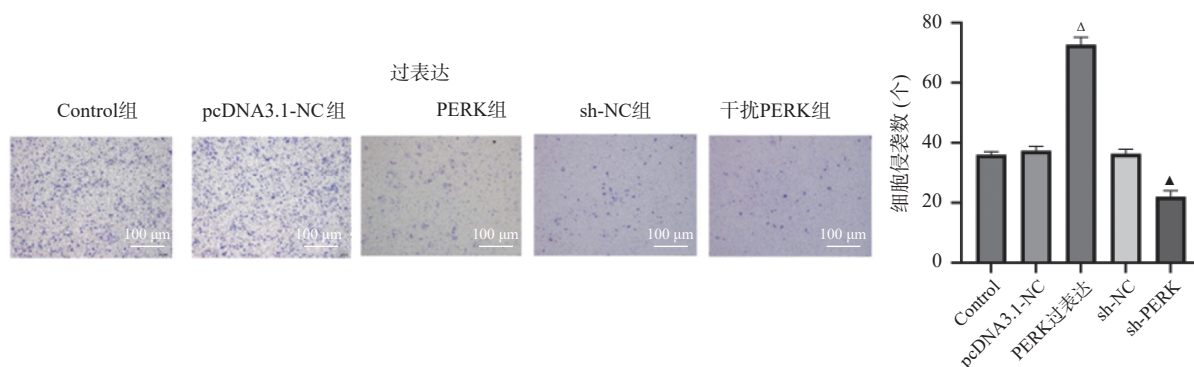


图 8 Transwell 实验检测细胞侵袭能力($\times 100$)($n_i = 3$)

Fig. 8 Cell invasion ability assessed by Transwell assay ($\times 100$) ($n_i = 3$)

注:与 pcDNA3.1-NC 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 sh-NC 组比较, $^{\blacktriangle}P < 0.05$ 。

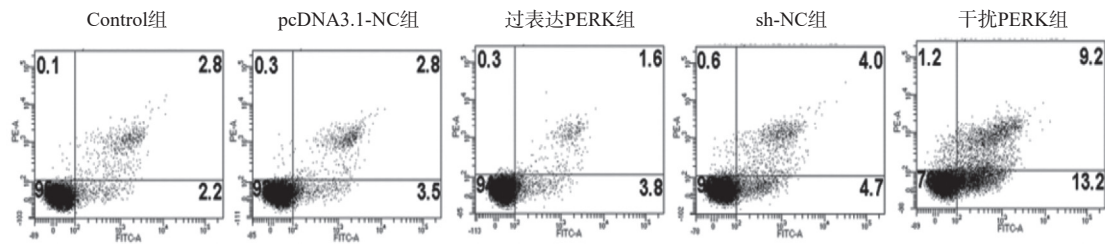


图 9 流式细胞仪检测细胞凋亡($n_i = 3$)

Fig. 9 Apoptosis detection by flow cytometry ($n_i = 3$)

表 2 流式细胞仪检测细胞凋亡($\bar{x} \pm s$, $n_i = 3$)

Tab. 2 Cell apoptosis measured by flow cytometry($\bar{x} \pm s$, $n_i = 3$)

组别	早期凋亡率(%)	晚期凋亡率(%)	总凋亡率(%)
Control 组	2.23 $\pm$ 0.06	0.15 $\pm$ 0.05	2.38 $\pm$ 0.10
pcDNA3.1-NC 组	3.50 $\pm$ 0.10	0.32 $\pm$ 0.03	3.82 $\pm$ 0.12
过表达 PERK 组	3.83 $\pm$ 0.06	1.67 $\pm$ 0.08	5.50 $\pm$ 0.09
sh-NC 组	4.77 $\pm$ 0.08	0.65 $\pm$ 0.05	5.42 $\pm$ 0.12
干扰 PERK 组	13.53 $\pm$ 0.35	1.31 $\pm$ 0.11	14.85 $\pm$ 0.41
<i>F</i>	2 117.00	118 787.00	1 674.00
<i>P</i>	<0.001*	<0.001*	<0.001*

* $P < 0.05$ 。

3 讨论

CC 是癌症谱中第二大常见的恶性肿瘤, 宫颈上皮内瘤变(CIN II 级和CIN III 级)是CC 发展之前的前驱病变^[14-17]。针对 CC 的初始治疗方法包括传统的方法, 如手术、放化疗等^[18]。然而, 传统的治疗策略往往不能达到预期的治疗效果, 尤其是在慢性 CC 病例中。在癌症研究领域, ERS 通路是触发细胞凋亡的关键机制^[19]。细胞内微环境的异常导致 ER 功能障碍, 促进 PERK 表达^[8, 20]。PERK 是一类由丝/苏氨酸激酶结构域组成的 I 类跨膜蛋白, 可通过自磷酸化作用被激活。因此, PERK 的激活触发 eIF-2 α N 端丝氨酸 51 的磷酸化, 导致蛋白质翻译和合成的抑制, 从而增加 GRP78/PERK/CHOP 的释放^[21]。在基础状态下, GRP78 与 PERK 相互作用, 而在 ERS 条件下, GRP78 与 PERK 分离, PERK 发生磷酸化并诱导 CHOP 过表达。

本研究结果显示, 与正常宫颈组织相比, CC 组织 PERK、eIF-2 α 的表达更明显, 且与 CIN 病理分级呈正相关。研究发现, CC 组织中 ERS 相关蛋白 GRP78、Calpain2 表达均有不同程度的表达增加, 进而促进 PERK 磷酸化, 增加 CHOP 活化, 抑制抗凋亡相关基因 Bcl-2 和增强凋亡相关

蛋白 Caspase-12 表达^[22]。基于此, 本研究结果提示 PERK/eIF-2 α 异常高表达可能与 CC 的发生发展有关。

Zhang 等^[23]研究表明, 铂通过调节 PERK/eIF-2 α /ATF4/CCAAT/CHOP 信号通路可影响肺癌细胞 A549 增殖、凋亡、迁移。本研究结果显示, 将过表达或干扰 PERK/eIF-2 α 的重组质粒分别转染至 HeLa 细胞后, 过表达组的细胞增殖活性升高、E-cadherin 荧光表达减弱, 而干扰组 HeLa 细胞增殖活性降低、E-cadherin 荧光表达增强。提示抑制 PERK/eIF-2 α 通路激活可抑制 CC 细胞的恶性增殖, 进而对 CC 病程起到抑制作用。

本研究具有一定的局限性。本研究样本量相对较小, 其中正常组仅 17 例, CIN 组和 CC 组的样本量也有限, 可能影响统计学效能和结果的稳定性。因此, 部分结果在外部人群中的推广性和普适性需要谨慎解读。同时该研究只基于细胞模型, 样本量小, 细胞系单一, 需要通过动物试验来全面评价其生物学功能。今后笔者还需要进行多中心、大样本的前瞻性研究, 以增强研究结论的可信度及临床应用价值。

综上所述, PERK/eIF-2 α 在宫颈癌组织中的表达水平与肿瘤的病理进展密切相关。上调 PERK/eIF-2 α 可促进宫颈癌细胞增殖, 并下调 E-cadherin 的表达; 相反, 抑制 PERK/eIF-2 α 的表

达可显著抑制上述生物学效应。本研究结果为开发安全、有效的宫颈癌靶向治疗药物提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] Buskwofie A, David-West G, Clare C A. A review of cervical cancer: Incidence and disparities[J]. *J Natl Med Assoc*, 2020, 112(2): 229–232.
- [2] Bertone F, Serusi E, Liscia D S, et al. Thyroid gland metastasis from endometrial carcinoma causing acute severe dyspnea[J]. *Ear Nose Throat J*, 2024, 103(3): NP142–NP144.
- [3] 徐海花, 孙蓬明. Toll 样受体与输卵管疾病 [J]. *中国生育健康杂志*, 2020, 31(3): 289–291.
- [4] 李海英, 蔡竞, 朱虹丽. 宫颈癌的临床治疗研究进展 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2020, 42(4): 419–422.
- [5] 李洵, 付晓霞, 樊丽伟, 等. 乔松素抑制人胃癌细胞系 AGS 增殖、迁移和侵袭的研究 [J]. *基础医学与临床*, 2022, 42(11): 1744–1749.
- [6] 李聪聪, 赵鹏, 秦燕勤, 等. 淫羊藿苷的药理活性研究进展 [J]. *中医学报*, 2020, 35: 781–786.
- [7] Chen H, Chen G M, Liu Y J, et al. Alpha-fetoprotein/endoplasmic reticulum stress signaling mitigates injury in hepatoma cells[J]. *Neoplasia*, 2021, 68(5): 983–993.
- [8] Izadpanah A, Willingham K, Chandrasekar B, et al. Unfolded protein response and angiogenesis in malignancies[J]. *Biochim Biophys Acta BBA Rev Cancer*, 2023, 1878(2): 188839.
- [9] Kumar A, Kumar N, Pathak Z, et al. Extra cellular matrix remodeling: An adjunctive target for spinal cord injury and intervertebral disc degeneration[J]. *Neurospine*, 2022, 19(3): 632–645.
- [10] Oakes S A. Endoplasmic reticulum stress signaling in cancer cells[J]. *Am J Pathol*, 2020, 190(5): 934–946.
- [11] Lemmer I L, Willemsen N, Hilal N, et al. A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders[J]. *Mol Metab*, 2021, 47: 101169.
- [12] 周琦, 吴小华, 刘继红, 等. 宫颈癌诊断与治疗指南(第四版)[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2018, 34(6): 613–622.
- [13] 中华医学会妇科肿瘤学分会. 中国宫颈癌及癌前病变诊疗指南(2022 年版)[J]. *中华妇产科杂志*, 2022, 57(4): 256–269.
- [14] Magaki S, Hojat S A, Wei B, et al. An introduction to the performance of immunohistochemistry[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1897: 289–298.
- [15] Hernandez I, Cohen M. Linking cell-surface GRP78 to cancer: From basic research to clinical value of GRP78 antibodies[J]. *Cancer Lett*, 2022, 524: 1–14.
- [16] Khan M, Sharma A, Hathorn T, et al. The mucosal manifestations of syphilis in the head and neck[J]. *Ear Nose Throat J*, 2025, 104(12): NP868–NP881.
- [17] Dhara V, Hoda N, Rajini B C, et al. Significance of cervical node necrosis in preoperative MRI as a prognostic indicator: Retrospective study of patients with SCC of tongue[J]. *J Oral Med Oral Surg*, 2021, 27(3): 43.
- [18] 刘红, 王增四, 高文, 等. 黄芪甲苷对 STZ 诱导糖尿病大鼠肾组织内质网应激及 CHOP 信号通路的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2021, 41(13): 1318–1323.
- [19] Yoo Y M, Joo S S. Melatonin can modulate neurodegenerative diseases by regulating endoplasmic reticulum stress[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2381.
- [20] 林善婷, 胡晓, 李来好, 等. 水产蛋白源生物活性肽研究进展 [J]. *大连海洋大学学报*, 2020, 35: 775–785.
- [21] 练毅, 宫丽荣, 余剑波, 等. 内质网应激介导的细胞凋亡与急性肺损伤的研究进展 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2021, 27(2): 3.
- [22] 童凯, 罗红兰. 洛铂通过 PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP 信号通路调节肺癌细胞 A549 的作用机制 [J]. *世界临床药物*, 2023, 44(8): 805.
- [23] 张超云, 费娜, 郝鹏飞, 等. 基于内质网应激探讨葛根芩连汤对非酒精性脂肪肝大鼠 PERK-eIF2 α 通路的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2024, 44(4): 384–390.