

·综述·

葡萄糖调节蛋白78在泌尿系肿瘤中的研究进展

赵越, 付伟金*

(广西医科大学第一附属医院 泌尿外科, 广西 南宁 530022)

中图分类号: R737.1

文献标识码: A

文章编号: 1674-7410(2021)03-0081-04

内质网(endoplasmic reticulum, ER)是细胞中蛋白质、类固醇、脂类的合成场所,对于细胞的活动和生存是不可缺少的。多种因素使ER稳态被打破,发生错误折叠和未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),在ER腔内聚集以及引起钙离子平衡紊乱,称为内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)。葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78, GRP78)作为一种分子伴侣,在蛋白质的折叠、转运过程和ERS反应中发挥重要作用。近年发现,GRP78在泌尿系肿瘤中过表达,可能与泌尿系肿瘤,如前列腺癌、肾细胞癌、膀胱癌的恶性生物学行为,如增殖、凋亡、侵袭等密切相关^[1-2],本文对GRP78表达在泌尿系肿瘤的研究进展作一综述。

1 GRP78 概述

GRP78最初是在无葡萄糖介质中培养鸡胚成纤维细胞的过程中发现,它是一种分子质量为78 000 kD的蛋白^[3]。GRP78是一种ER分子伴侣,是细胞为了适应ERS所产生的一种应激蛋白,主要参与ER蛋白转运、质量控制及ER相关蛋白降解、ERS调节及ER钙绑定等活动^[4]。GRP78结构可分为:①44 kD部分(N端):4个 α -螺旋形成1个裂缝,其底部具有ATP结合位点,具有ATPase活性;②18 kD部分:由4个反相平行的 β -折叠和1个 α -螺旋构成,是多肽的结合部位;③10 kD部分(C端):主要由 α -螺旋构成,为ATP活性调节域,具有高度保守的EEVD氨基酸序列。细胞接受相关因素包括组织缺氧、营养缺乏、酸中毒、化学中毒等刺激时,可诱导ERS发生,导致蛋白未折叠或错误折叠的蛋白堆积触发UPR^[5]。UPR属于细胞的自我保护反应,可促使细胞逐渐适应ERS作用,同时诱导和合成GRP78的反应

性增加,因此GRP78表达上调常被视为ERS的标志。

2 GRP78 在肿瘤中的表达及临床意义

研究证明,GRP78在肝癌、肺癌、胰腺癌、胃癌等多种恶性肿瘤组织中呈高表达,可能与肿瘤细胞的增殖、侵袭、诱导化疗耐药性、免疫逃逸等恶性生物学行为密切相关^[6-9]。YUAN等^[10]证实,GRP78可调控下游通路FAK和JNK蛋白,促进胰腺癌细胞浸润性生长。有研究发现,过表达GRP78可激活Akt/线粒体凋亡途径,诱导乳腺癌细胞对吉西他滨的化疗产生耐药性^[6,9,11]。获得性耐药性是索拉非尼治疗肝癌患者后出现的常见副作用,其机制仍有待进一步研究。LI等^[6]研究发现,肝癌患者血清和多种肝癌细胞系的细胞培养基中可检测到GRP78高表达,提示肝癌细胞可分泌GRP78,GRP78可促进索拉非尼在肝癌细胞体内外增殖并抑制其凋亡,下调EGFR表达可抑制GRP78诱导SRC和STAT3的磷酸化;EGFR高表达可增强GRP78诱导的SRC和STAT3的磷酸化,GRP78可调控EGFR/SRC/STAT3信号通路,从而促进肝癌细胞对索拉非尼的耐药性。

3 GRP78 在泌尿系肿瘤中的表达

3.1 GRP78在肾癌中的表达 FU等^[2]2010年率先开展GRP78表达与肾癌相关性的临床研究。RT-PCR结果示,不同肾癌细胞系GRP78 mRNA表达高于正常肾小管细胞,差异有统计学意义($P<0.001$);42例肾透明细胞癌(clear cell RCC, ccRCC)组织的GRP78 mRNA明显高于癌旁正常肾组织,差异有统计学意义($P<0.001$),GRP78 mRNA和蛋白高表达与肿瘤大小、临床分期显著相关($P<0.001$),与年龄、性别、细胞分级无关($P>0.05$),提示GRP78可能与肾癌发生、发展密切相关。

KAZUSHI等^[12]将小干扰RNA(small interfer-

*通信作者:付伟金, E-mail: fuwj66@aliyun.com

ing RNA, siRNA) GRP78转染肾癌RENCH细胞下调GRP78表达。RT-PCR检测UPR下游凋亡通路信号分子CHOP、EDEM1和ERDJ4 mRNA表达均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 提示RNA干扰下调GRP78表达后, 激活了肾癌细胞相关凋亡信号通路, 抑制细胞生长。研究进一步发现, siRNA-GRP78转染肾癌细胞系B16BL6、REN-CA、PAN02、Colon26, 可增加ERS诱导剂 tunicamycin、MG132和2-deoxyglucose对肾癌细胞的生长抑制, 提示siRNA-GRP78联合ERS诱导剂可能是一种潜在的肾癌治疗方法。

LIN等^[13]探讨GRP78表达对肾癌细胞周期的影响。RT-PCR和蛋白印迹检测(western blotting, WB)提示GRP78 mRNA和蛋白在4种肾癌细胞(VHL肾癌细胞系ACHN、Caki-1, 非VHL肾癌细胞系A498、786-O)均表达, 表达水平与VHL状态无关。转染siRNA-GRP78 48 h后, 肾癌细胞增殖均明显下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); siRNA-GRP78转染ACHN、A498细胞系后, 肾癌细胞群落数量、大小和细胞密度均受到抑制, 由UPR诱导的跨膜蛋白Herp表达增加, 差异有统计学意义(ACHN: $P<0.05$, A498: $P<0.001$), 提示GRP78表达下调可诱导肾癌细胞发生UPR和抑制生长。血清饥饿释放后, 阴性对照siRNA转染细胞的S期和G2/M期增加; 而siRNA-GRP78转染细胞保持在G1期, 表明抑制GRP78表达可阻滞肾癌细胞于G1期。转染siRNA-GRP78的肾癌ACHN细胞系, RT-PCR检测出细胞周期蛋白(D1、E1、E2)和细胞周期蛋白依赖激酶(CDK4和CDK6)均被抑制, 而对照组中蛋白酶体抑制剂MG132并不能增加上述细胞周期蛋白的表达水平, 提示GRP78下调所致的G1周期阻滞可能由G1/S转换相关细胞周期蛋白和CDK蛋白的所调控。

SHEN等^[14]通过软件辅助量化分析GRP78在ccRCC、肾周脂肪及癌旁正常肾组织中的差异表达。染色强度法显示, 68例ccRCC及癌旁正常组织间GRP78表达差异无统计学意义 ($P=0.12$)。选取ccRCC ($n=114$)和肾周脂肪 ($n=60$)纳入二元logistic分析, 两者GRP78的表达水平与ccRCC分级和肿瘤大小无关。研究结果与FU等^[7]的结论相反, 不认为GRP78表达可作为ccRCC的危险分层标记, 研究结果差异可能是因为ERS标记物峰值表达可能随癌症不同发展阶段而变化, 但不影响ERS作为肾

癌潜在治疗靶点。

3.2 GRP78在膀胱癌的表达 HUANG等^[15]探讨了GRP78在塞来昔布抑制膀胱癌细胞中的作用机制。100 μmol 塞来昔布与膀胱癌NTUB1、T24细胞共培养12、24 h后, 细胞G1期阻滞的比例明显多于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); WB检测CDK抑制剂蛋白p21和p27的表达显著增加。研究还探讨了塞来昔布和蛋白酶体抑制剂MG132对膀胱癌细胞的影响, 在低剂量MG132 (0.5 μmol 和1 μmol)下, 不影响细胞活力, 而塞来昔布和MG132联合使用可促进膀胱癌细胞凋亡以及半胱氨酸蛋白酶分解, 提示蛋白酶体抑制剂MG132可促进塞来昔布诱导UPR, 增强ERS相关的细胞凋亡。而塞来昔布类似物LM-1685对膀胱癌细胞无明显抑制作用, 也未检测出ERS相关蛋白表达。转染siRNA-GRP78后, LM-1685可显著诱导膀胱癌细胞凋亡, 提示GRP78可能参与调控膀胱癌细胞的增殖, 可能是一个治疗膀胱癌的良好靶点。

3.3 GRP78在前列腺癌的表达 POORTAKUL等^[16]研究GRP78表达在前列腺癌进展和去势抵抗中的作用。219例前列腺癌pT₃N₀M₀患者, 根据术前情况, 分为未接受雄激素治疗组、雄激素治疗组和去势抵抗组。GRP78表达百分比与去势抵抗状态密切相关 ($P<0.05$); 去势抵抗组GRP78表达百分比及染色强度均显著高于其他两组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。未接受雄激素治疗组, 前列腺癌GRP78高表达与高复发风险和低生存率相关 ($P<0.05$)。GRP78表达上调与前列腺癌去势抵抗的发展有关, 可能作为预测pT₃期前列腺癌患者复发的重要预后指标。

DANESHMAND等^[17]的研究中也证实了GRP78可作为合并淋巴结转移前列腺癌患者的预后指标。免疫组化检测GRP78在前列腺癌、淋巴结转移灶、癌旁正常前列腺组织中的表达差异, 结果显示, GRP78的表达强度依次为前列腺癌组织>淋巴结转移灶>癌旁正常前列腺组织。与低表达的GRP78患者相比, 高表达GRP78的前列腺癌患者有更高的临床复发风险和死亡风险(相对风险值=2.0, $P<0.05$; 相对风险值=1.8, $P<0.05$)。

CULTRARA等^[18]探讨GRP78表达对前列腺癌细胞上皮间质变(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)信号通路相关蛋白的影响, siRNA-GRP78转染前列腺癌PC-3细胞后, EMT相关蛋白N-cad蛋白及E-cad蛋白的表达显著下降, 同时

TGF- β 1表达显著上调, Snail-2表达水平也高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); E-cad下调可能与GRP78沉默诱导Snail-2表达升高有关, 提示GRP78可能是前列腺癌中调控EMT通路相关蛋白的重要调节因子。

ZHANG等^[19]制备了一种新型的LCP-RGD纳米颗粒给药系统(RGD-PEG-DSPE/DOPA/CaP), 原理是将siRNA-GRP78压缩到其CaP核心, 并将DTXL装载到其脂质层, 靶向前列腺癌新生血管部位。PC-3细胞悬液接种BALB/c雌性小鼠, 随机分为5组, 分别予PBS、游离DTXL、游离siRNA、游离DTXL+游离siRNA、纳米颗粒给药系统(DTXL+siRNA)治疗, 每3 d治疗1次, 总疗程24 d。测定GRP78 mRNA表达水平, 与游离siRNA组(基因表达水平为0.83)相比, 纳米颗粒给药系统siRNA有高效的基因沉默效果, 表达水平仅为0.34。上述五组细胞G2/M期阻滞的比例分别为18.0%、23.2%、19.7%、24.1%和30.4%, 细胞总凋亡率分别为1.9%、17.7%、2.5%、37.1%和66.4%。对照其他三组, 纳米颗粒给药系统(DTXL+siRNA)对G2/M细胞周期停滞和细胞诱导凋亡作用最显著, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 实验证实纳米颗粒运载DTXL和siRNA-GRP78可诱导细胞周期停滞和凋亡诱导。

4 小结

GRP78在泌尿系肿瘤, 如前列腺癌、膀胱癌、肾癌呈高表达, 与肿瘤增殖、转移、耐药等恶性生物学行为密切相关, 提示其可能是一个良好的生物学标志物和治疗靶点。GRP78联合新型纳米颗粒给药系统的初步成功, 也为抗肿瘤治疗提供了新的方向和希望。但目前关于GRP78在泌尿系肿瘤的相关研究大多数为基础研究, 具体作用机制需要进一步探讨, 还需要大规模、多中心、随机对照研究证实其临床有效性。相信随着研究的深入, GRP78可能成为泌尿系肿瘤一个有效的治疗靶点和预后标志物。

参考文献:

- [1] WU CT, WANG WC, CHEN MF, et al. Glucose-regulated protein 78 mediates hormone-independent prostate cancer progression and metastasis through maspin and COX-2 expression [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(1):195-204.
- [2] FU W, WU X, LI J, et al. Upregulation of GRP78 in renal cell carcinoma and its significance [J]. *Urology*, 2010, 75(3):603-607.
- [3] LITTLE E, RAMAKRISHNAN M, ROY B, et al. The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 1994, 4(1):1-18.
- [4] IBRAHIM IM, ABDELMALEK DH, ELFIKY AA. GRP78: A cell's response to stress [J]. *Life Sci*, 2019, 226:156-163.
- [5] PFAFFENBACH KT, LEE AS. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(2):150-156.
- [6] LI R, YANJIAO G, WUBIN H, et al. Secreted GRP78 activates EGFR-SRC-STAT3 signaling and confers the resistance to sorafenib in HCC cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12):19354-19364.
- [7] FU Y, LEE AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(7):741-744.
- [8] 王红兵, 陈卫昌. 胃癌患者外周血与胃癌组织中ERCC1基因甲基化的关系及其意义[J]. *中国癌症杂志*, 2013, 23(11):900-903.
- [9] RUI L, GU YJ, HE WB, et al. Secreted GRP78 activates EGFR-SRC-STAT3 signaling and confers the resistance to sorafenib in HCC cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12):19354-19364.
- [10] YUAN XP, DONG M, LI X, et al. GRP78 promotes the invasion of pancreatic cancer cells by FAK and JNK [J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 398(1-2):55-62.
- [11] XIE, TAO ZH, ZHAO J, et al. Glucose regulated protein 78 (GRP78) inhibits apoptosis and attenuates chemosensitivity of gemcitabine in breast cancer cell via AKT/mitochondrial apoptotic pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 474(3):612-619.
- [12] KAZUSHI M, CHIKA S, SHIGERU K, et al. Inhibition of cancer cell growth by GRP78 siRNA lipoplex via activation of unfolded protein response [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(4):648-653.
- [13] LIN JA, FANG SU, SU CL, et al. Silencing glucose-regulated protein 78 induced renal cell carcinoma cell line G1 cell-cycle arrest and resistance to conventional chemotherapy [J]. *Urol Oncol*, 2014, 32(1):29.e1-11.
- [14] SHEN KY, VESEY DA, ELLIS RJ, et al. GRP78 expression in tumor and perinephric adipose tissue is not an optimal risk stratification marker for clear cell renal cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2019, 14(1):e0210246.
- [15] HUANG KH, KUO KL, CHEN SC, et al. Down-regulation of glucose-regulated protein (GRP) 78 potentiates cytotoxic effect of celecoxib in human urothelial carcinoma cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e33615.
- [16] POOTRAKUL L, DATAR RH, SHI SR, et al. Expression of stress response protein Grp78 is associated with the development of castration-resistant prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(20Pt1):5987-5993.
- [17] DANESHMAND S, QUEK ML, LIN E, et al. Glucose-

regulated protein GRP78 is up-regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival [J]. Hum Pathol, 2007,38(10):1547-1552.

[18] CULTRARA CN, KOZUCH SD, RAMASUNDARAM P, et al. GRP78 modulates cell adhesion markers in prostate Cancer and multiple myeloma cell lines [J]. BMC

Cancer, 2018,18(1):1263.

[19] ZHANG X, HE Z, XIANG L, et al. Codelivery of GRP78 siRNA and docetaxel via RGD-PEG-DSPE/DO-PA/CaP nanoparticles for the treatment of castration-resistant prostate cancer [J]. Drug Des Devel Ther, 2019,13:1357-1372.

(上接第80页)

皮肾镜组低,但术后4周复查时两组的结石清除率差异无统计意义,提示输尿管软镜受术中通道的影响,短期结石清除率要相对低,因此术前应尽量提前告知患者,并嘱患者术后积极排石治疗。本研究软镜组出现2例菌血症病例,手术时间均超过2 h,提示软镜手术中应严格控制手术时间,最好手术时间控制在90 min之内,同时多囊肿患者因囊肿原因,收集系统容易压迫,增加了术后感染发生率。手术中通道直径更小,术中容易出现压力过高的情况,因此多囊肾患者术前尽量行输尿管支架预扩张,术中尽量选择直径较大的输尿管鞘,控制手术时间,术后加强抗感染,并严密监测术后全身感染的可能,必要时采用分期输尿管软镜碎石治疗^[16]。

综上,输尿管软镜碎石术治疗多囊肾合并上尿路结石安全有效,手术创伤小,并发症少,与经皮肾镜相比有更好的安全性,应注重术后排石的整体治疗,并重视围手术期感染的防治,避免出现严重并发症。

参考文献:

[1] SUM H, ZHANG Z, HUANG G, et al. Fluoroscopy versus ultrasonography guided mini-percutaneous nephrolithotomy in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. Urolithiasis, 2017,45(3):297-303.
[2] 刘婧,王芳,吕文涛,等.尿常规检查对尿路感染的诊断价值分析[J].国际检验医学杂志,2016,37(14):1994-1995.
[3] 王少刚,余斌.经皮肾镜碎石术—日间手术新探索[J].北京大学学报(医学版),2017,39(5):753-755.
[4] 李建兴,肖博.经皮肾镜手术通道的发展与创新[J].临床泌尿外科杂志,2020,35(9):679-683.
[5] 叶章群,曾国华.软性输尿管镜术中国专家共识[J].中华泌尿外科

杂志,2016,37(8):561-565.

[6] MUFTI UB, NALAGATLA SK. Nephrolithiasis in autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. J Endourol, 2010,24(10):1557-1561.
[7] BAISHYA R, DHAWAN DR, KURIEN A, et al. Management of nephrolithiasis in autosomal dominant polycystic kidney disease—A single centre experience [J]. Urol Ann, 2012,4:29-33.
[8] GRAMPSAS SA, CHANDHOKE PS, FAN J, et al. Anatomic and metabolic risk factors for nephrolithiasis in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. Am J Kidney Dis, 2000,36(1):53-57.
[9] DELAKAS D, DASKALOPOULOS G, CRANIDIS A. Extracorporeal shock wave lithotripsy for urinary calculi in autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. J Endourol, 1997,11(3):167-170.
[10] 郭军,丁瑜,李晓燕.低能量、低剂量体外震波碎石术治疗多囊肾合并肾结石[J].宁夏医科大学学报,2014,10(36):1161-1162.
[11] 韩见知,吴开俊.体外冲击波碎石技术[M].北京:人民卫生出版社,2004:11-13
[12] PRADÈRE B, DOIZI S, PROIETTI S, et al. Evaluation of Guidelines for Surgical Management of Urolithiasis [J]. J Urol, 2018,199(5):1267-1271.
[13] ZHANG J, ZHANG J, XING N. Polycystic kidney disease with renal calculi treated by percutaneous nephrolithotomy: a report of 11 cases [J]. Urol Int, 2014,92(4):427-432.
[14] 杨炜青,李逊,何永忠,等.输尿管软镜与微创经皮肾镜治疗多囊肾合并肾结石的疗效比较[J].中华腔镜泌尿外科杂志(电子版),2016,10(3):5-8.
[15] 伦晓璐,王永传,周海军,等.输尿管软镜钬激光碎石术治疗2~4 cm肾结石临床疗效观察[J].微创泌尿外科杂志,2020,9(4):245-249.
[16] 许长宝,张一帆.要高度重视输尿管软镜术的术前准备[J].现代泌尿外科杂志,2019,24(3):173-177.