

·基础研究·

## 具核梭杆菌诱导内质网应激相关蛋白 GRP78 及 XBP1 高表达在食管鳞癌中的临床意义

陈斯默<sup>1</sup>, 张哲源<sup>2</sup>, 张家豪<sup>1</sup>, 何珂瑶<sup>1</sup>, 刘怡文<sup>2</sup>, 周福有<sup>1,3</sup>

(1. 新乡医学院第三附属医院胸外科, 河南 新乡, 453003; 2. 河南科技大学临床医学院//河南科技大学第一附属医院//河南省肿瘤表观遗传重点实验室//河南省微生态与食管癌防治重点实验室, 河南 洛阳, 471003; 3. 安阳市肿瘤医院胸外科//河南省食管癌精准防治医学重点实验室, 河南 安阳 455000)

**摘要:**【目的】分析食管鳞癌(ESCC)中具核梭杆菌(Fn)对内质网应激相关蛋白葡萄糖调节蛋白78(GRP78)及X盒结合蛋白1(XBP1)的诱导效应,并探讨其潜在机制及临床意义。【方法】采用Fn感染ESCC细胞KYSE150及KYSE140不同时间(12 h、24 h及48 h),通过氧化应激指标试剂盒及Western blot检测各组细胞中氧化应激指标(ROS、MDA与SOD)及GRP78与XBP1的表达情况。实验分为Fn组,Fn+siNC1组,Fn+siGRP78组,Fn+siNC2组及Fn+siXBP1组,比较各组细胞中氧化应激指标、紫杉醇(PTX)应答效力、增殖、侵袭及转移能力差异。采用RNA scope及免疫组化法检测234例ESCC组织及癌旁组织中Fn感染及GRP78与XBP1的表达情况。利用卡方检验分析各因素与患者临床病理特征之间的相关性。采用Kaplan-Meier生存分析比较各因素对患者生存期的影响。【结果】与Fn未感染的KYSE150及KYSE140组细胞相比,Fn感染组(12 h、24 h及48 h)细胞中ROS与MDA含量逐渐增加,SOD活性逐渐降低,且GRP78及XBP1表达量逐渐增高(均 $P < 0.05$ )。与Fn组、Fn+siNC1组及Fn+siNC2组相比,Fn+siGRP78组及Fn+siXBP1组细胞中ROS与MDA含量减少,SOD活性增强,PTX应答效力增强,增殖、侵袭及转移能力减弱(均 $P < 0.05$ )。ESCC组织中Fn感染率、GRP78及XBP1阳性率分别为43.16%、69.66%及60.68%,三者具有显著一致性( $P < 0.05$ )。Fn感染阳性、GRP78及XBP1高表达的患者多为有吸烟、饮酒史的男性患者,且肿瘤分化程度低、浸润程度深、淋巴结转移率高、临床分期多为III/IV期。三者阳性组的患者5年生存期均缩短( $P < 0.05$ )。【结论】Fn可通过诱导GRP78及XBP1高表达,引发内质网应激,促进ESCC恶性演进。

**关键词:**食管鳞癌;具核梭杆菌;内质网应激;葡萄糖调节蛋白78;X盒结合蛋白1;预后

**中图分类号:**R735 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2023)03-0403-13

**DOI:**10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).20230409.001

### Clinical Significance of High Expression of Endoplasmic Reticulum Stress-related Proteins Glucose-regulating Protein 78 and X-box Binding Protein 1 induced by *Fusobacterium Nucleatum* in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

CHEN Si-mo<sup>1</sup>, ZHANG Zhe-yuan<sup>2</sup>, ZHANG Jia-hao<sup>1</sup>, HE Ke-yao<sup>1</sup>, LIU Yi-wen<sup>2</sup>, ZHOU Fu-you<sup>1,3</sup>

(1. Department of Thoracic Surgery, The Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; 2. College of Clinical Medicine of Henan University of Science and Technology // The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology // Henan Key Laboratory of Cancer Epigenetics // Henan Key Laboratory of Microbiome and Esophageal Cancer Prevention and Treatment, Luoyang 471003, China; 3. Department of Thoracic Surgery, Anyang Tumor Hospital // Henan Key Laboratory of Precision Medicine for Prevention and Treatment of Esophageal Cancer, Anyang 455001, China)

Correspondence to: ZHOU Fu-you; E-mail: ayzhoufuyou@163.com

收稿日期:2022-11-08

基金项目:河南省科技攻关计划项目(212102310670);河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20200811,SBGJ202103099);安阳市重大科技专项(ZDKJJH2020006, 2022A02SF002)

作者简介:陈斯默,硕士,医师,研究方向:消化道肿瘤的临床与基础研究,E-mail:56756950@qq.com;周福有,通信作者,博士,教授,主任医师,E-mail: ayzhoufuyou@163.com

**Abstract:** 【Objective】 To analyze the induction effect of *Fusobacterium nucleatum* (Fn) on endoplasmic reticulum stress-related proteins Glucose-regulating protein 78 (GRP78) and X-box binding protein 1 (XBP1) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), and to explore its potential mechanism and clinical significance. 【Methods】 ESCC cells KYSE150 and KYSE140 were infected with Fn for 12 h, 24 h and 48 h. The oxidative stress indexes (ROS, MDA and SOD) and the expression of GRP78 and XBP1 in each group were detected by oxidative stress index kit and Western blot. The experiment was divided into Fn groups, Fn+siNC1 groups, Fn+siGRP78 groups, Fn+siNC2 groups and Fn+siXBP1 groups; the oxidative stress indexes, paclitaxel (PTX) response efficacy, abilities of proliferation, invasion and metastasis in each group were compared. The infection of Fn and the expression of GRP78 and XBP1 in 234 ESCC and paracancerous tissues were detected by RNA scope and immunohistochemistry. The correlation between each factor and clinicopathological characteristics of patients was analyzed by Chi-square test. The influence of each factor on the survival of patients was compared by Kaplan-meier survival estimate. 【Results】 Compared with Fn uninfected KYSE150 and KYSE140 cells, the content of ROS and MDA was gradually increased, the activity of SOD was gradually decreased, and the expression of GRP78 and XBP1 was gradually increased in Fn infected groups (12 h, 24 h and 48 h) ( $P < 0.05$ ). Compared with Fn groups, Fn+siNC1 groups, and Fn+siNC2 groups, ROS and MDA contents were decreased, SOD activity was increased, PTX response efficacy was enhanced, and abilities of proliferation, invasion and metastasis were decreased in Fn+siGRP78 and Fn+siXBP1 groups ( $P < 0.05$ ). The rates of Fn, GRP78 and XBP1 in ESCC tissues were 43.16%, 69.66% and 60.68%, respectively. And the three indexes were significantly consistent ( $P < 0.05$ ). The patients with positive Fn infection and high expression of GRP78 and XBP1 were mostly males with a history of smoking and drinking, and the tumor differentiation degree was low, the invasion degree was deep, the lymph node metastasis rate was high, and the clinical stage was mostly stage III/IV. The 5-year survival time of patients with above positive indexes was shortened ( $P < 0.05$ ). 【Conclusions】 Fn could induce endoplasmic reticulum stress by inducing the high expression of GRP78 and XBP1, and promote the malignant evolution of ESCC.

**Key words:** esophageal squamous cell carcinoma; *fusobacterium nucleatum*; endoplasmic reticulum stress; GRP78; XBP1; prognosis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(3): 403-415]

食管癌是临床上常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率极高,我国主要以食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)为主<sup>[1]</sup>。ESCC病因不明,早期临床症状隐匿,缺乏有效预防措施和筛查方法,多数患者确诊时已发展至中晚期<sup>[2]</sup>。本团队前期研究已证实,ESCC中具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*, Fn)的长期定植不仅可激活炎症相关信号通路及增强癌细胞葡萄糖代谢,还可重塑肿瘤免疫微环境,导致机体抗肿瘤免疫失能,降低癌细胞对化疗药物的敏感性,显著缩短患者生存期<sup>[3-5]</sup>。因此,Fn感染可促进ESCC的恶性演进。研究表明,肿瘤的发生发展与自身内质网功能密切相关<sup>[6]</sup>。内质网是真核细胞中蛋白质合成、加工、折叠的重要场所。病原微生物入侵可诱导活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)大量富集,引起错误折叠蛋白积聚,诱发内质网应激<sup>[7]</sup>。其中,葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated proteins 78,

GRP78)及X盒结合蛋白1(X-box binding protein 1, XBP1)为内质网应激的关键调节因子,其高表达可促进多种肿瘤的发生发展<sup>[8]</sup>。乳腺癌、前列腺癌及结直肠癌中GRP78及XBP1的异常活化,可促进癌细胞恶性增殖及远处转移<sup>[9-11]</sup>。因此,推测Fn可能通过激活GRP78及XBP1,诱发内质网应激,促进ESCC恶性进展。本研究首先通过Fn感染ESCC细胞,初步分析Fn对ESCC细胞的氧化应激水平及内质网应激标志蛋白GRP78及XBP1的调控作用。然后检测234例ESCC组织中Fn感染及GRP78与XBP1的表达情况,并分析各因素与患者临床病理特征及生存期之间相关性,为ESCC防治提供新思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 一般资料

本研究选取2015年1月至2017年1月安阳市

肿瘤医院胸外科手术切除的ESCC患者癌组织及相应癌旁组织石蜡包埋标本为研究对象。于术前获得患者知情同意,且经安阳市肿瘤医院伦理委员会

审核批准(批件号:2022WZ14K01)。图1为本研究ESCC患者的入组标准及临床病理特征。最终纳入234例ESCC患者。

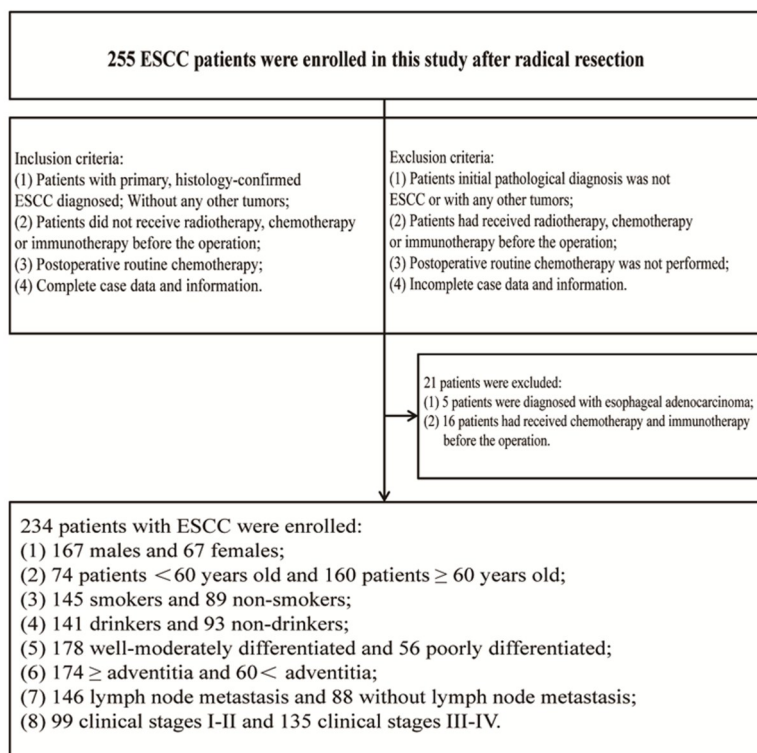


图1 本研究ESCC患者的入组标准及临床病理特征

Fig. 1 Inclusion criteria and clinicopathological characteristics of ESCC patients in this study

## 1.2 主要试剂与仪器

ESCC细胞系 KYSE150 及 KYSE140, Fn 菌株 ATCC 25586(本实验室冻存);氧化应激指标检测试剂盒(中国 Njcbio 公司);RPMI-1640 培养基及胎牛血清(美国 Gibco 公司);RNAscope 试剂盒及 Fn 特异性探针(美国 ACD 公司);GRP78、XBP1 及 GAPDH 兔抗人单克隆抗体,山羊抗兔 IgG(英国 Abcam 公司);PVDF 膜(美国 Millipore 公司);免疫组化试剂盒(中国 ZSGB-BIO 公司);BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 发光显影液、CCK8 试剂盒、甲醛、结晶紫、柠檬酸抗原修复液及 DAB 显色液(中国 Solarbio 公司);siGRP78(序列信息:5'-GCCTAAATGTTAT-GAGGATCA-3')及 siNC1(序列信息:5'-GTTCTCC-GAACGTGTCACGT-3')、siXBP1(序列信息:5'-CCAAGCUGGAAGCCAUAATT-3')及 siNC2(序列信息:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3')(上海吉玛基因公司);Lipofectamine2000(美国 Invitrogen 公司)。厌氧工作站(美国 COY 公司);酶标

仪(美国 PerkinElmer 公司);凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司);光学显微镜(日本 Nikon 公司)。

## 1.3 Fn 感染 ESCC 细胞

厌氧工作站中常规培养 Fn。37℃,体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中常规培养 ESCC 细胞 KYSE150 及 KYSE140(培养基为含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640)。待 ESCC 细胞密度为 70% 时,将对数生长期的 Fn(Fn 菌液 OD<sub>600 nm</sub> =1~2)加入细胞培养基(感染复数 MOI=10),感染不同时间,进行后续实验。具体细胞及细菌培养方法参照本课题组前期研究<sup>[12]</sup>。

## 1.4 各组细胞中 GRP78 及 XBP1 表达量的检测

提取各组细胞新鲜蛋白后,用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。每泳道 30 μg 总蛋白,于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转移至 PVDF 膜。含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h。GRP78、XBP1 及 GAPDH 抗体(按 V<sub>-抗</sub>:V<sub>TBST</sub>=1:1 000 稀释)4℃孵育过夜。山羊抗兔 IgG(V<sub>-抗</sub>:V<sub>TBST</sub>=1:2 000 稀

释)孵育2 h。用ECL发光显影液于凝胶成像系统中检测目的蛋白条带。用Image Lab软件测定蛋白条带灰度值。以目的蛋白与GAPDH蛋白灰度值比值为最终GRP78及XBP1相对表达量<sup>[13-14]</sup>。实验重复3次。

### 1.5 各组细胞中氧化应激指标的检测

采用ROS试剂盒检测各组细胞中ROS水平,取1组荧光值为1,其余各组与之比较,得出相对ROS含量,具体步骤参考说明书及文献<sup>[15]</sup>。采用丙二醛(malondialdehyde, MDA)及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒检测各组细胞培养上清中MDA含量及SOD活性,具体步骤参考说明书及文献<sup>[15]</sup>。实验重复3次。

### 1.6 建立GRP78及XBP1敲降的ESCC细胞系

常规培养ESCC细胞KYSE150及KYSE140,将两株细胞各分为5组:Fn组,Fn+siNC1组,Fn+siGRP78组,Fn+siNC2组,Fn+siXBP1组。待各组细胞密度为70%时,按1.3中方法将Fn加入细胞培养基(感染复数MOI=10)。按分组,将siNC1、siGRP78、siNC2及siXBP1按照Lipofectamine2000转染说明书对细胞分别进行转染。48h后,检测GRP78及XBP1的敲降效率,并进行后续实验,具体步骤参照说明书及文献<sup>[16-17]</sup>。

### 1.7 CCK8法检测各组细胞的紫杉醇应答效力

各组细胞均于96孔板中铺入每孔 $1 \times 10^3$ 个细胞,至培养箱常规培养24 h。每组均设置1个对照组及不同浓度实验组,按浓度分组加入紫杉醇(paclitaxel, PTX),培养24 h。具体步骤参照本课题组前期研究<sup>[12]</sup>。每孔加入CCK8试剂10  $\mu$ L,1 h后更换为新鲜培养基。酶标仪测定 $OD_{450\text{nm}}$ 。对比不同组间的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC50)。实验重复3次。

### 1.8 平板克隆检测各组细胞的体外增殖能力

各组细胞均于6孔板中铺入每孔 $1 \times 10^3$ 个细胞,常规培养1周。甲醛固定2 h、结晶紫染色10 min,拍照并计数克隆数。具体步骤参照文献<sup>[18]</sup>。实验重复3次。

### 1.9 Transwell法检测各组细胞的体外侵袭能力

Matrigel胶包被Transwell小室基底膜。各组细胞均以无血清RPMI-1640饥饿培养24 h后,分别于Transwell小室中铺入每孔 $1 \times 10^5$ 个细胞,并向下室加入600  $\mu$ L含10%胎牛血清的RPMI-1640,常规培养24 h。擦去小室上层细胞,甲醛固定2 h、结

晶紫染色10 min,拍照并计数穿过基底膜的细胞数。具体步骤参照文献<sup>[18]</sup>。实验重复3次。

### 1.10 划痕实验检测各组细胞的体外迁移能力

各组细胞均于6孔板中常规培养。待细胞密度为70%,用200  $\mu$ L无菌枪头划痕。至培养箱常规培养,每隔6 h对同一位置细胞拍照。用Image J软件测量并计算各组细胞的迁移面积。具体步骤参照文献<sup>[19]</sup>。实验重复3次。

### 1.11 RNAscope检测Fn感染情况

取常规石蜡包埋的ESCC组织及相应癌旁组织病理切片(片厚2  $\mu$ m),经脱蜡及水化后,采用RNAscope试剂盒中靶标修复液修复、双氧水及蛋白酶孵育。Fn探针4  $^{\circ}$ C孵育过夜。RNAscope显色试剂显色<sup>[12]</sup>。结果判定:ESCC组织的癌细胞及间质细胞胞浆中出现弥散性红色颗粒,为Fn的16S rRNA表达阳性。于高倍镜下( $\times 400$ )计数细胞内的红色颗粒数。本研究中,Fn感染阳性细胞判定标准:每个细胞中单独的红色颗粒 $\geq 8$ 个;Fn感染阳性样本判定标准:阳性细胞所占比例 $\geq 30\%$ 。阳性对照、阴性对照及评分细则见本课题组前期研究<sup>[3-5]</sup>。

### 1.12 ESCC组织中GRP78及XBP1蛋白表达的检测

取2张同批常规石蜡包埋的ESCC组织及相应癌旁组织连续切片(片厚2.5  $\mu$ m),经脱蜡、水化、抗原修复后,采用免疫组化试剂盒中的过氧化物酶阻断剂及山羊血清封闭。分别加入GRP78及XBP1( $V_{\text{抗}}:V_{\text{PBS}}=1:100$ 稀释)抗体4  $^{\circ}$ C孵育过夜。经试剂盒中的山羊抗兔聚合物及SP孵育后,采用DAB显色、苏木素复染、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。结果判读:ESCC细胞及间质细胞胞浆出现棕黄色或棕褐色颗粒为GRP78表达阳性;ESCC细胞及间质细胞胞核出现棕黄色或棕褐色颗粒为XBP1表达阳性。阳性对照、阴性对照及免疫组化评分标准参照本课题组前期研究<sup>[12]</sup>及参考文献<sup>[13-14]</sup>。

### 1.13 统计学方法

运用GraphPad 5.0及SPSS 26.0软件进行统计分析及绘图。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组以上组间各指标差异比较采用方差分析,并采用Bonferroni法进行两两比较。ESCC组织及癌旁组织中Fn、GRP78、XBP1阳性率的比较采用 $\chi^2$ 检验。三个指标间的一致性分析采用Cohen's kap-

pa 系数。三个指标与患者临床病理特征的相关性分析采用  $\chi^2$  检验。生存曲线绘制采用 Kaplan-Meier 法,生存时间差异分析采用 Log-rank 法。生存时间为入院时间至最后 1 次随访或死亡;随访时间为 60 个月;删失数据为随访至 60 个月仍存活的患者,未删失数据为由 ESCC 导致的死亡患者。检验水准  $\alpha=0.05$ ,  $P<0.05$  为具有统计学差异。

## 2 结果

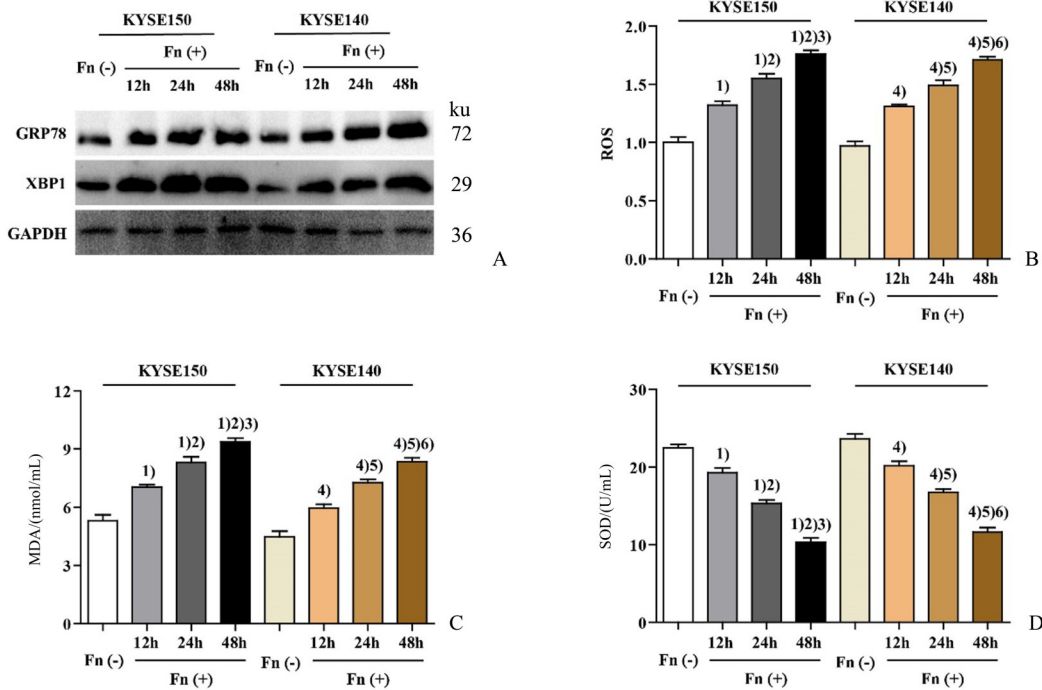
### 2.1 Fn 未感染与 Fn 感染的 ESCC 细胞中 GRP78 与 XBP1 表达量及氧化应激指标比较

将 KYSE150 及 KYSE140 各分为 4 组:Fn(-) 组,Fn(12 h)组,Fn(24 h)组,Fn(48 h)组。Fn(-) 组不感染 Fn,后三组分别感染 Fn 12 h、24 h 及 48 h。通过 Western blot 及氧化应激指标试剂盒检测各组细胞中 GRP78 与 XBP1 表达及氧化应激指标差异(图 2)。经单因素方差分析,KYSE150 及 KYSE140 的 4 组细胞间 GRP78 与 XBP1 表达量、ROS 与 MDA

含量及 SOD 活性的差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );采用 Bonferroni 法进一步作两两比较,发现 KYSE150 及 KYSE140 的 4 组细胞间上述各指标两两比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。提示 Fn 感染可诱导 ESCC 细胞中内质网应激标志蛋白 GRP78 及 XBP1 高表达,增强 ESCC 细胞的氧化应激水平并降低其抗氧化能力,且具有时间依赖性。

### 2.2 GRP78 及 XBP1 对 Fn 感染的 ESCC 细胞的氧化应激指标及 PTX 应答效力的影响

将 KYSE150 及 KYSE140 各分为 5 组:Fn 组,Fn+siNC1 组,Fn+siGRP78 组,Fn+siNC2 组,Fn+siXBP1 组。各组均感染 Fn 48 h。通过 Western blot 检测各组细胞中 GRP78 与 XBP1 表达的差异。(图 3)经单因素方差分析,Fn 组,Fn+siNC1 组与 Fn+siGRP78 组中 GRP78 表达的差异及 Fn 组,Fn+siNC2 组与 Fn+siXBP1 组中 XBP1 表达的差异均具有统计学意义;采用 Bonferroni 法进一步作两两比较,发现 Fn 组与 Fn+siNC1 组及 Fn+siNC2 组比较 GRP78 及 XBP1 表达的差异均无统计学意义;Fn+



A: The protein expressions of GRP78 and XBP1 in each group were detected by Western blot; B: ROS kit was used to detect the relative content of ROS in each group; C: MDA kit was used to detect the content of MDA in each group; D: SOD kit was used to detect SOD activity in each group. KYSE150: 1), 2) and 3) respectively represent compared with Fn(-) group, Fn infection 12 h group, and Fn infection 24 h group,  $P<0.05$ ; KYSE140: 4), 5) and 6) respectively represent compared with Fn(-) group, Fn infection 12 h group, and Fn infection 24 h group,  $P<0.05$ .

图 2 Fn 未感染与 Fn 感染的 ESCC 细胞中 GRP78 与 XBP1 表达量及氧化应激指标比较

Fig. 2 Comparison of GRP78 and XBP1 expressions and oxidative stress indicators in ESCC cells uninfected with Fn and infected with Fn

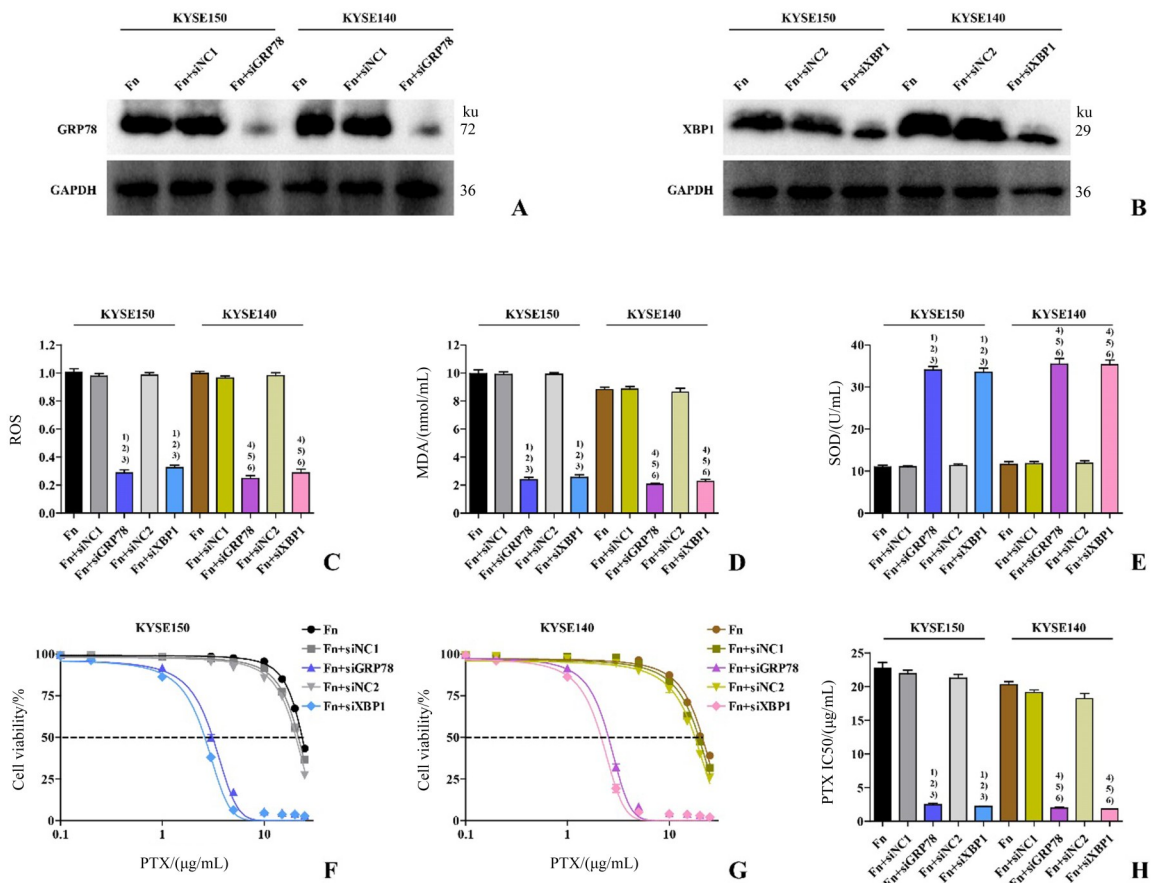
siGRP78组与Fn组及Fn+siNC1组比较GRP78表达的差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );Fn+siXBP1组与Fn组及Fn+siNC2组比较XBP1表达的差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。提示Fn+siGRP78组及Fn+siXBP1组细胞中GRP78与XBP1已有效敲降,成功建立敲降细胞系。

通过氧化应激指标试剂盒及CCK8法检测各组细胞中氧化应激指标及PTX IC50差异(图3)。经单因素方差分析,5组细胞中ROS与MDA含量、SOD活性及PTX IC50差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );采用Bonferroni法进一步作两两比较,发现Fn组、Fn+siNC1组与Fn+siNC2组间上述指标差异均无统计学意义;Fn+siGRP78组与Fn组、Fn+siNC1组与Fn+siNC2组间上述指标差异均具有统

计学意义( $P<0.05$ );Fn+siXBP1组与Fn组、Fn+siNC1组与Fn+siNC2组间上述指标差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );而Fn+siGRP78组与Fn+siXBP1组间上述指标差异均无统计学意义。提示GRP78及XBP1的敲降阻断了Fn对ESCC细胞氧化应激反应及PTX化疗抵抗的诱导作用。

### 2.3 GRP78及XBP1对Fn感染的ESCC细胞的增殖、侵袭及转移能力的影响

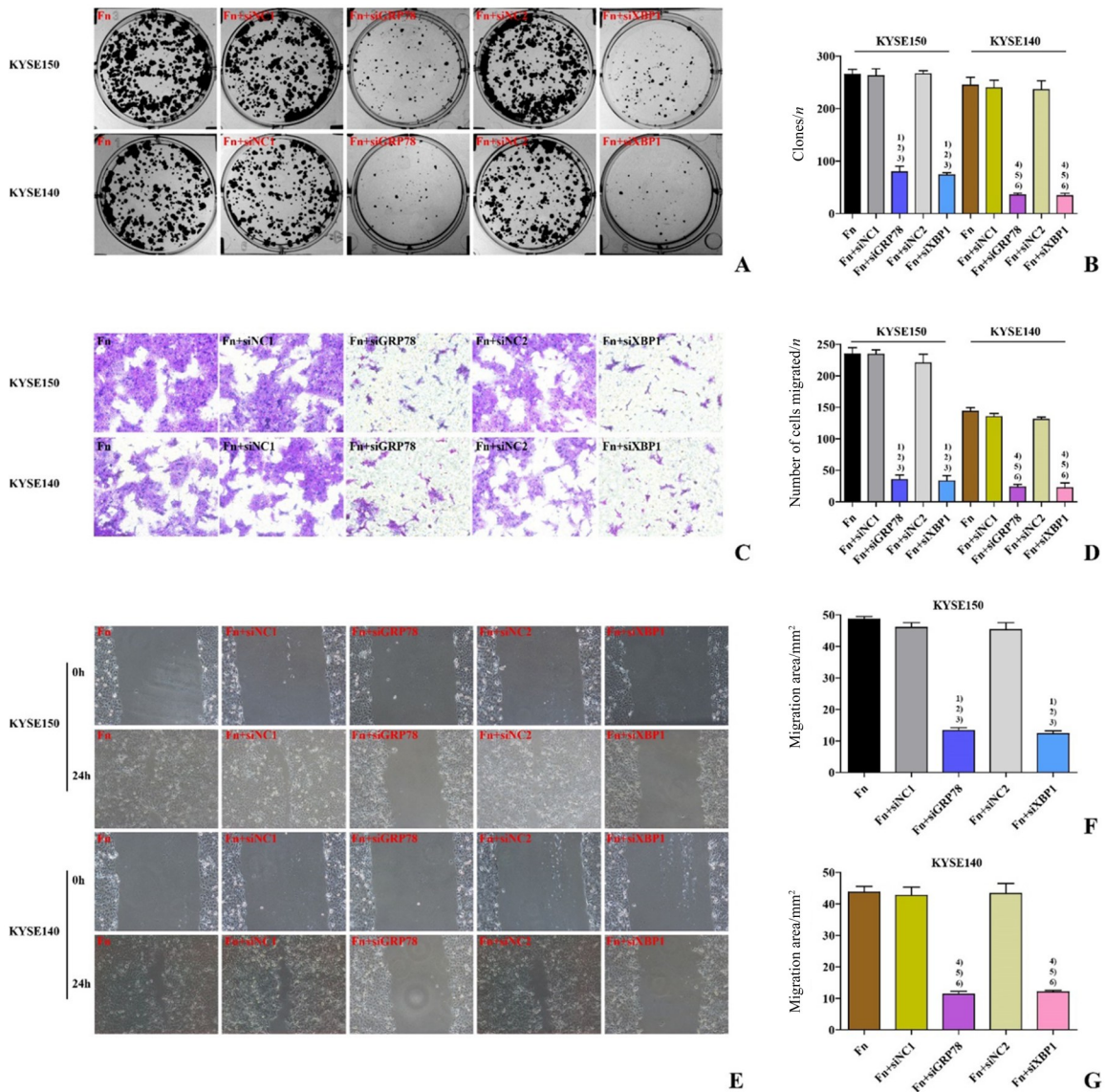
将KYSE150及KYSE140各分为5组:Fn组,Fn+siNC1组,Fn+siGRP78组,Fn+siNC2组,Fn+siXBP1组。通过平板克隆、transwell及划痕实验检测各组细胞的增殖、侵袭及转移能力差异(图4)。经单因素方差分析,5组细胞间上述能力的差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );采用Bonferroni法进一



A, B: The expressions of GRP78 and XBP1 proteins in each group were detected by Western blot; C: ROS kit was used to detect the relative content of ROS in each group; D: MDA kit was used to detect the content of MDA in each group; E: SOD kit was used to detect SOD activity in each group; F/G: PTX dose-response curves of the cells in each group; H: PTX IC50 in each group. KYSE150: 1), 2) and 3) respectively represent compared with Fn group, Fn+siNC1 group, and Fn+siNC2 group,  $P<0.05$ ; KYSE140: 4), 5) and 6) respectively represent compared with Fn group, Fn+siNC1 group, and Fn+siNC2 group,  $P<0.05$ .

图3 各组KYSE150及KYSE140细胞中GRP78、XBP1、氧化应激指标及PTX IC50的比较

Fig. 3 Comparison of GRP78, XBP1, oxidative stress indicators, and PTX IC50 in each group of KYSE150 and KYSE140 cells



A: The proliferation ability of each group in vitro was determined by plate cloning; B: Comparison of clones in each group; C: The invasion ability of each group in vitro was evaluated by transwell assay (200×); D: Comparison of cells migrated in each group; E: The migration ability of each group in vitro was detected by wound healing assay (200×); F/G: Comparison of migration area in each group. KYSE150: 1), 2) and 3) respectively represent compared with Fn group, Fn+siNC1 group, and Fn+siNC2 group,  $P < 0.05$ ; KYSE140: 4), 5) and 6) respectively represent compared with Fn group, Fn+siNC1 group, and Fn+siNC2 group,  $P < 0.05$ .

图4 各组 KYSE150 及 KYSE140 细胞增殖、侵袭及转移能力的比较

Fig. 4 Comparison of proliferation, invasion, and migration abilities in each group of KYSE150 and KYSE140 cells

步作两两比较,发现 Fn 组、Fn+siNC1 组与 Fn+siNC2 组间上述能力的差异均无统计学意义;Fn+siGRP78 组与 Fn 组、Fn+siNC1 组与 Fn+siNC2 组间上述能力的差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ );Fn+siXBP1 组与 Fn 组、Fn+siNC1 组与 Fn+siNC2 组间上述能力的差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ );而 Fn+siGRP78 组与 Fn+siXBP1 组间上述能力的差异均无统计学意义。提示 GRP78 及 XBP1 的敲降阻断了

Fn 对 ESCC 细胞恶性生物学行为的诱导作用。

#### 2.4 ESCC 组织中 Fn 感染及 GRP78 与 XBP1 表达检测

选择 234 例 ESCC 患者癌组织及癌旁组织连续切片为研究对象,采用 RNA scope 及免疫组化法检测组织中 Fn 感染及内质网应激相关蛋白 GRP78 与 XBP1 的表达情况,结果显示:ESCC 细胞及间质细胞胞浆出现弥散性红色颗粒,为 Fn 感染阳性(图

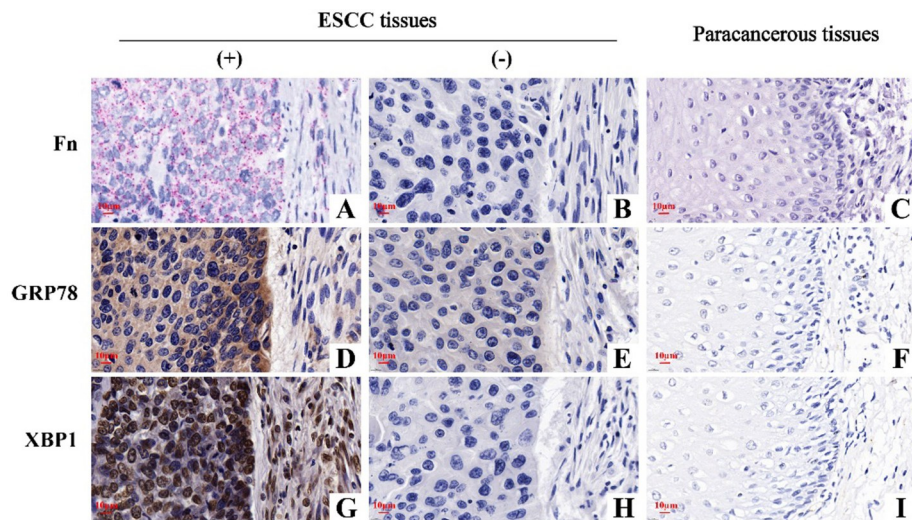
5A),而癌旁组织中Fn多为阴性感染(图5C与表1,  $P < 0.05$ );连续切片癌细胞及间质细胞胞浆出现棕黄色或棕褐色颗粒,为GRP78表达阳性(图5D),而癌旁组织中GRP78多为阴性表达(图5F与表1,  $P < 0.05$ );连续切片癌细胞及间质细胞胞核出现棕

黄色或棕褐色颗粒,为XBP1表达阳性(图5G),而癌旁组织中XBP1多为阴性表达(图5I与表1,  $P < 0.05$ );且癌组织中Fn感染率、GRP78及XBP1阳性率分别为43.16%、69.66%及60.68%,两两间具有一致性( $P < 0.05$ )。

表1 ESCC组织及癌旁组织中Fn、GRP78及XBP1阳性率的比较

Table 1 Comparison of positive rates of Fn, GRP78 and XBP1 in ESCC and paracancerous tissues [n(%)]

Groups	n	Positive samples		
		Fn	GRP78	XBP1
Cancer	234	101(43.16)	163(69.66)	142(60.68)
Paracancerous	234	19(8.12)	44(18.80)	41(17.52)
$\chi^2$		27.231	23.604	32.206
P		<0.001	<0.001	<0.001



A, D, G: Fn infection and GRP78 and XBP1 expression positive samples in ESCC tissues; B, E, H: Fn infection and negative expression of GRP78 and XBP1 in ESCC tissues; C, F, I: Fn infection and negative expression of GRP78 and XBP1 in paracancerous tissues. 400×

图5 ESCC组织及癌旁组织中Fn感染及GRP78与XBP1表达检测结果

Fig. 5 The detection results of Fn infection, GRP78 and XBP1 expressions in ESCC and paracancerous tissues

### 2.5 Fn感染、GRP78及XBP1高表达阳性组与阴性组ESCC患者临床病理特征的比较

采用卡方检验分析Fn感染、GRP78及XBP1表达与ESCC患者临床病理特征的相关性(表2),结果显示:Fn感染、GRP78及XBP1高表达的ESCC患者中,男性多于女性,有吸烟、饮酒史的患者多于无吸烟、饮酒史的患者,低分化的患者多于中-高分化的患者,肿瘤浸润深度侵及外膜的患者多于未侵及外膜的患者,有淋巴结转移的患者多于无淋巴结转

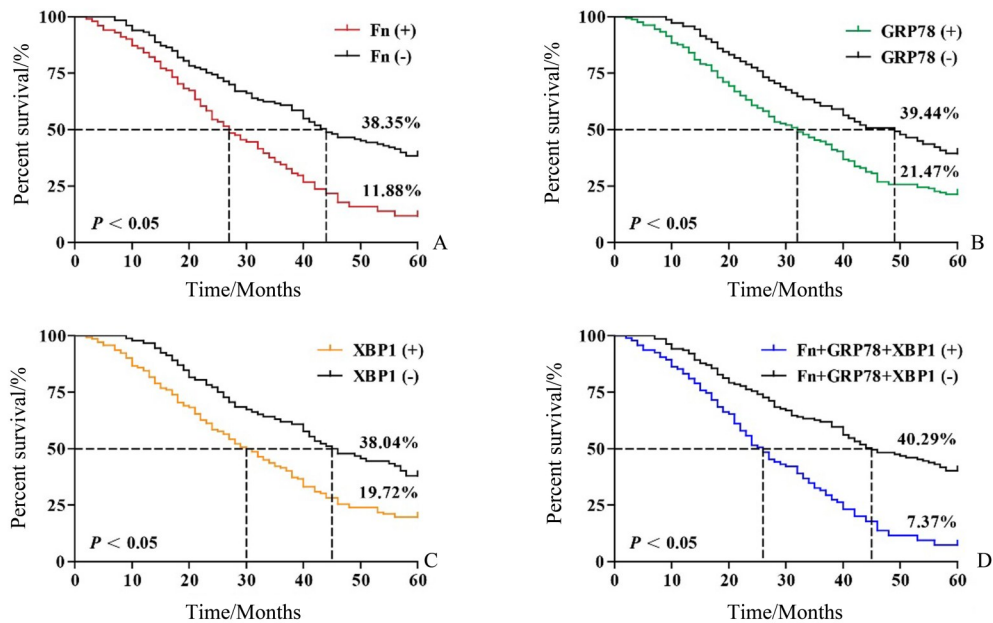
移的患者,临床分期为Ⅲ/Ⅳ期的患者多于Ⅰ/Ⅱ期的患者。

### 2.6 Fn感染、GRP78及XBP1高表达与ESCC患者生存期的相关性

将RNA scope及免疫组化结果里,3张连续切片中Fn感染、GRP78及XBP1表达同时判定为阳性的组织样本定义为Fn诱导内质网应激相关蛋白高表达阳性组,以Fn+GRP78+XBP1(+)表示(共95例);不满足3张连续切片同时阳性的归为阴性组,

以 Fn+GRP78+XBP1(-) 表示 (共 139 例)。分析各因素与 ESCC 患者 5 年生存期之间相关性。(图 6 及表 3) 结果显示: 234 例 ESCC 患者术后 5 年总生存率、平均及中位生存时间分别为 27.35%、(36.00±2.29) 个月, 其中 Fn(+ ) 组、GRP78(+ ) 组、XBP1(+ ) 组及 Fn+GRP78+XBP1(+ ) 组患者的术后 5 年生存

率及中位生存时间均低于阴性组患者, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与各指标阴性组患者中位生存时间相比, Fn(+ ) 组、GRP78(+ ) 组、XBP1(+ ) 组及 Fn+GRP78+XBP1(+ ) 组患者中位生存时间分别缩短了 17 个月、17 个月、15 个月及 19 个月。



A: 5-year survival curve of Fn infection positive and negative patients; B: 5-year survival curves of GRP78 positive and negative patients; C: 5-year survival curves of patients with positive and negative XBP1 expression; D: The 5-year survival curve of Fn+GRP78+XBP1 positive group and XBP1 negative group.

图6 各组 ESCC 患者术后 5 年 Kaplan-Meier 生存曲线

Fig. 6 The 5 year Kaplan-meier survival curve of ESCC patients in each group

### 3 讨论

ESCC 发病率和死亡率极高, 病因至今尚未完全明确, 多数患者确诊时已处于中晚期。因此, 探明 ESCC 病因, 寻找早期诊断指标与有效预防措施尤为重要。研究表明, 病原微生物的慢性感染可通过多种生物学机制促进恶性肿瘤的发生发展<sup>[3-5]</sup>。本团队前期研究发现, Fn 为口腔毒力最强的致病细菌之一, 可随吞咽唾液及血液循环定植于 ESCC 组织<sup>[5]</sup>。Fn 感染可促进 ESCC 细胞的恶性增殖及化疗抵抗, 且 Fn 感染阳性的 ESCC 患者预后不良<sup>[12]</sup>。因此, Fn 为 ESCC 的关键致病因素, 阐明 Fn 在 ESCC 中致病的分子机制对降低 ESCC 发病率及改善患者预后至关重要。

病原微生物对宿主微环境的重塑机制至今尚

未完全明确, 但多数可引起宿主细胞中 ROS 大量富集, 引发氧化应激反应, 促进多种肿瘤的发生发展及化疗耐受。幽门螺杆菌通过富集 ROS, 激活胃黏膜中 ROS-HIF-1-AQP3-ROS 环通路, 促进胃癌发生发展<sup>[20]</sup>; 人乳头瘤病毒通过富集 ROS, 产生羟基丁酸, 促进宫颈癌细胞恶性增殖<sup>[21]</sup>; 人类免疫缺陷病毒通过富集 ROS, 诱导 Twist 表达上调, 促进肿瘤远处转移<sup>[22]</sup>; 乙肝病毒通过富集 ROS, 引起 Snail 介导 SOCS3 的表观遗传沉默, 促进肝癌发生发展<sup>[23]</sup>; 人类疱疹病毒通过富集 ROS, 激活 mTOR/PI3K/AKT 通路, 促进鼻咽癌恶性演进<sup>[24]</sup>。本研究发现, 随 Fn 感染时间的延长, ESCC 细胞中 ROS 与 MDA 含量逐渐增加, 而 SOD 活性则逐渐降低。ROS 与 MDA 含量反应了细胞的氧化应激水平, 而抗氧化酶 SOD 活性反应了细胞清除氧自由基的能力。因

表2 Fn感染、GRP78及XBPI高表达阳性组与阴性组ESCC患者临床病理特征的比较  
Table 2 Comparison of clinicopathological features of ESCC patients with Fn, GRP78 and XBPI positive and negative groups

Clinical variables	n	Fn		$\chi^2$	P	GRP78		$\chi^2$	P	XBPI		$\chi^2$	P
		(+)	(-)			(+)	(-)			(+)	(-)		
Sex													
male	167	91(54.49)	76(45.51)	30.512	< 0.001	125(74.85)	42(25.15)	7.439	0.006	110(65.87)	57(34.13)	6.571	0.010
female	67	10(14.92)	57(85.08)			38(56.72)	29(43.28)			32(47.76)	35(52.24)		
Age													
<60	74	34(45.95)	40(54.05)	0.342	0.559	53(71.62)	21(28.38)	0.197	0.657	53(71.62)	21(28.38)	5.427	0.020
≥60	160	67(41.87)	93(58.13)			110(68.75)	50(31.25)			89(55.63)	71(44.37)		
Smoking													
positive	145	91(62.76)	54(37.24)	59.676	< 0.001	108(74.48)	37(25.52)	4.199	0.040	98(67.59)	47(32.41)	7.613	0.006
negative	89	10(11.24)	79(88.76)			55(61.80)	34(38.20)			44(49.44)	45(50.56)		
Alcohol													
positive	141	91(64.54)	50(35.46)	66.083	< 0.001	107(75.89)	34(24.11)	6.512	0.011	98(69.50)	43(30.50)	11.567	0.001
negative	93	10(10.75)	83(89.25)			56(60.22)	37(39.78)			44(47.31)	49(52.69)		
Differentiation type													
poorly	56	36(64.29)	20(35.71)	13.390	< 0.001	50(89.29)	6(10.71)	13.418	< 0.001	40(71.43)	16(28.57)	3.562	0.059
moderately-well	178	65(36.52)	113(63.48)			113(63.48)	65(36.52)			102(57.30)	76(42.70)		
Infiltration depth													
≥Adventitia	174	96(55.17)	78(44.83)	39.899	< 0.001	148(85.06)	26(14.94)	76.139	< 0.001	134(77.01)	40(22.99)	75.827	< 0.001
<Adventitia	60	5(8.33)	55(91.67)			15(25.00)	45(75.00)			8(13.33)	52(86.67)		
Lymph node metastasis													
positive	146	96(65.75)	50(34.25)	80.764	< 0.001	122(83.56)	24(16.44)	35.508	< 0.001	122(83.56)	24(16.44)	85.167	< 0.001
negative	88	5(5.68)	83(94.32)			41(46.59)	47(53.41)			20(22.73)	68(77.27)		
Clinical stages													
I / II	99	5(5.06)	94(94.94)	101.601	< 0.001	41(41.41)	58(58.59)	64.767	< 0.001	20(20.20)	79(79.80)	117.867	< 0.001
III / IV	135	96(71.11)	39(28.89)			122(90.37)	13(9.63)			122(90.37)	13(9.63)		

表3 Fn、GRP78及XBP1阳性组与阴性组ESCC患者中位生存时间

Table 3 Median survival time of patients with Fn, GRP78 and XBP1 positive and negative groups in ESCC

[months, n(%)]

Group	n	$P_{25}$		$P_{50}$		$P_{75}$		$\chi^2$	P	
		Estimated value	Standard error	Estimated value	Standard error	Estimated value	Standard error			
Fn	(+)	101	42	2.632	27	2.511	17	1.853	25.525	<0.001
	(-)	133	-	-	44	3.944	24	2.875		
GRP78	(+)	163	53	-	32	3.191	18	1.790	9.549	0.002
	(-)	71	-	-	49	6.553	26	3.264		
XBP1	(+)	142	48	4.407	30	2.648	17	1.744	13.386	<0.001
	(-)	92	-	-	45	4.796	25	2.643		
Fn+GRP78+XBP1	(+)	95	40	2.243	26	2.214	16	1.765	39.447	<0.001
	(-)	139	-	-	45	5.158	25	2.582		
Total		234	-	-	36	2.294	20	1.397	-	-

此,Fn感染可增强ESCC细胞的氧化应激水平并降低其抗氧化能力。

肿瘤细胞的抗氧化应激系统普遍存在缺陷。当病原微生物入侵时,大量ROS的积累超出了机体的抗氧化能力,未折叠或错误折叠蛋白在内质网积聚,诱发内质网应激<sup>[25]</sup>。为适应环境,肿瘤细胞启动未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),以恢复内环境稳态,并满足自身迅速生长的生物合成及能量代谢需求。此时介导UPR的PERK、ATF6及IRE1均与GRP78解离而激活,产生相关应答反应,参与多种疾病进程<sup>[26]</sup>。幽门螺杆菌通过空泡毒素和分泌型抗原激活PERK-ATF4-CHOP内质网应激通路,诱导胃黏膜上皮细胞异型增生,促进胃癌发生发展<sup>[27]</sup>;乙肝病毒通过诱导内质网应激相关蛋白PERK和XBP1高表达,激活STAT3及IL-6通路,促进肝癌细胞抵抗凋亡<sup>[28]</sup>。本研究发现,随Fn感染时间的延长,ESCC细胞中GRP78及XBP1蛋白表达量逐渐增高,表明Fn感染可诱导ESCC细胞中GRP78及XBP1高表达,引发内质网应激,且具有时间依赖性。为探明GRP78及XBP1在Fn促癌机制中发挥的作用,对Fn感染的ESCC细胞分别敲降GRP78及XBP1,发现敲降后细胞中ROS与MDA含量减少,SOD活性增强,PTX应答效力增强,增殖、侵袭及转移能力减弱。提示GRP78及XBP1的敲降阻断了Fn对ESCC细

胞氧化

应激反应及恶性生物学行为的诱导作用,表明GRP78及XBP1为Fn感染诱导ESCC恶性演进过程中的关键调控因子。

资料显示,GRP78及XBP1在多种肿瘤中的阳性率均显著高于正常组织,二者的高表达与肿瘤发生发展密切相关<sup>[29-31]</sup>。本研究发现,234例ESCC患者癌组织中Fn感染率、GRP78及XBP1阳性率分别为43.16%、69.66%及60.68%,三者具有显著一致性,提示Fn感染的ESCC细胞中内质网应激标志蛋白GRP78及XBP1高度激活。三者阳性组的患者多为有吸烟、饮酒史的男性患者,提示由于大多数男性患者长期吸烟、饮酒,口腔环境差,导致Fn定植率高,定植部位GRP78及XBP1多为高表达。且随肿瘤分化程度降低,三者阳性率逐渐增高,提示Fn感染、GRP78及XBP1高表达与肿瘤的恶性程度有关。此外,三者阳性组的患者肿瘤浸润程度深、淋巴结转移率高、临床分期多为Ⅲ/Ⅳ期,提示Fn感染及内质网应激促进了ESCC的恶性演进。同时,三者阳性组的患者5年生存期均缩短,且三者共阳性组的患者5年生存期缩短更多,提示Fn感染、GRP78及XBP1高表达均可影响ESCC患者生存期,且三者共阳性对患者生存期影响最大。

本团队前期研究发现,Fn不仅可诱导免疫微环境中具有杀伤功能的CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞表面高表

达抑制性受体,还可富集具有负性调节功能的 MD-SCs,促进 ESCC 细胞免疫逃逸<sup>[4-5]</sup>。本研究中,Fn 感染阳性 ESCC 组织的间质细胞中,同样可出现 GRP78 及 XBP1 高表达,提示 Fn 感染可能通过引发间质细胞内质网应激,削弱机体抗肿瘤免疫反应。研究表明,Fn 不仅可调控 GLUT4 增强葡萄糖代谢,活化 NLRP3 诱导炎症反应,还可激活 LC3 富集炎

症小体,三者均可引起 ESCC 恶性演进<sup>[3,12,32]</sup>。由于病原微生物感染与肿瘤的发生发展是一个多因素的复杂过程,GRP78 及 XBP1 活化介导的内质网应激与上述通路之间是否存在串扰作用,有待进一步实验验证。但有效清除 Fn 并抑制其对内质网应激的诱导作用,对延长患者生存期具有重要的意义。

#### 参考文献

- [1] Yang CS, Chen XL. Research on esophageal cancer: With personal perspectives from studies in China and Kenya[J]. *Int J Cancer*, 2021, 149(2): 264-276.
- [2] 宋颂,雷林,张瑞,等.食管癌筛查的研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2022, 29(7): 451-455.  
Song S, Lei L, Zhang R, et al. Research progress of esophageal cancer screening [J]. *Chin J Ca Prevention and treatment*, 2022, 29(7): 451-455.
- [3] 王敏,刘怡文,原翔,等.具核梭杆菌诱导葡萄糖转运蛋白4高表达在食管鳞癌组织中的临床意义及预后价值[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2020, 41(6): 884-890.  
Wang M, Liu YW, Yuan X, et al. Clinical significance and prognostic value of *Fusobacterium nucleatum*-induced high expression of glucose transporter 4 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Sun Yat-Sen Univ (Med Sci)*, 2020, 41(6): 884-890.
- [4] Wang X, Liu Y, Lu Y, et al. Clinical impact of Fn-induced high expression of KIR2DL1 in CD8 T lymphocytes in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *Ann Med*, 2022, 54(1): 51-62.
- [5] Liang M, Liu Y, Zhang Z, et al. *Fusobacterium nucleatum* induces MDSCs enrichment via activation the NLRP3 inflammosome in ESCC cells, leading to cisplatin resistance[J]. *Ann Med*, 2022, 54(1): 989-1003.
- [6] Chen X, Cubillos-Ruiz J. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(2): 71-88.
- [7] Rohde C, Becker S, Krähling V. Marburg virus regulates the IRE1/XBP1-dependent unfolded protein response to ensure efficient viral replication [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1): 1300-1313.
- [8] Madhavan S, Nagarajan S. GRP78 and next generation cancer hallmarks: An underexplored molecular target in cancer chemoprevention research [J]. *Biochimie*, 2020, 175: 69-76.
- [9] Lager T, Conner C, Keating CR, et al. Cell surface GRP78 and Dermcidin cooperate to regulate breast cancer cell migration through Wnt signaling [J]. *Oncogene*, 2021, 40(23): 4050-4059.
- [10] Zhao Y, Zhang W, Huo M, et al. XBP1 regulates the protumoral function of tumor-associated macrophages in human colorectal cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 357-371.
- [11] Lu T, Wang Y, Xu K, et al. Co-downregulation of GRP78 and GRP94 induces apoptosis and inhibits migration in prostate cancer cells [J]. *Open Life Sci*, 2019, 14(1): 384-391.
- [12] 张哲源,刘怡文,付臻,等.具核梭杆菌对炎症小体 NLRP3 的诱导作用对食管鳞状细胞癌患者生存期的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2022, 57(2): 170-175.  
Zhang ZY, Liu YW, Fu Z, et al. Effect of *Fusobacterium nucleatum* induction on inflammasome NLRP3 on survival of patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J ZhengZhou Univ (Med)*, 2022, 57(2): 170-175.
- [13] Ren P, Chen C, Yue J, et al. High expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78) is associated with metastasis and poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 617-625.
- [14] Xia T, Tong S, Fan K, et al. XBP1 induces MMP-9 expression to promote proliferation and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(9): 2031-2040.
- [15] Yang H, Liu Y, Kong J. Effect of aerobic exercise on acquired gefitinib resistance in lung adenocarcinoma [J]. *Transl Oncol*, 2021, 14(11): 101204.
- [16] 杨洁,贺武斌,安妮,等.葡萄糖调节蛋白78对肝癌

- 细胞放射敏感性的调控作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47(4): 888-895.
- Yang J, He WB, Anne, et al. Effect of glucose-regulated protein 78 on the radiosensitivity of hepatocellular carcinoma cells [J]. *J JiLin Univ (Med Edit)*, 2021, 47(4): 888-895.
- [17] 郑学忠,陈裕浩,王恩阳,等. 沉默 IRE1 $\alpha$ -XBP1 信号通路对 HASMC 增殖及 CyclinD1 表达的影响[J]. 西南国防医药, 2019, 29(1): 1-5.
- Zheng XZ, Chen YH, Wang EY, et al. Effect of silencing IRE1 $\alpha$ -XBP1 signaling pathway on proliferation and expression of CyclinD1 in HASMC [J]. *Med J Natl Defending Forces Southwest China*, 2019, 29(1): 1-5.
- [18] 刘怡文,周福有,杨海军,等. 牙龈卟啉单胞菌诱导线粒体转录因子 A 高表达在食管鳞癌中的临床意义[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2022, 43(5): 453-466.
- Liu YW, Zhou FY, Yang HJ, et al. Clinical significance of porphyromonas gingivalis inducing high expression of mitochondrial transcription factor A in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Jinan Univ (Med Sci)*, 2022, 43(5): 453-466.
- [19] Guo YB, Liu YW, Yang HJ, et al. Associations of porphyromonas gingivalis infection and low Beclin1 expression with clinicopathological parameters and survival of esophageal squamous cell carcinoma patients [J]. *Pathol Oncol Res*, 2021, 8(27): 1609976.
- [20] Wen J, Wang Y, Gao C, et al. Helicobacter pylori infection promotes Aquaporin 3 expression via the ROS-HIF-1 $\alpha$ -AQP3-ROS loop in stomach mucosa: a potential novel mechanism for cancer pathogenesis [J]. *Oncogene*, 2018, 37(26): 3549-3561.
- [21] Liu Y, Guo JZ, Liu Y, et al. Nuclear lactate dehydrogenase A senses ROS to produce  $\alpha$ -hydroxybutyrate for HPV-induced cervical tumor growth [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4429-4445.
- [22] Bayurova E, Jansons J, Skrastina D, et al. HIV-1 Reverse Transcriptase Promotes Tumor Growth and Metastasis Formation via ROS-Dependent Upregulation of Twist [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 6016278. doi: 10.1155/2019/6016278.
- [23] Yuan K, Lei Y, Chen HN, et al. HBV-induced ROS accumulation promotes hepatocarcinogenesis through Snail-mediated epigenetic silencing of SOCS3 [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(4): 616-627.
- [24] Li W, Li G, She W, et al. Targeted antitumor activity of Ginsenoside (Rg1) in paclitaxel-resistant human nasopharyngeal cancer cells are mediated through activation of autophagic cell death, cell apoptosis, endogenous ROS production, S phase cell cycle arrest and inhibition of m-TOR/PI3K/AKT signalling pathway [J]. *J BUON*, 2019, 24(5): 2056-2061.
- [25] Bian M, Fan R, Yang Z, et al. Pt(II)-NHC complex induces ROS-ERS-Related DAMP balance to harness immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma [J]. *J Med Chem*, 2022, 65(3): 1848-1866.
- [26] Liang D, Khoonkari M, Avril T, et al. The unfolded protein response as regulator of cancer stemness and differentiation: Mechanisms and implications for cancer therapy [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 192: 114737. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114737. Epub 2021 Aug 16.
- [27] Mommersteeg MC, Simovic I, Yu B, et al. Autophagy mediates ER stress and inflammation in Helicobacter pylori-related gastric cancer [J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2015238. doi: 10.1080/19490976.2021.2015238.
- [28] Liu W, Cai S, Pu R, et al. HBV preS Mutations Promote Hepatocarcinogenesis by Inducing Endoplasmic Reticulum Stress and Upregulating Inflammatory Signaling [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(13): 3274. doi: 10.3390/cancers14133274.
- [29] Xia S, Duan W, Liu W, et al. GRP78 in lung cancer [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 118-132.
- [30] Lee JH, Yoon YM, Lee SH. GRP78 regulates apoptosis, cell survival and proliferation in 5-fluorouracil-resistant SNUC5 colon cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(9): 4943-4951.
- [31] Li H, Chen X, Gao Y, et al. XBP1 induces snail expression to promote epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of breast cancer cells [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(1): 82-89.
- [32] Liu Y, Baba Y, Ishimoto T, et al. Fusobacterium nucleatum confers chemoresistance by modulating autophagy in oesophageal squamous cell carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2021, 124(5): 963-974.