

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.11.004

TGF-β₁ 促进人胃癌 MKN28 细胞上皮-间质转化和转移的研究

孙 云¹, 马国娟², 胡晓杰¹, 尹香云¹, 彭彦辉^{3△}
(河北省人民医院:1. 普外四科;2. 门诊部;3. 普外三科, 石家庄 050051)

[摘要] **目的** 观察转化生长因子-β₁ (TGF-β₁) 诱导对人胃癌 MKN28 细胞上皮-间质转化(EMT)标志物、LMO1 及转移相关基因表达的影响,探讨 LMO1 基因沉默在 TGF-β₁ 诱导的 MKN28 细胞 EMT 及转移中的作用。**方法** 体外原代培养人胃癌 MKN28 细胞,采用 TGF-β₁ 诱导法建立 EMT 模型,将细胞分成 4 组:对照组(5% BSA)、TGF-β₁ 诱导组(10 μg/L)、阴性转染组(TGF-β₁ + 阴性转染 siRNA)、LMO1-siRNA 转染组(TGF-β₁ + LMO1-siRNA)。用 Real time-PCR 和 Western blot 检测各组 EMT 标志物[E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)]、LMO1 表达情况。Transwell 小室检测细胞的侵袭转移能力。Western blot 检测转移相关蛋白[基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、血管内皮生长因子(VEGF)]表达情况。**结果** TGF-β₁ 可诱导 MKN28 细胞发生明显的 EMT 进程,同时伴随 E-cadherin 表达下调和 N-cadherin、LMO1、MMP-9、VEGF 表达上调($P<0.01$),且细胞侵袭转移能力明显增强($P<0.01$)。下调 LMO1 表达能使 TGF-β₁ 诱导的 E-cadherin 下调及 N-cadherin、MMP-9、VEGF 的上调得到部分恢复,细胞侵袭转移能力得到显著抑制($P<0.01$)。**结论** TGF-β₁ 通过上调 LMO1 表达在促进胃癌 MKN28 细胞发生 EMT 及侵袭转移中发挥重要作用。下调 LMO1 表达能够显著抑制胃癌的侵袭转移过程。

[关键词] 胃肿瘤;转化生长因子-β₁;LMO1;上皮-间质转化;转移
[中图法分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)11-1444-05

TGF-β₁ induced up-regulation of LMO1 drives epithelial to mesenchymal transition and metastasis in human gastric cancer MKN28 cells

SUN Yun¹, MA Guojuan², HU Xiaojie¹, YIN Xiangyun¹, PENG Yanhui^{3△}
(1. Fourth Department of General Surgery; 2. Department of Outpatient; 3. Third Department of General Surgery, Hebei General Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

[Abstract] **Objective** TGF-β₁ can promote EMT, then strengthen the invasion and metastasis ability of cancer cells. However, the mechanism for TGF-β₁ in gastric cancer still keeps unclear. Aim of this study was to investigate the expression of epithelial to mesenchymal transition (EMT) marker, LMO1 and metastasis related genes on the human gastric cancer cell line MKN28 treated with TGF-β₁, and test whether down-regulate LMO1 expression can affect the pro-EMT and pro-metastatic roles of TGF-β₁ in MKN28 cells. **Methods** Primary human gastric cancer cell line MKN28 was cultured in vitro. Cells were treated with TGF-β₁ to induce cells to undergone EMT. Cells were divided into four groups: control group (5% BSA), TGF-β₁ induced group (10 μg/L), negative transfect group (TGF-β₁ + negative transfect siRNA), and LMO1-siRNA transfect group (TGF-β₁ + LMO1-siRNA). Real time-PCR and Western blot was used to examine the difference of EMT marker (E-cadherin and N-cadherin), LMO1 and metastasis related genes (MMP-9 and VEGF) expression. Transwell assays were performed to identify the differences and changes of invasive and metastatic ability in gastric cancer cell line MKN28. Western blot was used to examine the expression levels of MMP-9 and VEGF. **Results** TGF-β₁ stimulation induced classical EMT morphological change, as was confirmed by E-cadherin decrease and N-cadherin, LMO1, MMP-9, VEGF increase ($P<0.01$). Accompanied with the EMT, cell invasion and migration ability was markedly increased ($P<0.01$). However, Down-regulation of LMO1 expression reversed the pro-migratory effect of TGF-β₁ to a great degree ($P<0.01$). **Conclusion** LMO1 played a central role in coordinating TGF-β₁ induced EMT and pro-migratory effects in gastric cancer MKN28 cells. Using siRNA to down-regulate the expression of LMO1 can inhibit the invasion and metastasis ability of gastric cancer MKN28 cells.

[Key words] stomach neoplasms; the transforming growth factor-β₁; LMO1; epithelial to mesenchymal transition; metastasis

研究表明,上皮-间质转化(epithelia to mesenchymal transition, EMT)在肿瘤侵袭转移中发挥重要作用,它是指上皮细胞在形态学上向间质细胞转变,在此过程中细胞浸润和迁移能力明显增强^[1-2]。转化生长因子- β_1 (the transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)是 EMT 的重要诱导因子,在细胞增殖、分化、凋亡中发挥重要作用。研究显示,进展期胃癌患者 TGF- β_1 表达升高,通过促进细胞 EMT 进程,增强肿瘤细胞的侵袭迁移能力^[3]。但是,胃癌中 TGF- β_1 调控 EMT 的分子机制尚不清楚。LMO1 是由 2 个 LIM 结构域组成的辅助转录因子,其 LIM 结构域可作为蛋白质相互作用的适配器,通过与其他蛋白相互作用形成复合体,调控基因转录活性,参与细胞分化、增殖等生物学过程^[4]。研究显示,LMO1 在 T 淋巴细胞白血病、神经母细胞瘤、乳腺癌患者中表达升高,且与患者预后密切相关,提示 LMO1 在肿瘤发生、发展中发挥重要作用^[5]。有研究显示 LMO 家族其他成员 LMO2、LMO4 参与了 EMT 的调控^[6]。然而,LMO1 是否参与 TGF- β_1 介导的 EMT 进程目前尚未见报道。本研究通过 Real time-PCR 和 Western blot 等技术探讨 LMO1 在 TGF- β_1 诱导的胃癌 MKN28 细胞 EMT 及转移中的作用,为阐明胃癌发病机制及治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂 人胃癌 MKN28 细胞购自军事医学科学院;兔抗人 E-cadherin、N-cadherin、LMO1、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinases-9, MMP-9)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体、BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自北京中杉金桥有限公司;胎牛血清、PRMI 1640 培养基、Lipofectamine 2000、TGF- β_1 、Trizol、实时荧光定量试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;LMO1 siRNA 及阴性对照 siRNA 由上海吉玛基因化学技术有限公司合成;Transwell 小室、Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在 37℃、5% CO₂ 条件下,用含 10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的 RPMI 1640 培养基常规培养细胞,2 d 换液 1 次。将处于对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,细胞分 4 组:对照组(5% BSA)、TGF- β_1 诱导组(10 μ g/L)、阴性转染组(TGF- β_1 + 阴性转染 siRNA)、LMO1-siRNA 转染组(TGF- β_1 + LMO1-siRNA)。每组设 3 个复孔,重复 3 次。

1.2.2 细胞转染 根据 Gene Bank 中人 LMO1 基因序列设计特异性 siRNA。LMO1-siRNA 序列为:正义:5'-GGG CCC GAG ACA ATG TGT AT-3',反

义:5'-AGA CGG ACA GAT GGA CCT GG-3';同时合成一条荧光素标记的阴性对照 siRNA。收集处于对数生长期的 MKN28 细胞接种于 6 孔板中,调整细胞密度为 2 \times 10⁵ 个/孔,利用脂质体 Lipofectamine 2000 转染。转染 24 h 后在荧光显微镜下观察转染效率,转染 48 h 后收集细胞用于实验。

1.2.3 Real time-PCR 检测目的基因 mRNA 的表达 根据 Gene Bank 中人 LMO1 mRNA 序列,采用 DNAMAN 软件设计引物,引物序列见表 1,由上海生物工程技术有限公司合成。Trizol 提取细胞总 RNA,用紫外分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度。在 ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪上进行反转录和扩增试验。反应结束后采用仪器自带的 SDS v1.3 软件分析得出各样本、各基因扩增的 Ct 值。设对照组样品为标准 1,目的基因表达水平的相对定量值 $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$,将 RQ 值用于统计分析,以 GAPDH 为内参照基因。

表 1 LMO1、E-cadherin、N-cadherin、GAPDH 引物序列		
基因		引物序列(5'-3')
LMO1	上游	TCTACACCAAGGCCAACCTC
	下游	CTGCCCTTCTCATAGTCCA
E-cadherin	上游	CGAGAGCTACACGTTTCACGG
	下游	GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG
N-cadherin	上游	TTTGATGGAGGTCTCCTAACAC
	下游	ACGTTTAACACGTTGGAAATGTG
GAPDH	上游	CCAGAACATCATCCCTGCCT
	下游	CCTGCTTCACCACCTTCTTG

1.2.4 Western blot 检测目的基因蛋白质 细胞加入裂解液 100 μ L,冰上静置 30 min,4℃ 12 000 r/min 离心 30 min,用 BCA 法进行蛋白定量。将 50 μ g 总蛋白进行 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,用 10%脱脂奶粉封闭 2 h,加入特异性 E-cadherin、N-cadherin、LMO1、MMP-9、VEGF 抗体,4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,室温孵育 1 h,TBST 清洗,ECL 化学发光法显色、定影。用 UVP 软件检测并分析蛋白条带 IOD 值,以 GAPDH 作为内参照,以目的蛋白吸光度值/内参照吸光度值的比值进行定量分析。

1.2.5 Transwell 小室检测细胞侵袭力 将 Matrigel 胶用 PRMI 1640 培养基稀释后均匀涂于 8 μ m 小孔聚碳酸酯滤膜的 Transwell 小室上室。收集转染组和对照组 MKN28 细胞,用不含血清的 PRMI 1640 培养基重悬细胞,制备单细胞悬液(2 \times 10⁵ 个/mL),取 200 μ L 单细胞悬液接种于 Transwell 小室的上室,下室加入含 10%胎牛血清(FBS)的 PRMI 1640 培养基

表 2 TGF-β₁ 诱导对胃癌 MKN28 细胞 E-cadherin、N-cadherin、LMO1 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	E-cadherin		N-cadherin		LMO1	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
对照组	1.01±0.16	0.95±0.12	0.22±0.03	0.17±0.03	0.18±0.03	0.14±0.02
TGF-β ₁ 诱导组	0.47±0.07*	0.39±0.06*	1.35±0.23*	1.29±0.21*	1.28±0.21*	1.22±0.20*
阴性转染组	0.49±0.08*	0.40±0.06*	1.32±0.20*	1.27±0.19*	1.25±0.20*	1.19±0.16*
MOI-siRNA 转染组	0.65±0.11*▲	0.61±0.10*▲	0.79±0.12*▲	0.74±0.12*▲	0.66±0.11*▲	0.60±0.09*▲

* : $P < 0.01$, 与对照组比较; ▲: $P < 0.01$, 与 TGF-β₁ 诱导组、阴性转染组比较

800 μL。培养 24 h 后取出 Transuella 小室,用棉签擦拭掉小室底部未转移的细胞,用 4%多聚甲醛固定 15 min,0.1%结晶紫染色 15 min。在倒置显微镜下随机选取 10 个视野(×200)计算穿膜细胞数,求均值。

1.2.6 Transwell 小室检测细胞迁移能力 Transwell 小室不涂抹 Matrigel 胶,其余步骤同 1.2.5。

1.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件包处理数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TGF-β₁ 诱导对胃癌 MKN28 细胞形态学的影响 对照组细胞仍表现为上皮细胞形态,细胞呈鹅卵石样,且细胞间连接紧密。TGF-β₁ 诱导组和阴性转染组细胞由紧密连接的多角形变为长梭形或纺锤体形,细胞多分散,呈典型的 EMT 形态改变。LMO1-siRNA 转染组部分细胞恢复成梭形,细胞间连接略疏松,即 LMO1-siRNA 特异性下调 LMO1 能够明显减弱 TGF-β₁ 诱导 MKN28 细胞引起的 EMT 形态改变。

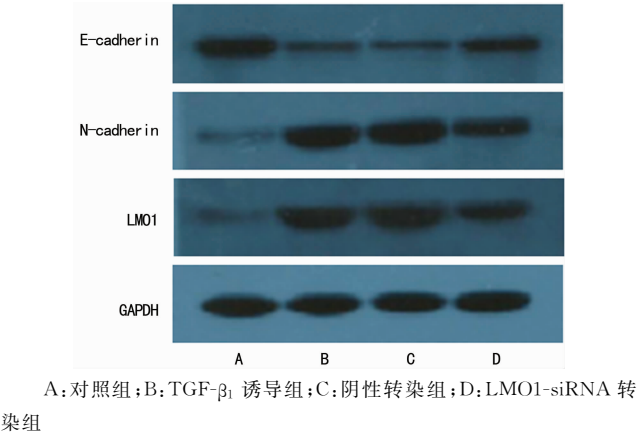


图 1 Western blot 检测各组 E-cadherin、N-cadherin、LMO1 表达情况

2.2 TGF-β₁ 诱导对胃癌 MKN28 细胞 EMT 相关标志物及 LMO1 表达的影响 Real time-PCR 和 Western blot 结果显示,与对照组比较,TGF-β₁ 诱导组和阴性转染组 E-cadherin 表达显著下降,N-cadherin、LMO1 表达显著上升($P < 0.01$),TGF-β₁ 诱导组和阴性转染组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);LMO1-siRNA 转染组 E-cadherin 表达较 TGF-β₁ 诱导组和阴性转染组显著回升,N-cadherin、LMO1 表达较 TGF-β₁ 诱导组和阴性转染组显著降低($P < 0.01$),但

和对照组比较差异仍有统计学意义($P < 0.01$),见表 2,图 1。

2.3 TGF-β₁ 诱导对胃癌 MKN28 细胞侵袭能力的影响 Transwell 小室侵袭实验结果显示,TGF-β₁ 诱导组、阴性转染组穿膜细胞数分别为(312±22)个和(318±26)个,较对照组[(116±18)个]显著增加($P < 0.01$),TGF-β₁ 诱导组和阴性转染组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);与 TGF-β₁ 诱导组、阴性转染组比较,LMO1-siRNA 转染组穿膜细胞数[(197±20)个]显著降低($P < 0.01$),但与对照组比较差异仍有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。

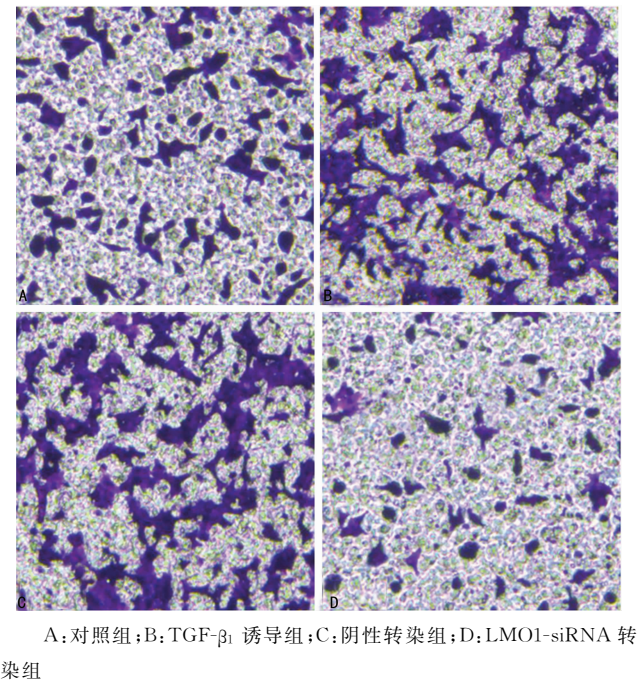


图 2 TGF-β₁ 诱导对胃癌 MKN28 细胞侵袭能力的影响

2.4 TGF-β₁ 诱导对胃癌 MKN28 细胞迁移能力的影响 Transwell 小室迁移实验结果显示,TGF-β₁ 诱导组、阴性转染组穿膜细胞数分别为(458±28)个和(470±26)个,较对照组[(231±22)个]显著增加($P < 0.01$),TGF-β₁ 诱导组和阴性转染组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);与 TGF-β₁ 诱导组、阴性转染组比较,LMO1-siRNA 转染组穿膜细胞数[(301±27)个]显著降低($P < 0.01$),但与对照组比较差异仍有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。

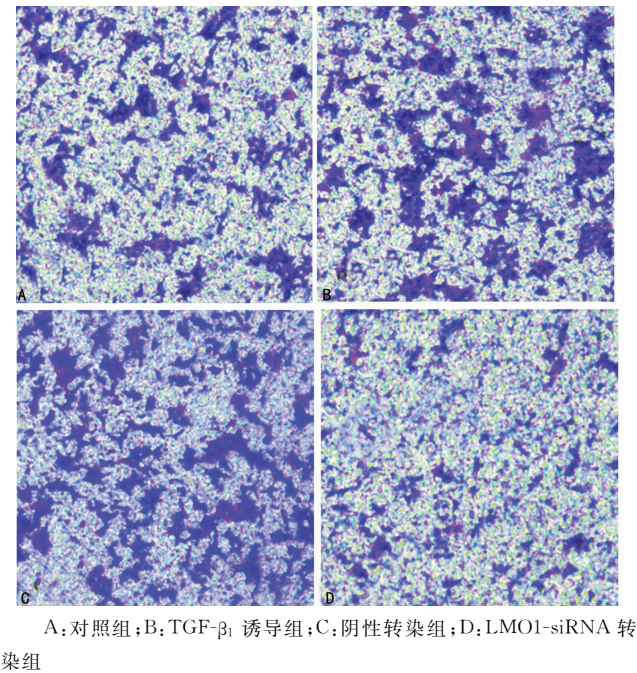


图3 TGF-β₁ 诱导对各组胃癌 MKN28 细胞迁移能力的影响

2.5 TGF-β₁ 诱导对胃癌 MKN28 细胞侵袭转移相关基因表达的影响 Western blot 结果显示,与对照组比较,TGF-β₁ 诱导组和阴性转染组 MMP-9、VEGF 表达显著上升($P<0.01$),TGF-β₁ 诱导组和阴性转染组比较差异无统计学意义($P>0.05$);LMO1-siRNA 转染组 MMP-9、VEGF 表达较 TGF-β₁ 诱导组和阴性转染组显著下降($P<0.01$),但和对照组比较差异仍有统计学意义($P<0.01$),见表 3、图 4。

表 3 TGF-β ₁ 诱导对胃癌 MKN28 细胞 MMP-9、VEGF 表达的影响(±s)		
组别	MMP-9	VEGF
对照组	0.48±0.07	0.53±0.08
TGF-β ₁ 诱导组	1.57±0.24*	1.72±0.26*
阴性转染组	1.54±0.23*	1.77±0.28*
LMO1-siRNA 转染组	0.76±0.09*▲	0.88±0.12*▲

*: $P<0.01$,与对照组比较;▲: $P<0.01$,与 TGF-β₁ 诱导组、阴性转染组比较

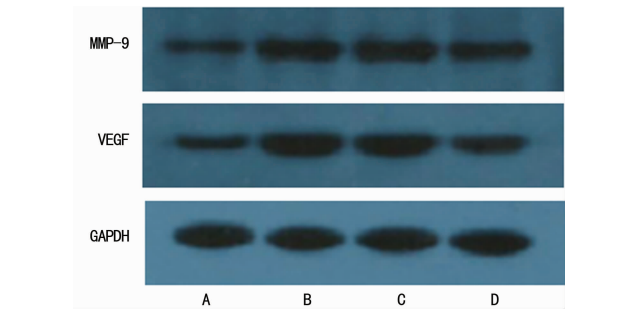


图4 Western blot 检测各组 MMP-9、VEGF 表达情况

3 讨论

胃癌是来源于胃黏膜上皮的消化道恶性肿瘤,其

发病率和死亡率极高,居恶性肿瘤的第 2 位^[7]。侵袭和转移是恶性肿瘤的重要特征,也是导致治疗失败的主要原因,据统计每年约有 60% 的胃癌患者死于复发和转移^[8]。因此,寻找与胃癌侵袭和转移相关的靶向分子,对于深入探讨胃癌发生、发展的分子机制并探索积极有效的治疗措施、改善患者预后具有重要意义。

TGF-β₁ 是 TGF 家族的重要成员,具有多种生物学功能,已有研究发现 TGF-β₁ 在诱导肿瘤细胞 EMT 进程中发挥关键作用^[9-10]。TGF-β₁ 可通过 Smad 依赖性和非 Smad 依赖性途径介导肿瘤细胞 EMT 进程。LMO1 是 LMO 家族成员,主要通过调控基因转录活性参与细胞分化、增殖等生物学过程^[4]。研究显示,LMO1 与 T 淋巴细胞白血病、神经母细胞瘤、乳腺癌等恶性肿瘤发生、发展密切相关。患者 LMO1 表达升高,且与患者预后密切相关,提示 LMO1 在肿瘤发生、发展中发挥重要作用^[5]。

本研究结果显示,TGF-β₁ 诱导人胃癌 MKN28 细胞后出现典型的 EMT 形态学变化,细胞由紧密连接的多角形变为长梭形或纺锤体形,细胞多分散。Real time-PCR 和 Western blot 结果显示,TGF-β₁ 诱导后 MKN28 细胞 EMT 标志物 E-cadherin 表达显著下调,N-cadherin 表达显著上调,说明 TGF-β₁ 是 EMT 的有效诱导因子,与 HELDIN 等^[11] 的报道一致。同时在 TGF-β₁ 诱导 MKN28 细胞出现的 EMT 进程中,LMO1 表达显著上调。SAEKI 等^[12] 研究显示,TGF-β₁ 通过上调 LMO1 表达进而促进胃黏膜上皮细胞的凋亡进程,与本研究结果一致。本研究采用 Tanswell 小室实验及 Western blot 检测 TGF-β₁ 诱导后 MKN28 细胞侵袭迁移能力及转移相关蛋白(MMP-9、VEGF)表达的变化。结果显示,TGF-β₁ 诱导后 MKN28 细胞侵袭迁移能力明显增强,MMP-9、VEGF 蛋白表达明显上调,说明 TGF-β₁ 诱导后 MKN28 细胞经历了 EMT 进程。为进一步阐明 LMO1 在 TGF-β₁ 调控 MKN28 细胞发生 EMT 转移的作用,笔者采用 RNA 干扰技术下调 LMO1 表达,结果显示,下调 LMO1 表达能够明显逆转 TGF-β₁ 诱导的 MKN28 细胞出现 EMT 形态学变化,同时 E-cadherin 表达显著回升,N-cadherin、MMP-9、VEGF 表达显著下降。以上结果充分证实 LMO1 在 TGF-β₁ 介导的信号转导通路中可能发挥重要作用。

本研究结果显示,TGF-β₁ 可能通过某种信号通路上调其靶基因 LMO1 表达,从而明显增强胃癌 MKN28 细胞的侵袭转移能力,这可能是 TGF-β₁ 诱导 MKN28 细胞发生 EMT 和转移的可能机制。本研究为深入探讨胃癌发生、发展的分子机制及寻找治疗胃癌的分子靶点提供了新思路。然而,TGF-β₁ 调控 LMO1 表达的具体分子机制尚待后续研究。

参考文献

- [1] BEZDENZHNYKH N, SEMESIUK N, LYKHOVA O, et al. Impact of stromal cell components of tumor micro-environment on epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells[J]. *Exp Oncol*, 2014, 36(2):72-78.
 - [2] TALBOT L J, BHATTACHARYA S D, KUO P C. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies[J]. *Int J Biochem Mol Biol*, 2012, 3(2):117-136.
 - [3] LI J, WANG J, ZOU Y, et al. The influence of delayed compressive stress on TGF- β_1 -induced chondrogenic differentiation of rat BMSCs through Smad-dependent and Smad-independent pathways[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(33):8395-8405.
 - [4] 顾卉, 佟宇鑫, 刘彤, 等. GST-LMO1 融合蛋白表达载体的构建及其在原核细胞中的表达[J]. *中国医科大学学报*, 2011, 40(11):961-963, 978.
 - [5] VANNELLA L, LAHNER E, OSBORD J, et al. Risk factors for progression to gastric neoplastic lesions in patients with atrophic gastritis[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010, 31(9):1042-1050.
 - [6] 李静怡, 申秀锦, 邓红. LMO4 调节肿瘤发生过程中的上皮-间质转化[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2011, 40(1):107-111.
 - [7] LUYIMBAZI D, NELSON R A, CHOI A H, et al. Estimates of conditional survival in gastric cancer reveal a reduction of racial disparities with long-term follow-up[J]. *J Gastrointest Surg*, 2015, 19(2):251-257.
 - [8] 吴菲, 林国桢, 张晋昕. 我国恶性肿瘤发病现状及趋势[J]. *中国肿瘤*, 2012, 21(2):81-85.
 - [9] MORRISON C D, PARVANI J G, SCHIEMANN W P. The relevance of the TGF- β Paradox to EMT-MET programs[J]. *Cancer Lett*, 2013, 341(1):30-40.
 - [10] KATSUNO Y, LAMOUILLE S, DERYNCK R. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression[J]. *Curr Opin Oncol*, 2013, 25(1):76-84.
 - [11] HELDIN C, VANLANDEWIJCK M, MOUSTAKAS A. regulation of EMT by TGF- β in cancer[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(14):1959-1970.
 - [12] SAEKI N, KIM D H, USUI T, et al. GASDERMIN, suppressed frequently in gastric cancer, is a target of LMO1 in TGF-beta-dependent apoptotic signalling[J]. *Oncogene*, 2007, 26(45):6488-6498.
-
- (收稿日期:2017-09-18 修回日期:2017-12-16)
-
- (上接第 1443 页)
- [5] 李永贺, 李威, 陈浩, 等. 盐酸椒苯酮胺对豚鼠耳蜗缺血再灌注损伤的听力保护作用[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2013, 21(6):603-607.
 - [6] 施宁华, 张志坚, 许燕, 等. 全脑缺血再灌注后大鼠耳蜗组织内巢蛋白与神经生长因子的表达[J]. *江苏大学学报*, 2011, 21(1):5-8.
 - [7] 吕哲, 张颖, 王团, 等. 豚鼠脑缺血再灌注后听皮层内质网应激相关因子的表达及意义[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2016, 24(4):377-381.
 - [8] 路虹, 王团, 徐鸥, 等. 内质网应激反应对豚鼠脑缺血再灌注后听皮质区损伤的作用[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2014, 21(5):249-254.
 - [9] WU CX, LIU R, GAO M, et al. Pinocembrin protects brain against ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress induced apoptosis[J]. *Neurosci Lett*, 2013, 546(1):57-62.
 - [10] QIU B, HU S D, LIU L B, et al. CART attenuates endoplasmic reticulum stress response induced by cerebral ischemia and reperfusion through upregulate BDNF synthesis and secretion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 436(4):655-659.
 - [11] JOHNSON G G, WHITE M C, WU J H, et al. The deadly connection between endoplasmic reticulum, Ca^{2+} , protein synthesis, and the endoplasmic reticulum stress response in malignant glioma cells[J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16(8):1086-1099.
 - [12] NISHITOH H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response[J]. *J Biochem*, 2012, 151(3):217-219.
 - [13] SU Y, LI F. Endoplasmic reticulum stress in brain ischemia[J]. *Int J Neurosci*, 2016, 126(8):681-691.
 - [14] KREBS J, AGELLON L B, MICHALAK M. Ca^{2+} homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(1):114-121.
 - [15] ZHU G, LEE A S. Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(7):1413-1420.
 - [16] XU X, LIU T, ZHANG A, et al. Reactive oxygen species-triggered trophoblast apoptosis is initiated by endoplasmic reticulum stress via activation of caspase-12, CHOP, and the JNK pathway in toxoplasma gondii infection in mice[J]. *Infect Immun*, 2012, 80(6):2121-2132.
 - [17] 林岩, 肖薇, 金莉, 等. 内质网应激介导白藜芦醇对心肌细胞肥大的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(12):1721-1725.
- (收稿日期:2017-12-24 修回日期:2018-02-10)