

PINK1和Parkin在结直肠癌组织中的表达及临床价值

张顺涛¹, 李巧玉¹, 张园梦¹, 邱烈旺¹, 高敏娜², 曾波^{1*}

¹重庆医科大学附属永川医院消化内科, 重庆

²重庆医科大学病理教研室, 重庆

收稿日期: 2023年7月13日; 录用日期: 2023年8月7日; 发布日期: 2023年8月14日

摘要

目的: 监测结直肠癌组织中与线粒体自噬过程紧密相关的基因PINK1和Parkin的表达情况, 并探讨其存在的临床价值。方法: 应用免疫组织化学染色SP法检测肠镜检查或手术过程中获取的120例结直肠癌组织、45例结直肠腺瘤组织和45例正常结直肠组织(距肿瘤 > 5 cm)中PINK1和Parkin的表达情况, 分析PINK1和Parkin之间的内在关联性以及PINK1和Parkin的表达与结直肠癌患者的性别、年龄、肿瘤体积、病理类型、分化程度、淋巴结转移、远处转移和临床TNM分期等关联性。结果: 免疫组化结果表明PINK1和Parkin阳性表达均主要发生在肿瘤细胞胞浆中。120例结直肠癌组织中PINK1和Parkin阳性表达率分别为56.67% (68/120)和47.5% (57/120), 明显低于肠腺瘤组织和正常肠组织中的表达($P < 0.01$)。PINK1和Parkin蛋白在结直肠癌组织中的表达具有正相关性($r = 0.5528, P < 0.05$)。在结直肠癌组织中, PINK1和Parkin的阳性表达与其分化程度、淋巴结转移、远处转移和临床TNM分期具有明显的关联性($P < 0.05$); 而与患者年龄、性别、肿瘤体积、病理类型无关($P > 0.05$)。结论: PINK1和Parkin在结直肠癌组织中呈现低水平表达状态, 提示线粒体自噬活性的降低在结直肠癌的发生发展和侵袭转移中可能发挥了一定作用。

关键词

结直肠癌, 线粒体自噬, PINK1, Parkin

Expression and Clinical Significance of PINK1 and Parkin in Colorectal Cancer

Shuntao Zhang¹, Qiaoyu Li¹, Yuanmeng Zhang¹, Liewang Qiu¹, Minna Gao², Bo Zeng^{1*}

¹Department of Gastroenterology, Yongchuan Hospital Affiliated of Chongqing Medical University, Chongqing

²Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing

*通讯作者。

文章引用: 张顺涛, 李巧玉, 张园梦, 邱烈旺, 高敏娜, 曾波. PINK1 和 Parkin 在结直肠癌组织中的表达及临床价值[J]. 临床医学进展, 2023, 13(8): 12639-12645. DOI: 10.12677/acm.2023.1381772

Abstract

Objective: To observe the expression of PINK1 and Parkin closely related to mitochondrial autophagy in colorectal cancer and to explore the clinical significance. **Methods:** Immunohistochemical SP methods was applied to detect the expressions of PINK1 and Parkin in 120 colorectal cancer tissues, 45 intestinal adenoma tissues and 45 normal intestinal tissues (5 cm away from the cancer). The correlation between PINK1 and Parkin was analyzed; while, the relationships between the expression of PINK1, Parkin and the clinicopathological features, including sex, age, size, pathological type, differentiation degree, lymph node metastasis, distant organs metastasis and TNM stage were analyzed. **Results:** Immunohistochemical results showed that the positive expressions of PINK1 and Parkin were mainly located in the cytoplasm of the cells, and their positive expression rates in 120 colorectal cancer tissues were 56.67% (68/120) and 47.5% (57/120), respectively, which were both significantly lower than those in intestinal adenoma tissues and normal intestinal tissues ($P < 0.01$). There was a positive correlation between the expression of PINK1 and Parkin in colorectal cancer ($r = 0.5528$, $P < 0.05$). In colorectal cancer, the positive expression of PINK1 and Parkin was significantly correlated with the degree of differentiation, distant organ metastasis, lymph node metastasis and TNM stage ($P < 0.05$); and they were both independent to age, sex, tumor size and pathological type ($P > 0.05$). **Conclusion:** PINK1 and Parkin were low expressed in colorectal cancer, which suggested that the decrease of the mitophagy activity may play a role in the occurrence, development, invasion and metastasis of colorectal cancer.

Keywords

Colorectal Cancer, Mitophagy, PINK1, Parkin

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

结直肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一，因其自身极易发生侵袭、转移和复发，结直肠癌患者死亡率依然在众多肿瘤患者中位居前列。从分子水平着手，深入研究结直肠癌的发生及转归的机制，对于新型药物开发、新的治疗方案制定，具有深远的现实价值，以期使结直肠癌治愈率得到提升的[1]。

自噬是存在于真核细胞内的一种重要的生命现象。在肿瘤细胞中，自噬起着“双刃剑”作用：适度自噬可使受损的肿瘤细胞存活[2]，而过度的自噬则加速了肿瘤细胞的死亡[3]，进而影响肿瘤细胞的恶性生物学行为，参与肿瘤的发生、发展、诊疗等过程[4] [5]。线粒体自噬是利用自噬机制从细胞胞质中选择性清除受损线粒体的过程，在维持细胞内线粒体数量和质量的平衡，维持细胞稳态，促进细胞存活方面担当着重要角色[6]。有研究表明，线粒体自噬在肿瘤发生、发展的各个阶段发挥着不同的作用：在早期，线粒体自噬过程帮助正常细胞维持基础代谢，同时抑制肿瘤的发生；在晚期，线粒体自噬又能通过提高细胞耐受性对肿瘤细胞形成保护，从而促进肿瘤发展[7]。PINK-1/Parkin 介导的线粒体自噬调控机制是最为经典且最为重要的，本研究采用免疫组织化学法检测结直肠癌组织中 PINK-1、Parkin 的表达情况，观察其两项基因之间的关联性，同时结合结直肠癌临床病理特点探讨 PINK-1、Parkin 与结直肠癌发生、发

展之间的关系。

2. 材料与方法

2.1. 临床资料与组织标本

2.1.1. 材料

收集重庆医科大学附属永川医院 2020.1~2021.9 肠镜活检所获得的结直肠腺瘤标本 45 例、结直肠癌手术切除所获得的结直肠癌标本 120 例及结直肠正常组织标本(距肿瘤 > 5 cm) 45 例。设结直肠癌标本为试验组, 肠腺瘤和正常的肠标本为对照组。所取结直肠癌标本均来源于术前未经化疗、放疗或药物靶向治疗等处理且基本临床资料都齐备的结直肠癌患者。顺利获取组织标本后, 均采用 10% 的中性福尔马林浸泡固定, 石蜡包埋法对其进行妥善保存。

2.1.2. 试剂

免疫组化试剂盒(SP 法)和 DAB 染色试剂盒均购自北京康为世纪生物技术有限公司, 兔抗人多克隆抗体 anti-Parkin 和 anti-PINK1 购自 Santa Cruz 公司。

2.2. 方法

2.2.1. 免疫组织化学染色

采用 SP 法。详细过程如下: 将 5 μm 石蜡切片依次经二甲苯脱蜡和梯度酒精透明, PBS 洗涤 3 次, 再经柠檬酸钠缓冲液微波高温抗原修复; 冷却后再次 PBS 洗涤, 滴加 3% H_2O_2 室温孵育 30 min 以消除过氧化物酶; PBS 充分洗涤后, 加入试剂盒中 A 液(封闭血清)室温孵育 60 min; 甩干后滴加稀释的抗体 Parkin (1:50)和 PINK1 (1:50), 置入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜; PBS 充分洗涤后再滴加 B 液(生物素标记的二抗), 室温下放置 30 min; PBS 充分洗涤后滴加 C 液(HRP 标记的三抗), 放置 30 min; 用 DAB 液进行显色, 在显微镜下观察并终止显色; 苏木素复染后经盐酸酒精分化以及饱和碳酸锂返蓝; 最后中性树胶封片观察。用已知阳性组织切片作阳性对照, 以 PBS 替代一抗作为阴性对照。

2.2.2. 结果判定

阳性标准: 若可见棕黄色颗粒出现于胞浆或胞核内即视为阳性结果。随机选取 5 个高倍视野进行观察, 读取每个视野内所有细胞的染色情况。阳性细胞与视野内细胞总数之比, 即阳性表达率 $\leq 5\%$ 计为 0 分, 6%~25%计为 1 分, 26%~50%计为 2 分, 51%~75%计为 3 分, >75%计为 4 分; 阳性强度显示: 紫色或蓝色计为 0 分, 黄色计为 1 分, 棕黄计为 2 分, 棕褐色计为 3 分。将阳性表达率与阳性强度两者积分相乘: 0 分为阴性(-), 1~12 分则为阳性, 其中 1~4 分为弱阳性(+), 5~8 分为中度阳性(++), 9~12 分为强阳性(+++)。

2.3. 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析, 运用卡方检验开展组间比较, 各指标之间用 Spearman 秩相关进行分析, 以 $P < 0.05$ 为存在统计学意义。

3. 结果

3.1. PINK1 和 Parkin 在结直肠癌、肠腺瘤和正常肠组织中的表达

免疫组化结果显示, PINK1 和 Parkin 阳性表达主要位于细胞胞浆内, 极少表达于胞核。在 120 例结直肠癌组织中, PINK1 和 Parkin 的阳性表达率分别为 56.67% (68/120)和 47.5% (57/120); 在 45 例结直肠

腺瘤组织中, PINK1 和 Parkin 的阳性表达率分别为 68.89% (31/45)和 66.67% (30/45); 在 45 例正常结直肠组织中, PINK1 和 Parkin 的阳性表达率分别为 84.44% (38/45)和 80.00% (36/45)。PINK1 和 Parkin 的阳性表达率在结直肠癌、肠腺瘤和正常肠组织中有明显差异(见表 1、图 1)。

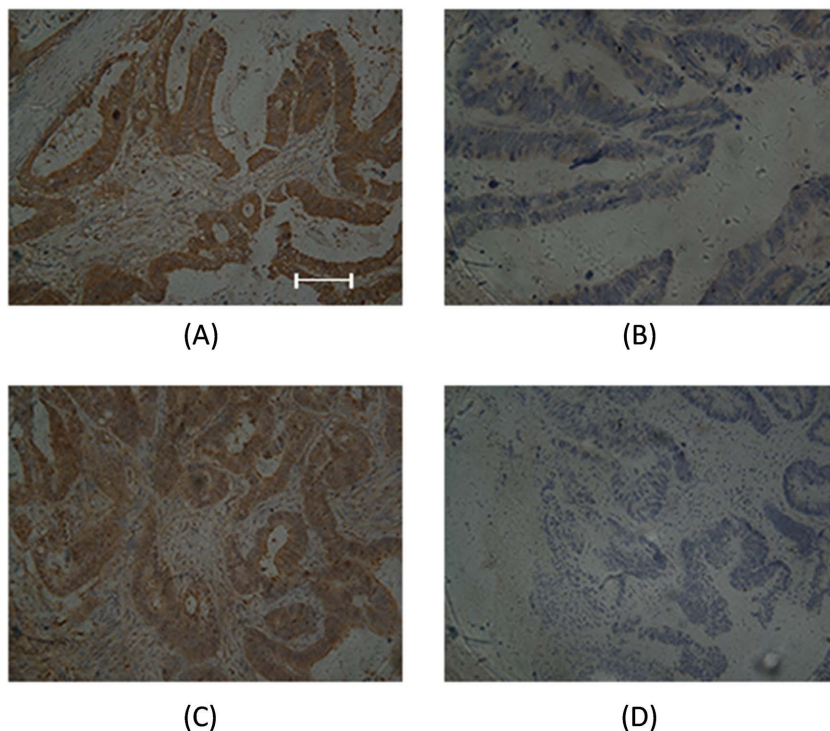


Figure 1. Expression of PINK1 and Parkin in colorectal cancer tissues. (A) Positive expression of PINK1 in colorectal cancer tissues; (B) Negative expression of PINK1 in colorectal cancer tissues; (C) Positive expression of Parkin in colorectal cancer tissues; (D) Negative expression of Parkin in colorectal cancer tissues. Scale bar, A, B, C, D, 150 μ m

图 1. PINK1 和 Parkin 在结直肠癌组织中的表达。(A) PINK1 在结直肠癌组织中的阳性表达; (B) PINK1 在结直肠癌组织中的阴性表达; (C) Parkin 在结直肠癌组织中的阳性表达; (D) Parkin 在结直肠癌组织中的阴性表达。比例尺: A, B, C 和 D, 150 μ m

Table 1. Expression and statistical analysis of PINK1 and Parkin in colorectal cancer, intestinal adenoma and normal intestinal tissue

表 1. PINK1 和 Parkin 在结直肠癌、肠腺瘤和正常肠组织中的表达及统计学分析

组别	例数	PINK1		Parkin	
		+	-	+	-
结肠癌	120	68	52	57	63
肠腺瘤	45	31	14	30	15
正常肠组织	45	38	7	36	9
X ²		11.466		15.792	
P		0.002		0.000	

3.2. PINK1 和 Parkin 的阳性表达与结直肠癌临床病理主要参数的关系

在结直肠癌组织中, PINK1 和 Parkin 的阳性表达与其分化程度、淋巴结转移、远处转移和临床 TNM

分期具有明显的关联性($P < 0.05$); 而与患者年龄、性别、肿瘤体积、病理类型无关($P > 0.05$) (见表 2)。

Table 2. Relationship between the expression of PINK1 and Parkin in colorectal cancer and clinicopathological parameters
表 2. PINK1 和 Parkin 在结直肠癌中表达与临床病理参数的关系

组别	例数	PINK1			Parkin		
		+	-	X2	+	-	X2
年龄							
<60 岁	35	18	17		18	17	
≥60 岁	85	50	35	0.5521	39	46	0.3058
性别							
男	77	46	31		38	39	
女	43	22	21	0.8267	19	24	1.0708
瘤体直径							
<5 cm	63	37	26		32	31	
≥5 cm	57	31	26	1.0090	25	32	0.5770
分化程度							
高分化	64	43	21		37	27	
中低分化	56	25	31	6.1819 ^a	20	36	5.8485 ^a
淋巴结转移							
有	44	19	25		13	31	
无	76	49	27	5.1447 ^b	44	32	8.9808 ^b
器官转移							
有	49	20	29		17	32	
无	71	48	23	8.4732 ^c	40	31	5.4463 ^c
临床分期							
I~II 期	72	48	24		40	32	
III~IV 期	48	20	28	7.3303 ^d	17	31	4.6839 ^d

注: a, $P < 0.05$, vs 高分化; b, $P < 0.05$, vs 有淋巴结转移; c, $P < 0.05$, vs 有远处器官转移; d, $P < 0.05$, vs 临床 I~II 期。

3.3. PINK1 和 Parkin 阳性表达的关联性分析

在 120 例结直肠癌组织中, PINK1 和 Parkin 蛋白共同阳性表达的病例数为 52 例, 共同阴性表达的病例数为 47 例。Spearman 等级分析结果显示 PINK1 和 Parkin 蛋白在结直肠癌组织中的表达具有正相关性 ($r = 0.5528$, $P < 0.05$) (见表 3)。

Table 3. Correlation analysis of positive expression of PINK1 and Parkin in colorectal cancer tissues

表 3. PINK1 和 Parkin 在结直肠癌组织阳性表达的相关性分析

Parkin	PINK1		X2	R
	+	-		
+	52	5	52.8139	0.5528
-	16	47		

4. 讨论

线粒体是绝大多数细胞新陈代谢的“供能中心”，决定着细胞的存活与消亡。为了维持线粒体的正常数量和质量，保证“供能中心”的正常运作，机体会及时地、主动地清除细胞内受损的、老化的或多余的线粒体，这一过程即是所谓的“线粒体自噬”。它是一个重要而复杂的生理过程，其调控机制也十分复杂。在多数真核多细胞内，PINK1-1/Parkin 介导的线粒体自噬是众多调节机制中最重要的途径之一。

PINK1 (PTEN induced putative kinase protein 1, PINK1)和 Parkin 是与帕金森病密切相关的两个重要基因，两者都具备清除缺陷、受损线粒体的能力[8]。PINK1 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶，主要存在于线粒体的外膜，属于感知线粒体损伤的受体。Parkin 是一种 E3 泛素连接酶，主要定位于胞浆中。Parkin 位于 PINK1 的下游，在线粒体自噬信号中担当“增强子”的角色。通常情况下，PINK1 与线粒体外膜转运酶(translocase outer membrane, TOM)形成复合物借此进入线粒体膜间隙，随后与内膜转运酶(translocase inner membrane, TIM)再次形成新的复合物，并被内膜上的早老素相关的菱形蛋白(Presenilin-associated rhomboid-like protein, PARL)快速分解，从而维持 PINK1 的低表达，并抑制对正常线粒体的吞噬作用[9]。而当线粒体受损或功能障碍时，线粒体膜电位降低，PINK1 就不能与 TOM 正常结合，因无法顺利进入线粒体膜间隙，故而大量聚集在外膜上，并从胞浆中募集 Parkin 到线粒体膜上[10]。这一过程是通过 PINK1 磷酸化 Parkin 实现的[11]。随后，Parkin 泛素化线粒体外膜蛋白，该蛋白被信号接头蛋白 p62/SQSTM1 所识别，然后与吞噬膜表面的 Atg8 家族同源蛋白(LC3 等)进行连接，进而启动线粒体自噬[12]。

PINK1 和 Parkin 是诱导线粒体自噬的重要因素，其它们的过度激活可能抑制肿瘤细胞的生长，并促进其凋亡[13] [14]；而当两者表达缺失时，线粒体自噬活性将降低，这可能反而会会导致肿瘤的发生[15]。大量研究表明，线粒体自噬活性在人类多种恶性肿瘤细胞中都存在一定程度的异常。例如卵巢癌、乳腺癌等恶性肿瘤中，PINK1 和 Parkin 的表达都显著低于正常组织；在 PINK1 基因敲除的小鼠中，乳腺癌、肺癌等恶性肿瘤的发病率明显高于正常小鼠[16]。丁高峰等在对多形性腺瘤和癌的研究结果也显示：在正常腮腺组织中，PINK1 和 Parkin 蛋白阳性表达率明显高于多形性腺瘤和癌，且在癌中的表达率最低[17]。另有研究发现线粒体自噬在肿瘤形成过程中是存在显著差异的。Jeong 等发现，在小鼠胰腺癌发展的过程中，线粒体自噬水平在早期是明显升高的，以扼制癌变的快速发展；而在晚期，胰腺细胞完成癌变后，线粒体自噬水平又显著降低，使得癌变进程加快[18]。以上所有结果均提示了，线粒体自噬活性的降低确实是促进肿瘤恶化的关键因子。而在结直肠癌的发生、发展过程中，PINK1 和 Parkin 的表达情况如何，这些因子的变化与结直肠癌的临床病理又有着怎样的联系，目前相关的报道甚少。

本研究结果显示，PINK1 和 Parkin 蛋白在正常结直肠组织、结直肠腺瘤和结直肠癌组织中的阳性表达率依次呈逐渐降低的趋势，也就是说，两者阳性表达率在正常结直肠组织中阳性表达率最高，结直肠癌中阳性表达率最低，结直肠腺瘤中阳性表达率居中，这与目前存在的文献报道结果相符[16] [17]。究其原因，可能是因为结直肠癌细胞为适应癌组织迅速生长所造成的低氧和营养缺乏的环境，需要对线粒体自噬水平进行利于自身的下调处理。对其临床意义的进一步研究表明，PINK1 和 Parkin 的阳性表达与其分化程度、淋巴结转移、远处转移和临床 TNM 分期具有明显的关联性，而与患者年龄、性别、肿瘤体积、病理类型无关。Spearman 相关系数检验结果发现，在癌组织中 PINK1 和 Parkin 两者的阳性表达呈正相关($r = 0.5528$, $P = 0.03$)：随着 PINK1 的阳性表达升高降低，Parkin 的阳性表达也随之升高降低，这说明两者的低表达降低了结直肠癌的线粒体自噬活性，促进了结直肠癌的发生、发展。

5. 结论

总之，PINK1 和 Parkin 蛋白在结直肠癌中的阳性表达率明显低于肠腺瘤和正常肠组织，并促进了结直肠癌的发生、发展、侵袭和转移。PINK1-Parkin 介导的线粒体自噬可能是一种肿瘤抑制机制，激活该

通路介导的线粒体自噬可能为结直肠癌的防治提供了一个新的靶点；而且联合检测 PINK1 和 Parkin 则有利于提高结直肠癌的疗效和判断预后。

参考文献

- [1] Dilly, A., Honick, B.D., Lee, Y.J., *et al.* (2020) Rational Application of Targeted Therapeutics in Mucinous Colon/Appendix Cancers with Positive Predictive Factors. *Cancer Medicine*, **9**, 1753-1767. <https://doi.org/10.1002/cam4.2847>
- [2] Rabanalruiz, Y., Otten, E.G. and Korolchuk, V.I. (2017) mTORC1 as the Main Gateway to Autophagy. *Essays in Biochemistry*, **61**, 565-584. <https://doi.org/10.1042/EBC20170027>
- [3] Wang, X., Li, H., Li, W., *et al.* (2020) The Role of Caspase-1/GSDMD-Mediated Pyroptosis in Taxol-Induced Cell Death and a Taxol-Resistant Phenotype in Nasopharyngeal Carcinoma Regulated by Autophagy. *Cell Biology and Toxicology*, **36**, 437-457. <https://doi.org/10.1007/s10565-020-09514-8>
- [4] Zhang, L., Liu, X., Song, L., Zhai, H. and Chang, C. (2020) MAP7 Promotes Migration and Invasion and Progression of Human Cervical Cancer Through Modulating the Autophagy. *Cancer Cell International*, **20**, Article No. 17. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-1095-4>
- [5] Chu, Y., Wang, Y., Li, K., *et al.* (2020) Human Omental Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Enhance Autophagy in Ovarian Carcinoma Cells through the STAT3 Signalling Pathway. *Cellular Signalling*, **24**, Article ID: 109549. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109549>
- [6] Shefa, U., Jeong, N.Y., Song, I.O., Chung, H.J., Kim, D., Jung, J. and Huh, Y. (2019) Mitophagy Links Oxidative Stress Conditions and Neurodegenerative Diseases. *Neural Regeneration Research*, **14**, 749-756. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.249218>
- [7] Zhong, Z.Y., Sanchez-Lopez, E. and Karin, M. (2016) Autophagy, Inflammation, and Immunity: A Troika Governing Cancer and Its Treatment. *Cell*, **166**, 288-298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.051>
- [8] Di Rita, A., Peschiaroli, A., D'Acunzo, P., *et al.* (2018) HUWE1 E3 Ligase Promotes PINK1/PARKIN-Independent Mitophagy by Regulating AMBRA1 Activation via IKK α . *Nature Communications*, **9**, Article No. 3755. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05722-3>
- [9] Kong, H., Jiang, C.-Y., Hu, L., *et al.* (2019) Morphine Induces Dysfunction of PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy in Spinal Cord Neurons Implying Involvement in Antinociceptive Tolerance. *Journal of Molecular Cell Biology*, **11**, 1056-1068. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz002>
- [10] Palikaras, K., Lionaki, E. and Tavernarakis, N. (2018) Mechanisms of Mitophagy in Cellular Homeostasis, Physiology and Pathology. *Nature Cell Biology*, **20**, 1013-1022. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0176-2>
- [11] Salazar, C., Ruiz-Hincapie, P. and Ruiz, L.M. (2018) The Interplay among PINK1/PARKIN/Dj-1 Network during Mitochondrial Quality Control in Cancer Biology: Protein Interaction Analysis. *Cell*, **7**, Article No. 154. <https://doi.org/10.3390/cells7100154>
- [12] Lazarou, M., Sliter, D.A., Kane, L.A., *et al.* (2015) The Ubiquitin Kinase PINK1 Recruits Autophagy Receptors to Induce Mitophagy. *Nature*, **524**, 309-314. <https://doi.org/10.1038/nature14893>
- [13] Boyle, K.A., Van Wickle, J., Hill, R.B., *et al.* (2018) Mitochondria-Targeted Drugs Stimulate Mitophagy and Abrogate Colon Cancer Cell Proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, **293**, 14891-14904. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001469>
- [14] Han, J., Zhang, J., Zhang, W., *et al.* (2019) Abiraterone and MDV3100 Inhibits the Proliferation and Promotes the Apoptosis of Prostate Cancer Cells through Mitophagy. *Cancer Cell International*, **19**, Article No. 332. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1021-9>
- [15] Gladkova, C., Maslen, S.L., Skehel, J.M. and Komander, D. (2018) Mechanism of Parkin Activation by PINK1. *Nature*, **559**, 410-414. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0224-x>
- [16] Bernardini, J.P., Lazarou, M. and Dewson, G. (2017) Parkin and Mitophagy in Cancer. *Oncogene*, **36**, 1315-1327. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.302>
- [17] 丁高峰, 郭雷鸣, 柯少瑞, 陆寓非. 腮腺多形性腺瘤及癌在多形性腺瘤中 PINK1 和 Parkin 的表达及临床意义[J]. 肿瘤防治研究, 2021, 48(5): 470-473.
- [18] Jeong, S.M., Hwang, S., Park, K., Yang, S. and Seong, R.H. (2016) Enhanced Mitochondrial Glutamine Anaplerosis Suppresses Pancreatic Cancer Growth through Autophagy Inhibition. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 30767. <https://doi.org/10.1038/srep30767>