

引用本文:胡宁,朱晓锋.经典瞬时受体电位通道1在胃癌组织中的表达及其生物学意义[J].安徽医药,2021,25(9):1851-1854.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.09.036.



◇临床医学◇

## 经典瞬时受体电位通道1在胃癌组织中的表达及其生物学意义

胡宁<sup>a</sup>,朱晓锋<sup>b</sup>

作者单位:咸宁市中心医院湖北科技学院附属第一医院,<sup>a</sup>胃肠外科一病区,<sup>b</sup>心胸外科,湖北 咸宁 437100

**摘要:** 目的 研究胃癌组织中经典瞬时受体电位通道1(transient receptor potential canonical, TRPC1)的表达及TRPC1沉默对胃癌细胞的生物学效应。方法 收集咸宁市中心医院2015年1月至2018年4月93例手术切除的胃癌和癌旁组织标本,免疫组化检测上述标本中TRPC1的表达,分析其与病人临床病理特征的关系。利用TRPC1小分子干扰RNA(siRNA-TRPC1)转染胃癌MGC-803细胞,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质印迹法(Western blotting)验证转染效率。MTT法评估siRNA-TRPC1对MGC-803细胞增殖能力的影响。相关试剂盒检测丙二醛、活性氧和超氧化物歧化酶(SOD)水平。流式细胞术检测细胞凋亡水平。结果 与癌旁组织比较,TRPC1在胃癌组织中的表达显著上调(阳性表达率分别为79.6%比20.4%),且TRPC1的高表达与肿瘤的TNM分期( $P=0.007$ )、分化程度( $P=0.022$ )和淋巴结转移( $P=0.010$ )相关;与对照组比较,转染组TRPC1 mRNA和蛋白质水平均显著下降( $P<0.05$ );与对照组比较,siRNA-TRPC1转染组细胞的增殖活性显著下降( $P<0.05$ );与对照组比较,siRNA-TRPC1转染组细胞丙二醛和活性氧水平升高,SOD活性降低( $P<0.05$ );与对照组比较,siRNA-TRPC1转染组细胞凋亡水平明显升高( $P<0.05$ )。结论 TRPC1在胃癌中高表达,siRNA沉默TRPC1可抑制胃癌肿瘤细胞的增殖,上调细胞的氧化应激水平,促进肿瘤细胞的凋亡。

**关键词:** 胃肿瘤; 经典瞬时受体电位通道1; 增殖; 氧化应激

### The expression and biological significance of TRPC1 in gastric carcinoma tissue

HU Ning<sup>a</sup>,ZHU Xiaofeng<sup>b</sup>

Author Affiliation:<sup>a</sup>Department of Gastrointestinal Surgery, <sup>b</sup>Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Hubei University of Science and Technology, Xianning, Hubei 437100, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression and biological functions of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) in gastric carcinoma. **Methods** Ninety-three cases of surgically removed gastric carcinoma and paracarcinoma tissues in Xianning Central Hospital January 2015 to April 2018 were collected. The expression of TRPC1 in the above samples was detected by immunohistochemical analysis, and the relationship between TRPC1 and clinicopathological features of the patients was analyzed. The gastric carcinoma cells were transfected with siRNA-TRPC1, and the transfection efficiency of TRPC1 was detected by RT-PCR and Western blotting. Meanwhile, cell proliferation was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). Moreover, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde and reactive oxygen species activity were detected by biochemical kit. The apoptotic level was detected by flow cytometry. **Results** Compared with adjacent tissues, the expression of TRPC1 was significantly increased in tissues of gastric carcinoma (79.6% vs. 20.4%,  $P<0.05$ ). The expression of TRPC1 in gastric cancer tissues was correlated with tumor TNM staging, differentiation degree and lymph node metastasis ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, TRPC1 mRNA and protein levels in the transfection group were significantly lower ( $P<0.05$ ). In addition, the proliferation activity of siRNA-TRPC1 transfected cells was significantly decreased ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, malondialdehyde and reactive oxygen species levels increased while SOD activity decreased in siRNA-TRPC1 transfected cells ( $P<0.05$ ); and the apoptotic level of siRNA-TRPC1 transfected cells increased significantly ( $P<0.05$ ). **Conclusions** The expression of TRPC1 is up-regulated in gastric carcinoma tissues. Moreover, inhibition of TRPC1 expression by siRNA increases oxidative stress and inhibits the cell proliferation.

**Key words:** Stomach neoplasms; TRPC1; Proliferation; Oxidative stress

胃癌是我国最常见的消化道肿瘤,占2015年我国癌症发病顺位的第2位(40.3万例),且占我国因癌症死亡的第3位(29.1万例)<sup>[1]</sup>。尽管手术切除、放化疗和靶向药物等措施在胃癌的诊治中取得了较大进展,但终末期胃癌的5年生存率仍不足30%<sup>[2-3]</sup>。

经典瞬时受体电位通道(transient receptor potential canonical, TRPC)为一类分布广泛的钙离子通道,通过调控钙离子内流,参与一系列的生物学过程。研究表明,经典瞬时受体电位通道1(TRPC1)通道在多种恶性肿瘤中表达上调,包括乳腺癌、甲

状腺癌和肝细胞癌等<sup>[4-8]</sup>。然而,尚不清楚TRPC1通道在胃癌中的表达及其生物学效应。因此,本研究首先检测TRPC1在胃癌组织中的表达情况,分析其与胃癌病人临床病理特征的关系,以期为胃癌的精准治疗提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 临床标本收集** 收集咸宁市中心医院2015年1月至2018年4月93例手术切除的胃癌和癌旁组织标本,所有病人术前均未接收放、化疗或其他抗肿瘤治疗。其中男性62例,女性31例,年龄范围为35~79岁。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求,所有病人均签署了知情同意书。

**1.2 试剂** TRPC1抗体和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司。人胃癌MGC-803细胞购自中科院上海细胞库。TRPC1小分子干扰RNA(siRNA-TRPC1)质粒购自上海Genechem公司。Trizol、PrimeScript™ RT-PCR试剂盒、噻唑蓝试剂盒和凋亡流式试剂盒均购自瑞士Roche公司。RPMI1640培养基购自美国Gibco公司。丙二醛、活性氧和超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 免疫组织化学染色** 包埋后将组织标本切成4~5 μm厚的薄片,经脱蜡、抗原修复等处理后,滴加3%的小牛血清封闭。分别加入适量的TRPC1抗体和二抗,复染细胞核后脱水封片,显微镜下观察。结果判定:(1)以阳性细胞数<5%计为0分,5%~25%计为1分,>25%~50%计为2分,>50%~75%计为3分,>75%~100%计为4分。(2)以无着色计为0分,黄色计为1分,棕黄色计为2分,棕褐色计为3分。将两者得分相乘后:以<3分为阴性表达,≥3分为阳性表达。

**1.3.2 细胞培养和转染** 将复苏后的人胃癌MGC-803细胞培养在RPMI1640培养基,选择处于对数期的细胞,接种于6孔板中。按照说明书的步骤操作,利用siRNA沉默TRPC1的表达。根据实验设计,将其分为三组:对照组、空载体组和转染组。其中对照组不做任何处理,空载体组仅转染无任何靶基因的siRNA,转染组则转染siRNA-TRPC1。

**1.3.3 MTT法检测细胞增殖情况** 将转染后的人胃癌MGC-803细胞接种于96孔板中,密度为 $5 \times 10^3$ /孔,设置3个复孔。分别于转染后0、12、24、48、72 h,加入7 g/L的噻唑蓝溶液,孵育5 h后加入二甲亚砜溶液。37℃孵育10 min后,酶标仪检测各组细胞在490 nm波长处的吸光度值,以对照组为参照,计算细胞存增殖活性。上述实验均重复3次。

**1.3.4 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测细胞mRNA水平** 收集细胞,加入Trizol试剂提取总RNA,并将其反转录成互补DNA(cDNA)。按照PrimeScript™ RT-PCR试剂盒说明书的操作步骤,在RT-PCR仪进行PCR扩增。以GAPDH作为内参,进行定量分析。GAPDH正向引物序列为5'-CTGGC-TACTGAGCACC-3',反向引物序列为5'-AAGTG-GTCGTTGAGGGCAATG-3'。TRPC1正向引物序列为5'-ACTTCAACAGCGA-3',反向引物序列为5'-ATACCAGGAAATGAGC-3'。上述实验均重复3次。

**1.3.5 蛋白质印迹法(Western blotting)检测细胞蛋白水平** 收集细胞并提取细胞蛋白,检测TRPC1的蛋白表达。具体操作步骤如下:每孔加入200 μL裂解液,提取细胞总蛋白并进行定量分析。制备凝胶并按每孔40 μg蛋白量上样电泳,将蛋白转移到PVDF膜上。脱脂奶粉封闭1 h后,加入适量的一抗,4℃孵育,等渗缓冲盐溶液(TBST)洗膜后加入二抗,37℃孵育1h。使用Odyssey成像系统扫膜,以GAPDH为参照物,检测TRPC1的表达水平。上述实验均重复3次。

**1.3.6 检测细胞氧化应激水平** 收集细胞,检测各组样品的蛋白浓度,按照各试剂盒说明书的步骤操作,检测SOD、丙二醛和活性氧的水平。上述实验均重复3次。

**1.3.7 检测细胞凋亡水平** 收集细胞,加入200 μL的结合缓冲液使细胞重悬。分别加入5 μL膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)和碘化丙啶(PI)染色液,上机检测细胞凋亡水平。上述实验均重复3次。

**1.4 统计学方法** 采用SPSS 21.0进行统计学处理。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 $t$ 检验,多组比较采用单因素方差分析+LSD- $t$ 检验;计数资料比较采用 $\chi^2$ 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 TRPC1在胃癌及癌旁组织中的表达** 免疫组化结果显示TRPC1蛋白表达于细胞内,呈棕黄色颗粒。TRPC1在胃癌组织的阳性表达率显著高于癌旁组织(79.6%比20.4%, $\chi^2=65.054$ , $P<0.001$ )。

**2.2 TRPC1的表达与胃癌病人临床病理特征的关系** TRPC1的高表达与肿瘤的TNM分期、分化程度和淋巴结转移相关(均 $P<0.05$ ),而与性别、年龄、肿瘤大小、远处转移、吸烟史和饮酒史无关(均 $P>0.05$ ),见表1。

**2.3 siRNA靶向沉默TRPC1的效果** RT-PCR和蛋白质印迹法结果显示,转染组胃癌MGC-803细胞中TRPC1 mRNA和蛋白表达明显低于对照组( $P<$

**表1** 经典瞬时受体电位通道1(TRPC1)的表达与胃癌临床病理特征的关系/例(%)

临床病理特征	例数	TRPC1		$\chi^2$ 值	P值
		阴性表达	阳性表达		
性别				0.132	0.716
男	62	12(19.4)	50(80.6)		
女	31	7(22.6)	24(77.4)		
年龄				0.185	0.667
≥60岁	53	10(18.9)	43(81.1)		
<60岁	40	9(22.5)	31(77.5)		
肿瘤大小				0.373	0.541
≥5 cm	35	6(37.1)	29(62.9)		
<5 cm	58	13(55.2)	45(44.8)		
TNM分期				7.182	0.007
I/II	30	11(36.7)	19(63.3)		
III/IV	63	8(12.7)	55(87.3)		
分化程度				5.216	0.022
低	51	6(11.8)	45(88.2)		
中高	42	13(31.0)	29(69.0)		
淋巴结转移				6.573	0.010
否	23	9(39.1)	14(60.9)		
是	70	10(14.3)	60(85.7)		
远处转移				3.023	0.082
否	80	14(17.5)	66(82.5)		
是	13	5(38.5)	8(61.5)		
吸烟史				1.106	0.293
否	21	6(28.6)	15(71.4)		
是	72	13(18.1)	59(81.9)		
饮酒史				0.515	0.473
否	28	7(25.0)	21(75.0)		
是	65	12(18.5)	53(81.5)		

0.05)。而对照组与空载体组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表2和图1。

**表2** 转染后的人胃癌MGC-803细胞经典瞬时受体电位通道1(TRPC1)mRNA和蛋白相对表达量 $\bar{x} \pm s$

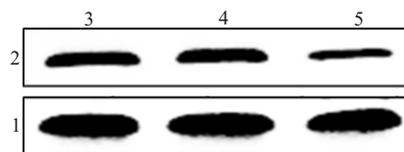
组别	重复次数	TRPC1 mRNA	TRPC1 蛋白
对照组	3	1.00±0.16	1.00±0.19
空载体组	3	1.05±0.14	1.08±0.21
转染组	3	0.29±0.08 <sup>①</sup>	0.34±0.05 <sup>①</sup>
F值		63.035	35.898
P值		<0.001	<0.001

注:①与对照组比较, $P<0.05$ 。

**表4** 各组人胃癌MGC-803细胞转染后各时点的增殖活性比较 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组	3	0.43±0.04	0.49±0.05	0.69±0.06	1.02±0.07	1.19±0.09
空载体组	3	0.45±0.05	0.50±0.05	0.68±0.07	1.01±0.08	1.23±0.10
转染组	3	0.44±0.04	0.48±0.04	0.58±0.05 <sup>①</sup>	0.69±0.05 <sup>①</sup>	0.75±0.07 <sup>①</sup>
F值		0.316	0.636	6.055	45.957	55.513
P值		0.734	0.543	0.012	<0.001	<0.001

注:①与对照组比较, $P<0.05$ 。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—经典瞬时受体电位通道1(TRPC1);3—对照组;4—空载体组;5—转染组。

**图1** 蛋白质印迹法检测转染后各组人胃癌MGC-803细胞TRPC1蛋白水平

**2.4 细胞氧化应激水平检测** 与对照组相比,siRNA-TRPC1转染组丙二醛和活性氧水平明显升高,抗氧化酶SOD活性降低( $P<0.05$ )。而与对照组比较,空载体组细胞丙二醛、活性氧和SOD水平的差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表3。

**表3** siRNA沉默TRPC1对人胃癌MGC-803细胞氧化应激水平的影响 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	SOD/(U/L)	丙二醛/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	活性氧/ ( $\mu\text{mol/L}$ )
对照组	3	43.47±3.16	5.29±0.34	65.18±4.72
空载体组	3	44.32±2.24	5.12±0.39	62.46±5.43
转染组	3	20.13±3.87 <sup>①</sup>	7.83±0.46 <sup>①</sup>	92.61±4.29 <sup>①</sup>
F值		113.139	86.530	71.350
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:TRPC1为经典瞬时受体电位通道1,SOD为超氧化物歧化酶。  
①与对照组比较, $P<0.05$ 。

**2.5 细胞增殖活性** MTT法检测结果显示,72 h时,siRNA-TRPC1转染组细胞增殖活性明显低于对照组( $P<0.05$ ),而对照组和空载体组间的差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表4。

**2.6 细胞凋亡水平检测** 三组凋亡率比较, $F=356.705$ , $P<0.001$ 。与对照组凋亡率(2.23±0.35)%相比,siRNA-TRPC1转染组(10.13±0.87)%显著升高( $P<0.05$ ),而空载体组(2.37±0.39)%则差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

目前,胃癌已经成为严重威胁我国居民健康的重大疾病之一<sup>[9-10]</sup>。因此,深入探究胃癌的发病机制,寻找新的治疗靶点,对于胃癌的防治具有重要意义。本研究结果显示胃癌组织中TRPC1的表达

较癌旁组织明显升高,且 TRPC1 的高表达与 TNM 分期、分化程度和淋巴结转移呈显著正相关,提示 TRPC1 可能在胃癌的致病过程中具有重要的作用。

1995 年, Wes 等<sup>[11]</sup>首次通过原位杂交技术克隆出人 TRPC1 蛋白,并定位于 3 号染色长臂的 22-24 区。人和小鼠的 TRPC1 通道蛋白均包含 753 个氨基酸序列,分子量为 91 kDa。研究表明,TRPC1 不仅表达在正常器官和组织,在多种肿瘤组织中也均有表达<sup>[12-14]</sup>。李英等<sup>[15]</sup>证实,TRPC1 在乳腺癌组织中呈高表达,且和乳腺癌的病理类型、分级有关。研究证实,敲除人滤泡性甲状腺癌细胞中的 TRPC1 的表达,可显著降低癌细胞的增殖和迁移、促进肿瘤细胞的凋亡<sup>[5]</sup>。同时有研究也表明,TRPC1 在肝细胞癌中的表达显著上调,且 siRNA 沉默人肝癌 Huh7 细胞中的 TRPC1 表达,可明显抑制 Huh7 细胞的增殖活性<sup>[6]</sup>。本研究提示转染组细胞 TRPC1 的 mRNA 和蛋白质表达水平明显低于对照组,沉默 TRPC1 的表达可显著降低 MGC-803 细胞的增殖活性。

氧化应激损伤是指各种病理生理刺激导致活性氧在体内大量蓄积,继而出现细胞或组织损伤。研究表明,活性氧在肿瘤进展过程中发挥着“双刃剑”作用,即低浓度的活性氧通过诱导 DNA 突变、激活原癌基因和上调肿瘤细胞的代谢水平等促进肿瘤细胞异常增殖。而高浓度的活性氧则抑制肿瘤细胞的增殖,诱导细胞凋亡<sup>[16-17]</sup>。徐湖波等<sup>[18]</sup>研究表明,上调胃癌细胞的活性氧水平可以抑制肿瘤细胞增殖,促进凋亡。Badr 等<sup>[19]</sup>证实对乙酰氨基酚通过抑制 TRPC1 的激活,上调活性氧水平,促进人肝癌 HepG2 的凋亡。与之类似,本研究表明,siRNA 沉默 TRPC1 的表达可显著升高胃癌 MGC-803 细胞活性氧水平,抑制胃癌细胞的增殖,促进凋亡。

综上所述,TRPC1 在胃癌组织中高表达,且与胃癌的 TNM 分期、分化程度和淋巴结转移密切相关。siRNA 沉默 TRPC1 的表达可以上调 MGC-803 细胞的氧化应激水平,抑制肿瘤细胞的增殖。然而,本研究仍有不足之处:一是随访时间较短,没有探讨 TRPC1 的表达与胃癌病人的预后和生存率的关系;二是没有进行动物实验,也没有在多种胃癌细胞中进行验证。因此,这些不足之处是我们接下来的研究方向。

### 参考文献

[1] 孙可欣,郑荣寿,张思维,等.2015 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中国肿瘤,2019,28(1):1-11.  
[2] LEE JH, NAM BH, RYU KW, et al. Comparison of outcomes after laparoscopy-assisted and open total gastrectomy for early gastric cancer[J]. Br J Surg, 2015, 102(12): 1500-1505.

[3] 韩冬冬,顾康生.单药或联合方案二线治疗进展期胃癌研究进展[J].安徽医药,2018,22(12):2287-2290.  
[4] SELLI C, PEARCE DA, SIMS AH, et al. Differential expression of store-operated calcium- and proliferation-related genes in hepatocellular carcinoma cells following TRPC1 ion channel silencing [J]. Mol Cell Biochem, 2016, 420(1/2): 129-140.  
[5] ASGHAR M Y, MAGNUSSON M, KEMPPAINEN K, et al. Transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) channels as regulators of sphingolipid and VEGF receptor expression: implications for thyroid cancer cell migration and proliferation [J]. J Biol Chem, 2015, 290(26): 16116-16131.  
[6] SELLI C, ERAC Y, KOSOVA B, et al. Silencing of TRPC1 regulates store-operated calcium entry and proliferation in Huh7 hepatocellular carcinoma cells [J]. Biomed Pharmacother, 2015, 71: 194-200.  
[7] NESIN V, TSIOKAS L. TRPC1 [J]. Handb Exp Pharmacol, 2014, 222: 15-51.  
[8] KAEMMERER E, TURNER D, PETERS AA, et al. An automated epifluorescence microscopy imaging assay for the identification of phospho-AKT level modulators in breast cancer cells [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2018, 92: 13-19.  
[9] 刘婉婷,顾康生.胃癌术后辅助化疗的研究进展[J].临床肿瘤学杂志,2018,23(6):569-572.  
[10] 张理想,徐阿曼,韩文秀,等.快速康复外科在胃癌中的应用[J].安徽医药,2017,21(5):948-951.  
[11] WES PD, CHEVESICH J, JEROMIN A, et al. TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(21): 9652-9656.  
[12] SABOURIN J, BOET A, RUCKER-MARTIN C, et al. Ca(2+) handling remodeling and STIM1/Orai1/TRPC1/TRPC4 upregulation in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy [J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 118: 208-224.  
[13] AZIMI I, MILEVSKIY M, KAEMMERER E, et al. TRPC1 is a differential regulator of hypoxia-mediated events and Akt signaling in PTEN-deficient breast cancer cells [J]. J Cell Sci, 2017, 130(14): 2292-2305.  
[14] GE P, WEI L, ZHANG M, et al. TRPC1/3/6 inhibition attenuates the TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer via the Ras/Raf1/ERK signaling pathway [J]. Cell Biol Int, 2018, 42(8): 975-984.  
[15] 李英,李宗龙,逯金海,等. TRPC1 蛋白在乳腺癌中表达及与临床病理参数的相关性[J].中国老年学杂志,2019,39(1):62-64.  
[16] TANG JY, OU-YANG F, HOU MF, et al. Oxidative stress-modulating drugs have preferential anticancer effects - involving the regulation of apoptosis, DNA damage, endoplasmic reticulum stress, autophagy, metabolism, and migration [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 58: 109-117.  
[17] 肖莉,张倩雨,马莹,等.氧化应激在肿瘤糖代谢中的作用研究[J].肿瘤,2018,38(9):901-906.  
[18] 徐湖波,刘云华,江应平,等.下调乳酸脱氢酶-A 诱导胃癌细胞凋亡及 ROS 产生的实验研究[J].现代肿瘤医学,2019,27(5):757-761.  
[19] BADR H, KOZAI D, SAKAGUCHI R, et al. Different contribution of redox-sensitive transient receptor potential channels to acetaminophen-induced death of human hepatoma cell line [J]. Front Pharmacol, 2016, 7: 19.

(收稿日期:2019-09-15,修回日期:2019-10-24)