

# TROP2通过内质网钙铁离子交换影响胃癌侵袭的分子机制

王超<sup>1,2</sup>, 贾立周<sup>2</sup>, 刘阳<sup>2</sup>, 张宁<sup>2</sup>, 王如梦<sup>2</sup>, 肖瑞<sup>1\*</sup>

(1. 内蒙古医科大学基础医学院, 内蒙古 呼和浩特 010059;

2. 巴彦淖尔市医院中心实验室, 内蒙古 巴彦淖尔 015000)

**【摘要】目的** 探讨人滋养层细胞表面糖蛋白2(TROP2)通过内质网钙铁离子交换影响胃癌侵袭的分子机制。**方法** 构建TROP2与PLOD2过表达/敲减细胞株, WB、RT-qPCR检测TROP2、PLOD2、磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(PIP2)、胶原蛋白I型(COL-I)、缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )、蛋白激酶C(PKC)mRNA和蛋白的表达水平, ELISA法检测三磷酸肌醇受体(IP3R)含量, 比色分析法检测Fe<sup>2+</sup>和Ca<sup>2+</sup>含量。**结果** 随着TROP2的表达量的变化, PLOD2、PIP2、IP3等蛋白水平随之同步变化, 在PLOD2的过表达和敲减模型中, 无论PLOD2如何变化, TROP2、PIP2、IP3R、PKC并无明显变化, 但COL-I、HIF-1 $\alpha$ 随着PLOD2的变化同步增减。在离子水平, 内质网Ca<sup>2+</sup>浓度与TROP2和PLOD2的表达量呈正相关, Fe<sup>2+</sup>浓度与TROP2和PLOD2的表达量呈负相关。**结论** PLOD2上游受TROP2的钙离子信号转导通路“内质网Ca<sup>2+</sup>-Fe<sup>2+</sup>交换”调控, 下游通过调控HIF1 $\alpha$ 和胶原纤维交联促进肿瘤的侵袭、转移。

**【关键词】** 胃癌; PLOD2; TROP2; 钙离子信号转导通路; Ca<sup>2+</sup>-Fe<sup>2+</sup>交换

中图分类号: R365

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2023)02-0118-07

## MOLECULAR MECHANISM OF TROP2 AFFECTING THE INVASION OF GASTRIC CANCER THROUGH CALCIUM AND IRON ION EXCHANGE IN ENDOPLASMIC RETICULUM

WANG Chao<sup>1,2</sup>, JIA Lizhou<sup>2</sup>, LIU Yang<sup>2</sup>, ZHANG Ning<sup>2</sup>, WANG Rumeng<sup>2</sup>, XIAO Rui<sup>1\*</sup>

( 1. College of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China;

2. Central Laboratory, Bayannur Hospital, Bayannur 015000, China )

**【Abstract】Objective** To investigate the molecular mechanism of human trophoblast cell surface glycoprotein 2 (TROP2) affecting gastric cancer invasion through endoplasmic reticulum calcium-iron ion exchange. **Methods** TROP2 and PLOD2 overexpression/knockdown cell lines were constructed, WB, RT-qPCR detected the expression levels of TROP2, PLOD2, PIP2, COL-1, HIF-1 $\alpha$ , PKC mRNA and protein, ELISA detected IP3 receptor (IP3R) content, colorimetric analysis detected Fe<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> content. **Results** With the change of TROP2 expression, the levels of PLOD2, PIP2, IP3 and other proteins changed synchronously, and in the overexpression and knockdown model of PLOD2, no matter how PLOD2 changed, TROP2, PIP2, IP3R, PKC did not change significantly, but COL-I and hif-1 $\alpha$  increased and decreased simultaneously with the change of PLOD2. At the ionic level, the concentration of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> was positively correlated with the expression of TROP2 and PLOD2. Fe<sup>2+</sup> concentration was negatively correlated with the expression of TROP2 and PLOD2. **Conclusions** The upstream of PLOD2 is regulated by the calcium signal transduction pathway "endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-Fe<sup>2+</sup> exchange" in the upper reaches of PLOD2, and the downstream promotes tumor invasion and metastasis by regulating the crosslinking of HIF1 $\alpha$  and collagen fibers.

**【Keywords】** Gastric cancer; PLOD2; TROP2; Calcium signal pathway; Ca<sup>2+</sup>-Fe<sup>2+</sup> competitive inhibition

收稿日期: 2023-02-11; 修回日期: 2023-03-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(82060438)

第一作者: 王超(1988—), 男, 2020级在读硕士研究生。E-mail: 476661851@qq.com

\*通信作者: 肖瑞, 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师。研究方向: 雄性不育和神经退行性疾病相关基因功能以及分子机制的研究。E-mail: xiaorui79@hotmail.com

据统计,2020年我国胃癌新发病例数和胃癌死亡人数均居恶性肿瘤的第三位<sup>[1]</sup>。多数患者就诊时已是晚期,预后差,5年生存率低<sup>[2]</sup>,因此寻找一种能够有效治疗并控制胃癌,同时改善患者预后的药物具有重要意义<sup>[3]</sup>。课题组前期发现TROP2促进胃癌上皮-间充质转化并诱导胃癌细胞转移<sup>[4]</sup>,这可能有助于更好地了解胃癌的发病机制。离子代谢在肿瘤细胞内的异常可直接导致肿瘤能量代谢的变异,并可影响到肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)的变化<sup>[5]</sup>。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积过多或结构形态异常是TME的重要特征之一<sup>[6]</sup>。胶原蛋白基因参与肿瘤ECM与受体的相互作用和局灶性黏附途径,在肿瘤的侵袭、转移过程中起着举足轻重的作用。高表达的胶原蛋白基因,促进了癌细胞的增殖及肿瘤的发生<sup>[7]</sup>。PLOD2是一种胶原蛋白修饰酶,胶原蛋白是在ECM中最丰富的支架蛋白<sup>[8]</sup>。PLOD2作为关键基因介导稳定胶原交联形成<sup>[9]</sup>。据报道,TROP2与PLOD2的表达与胃癌的不良预后相关,但是TROP2如何调控PLOD2重塑胃癌肿瘤微环境的机制尚不清楚。该课题对TROP2通过内质网 $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交换影响胃癌侵袭的分子机制进行了初步研究。这些发现对于今后胃癌发生和发展的分子机制以及早期诊断、开发新的治疗靶点有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人胃癌细胞株MKN45、MG803由本实验室保存,质粒载体(北京义翘神州公司),培养基(GeneCopoeia公司,美国),双抗(BI公司,美国),Lenti-Pac慢病毒包装试剂盒(GeneCopoeia公司,美国),嘌呤霉素(Sigma Aldrich公司,美国),TRIzol试剂、High-Capacity cDNA逆转录试剂盒(Invitrogen公司,美国),SYBR荧光定量PCR试剂盒(诺唯赞公司,南京),重组人PLOD2蛋白、重组人TROP2蛋白、RIPA裂解液、鼠抗人GAPDH单克隆抗体、HRP标记的羊抗兔与兔抗小鼠IgG抗体(Abcam公司,美国),胰蛋白酶、酶标抗体(GIBCO公司,美国),预染标记marker、Alexa Fluor 488标记的羊抗兔IgG、ECL发光液(Thermo公司,美国),5X eBlot LI PVDF膜转膜浓缩液、Tris-MOPS-SDS Running Buffer Powder(南京金斯瑞生物科技有限公司),鼠抗人TROP2单克隆抗体、鼠抗人PLOD2单克隆抗体、HRP标记的羊抗兔

与兔抗小鼠IgG抗体(R&D公司,美国),鼠抗人单克隆GAPDH抗体(武汉三鹰生物科技有限公司),TMB(四甲基联苯胺)(武汉生物科技有限公司)。引物由北京擎科生物科技有限公司合成。本研究已由内蒙古医科大学医学伦理委员会审核通过。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 胃癌细胞株MKN45、MG803培养于10%胎牛血清,添加1%双抗的RPMI1640培养基中,置于37℃含有5%  $\text{CO}_2$ 恒温培养箱中培养,每2~3 d换一次液,待细胞融合度达到90%后,用0.25%的胰蛋白酶进行细胞消化传代。

**1.2.2 TROP2 shRNA与PLOD2 shRNA表达质粒的构建与鉴定** 将质粒转化至DH5 $\alpha$ 感受态细胞,涂板于含氨苄青霉素的LB平板,37℃培养过夜。挑单克隆菌落接种于含氨苄青霉素的LB培养基中,37℃振荡过夜。次日将少量菌液用1:10比例稀释的甘油进行混合,在冰箱-80℃进行保种,其余提取一定量的菌液送生工生物工程(上海)有限公司进行测序,验证pCMV3-TROP2-Flag序列是否正确。

**1.2.3 慢病毒包装** 10 cm培养皿接种 $1.5 \times 10^6$ 个胃癌细胞,添加含10% FBS的10 mL DMEM培养基(胎牛血清提前进行热灭活)。待细胞长至约80%融合度,按Lenti-Pac慢病毒包装试剂说明书将空载和过表达质粒分别转染至胃癌细胞,离心收集上清液并用滤器过滤。上清与浓缩试剂按5:1比例混合,4℃孵育过夜并离心,弃上清收集沉淀物即为慢病毒颗粒。取PBS吹打慢病毒沉淀,操作轻柔,保存-80℃冰箱。

**1.2.4 病毒感染及稳定株筛选** 将胃癌细胞以 $5 \times 10^4$ 个/孔的密度种植于24孔板,24 h后取出慢病毒颗粒置于冰上融化,感染目的细胞。分别标记感染含干扰质粒和过表达质粒的慢病毒的细胞、感染空载体慢病毒的细胞,24 h后更换为含10%热灭活FBS的RPMI1640培养基。72 h后加入嘌呤霉素并持续筛选1周。荧光显微镜下观察转染效率,细胞荧光率达100%,0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素维持培养2周。

**1.2.5 RNA提取,逆转录和RT-qPCR** 将进入生长期的细胞,按照制造商的说明用TRIzol试剂提取细胞RNA,再根据High-Capacity cDNA逆转录试剂盒说明书逆转录总RNA为cDNA。qRT-PCR在96孔板上的ABI PRISM 7500HT序列检测系统上进行。相对表达水平以与GAPDH的归一化比值计算。结果被归一化为各自的内部对照。计算每个样本扩增的 $\text{Ct}$ 值,基因表达的相对定量值(RQ值)以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算。

**1.2.6 免疫蛋白印迹分析** 用标准方法裂解细胞蛋白。细胞蛋白用10% SDS-PAGE分离,转移到PVDF膜上。用含有5%脱脂牛奶封闭膜2 h,在4℃下使用一抗孵育过夜。将PVDF膜分别浸没于抗体稀释液配制的一抗。用TBST溶液漂洗PVDF膜3次,每次10 min,分别加入二抗室温孵育1 h, TBST溶液漂洗3次,每次10 min。将ECL曝光混合液均匀覆盖PVDF膜,打开曝光软件拍照并用软件检测灰度值。

**1.2.7 在TROP2与PLOD2过表达/敲减细胞株中利用ELISA检测IP3含量** 用碳酸盐包被缓冲液将抗体稀释,4℃过夜。弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗3次,每次3 min。提取细胞总蛋白后加细胞裂解液于上述已包被的反应孔中,置37℃孵育1 h,洗涤。各反应孔加入新鲜稀释的酶标抗体,37℃孵育0.5~1 h,洗涤。各反应孔中加入配制的四甲基联苯胺底物溶液,37℃10~30 min于各反应孔中加入硫酸。在ELISA检测仪上,于450 nm处以空白对照孔调零后测各孔OD值。

**1.2.8 利用比色分析法检测Fe<sup>2+</sup>和Ca<sup>2+</sup>含量** 用10 μL 100 mM standard Iron加入990 μL的ddH<sub>2</sub>O稀释生成1 mM标准铁。将稀释后的standard Iron以不同的量加入96孔板中,生成不同含量的标准孔。使用Iron Assay Buffer调整体积,每标准孔内加入Iron Reducer。将所测细胞加入的Iron Assay Buffer中溶解,离心除去不溶性物质。将样品加入96孔板中,用Iron Assay Buffer调整样品体积。将蛋白标准品和样品在室温下孵育30 min。在每个标准曲线孔和样品孔中加入100 μL的Iron Probe,并充分混匀。在室温下避光反应1 h。在593 nm处测量OD值,绘制铁标准曲线。Fe<sup>2+</sup>浓度计算:C=Sa/Sv(nmol/μL or mM)

将10 μL Calcium Standard(500 mM)加入90 μL ddH<sub>2</sub>O稀释成5 mM Calcium Standard分别以不同的量加入孔板中,用ddH<sub>2</sub>O补充。将细胞裂解液置于孔板中,加ddH<sub>2</sub>O补充。向含有标准品、检测品及对照的孔中加入Chromogenic Reagent轻轻混合,再向每个孔中加入Calcium Assay Buffer轻轻混合。在室温下避光孵育。及时测量575 nm处的OD值。Ca<sup>2+</sup>浓度计算:C=Sa/Sv(μg/μL or mg/mL)。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计分析,计量资料以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两两比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-q检验,检验水准为 $\alpha=0.05$ , $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TROP2过表达质粒在胃癌细胞株MGC803中的构建情况

在MGC803细胞株中构建TROP2过表达瞬转细胞模型及其对照组,命名为OE-TROP2-MGC803和OE-Control<sup>TROP2</sup>-MGC803。本课题组在早期研究中已成功在MKN45中构建了TROP2敲减细胞模型及对照组,并命名为shTROP2-MKN45和shControl-MKN45<sup>[3]</sup>。另外将未经任何处理的细胞设为阴性对照并命名为NC-MKN45及NC-MGC803。利用RT-qPCR、WB、FACS、LCSM四种实验方法检测在过表达MGC803胃癌细胞株中TROP2的表达变化。

**2.1.1 在qRT-PCR检测中,OE-TROP2-MGC803组细胞TROP2 mRNA表达水平较OE-Control<sup>TROP2</sup>-MGC803组和NC-MGC803组明显上调(见图1)。**

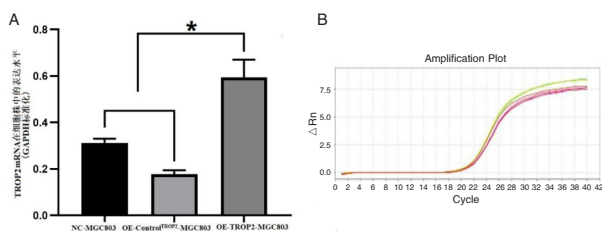


图1 qRT-PCR检测TROP2 mRNA在OE-TROP2-MGC803的表达水平

Fig.1 qRT-PCR detects the expression level of TROP2 mRNA in OE-TROP2-MGC803

A: 过表达组TROP2 mRNA与对照组、空载组表达水平相比较, $P<0.05$ ;对照组TROP2 mRNA与空载组表达水平相比较 $P>0.05$ 。B: TROP2基因扩增曲线图,\* $P<0.05$ 。

A: The expression level of TROP2 mRNA in the overexpression group was compared with that in the control group and the empty group ( $P<0.05$ ); while the expression level of TROP2 mRNA in the control group was compared with that in the empty group ( $P>0.05$ ). B: TROP2 gene amplification curve, \* $P<0.05$ .

**2.1.2 在WB检测中,OE-TROP2-MGC803组TROP2蛋白表达水平较OE-Control<sup>TROP2</sup>-MGC803组和NC-MGC803组明显上调(见图2)。**

### 2.2 Ca<sup>2+</sup>转导通路相关蛋白在TROP2过表达/敲减细胞株中的检测结果

**2.2.1 利用WB在TROP2过表达/敲减细胞株中检测蛋白的表达情况。**结果显示:shTROP2-MKN45组PLOD2、PIP2、IP3R、COL-I、HIF-1 $\alpha$ 、PKC蛋白表达水平较shControl-MKN45组和NC-MKN45组明显下降;OE-TROP2-MGC803组PLOD2、PIP2、IP3受体(IP3R)、COL-I、HIF-1 $\alpha$ 、PKC蛋白较OE-Control<sup>TROP2</sup>-MGC803组和NC-MGC803组明显上调(见图3)。



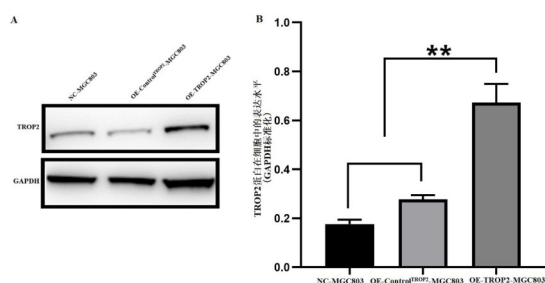


图2 WB检测TROP2蛋白在OE-TROP2-MGC803的表达水平  
Fig.2 WB detects the expression level of TROP2 protein in OE-TROP2-MGC803

A: WB曝光图,过表达组与对照组和空载组比较,  $P < 0.05$ ; 对照组与空载组比较,  $P > 0.05$ 。B: TROP2 表达量光密度比值统计图;  $**P < 0.001$ 。

A: WB exposure map, compared with the control group and the empty group in the overexpression group,  $P < 0.05$ ; Compared with the control group and the empty group,  $P > 0.05$ 。B: Statistical map of optical density ratio of TROP2 expression,  $**P < 0.001$ 。

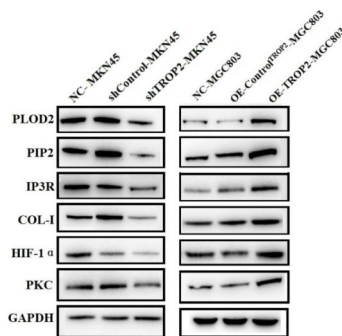


图3 WB检测TROP2过表达/敲减细胞Ca<sup>2+</sup>转导通路蛋白及PLD2下游蛋白  
Fig.3 WB detected TROP2 overexpression/knockdown cell Ca<sup>2+</sup> transduction pathway protein and PLD2 downstream protein

MKN45细胞过表达组与对照组和空载组比较,  $P < 0.05$ ; 对照组和空载组比较,  $P > 0.05$ ; MGC803细胞过表达组与对照组和空载组比较,  $P < 0.05$ ; 对照组和空载组比较,  $P > 0.05$ 。

The MKN45 cell overexpression group was compared with the control group and the empty group ( $P < 0.05$ ), the control group was compared with the empty group ( $P > 0.05$ ); Compared with the control group and the empty group, the overexpression group of MGC803 cells had a significant difference ( $P < 0.05$ ), while the comparison between the control group and the empty group had a significant difference ( $P > 0.05$ ).

2.2.2 利用ELISA在TROP2过表达/敲减细胞株中选取了6个时间点检测IP3的含量,结果显示:每个对应的时间点 shTROP2-MKN45组IP3的含量较shControl-MKN45和NC-MKN45明显下调;OE-TROP2-MGC803组每个对应时间IP3含量较OE-Control<sup>TROP2</sup>-MGC803组和NC-MGC803组明显上调(见图4)。

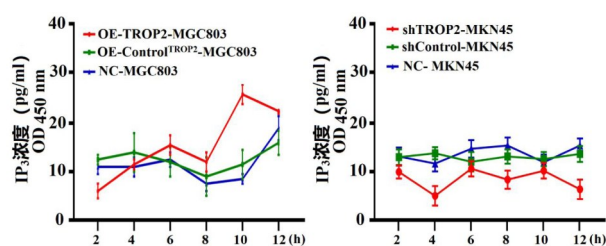


图4 ELISA检测TROP2过表达/敲减细胞株中IP3的含量变化  
Fig.4 ELISA detects changes in IP3 content in TROP2 overexpression/knockdown cell lines

MKN45细胞、MGC803细胞过表达组与对照组和空载组比较,  $P < 0.05$ ; 对照组与空载组比较,  $P > 0.05$ 。

Compared with the control group and the empty group, the overexpression group of MKN45 cells and MGC803 cells had a significant difference ( $P < 0.05$ ). Compared with the empty group, the control group had a significant difference ( $P > 0.05$ ).

## 2.3 在TROP2过表达/敲减细胞株中Fe<sup>2+</sup>和Ca<sup>2+</sup>含量的检测结果

2.3.1 利用比色分析法选取了6个时间点检测细胞质内Fe<sup>2+</sup>的含量,结果显示:每个对应的时间点 sh-TROP2-MKN45组较shControl-MKN45组和NC-MKN45组明显上调;OE-TROP2-MGC803组2 h、10 h、12 h较OE-Control<sup>TROP2</sup>-MGC803组和NC-MGC803组明显下降,在4 h、6 h、8 h OE-TROP2-MGC803组较OE-Control<sup>TROP2</sup>-MGC803和NC-MGC803明显上调(见图5)。

2.3.2 利用比色分析法选取了6个时间点检测细胞质内Ca<sup>2+</sup>的含量,结果显示:每个对应的时间点 sh-TROP2-MKN45组较shControl-MKN45组和NC-MKN45组明显下调;OE-TROP2-MGC803组2 h、4 h较OE-Control<sup>TROP2</sup>-MGC803组和NC-MGC803组明显下调,OE-TROP2-MGC803组6 h、8 h、10 h、12 h较OE-Control<sup>TROP2</sup>-MGC803组和NC-MGC803组明显上调(见图5)。

## 2.4 PLOD2的上下游相关调控蛋白在过表达/敲减细胞株中的检测结果

2.4.1 利用WB在PLOD2过表达/敲减细胞株中检测TROP2、PIP2、IP3受体(IP3R)、COL-1、HIF-1α、PKC蛋白的表达情况,结果显示:shPLOD2-MKN45 COL-1、HIF-1α蛋白表达量较shControl-MKN45组和NC-MKN45组明显下调;但OE-PLOD2-MGC803组较OE-Control<sup>PLOD2</sup>-MGC803组和NC-MGC803组COL-1、HIF-1α蛋白表达量明显上调(见图6)。