

网络出版时间:2025-02-06 14:15:38 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250206.1139.018

TNNT1 表达调控胃癌细胞 HGC-27 生物学行为研究

龚雨海, 余昌俊

(安徽医科大学第一附属医院胃肠外科, 合肥 230022)

摘要 目的 研究肌钙蛋白 T1(TNNT1)在临床胃癌组织样本及胃癌细胞 HGC-27 中的表达情况。方法 选择 UALCAN、GEPIA 数据库对 TNNT1 蛋白在胃癌组织中表达差异性进行检测;使用 Western blot 方法检测胃癌组织临床样本中的蛋白表达情况;使用 MTT 法、Transwell 法定量检测并分析 TNNT1 蛋白在胃癌细胞 HGC-27 中对增殖、侵袭及迁移的影响及其与患者临床病理特征之间的关系。结果 TNNT1 蛋白在胃癌细胞 HGC-27 中表达上调;转染 sh-TNNT1 后,检测 TNNT1 蛋白表达下调($P < 0.01$),胃癌细胞 HGC-27 增殖、侵袭及迁移能力均受抑制($P < 0.05$)。TNNT1 蛋白在胃癌组织中表达上调且与患者的 TNM 分期($P = 0.049$)及肿瘤浸润深度($P = 0.011$)密切相关,但与患者年龄、肿瘤直径、淋巴结转移、肿瘤分化程度等均无明显相关性。结论 下调 TNNT1 蛋白表达可抑制胃癌细胞 HGC-27 的增殖、侵袭和迁移能力。

关键词 胃癌;TNNT1;增殖;侵袭;迁移;临床病理特征

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)02-0321-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.019

胃癌是消化系统中发病率较高的恶性肿瘤之一,其发展受多种因素的影响,包括环境因素和遗传因素^[1],是全球癌症死亡的第四大原因,晚期患者的中位生存期不足 12 个月^[2]。胃癌具有高侵袭性和异质性,其诊断、治疗及早期筛查目前仍是一个全球性的健康问题^[3]。肌钙蛋白 T (troponin T, TnT) 基于对肌动蛋白丝的调控来控制横纹肌收缩,并在调节平滑肌收缩力和非肌肉细胞运动中发挥重要作用^[4]。在脊椎动物中,有 3 个同源基因编码 3 种肌肉类型特异性的 TnT 亚型:慢速骨骼肌的 TnT 为 TNNT1、心肌的 TnT 为 TNNT2、快速骨骼肌的 TnT 为 TNNT3^[5]。TNNT1 作为肌钙蛋白其中一个亚基,其作用与神经肌肉疾病密切相关^[6]。近年来,已有报道称 TNNT1 能促进乳腺癌、结直肠癌细胞的增殖、侵袭及迁移^[7]。目前,尚无相关报道证实 TNNT1 与胃癌的发生发展关系。该研究旨在探讨 TNNT1 在胃癌中的表达、功能及调控异常的机制,为胃癌的临床治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 主要材料 收集 2016 年 8 月—2021 年 8 月安

徽医科大学第一附属医院病理科所保存的胃癌患者术中切除标本和正常胃组织标本蜡块共计 207 例,其中胃癌组织 127 例,正常胃组织 80 例。所有结果均由 2 位病理科医师(采用双盲原则)共同评定;免疫组化试剂使用 DAB 显色剂(北京中杉金桥公司)及通用型 EnVision 两步法试剂盒,鼠抗人 β -actin 抗体、兔抗人抗体 TNNT1(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);人胃癌细胞株 HGC-27 购自美国细胞培养物集存库;无血清培养基 OPTI-MEM、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、洛维培养基(RPMI-1640)(美国 GIBCO 公司);Lipofectamine 3000 转染试剂、TRIzol 试剂、RNA 反转录试剂、实时荧光定量 PCR 反应试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司];0.25% 胰蛋白酶、蛋白裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 UALCAN 数据库与 GEPIA 数据库数据分析

对 UALCAN 数据库(<http://ualcan.path.uab.edu>)及 GEPIA 数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>)中 RNA-seq 数据集及胃癌患者临床数据信息进行软件分析,统计 TNNT1 mRNA 在正常胃组织及胃癌组织中表达及患者预后生存情况,完成图表绘制。

1.2.2 免疫组化 取正常胃组织及胃癌组织蜡块,进行切片、脱蜡,切成约 4 μm 的连续切片后进行预处理。切片根据说明书使用通用型 EnVision 两步

2024-10-20 接收

基金项目:安徽省高等学校自然科学研究项目(编号:KJ2021ZD0025)

作者简介:龚雨海,男,硕士研究生;

余昌俊,男,教授,主任医师,博士生导师,通信作者,E-

mail:yuchangjun321@163.com

法试剂盒及 DAB 显色剂对 TNNT1 蛋白在正常胃组织及胃癌组织中表达进行测定。每张切片随机选取 4 个高倍镜下视野观察并采用半定量评分标准判断^[8-9],最后进行结果判读;所有患者均电话回访后在网上签署知情同意书。

结果判读:将免疫组化染色强度分为以下 4 类:分别计为:0 分(细胞无着色);1 分(细胞着色为淡黄色);2 分(细胞着色为黄色);3 分(细胞着色为深褐色)。将阳性细胞所占比例分为 5 类并赋分值:0 分(无阳性细胞);1 分(阳性细胞占 $>0\% \sim 20\%$);2 分(阳性细胞占 $>20\% \sim 50\%$);3 分(阳性细胞占 $>50\% \sim 75\%$);4 分(阳性细胞 $>75\%$)。最终将染色强度分值与阳性细胞比例分值相乘得出结果并分为以下 3 组:0 分为阴性组;1 ~ 4 分为低表达组;6 ~ 12 分为高表达组。

1.2.3 细胞培养与细胞转染 人胃癌细胞株 HGC-27 培养于含有 10% FBS 及 1% 青-链霉素的 RPMI-1640 培养基中,放置于含有 5% CO_2 、37 °C 恒温培养箱中传代培养。在显微镜下观察细胞形态进行细胞换液处理,1 ~ 2 d 更换培养基。细胞传代后将 HGC-27 细胞接种于 6 孔板中继续培养,平均每孔接种细胞数量为 1.0×10^5 个;当镜下观察细胞生长密度为孔面积的 70% 左右时进行细胞转染,转染步骤如下:根据 Lipofectamine 3000 转染试剂(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)说明书进行细胞转染。本实验设置实验组与空白对照组(空白对照组均加入等量 PBS 缓冲液)。实验组细胞转染 sh-TNNT1-1 及 sh-TNNT1-2 质粒(TNNT1 的 sh-RNA)(上海吉玛制药技术有限公司),sh-TNNT1-1 和 sh-TNNT1-2 的敲低效率不同。在镜下观察细胞状态及细胞密度,转染 48 h 后收集蛋白并检测。转染序列如下:sh-TNNT1-1: 5'-CCGGGCCTCTGGACATTGACTACATCTC GAGATGTAGTCAATGTCCAGAGGCTTTTGTG-3';sh-TNNT1-2: 5'-CCGGGCCTCCTTTGATCCCGCCAAACTCGA GTTTGGCGGGATCAAAGGAGGCTTTTGTG-3'。

1.2.4 细胞增殖能力检测 采用四唑盐比色法(method of tetrazolium salt colorimetric, MTT)进行检测,取培养皿中 HGC-27 细胞先进行胰酶消化后镜下计数。将计数后细胞接种于 96 孔板中,每孔接种 1.0×10^3 个细胞并设置 6 个平行孔。接种时弃去培养基,在每孔细胞中加入约 100 μl MTT 液与培养基的混合液(1:9)并放置于 5% CO_2 、37 °C 恒温培养箱中 1 h,最后使用酶标仪测量 570 nm 处吸光度,连续检测 5 d,每次检测后取数值平均值并作图。

1.2.5 细胞转移能力检测 选择生长对数期 HGC-27 细胞进行胰酶消化并计数。将计数后的细胞接种于 24 孔板中,每孔接种 5×10^4 个细胞并设置 2 个平行副孔。细胞迁移实验中孔下方加入 700 μl 含有血清的培养基,上方 Transwell 小室中加入总体积为 300 μl 无血清的培养基(且含有 5×10^4 个 HGC-27 细胞)后放置于 5% CO_2 、37 °C 恒温培养箱中培养 12 h 后取出,进行甲醛固定、结晶紫溶液染色后于镜下观察、拍照。细胞侵袭实验中需在上方 Transwell 小室中铺 Matrigel 胶后加入总体积为 300 μl 无血清的培养基(且含有 5×10^4 个 HGC-27 细胞)后放置于 5% CO_2 、37 °C 恒温培养箱中培养 24 h,其余步骤与细胞迁移实验相同。均在显微镜下随机选取 3 个视野进行细胞计数并统计制图。

1.3 统计学处理 所有数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。多组间比较使用 χ^2 检验,计量资料的两组间比较使用 t 检验,细胞增殖能力比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNNT1 蛋白在 UALCAN 数据库、GEPIA 数据库及临床组织样本中表达 通过在 UALCAN 数据库中检测发现,TNNT1 在 415 例胃癌患者胃组织中呈高表达,34 例正常胃组织中的 TNNT1 呈低表达($P < 0.01$,图 1)。在 GEPIA 数据库中证实,高表达 TNNT1 胃癌患者的无病生存期短于低表达 TNNT1 胃癌患者,但差异无统计学意义($P = 0.06$,图 2)。免疫组化检测 TNNT1 蛋白在组织中的表达,结果显示 TNNT1 蛋白在胃癌患者临床组织样本中表达显著上调,差异有统计学意义,见图 3 和表 1。

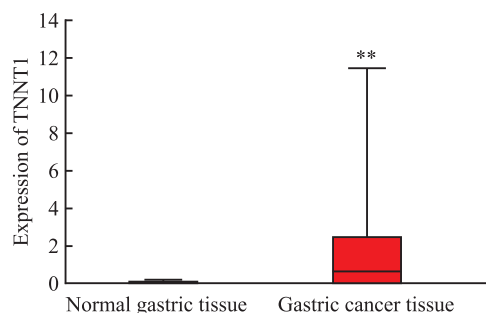


图 1 UALCAN 数据库中 TNNT1 在胃癌组织及正常胃组织中的表达情况

Fig.1 Expression of TNNT1 in gastric cancer and normal gastric tissue in UALCAN database

** $P < 0.01$ vs Normal gastric tissue group.

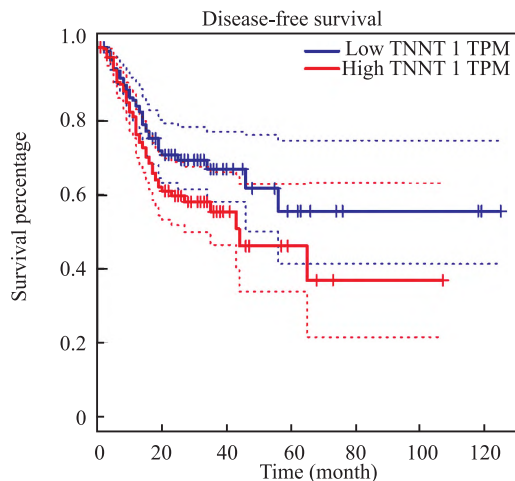


图2 GEPIA 数据库中 TNNT1 表达与胃癌患者无病生存率的生存曲线
Fig.2 The correlation between TNNT1 expression and disease-free survival rate of gastric cancer patients in GEPIA database

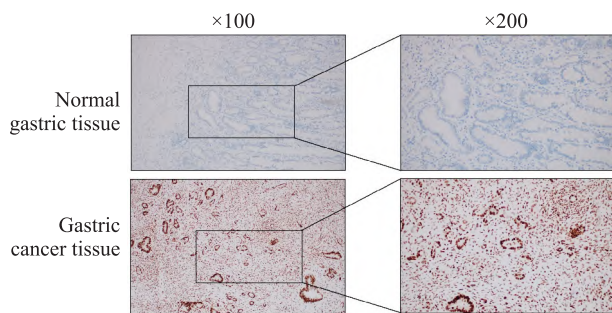


图3 免疫组化法检测 TNNT1 蛋白在人胃癌组织及正常胃组织中的表达情况

Fig.3 TNNT1 protein expression in gastric cancer tissues and normal gastric tissues detected by immunohistochemistry

表1 TNNT1 在正常胃组织中和胃癌组织表达 [n(%)]

Tab.1 TNNT1 Expression in normal and gastric cancer tissues [n(%)]

Group	n	TNNT1 positive expression	χ^2 value	P value
Gastric cancer tissues	127	97 (76.4)	8.05	<0.05
Normal gastric tissues	80	30 (37.5)		

2.2 TNNT1 蛋白与胃癌患者临床病理特征之间的关系 选择免疫组化法检测 TNNT1 蛋白表达情况,结果显示 TNNT1 蛋白表达与肿瘤 TNM 分期及肿瘤浸润深度密切相关,与胃癌患者年龄、肿瘤直径、淋巴结转移、肿瘤分化程度等均无明显相关性。见表2。

2.3 TNNT1 在胃癌组织中的表达 为检测 TNNT1 蛋白在胃癌组织中的表达情况,选取临床胃癌组织及正常胃组织样本进行蛋白检测。用 Western blot 法检测 TNNT1 蛋白表达。胃癌组中的 TNNT1 蛋白表达显著下调,差异有统计学意义 ($P < 0.01$,图4)。

表2 TNNT1 在胃癌组织中的表达与临床病理特征的关系 [n(%)]

Tab.2 Relationship between TNNT1 expression in gastric cancer tissues and clinicopathological features [n(%)]

Group	n	Positive expression		P value
		High (n = 48)	Low (n = 49)	
Age (year)				0.473
<60	46	21	25	
≥60	51	27	24	
Tumor diameter (cm)				0.258
<5	53	29	24	
≥5	44	19	25	
TNM stage				0.049
I	42	16	26	
II - IV	55	32	23	
Lymph node metastasis				
Yes	45	27	18	0.054
No	52	21	31	
Tumor differentiation				0.596
High	41	19	22	
Medium or low	56	29	27	
Tumor infiltration depth				0.011
Serosa not invaded	46	29	17	
Invasion of serosa	51	19	32	

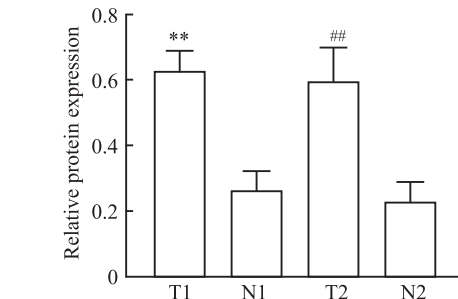
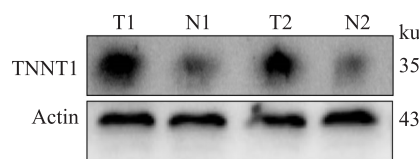


图4 TNNT1 在胃癌组织及正常胃组织中的蛋白表达

Fig.4 Protein expression of TNNT1 in gastric cancer tissues and normal gastric tissues

T1: Human gastric cancer tissue sample 1; N1: Normal gastric tissue 1; T2: Human gastric cancer tissue sample 2; N2: Normal gastric tissue 2; ** $P < 0.01$ vs N1; ## $P < 0.01$ vs N2.

2.4 抑制 TNNT1 蛋白表达对胃癌 HGC-27 细胞增殖、转移的影响 胃癌细胞 HGC-27 转染 sh-TNNT1-1、sh-TNNT1-2 质粒后行 Western blot 检测,结果显示 sh-TNNT1-1、sh-TNNT1-2 组中 TNNT1 蛋白表达下调,差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$,图5),且证实 sh-TNNT1-1 敲低效率更高,故选择 sh-TNNT1-1 进行后续细胞功能实验。MTT 结果显示:转染 sh-TNNT1 组的细胞增殖速度自第2天

起,均低于 sh-control 组 ($P < 0.05$, 图 6), 证实下调 TNNT1 蛋白表达可抑制胃癌 HGC-27 细胞增殖能力。Transwell 实验结果显示:在 100 倍镜下观察,sh-TNNT1 组中 HGC-27 细胞的侵袭、迁移能力均减弱 ($P < 0.05$, 图 7), 说明下调 TNNT1 蛋白表达可抑制胃癌 HGC-27 细胞侵袭、迁移能力。

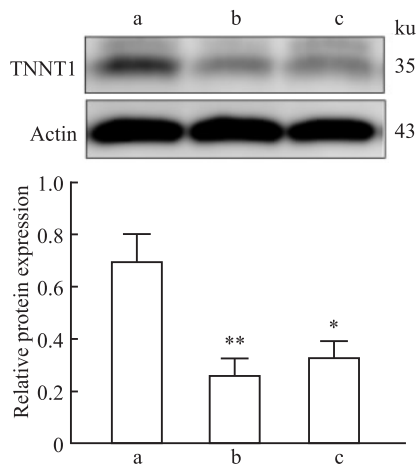


图 5 Western blot 法检测转染 sh-TNNT1 的效率

Fig. 5 The transfection efficiency of sh-TNNT1 determined by Western blot

a: sh-control; b: sh-TNNT1-1; c: sh-TNNT1-2; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs sh-control group.

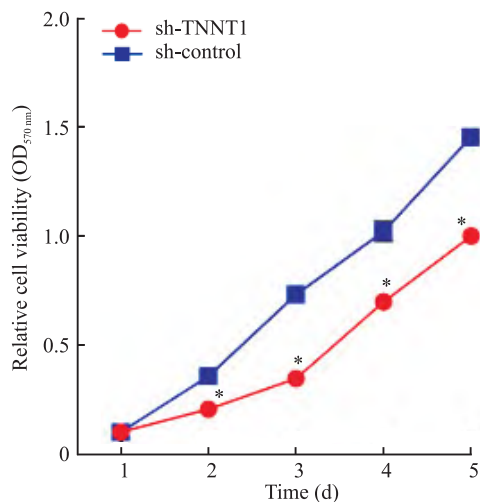


图 6 下调 TNNT1 基因表达抑制胃癌 HGC-27 细胞增殖

Fig. 6 Downregulation of TNNT1 expression inhibited the proliferation of gastric cancer HGC-27 cells

* $P < 0.05$ vs sh-control group.

3 讨论

我国胃癌病死率已居恶性肿瘤第 3 位^[10]。近年来,各国年轻人的胃癌发病率在逐步上升^[11]。深入了解并研究全球及各区域内胃癌流行病学危险因素及其发生机制已成为临床靶向研究的新方向。

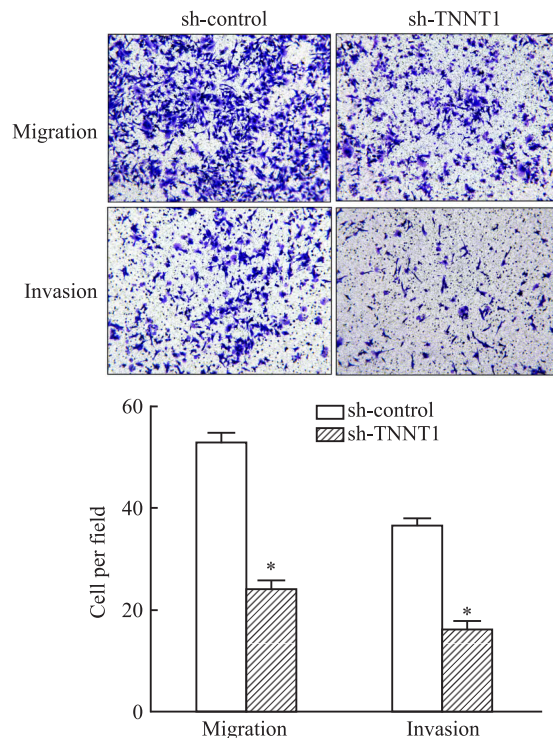


图 7 TNNT1 蛋白表达对胃癌 HGC-27 细胞侵袭、迁移的影响 ×100

Fig. 7 Effect of TNNT1 expression on invasion and migration of gastric cancer HGC-27 cells ×100

* $P < 0.05$ vs sh-control group.

因此,本研究拟阐述胃癌细胞 HGC-27 在增殖、侵袭及迁移的相关分子机制,为提高胃癌患者的诊疗效果、延长患者预后生存期提供临床诊疗新思路。

现有研究^[12]表明,TNNT1 基因突变可导致骨骼肌中的 TnT 蛋白功能缓慢减弱直至完全丧失,最终导致严重的网状肌病。同时,TNNT 蛋白在乳腺癌组织中表达显著升高,其表达程度与其临床分期、TNM 分期密切相关,TNNT 蛋白可通过改变 G1/S 转换促进乳腺癌细胞的增殖^[12]。与此同时,相关研究也证实抑制 TNNT1 蛋白表达也可显著抑制结直肠癌细胞的增殖、侵袭和迁移^[13]。至此,本研究拟提出探讨 TNNT 蛋白家族中的 TNNT1 在胃癌发生发展过程所发挥的生物学效应。

本研究在公共数据库 UALCAN、GEPIA 中检测 TNNT1 在胃癌患者中的蛋白表达及预后情况。数据库证实 TNNT1 蛋白在胃癌组织中表达上调 ($P < 0.01$)。免疫组化结果显示在胃癌患者临床组织样本中 TNNT1 蛋白表达上调,且表达强弱与胃癌 TNM 分期及肿瘤浸润深度密切相关。通过 Western blot 法检测,胃癌细胞株 HGC-27 中 TNNT1 蛋白表达下

调后,胃癌细胞增殖、侵袭和迁移能力受抑制,临床数据库及细胞实验结果一致。

综上所述,本研究通过探讨 TNNT1 在胃癌发生发展过程中的相关作用机制,拟提出 TNNT1 可能作为具有相关潜力的胃癌治疗新靶点,为胃癌患者的临床治疗提供新的研究方向。

参考文献

- [1] Yusefi A R, Bagheri Lankarani K, Bastani P, et al. Risk factors for gastric cancer: a systematic review [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(3): 591–603. doi:10.22034/apjcp.2018.19.3.591.
- [2] Zhang X Y, Zhang P Y. Gastric cancer: somatic genetics as a guide to therapy [J]. *J Med Genet*, 2017, 54(5): 305–12. doi:10.1136/jmedgenet-2016-104171.
- [3] Gao J P, Xu W, Liu W T, et al. Tumor heterogeneity of gastric cancer: from the perspective of tumor-initiating cell [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(24): 2567–81. doi:10.3748/wjg.v24.i24.2567.
- [4] Musso G, Blasi L, Mion M M, et al. Troponin T in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) [J]. *J Neurol Sci*, 2024, 456: 122816. doi:10.1016/j.jns.2023.122816.
- [5] Landim-Vieira M, Ma W, Song T, et al. Cardiac troponin T N-domain variant destabilizes the actin interface resulting in disturbed myofilament function [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(23): e2221244120. doi:10.1073/pnas.2221244120.
- [6] Chen Y, Wang J, Wang D, et al. TNNT1, negatively regulated by miR-873, promotes the progression of colorectal cancer [J]. *J Gene Med*, 2020, 22(2): e3152. doi:10.1002/jgm.3152.
- [7] Tutar Y. miRNA and cancer: computational and experimental approaches [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2014, 15(5): 429. doi:10.2174/138920101505140828161335.
- [8] Wang L, Zhang J, Yang X, et al. SOX4 is associated with poor prognosis in prostate cancer and promotes epithelial-mesenchymal transition *in vitro* [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2013, 16(4): 301–7. doi:10.1038/pcan.2013.25.
- [9] Jin M, Yang Z, Ye W, et al. Prognostic significance of histone methyltransferase enhancer of zeste homolog 2 in patients with cervical squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(2): 857–62. doi:10.3892/ol.2015.3319.
- [10] 胡泽瑞,朱小琼,葛王舒琦,等. 2022 年全球及中国胃癌发病率和死亡率分析 [J/OL]. 海军军医大学学报, 1–9 [2025–01–01]. <https://doi.org/10.16781/j.cn31-2187/R.20240736>.
- [10] Hu Z R, Zhu X Q, Ge W S Q, et al. Incidence and mortality of gastric cancer globally and in China in 2022 [J/OL]. *Acad Naval Med Univ*, 1–9 [2025–01–01]. <https://doi.org/10.16781/j.cn31-2187/R.20240736>.
- [11] Thrift A P, Wenker T N, El-Serag H B. Global burden of gastric cancer: epidemiological trends, risk factors, screening and prevention [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(5): 338–49. doi:10.1038/s41571-023-00747-0.
- [12] Johnston J J, Kelley R I, Crawford T O, et al. A novel nemaline myopathy in the Amish caused by a mutation in troponin T1 [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 67(4): 814–21. doi:10.1086/303089.
- [13] Shi Y, Zhao Y, Zhang Y, et al. TNNT1 facilitates proliferation of breast cancer cells by promoting G1/S phase transition [J]. *Life Sci*, 2018, 208: 161–6. doi:10.1016/j.lfs.2018.07.034.

Regulation of TNNT1 expression on biological behavior of gastric cancer cells HGC-27

Gong Yuhai, Yu Changjun

(Dept of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression of troponin T1 (TNNT1) in clinical gastric cancer tissue samples and gastric cancer cell line HGC-27. **Methods** The expression of TNNT1 protein in gastric cancer tissues was analyzed using the UALCAN and GEPIA databases to assess its differential expression. Western blot was used to detect the protein expression in clinical samples of gastric cancer tissue. The effects of TNNT1 protein on proliferation, invasion and migration of gastric cancer cell HGC-27 and relationship with clinicopathological features of patients were quantitatively detected and analyzed by MTT and Transwell assays. **Results** The expression of TNNT1 protein was up-regulated in HGC-27 cells. The expression of TNNT1 protein was down-regulated ($P < 0.01$) and the proliferation, invasion, migration of HGC-27 cells were inhibited ($P < 0.01$) after transfection with sh-TNNT1. The expression of TNNT1 protein was down-regulated in gastric cancer tissues and correlated with TNM stage ($P = 0.049$) and depth of tumor invasion ($P = 0.011$); There was no significant correlation with patient age, tumor diameter, lymph node metastasis, and tumor differentiation. **Conclusion** Down-regulating of TNNT1 protein expression can inhibit the proliferation, invasion and migration of gastric cancer cells HGC-27.

Key words gastric cancer; TNNT1; proliferation; invasion; migration; clinicopathological features

Fund program Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. KJ2021ZD0025)

Corresponding author Yu Changjun, E-mail: yuchangjun321@163.com