生理学报 *Acta Physiologica Sinica*, June 25, 2020, 72(3): 274–284
DOI: 10.13294/j.aps.2020.0038 http://www.actaps.com.cn

研究论文

钙敏感受体基因多态性E942K通过Ca^{2+}和ERK1/2通路促进胃癌细胞增殖

张亚博[1]，杜 超[3]，卢 骋[2]，董 辉[2]，吴小翎[1,*]

[1]重庆医科大学第二附属医院消化科，重庆 400010；[2]陆军军医大学第二附属医院新桥医院消化科，重庆 400037；[3]中国人民解放军西部战区总医院消化内科，成都 610038

摘 要：本研究旨在探究钙敏感受体(calcium-sensing receptor, CaSR)的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP) E942K对胃癌细胞增殖的影响及其机制。对46例胃癌患者和50例正常对照进行基因型检测。应用CaSR E942K突变质粒和野生型质粒转染SGC-7901和HEK-293构建细胞模型，采用CCK8和细胞克隆形成实验检测E942K突变对细胞增殖能力的影响，用钙显影成像技术检测E942K突变对钙信号的影响，并采用Western blot检测E942K突变后下游信号通路关键蛋白ERK1/2和β-catenin磷酸化水平的变化。结果显示，胃癌患者CaSR E942K的突变率显著高于正常对照($P < 0.05$)。CaSR E942K突变显著提高了SGC-7901胃癌细胞及HEK-293细胞的增殖能力、细胞内钙信号以及ERK1/2的磷酸化，却不影响β-catenin的磷酸化。以上结果提示，CaSR的E942K突变可能通过增强细胞内钙信号和ERK1/2磷酸化，最终促进了胃癌细胞的增殖，这些结果对胃癌的诊断和靶向治疗具有潜在的临床意义。

关键词：胃癌；基因多态性；细胞增殖；钙敏感受体；钙信号；ERK1/2
中图分类号：R363.2+5

A calcium-sensing receptor polymorphism at E942K promotes the proliferation of gastric cancer cells via Ca^{2+} and ERK1/2 pathways

ZHANG Ya-Bo[1], DU Chao[3], LU Cheng[2], DONG Hui[2], WU Xiao-Ling[1,*]

[1]*Department of Digestive System, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;* [2]*Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China;* [3]*Department of Gastroenterology and Hepatology, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610038, China*

Abstract: The study was designed to investigate the effects and mechanism of a calcium-sensing receptor (CaSR) polymorphism at E942K on the proliferation of gastric cancer cells. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were detected between gastric cancers group and normal controls group by DNA sequence analysis. The cell model was constructed by transfection of E942K mutant plasmid and wild-type (WT) plasmid into SGC-7901 and HEK-293 cells. The effect of E942K mutation on cell proliferation ability was detected by CCK8 and cell clone formation experiments. The effect of E942K mutation on calcium signaling was detected by calcium imaging. Western blot experiments were used to detect changes in phosphorylation levels of key proteins ERK1/2 and β-catenin in downstream signaling pathways after E942K mutation. The results showed that the mutation rate of E942K in gastric cancer group was significantly higher than that in normal control group ($P < 0.05$). CCK8 and cell clone formation experiments showed that E942K mutation significantly improved the proliferation ability of SGC-7901 gastric cancer cells and HEK-293 cells. E942K mutation enhanced calcium signaling in SGC-7901 and HEK-293 cells. E942K mutation enhanced ERK1/2 phosphorylation without affecting β-catenin phosphorylation. The results suggest that E942K mutation in CaSR may ultimately promote the proliferation of gastric

Received 2019-10-30 Accepted 2019-05-15
This work was supported by National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFC1302200).
*Corresponding author. E-mail: wuxiaoling@cqmu.edu.cn

cancer cells by enhancing intracellular calcium signaling and ERK1/2 phosphorylation. These results have potential clinical implications for the diagnosis and targeted therapy of gastric cancer.

Key words: gastric cancer; polymorphism; calcium-sensing receptor; calcium signaling; proliferation; ERK1/2

据美国癌症中心 2018 年公布的全球癌症统计数据，胃癌在全球癌症死亡率排第 2 位，发病率排第 5 位，2018 年大约新增了 100 万胃癌患者，且新增约 78.3 万患者死于胃癌 [1]。胃癌的发生和发展过程受多种因素的共同影响，其中遗传因素、幽门螺杆菌感染和环境、饮食等因素是其发生和发展的主要因素 [2]。

钙敏感受体 (calcium-sensing receptor, CaSR) 在甲状旁腺、肾脏和骨等组织广泛表达，感受细胞外钙离子浓度 ($[Ca^{2+}]_o$) 的变化，在生理情况下是维持机体内 Ca^{2+} 稳态、调节激素分泌和细胞膜离子通道的重要受体之一，在调节基因表达及诱导细胞凋亡、分化、衰老等过程中均发挥重要作用 [3, 4]。CaSR 的表达水平和功能异常既会导致钙调紊乱疾病 (calciotropic disorders)，也会导致非钙调紊乱疾病 (non-calciotropic disorders)，如心血管疾病和肿瘤。有研究报道，CaSR 表达和功能的异常直接参与了胃癌的发生和发展过程 [5, 6]。CaSR 影响恶性肿瘤的发生和发展不仅与钙信号和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路有关，而且与 AKT/β-catenin 通路密切相关 [3–7]。

CaSR 是一个 G 蛋白耦联受体，包含 7 个跨膜域、1 个胞内结构域和 1 个胞外结构域。CaSR 可以结合不同的配体，与不同的 G 蛋白反应，也可以通过表观遗传修饰及 miRNA 调控不同的下游信号通路，导致细胞功能的改变 [7]。CaSR 可以由不同分子激活，包括 Ca^{2+}、多胺和氨基糖苷类等。CaSR 和细胞外 Ca^{2+} 结合并介导受体形成二聚体，激活多种 G 蛋白，包括 Gi/o、Gq/11 和 G12/13 [8, 9]。细胞外 Ca^{2+} 作用于 Gq/11 可激活磷脂酰肌醇磷脂酶 C，继而升高 1,4,5- 三磷酸肌醇 (inositol 1,4,5-trisphosphate, IP3) 浓度；IP3 激活内质网 IP3 受体，引起细胞钙库释放，增加细胞内 Ca^{2+} 浓度 (cytoplasmic free Ca^{2+} concentration, $[Ca^{2+}]_{cyt}$)，激活蛋白激酶 C，再激活 MAPK 级联反应，最终激活胞外信号调节蛋白激酶 1/2 (extracellular signal-regulated protein kinase1/2, ERK1/2) [10]。

MAPK 是一类丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶，在多种细胞广泛表达，参与调控细胞增殖、分化和凋亡等过程，其家族包括 ERK、JNK/MAPK 和 p38 MAPK 等 [10, 11]。ERK 级联反应可被多种分子激活，如受体酪氨酸激酶、G 蛋白耦联受体等。激活的 ERK 可促进细胞质靶蛋白磷酸化或者调节其他蛋白激酶的活性，还可入核并促进多种转录因子的磷酸化，增强转录活性。ERK 活性受正、负反馈调节，进而影响 ERK 信号的强度和持续时间，其中信号的持续时间是决定 ERK 信号输出的主要因素 [12]。

CASR 基因位于 3q21.1 染色体，由 7 个外显子构成，前 6 个外显子编码细胞外域 CaSR 蛋白，第 7 个外显子编码跨膜域和胞内结构域 [13]。在第 7 外显子上存在多个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)，其中 A986S 属于功能丧失型突变，已在结直肠癌和乳腺癌中研究过，但其在肿瘤中的作用目前仍存在争议 [14, 15]。目前尚未见 *CASR* A986S 突变与胃癌关系的研究报道。我们在前期预实验中，对 19 例胃腺癌组织的 *CASR* 外显子进行测序，检测到两个 SNP，即 A986S 和 E942K，其突变率分别为 2/19 和 3/19，E942K 突变此前未见报道过。因此，我们在前期工作的基础上增加了胃癌病例的数量及正常对照组来探究上述 2 个 SNP 和胃癌的关系。通过野生型 (wild-type, WT) 及 E942K 突变质粒转染 SGC-7901 和 HEK-293 构建细胞模型，采用 CCK8 和细胞克隆形成实验研究 E942K 突变对细胞增殖的影响，并进一步探究其机制。

1 材料与方法

1.1 组织标本 胃癌组纳入标准：(1) 汉族；(2) 病理科明确诊断为胃癌；(3) 没有合并其他肿瘤；(4) 与其他入组成员无血缘关系。正常对照组纳入标准：(1) 汉族；(2) 明确排除患有胃癌和其他肿瘤；(3) 没有胃癌家族史；(4) 与其他入组成员无血缘关系。根据纳入标准收集中国人民解放军陆军军医大学第二附属医院普通外科 2017 年 12 月 ~2018 年 12 月期间的 46 例胃癌组织，收集消化内科门诊胃镜室 50 例正常胃部组织标本纳入正常对照组。本病例对照研究经中国人民解放军陆军军医大学第二附属医

院医学伦理委员会审查通过，所有研究对象均提供书面知情同意书。

1.2 主要材料 人胃癌细胞 AGS、BGC-823、MGC-803、SGC-7901、MKN-45 和人胚肾细胞 HEK-293 为本实验室保存。ERK1/2 和 p-ERK1/2 (Tyr202+Tyr204) 抗体购自 Abcam 公司；β-catenin 和 p-β-catenin (Ser675) 抗体购自 CST 公司；CaSR 抗体购自美国 Santa Cruz 公司；GAPDH 抗体、蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒和嘌呤霉素购自碧云天公司；辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔二抗和山羊抗鼠二抗购自北京中杉金桥公司；高糖 DMEM 和 RPMI-1640 培养基及胎牛血清购自美国 Hyclone 公司；WT 及 E942K 突变质粒大肠杆菌甘油菌液由赛业生物科技有限公司设计合成；CCK8 试剂盒购自 MCE 公司；钙测定用盖玻片购自美国 Millicell 公司；Fura-2AM 购自美国 Invitrogen 公司；6 孔板、12 孔板、24 孔板和 96 孔板购自美国 Corning 公司；基因组 DNA 提取试剂盒和无内毒素质粒提取盒购自北京天根生化科技公司；结晶紫染色液购自上海生工生物公司。

1.3 DNA 提取及测序 按照天根基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 说明书提取临床胃癌组织及正常胃黏膜组织 DNA。扩增 *CASR* 基因第 7 外显子包含 2 个多态位点 E942K 和 A986S 的 DNA 片段，分别位于基因序列的第 942、986 位点。引物序列为 SC981F：5’-GCAGCTCACGCTTTCAAGGT-3’，SC981R：5’-GGGAGTAATGGCTGGTGTCG-3’。PCR 反应总体积是 25 μL，包括 200 ng 的模板 DNA 1 μL，0.5 μmol/L 上、下游引物各 0.5 μL，10 mmol/L dNTP 0.5 μL、水 20 μL、5 U Taq DNA 聚合酶 0.2 μL 及其缓冲液 2.5 μL。PCR 程序：95 °C 持续 3 min 预变性、94 °C 持续 30 s 变性、58 °C 持续 30 s 退火，72 °C 持续 30~60 s 延伸，总共循环 35 次，72 °C 持续 10 min 修复延伸。1.5% TAE 琼脂糖电泳，150 V、100 mA，20 min 电泳观察。PCR 产物经纯化回收试剂盒回收后，委托上海生工生物公司测序。

1.4 甘油大肠杆菌活化及质粒提取 含有 100 mg/mL 氨苄霉素的 LB 固体培养基进行平板划线法接种菌液，37 °C 培养箱倒置培养 12~16 h，挑取单克隆菌落于 100 mg/mL 氨苄霉素的 LB 液体培养基，37 °C，220 r/min，震荡培养 12~16 h，部分菌液配制成 15% 甘油菌用于保种，其余按照天根无内毒素质粒小提中量试剂盒进行质粒提取，全波段酶标仪检测质粒浓度，−80 °C 保存。

1.5 细胞培养及质粒转染 AGS、BGC-823、MGC-803、SGC-7901 和 MKN-45 用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素及链霉素的 RPMI-1640 培养基培养，HEK-293 用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素及链霉素的高糖 DMEM 培养基培养，细胞置于 37 °C、5% CO_2 的培养箱中培养。转染前 1 天将细胞接种入 12 孔板，细胞对数期生长密度达到 60%~80% 时进行转染。采用转染试剂脂质体 DNA-Lipofectamine® 2000，参照说明书转染质粒。HEK-293 在转染 3 天后进行嘌呤霉素 2~10 μg/mL 逐级增加浓度梯度筛选稳定株，SGC-7901 在转染 3 天后进行后续功能实验。转染 WT 质粒分别为对照组：SGC-7901-WT (SGC-WT) 和 HEK-293-WT (HEK-WT)，转染 E942K 质粒分别为 CaSR 突变组：SGC-7901-E942K (SGC-E942K) 和 HEK-293-E942K (HEK-E942K)。

1.6 CCK8 法检测细胞增殖 SGC-WT、SGC-E942K、HEK-WT 和 HEK-E942K 细胞培养至对数生长期，胰酶消化、离心、重悬、计数，以细胞数 3 000 个 / 100 μL 接种至 96 孔板中，周围加 PBS，置于 37 °C、5% CO_2 的培养箱中培养 1 天，WT+Ca^{2+} 组及 E942K+Ca^{2+} 组加入 $CaCl_2$ (2 mmol/L)，分别于处理第 0 天、1 天和 2 天进行 CCK8 测定。测定时弃旧培养基，更换为 100 μL/ 孔含 10% CCK8 试剂的新鲜培养基，置于 37 °C、5% CO_2 的培养箱孵育 1 h，用酶联免疫检测仪测定 450 nm 波长处的光密度值 (OD_{450})。

1.7 细胞克隆形成实验 SGC-WT、SGC-E942K、HEK-WT 和 HEK-E942K 细胞培养至对数生长期，胰酶消化、离心、重悬后，以细胞数 1 000 个 / 孔接种至 6 孔板，1 天后 WT+Ca^{2+} 组及 E942K+Ca^{2+} 组加 $CaCl_2$ (2 mmol/L) 继续培养 10 天，进行 PBS 洗涤、4% 多聚甲醛固定、结晶紫染色、集落计数。

1.8 钙显像测定实验 将 SGC-WT、SGC-E942K、HEK-WT 和 HEK-E942K 细胞株对数期适量接种于 12 孔板盖玻片，于 37 °C、5% CO_2 培养箱培养过夜，将盖玻片用生理盐溶液 (PSS) 漂洗并于 10 μmol/L Fura-2AM PSS 溶液中避光孵育 1 h，孵育结束后 PSS 漂洗 3 次。将盖玻片细胞贴合面倒置标准灌注室中，立即注入 500 μL 0 Ca^{2+} PSS，使用 Metafluor 软件获取图像，圈定明亮均匀的细胞，依次在灌注室加入 0.1、0.5、1、2、3、4、5、6 mmol/L $CaCl_2$，在 340/380 nm 的激发波下每隔 3 s 连续记录 F (340/380) 的钙信号变化。PSS 成分包括 (mmol/L)：140 Na^+、

5 K^+、2 Ca^{2+}、149 Cl^-、10 HEPES 和 10 葡萄糖，pH 7.4；0 Ca^{2+} PSS 成分包括 (mmol/L)：140 Na^+、5 K^+、2 Ca^{2+}、145 Cl^-、0.5 EGTA、10 HEPES 和 10 葡萄糖，pH 7.4。

1.9 Western blot 检测 将 SGC-WT、SGC-E942K、HEK-WT 和 HEK-E942K 细胞株培养至对数生长期，胰酶消化、离心、重悬后，按细胞数 2×10^6 个 / 孔接种至 6 孔板，1 天后加入 $CaCl_2$ (2 mmol/L)，分别于 0、5、10、20、30、60 min 提取细胞总蛋白。配制 8% SDS PAGE 凝胶用于 CaSR 蛋白检测，12% 凝胶用于其余蛋白检测。每孔上样量为 30 μg，恒压 60 V 持续 30 min，120 V 持续 60 min，1 min/kDa、300 mA 恒流转膜，5% 脱脂奶粉封闭 2 h，CaSR 抗体 (1:1 000)、ERK1/2 抗体 (1:1 000)、p-ERK1/2 抗体 (1:1 000)、β-catenin 抗体 (1:1 000)、p-β-catenin 抗体 (1:1 000) 和 GAPDH 抗体 (1:5 000) 孵育过夜，TBST 漂洗 3 次，10 min/ 次，室温孵育二抗 (山羊抗兔抗体：1: 10 000，山羊抗鼠抗体：1: 5 000) 1 h，再次 TBST 漂洗，ECL 化学发光，凝胶成像系统显影。

1.10 统计学分析 数据以 mean ± SEM 表示，采用 GraphPad Prism7.0 进行分析。分类资料采用卡方检验，两组间比较采用两样本 *t* 检验，多组间比较采用双因素方差分析，采用 Tukey 法进行两两比较，半最大效应浓度 (concentration for 50% of maximal effect, EC_{50}) 采用 *F* 检验 [16]。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

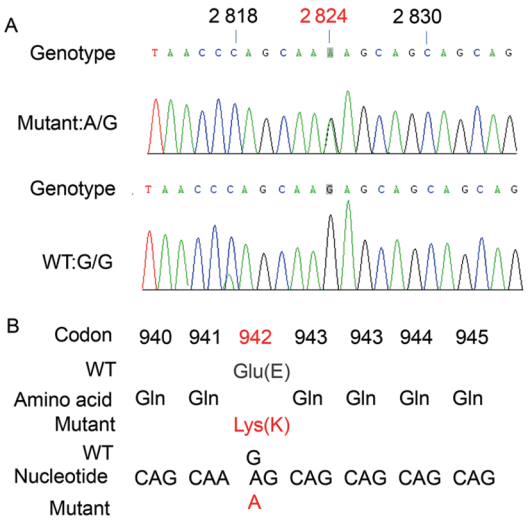
2 结果

2.1 CaSR E942K突变率在人胃癌组织中显著增高

通过对胃癌组织和正常胃黏膜组织进行基因测序，发现 *CASR* 基因第 2 824 碱基位点上的 G-A 突变点 (图 1*A*)，其导致了 CaSR 在第 942 位的密码子由谷氨酸 (Glu, E) 突变为赖氨酸 (Lys, K)，形成 E942K 突变 (图 1*B*)。对 46 例胃癌病例组和 50 例正常对照组的 CaSR E942K 和 A986S 的突变率进行卡方检验 (图 1*C*)，发现胃癌患者的 E942K 突变率显著高于正常对照组 ($P < 0.05$)，而 A986S 突变率在两组间没有统计学差异 ($P > 0.05$)。此结果提示 CaSR E942K 可能和胃癌的发生和发展有关，而 A986S 可能和胃癌无关。因此，我们后续实验集中研究 CaSR E942K 突变在胃癌中的作用及其机制。

2.2 构建SGC-7901和HEK-293的CaSR E942K突变细胞模型

Western blot 检测胃癌细胞株 AGS、MGC-803、MKN-45、SGC-7901 和 BGC-823 中的 CaSR 蛋白表达量，观察到 CaSR 在 MGC-803 和 SGC-7901 细胞中表达量低于 AGS 细胞 (图 2*A*、*B*，$P < 0.000\ 1$)。由于 MGC-803 细胞状态不佳，因此选择 CaSR 表达量较低的胃癌细胞 SGC-7901 和无内源性 CaSR 表达的人胚肾细胞 HEK-293 进行 CaSR 过表达实验。



C

Group	Genotype			
	E942K		A986S	
	GG	AG	GG	GT
Gastric cancers (*n*)	39	7	42	4
Controls (*n*)	49	1	47	3
χ^2	3.886		0.101 313	
p	0.048 7*		0.908 8	

图 1. E942K突变率在胃癌组织显著增高

Fig. 1. The mutation rate of E942K was significantly higher in gastric cancers group than that in normal controls group. *A*: Heterozygous G-to-A transition at nucleotide c.2 824 was identified by DNA sequencing. *B*: This G-to-A transition changes a GAG codon to AAG and is predicted to result in a missense amino acid substitution from Glu (E) to Lys (K) at position 942 in the CaSR protein. *C*: Distribution of E942K and A986S CaSR alleles in gastric cancers group versus that in normal controls group. *$P < 0.05$.

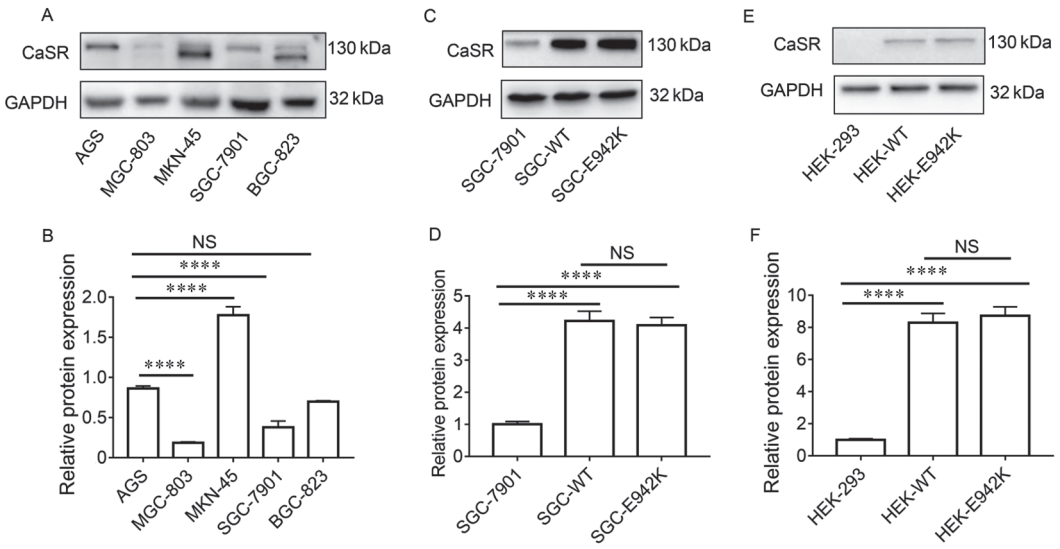


图 2. 构建SGC-7901和HEK-293的CaSR过表达细胞模型

Fig. 2. Overexpression of CaSR in SGC-7901 and HEK-293 cells. Western blot was used to determine CaSR in different gastric cancer cells (*A, B*). Expression of CaSR in SGC-7901 transfected with WT plasmids or E942K plasmids (*C, D*). Expression of CaSR in HEK-293 transfected with WT plasmids or E942K plasmids (*E, F*). Mean ± SEM, $n = 3$. $^{****}P < 0.000\ 1$. NS: Not significant.

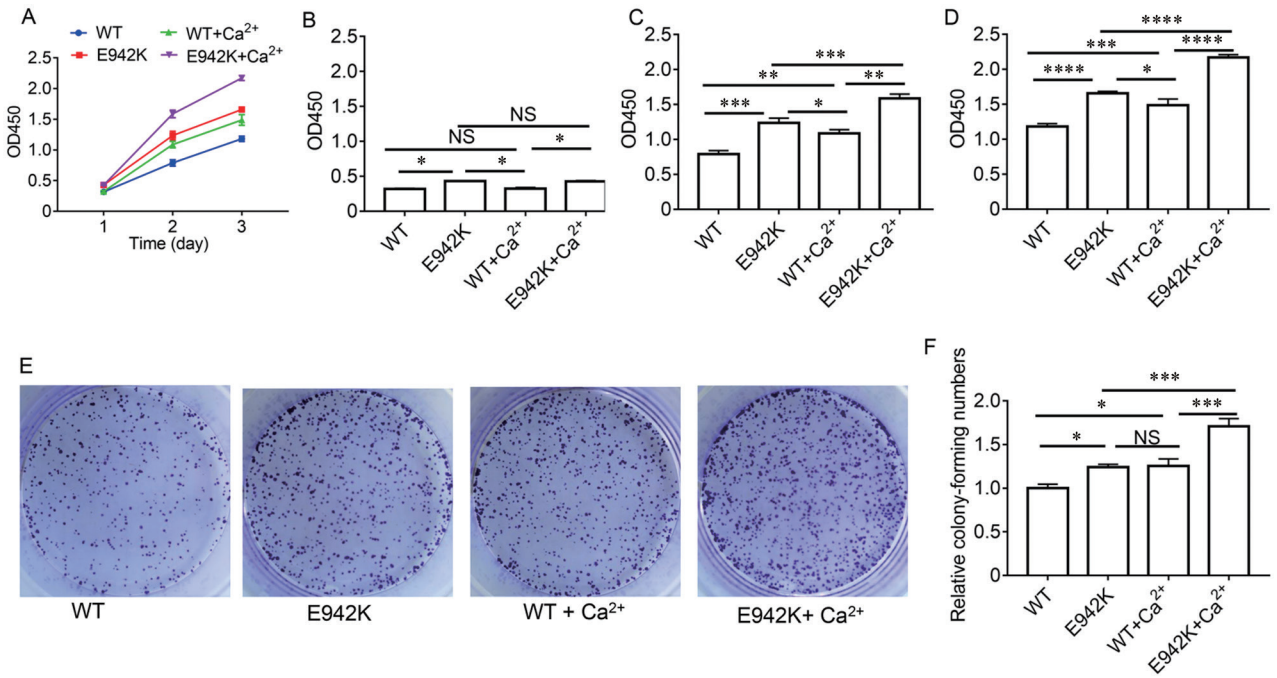


图 3. CaSR E942K促进SGC-7901细胞增殖

Fig. 3. The CaSR E942K mutation promotes the proliferation of SGC-7901. *A*: Proliferation curves of SGC-WT and SGC-E942K cells treated with 2 mmol/L $CaCl_2$. Comparision of proliferation ability between SGC-WT and SGC-E942K treated with 2 mmol/L $CaCl_2$ on day 0 (*B*), day 1 (*C*) and day 2 (*D*). *E, F*: Colony formation assay in SGC-WT and SGC-E942K cells treated with 2 mmol/L $CaCl_2$. Mean ± SEM, $n = 3$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$. NS: Not significant.

结果显示，转染 CaSR WT 及 E942K 质粒的细胞株 SGC-WT、SGC-E942K、HEK-WT 和 HEK-E942K，其 CaSR 的表达显著高于对照组 (图 2*C*~*F*，$P < 0.000\ 1$)。该结果提示我们成功构建了 SGC-7901 和

HEK-293 的 E942K 突变细胞模型。

2.3 CaSR E942K突变促进SGC-7901和HEK-293细胞增殖

采用 CCK8 实验观察到，SGC-WT、SGC-E942K、HEK-WT 和 HEK-E942K 在 $CaCl_2$ (2 mmol/L) 的刺激下，全部细胞株的增殖能力显著增加 (图 3*A*~*D*，图 4*A*~*D*，$P < 0.05$)，但随着时间的延长，E942K 突变细胞增殖能力的提高幅度更大 (图 3*A*~*D*，图 4*A*~*D*)。采用细胞克隆形成实验观察到，$CaCl_2$ (2 mmol/L) 能同时增加 E942K 和 WT 细胞的增殖能力 ($P < 0.05$)，但钙离子对 E942K 突变细胞增殖能力的促进作用更为明显 (图 3*E*，*F* 和图 4*E*，*F*)。这些结果提示，CaSR E942K 明显促进 SGC-7901 和 HEK-293 的增殖能力，而促进增殖的机制可能和 $[Ca^{2+}]_o$ 有关。

2.4 CaSR E942K突变增强SGC-7901和HEK-293的细胞内Ca^{2+}信号

SGC-WT、SGC-E942K、HEK-WT 和 HEK-E942K 在不同浓度 $CaCl_2$ (0.1、0.5、1、2、3、4、5 和 6 mmol/L) 激动下，表现出浓度依赖性细胞内钙信号升高 (图 5*A*、*B*，图 6 *A*、*B*)。当 $CaCl_2$ 浓度在 0.5~6 mmol/L 时，SGC-E942K 的钙信号升高幅度显著大于 SGC-WT (图 5*C*，$P < 0.05$) ；当 $CaCl_2$ 浓度在 1~6 mmol/L 时，HEK-E942K 的钙信号升高幅度显著大于 HEK-WT (图 6*C*，$P < 0.05$)。在 $CaCl_2$ 激动下，SGC-E942K 的 EC_{50} (1.068 mmol/L) 显著低于 SGC-WT 的 EC_{50} (1.608 mmol/L)(图 5*C*) ；SGC-E942K 的钙信号最大升高幅度高于 SGC-WT 细胞 (图 5*D*，$P < 0.05$)。同样地，在 $CaCl_2$ 激动下，HEK-E942K 的 EC_{50} (1.092 mmol/L) 显著小于 HEK-WT 的 EC_{50} (1.794 mmol/L)(图 6*C*) ；HEK-E942K 细胞内的钙信号最大升高幅度高于 HEK-WT 细胞 (图 6*D*，$P < 0.05$)。上述结果说明，CaSR E942K 突变提高了 SGC-7901 和 HEK-293 细胞对 Ca^{2+} 的敏感性，并具有增加 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的作用。

2.5 CaSR E942K突变促进SGC-7901和HEK-293细胞 ERK1/2的磷酸化

在 2 mmol/L $CaCl_2$ 孵育不同时间 (5、10、20、30 和 60 min) 条件下，SGC-E942K 细胞内的 ERK1/2 磷酸化水平显著高于 SGC-WT (图 7*A*~*C*, $P < 0.05$)；SGC-E942K 在 20 min 时 ERK1/2 即可达到最大磷酸化水平，而 SGC-WT 在 30 min 时才达到最大值 (图

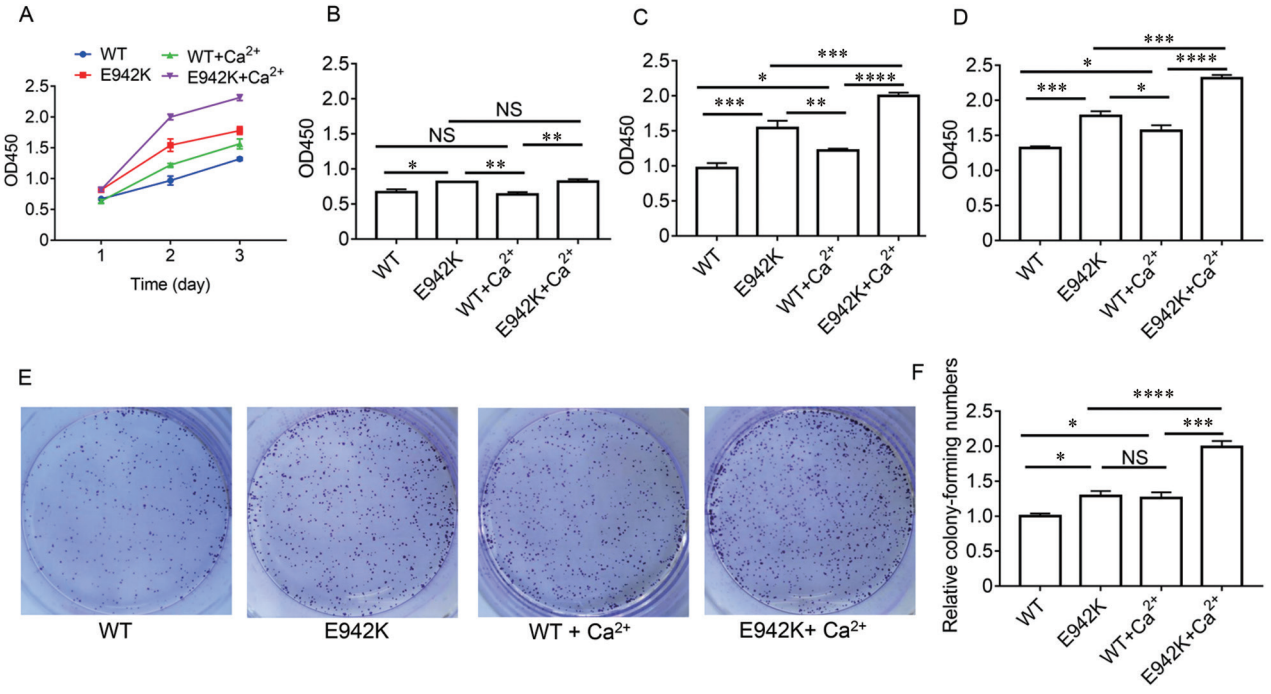


图 4. CaSR E942K突变促进HEK-293细胞增殖

Fig. 4. The CaSR E942K mutation promotes proliferation of HEK-293. *A*: Proliferation curves of HEK-WT and HEK-E942K cells treated with 2 mmol/L $CaCl_2$. Comparision of proliferation ability between HEK-WT and HEK-E942K treated with 2 mmol/L $CaCl_2$ on day 0 (*B*), day 1 (*C*) and day 2 (*D*). *E*, *F*: Colony formation assay in HEK-WT and HEK-E942K cells treated with 2 mmol/L $CaCl_2$. Mean ± SEM, $n = 3$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$. NS: Not significant.

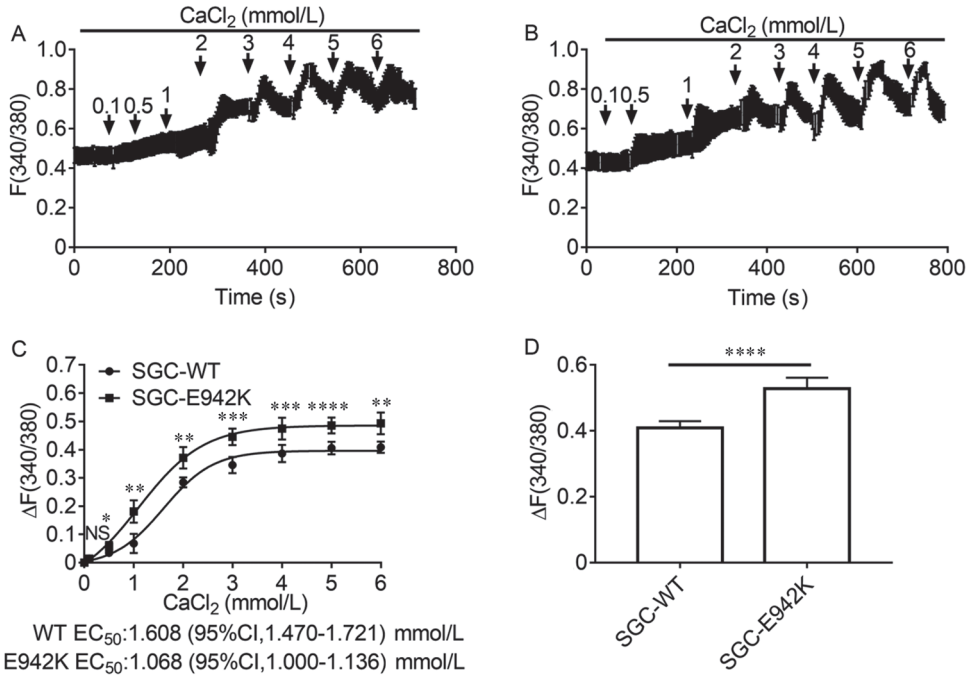


图 5. CaSR E942K突变增强SGC-7901细胞内钙信号

Fig. 5. CaSR E942K mutation enhances the cytosolic calcium signaling in SGC-7901 cells. Time courses of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ changes induced by $CaCl_2$ in SGC-WT (*A*) and SGC-E942K (*B*) cells. *C*: Concentration-response (ΔF340/380) curves in SGC-WT and SGC-E942K. *D*: Maximum increase of concentration-response (ΔF340/380) in SGC-WT and SGC-E942K. $CaCl_2$ (mmol/L) concentration: 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6. EC_{50} values with 95% confidence intervals (CIs) are provided (*F*-test). Mean ± SEM, $n = 20$ cells. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* SGC-WT. NS: Not significant.

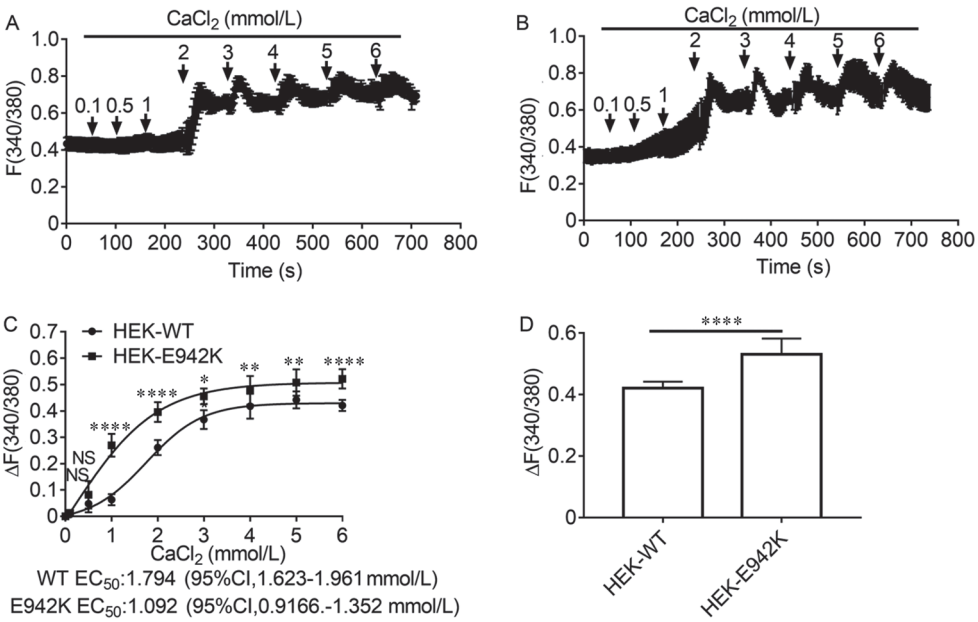


图 6. CaSR E942K突变增强HEK-293细胞内钙信号

Fig. 6. CaSR E942K mutation enhances the cytosolic calcium signaling in HEK-293 cells. Time courses of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ changes induced by $CaCl_2$ in HEK-WT (*A*) and HEK-E942K (*B*) cells. *C*: Concentration-response (ΔF340/380) curves in HEK-WT and HEK-E942K. *D*: Maximum increase of concentration-response (ΔF340/380) in HEK-WT and HEK-E942K. $CaCl_2$ (mmol/L) concentration: 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6. EC_{50} values with 95% confidence intervals (CIs) are provided (*F*-test). Mean ± SEM, $n = 20$ cells. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* HEK-WT. NS: Not significant.

7*A*~*C*)；$CaCl_2$ 孵育时间一样的条件下，SGC-WT 和 SGC-E942K 细胞的 β-catenin 磷酸化水平没有显著差异 (图 7*D*~*F*，$P > 0.05$)。在 2 mmol/L $CaCl_2$ 孵育不同时间 (5、10、20、30 和 60 min) 条件下，HEK-E942K 和 HEK-WT 的 ERK1/2 和 β-catenin 实验结果 (图 8*A*~*F*) 与 SGC-E942K 和 SGC-WT 保持一致

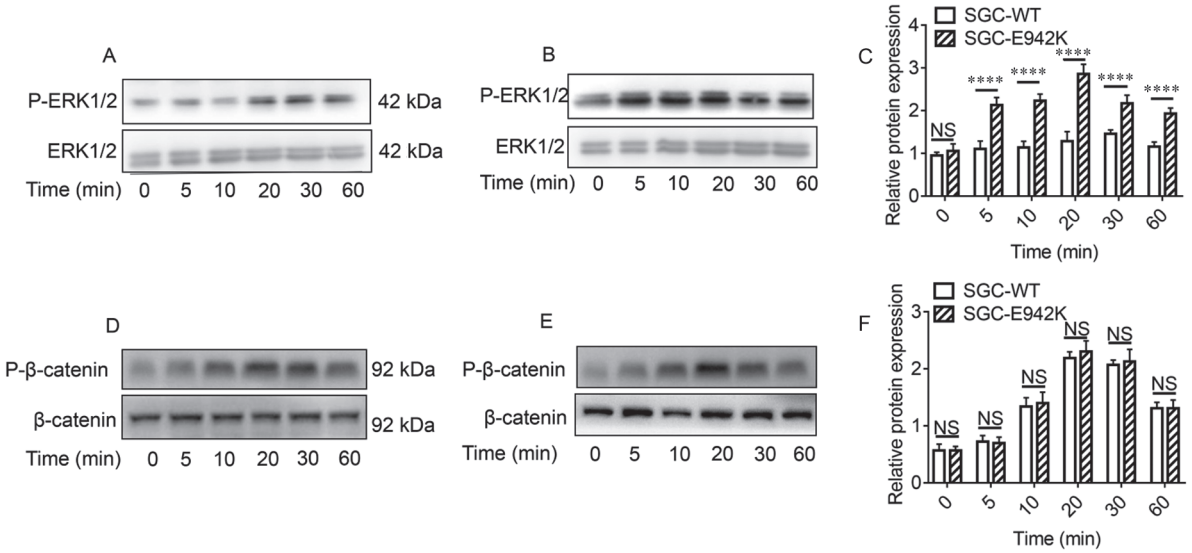


图 7. CaSR E942K突变促进SGC-7901细胞ERK1/2的磷酸化

Fig. 7. CaSR E942K mutation promotes phosphorylation of ERK1/2 in SGC-7901 cells. Time-dependent phosphorylation of ERK1/2 induced by $CaCl_2$ in SGC-WT (*A*) and SGC-E942K (*B*) cells. *C*: Comparison of relative expression of p-ERK1/2 in SGC-WT and SGC-E942K. Time-dependent phosphorylation of β-catenin induced by $CaCl_2$ in SGC-WT (*D*) and in SGC-E942K (*E*). *F*: Comparison of relative expression of p-β-catenin in SGC-WT and SGC-E942K. $CaCl_2$: 2 mmol/L. Mean ± SEM, $n = 3$. $^{****}P < 0.000\ 1$. NS: Not significant.

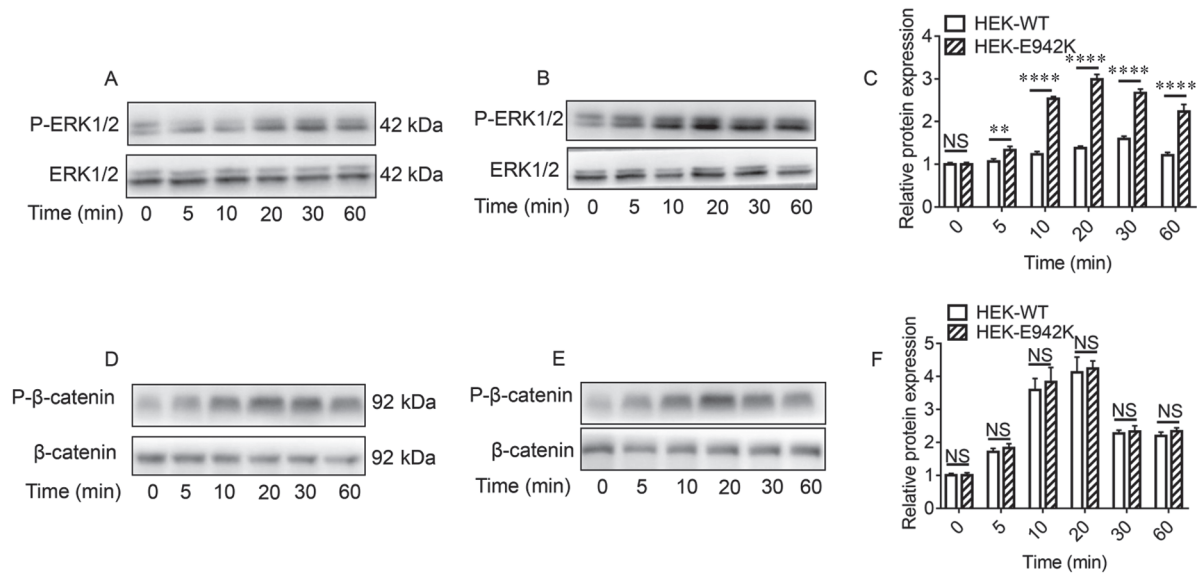


图 8. CaSR E942K突变促进HEK-293细胞ERK1/2的磷酸化

Fig. 8. CaSR E942K mutation promotes phosphorylation of ERK1/2 in HEK-293 cells. Time-dependent phosphorylation of ERK1/2 induced by $CaCl_2$ in HEK-WT (*A*) and HEK-E942K (*B*) cells. *C*: Comparison of relative expression of p-ERK1/2 in HEK-WT and HEK-E942K. Time-dependent phosphorylation of β-catenin induced by $CaCl_2$ in HEK-WT (*D*) and in HEK-E942K (*E*). *F*: Comparison of relative expression of p-β-catenin in HEK-WT and HEK-E942K. $CaCl_2$: 2 mmol/L. Mean ± SEM, $n = 3$. $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.000\ 1$. NS: Not significant.

(图 7*A*~*F*)。该实验结果提示，与 WT 相比，CaSR E942K 突变可以明显增强和加快 SGC-7901 和 HEK-293 细胞 ERK1/2 的磷酸化，但不影响 β-catenin 的磷酸化。

3 讨论

胃癌发病率和死亡率高，至今其发病机制不明确。已知胃癌的发生、发展和遗传因素密切相关。基因多态性在胃癌和多种肿瘤的发生、发展过程中起重要作用，其中 SNP 是最常见的变异，在人类基因组的遗传标记中密度最大、发生频率较高，能作为新一代遗传学标记的突变形式。近年来 SNP 与胃癌易感性之间的关系得到越来越多的关注 [2]。A986S 突变位于 *CASR* 基因的第 7 外显子上，参与编码 CaSR 的胞内结构域，并且和 CaSR 功能不全有关 [17]。据报道，在乳腺癌中，CaSR A986S 突变促进血钙维持在高水平并促进乳腺癌的增殖及侵袭 [14]；但在一个结直肠癌大规模病例对照研究中发现，A986S 突变和结直肠癌风险没有关系 [15]。

本研究通过病例对照研究显示，CaSR A986S 突变率在胃癌组和正常对照组之间没有统计学差异，提示 A986S 与胃癌没有明显关系。同时，本研究组前期预实验在对 19 例胃腺癌组织的 *CASR* 外显子测序中发现 3 例 E942K 突变胃癌患者，采用 Jpred 及 PSiPRED 软件对其二级结构进行预测，发现 E942K 可加强 α 螺旋的稳定性。本研究增加胃癌组病例数 (46 例) 和正常对照组 (50 例)，结果显示胃癌患者中 E942K 突变率比正常对照组显著增加，表明其可能与胃癌的发生、发展关系密切，而此前该突变未见报道。

CaSR 属于 G 蛋白耦联受体家族，可以感受血钙水平的变化，并通过甲状旁腺素 (parathyroid hormone, PTH) 分泌，调节小肠钙吸收及尿钙排泄等方式来维持血钙浓度动态平衡 [18]。细胞内 Ca^{2+} 作为第二信使在机体的生理和病理活动中发挥至关重要的作用，如神经传导、肌肉收缩、腺体分泌及细胞老化等 [3, 19, 20]。而在肿瘤研究中，细胞内 Ca^{2+} 平衡紊乱及其介导的下游信号通路是恶性肿瘤发生、发展的重要原因之一 [21, 22]。Ca^{2+} 信号的变化参与调控肿瘤细胞包括增殖、侵袭、凋亡以及新生血管形成在内的多种癌症进程 [13]。本研究组前期研究显示，CaSR 在胃癌组织中的表达显著高于癌旁组织，而且 CaSR 高表达更多见于男性、肿瘤体积大、中等分化及晚期胃癌组织中，提示 CaSR 和胃癌进展呈正相关。进一步的功能实验显示，CaSR 有促进胃癌的作用 [4]。HEK-293 细胞极少表达细胞外配体所需的内生受体，且比较容易转染，是一个很常用的研究外源基因的细胞株，已多次在研究 CaSR 的基因多态性中使用 HEK-293 作为工具细胞 [23, 24]。因此本研究选择了 CaSR 表达量较低的 SGC-7901 和不表达 CaSR 的 HEK-293 完成相关细胞实验。本研究通过 CCK8 和细胞克隆形成实验发现，在 $CaCl_2$ (2 mmol/L) 激动下，CaSR E942K 突变细胞株比 WT 细胞株的增殖能力有更大幅度提高，但在没有加入 CaSR 激动剂 $CaCl_2$ 时，E942K 突变细胞株的增殖能力依然显著高于 WT 组。据查证，RPMI-1640 和 DMEM 培养基中分别含有 0.42 mmol/L 和 1.8 mmol/L Ca^{2+}，这解释了在无 $CaCl_2$ 孵育情况下，E942K 突变细胞株的增殖能力依然显著大于 WT 细胞株。上述细胞增殖实验提示，过表达 CaSR E942K 能够促进 HEK-293 细胞及胃癌细胞的增殖，且这和 $[Ca^{2+}]_o$ 密切相关。

已有许多文献报道，Ca^{2+} 信号及 ERK1/2 的磷酸化通路在促进细胞增殖方面发挥重要作用。本研究采用细胞内钙成像技术，不仅观察到 CaSR 能够被细胞外钙激活后升高 $[Ca^{2+}]_{cyt}$，而且 E942K 突变细胞株对细胞外钙的敏感度显著高于 WT 细胞株。

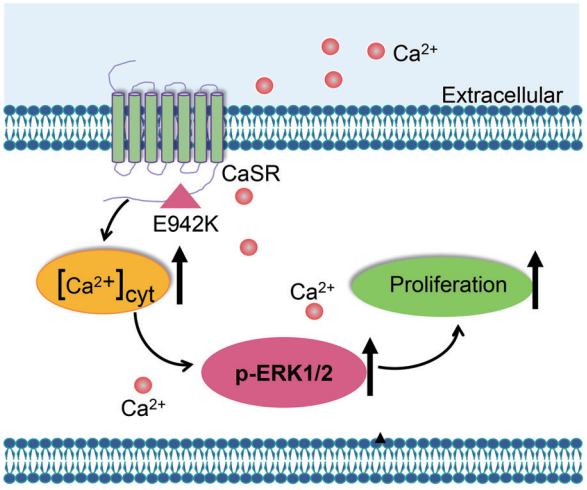


图 9. CaSR E942K突变通过细胞内Ca^{2+}信号及ERK1/2的磷酸化促进胃癌细胞增殖

Fig. 9. CaSR E942K mutation promotes the proliferation of gastric cancer cells via Ca^{2+} and ERK1/2 pathways. $[Ca^{2+}]_{cyt}$: cytoplasmic free Ca^{2+} concentration.

本研究还证明 E942K 突变后可增强 CaSR 下游信号 ERK1/2 的磷酸化。因此，CaSR E942K 突变通过细胞内 Ca^{2+} 信号及 ERK1/2 的磷酸化促进了细胞的增殖，从而参与了胃癌的发生和发展 (图 9)。

综上所述，本研究首先发现了 CaSR 的 E942K 突变率在人胃癌组织中显著升高，并探讨了其对胃癌细胞增殖的影响及机制，发现 E942K 突变可能通过增强细胞内 Ca^{2+} 信号和 ERK1/2 的磷酸化促进胃癌细胞的增殖。进一步深入研究胃癌中 CaSR 的 E942K 突变，可能对胃癌的诊断和靶向治疗具有潜在的临床意义。由于本研究仅为本地区的单中心小样本，因此上述结果需要进一步扩大样本数量和多地区、多中心样本量来加以证实 CaSR 突变位点 E942K 与胃癌的关系，以及在胃癌诊治方面的临床意义。

参考文献

1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2018; 68: 394–424.

2 Gao LL (高琳琳), Song G. Research progress of gene polymorphism in gastric cancer. Med Recapitul (医学综述) 2018; 24: 2155–2159 (in Chinese with English abstract).

3 Hofer AM, Brown EM. Extracellular calcium sensing and signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4: 530–538.

4 Xie R, Xu J, Xiao Y, Wu J, Wan H, Tang B, Liu J, Fan Y, Wang S, Wu Y, Dong TX, Zhu MX, Carethers JM, Dong H, Yang S. Calcium promotes human gastric cancer via a novel coupling of calcium-sensing receptor and TRPV4 channel. Cancer Res 2017; 77: 6499–6512.

5 Tang B, Chow JY, Dong TX, Yang SM, Lu DS, Carethers JM, Dong H. Calcium sensing receptor suppresses human pancreatic tumorigenesis through a novel NCX1/Ca^{2+}/β-catenin signaling pathway. Cancer Lett 2016; 377: 44–54.

6 Borowiec AS, Bidaux G, Pigat N, Goffin V, Bernichtein S, Capiod T. Calcium channels, external calcium concentration and cell proliferation. Eur J Pharmacol 2014; 739: 19–25.

7 Chakravarti B, Chattopadhyay N, Brown EM. Signaling through the extracellular calcium-sensing receptor (CaSR). Adv Exp Med Biol 2012; 740: 103–142.

8 Jiang CM, Han LP, Li HZ, Qu YB, Zhang ZR, Wang R, Xu CQ, Li WM. Calcium-sensing receptors induce apoptosis in cultured neonatal rat ventricular cardiomyocytes during simulated ischemia/reperfusion. Cell Biol Int 2008; 32: 792–800.

9 Ward DT, Riccardi D. New concepts in calcium-sensing receptor pharmacology and signalling. Br J Pharmacol 2012; 165: 35–48.

10 Kifor O, MacLeod RJ, Diaz R, Bai M, Yamaguchi T, Yao T, Kifor I, Brown EM. Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. Am J Physiol Renal Physiol 2001; 280: F291–F302.

11 Chen B, Liu J, Chang Q, Beezhold K, Lu Y, Chen F. JNK and STAT3 signaling pathways converge on Akt-mediated phosphorylation of EZH2 in bronchial epithelial cells induced by arsenic. Cell Cycle 2013; 12: 112–121.

12 Zhao MZ (赵明哲), Liu JH, Li YH, Jiang Y. Regulatory mechanism of ERK signal transduction pathway. Int J Pathol Clin Med (国际病理科学与临床杂志) 2009; 29(01): 15–19 (in Chinese with English abstract).

13 Tennakoon S, Aggarwal A, Kállay E. The calcium-sensing receptor and the hallmarks of cancer. Biochim Biophys Acta 2016; 1863: 1398–1407.

14 Wang L, Widatalla SE, Whalen DS, Ochieng J, Sakwe AM. Association of calcium sensing receptor polymorphisms at rs1801725 with circulating calcium in breast cancer patients. BMC Cancer 2017; 17: 511.

15 Jenab M, McKay J, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhoven FJB, Ferrari P, Slimani N, Jansen EHJM, Pischon T, Rinaldi S, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Engel P, Kaaks R, Linseisen J, Boeing H, Fisher E, Trichopoulou A, Dilis V, Oustoglou E, Berrino F, Vineis P, Mattiello A, Masala G, Tumino R, Vrieling A, van Gils CH, Peeters PH, Brustad M, Lund E, Chirlaque MD, Barricarte A, Suárez LR, Molina E, Dorronsoro M, Sala N, Hallmans G, Palmqvist R, Roddam A, Key TJ, Khaw KT, Bingham S, Boffetta P, Autier P, Byrnes G, Norat T, Riboli E. Vitamin D receptor and calcium sensing receptor polymorphisms and the risk of colorectal cancer in european populations. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009; 18: 2485–2491.

16 Nesbit MA, Hannan FM, Howles SA, Babinsky VN, Head RA, Cranston T, Rust N, Hobbs MR, Heath H 3rd, Thakker RV. Mutations affecting G-protein subunit α11 in hypercalcemia and hypocalcemia. N Engl J Med 2013; 368: 2476–2486.

17 Bilezikian JP, Brandi ML, Eastell R, Silverberg SJ, Udelsman R, Marcocci C, Potts JT Jr. Guidelines for the management of asymptomatic primary hyperparathyroidism: summary statement from the Fourth International Workshop. J Clin Endocrinol Metab 2014; 99: 3561–3569.

18 Hendy GN, Canaff L. Calcium-sensing receptor gene: regulation of expression. Front Physiol 2016; 7: 394.

19 Brown EM. Role of the calcium-sensing receptor in extracel-

lular calcium homeostasis. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2013; 27: 333–343.

20 Geibel JP, Hebert SC. The functions and roles of the extracellular Ca^{2+}-sensing receptor along the gastrointestinal tract. Annu Rev Physiol 2009; 71: 205–217.

21 Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. Nat Rev Cancer 2011; 11: 609–618.

22 Jardin I, Rosado JA. STIM and calcium channel complexes in cancer. Biochim Biophys Acta 2016; 1863: 1418–1426.

23 Gorvin CM, Babinsky VN, Malinauskas T, Nissen PH, Schou AJ, Hanyaloglu AC, Siebold C, Jones EY, Hannan FM, Thakker RV. A calcium-sensing receptor mutation causing hypocalcemia disrupts a transmembrane salt bridge to activate β-arrestin-biased signaling. Sci Signal 2018; 11(518): eaan3714. doi: 10.1126/scisignal.aan3714.

24 Young SH, Rey O, Rozengurt E. Intracellular Ca^{2+} oscillations generated via the extracellular Ca^{2+}-sensing receptor (CaSR) in response to extracellular Ca^{2+} or L-phenylalanine: Impact of the highly conservative mutation Ser170Thr. Biochem Biophys Res Commun 2015; 467: 1–6.