

# SERCA3 在结直肠癌细胞中异常表达及其临床意义

孙卢浩然<sup>1</sup>, 卢敏<sup>2\*</sup>

(1. 中国医科大学附属第一医院骨科, 辽宁 沈阳 110001; 2. 中国医科大学附属第一医院肛肠外科, 辽宁 沈阳 110001)

**摘要:**目的 探讨结直肠癌中肌浆网/内质网钙离子转运 ATP 酶 3 (sarcoendoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transporting ATPase 3, SERCA3) mRNA 的表达与临床病理特征的关系。方法 收集 40 例病理确诊的结直肠癌腺癌组织及其癌旁正常组织标本。采用实时 RT-PCR 检测 SERCA3 mRNA 表达, 分析其与患者临床病理特征的关系。结果 结直肠癌标本中 SERCA3 mRNA 表达较癌旁正常组织低 ( $P < 0.05$ )。结直肠癌 SERCA3 mRNA 水平在淋巴结转移和 TNM 分期方面比较, 差异均具有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。结论 结直肠癌组织中 SERCA3 的异常表达与结直肠癌淋巴结转移和 TNM 分期密切相关。

**关键词:**结直肠肿瘤/病理学; 肌浆网钙转运 ATP 酶类; 内质网; 基因表达; 淋巴转移; 肿瘤分期

中图分类号: R735.3; R730.23 文献标志码: A 文章编号: 1001-1692(2019)02-0122-03

## Abnormal expression and clinical significance of SERCA3 in colorectal cancer cells

Sun Luhaoran<sup>1</sup>, Lu Min<sup>2</sup>

(1. Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China;

2. Department of Anorectal Surgery, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

Corresponding to : Lu Min, E-mail: supermanslhr@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the mRNA expression of sarcoendoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transporting ATPase 3 (SERCA3) in colorectal cancer and its relationship with the clinicopathological features of the disease. **Methods** The specimens of 40 patients with pathologically confirmed colorectal cancer and adjacent normal tissue were collected. The expression of SERCA3 mRNA was detected by real-time RT-PCR, and its relationship with the clinicopathological features of the patients were further analyzed. **Results** The expression of SERCA3 mRNA in colorectal cancer specimens was significantly lower than adjacent normal tissue ( $P < 0.05$ ). Moreover, the mRNA level of SERCA3 was significantly related to lymph node metastasis and TNM staging (both  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The abnormal expression of SERCA3 in colorectal cancer is closely related to the lymph node metastasis and TNM staging of the disease.

**Key words:** colorectal neoplasms/pathology; sarcoplasmic reticulum calcium-transporting ATPases; endoplasmic reticulum; gene expression; lymphatic metastasis; neoplasm staging

结直肠癌是全球发病率最高的癌症之一, 具有较高的死亡率。目前其发病机制尚有待进一步研究。肌浆网/内质网钙离子转运 ATP 酶 3 (sarcoendoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transporting ATPase 3, SERCA3) 参

与钙离子从内质网到细胞质的转运, 并与细胞代谢、神经细胞塑化、基因转录、细胞生长、分化、凋亡、蛋白质折叠和癌变密切相关。为研究 SERCA3 与结直肠癌发生和发展的关系, 本研究收集 40 例结直肠癌组织标本及癌旁正常组织检测其 SERCA3 表达, 分析其与结直肠癌临床病理特征的关系。

收稿日期: 2017-12-28

DOI: 10.13267/j.cnki.syzlzz.2019.02.005

基金项目: 辽宁省科技厅科学技术项目 (2015020489)

作者简介: 孙卢浩然 (1991-), 男, 辽宁沈阳人, 硕士生, 从事实时 RT-PCR 检测与分析研究。

\* 通信作者 E-mail: supermanslhr@163.com

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集 2009 年 1 月至 2013 年 4 月间中国医科大

学附属第一医院胃肠外科收治的 40 例结直肠癌患者。患者均行结直肠癌根治术,40 例术后切除标本均经病理检查确诊为腺癌。纳入标准:(1)术前肠镜及病理检查证实为结直肠癌并成功行手术切除的患者;(2)术前未行新辅助化疗或其他生物免疫治疗等。其中男性 27 例,女性 13 例;年龄 41~76 岁,中位年龄 57 岁。根据世界卫生组织(World Health Organization,WHO)2010 分级标准<sup>[1]</sup>,高分化 7 例,中分化 24 例,低分化 9 例。根据国际抗癌联盟(International Union Against Cancer, UICC)第 8 版(2017)TNM 分期<sup>[2]</sup>,I 期为 7 例,II 期 19 例,III 期 12 例,IV 期(肝转移)2 例。取所有患者的癌旁正常组织为对照。

## 1.2 方法

**1.2.1 RNA 抽提** 从 1~10 mg 新鲜组织样品中抽提 RNA:加入 800  $\mu$ L 的 Trizol 试剂至样品中,样品裂解后,室温孵育 5 min;取 1 mL 上述液体加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡后,室温孵育 2~3 min。12 000 r/min 离心 15 min 后,取上清无色水相,加异丙醇沉淀 RNA;用 75% 乙醇进行 RNA 清洗,用无 RNase 水重新溶解 RNA 沉淀。获得的 RNA 溶液保存于 -70 $^{\circ}$ C。

**1.2.2 实时 PCR 检测 SERCA3** 委托中国 Takara 公司设计并合成 SERCA3 相关的实时 PCR 引物,检验引物特异性后,加入 PCR 微阵列相应的反应孔。用 Trizol 提纯 RNA, DNase I 消化 RNA 样品以除去可能存在的基因组 DNA,其后 RNA 纯化使用 RNeasy MinElute<sup>TM</sup> 纯化试剂盒(德国 Qiagen 公司),通过琼脂糖电泳和紫外吸收测定法检测 RNA 的质量、浓度和纯度,最后以 RNA 为模板,应用 SuperScript. III 逆转录酶(美国 Invitrogen 公司)合成 cDNA,20  $\mu$ L 反应体系加入 1.5  $\mu$ g RNA。PCR 微阵列的每孔加入 cDNA 与 SuperArray PCR master mix(美国应用生物系统公司 Cat. No. PA-112)充分混合,加 10  $\mu$ L 至 PCR Array 对应的每个孔中。实时定量 PCR 程序设置为变性 95 $^{\circ}$ C 10 min,扩增 40 个循环,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,采集荧光后分析溶解曲线。数据分析采用  $\Delta\Delta$ Ct 方法。荧光阈值设定为 0.15,取 PCR Array 管家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的阈值循环数(cycle threshold, Ct)均值为本底,计算  $\Delta$ Ct = Ct 均值 - 管家基因的 Ct 均值,计算  $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ Ct<sub>结直肠癌组</sub> -  $\Delta$ Ct<sub>对照组</sub>。通过  $2^{-\Delta\Delta$ Ct} 计算结直肠癌组与对照组对应基因的表达差异<sup>[3]</sup>。基因芯片实验

由康成生物工程有限公司(中国上海)提供技术服务。

## 1.3 统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件进行数据分析。组间比较采用 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RNA 样品提纯鉴定

结直肠癌组和对照组反映 RNA 样品纯度的紫外吸光度(absorbance, A)比值  $A_{260}/A_{280}$  分别为 2.01 和 2.00。检测 RNA 样品质量的变性琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。结直肠癌组和对照组的 28 S 核糖体 RNA 带均亮而浓,前者密度高于后者,可看到一片弥散的 EB 染色物质,可能是由 mRNA 和其他异型 RNA 组成。

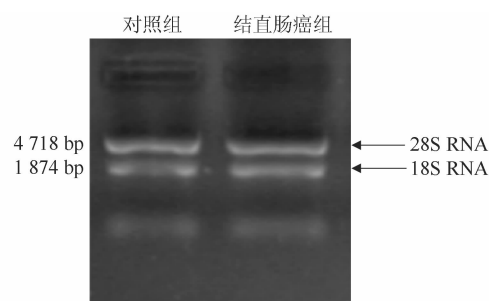


图 1 RNA 样品的变性琼脂糖凝胶电泳鉴定

Fig. 1 Assessing RNA samples by denaturing agarose gel electrophoresis

### 2.2 结直肠癌组织 SERCA3 mRNA 表达

实时 RT-PCR 检测显示,40 例结直肠癌组织中 SERCA3 mRNA 水平较其癌旁正常组织低( $P < 0.05$ ,图 2)。

### 2.3 SERCA3 表达与结直肠癌临床病理特征的关系

结直肠癌患者 SERCA3 mRNA 表达在淋巴结转移和 TNM 分期方面比较,差异均具有统计学意义(均  $P < 0.05$ ,表 1)。

## 3 讨论

SERCA 是内质网膜上的跨膜蛋白,亚型包含 SERCA 1~3,通过水解 ATP 将钙离子从细胞质中转移到内质网腔内<sup>[4]</sup>。SERCA 通过控制内质网内外的钙离子浓度变化的频率幅度调控钙离子稳态(calcium homeostasis),参与多个通路的信号转导,影响细胞内几乎所有的重要生理过程<sup>[5-6]</sup>。SERCA3 的异常表达与结直肠癌和结肠癌的发展密切相关。既往研究表明,与癌旁正常组织比较,结

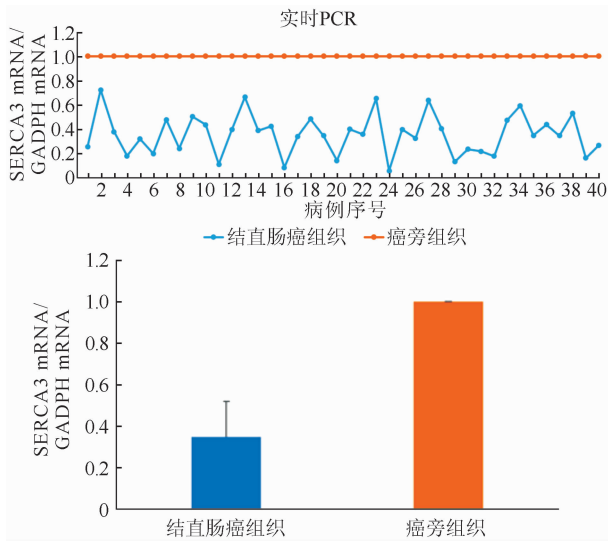


图2 结直肠癌及癌旁组织中 SERCA3 mRNA 水平检测

Fig.2 Analyzing the mRNA level of SERCA3 in colorectal carcinoma and paracarcinoma tissues

表1 结直肠癌 SERCA3 mRNA 表达与临床病理特征的关系

Table 1 Relationship between expression of SERCA3 mRNA and the clinicopathological features in colorectal cancer

临床病理特征	例数	mRNA 表达值 (Ct)	结直肠癌组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ / 对照组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	P 值
年龄				
<60 岁	29	28.36	0.343	0.243
≥60 岁	11	27.92	0.347	
性别				
男	27	28.73	0.335	0.104
女	13	28.90	0.330	
肿瘤部位				
结肠	16	28.81	0.336	0.095
直肠	24	28.20	0.341	
淋巴结转移				
有	14	27.30	0.343	0.021
无	26	27.38	0.314	
TNM 分期				
I ~ II 期	26	27.15	0.339	0.034
III 期	12	27.69	0.325	
IV 期(肝转移)	2	27.03	0.311	
肿瘤组织分化程度				
中	24	27.34	0.339	0.073
低	9	28.52	0.338	
高	7	27.02	0.344	
肿瘤大小				
<5 cm	30	28.13	0.347	0.102
≥5 cm	10	28.42	0.344	
大体病理类型				
肿块型	31	27.93	0.338	0.213
浸润型	2	28.14	0.337	
溃疡型	7	27.02	0.340	

肠癌组织中 SERCA3 水平有所下降<sup>[7]</sup>。结肠癌 SERCA3 表达水平的降低与结肠癌恶性程度密切相

关<sup>[6,8]</sup>。Gou 等<sup>[9]</sup>通过 RT-PCR 检测发现, SERCA3 mRNA 表达在结肠癌中较原位癌低 ( $P < 0.05$ ); 免疫组织化学检查显示, SERCA3 表达在淋巴结侵袭方面, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。本研究采用实时 PCR 微阵列测定结直肠癌组织 SERCA3 的 mRNA 表达情况发现, 结直肠癌 SERCA3 mRNA 表达较癌旁组织低 ( $P < 0.05$ ), 其表达在淋巴结转移和 TNM 分期方面比较, 差异均具有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 与上述结果相符<sup>[6,8-10]</sup>。本研究结果提示, SERCA3 异常表达与结直肠癌的发展密切相关, 但其影响结直肠癌的确切机制仍有待进一步研究。

参考文献:

[1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会医政医管局, 中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范(2017年版)[J]. 中国实用外科杂志, 2018, 56(4): 241-258.

[2] 姚宏伟, 吴鸿伟, 刘荫华. 从传统“群体化”诊治到精准“个体化”医疗: AJCC 第八版结直肠癌分期系统更新解读[J]. 中华外科杂志, 2017, 55(1): 24-27.

[3] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[4] Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, et al. Calcium and cancer: targeting  $Ca^{2+}$  transport [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(7): 519-530.

[5] Elaib Z, Saller F, Bobe R. The calcium entry-calcium refilling coupling[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 898: 333-352.

[6] Toyoshima C, Nomura H, Tsuda T. Luminal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues [J]. Nature, 2004, 432(7015): 361-368.

[7] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.

[8] Gélébart P, Kovács T, Brouland JP, et al. Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells induction of SERCA3 expression during differentiation[J]. J Biol Chem, 2002, 277(29): 26310-26320.

[9] Gou WF, Niu ZF, Zhao S, et al. Aberrant SERCA3 expression during the colorectal adenoma-adenocarcinoma sequence[J]. Oncol Rep, 2014, 31(1): 232-240.

[10] Brouland JP, Gélébart P, Kovács T, et al. The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis[J]. Am J Pathol, 2005, 167(1): 233-242.