



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.013
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.013
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(10):1411-1416.

· 基础研究 ·

囊泡相关膜蛋白 8 在结肠癌中的表达及临床意义

廖真, 张良敏, 晏锐

(湖北省恩施州来凤县人民医院 普外胸外科, 湖北 恩施 445700)

摘要

目的: 探讨囊泡相关膜蛋白 8 (VAMP8) 在结肠癌组织中的表达及其临床意义。

方法: 收集 42 例结肠癌患者癌组织及癌旁正常组织标本, 用免疫组化法检测 VAMP8 蛋白的阳性表达率, 分析其表达与结肠癌临床病理特征之间的关系; 并选择其中 12 对标本, 用 qRT-PCR 与 Western blot 法检测 VAMP8 mRNA 与蛋白的表达量。

结果: qRT-PCR 及 Western blot 检测显示, 9 对标本的结肠癌组织 VAMP8 mRNA 与蛋白表达量明显高于其对应的癌旁组织 (均 $P < 0.05$); 免疫组化结果显示, VAMP8 在结肠癌组织中的阳性率明显高于癌旁组织 (73.8% vs. 42.9%; $\chi^2 = 8.28$, $P < 0.01$), 且 VAMP8 的表达与肿瘤的分化程度、Dukes 分期及淋巴结转移情况有关 (均 $P < 0.05$)。

结论: VAMP8 在结肠癌组织中表达上调, 提示 VAMP8 可能通过调节自噬 / 溶酶体途径促进结肠癌的恶性进展与转移。

关键词

结肠肿瘤; 囊泡相关膜蛋白质 8; 自噬; 肿瘤浸润
中图分类号: R735.3

Expression of vesicle-associated membrane protein 8 in colon cancer and its clinical significance

LIAO Zhen, ZHANG Liangmin, YAN Rui

(Department of General and Thoracic Surgery, Laifeng People's Hospital, Enshi, Hubei 445700, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression of vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8) in colon cancer tissue and its clinical significance.

Methods: The specimens of colon cancer along with normal adjacent tissue from 42 patients were collected, in which the positive expression rate of VAMP8 protein was detected by immunohistochemical staining, and then the relations of VAMP8 expression with clinicopathologic characteristics of the patients were analyzed. Further, 12 pairs of the specimens were selected, and then the VAMP8 mRNA and protein expression levels were determined by qRT-PCR and Western blot, respectively.

Results: Results of qRT-PCR and Western blot analysis showed that the VAMP8 mRNA and protein expression levels in colon cancer tissue were significantly higher than those in their matched adjacent tissue in 9 pairs of specimens (both $P < 0.05$). Results of immunohistochemical staining demonstrated that the positive expression rate of VAMP8 protein in colon cancer tissues was significantly higher than that in adjacent non-tumorous tissues

收稿日期: 2015-06-02; 修订日期: 2015-09-09。

作者简介: 廖真, 湖北省恩施州来凤县人民医院副主任医师, 主要从事普通外科方面的研究。

通信作者: 晏锐, Email: ruiyan_18@163.com

(73.8% vs. 42.9%; $\chi^2=8.28, P<0.01$), and the VAMP8 expression was significant associated with histopathological grade, Dukes' stage and lymph node metastasis (all $P<0.05$).

Conclusion: VAMP8 expression is increased in colon cancer tissue, which suggests that VAMP8 may promote the progression and metastasis of colon cancer through regulating the autophagy-lysosome pathway.

Key words

Colonic Neoplasms; Vesicle-Associated Membrane Protein 8; Autophagy; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.3

自噬 (autophagy) 是细胞对受损的细胞器和蛋白质进行自我吞噬、清除的过程, 其在正常细胞功能维持、肿瘤发生和放化疗抵抗等病理生理过程中发挥着重要作用, 已成为当今肿瘤学研究的热点^[1-2]。然而, 目前自噬的研究大多关注于早期的启动和调控过程, 对于其晚期阶段—自噬体和溶酶体融合的研究却较少, 而自噬溶酶体形成才是自噬发生的根本性标志^[3-4]。因此, 加强对自噬晚期阶段相关分子信号的研究具有十分重要的意义。

囊泡相关膜蛋白8 (vesicle-associated membrane protein 8, VAMP8) 是可溶性N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体 (SNARE) 复合物的成员之一, 研究^[5-6]发现其同时也是自噬体和溶酶体融合过程中的关键调控分子。然而目前关于VAMP8在肿瘤中的研究鲜有报道, 本研究通过多种分子生物学方法检测VAMP8在结肠癌中的表达, 并探讨其临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本材料

收集2012年6月—2014年6月本院诊断为结肠癌并行手术切除的组织标本共42例, 所有标本均经病理确诊。其中女12例, 男30例; 中位年龄58.5岁; 肿瘤位于近段结肠26例、远端结肠16例; 病理分期按Duke分期A期12例, B期7例, C期20例, D期3例; 按分化程度高分化10例, 中分化18例, 低分化14例; 按浸润深度侵及浆膜者29例, 未侵及浆膜者13例; 经病理证实有淋巴结转移22例, 无淋巴结转移20例。同期肿瘤切除后距肿瘤边缘5 cm以外的肠管黏膜为癌旁组织。所有患者术前均未行放疗或化疗。42例标本均常规行石蜡包埋, 另取12例新近收集的组织 (液氮中保存) 进行Western blot和PCR检测。

1.2 主要试剂

TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司; VAMP8及GAPDH引物序列由上海生工生物工程有限公司合成; 兔抗人VAMP8多克隆抗体购自英国Abcam公司; 鼠抗人GAPDH单克隆抗体购自美国Proteintech公司; 免疫组化SABC试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 qRT-PCR 按TRIzol说明书提取组织样品总RNA, 按逆转录试剂盒 (ReverTra Ace[®] qPCR RT kit, 日本TOYOBO) 说明书二步法合成cDNA, 产物保存于-80℃。再根据qRT-PCR试剂盒 (SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix, 日本TOYOBO) 说明书在荧光定量PCR仪 (ABI7500) 上进行检测。VAMP8上游引物序列为: 5'-CAT CTC CGC AAC AAG ACA GA-3'; 下游引物序列为: 5'-TGG CAA AGA GC ACA ATG AAG-3'。GAPDH上游引物序列为: 5'-GGG TGT GAA CCA TGA GAA GT-3'; 下游引物序列为: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3'。样本中目的基因与内参基因 (GAPDH) 循环阈值的差异为 ΔCT , 实验样本与对照样本 (正常肠管黏膜组织) ΔCT 的差异为 $\Delta \Delta CT$, 以 $2^{-\Delta \Delta CT}$ 表示基因的相对表达量。以上实验重复3次。

1.3.2 Western blot 提取组织中的总蛋白, BCA法检测蛋白浓度。以20 μg 蛋白/泳道上样, 10%SDS-PAGE凝胶进行电泳、转膜, 5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 然后加入VAMP8一抗 (1:500) 和GAPDH一抗 (1:5 000) 于杂交袋中4℃孵育过夜, TBST洗膜后二抗 (1:2 000) 室温孵育2 h, 之后采用增强化学发光 (ECL) 试剂 (美国Pierce公司) 于凝胶成像仪 (Bio-rad) 中进行曝光。结果用图像分析软件Image J进行灰度分析, 计算目的蛋白与GAPDH的光密度比值。

1.3.3 免疫组织化学染色 所有标本均经多聚

甲醛固定,常规石蜡包埋、连续4 μm 厚切片。VAMP8一抗的工作浓度为1:100。操作步骤按即用型免疫组化SABC检测试剂盒说明书进行。用已知阳性的结肠癌切片作为阳性对照,用PBS代替一抗作为阴性对照。VAMP8主要为胞浆着色,判定标准参照文献^[7]:每张切片随机观察5个高倍视野(400倍)读取阳性细胞数,并计算阳性细胞百分率。以阳性细胞染色程度及阳性细胞百分数评分的乘积进行综合判断。不着色为0分,浅棕黄色为1分,棕黄色为2分,黄褐色为3分;阳性细胞数<5%为0分,5%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分。结果判定:总分<2判定为阴性,总分 ≥ 2 判定为阳性。以上结果由两位高年资病理科医师在双盲条件下进行评定。

1.4 统计学处理

所有数据采用SPSS 13.0软件进行统计分析。两个样本均数间比较用Student's *t*检验;VAMP8的表达与临床病理资料之间的分析采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VAMP8 mRNA在结肠癌及癌旁组织中的表达

qRT-PCR检测结果显示,在12对结肠癌组织中有9对(75.0%)癌组织的VAMP8 mRNA表达水平高于对应的癌旁组织(均 $P<0.05$);以癌组织和癌旁组织的mRNA表达水平作散点图,两者的均值差异有统计学意义($P<0.05$)(图1)。

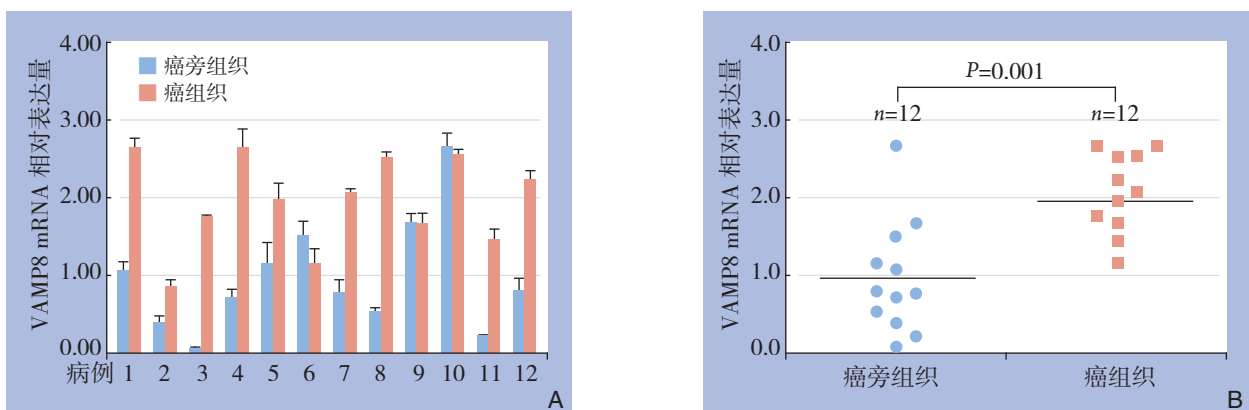


图1 VAMP8 mRNA表达检测 A: 12对标本中VAMP8 mRNA相对表达量; B: 12对标本中VAMP8 mRNA相对表达量的散点图

Figure 1 Detection of VAMP8 mRNA expression A: Relative VAMP8 mRNA expression levels in the 12 pairs of specimens; B: Scatterplots for the relative VAMP8 mRNA expression levels in the 12 pairs of specimens

2.2 Western blot 检测结果

在12对结肠癌组织中有9对(75.0%)癌组织的VAMP8蛋白(17 kD)表达量高于对应的癌旁组织,差异有统计学意义(均 $P<0.05$)(图2)。

2.3 VAMP8蛋白在结肠癌及癌旁组织中的表达

VAMP8在所有癌组织及大部分癌旁组织中均有表达,主要定位于胞浆,呈棕黄色颗粒状分布(图3)。42例结肠癌组织中VAMP8阳性表达率为73.8%(31/42),而对应的癌旁组织中VAMP8阳

性表达率为42.9%(18/42),差异有统计学意义($\chi^2=8.28$, $P<0.01$)。

2.4 VAMP8蛋白表达与结肠癌临床病理特征之间的关系

经统计学分析发现,VAMP8蛋白的表达与患者的年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小和浸润深度无关(均 $P>0.05$),而与肿瘤的分化程度、Dukes分期及淋巴结转移情况有关(均 $P<0.05$)(表1)。

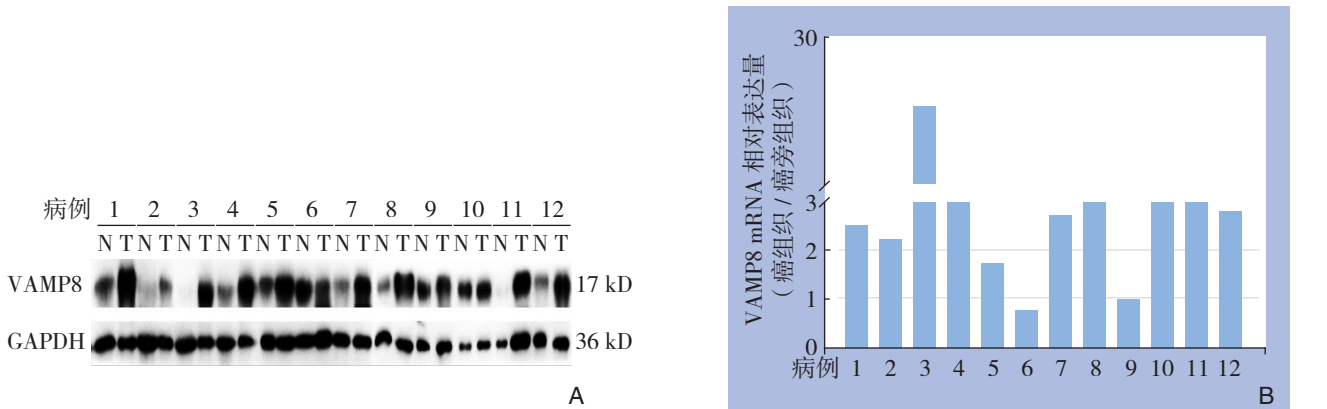


图 2 VAMP8 蛋白表达检测 A: 12 对标本中 VAMP8 蛋白表达 (N: 癌旁组织; T: 癌组织); B: 12 对标本癌组织相对自身癌旁组织的 VAMP8 蛋白相对表达量

Figure 2 Determination of VAMP8 protein expression A: VAMP8 protein expressions in the 12 pairs of specimens; B: The expression levels of VAMP8 protein in the tumor tissues relative to their adjacent tissue of the 12 specimens

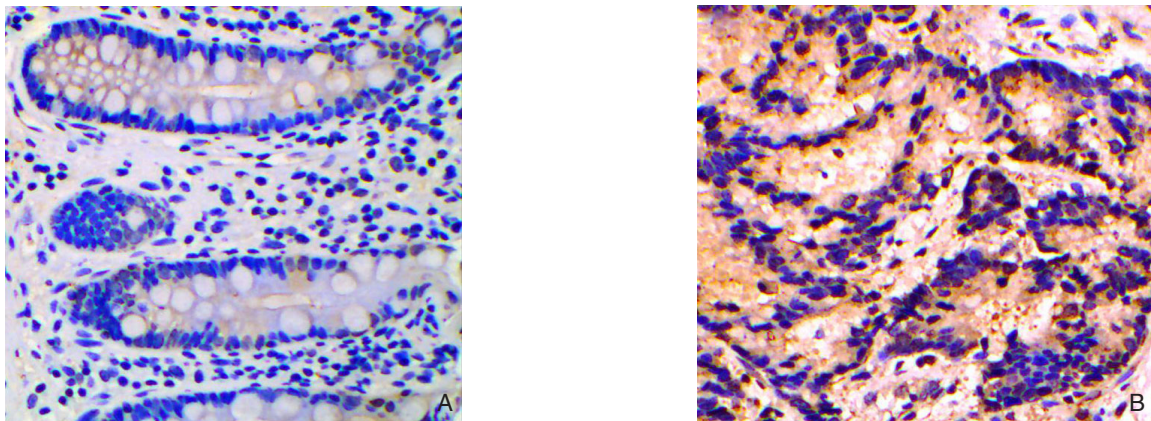


图 3 免疫组织化学检测 VAMP8 蛋白表达 (×200) A: 癌旁组织中 VAMP8 阴性表达; B: 癌组织中 VAMP8 阳性表达
Figure 3 Immunohistochemical staining for VAMP8 protein expression (×200) A: Negative VAMP8 expression in adjacent tissue; B: Positive VAMP8 expression in tumor tissue

表 1 VAMP8 蛋白表达与结肠癌临床病理特征之间的关系 [n (%)]
Table 1 Relations of VAMP8 expression with clinicopathologic factors of colon cancer [n (%)]

临床因素	n	VAMP8 蛋白表达		χ^2	P	临床因素	n	VAMP8 蛋白表达		χ^2	P
		阳性 (n=31)	阴性 (n=11)					阳性 (n=31)	阴性 (n=11)		
年龄 (岁)						分化程度					
≤ 55	25	18 (72.0)	7 (28.0)	0.00	0.95	高-中分化	28	17 (60.7)	11 (39.3)	5.56	0.02
> 55	17	13 (76.5)	4 (23.5)			低分化	14	14 (100.0)	0 (0.0)		
性别						Dukes 分期					
男性	30	21 (70.0)	9 (30.0)	0.25	0.67	A+B	19	10 (52.6)	9 (47.4)	6.17	0.02
女性	12	10 (83.3)	2 (16.7)			C+D	23	21 (91.3)	2 (8.7)		
肿瘤部位						浸润深度					
近段结肠	26	20 (76.9)	6 (23.1)	0.05	0.84	未及浆膜	13	7 (53.8)	6 (46.2)	2.53	0.14
远段结肠	16	11 (68.8)	5 (31.2)			浆膜以外	29	24 (82.8)	5 (17.2)		
肿瘤大小 (cm)						淋巴结转移					
< 5	28	19 (67.9)	9 (32.1)	0.75	0.46	无	20	11 (55.0)	9 (45.0)	6.99	0.03
≥ 5	14	12 (85.7)	2 (14.3)			有	22	20 (90.9)	2 (9.1)		

3 讨论

目前研究认为肿瘤的发生发展是多步骤、多因素参与的复杂过程,其中肿瘤细胞离开原发灶进入脉管系统(如淋巴管或血管)而不发生凋亡,并能够在游离状态下生存进而到达远处器官,称之为“失巢凋亡”抵抗,其被认为是肿瘤转移的早期事件和先决条件^[8-9]。遗憾的是肿瘤细胞具备失巢凋亡抗性的机制尚不明确,最新研究^[10-11]发现自噬可能是肿瘤细胞逃避失巢凋亡的关键机制之一。自噬是细胞通过单层或双层膜包裹待降解物形成自噬体,然后运送到溶酶体进行消化降解,以实现自身代谢需要和细胞器更新的过程。大量研究^[12-13]表明,自噬在多种人类肿瘤(包括结肠癌)的发生发展、侵袭转移和化疗耐药等过程中发挥了重要作用。然而目前有关自噬的研究均针对其早期的调控过程,对于自噬晚期阶段的研究却较少。自噬虽然经过早期的诱导发生,而一旦自噬体和溶酶体融合过程功能失调就无法完成自噬的全过程。因此,自噬溶酶体的形成可能是肿瘤细胞抵抗失巢凋亡进而发生远处转移的主要原因^[14-15]。

VAMP8是SNARE复合物的主要成员之一,该复合物在细胞的物质运输以及特异性膜融合等过程中发挥了关键作用^[16-17]。而细胞自噬的发生同样包括物质的转运及相关膜的融合过程,因此SNARE蛋白在自噬过程中也发挥着不可或缺的作用^[18-19]。Furuta等^[5]研究发现,VAMP8能通过与自噬体上的Vti1b蛋白相结合,调控自噬体与溶酶体的融合过程。而同时抑制VAMP8与Vti1b的表达可阻断自噬体标记蛋白LC3与溶酶体标记蛋白LAMP1荧光信号的共定位。Itakura等^[6]也发现,当自噬体与溶酶体进行融合时,VAMP8可与SNARE蛋白syntaxin 17及snap29形成复合体并促进自噬体与溶酶体的融合,从而调控细胞自噬的过程。Jean等^[20]最新研究还发现,细胞在饥饿状态下能通过MTMR13/Rab21信号轴激活VAMP8介导的自噬体与溶酶体融合,进而促进自噬的发生。然而关于VAMP8在肿瘤中的研究鲜有文献报道,Chen等^[7]报道在人恶性胶质瘤中VAMP8的表达水平较对应的癌旁组织升高,且其能通过调控细胞的自噬过程参与肿瘤的恶性增殖及对化疗药物的抵抗。此外,VAMP8的高表达还与患者的不良预后相关,且

是其独立的风险因素。Stegeman等^[21]也发现在人前列腺癌中miR-370可与VAMP8的miRSNP位点相结合并调控其表达,进而影响细胞的多种生物学功能。以上研究表明VAMP8与肿瘤的恶性生物学行为关系密切,但其具体功能及机制仍未明确。

目前国内外尚未见VAMP8在结肠癌中的研究报道,本研究结果显示,VAMP8在结肠癌组织及对应的癌旁组织中的表达差异具有统计学意义,在结肠癌中VAMP8表达上调。此外,本研究还发现VAMP8的高表达与结肠癌的分化程度、Dukes分期及淋巴结转移情况有关,而与其他临床特征之间没有相关性。结合前述文献报道,笔者推测VAMP8可能通过调节自噬/溶酶体途径,进而参与了结肠癌的恶性进展及转移等生物学过程。

综上所述,本研究通过检测首次发现VAMP8在结肠癌组织中表达上调,且与肿瘤的进展及转移情况相关,而肿瘤的恶性转化和转移是影响结肠癌患者预后的重要因素。因此,VAMP8也可能成为结肠癌的一个预后判断指标,但目前VAMP8在肿瘤中所扮演的角色及调控机制尚不完全清楚,而其在结肠癌中的作用及详细机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology[J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(4):1383-1435.
- [2] Guo JY, Xia B, White E. Autophagy-mediated tumor promotion[J]. *Cell*, 2013, 155(6):1216-1219.
- [3] Furuta N, Yoshimori T, Amano A. Mediator molecules that fuse autophagosomes and lysosomes[J]. *Autophagy*, 2010, 6(3):417-418.
- [4] Bernard A, Klionsky DJ. Autophagosome formation: tracing the source[J]. *Dev Cell*, 2013, 25(2):116-117.
- [5] Furuta N, Fujita N, Noda T, et al. Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes[J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(6):1001-1010.
- [6] Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes[J]. *Cell*. 2012, 151(6):1256-1269.
- [7] Chen Y, Meng D, Wang H, et al. VAMP8 facilitates cellular proliferation and temozolomide resistance in human glioma cells[J].

- Neuro Oncol, 2015, 17(3):407-418.
- [8] Liotta LA, Kohn E. Anoikis: cancer and the homeless cell[J]. Nature, 2004, 430(7003):973-974.
- [9] Kim YN, Koo KH, Sung JY, et al. Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis[J]. Int J Cell Biol, 2012, 2012: 306879. doi: 10.1155/2012/306879.
- [10] Yang J, Zheng Z, Yan X, et al. Integration of autophagy and anoikis resistance in solid tumors[J]. Anat Rec (Hoboken), 2013, 296(10):1501-1508.
- [11] Sun L, Li T, Wei Q, et al. Upregulation of BNIP3 mediated by ERK/HIF-1 α pathway induces autophagy and contributes to anoikis resistance of hepatocellular carcinoma cells [J]. Future Oncol, 2014, 10(8):1387-1398.
- [12] Cicchini M, Karantza V, Xia B. Molecular pathways: autophagy in cancer--a matter of timing and context[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(3):498-504.
- [13] 谢杰斌, 庞月珊, 王崇树, 等. 自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤对结直肠腺癌细胞生长与Notch1蛋白表的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(4):527-531.
- [14] Xu Y, Xia X, Pan H. Active autophagy in the tumor microenvironment: A novel mechanism for cancer metastasis[J]. Oncol Lett, 2013, 5(2):411-416.
- [15] Peng YF, Shi YH, Ding ZB, et al. Autophagy inhibition suppresses pulmonary metastasis of HCC in mice via impairing anoikis resistance and colonization of HCC cells [J]. Autophagy, 2013, 9(12):2056-2068.
- [16] Chen YA, Scheller RH. SNARE-mediated membrane fusion [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(2):98-106.
- [17] Südhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins[J]. Science. 2009, 323(5913):474-477.
- [18] Nair U, Jotwani A, Geng J, et al. SNARE proteins are required for macroautophagy[J]. Cell. 2011, 146(2):290-302.
- [19] Moreau K, Renna M, Rubinsztein DC. Connections between SNAREs and autophagy[J]. Trends Biochem Sci, 2013, 38(2):57-63.
- [20] Jean S, Cox S, Nassari S, et al. Starvation-induced MTMR13 and RAB21 activity regulates VAMP8 to promote autophagosome-lysosome fusion[J]. EMBO Rep, 2015, 16(3):297-311.
- [21] Stegeman S, Amankwah E, Klein K, et al. A Large-Scale Analysis of Genetic Variants within Putative miRNA Binding Sites in Prostate Cancer [J]. Cancer Discov, 2015, 5(4):368-379.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 廖真, 张良敏, 晏锐. 囊泡相关膜蛋白8在结肠癌中的表达及临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(10):1411-1416. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.013

Cite this article as: LIAO Z, ZHANG LM, YAN R. Expression of vesicle-associated membrane protein 8 in colon cancer and its clinical significance[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(10):1411-1416. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.013

认仕医生重构医疗生态，改善医生生活 ——未来医生·新生活·发布会隆重召开

2015年10月22日，一场以打造互联网新医疗生态圈，改善医生生活为探讨主题的“未来医生·新生活·发布会”在北京隆重召开。原卫生部副部长孙隆椿，军事科学院微生物流行病学研究所政委唐明山，解放军第三〇六医院院长顾建文，中华医学会杂志社副社长刘冰，急诊科女超人于莺，九州通医药集团业务总裁耿鸿武，中国医疗器械商学院创始人朱明，万方医学专家委员会秘书长王光跃等嘉宾都做了主题发言，他们在畅想互联网+医疗各种可能的同时，也充分肯定了认仕医生平台打造互联网新医疗生态圈对于中国医疗发展的积极意义。

认仕医生董事长、CEO万马，万马表示他和他的团队一直在寻找可以真正帮助到医生，打破行业封闭，让医生获得应有回报与职业尊严的方法。CEO万马表示：连接的彼此需要信息，而医疗当中大量存在的信息都在医院当中，如何让医院中的信息发挥出价值，帮助更多患者找到好的医生，求得好药，快速看对病。2014年12月中国首个互联网+医生轻职业生活平台——认仕医生，正式上线。到目前为止已覆盖280万执业医师数据，20余万家医疗企业数据，数十个医学分会，并与网易、民生银行、三大运营商、国家密码局建立深度合作。截至到今天，认仕医生平台已签约北京、上海、广州、深圳、浙江、四川、湖北、湖南等地，签约多家顶级医院的医疗专家上千位。