

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.21.009

文章编号: 1005-8982 (2018) 21-0048-05

肺鳞状细胞癌组织中血管扩张刺激磷蛋白的临床意义及生物学功能研究

许海东

(四川省医学科学院 四川省人民医院, 急诊内科, 四川 成都 610072)

摘要: **目的** 探讨肺鳞状细胞癌 (LSCC) 组织中血管扩张刺激磷蛋白 (VASP) 的临床意义及对肺癌细胞迁移侵袭的影响。**方法** 检测 50 例 LSCC 及其癌旁组织中 VASP 的表达, 分析肿瘤组织 VASP 表达与患者临床特征及预后间的相关性。通过 siRNA 沉默肺癌细胞中 VASP 的表达, 采用划痕愈合试验及 Transwell 小室模型检测沉默 VASP 后肺癌细胞迁移及侵袭能力的变化。**结果** 肺癌组织中 VASP 的阳性表达率 ($\chi^2=7.853$, $P=0.005$) 及阳性表达程度 ($t=4.318$, $P=0.000$) 均高于对应癌旁组织, 并与肿瘤淋巴结转移 ($\chi^2=6.455$, $P=0.011$) 及高 TNM 分期呈正相关 ($\chi^2=6.455$, $P=0.011$); 肺癌组织 VASP 蛋白表达阳性患者 3 年总生存率 ($\chi^2=8.311$, $P=0.004$) 及无病生存率 ($\chi^2=9.969$, $P=0.002$) 均低于 VASP 蛋白表达阴性患者。在体外, 沉默 VASP 的表达能够抑制肺癌细胞的迁移 ($t=9.021$, $P=0.011$) 及侵袭 ($t=4.609$, $P=0.041$) 能力。**结论** 肺鳞癌组织中 VASP 表达升高并与肿瘤患者较差的生存获益有关, 沉默 VASP 表达在体外能够实现一定的抗肿瘤转移效应。

关键词: 血管扩张刺激磷蛋白; 肺鳞状细胞癌; 表达; 预后; 转移

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Clinical role and biofunctions of VASP in human lung squamous cell carcinoma

Hai-dong Xu

(Department of Emergency internal medicine, Sichuan Provincial People's Hospital, Sichuan Academy of Medical Sciences, Chengdu, Sichuan 610072, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP) and its clinical significance in human lung squamous cell carcinoma (LSCC). **Methods** The expression of VASP in 50 LSCC tissues and matched tumor adjacent tissues was detected by immunohistochemistry. The relationship between VASP and clinical features were determined by chi-square test. VASP was knocked down by siRNA technology in vitro. **Results** The expression of VASP was up-regulated in tumor tissues than non-tumor tissues ($\chi^2 = 7.853$, $P = 0.005$; $t = 4.318$, $P = 0.000$). VASP was positively associated with lymphatic metastasis ($\chi^2 = 6.455$, $P = 0.011$) and advanced TNM stage (III + IV stage, $\chi^2 = 6.455$, $P = 0.011$). Three-year overall survival rate and disease-free survival rate were dramatically lower in VASP positive group than those in VASP negative expression group ($\chi^2 = 8.311$, $P = 0.004$, $\chi^2 = 9.969$, $P = 0.002$). Knockdown of VASP inhibited the migration and invasion of cancer cells in vitro condition. **Conclusions** Expression of VASP is significantly increased in LSCC tissues and may be involved in tumor metastasis.

Keywords: VASP; lung squamous cell carcinoma; expression; prognosis; metastasis

收稿日期: 2017-10-27

目前,肺癌是我国发病率最高的恶性肿瘤之一^[1],由于其早期症状隐匿,手术后易复发且放化疗敏感性低等生物学特点,肺癌已成为危害我国人民群众身体健康的重大公共卫生问题^[2]。肺癌病理类型复杂其中以肺鳞状细胞癌(lung squamous cell carcinoma, LSCC)之类型最为常见^[3],对肺鳞状细胞癌分子特征的研究对于寻找新的肺癌预后靶点具有重要意义。

血管扩张刺激磷蛋白(vasodilator stimulated phosphoprotein, VASP)是 Enabled (Ena)/VASP 家族主要成员^[4],是构成细胞骨架的相关蛋白之一^[5]。研究发现肿瘤组织中 VASP 的表达情况与癌症细胞侵袭、转移及患者生存获益密切相关^[6]。因而, VASP 可能是一种重要的肿瘤诊断及预后分子,而 VASP 在肺鳞状细胞癌中的临床意义尚不完全清楚。

本研究探讨 VASP 在肺鳞状细胞癌中的临床表达意义,以期使 VASP 成为肺鳞状细胞癌诊断、治疗的分子标志物提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2011 年 1 月-2013 年 1 月于本院手术切除鳞状细胞癌以及癌旁组织(距肿瘤边缘 >2 cm)50 例组织标本。其中,男性 35 例,女性 15 例;年龄 45 ~ 77 岁,平均(54.3 ± 2.1)岁。

兔抗人 Super Vision (SV) 二步法超敏免疫组织化学(简称免疫组化)试剂盒(SV0002)(购自武汉博士德公司,内容包括:5%牛乳清蛋白封闭液、聚合 HRP 标记抗兔 IgG、3%过氧化氢溶液),兔抗人 VASP 一抗(sc-13975)及 GAPDH 一抗(购自美国 Santa cruz 公司),Trizol 试剂(15596026)及 Lipofectamine™ 3000 转染试剂(L3000015)、一步法 RT-PCR 试剂盒(10928042)(购自美国 Invitrogen 公司), VASP siRNA (5'-GGACCUACAGAGGGUGAAAdTdT-3')、阴性对照 siRNA(购自广州复能基因有限公司), VASP 引物(正向 5'-AAAGTCAGCAAGCAGGAGGA-3';反向 5'-ATTC ATCCTTGGGGGTTTTTC-3');GAPDH 引物(正向 5'-CG GAGTCAACGGATTTGCTCGTAT-3';反向 5'-AGCCTT CTCCATGGTGGTGAAGAC-3')(由上海生工生物工程公司合成),Transwell 小室(#3458)(购自美国康宁公司),Matrigel(货号:354230)(购自美国 B&D 公司)。

1.2 免疫组化检测 VASP 表达

石蜡包埋的标本组织切片常规进行脱蜡及水化

预处理;用抗体稀释液按 1 : 100 稀释兔抗人 VASP 多克隆抗体,滴加抗体于组织切片上并充分浸没组织标本;4℃恒温冰箱内孵育过夜,洗净未结合一抗后,使用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗结合相应一抗,DAB 法显示阳性蛋白。400 倍视野下每张组织切片下随机选取 10 个视野进行阅片。按文献^[7]所述标准评分。最终评分 ≥ 1 分者评判为 VASP 阳性表达。

1.3 细胞培养及 siRNA 转染

NCI-H520 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养至稳定传代 2 ~ 3 代。按过夜增殖至愈合度达 70% 之密度接种 6 孔细胞培养板。达到预定培养密度后移除培养基,1 × PBS 溶液充分洗涤细胞。转染分组: VASP 组每孔加入 100 pmol VASP siRNA 及 5 μl 转染试剂;对照组每孔加入 100 pmol 的阴性对照 siRNA 及 5 μl 转染试剂。添加无血清 DMEM 培养液至终体积 1 ml/孔。4 h 后更换完全培养基继续培养。

1.4 VASP 基因在肿瘤中的相对表达量检测

采用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测。按 Trizol 试剂说明书提取组织或细胞总 RNA,按试剂盒说明书配制逆转录及 PCR 扩增体系。设置逆转录 PCR 条件:50℃逆转录 30 min,94℃逆转录酶失活 2 min,循环次数 1。设置 qRT-PCR 条件:94℃预变性 15 s;94℃变性 15 s,60℃延伸 30 s,循环次数 40;最后 72℃延伸 10 min。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 VASP 基因在肿瘤中的相对表达量。

1.5 细胞划痕愈合试验

转染 24 h 后的 NCI-H520 细胞接种于 6 孔板中,接种密度以过夜铺满为准。无血清 DMEM 培养基饥饿细胞 4 h 已减弱细胞间连接。100 μl 的枪头由每孔中线划过,PBS 清洗 6 孔板,无血清 DMEM 培养基补足体积至 2 ml。培养 48 h 后观察细胞迁移。

1.6 Transwell 侵袭小室检测

按 1 : 8 比例采用 DMEM 培养液稀释基质胶后,每孔 100 μl 包被 Transwell 小室膜的上室面,取转染 72 h 后的 NCI-H520 细胞,使用无血清培养基重悬细胞至 5×10^5 个/ml,上层小室每室加入 250 μl 细胞悬液,下层小室中加入含 10% FBS 的培养基,置于 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 孵箱中培养 12 h。用棉签擦净上室面细胞,4% 多聚甲醛固定下室面细胞,Giemsa 染液染色。100 倍光镜下随机选择 10 个视野计数下

室面的细胞个数。以每个小室的平均细胞数为最终计数。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件，计数资料比较采用 χ^2 检验，计量数据比较采用 t 检验。患者术后行 3 年随访访问，Kaplan–Meier 分析评价患者生存获益，COX 回归分析判断预后危险因素， $\alpha_{入}=0.05$ ， $\alpha_{出}=0.10$ 。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VASP 的表达情况

PCR 结果显示，VASP 基因在肺癌组织中的表达量 (1.357 ± 0.213) 高于癌旁组织 (0.468 ± 0.083)，差异有统计学意义 ($t=4.589$ ， $P=0.000$)。免疫组化结果发现，VASP 主要定位于胞浆之中，呈棕黄至棕褐色颗粒状沉积。LSCC 组织中有 66.0% (33/50) 存在 VASP 阳性表达，而癌旁组织仅 38.0% (19/50 例) 有 VASP 阳性表达，两者表达差异有统计学意义 ($\chi^2=7.853$ ， $P=0.005$)，见表 1。进一步对 VASP 免疫组化分进行分析，LSCC 组织中 VASP 的免疫组化染色平均得分为 (9.341 ± 1.252)，而癌旁组织的平均得分为 (3.234 ± 0.981)，统计学分析证实两者表达强度差异有统计学意义 ($t=4.318$ ， $P=0.000$)。见图 1。

2.2 VASP 表达与临床病理特征的关系

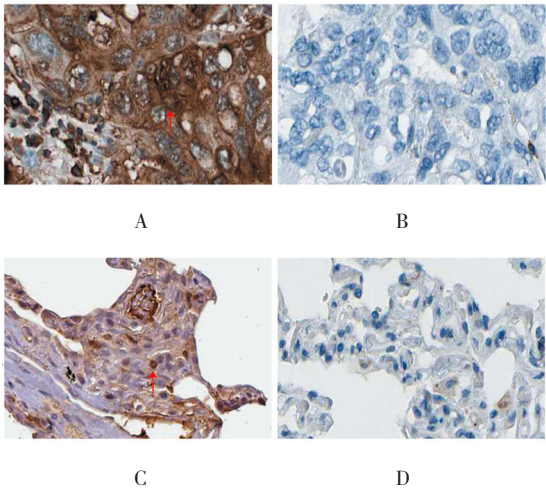
VASP 蛋白阳性表达的肺鳞状细胞癌患者存在肿瘤淋巴结转移 ($\chi^2=6.455$ ， $P=0.011$) 及较晚 TNM 分期 (Ⅲ + Ⅳ期， $\chi^2=7.390$ ， $P=0.007$) 的情况较多见。另外，尽管其他临床病理特征间的 VASP 表达也有差异，但差异无统计学意义。见表 2。

2.3 肺癌组织 VASP 蛋白表达与预后间的关系

随访完成发现 50 例患者中存活 17 例，死于肺癌 33 例，3 年生存率 34.00%。按 VASP 表达分组后发现，VASP 阳性组表达 3 年存活率为 21.21% (7/33)，而 VASP 阴性组表达则高达 58.82% (10/17)，两组

表 1 VASP 在肺鳞状细胞癌中的表达 例

组别	VASP 表达		χ^2 值	P 值
	VASP 阳性	VASP 阴性		
LSCC 组织	33	17	7.853	0.005
癌旁组织	19	31		
合计	52	48		



A: VASP 在肺鳞状细胞癌组织中阳性表达(红色箭头所示)；B: VASP 在肺鳞状细胞癌组织中阴性表达；C: VASP 在癌旁组织中阳性表达(红色箭头所示)；D: VASP 在癌旁组织中阴性表达

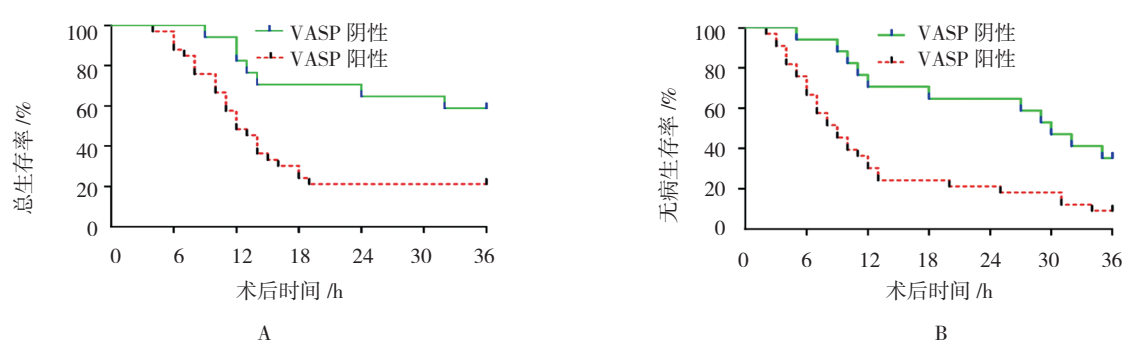
图 1 VASP 在肺鳞状细胞癌中的表达

比较差异有统计学意义 ($\chi^2=8.311$ ， $P=0.004$ ，见图 2A)。VASP 阳性表达患者的术后更易复发 ($\chi^2=9.969$ ， $P=0.002$ ，见图 2B)。COX 多元回归分析表明，VASP 阳性表达是影响患者预后的独立因素 ($b=0.818$ ， $S_b=$

表 2 VASP 的临床病理意义分析 (n=50)

临床病理特征	VASP 阳性 (<i>n</i> =33)	VASP 阴性 (<i>n</i> =17)	χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄				
>50 岁	17	9	0.009	0.924
>50 岁	16	8		
性别				
男	23	12	0.004	0.948
女	10	5		
吸烟与否				
是	25	10	1.532	0.216
否	8	7		
肿瘤直径				
<5 cm	14	12	3.566	0.059
≥ 5 cm	19	5		
淋巴结转移				
无	6	9	6.455	0.011 [†]
有	27	8		
TNM 分期				
I + II	10	12	7.390	0.007 [†]
III + IV	23	5		

注：[†] $P<0.05$



A：不同 VASP 表达状态下患者 3 年总生存率（OS）比较；B：不同 VASP 表达状态下患者 3 年无病生存率（DFS）比较

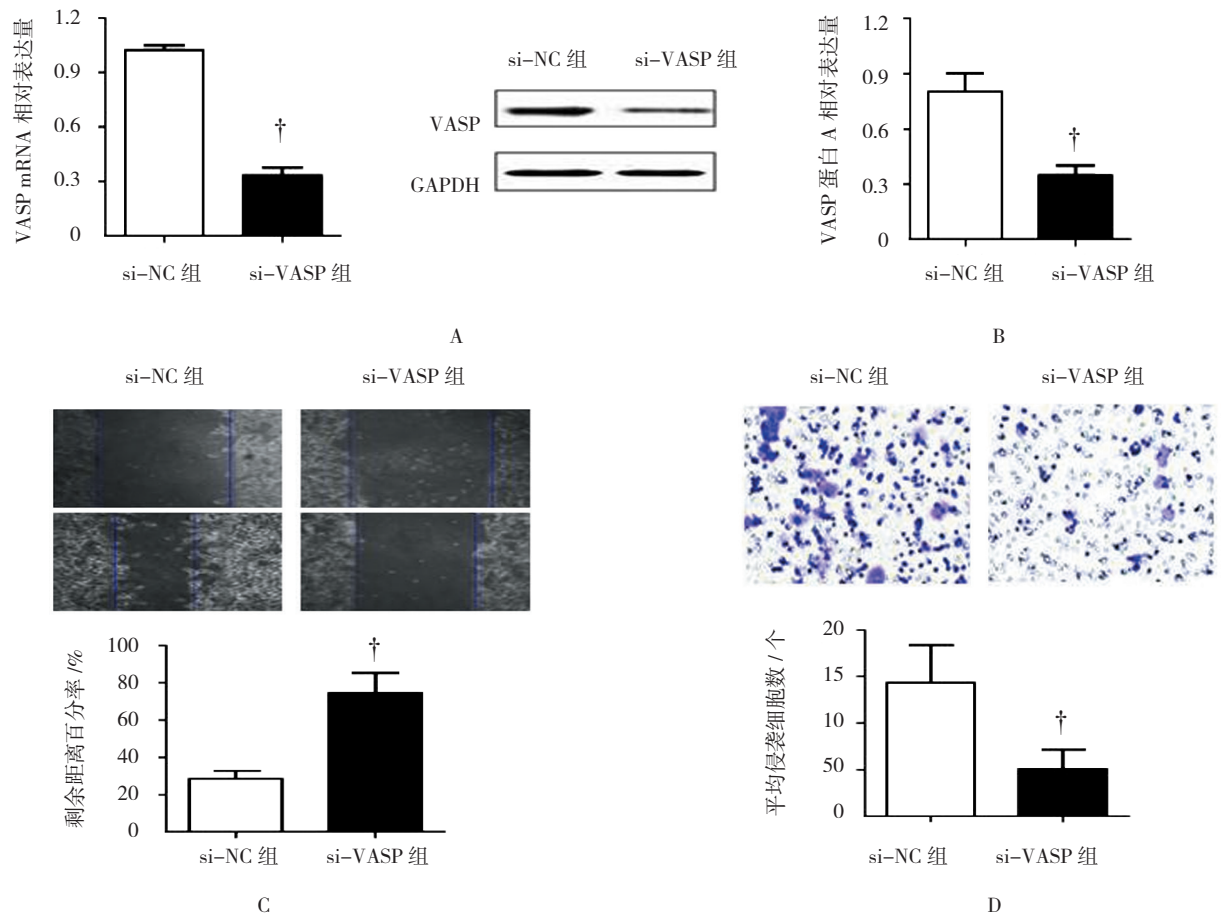
图 2 Kaplan-Meier 生存分析曲线

0.326, Wald $\chi^2=6.298$, df=1, OR=2.799, 95%CI : 1.370, 5.715, $P=0.006$)。

2.4 沉默 VASP 表达对 NCI-H520 细胞迁移侵袭的影响

迁移及侵袭能力是肿瘤细胞转移潜能的生物学标志。为探究 VASP 对肺鳞癌细胞迁移及侵袭的影响，首先通过瞬时转染术在 NCI-H520 细胞内沉默 VASP

的表达（见图 3A、3B）。细胞划痕愈合结果显示，沉默 VASP 表达能抑制 NCI-H520 细胞迁移（ 31.394 ± 4.812 vs 87.003 ± 10.207 , $t=9.021$, $P=0.011$, 见图 3C）。Transwell 小室结果表明，在沉默 VASP 后 NCI-H520 细胞的侵袭能力也受到抑制（ 14.321 ± 4.036 vs 5.068 ± 2.110 , $t=4.609$, $P=0.041$, 见图 3D）。



† 与 si-NC 组比较, $P<0.05$

图 3 沉默 VASP 表达抑制肺鳞癌细胞迁移及侵袭

3 讨论

肺癌是我国恶性肿瘤发病率占首位的胸部恶性肿瘤^[8]，外科手术及术后放化疗是目前肺癌的主要治疗方案，但由于肺癌生物学恶性程度高，易复发、转移，导致目前患者术后生存时间仍较短^[9]。因而寻找有效的肺癌早期诊断及预后监测分子标志物十分有必要。

VASP 最初是在血小板中发现的一种细胞骨架蛋白，其能够与 Zyxin、Vinculin 及 Profilin 等蛋白结合，调节细胞间黏附、细胞运动及形态改变^[10]。近年来的研究发现，VASP 是一种促癌分子。例如，VASP 在乳腺癌组织中高表达^[11]，体外实验也证实，人工过表达 VASP 能够促进乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力，分子研究认为其机制可能是通过诱导乳腺癌细胞发生 EMT 改变而实现的^[12]。

在本研究中发现，肺鳞癌组织中 VASP 呈高表达趋势，且该类患者出现淋巴结转移及高 TNM 分期的可能性更大。结合 VASP 作为一种细胞骨架蛋白，具有调控细胞运动和迁移的生物学功能，笔者推测，VASP 高表达可能预示着肿瘤转移的可能。因此，笔者进一步分析入组患者术后 3 年内的生存情况，结果发现，VASP 表达阳性患者 3 年总生存率仅 30% 左右，而 3 年肿瘤复发率高达 90% 以上。且 VASP 是肺鳞癌患者的独立预后因素，其表达水平对肺癌患者的预后具有重要的监测意义。通过文献检索，ZHANG 等^[13]在胃癌中、TU 等^[14]在结肠癌中的研究也得到相同结论。为进一步明确 VASP 导致肿瘤转移的内在机制是否是通过促进细胞运动而实现，笔者通过体外小干扰 RNA 转染技术沉默 VASP 基因的表达，通过功能学试验检测肺癌细胞在下调 VASP 表达后迁移及侵袭能力的变化，结果显示沉默 VASP 能够降低细胞的迁移和侵袭能力。该现象从微观生物学上验证 VASP 在肺鳞状细胞癌转移及术后复发中的作用机制。

综上所述，肺鳞癌中 VASP 高表达，且与患者淋巴结转移及不良临床预后关系密切，沉默 VASP 表达能够抑制体外肺癌细胞转移，是一种潜在的肺鳞状细胞癌诊断及治疗分子指标。

参 考 文 献：

[1] 冯稳, 张冰, 于庆凯. 核因子 E2 相关因子 2 在乳腺癌中的表达及临床意义 [J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(4): 29-32.

- [2] 孙常铭, 王丽萍, 刘敏, 等. 沉默人肺癌 A549 细胞中期因子基因表达对细胞凋亡的影响 [J]. 重庆医学, 2015, 44(5): 608-609.
- [3] 袁世璋, 杜小军. 肺癌根治性袖状切除术和全肺切除术治疗非小细胞肺癌的比较研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(36): 94-96.
- [4] KRAUSE M, DENT E W, BEAR J E, et al. Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003, 19(1): 541-564.
- [5] GHAREHBAGHIAN A, SALIMIAN M, TAHERIAN A A, et al. Variations in intraplatelet phospho-VASP expression due to pre-analytical sample preparations, illustration of a quality control issue in platelet pharmacology[J]. Iran J Pharm Res, 2015, 14(1): 321-328.
- [6] KIM S D, LEE Y J, BAIK J S, et al. Baicalein inhibits agonist- and tumor cell-induced platelet aggregation while suppressing pulmonary tumor metastasis via cAMP-mediated VASP phosphorylation along with impaired MAPKs and PI3K-Akt activation[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 92(2): 251-265.
- [7] 拓航, 郑鑫, 涂康生, 等. PCAF 在肝细胞癌中的表达及临床意义研究 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(3): 297-300.
- [8] 郑莹, 吴春晓, 张敏璐. 肺癌在中国的流行状况和疾病特征 [J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(8): 561-569.
- [9] ZENG H, ZHENG R, GUO Y, et al. Cancer survival in China, 2003-2005: a population-based study[J]. Int J Cancer, 2015, 136(8): 1921-1930.
- [10] SCHMIT M A, MIRAKAJ V, STANGASSINGER M, et al. Vasodilator phosphostimulated protein (VASP) protects endothelial barrier function during hypoxia[J]. Inflammation, 2012, 35(2): 566-573.
- [11] SU K, TIAN Y, WANG J, et al. HIF-1 α acts downstream of TNF- α to inhibit vasodilator-stimulated phosphoprotein expression and modulates the adhesion and proliferation of breast cancer cells[J]. DNA Cell Biol, 2012, 31(6): 1078-1087.
- [12] TANAKA N, YOSHIDA H, SUZUKI Y, et al. Relative expression of hMena11a and hMenaINV splice isoforms is a useful biomarker in development and progression of human breast carcinoma[J]. Int J Oncol, 2014, 45(5): 1921-1928.
- [13] ZHANG J W, SU K, SHI W T, et al. Matrine inhibits the adhesion and migration of BCG823 gastric cancer cells by affecting the structure and function of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)[J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(8): 1084-1092.
- [14] TU K, LI J, VERMA V K, et al. Vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes activation of hepatic stellate cells by regulating Rab11-dependent plasma membrane targeting of transforming growth factor beta receptors[J]. Hepatology, 2015, 61(1): 361-374.

(王荣兵 编辑)