

SCAMP2 在结直肠癌中的表达及其意义

乔业华¹ 郭栋² 王璐¹ 曲婷婷³ 张翔雁³ 邢晓明³

(1 青岛大学基础医学院病理学系, 山东 青岛 266071; 2 青岛大学附属医院胃肠外科; 3 青岛大学附属医院病理科)

[摘要] **目的** 探讨分泌载体膜蛋白 2(SCAMP2)在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中的表达及其意义。**方法** 收集 2014 年 1 月—2016 年 8 月青岛大学附属医院 309 例原发性 CRC 患者的石蜡组织样本及临床病理资料,采用免疫组织化学法检测 SCAMP2 在 CRC 组织及癌旁正常组织中的表达水平。**结果** SCAMP2 在 CRC 组织中低表达,在癌旁正常组织中高表达。CRC 组织及癌旁正常组织中 SCAMP2 的表达水平差异具有统计学意义($t=5.042, P<0.05$)。在 CRC 组织中 SCAMP2 表达水平与肿瘤大小、微卫星不稳定性(MSI)有关($\chi^2=6.953, 4.923, P<0.05$)。**结论** SCAMP2 在 CRC 组织中低表达,可能与 CRC 的发生发展密切相关,SCAMP2 低表达的 CRC 患者肿瘤体积较大,提示 SCAMP2 可作为 CRC 潜在的治疗靶点。

[关键词] 结直肠肿瘤;载体蛋白质类;膜蛋白质类;微卫星不稳定性;肿瘤负荷;免疫组织化学

[中图分类号] R735.34 **[文献标志码]** A

EXPRESSION AND SIGNIFICANCE OF SECRETORY CARRIER MEMBRANE PROTEIN 2 IN COLORECTAL CANCER QIAO Yehua, GUO Dong, WANG Lu, QU Tingting, ZHANG Xiangyan, XING Xiaoming (Department of Pathology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression and significance of secretory carrier membrane protein 2 (SCAMP2) in colorectal cancer (CRC). **Methods** Paraffin tissue samples and clinicopathological data were collected from 309 patients with primary CRC who were treated in The Affiliated Hospital of Qingdao University from January 2014 to August 2016, and immunohistochemistry was used to measure the expression level of SCAMP2 in CRC tissue and adjacent tissue. **Results** SCAMP2 showed a low expression level in CRC tissue and a high expression level in adjacent tissue, and there was a significant difference in the expression level of SCAMP2 between CRC tissue and adjacent tissue ($t=5.042, P<0.05$). The expression level of SCAMP2 in CRC tissue was associated with tumor size and microsatellite instability ($\chi^2=6.953, 4.923, P<0.05$). **Conclusion** The low expression of SCAMP2 in CRC tissue may be closely associated with the development and progression of CRC, and CRC patients with low expression of SCAMP2 tend to have a significant increase in tumor volume, suggesting that SCAMP2 can be used as a potential therapeutic target for CRC.

[KEY WORDS] Colorectal neoplasms; Carrier proteins; Membrane proteins; Microsatellite instability; Tumor burden; Immunohistochemistry

目前,结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是世界上人群中发病率、致死率位列前 3 位的恶性肿瘤^[1]。随着医疗技术的提高,临床上多采用化疗联合放疗和免疫疗法,以提高治疗效果,但是仍有部分患者治疗后出现复发或转移,严重影响患者的生活质量,因此寻找更有效的 CRC 治疗的靶点尤为重要。分泌载体膜蛋白(SCAMPs)是具有 4 个跨膜结构的载体蛋白,参与高尔基体与后高尔基体循环的转运,SCAMPs 保守蛋白包括 SCAMP1~SCAMP5 5 个亚型^[2-3]。目前关于 SCAMP2 的研究主要限于其在囊泡转运、胞吞胞吐中的作用。而且研究发现,与癌旁正常组织相比较,SCAMP2 在胰腺癌肿瘤组织以及血液系统肿瘤之中高表达^[4-5],但尚未有研究揭示 SCAMP2 在 CRC 组织中的表达情况。本研究

通过免疫组织化学法检测 SCAMP2 在 CRC 中的表达水平,并且通过临床病理分析探讨 SCAMP2 在 CRC 发生发展中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2014 年 1 月—2016 年 8 月青岛大学附属医院 309 例原发性 CRC 患者术中的 CRC 组织和癌旁正常组织标本,纳入标准为术前未行放、化疗者。同时收集患者的年龄、性别、淋巴结转移情况以及肿瘤分化程度、大小、TNM 分期、浸润程度、微卫星不稳定性(MSI)、KRAS 和 NRAS 突变情况等一般临床资料。电话随访患者生存时间、生存状态等信息,随访截至 2022 年 12 月 3 日。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片的制备及免疫组织化学染色 将 309 例石蜡包埋的 CRC 组织和癌旁正常组织标本,

[收稿日期] 2023-01-19; [修订日期] 2023-02-01

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81972329)

[通讯作者] 邢晓明, Email: edithxing@126.com

使用组织仪分别制备成 2.0 mm 孔径、4 μm 厚的组织芯片。将 CRC 以及癌旁正常组织的芯片依次放入盛有二甲苯、梯度乙醇的玻璃缸中脱蜡、水化,之后放入柠檬酸钠抗原修复液中,加热至 100 °C 后持续 2 min,冷却至室温,置于 30 g/L 过氧化氢溶液中浸泡 20 min 后,滴加山羊血清于取出的组织芯片上,室温下反应 30 min。然后滴加 SCAMP2 一抗稀释液(1 : 800,北京中杉金桥生物科技有限公司,TA506991,OTI3C2)于组织芯片上,同时将仅滴加抗体稀释液的组织芯片(北京中杉金桥生物科技有限公司,ZLI-9029)作为阴性对照,4 °C 过夜。滴加通用型二抗(北京中杉金桥生物科技有限公司)至组织芯片中并室温反应 2 h,滴加 DAB 显色液,苏木素溶液复染,氨水分化后脱水,滴加中性树胶封片,置于光学显微镜下对染色结果进行评分。

1.2.2 免疫组织化学染色结果判读 由 2 名病理医师随机选择至少 5 个高倍视野评价 SCAMP2 染色情况,选取的高倍视野染色情况存在差异时则以占比多的染色结果为准,2 位医师结果不同时由第三名病理医师重新进行评分。SCAMP2 阳性评定标准为细胞核或细胞浆染色为棕黄色。染色强度评分标准:0 分为无着色,1 分为淡黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色。以染色强度 ≥ 2 分为 SCAMP2 高表达,以染色强度 < 2 分为 SCAMP2 低表达^[6]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计学处理。SCAMP2 在 CRC 组织与癌旁正常组织中的表达评分比较采用 *t* 检验,与临床病理特征的关系分析采用 Pearson χ^2 检验;生存分析采用 Log rank 检验以及 Kaplan-Meier 法,采用 Graphpad Prism 7 软件绘制生存曲线。以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

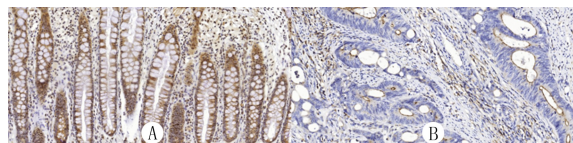
2.1 两种组织中 SCAMP2 表达水平比较

免疫组织化学染色结果显示,SCAMP2 在癌旁正常组织中呈高表达,在 CRC 组织中呈低表达(图 1)。309 例 CRC 组织中 SCAMP2 高表达者 120 例,低表达者 189 例;309 例癌旁正常组织样本中 SCAMP2 呈高表达者 232 例,低表达者 77 例,CRC 组织及癌旁正常组织中 SCAMP2 的表达水平差异具有显著性(*t* = 5.042, *P* < 0.05)。

2.2 SCAMP2 与 CRC 患者临床病理特征的关系

SCAMP2 表达水平与患者肿瘤大小、MSI 有关(χ^2 = 6.953、4.923, *P* < 0.05),而与年龄、性别、分化

程度、淋巴结是否有转移、TNM 分期、浸润程度、KRAS 及 NRAS 突变情况无相关性(*P* > 0.05)。见表 1。



A: 癌旁正常组织, B: CRC 组织, 200 倍

图 1 SCAMP2 在癌旁正常组织和 CRC 组织中的表达

表 1 SCAMP2 表达水平与患者临床病理特征的关系[例]

临床病理特征	<i>n</i>	SCAMP2 低表达(<i>n</i> = 189)	SCAMP2 高表达(<i>n</i> = 120)	χ^2	<i>P</i>
性别					
男	194	116	78		
女	115	73	42	0.413	0.521
年龄					
≤ 60 岁	94	61	33		
> 60 岁	215	128	87	0.791	0.374
分化程度					
高分化	10	6	4		
中分化	240	148	92		
低分化	59	35	24	0.116	0.944
肿瘤大小					
< 6 cm	55	25	30		
≥ 6 cm	254	164	90	6.953	0.008
TNM 分期					
I 组	43	28	15		
II 组	132	77	55		
III 组	122	76	46		
IV 组	12	8	4	0.947	0.814
浸润深度					
T ₁	7	3	4		
T ₂	52	39	13		
T ₃	125	71	54		
T ₄	125	76	49	6.188	0.103
淋巴结转移					
有	129	82	47		
无	180	107	73	0.537	0.464
MSI					
有	38	17	21		
无	271	172	99	4.923	0.027
KRAS					
突变型	141	81	60		
野生型	168	108	60	1.509	0.219
NRAS					
突变型	7	4	3		
野生型	302	185	117	0.049	0.825

2.3 SCAMP2 表达与 CRC 患者预后的关系

依据 SCAMP2 在 CRC 组织中的表达水平情况,将所有患者分为 SCAMP2 高表达组 120 例和 SCAMP2 低表达组 189 例,Kaplan-Meier 生存分析显示,SCAMP2 高表达组与低表达组患者的总体生

存期分别为(91.481±3.634)、(81.312±2.145)月; SCAMP2 高表达组与低表达组患者的无病生存期分别为(34.792±0.708)、(35.860±0.487)月,两组患者的上述两个指标比较,差异均无显著统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

CRC 是临床上常见的恶性肿瘤,多由腺瘤发展而来^[7-9]。尽管诊断、治疗 CRC 的技术不断提高,但部分患者的治疗效果仍不理想,常规治疗难以改善患者预后^[10-13]。因此探索 CRC 发生发展的分子机制,寻找相关的分子标记物在临床上具有重要意义。SCAMPs 家族共享四个疏水跨膜结构域(TMD1~4),N 端由 TMD1 连接,高度保守的亲水性 E 肽序列的两端为 TMD2 与 TMD3^[14]。SCAMPs 蛋白主要参与细胞膜转运、内吞作用以及囊泡循环^[15-17]。最近有研究显示,SCAMP 家族的表达水平及其变化会影响肿瘤的发生发展。YANG 等^[18]研究表明 SCAMP1 可以促进胆囊癌与胰腺癌细胞迁移与侵袭。VENUGOPALAN 等^[19]研究显示,SCAMP3 或可作为肺腺癌进展的负性调节因子。GE 等^[20]研究表明,原发性胶质瘤 SCAMP4 的低表达与患者的良好预后显著相关,提示 SCAMP4 是肿瘤潜在的癌基因。MAO 等^[4]研究表明,SCAMP1、SCAMP5 在胰腺癌中高表达,且具有作为诊断、预后因子的潜在临床价值。上述研究提示,SCAMP 家族蛋白在调节肿瘤的增殖、转移等恶性表型方面发挥重要作用,但 SCAMP2 作为 SCAMP 家族中的关键蛋白在肿瘤中的研究较少,其作用机制也尚不明确。本研究通过免疫组织化学法检测 SCAMP2 在 CRC 中的表达水平,探讨其与 CRC 发生发展的关系。

SCAMP2 的结构主要为 4 个高度保守的跨膜区域以及多个 N 端 NPF 重复的序列,EH 结构域蛋白与 NPF 相互作用,进行囊泡的转运^[15]。BLONDEAU 等^[21]研究发现 SCAMPs 与参与物质运输的网格蛋白共定位,提示 SCAMP2 同样参与了细胞内物质转运过程。本研究的免疫组织化学染色结果显示,SCAMP2 在细胞质以及细胞间质中均有分布,这可能与其转运功能相关;同时病理特征分析结果表明 SCAMP2 的表达与肿瘤体积具有相关性,SCAMP2 在 CRC 中低表达,且 SCAMP2 低表达患者肿瘤体积较大,提示 SCAMP2 可能与 CRC 的发生有关系,但还需进一步明确其在 CRC 中的具体作用机制。本研究显示 SCAMP2 的表达水平与患者

的年龄、性别、淋巴结转移情况以及肿瘤分化程度、TNM 分期、浸润程度、KRAS 和 NRAS 突变情况无明显相关性,分析原因可能与本研究选用的标本全为 CRC 与癌旁正常组织,因此制作成的组织芯片中阳性细胞占比为 100%。可见仅仅以染色强度作为唯一标准进行评价,SCAMP2 表达水平与淋巴结转移、肿瘤 TNM 分期等指标没有表现出明显的相关性。

中国 CRC 诊疗规范推荐将 MSI 以及 KRAS、NRAS 基因的筛查结果作为临床上 CRC 复发、转移和免疫用药等的参考依据,因此,研究 SCAMP2 表达水平与 MSI、KRAS 和 NRAS 基因间的关系,探讨 SCAMP2 的表达水平能否作为 CRC 复发以及用药的参考依据,还是具有比较重要的临床实际意义^[22]。微卫星高度不稳定多发于 Lynch 综合征患者,并且是 CRC II 期患者预后良好的指标及氟尿嘧啶耐药的靶点^[23]。本研究结果显示 SCAMP2 在 CRC 组织中高表达与存在 MSI 有关系,因此推测 SCAMP2 也可能是检测 Lynch 综合征的指标以及氟尿嘧啶化疗耐药的靶点。YUE 等^[5]研究发现,与健康人群相比较,急性髓系白血病患者的外周血中 SCAMP2 mRNA 的表达水平相对较高,且急性髓系白血病患者预后不良与 SCAMP2 mRNA 的高水平表达相关,提示 SCAMP2 是急性髓系白血病的潜在致病基因。MAO 等^[4]研究还发现,SCAMP1~SCAMP4 在胰腺癌组织中的表达高于正常组织,但 SCAMP2 高表达与胰腺癌患者预后不良无关,这与本研究中 SCAMP2 在 CRC 组织中低表达结论相反,由此推测 SCAMP2 在不同组织器官中的表达水平可能与组织的生物学特性有关,即使是同一种蛋白在不同肿瘤组织的功能也会不同,如 SCAMP3 在肺腺癌组织中低表达,发挥抑癌因子的作用;而在胰腺癌组织中高表达,发挥促癌因子的作用。

综上所述,SCAMP2 在 CRC 组织中低表达,可能与 CRC 的发生发展具有相关性,其高表达可能与 CRC 肿瘤大小、MSI 有关。但 SCAMP2 在 CRC 中发挥作用的分子机制还需进一步探讨,SCAMP2 能否作为早期诊断 CRC 的生物标志物尚待明确。

伦理批准和知情同意:本研究涉及的所有试验均已通过青岛大学附属医院医学伦理委员会的审核批准(文件号 QYFYWZLL27662)。所有试验过程均遵照《全国临床检验操作规程》的条例进行。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

作者声明:乔业华、郭栋、王璐、曲婷婷参与了研究设计;乔业华、张翔雁、邢晓明参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表

该论文。所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021,71(3):209-249.
- [2] CASTLE A, CASTLE D. Ubiquitously expressed secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) 1-4 mark different pathways and exhibit limited constitutive trafficking to and from the cell surface[J]. *J Cell Sci*, 2005,118(Pt 16):3769-3780.
- [3] GUO Z H, LIU L X, CAFISO D, et al. Perturbation of a very late step of regulated exocytosis by a secretory carrier membrane protein (SCAMP2)-derived peptide[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(38):35357-35363.
- [4] MAO F Y, DUAN H, ALLAMYRADOV A, et al. Expression and prognostic analyses of SCAMPs in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021,13(3):4096-4114.
- [5] YUE C, XIE S T, ZHONG J Y, et al. SCAMP2/5 as diagnostic and prognostic markers for acute myeloid leukemia[J]. *Sci Rep*, 2021,11(1):17012.
- [6] LUO Y G, WANG L L, RAN W W, et al. Overexpression of SAPCD2 correlates with proliferation and invasion of colorectal carcinoma cells[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20:43.
- [7] THE LANCET. Toward better control of colorectal cancer[J]. *Lancet*, 2014,383(9927):1437.
- [8] XI Y, XU P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040[J]. *Transl Oncol*, 2021,14(10):101174.
- [9] ELANGOVA A, SKEANS J, LANDSMAN M, et al. Colorectal cancer, age, and obesity-related comorbidities: A large database study[J]. *Dig Dis Sci*, 2021, 66(9):3156-3163.
- [10] ISLAM M R, AKASH S, RAHMAN M M, et al. Colon cancer and colorectal cancer: Prevention and treatment by potential natural products[J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 368:110170.
- [11] HU L F, LAN H R, HUANG D, et al. Personalized immunotherapy in colorectal cancers: Where do we stand? [J]. *Front Oncol*, 2021,11:769305.
- [12] WEINBERG B A, MARSHALL J L, SALEM M E. The growing challenge of young adults with colorectal cancer[J]. *Oncology (Williston Park)*, 2017,31(5):381-389.
- [13] OBUCH J C, AHNEN D J. Colorectal cancer: Genetics is changing everything[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2016, 45(3):459-476.
- [14] LAW A H Y, CHOW C M, JIANG L W. Secretory carrier membrane proteins[J]. *Protoplasma*, 2012, 249(2):269-283.
- [15] BRAND S H, CASTLE J D. SCAMP 37, a new marker within the general cell surface recycling system[J]. *EMBO J*, 1993, 12(10):3753-3761.
- [16] TOYOOKA K, MATSUOKA K. Exo- and endocytotic trafficking of SCAMP2[J]. *Plant Signal Behav*, 2009,4(12):1196-1198.
- [17] NOBLE A, STAGG S. COPI gets a fancy new coat[J]. *Science*, 2015,349(6244):142-3.
- [18] YANG S, LEE K T, LEE J Y, et al. Inhibition of SCAMP1 suppresses cell migration and invasion in human pancreatic and gallbladder cancer cells[J]. *Tumour Biol*, 2013,34(5):2731-2739.
- [19] VENUGOPALAN A, LYNNBERG M, CULTRARO C M, et al. SCAMP3 is a mutant EGFR phosphorylation target and a tumor suppressor in lung adenocarcinoma [J]. *Oncogene*, 2021,40(18):3331-3346.
- [20] GE X Q, WANG Z H, JIANG R, et al. SCAMP4 is a novel prognostic marker and correlated with the tumor progression and immune infiltration in glioma[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2021,139:106054.
- [21] BLONDEAU F, RITTER B, ALLAIRE P D, et al. Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004,101(11):3833-3838.
- [22] 顾艳宏,姜争,李健,等. 结直肠癌靶向治疗中国专家共识[J]. *中华普通外科学文献(电子版)*, 2023,17(1):1-8.
- [23] DIENSTMANN R, MASON M J, SINICROPE F A, et al. Prediction of overall survival in stage II and III colon cancer beyond TNM system: A retrospective, pooled biomarker study[J]. *Ann Oncol*, 2017,28(5):1023-1031.

(本文编辑 耿波 厉建强)

(上接第 240 页)

- [19] EBERL S, KOERS L, VAN HOOFT J, et al. The effectiveness of a low-dose esketamine versus an alfentanil adjunct to propofol sedation during endoscopic retrograde cholangiopancreatography: A randomised controlled multicentre trial[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2020,37(5):394-401.
- [20] GREER J J, SMITH J C, FELDMAN J L. Role of excitatory amino acids in the generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat[J]. *J Physiol*, 1991,437:727-749.
- [21] FUNK G D, SMITH J C, FELDMAN J L. Generation and transmission of respiratory oscillations in medullary slices: Role of excitatory amino acids[J]. *J Neurophysiol*, 1993,70(4):1497-1515.
- [22] JONKMAN K, VAN RIJNSOEVEER E, OLOFSEN E, et al. Esketamine counters opioid-induced respiratory depression[J]. *Br J Anaesth*, 2018,120(5):1117-1127.
- [23] GAO S H, GAO X Z, WU Z N, et al. Process for (S)-ketamine and (S)-norketamine via resolution combined with racemization[J]. *J Org Chem*, 2020,85(13):8656-8664.
- [24] LUNDY P M. Mechanism of action of ketamine[J]. *Br J Anaesth*, 1980,52(6):638.
- [25] 吴娜,王昭敏,储惠君,等. 苯磺酸瑞马唑仑对宫腔镜手术患者麻醉苏醒质量和认知功能的影响[J]. *精准医学杂志*, 2022, 37(1):75-79.

(本文编辑 耿波 厉建强)