

SNAP29 调节胃癌细胞顺铂耐药性的研究

张佳佳 喻鑫 周波 刘弋

摘要 目的 检测 SNAP29 对胃癌细胞顺铂耐药性的影响, 比较 SNAP29 在胃癌组织和正常胃组织中的表达差异, 分析胃癌患者中 SNAP29 的病理学意义。方法 Western blot 实验检测细胞 SNAP29 蛋白表达, MTT 实验和细胞软琼脂克隆形成实验分别检测细胞活力和细胞克隆形成能力, 评价 SNAP29 过表达对胃癌细胞顺铂敏感性的影响; 免疫组织化学实验检测胃癌组织和正常胃组织中 SNAP29 蛋白表达, 分析 SNAP29 蛋白表达与胃癌患者病理学参数的相关性。结果 MTT 实验和细胞软琼脂克隆形成实验表明 SNAP29 过表达促进胃癌细胞 MKN-45 和 AGS 对顺铂的耐受; SNAP29 在胃癌组织和正常胃组织中的蛋白表达水平无显著差异; 胃癌组织中 SNAP29 的表达水平与患者的淋巴结转移和肿瘤分期有相关性, 而与患者的年龄、性别、肿瘤大小和肿瘤分级无相关性。结论 SNAP29 过表达促进胃癌细胞对顺铂的耐受, SNAP29 阳性表达与胃癌患者淋巴结转移和肿瘤分期具有相关性, SNAP29 检测在胃癌的诊断和治疗中具有一定意义。

关键词 胃癌; SNAP29; 顺铂; 耐药

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)08-1189-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.008

胃癌是消化系统常见恶性肿瘤之一, 晚期胃癌预后较差。当前对于胃癌主要的治疗手段包括外科手术、放射治疗、化学药物治疗及靶向治疗。由于当前针对胃癌的靶向治疗药物较少, 化学药物治疗仍然是晚期胃癌的重要治疗手段。顺铂是胃癌治疗的常用化疗药物, 但药物耐受是亟待解决的重要问题^[1-3]。该研究旨在检测 SNAP29 基因对胃癌细胞顺铂耐药性的作用, 进一步分析 SNAP29 在胃癌患者中临床病理学意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料

本课题收集了安徽医科大学第一

2020-04-17 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1708085QH199)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院普外科(胃肠外科), 合肥 230022

作者简介: 张佳佳, 男, 主治医师;

刘弋, 男, 教授, 博士生导师, 主任医师, 责任作者, E-mail: yuxinweike@126.com

附属医院 2017~2019 年手术切除的患者石蜡组织标本, 包括 50 例胃癌组织标本和 50 例正常胃组织标本, 同时收集了胃癌患者的临床病理学参数, 包括患者的年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤淋巴结转移情况、肿瘤的分级和分期。患者对实验的开展知情同意。

1.2 细胞培养 实验中涉及的胃癌细胞系 MKN-45 和 AGS 均来源 ATCC (American Type Culture Collection), 均根据推荐条件在 37 °C 恒温 5% CO₂ 培养箱中进行培养, 实验时选取处于对数生长期的细胞进行实验。

1.3 质粒合成和转染 实验选取哺乳动物表达载体 pIRESneo3 (Invitrogen) 来构建 SNAP29 的过表达质粒。SNAP29 的编码序列(GenBank 识别码: NM_004782.4) 克隆进 pIRESneo3 质粒, 被命名为 pIRESneo3-SNAP29。质粒转染实验使用 lip2000 (QIAGEN) 转染试剂, 按照说明书推荐的条件进行, 参考文献操作^[4]。

1.4 Western blot Western blot 参考文献操作^[4]。对转染后的细胞进行收集, 使用细胞裂解液(Cell Signaling) 裂解细胞并提取蛋白。提取的蛋白使用 BCA Protein Assay kit (Pierce) 试剂测定浓度。Western blot 实验过程包括电泳、转膜、封闭、抗体孵育、酶标二抗孵育、显影过程。实验中主要的抗体包括兔 SNAP29 多克隆抗体(1:1 000, 12704-I-AP) 和鼠 β-actin 单克隆抗体(1:10 000, 66009-I-Ig) (美国芝加哥 Proteintech 集团有限公司)。β-Actin 作为内参。

1.5 MTT 实验 MTT 实验参考文献操作^[4]。具体过程如下: 已转染的细胞 24 h 后消化打散成单细胞计数, 种植于 96 孔细胞培养板中, 每孔种植细胞 5 000 个, 同组细胞种植 3 孔, 细胞培养 24 h 后相应加入 0.3、6 mg/L 顺铂处理, 48 h 后进行 MTT 实验检测, 测定 570 nm 的吸光度。

1.6 软琼脂克隆形成实验 软琼脂克隆形成实验用于检测细胞克隆形成。具体过程是在 6 孔细胞培养板中铺设含 0.5% 琼脂糖的 1640 培养基(1.5 ml), 凝固成下层胶, 已转染的细胞 24 h 后消化打散成单细胞后计数, 取相应数目的细胞加入含 0.35%

琼脂糖的 1640 培养基 种植于 6 孔板下层胶上,每孔对应 5 000 个细胞,1.5 ml 培养基,室温凝固后,上层加入 2 ml 的 1640 完全培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素链霉素双抗)。细胞种植 48 h 后相应加入 0、6 mg/L 顺铂处理 48 h 细胞再培养 4 d 后检测克隆形成。每组重复 3 孔 进行统计分析。

1.7 免疫组织化学实验 免疫组织化学实验参考文献操作^[4]。具体过程包括石蜡组织切片的脱蜡、抗原修复、内源性过氧化物酶阻断、抗体孵育、辣根过氧化物酶标二抗孵育、DAB 显色、苏木精复染、切片脱水封片等过程。实验使用迈新生物公司的 Envision 法免疫组织化学检测试剂盒和兔 SNAP29 多克隆抗体(1:200,12704-1-AP 美国芝加哥 Proteintech 集团有限公司)。SNAP29 为胞质表达 在组织中细胞表达比例 ≥15% 被定义为 SNAP29 阳性, <15% 被定义为 SNAP29 阴性。

1.8 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行分析。本课题实验均独立重复 3 次,结果取平均值。MTT 实验和软琼脂克隆形成实验结果使用 *t* 检验进行统计学分析。SNAP29 表达水平与胃癌患者临床病理学参数相关性分析使用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在胃癌细胞 MKN-45 中过表达 SNAP29 检测细胞对顺铂的敏感性 在本研究中构建了 SNAP29 过表达质粒 pIREsneo3-SNAP29,转染 MKN-45 胃癌细胞系,记为 MKN-45 SNAP29;对照 pIREsneo3 空质粒转染的 MKN-45 细胞系被记为 MKN-45 Vec。Western blot 实验显示 MKN-45 SNAP29 细胞中 SNAP29 蛋白表达水平高于 MKN-45 Vec 细胞(图 1A)。MTT 实验表明,MKN-45 SNAP29 和 MKN-45 Vec 细胞在不加顺铂情况下的细胞活力没有显著差异 顺铂可以抑制 MKN-45 SNAP29 和 MKN-45 Vec 细胞的细胞活力;在加入 3 和 6 mg/L 顺铂情况下,MKN-45 SNAP29 细胞的细胞活力高于 MKN-45 Vec 细胞($P < 0.05$) (图 1B)。进一步细胞软琼脂克隆形成实验显示 MKN-45 SNAP29 和 MKN-45 Vec 细胞的克隆形成率无显著差异,顺铂抑制 MKN-45 SNAP29 和 MKN-45 Vec 细胞的克隆形成,但是在 6 mg/L 顺铂处理后,MKN-45 SNAP29 细胞的克隆形成率高于 MKN-45 Vec 细胞($P = 0.0083$) (图 1C、D)。

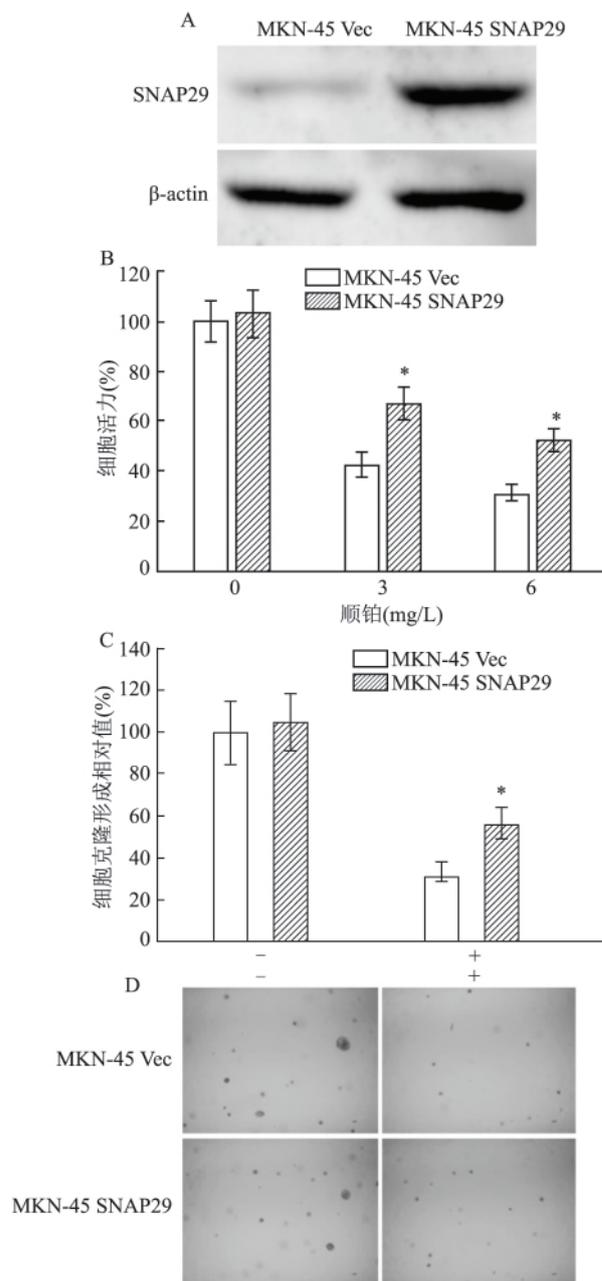


图 1 在胃癌细胞 MKN-45 中过表达 SNAP29 检测细胞对顺铂的敏感性

A: Western blot 实验检测 SNAP29 蛋白表达; B: MTT 实验检测细胞在 0、3、6 mg/L 顺铂处理 48 h 后的细胞活力; C: 软琼脂克隆形成实验; - 代表不加顺铂, + 代表加 6 mg/L 顺铂; 与同组 MKN-45 Vec 细胞比较: * $P < 0.05$; D: 软琼脂克隆形成实验图片 ×100

2.2 在胃癌细胞 AGS 中过表达 SNAP29 检测细胞对顺铂的敏感性 AGS 细胞转染 SNAP29 过表达质粒及对照空质粒,分别记为 AGS SNAP29 和 AGS Vec。Western blot 实验显示 AGS SNAP29 细胞中 SNAP29 蛋白表达水平高于 AGS Vec 细胞(图 2A)。与 MKN-45 细胞系相似,AGS SNAP29 和 AGS Vec

细胞在不加顺铂情况下的 MTT 细胞活力无显著差异,在加入 3 和 6 mg/L 顺铂后,AGS SNAP29 和 AGS Vec 细胞的细胞活力均下降,但 AGS SNAP29 细胞的细胞活力高于 AGS Vec 细胞($P < 0.05$) (图 2B)。细胞软琼脂克隆形成实验显示,在 6 mg/L 顺铂处理情况下,SNAP29 过表达的 AGS 细胞软琼脂克隆形成率高于对照细胞($P = 0.0127$) (图 2C、D)。

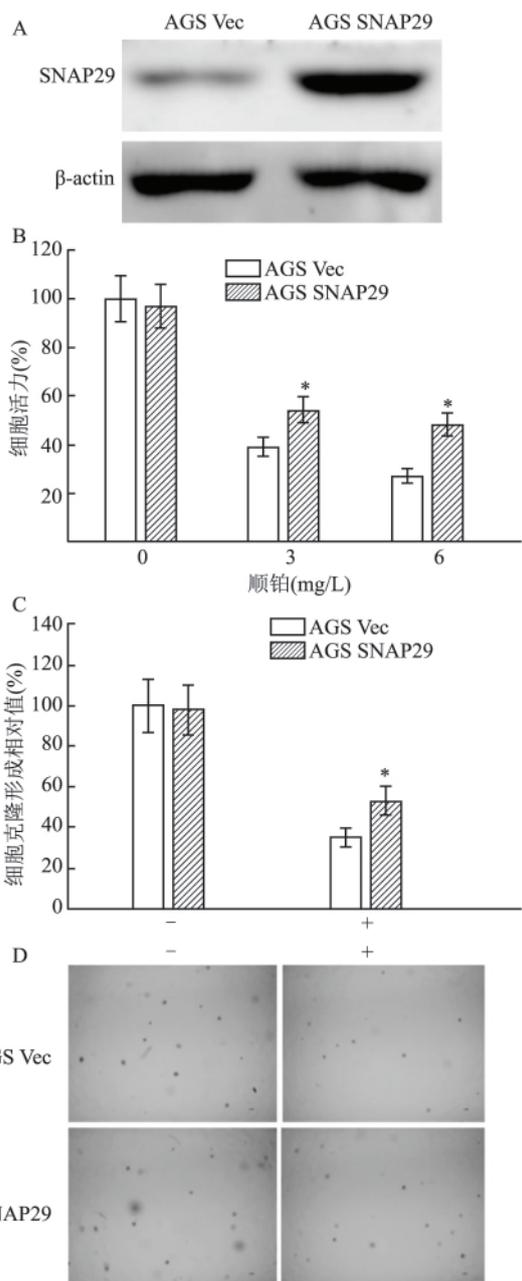


图2 在胃癌细胞 AGS 中过表达 SNAP29 检测细胞对顺铂的敏感性
A: Western blot 实验检测 SNAP29 蛋白表达; B: MTT 实验检测细胞在 0、3、6 mg/L 顺铂处理 48 h 后的细胞活力; C: 软琼脂克隆形成实验; - 代表不加顺铂, + 代表加 6 mg/L 顺铂; 与同组 AGS Vec 细胞比较; * $P < 0.05$; D: 软琼脂克隆形成实验图片 $\times 100$

2.3 胃癌组织 SNAP29 的表达及其临床病理学参数相关性分析 本课题组通过免疫组织化学实验检测了 50 例胃癌组织标本和 50 例正常胃组织标本中 SNAP29 的蛋白表达,结果显示在胃癌组织中 SNAP29 的阳性表达率是 66.0%,在正常胃组织中 SNAP29 的阳性表达率是 62.0%,两者差异无统计学意义($P > 0.05$) (表 1、图 3)。同时,本课题组收集了 50 例胃癌组织标本对应的患者临床病理学参数(包括患者的年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤淋巴结转移情况、肿瘤的分级和分期),进一步对 SNAP29 表达情况与这些病理学参数进行了相关性分析(表 2)。在胃癌患者中,SNAP29 阳性表达与胃癌患者的肿瘤淋巴结转移($P = 0.042$)和肿瘤分期($P = 0.023$)具有相关性,而与胃癌患者的年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤分级无相关性($P > 0.05$)。

表 1 SNAP29 在胃癌和正常组织中的表达

组别	n	SNAP29 表达情况 [n(%)]	
		阴性	阳性
胃癌组织	50	17 (34.0)	33 (66.0)
正常组织	50	19 (38.0)	31 (62.0)

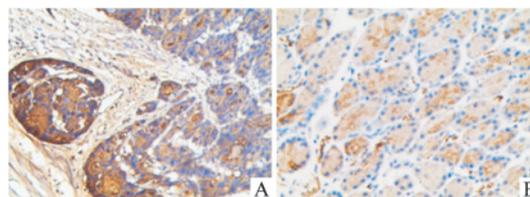


图 3 SNAP29 在胃癌组织和正常组织中的表达 $\times 200$
A: 胃癌组织; B: 正常组织

表 2 SNAP29 表达与胃癌患者临床病理参数相关性分析 [n(%)]

参数	n	SNAP29 阳性表达	χ^2 值	P 值
年龄 (岁)				
≤ 60	18	12 (66.7)	0.006	0.941
> 60	32	21 (65.6)		
性别				
男	28	18 (64.3)	0.083	0.773
女	22	15 (68.2)		
肿瘤大小 (cm)				
≤ 5	27	18 (66.7)	0.012	0.914
> 5	23	15 (65.2)		
淋巴结转移				
无	17	8 (47.1)	4.118	0.042
有	33	25 (75.8)		
分级				
I	5	2 (40.0)	2.273	0.321
II	25	16 (64.0)		
III	20	15 (75.0)		
分期				
I + II	16	7 (43.8)	5.191	0.023
III + IV	34	26 (76.5)		

3 讨论

胃癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤,早期胃癌预后相对较好,晚期胃癌治疗手段有限,预后较差。外科手术、辅助化疗或放疗是当前胃癌治疗的主要方式。针对胃癌常用靶向药物当前仅有曲妥单抗,它对 HER2 基因扩增的胃癌患者疗效较好,但 HER2 基因扩增在胃癌中的比例仅仅 10% ~ 15%^[2-3,5]。顺铂是胃癌常用化疗药物之一,对晚期胃癌的治疗具有一定效果,但是长期用药后患者往往产生获得性药物耐受。针对胃癌的顺铂耐药,许多分子机制参与其中: Zhu et al^[6]报道了 miR-187 靶向调控 TGF- β /Smad 信号通路参与调控胃癌细胞顺铂耐药; SLFN11 的甲基化作用促进胃癌细胞的顺铂耐药性^[7]; METase/lncRNA HULC/FoxM1 信号通路通过抑制细胞自噬从而降低胃癌顺铂耐药性^[8]。关于胃癌顺铂耐药的相关研究不胜枚举,其相关机制复杂多样,更进一步的研究迫切而必要。本研究首次报道 SNAP29 参与促进胃癌细胞对顺铂的耐药,同时进一步揭示了 SNAP29 在胃癌患者中的病理学意义。

SNAP29 属于突触体相关蛋白(SNAP)家族成员,参与 SNARE(可溶性 NSF 附着受体)蛋白(SNARES)生物学功能。SNAP 家族包括 SNAP25、SNAP23 和 SNAP29,前两种蛋白分别是膜相关蛋白,控制突触传递,参与广泛的非神经元膜融合过程; SNAP29 仅短暂的与膜结合,它包含一个酸性 NPF 基序,介导与内吞因子的结合^[9]。许多研究^[9-13]表明 SNAP29 在信号转导、细胞运动、细胞分裂、自噬和突触传递等过程中均发挥重要作用。Mastrodonato et al^[10]预测 SNAP29 可能在肿瘤发生发展以及神经退行性变中发挥重要作用。但目前为止,关于 SNAP29 在人体肿瘤中研究的报道十分有限,关于 SNAP29 在人体胃癌中的功能仍然是未知的。本课题在胃癌细胞 MKN-45 和 AGS 中转染 SNAP29 过表达质粒,通过 MTT 实验和细胞软琼脂克隆形成实验研究 SNAP29 对细胞功能的作用。从图 1 和图 2 的结果来看,SNAP29 的过表达对 MKN-45 和 AGS 细胞的细胞活力和细胞克隆形成能力均无显著作用,因此可以推断 SNAP29 对胃癌细胞的增殖能力并没有显著影响。

本课题在两种胃癌细胞系 MKN-45 和 AGS 中,通过 MTT 实验和细胞软琼脂克隆形成实验两种实验方法证明了 SNAP29 的过表达能够促进胃癌细胞

对顺铂的耐药性。但限于实验条件限制,本课题没有揭示出 SNAP29 促进胃癌顺铂耐药的下游分子机制,这是下一步工作应该致力的方向。根据先前报道,SNAP29 参与调控细胞自噬过程,SNAP29 参与形成自噬体上的 Syx17-Snap29 复合物,是启动复合体与溶酶体上的 Vamp8 融合的关键^[9,13-14]。因此在胃癌细胞中 SNAP29 很可能参与促进细胞自噬,从而介导了促进顺铂耐药的函数。Zhou et al^[15]发现 OGT 的下调可以抑制 SNAP29 的 O-GlcNAc 修饰作用,从而促进了 SNAP29-Stx17-VAMP8 复合物的形成和细胞自噬过程,该机制促进了卵巢癌对于顺铂的耐药性。因此 SNAP29 在胃癌中促进顺铂耐药很可能是通过促进细胞自噬介导的,该具体机制在后续工作中将继续研究。

本课题检测了 SNAP29 在胃癌组织和正常胃组织中的蛋白水平,二者无显著差异。SNAP29 在正常胃组织中的阳性率高达 62.0%,这表明 SNAP29 在正常组织中也是发挥重要功能的。据报道^[9-13] SNAP29 参与细胞的信号转导、运动、有丝分裂、自噬和突触传递等过程,因此在胃组织中 SNAP29 很可能也参与了细胞的相关生理过程,但其具体作用仍是未知的,也是后续工作需要进一步研究的方向。胃癌患者病理学参数相关性分析结果显示,SNAP29 与胃癌患者的年龄、性别、肿瘤大小和肿瘤分级无相关性,该结果证明了 SNAP29 在胃癌患者中的表达没有年龄和性别倾向,与肿瘤的增殖和生长非显著相关; SNAP29 与胃癌患者的淋巴结转移和肿瘤分期具有相关性,该结果证明 SNAP29 可能对胃癌的转移具有一定促进功能。总体而言,SNAP29 的高表达与胃癌患者的不良病理特征密切相关,在临床上具有一定意义。

总之,本课题首次报道了 SNAP29 在人体胃癌中的功能,明确了 SNAP29 在胃癌患者中的病理学意义。该研究对于进一步了解 SNAP29 的生理学功能,胃癌顺铂耐药机制具有一定意义,也为胃癌研究和治疗提供了新的靶标。

参考文献

- [1] Peng C, Li X, Yu Y, et al. LncRNA GASLI inhibits tumor growth in gastric carcinoma by inactivating the Wnt/ β catenin signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(5): 4039-45.
- [2] Zhang J, Jiang W, Zhang Q, et al. Long noncoding RNA STCAT16 suppresses cell growth and its expression predicts prognosis in patients with gastric cancer [J]. *Mol Med Rep* 2019, 19(6): 4613-22.

- [3] Zhai J , Shen J , Xie G , et al. Cancer-associated fibroblasts-derived IL-8 mediates resistance to cisplatin in human gastric cancer [J]. *Cancer Lett* 2019 , 454: 37 - 43.
- [4] Ding K , Tan S , Huang X , et al. GSE1 predicts poor survival outcome in gastric cancer patients by SLC7A5 enhancement of tumor growth and metastasis [J]. *J Biol Chem* 2018 , 293(11) : 3949 - 64.
- [5] Gravalos C , Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target [J]. *Ann Oncol* , 2008 , 19 (9) : 1523 - 9.
- [6] Zhu Q , Li Z , Lv C , et al. MiR-187 influences cisplatin-resistance of gastric cancer cells through regulating the TGF- β /Smad signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* , 2019 , 23(22) : 9907 - 14.
- [7] Peng Y , Wang L , Wu L , et al. Methylation of SLFN11 promotes gastric cancer growth and increases gastric cancer cell resistance to cisplatin [J]. *J Cancer* , 2019 , 10(24) : 6124 - 34.
- [8] Xin L , Zhou Q , Yuan Y , et al. METase/lncRNA HULC/FoxM1 reduced cisplatin resistance in gastric cancer by suppressing autophagy [J]. *J Cancer Res Clin Oncol* , 2019 , 145(10) : 2507 - 17.
- [9] Morelli E , Mastrodonato V , Beznoussenko G , et al. An essential step of kinetochore formation controlled by the SNARE protein SNAP29 [J]. *EMBO J* , 2016 , 35(20) : 2223 - 37.
- [10] Mastrodonato V , Morelli E , Vaccari T. How to use a multipurpose SNARE: the emerging role of SNAP29 in cellular health [J]. *Cell Stress* , 2018 , 2(4) : 72 - 81.
- [11] Dodson M , Liu P , Jiang T , et al. Increased O-GlcNAcylation of SNAP29 drives arsenic-induced autophagic dysfunction [J]. *Mol Cell Biol* , 2018 , 38(11) : e00595 - 17.
- [12] Rotem-Yehudar R , Galperin E , Horowitz M. Association of insulin-like growth factor 1 receptor with EHD1 and SNAP29 [J]. *J Biol Chem* , 2001 , 276(35) : 33054 - 60.
- [13] Morelli E , Ginefra P , Mastrodonato V , et al. Multiple functions of the SNARE protein Snap29 in autophagy , endocytic , and exocytic trafficking during epithelial formation in *r* , *Drosophila* [J]. *Autophagy* , 2014 , 10(12) : 2251 - 68.
- [14] Diao J , Liu R , Rong Y , et al. ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes [J]. *Nature* , 2015 , 520(7548) : 563 - 6.
- [15] Zhou F , Yang X , Zhao H , et al. Down-regulation of OGT promotes cisplatin resistance by inducing autophagy in ovarian cancer [J]. *Theranostics* 2018 , 8(19) : 5200 - 12.

Study on the regulation of cisplatin resistance in gastric cancer cells by SNAP29

Zhang Jiajia , Yu Xin , Zhou Bo , et al

(Dept of Gastrointestinal Surgery , Dept of General Surgery ,
The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

Abstract Objective To examine the effect of SNAP29 on Cisplatin resistance of gastric cancer cells , compare the expression of SNAP29 in gastric cancer and normal gastric tissues and analyze the clinicopathological significance of SNAP29 in gastric cancer patients. **Methods** Western blot was used to detect the SNAP29 protein levels in cell lines. MTT assay and soft agar colony formation assay were performed to detect cell viability and cell colony formation respectively , and for further examine the overexpression of SNAP29 to promote Cisplatin resistance in gastric cancer cells. Immunohistochemistry was carried out to detect the expression of SNAP29 protein in gastric cancer and normal gastric tissues , and to analyze the correlation between SNAP29 levels and pathological parameters in gastric cancer patients. **Results** MTT and soft agar colony formation assays showed that the overexpression of SNAP29 promoted Cisplatin resistance in gastric cancer cells MKN-45 and AGS; there was no significant difference of SNAP29 protein levels in gastric cancer and normal gastric tissue; the expression levels of SNAP29 were correlated with lymph node metastasis and tumor stage in gastric cancer patients , but not with patients' age , gender , tumor size or tumor grade. **Conclusion** Overexpression of SNAP29 promotes Cisplatin resistance in human gastric cancer cells. The expression levels of SNAP29 are positively correlated with lymph node metastasis and tumor stage in gastric cancer patients. Therefore , SNAP29 is an important biomarker for diagnosis and treatment in gastric cancer.

Key words gastric cancer; SNAP29; cisplatin; drug resistance