

肝细胞癌转移相关蛋白的iTRAQ定量蛋白质组学研究

高萍萍^{1,2} 陈宁² 孙薇^{1,2*}

(¹安徽医科大学研究生学院, 合肥 230032; ²军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京蛋白质组研究中心, 蛋白质组国家重点实验室, 北京 102206)

摘要 该研究对不同转移能力的人肝癌细胞系全细胞蛋白进行差异蛋白质组分析, 以期发现与肝癌转移相关的候选分子。选择具有高、低转移能力的人肝癌细胞系HCCLM6和MHCC97H为研究材料, 提取细胞全蛋白, FASP酶切、iTRAQ标记后进行质谱鉴定和定量分析, 并利用UniProt数据库和GOfact软件对差异蛋白进行生物信息学分析, 包括亚细胞定位、生物过程和分子功能富集分析。共鉴定了5 033种蛋白质, 其中5 013种蛋白质有定量信息, 发现91种差异蛋白(|ratio|≥1.5, 单样本 t 检验, $P<0.05$), 其中39种蛋白在高转移细胞HCCLM6中上调, 52种下调。差异蛋白的细胞定位主要为细胞质和细胞膜, GO分析显著富集到细胞黏附生物过程和蛋白结合生物功能。该研究建立了高低转移能力的人肝癌细胞系HCCLM6和MHCC97H细胞全蛋白的差异表达谱, 发现了4种新的与肝癌转移相关的候选蛋白(微管蛋白链 β -2B、着丝粒蛋白F、层黏连蛋白亚基 α 5和囊泡相关膜蛋白5), 为进一步研究肝癌转移机制提供了重要的数据参考。

关键词 肝细胞癌; 转移; 蛋白质组; iTRAQ

iTRAQ Quantitative Proteome Analysis of Metastasis-associated Proteins in Hepatocellular Carcinoma

Gao Pingping¹, Chen Ning², Sun Wei^{1,2*}

(¹Graduate School of Anhui Medical University, Hefei 230032, China; ²State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 102206, China)

Abstract In this study, quantitative proteomics analysis was performed on hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines with low and high metastatic potentials for discovery of candidate HCC metastasis-associated proteins. Two HCC cell lines (MHCC97H and HCCLM6), which have the same genetic background but different metastatic potentials, were chosen for analysis. Proteins extracted from cells were analyzed by MS identification after FASP digestion and iTRAQ labeling. Bioinformatics analysis of differentially expressed proteins, including subcellular localization, biology process and molecular function enrichment, were performed using UniProt knowledgebase and GOfact software. A total of 5 033 proteins were identified and 5 013 of which were quantified. There were 91 differentially expressed proteins (|ratio|≥1.5, one sample t test, $P<0.05$), among which 39 proteins were up-regulated and 52 proteins were down-regulated in HCCLM6. Most of the differentially expressed proteins were located in cytoplasm and cell membrane. GO analysis suggested that proteins related to cell adhesion and protein

收稿日期: 2015-05-04 接受日期: 2015-06-05

北京市科技计划课题(批准号: Z141100000214014)、蛋白质组学国家重点实验室开放课题(批准号: SKLP-O201309)和北京市科技新星计划(批准号: Z121107002512015)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-80727777-1515, E-mail: sunway21cn@126.com

Received: May 4, 2015 Accepted: June 5, 2015

This work was supported by Beijing Science and Technology Program (Grant No.Z141100000214014), Open Project of State Key Laboratory of Proteomics (Grant No.SKLP-O201309) and Beijing Nova Program (Grant No.Z121107002512015)

*Corresponding author. Tel: +86-10-80727777-1515, E-mail: sunway21cn@126.com

网络出版时间: 2015-07-02 14:41 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150702.1441.006.html>

binding were significantly enriched. This study profiled the proteomes of HCC cell lines with different metastatic potentials and discovered four novel candidate HCC metastasis-associated proteins (tubulin beta-2B chain, centromere protein F, laminin subunit alpha-5, vesicle-associated membrane protein 5), which provided valuable reference for future studies on HCC metastasis.

Keywords hepatocellular carcinoma; metastasis; proteome; iTRAQ

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球发病率第七、死亡率第三的恶性肿瘤。我国每年约有38万人死于肝癌, 约占全世界肝癌死亡人数的51%, 且逐年增加^[1]。肝细胞癌的转移是影响其治疗效果和预后的最大障碍, 是导致其死亡率高的主要原因。肝细胞癌转移的分子机制尚不完全清楚, 目前临床上尚无可用于肝癌复发转移检测的标志物和有效的治疗靶标, 发掘与肝癌转移相关的关键分子尤为紧迫。

血行转移和淋巴转移是肝细胞癌转移的重要方式。人肝癌细胞系MHCC97H和HCCLM6的遗传背景相同, HCCLM6的转移能力高于MHCC97H, 包括更强的血行转移能力以及相对于后者独有的淋巴转移能力^[2]。本研究利用高通量和高灵敏度的iTRAQ(sobaric tags for relative and absolute quantitation)蛋白质组定量技术, 对上述两株细胞系的蛋白表达进行差异分析, 以期发现与肝癌转移相关的重要蛋白质分子群, 为肝癌转移的机制研究提供线索, 为肝癌的转移复发提供可供验证的候选诊断分子和药物靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人肝癌细胞系MHCC97H和HCCLM6购自复旦大学附属中山医院肝癌研究所。HCCLM6转移能力强于MHCC97H, 转移能力比较见表1^[2]。

1.1.2 主要试剂 高糖DMEM培养液和青链霉素购自美国Hyclone公司; 优级胎牛血清购自美国Gibco公司; 碳酸氢铵、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、乙腈(acetonitrile, ACN)、尿素、甲醇、甲酸(formic acid, FA)、碘乙酰胺和Tris HCl购自美国Amresco公司; 质谱级胰酶购自美国Promega公司; iTRAQ[®]试剂盒购自AB Sciex公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和收集 细胞接种后, 在37 °C、5% CO₂条件下培养, 使用10%血清、1%双抗的DMEM培养基, 培养到80%时进行传代。待细胞生长至对数期, 收集细胞, 加UA裂解液(8 mol/L尿素, 0.1 mol/L Tris, pH8.5)提取细胞蛋白, Bradford法蛋白定量。

1.2.2 FASP酶切和iTRAQ标记 分别取90 μg的MHCC97H和HCCLM6全细胞蛋白, 每种细胞做2次重复实验。加DTT至终浓度为0.02 mol/L, 37 °C水浴4 h, 将蛋白溶液移入10 K超滤管中, 加碘乙酰胺至终浓度为0.01 mol/L, 避光反应0.5 h。14 000 ×g离心20 min, 弃掉收集管底部溶液。在管中加入200 μL UA溶液, 14 000 ×g离心20 min, 弃掉收集管底部溶液, 重复上述步骤2次。加入150 μL TEAB溶液(iTRAQ[®]试剂盒中的Dissolution Buffer), 14 000 ×g离心20 min, 弃掉收集管底部溶液, 重复上述步骤3次。更换新的收集管, 在超滤管中加入4 μg胰酶, 补加5倍稀释的TEAB溶液至100 μL, 37 °C水浴酶切过

表1 肝癌细胞系MHCC97H和HCCLM6转移能力比较

Table 1 Comparison of metastatic abilities between MHCC97H and HCCLM6

接种部位 Inoculation sites	转移部位 Metastasis sites	转移率(%) Metastasis rates (%)	
		MHCC97H	HCCLM6
Orthotopic inoculation	Lung	100	100
	Liver	80	100
	Abdominal viscera	10	100
	Lymph node	0	60
Subcutis inoculation	Lung	0	100
	Other sites	0	0
Footpad inoculation	Lymph node	0	75
	Other sites	0	0

夜。14 000 ×g离心20 min, 酶切后的肽段留于收集管底部。加水100 μL, 14 000 ×g离心20 min, 重复上述步骤2次。将管底肽段合并。加50 μL 5倍稀释的TEAB溶液复溶肽段定量。向4管对应MHCC97H、HCCLM6、MHCC97H和HCCLM6的iTRAQ标签(分子量分别为114、115、116和117的标签)中加入5倍体积的异丙醇, 混匀、离心, 分别加入到对应样本中。混匀后室温反应1.5 h, 冻干。

1.2.3 肽段液相分离 用50 μL A相流动相复溶标记好的肽段, 在高压液相色谱仪中进行反相分离。使用C18柱(直径4.6 mm, 长25 cm, 粒径5 μm, 填料孔径100 Å), 流速为0.7 mL/min, A相流动相为2%乙腈、98% Milipore水, pH10; B相流动相为98% ACN、2% Milipore水, pH10。B相梯度如下: 0~15 min 5%, 15~20 min升至8%, 20~50 min升至18%, 50~77 min升至32%, 77~79 min升至95%, 79~83 min升至95%, 83~87 min降至5%。从15 min后每分钟收集一管, 冻干机浓缩后, 把25~87 min的馏分每隔7 min合并在一起, 共合并成8个馏分, 冻干。

1.2.4 LC-MS/MS 将8个馏分的肽段分别上样, 经C18柱(直径75 μm, 长12 cm, 粒径5 μm, 填料孔径100 Å)反相分离, 流速为300 nL/min, A相流动相为0.1% FA、5%乙腈、95% Milipore水, B相流动相为0.1% FA、95% ACN、5% Milipore水。B相梯度如下: 0~8 min升至5%, 8~58 min升至8%, 58~70 min升至22%, 70~71 min升至32%, 71~78 min升至90%。液相分离后进行ORBITRAP FUSION质谱鉴定。质谱全扫描质量范围300~1 400 m/z, 分辨率120 000, 选取一级信号强度最高的20个离子进行二级质谱分析, 二级质谱全扫描质量范围300~1 400 m/z, 动态排除设置为18 s。

1.2.5 数据库检索 使用Proteome Discovery软件(Thermo Fisher, Version 1.3.0.339) Mascot (Version 2.3) 搜索引擎对Uniprot-human 140916人数据库搜库。搜库参数: 最大漏切位点数2, 半胱氨酸脲甲基化固定修饰、蛋氨酸可变氧化修饰、N端乙酰化可变修饰, N末端、赖氨酸、精氨酸iTRAQ 4plex可变修饰。数据过滤标准: Peptide FDR<0.01, Peptide score>10。

1.2.6 定量蛋白质组学和生物信息学分析 利用iTRAQ定量的ratio值(代表HCCLM6/HCC97H表达量比值的4个ratio值的平均值)和单样本t检验的P值, 选出高低转移细胞的差异蛋白。使用GOfact软件对差异蛋白进行生物过程、分子功能分析。通过

Uniprot数据库功能注释及文献调研筛选新的肝癌转移相关蛋白。

2 结果

2.1 蛋白质组鉴定和iTRAQ定量分析

在MHCC97H和HCCLM6中共鉴定到5 033种蛋白质, 包含37 015个肽段, 5 013种蛋白质有定量信息。iTRAQ标记效率为99.6%。MHCC97H两次重复实验95%的蛋白定量比值分布在(0.84, 1.20)区间内; HCCLM6两次重复实验95%的蛋白定量比值分布在(0.92, 1.12)区间内。两次重复实验之间的蛋白定量比值平均值都在1附近(相当于1:1混合)。定量蛋白ratio值(代表HCCLM6/HCC97H表达量比值的四个ratio值的平均值)绝大部分在1附近(图1)。根据文献报道和体系偏差选择|ratio|≥1.5倍且单样本t检验P<0.05的蛋白为差异蛋白。共鉴定到91种差异蛋白, 其中39种蛋白质在转移能力较高的HCCLM6中上调, 52种下调。图2展示了其中一种上调蛋白层黏连蛋白α5(laminin subunit alpha 5, LAMA5)(ratio=1.72)的iTRAQ定量结果。

2.2 差异蛋白功能分类分析

利用UniProt数据库注释进行亚细胞定位分析, 91种差异蛋白中除了18种无注释, 其他主要为细胞质(27种)、细胞膜(13种)、内膜系统(11种)和分泌蛋白(10种)等(图3)。使用GOfact软件, 依据Gene Ontology条目对差异蛋白进行生物过程和分子功能富集分析, 按P值顺序列出显著富集类别。生物过程分析(图4A)显著富集的5种生物过程是细胞黏附、细胞增殖、应激反应、细胞识别和细胞通讯。分子功能分析(图4B)显著富集的5种分子功能为蛋

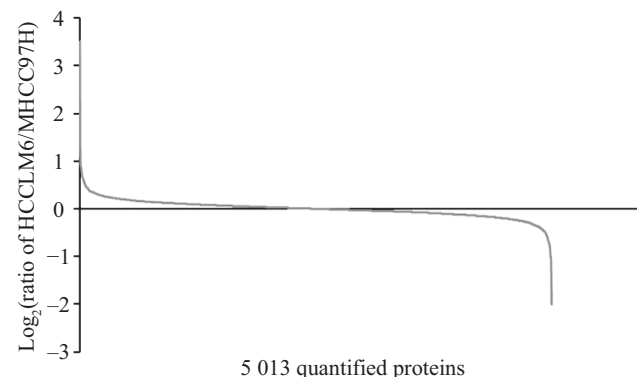
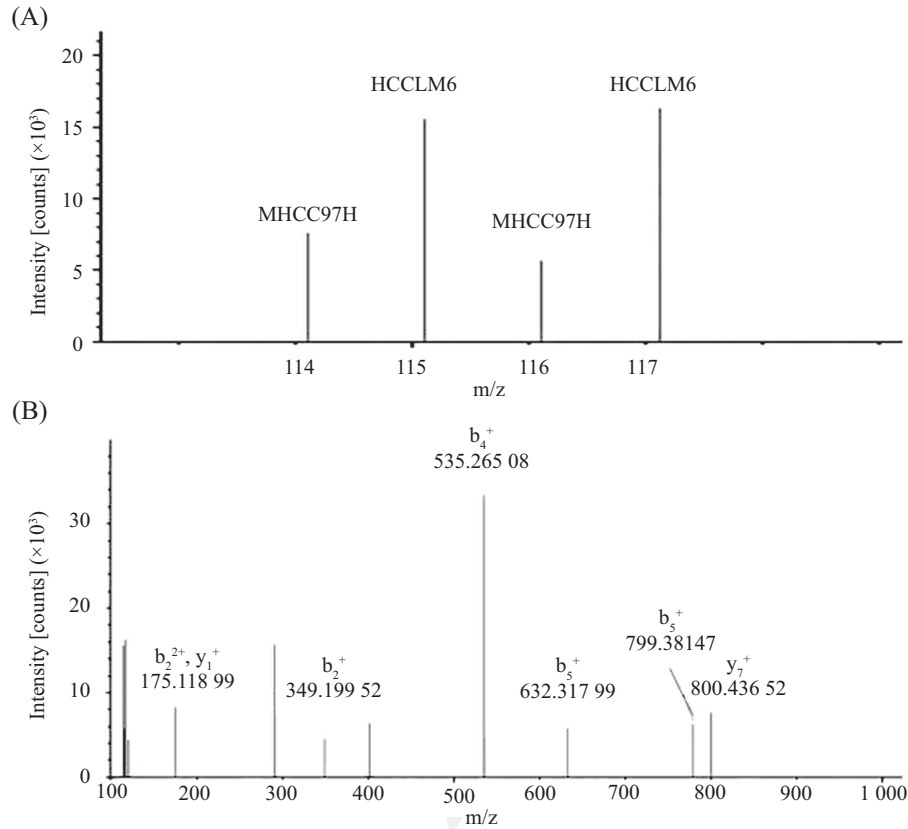


图1 HCCLM6/MHCC97H ratio对数值分布
Fig.1 The distribution of log₂(ratio of HCCLM6/MHCC97H)



A: 四组样本对应的报告离子114、115、116、117峰强度; B: 肽段序列的二级质谱图。

A: peak intensities of reporters 114、115、116、117 in four samples; B: MS/MS spectrum for peptide FGEPFVLNPGTWALR.

图2 LAMA5的iTRAQ定量结果质谱图

Fig.2 iTRAQ quantification result for LAMA5

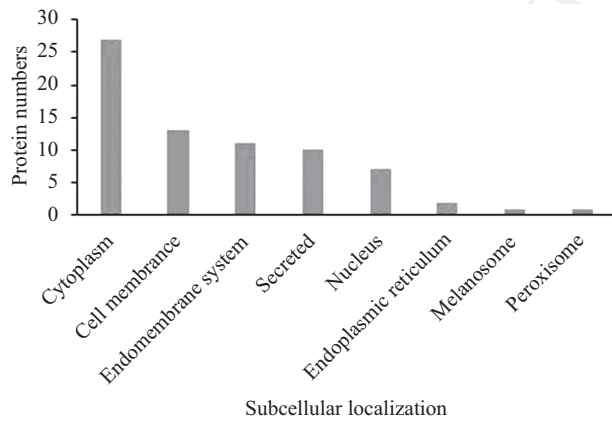


图3 差异蛋白亚细胞定位

Fig.3 The subcellular localization of differentially expressed proteins

白结合、脂质结合、氧结合、核酸结合和水解酶活性。

3 讨论

本研究对遗传背景相同、转移能力不同的两株肝癌细胞系MHCC97H和HCCLM6进行了iTRAQ蛋

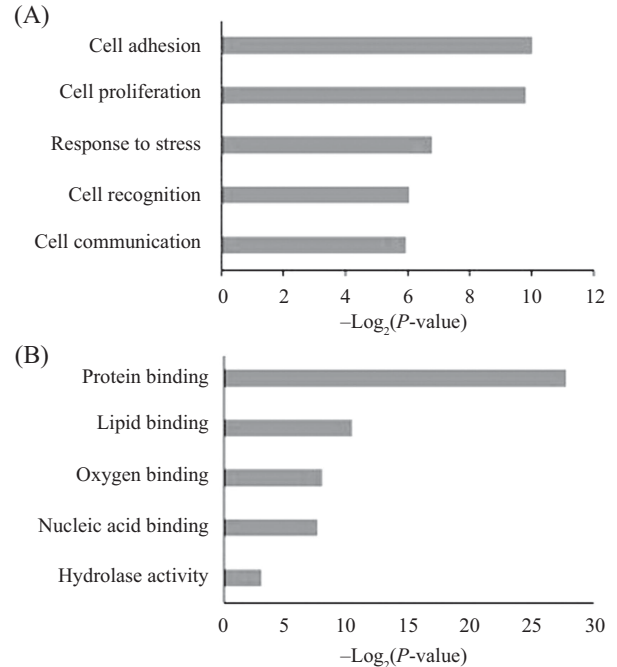


图4 差异蛋白最显著富集的前5位生物过程(A)和分子功能(B)

Fig.4 The top 5 significantly enriched biological processes (A) and molecular functions (B) of differentially expressed proteins

白质组定量分析。HCCLM6是将MHCC97H细胞皮下接种裸鼠进行6次肺转移筛选后得到的, HCCLM6血行转移能力大于MHCC97H, 同时具有较强的淋巴转移能力。为了发现与肝癌转移相关的重要蛋白, 我们通过iTRAQ的方法对两株细胞的蛋白表达进行了定量分析。经两次重复, 共鉴定到5 033种蛋白质、其中定量5 013种蛋白质, 是目前对这两株细胞定量蛋白数最多的研究。经分析, iTRAQ的标记效率为99.6%, MHCC97H的两次重复实验中95%的蛋白定量比值分布在(0.84, 1.20)区间内; HCCLM6的两次重复实验95%的蛋白定量比值分布在(0.92, 1.12)区间内, 说明实验误差较小、结果可靠。虽然HCCLM6和MHCC97H的转移能力有较大差别, 但是得到的差异蛋白数并不多, 仅有91个, 这些差异蛋白将为肝癌转移机制研究提供重要参考。

依据UniProt数据库亚细胞定位注释发现差异蛋白主要分布在细胞质、细胞膜和内膜系统。上调蛋白主要分布在细胞质中, 下调蛋白主要分布在细胞膜上。细胞膜定位的下调蛋白富含半胱氨酸蛋白1(cysteine-rich protein 1, CRIP1)在临床样本中得到相同的变化趋势, 在术后转移的骨肉瘤患者中CRIP1的表达量比10年不转移的患者低^[3]。差异蛋白中显著富集到与细胞黏附和细胞通讯等相关的蛋白。细胞黏附和失黏附过程由多种分子协调完成, 影响肿瘤细胞的脱落、定向运动、基质降解和靶器官定位生长。不同分子与肿瘤转移关系不同, 上调蛋白如LAMA5在乳腺癌细胞中过表达可提高细胞的转移能力, 临床样本统计数据也证明它与生存率负相关^[4]。下调蛋白斑联蛋白(Zyxin)的缺失可抑制成熟黏着斑形成从而抑制结肠癌细胞的运动和转移^[5]。具有细胞通讯功能的蛋白主要是上调蛋白, 如内皮一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, endothelial)与黑色素瘤细胞淋巴转移正相关^[6]。在差异蛋白中, 主要富集的蛋白是具有蛋白结合和脂质结合等生物功能的蛋白(图4B)。具有蛋白结合功能的上调蛋白如巢蛋白(Nestin)是中间丝结合蛋白, 有文献报道它可以通过促进血管生成与膀胱癌、胰腺癌等的转移正相关^[7]。下调蛋白如三叶因子1(trefoil factor 1)与胃癌细胞侵袭负相关, 临床样本统计数据也证明它与生存率正相关^[8]。有研究报道, 具有磷脂结合功能的上调蛋白膜联蛋白6(annexin A6, ANXA6)与乳腺癌转移正相关, ANXA6能够维持表皮细胞生长因子

的活性使磷脂酰肌醇3-激酶/Akt通路持续激活, 敲低它将使表皮生长因子失去活性, 且转移能力下降^[9]。临床数据表明, 下调蛋白载脂蛋白A-I(apolipoprotein A-I)与鼻咽癌转移负相关^[10]。

半数以上的上调蛋白已有报道与肿瘤转移正相关, 如热休克蛋白90、细丝蛋白C、I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链、膜联蛋白6、UPF0609蛋白、巢蛋白等。其中19种蛋白与其他类型肿瘤的转移正相关, 与肝癌转移相关上调蛋白较少, 如HCCLM6中明显上调的蛋白波形蛋白(Vimentin)(ratio=3.22), 有多项研究证明其与肝癌高转移相关, 是不良预后的标志物^[11-13], 含AAA结构域ATP酶2(ATPase family AAA domain-containing protein 2)(ratio=1.65)和转录因子SOX2(ratio=1.58)也有报道与肝癌复发正相关^[14-15]。这三个蛋白也在其他肿瘤中被证明与淋巴转移正相关。上述结果表明, 本研究的数据是可信的。同时我们也鉴定到未曾报道与任何肿瘤转移相关的蛋白(如VN1R5、TTC17等), 这些蛋白值得进一步关注。

在差异蛋白中, 我们着重关注在HCCLM6中上调倍数大的蛋白, 然后根据蛋白的功能注释以及研究新颖度进行候选肝癌转移相关蛋白的筛选, 同时考虑与其他肿瘤转移的相关性。微管蛋白链 β -2B(tubulin beta-2B chain, TUBB2B)(ratio=2.08)是微管的组成成分, 具有GTP酶活性, 仅发现其mRNA在脑肿瘤中上调^[16], 未有蛋白水平与肿瘤转移相关的报道。着丝粒蛋白F(centromere protein F, CENPF)(ratio=1.84)有研究报道与鼻咽癌^[17]、前列腺癌^[18]、头颈鳞状细胞癌^[19]转移正相关, 并且与乳腺癌的淋巴转移正相关^[20]。LAMA5(ratio=1.72)是在胚胎发育过程中介导细胞与外界联系的蛋白, 有研究表明, 它与乳腺癌转移正相关^[4]。囊泡相关膜蛋白5(vesicle-associated membrane protein 5, VAMP5)(ratio=1.59)参与蛋白高尔基体至质膜的转运、囊泡融合和细胞分化等过程。囊泡介导的转运过程参与肿瘤细胞之间和细胞与胞外基质的通讯, 在肿瘤转移中发挥着重要作用^[21]。同家族的VAMP8在脑胶质瘤细胞中上调^[22]。VAMP5蛋白较新颖, 没有与肿瘤相关的报道。上述四种蛋白都无肝癌转移相关报道, 尤其是VAMP5和TUBB2B没有与肿瘤转移相关的研究, 可作为下一步重点关注的候选蛋白。

综上所述, 本研究通过iTRAQ定量蛋白质组学方法建立了高低转移的两株肝癌细胞系HCCLM6和

MHCC97H的差异表达谱。GO分析表明, 91种差异蛋白主要涉及细胞黏附等生物过程和蛋白结合等分子功能。同时, 新发现了四种可能与肝癌转移相关的蛋白TUBB2B、CENPF、LAMA5和VAMP5, 为肝癌转移的机制研究提供了重要线索。

参考文献 (References)

- 1 Wang FS, Fan JG, Zhang Z, Gao B, Wang HY. The global burden of liver disease: the major impact of China. *Hepatology* 2014; 60(6): 2099-108.
- 2 Li Y, Tian B, Yang J, Zhao L, Wu X, Ye SL, *et al.* Stepwise metastatic human hepatocellular carcinoma cell model system with multiple metastatic potentials established through consecutive *in vivo* selection and studies on metastatic characteristics. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130(8): 460-8.
- 3 Baumhoer D, Elsner M, Smida J, Zillmer S, Rauser S, Schoene C, *et al.* CRIP1 expression is correlated with a favorable outcome and less metastases in osteosarcoma patients. *Oncotarget* 2011; 2(12): 970-5.
- 4 Zhou B, Gibson-Corley KN, Herndon ME, Sun Y, Gustafson-Wagner E, Teoh-Fitzgerald M, *et al.* Integrin $\alpha\beta 1$ can function to promote spontaneous metastasis and lung colonization of invasive breast carcinoma. *Mol Cancer Res* 2014; 12(1): 143-54.
- 5 Fukumoto M, Kurisu S, Yamada T, Takenawa T. α -actinin-4 enhances colorectal cancer cell invasion by suppressing focal adhesion maturation. *PLoS One* 2015; 10(4): e0120616.
- 6 Lahdenranta J, Hagendoorn J, Padera TP, Hoshida T, Nelson G, Kashiwagi S, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase mediates lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res* 2009; 69(7): 2801-8.
- 7 Ishiwata T. Nestin in gastrointestinal and other cancers: Effects on cells and tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2011; 17(4): 409-9.
- 8 Tanaka T, Nakamura J, Kitajima Y, Kai K, Miyake S, Hiraki M, *et al.* Loss of trefoil factor 1 is regulated by DNA methylation and is an independent predictive factor for poor survival in advanced gastric cancer. *Int J Oncol* 2013; 42(3): 894-8.
- 9 Koumangoye RB, Nangami GN, Thompson PD, Agboto VK, Ochieng J, Sakwe AM. Reduced annexin A6 expression promotes the degradation of activated epidermal growth factor receptor and sensitizes invasive breast cancer cells to EGFR-targeted tyrosine kinase inhibitors. *Mol Cancer* 2013; 12(1): 167.
- 10 Jiang R, Yang ZH, Luo DH, Guo L, Sun R, Chen QY, *et al.* Elevated apolipoprotein A-I levels are associated with favorable prognosis in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Med Oncol* 2014; 31(8): 1-8.
- 11 Hwa JS, Park HJ, Jung JH, Kam SC, Park HC, Kim CW, *et al.* Identification of proteins differentially expressed in the conventional renal cell carcinoma by proteomic analysis. *J Korean Med Sci* 2005; 20(3): 450-5.
- 12 Mitra A, Satelli A, Xia X, Cutrera J, Mishra L, Li S. Cell-surface vimentin: A mislocalized protein for isolating csVimentin(+) CD133(-) novel stem-like hepatocellular carcinoma cells expressing EMT markers. *Int J Cancer* 2015; 137(2): 491-5.
- 13 Zhai X, Zhu H, Wang W, Zhang S, Zhang Y, Mao G. Abnormal expression of EMT-related proteins, S100A4, vimentin and E-cadherin, is correlated with clinicopathological features and prognosis in HCC. *Med Oncol* 2014; 31(6): 1-8.
- 14 Yang J, Huang J, Luo L, Chen Z, Guo Y, Guo L. Significance of PRO2000/ANCCA expression, a novel proliferation-associated protein in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int* 2014; 14(7): 1-6.
- 15 Sun C, Sun L, Li Y, Kang X, Zhang S, Liu Y. Sox2 expression predicts poor survival of hepatocellular carcinoma patients and it promotes liver cancer cell invasion by activating Slug. *Med Oncol* 2013; 30(2): 1-9.
- 16 Leandro-García LJ, Leskelä S, Landa I, Montero-Conde C, López-Jiménez E, Letón R, *et al.* Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isotypes. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010; 67(4): 214-23.
- 17 Cao JY, Liu L, Chen SP, Zhang X, Mi YJ, Liu ZG, *et al.* Prognostic significance and therapeutic implications of centromere protein F expression in human nasopharyngeal carcinoma. *Mol Cancer* 2010; 9(9): 237-12.
- 18 Zhuo Y, Xi JM, Wan YP, Hua W, Liu YL, Wan S, *et al.* Enhanced expression of centromere protein F predicts clinical progression and prognosis in patients with prostate cancer. *Int J Mol Med* 2015; 35(4): 966-72.
- 19 De la Guardia C, Casiano CA, Trinidad-Pinedo J, Báez A. CENP-F gene amplification and overexpression in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2001; 23(2): 104-12.
- 20 Campone M, Campion L, RochéH, Gouraud W, Charbonnel C, Magrangeas F, *et al.* Prediction of metastatic relapse in node-positive breast cancer: Establishment of a clinicogenomic model after FEC100 adjuvant regimen. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 109(3): 491-501.
- 21 Howcroft TK, Zhang HG, Dhodapkar M, Mohla S. Vesicle transfer and cell fusion: Emerging concepts of cell-cell communication in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 2011; 12(3): 159-64.
- 22 Chen Y, Meng D, Wang H, Sun R, Wang D, Wang S, *et al.* VAMP8 facilitates cellular proliferation and temozolomide resistance in human glioma cells. *Neuro Oncol* 2014; 17(3): 407-9.