

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.10.012

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190125.1502.007.html(2019-01-28)

## PKG、PKA 及 VASP 在人结直肠癌组织中的表达及临床意义\*

陈晨<sup>1</sup>, 金旭<sup>2\*</sup>, 翁稚颖<sup>1</sup>, 朱焕利<sup>2</sup>, 郑昌博<sup>1</sup>, 刘伟军<sup>1</sup>, 代泽兰<sup>1</sup>, 肖创<sup>1</sup>, 杨之斌<sup>2△</sup>, 杨为民<sup>1▲</sup>

(1. 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500; 2. 昆明医科大学第三附属医院暨云南省肿瘤医院, 昆明 650118)

**[摘要]** **目的** 探讨 cGMP 依赖性蛋白激酶(PKG)两种亚型 PKG-I 和 PKG-II、cAMP 依赖性蛋白激酶 A(PKA)、血管扩张刺激磷蛋白(VASP)及其两种磷酸化蛋白 p-VASP Ser157 和 p-VASP Ser239 在结直肠癌(CRC)组织中的表达水平及临床意义。**方法** 收集云南省肿瘤医院结直肠外科 2015 年 3—9 月收治的 20 例有完整病理资料的 CRC 患者通过手术切除获得的癌组织及其同源的正常癌旁组织, 用 Western blot 检测上述组织中的 PKG-I、PKG-II、PKA、VASP、p-VASP Ser157 和 p-VASP Ser239 的蛋白表达水平, 进行统计分析。同时, 分析这些蛋白表达与年龄、性别等病理数据的相关性。**结果** CRC 组织中的 PKG-I、PKG-II、VASP、p-VASP Ser157 和 p-VASP Ser239 的蛋白表达均显著低于正常的癌旁组织 ( $P < 0.05$ ), 而 PKA 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 并且所有蛋白因子和性别、年龄、肿瘤分化程度及 TNM 分期等一般病理数据无显著性相关。**结论** PKG 两种亚型与 VASP 及其两种磷酸化蛋白在 CRC 组织显著降低, 可能会成为临床诊断治疗 CRC 的新靶点。

**[关键词]** 结直肠肿瘤; 环 GMP 依赖性蛋白激酶类; 环 AMP 依赖性蛋白激酶 A; VASP; 临床意义**[中图分类号]** R735.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)10-1669-05**Expressions and clinical significances of PKG, PKA and VASP in human colorectal cancer\***CHEN Chen<sup>1</sup>, JIN Xu<sup>2\*</sup>, WENG Zhiying<sup>1</sup>, ZHU Huanli<sup>2</sup>, ZHENG Changbo<sup>1</sup>,  
LIU Weijun<sup>1</sup>, DAI Zelan<sup>1</sup>, XIAO Chuang<sup>1</sup>, YANG Zhibin<sup>2△</sup>, YANG Weimin<sup>1▲</sup>

(1. School of Medicine, Kunming Medical University and Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming, Yunnan 650500, China; 2. the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University and Yunnan Cancer Hospital, Kunming, Yunnan 650118, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expressions and clinical significances of cGMP-dependent protein kinase (PKG) type I (PKG-I) and type II (PKG-II), cAMP-dependent protein kinase (PKA), vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) and phosphorylation of VASP including p-VASP Ser157 and p-VASP Ser239 in colorectal cancer (CRC). **Methods** CRC tissues and their homologous normal paracancerous tissues surgically of 20 patients with complete pathological data from March 2015 to September 2015 admitted to the colorectal surgery department of Yunnan Cancer Hospital were collected. The protein expressions of PKG-I, PKG-II, VASP, p-VASP Ser157, and p-VASP Ser239 in the above tissues were performed by Western blot. The correlation between these protein expression and general pathology data were analyzed. **Results** In CRC tissues, protein expressions of PKG-I, PKG-II, VASP, p-VASP Ser157 and p-VASP Ser239 were significantly lower than those in the normal tissues ( $P < 0.05$ ) while PKA difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). In addition, there was no significant correlation between all protein factors and general pathological data such as gender, age, tumor differentiation degree and TNM stage. **Conclusion** Two subtypes of PKG, VASP and its two phosphorylated proteins significantly reduced in CRC tissues, which may be potential targets for CRC therapy.

**[Key words]** colorectal neoplasms; cyclic GMP-dependent protein kinases; cyclic AMP-dependent protein kinase; vasodilator-stimulated phosphoprotein; clinical significance

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81560589, 30960450, 81173110, 81402991); 云南省科技厅项目[2018FE001(-026), 2017FE467(-019), 2014BC012, 2014IA033, 2017IC041]; 云南省教育厅项目(2018JJS161)。 作者简介: 陈晨(1986—), 硕士, 实验师, 主要从事药理学研究工作。

\* 共同第一作者: 金旭(1989—), 硕士, 住院医师, 主要从事结直肠肿瘤研究方向。 △ 通信作者, E-mail: yzblbab@vip.sina.com。 ▲ 共同通信作者, E-mail: ywmbessie@yeah.net。

发生在结肠和直肠的结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球第三大常见恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。据世界卫生组织预计,到 2030 年, CRC 的预期发病者超过 220 万新病例和 110 万死亡<sup>[2]</sup>。在我国, CRC 的发病率和病死率每年均保持上升趋势,由高到低依次为东部地区、中部地区、西部地区,且男性高于女性,年长者高于年轻人<sup>[3-4]</sup>。CRC 的一般治疗手段包括手术切除、放射治疗和化疗<sup>[5]</sup>。另外,使用抗血管生成疗法(如贝伐单抗)和表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)抑制剂(如西妥昔单抗)的靶向治疗也只在特定患者中有一定治疗作用<sup>[6-7]</sup>,但患者的生存率仍然不高,5 年内约为 60%<sup>[8]</sup>,因此,需要寻找新的治疗方案。

cGMP 依赖性蛋白激酶(cGMP-dependent protein kinase, PKG)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。在哺乳动物细胞中,PKG 有两种亚型,即 PKG-I 和 PKG-II。近年来的一些研究表明,PKG 具有舒张血管,改善血管功能等作用<sup>[9-10]</sup>,但在抗肿瘤特别是抗结肠癌方面鲜为少见。cAMP 依赖性蛋白激酶 A(cAMP-dependent protein kinase, PKA)与 PKG 同样是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,目前对 PKA 的研究大多集中在大脑学习记忆方面,包括神经退行性疾病阿尔兹海默症和帕金森病等<sup>[11-12]</sup>,但关于结肠癌方面的报道却较少。血管扩张刺激磷蛋白(vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP)是一种调节细胞形状和极性的肌动蛋白结合蛋白,是 PKG 与 PKA 的共同作用底物蛋白。PKG 优先磷酸化 Ser239(p-VASP Ser239)处的 VASP,而 PKA 则是优先磷酸化 Ser157(p-VASP Ser157)处的 VASP。有报道指出, VASP 蛋白的表达与癌症患者的疾病进展呈正相关,并且强调了它在恶性肿瘤中的重要性<sup>[13]</sup>。因此作者推测,作为 VASP 的直接上游蛋白激酶,PKG 与 PKA 的表达与活性的变化与 CRC 有关。

基于以上文献报道,本研究通过检测分析 CRC 组织中 PKG、PKA、VASP 及其磷酸化蛋白的表达情况,旨在为 CRC 患者寻找新的治疗靶点。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2015 年 3—9 月云南省肿瘤医院结肠外科经手术切除的 20 例患者的癌变组织及其癌旁正常组织。20 例患者相关的临床病例指标包括性别、年龄、肿瘤直径大小、肿瘤分化程度、TNM 分期以及肿瘤标志物癌胚抗原(CEA)及糖蛋白 125(CA-125)的测定结果。所有组织标本在手术完成后 30 min 获得,再放于液氮中保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 主要试剂与仪器** PKG-I 兔单抗(货号: #3248)、PKG-II 兔单抗(货号: #3248)、PKA 兔单抗(货号: 3927S)以及 GAPDH 兔单抗(货号: #2118)均购自美国 Cellsignaling technology 公司;

VASP 兔多抗(货号: SC-1395)、p-VASP Ser239 兔多抗(货号: SC-23507)、p-VASP Ser157 鼠单抗(货号: SC-365563)、羊抗兔二抗(货号: SC-2005)和羊抗鼠二抗(货号: SC-2004)均购自美国 Santa cruz 公司;二辛酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(货号: P0012)购自上海碧云天生物技术有限公司;Western blot 检测所用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳仪和半干转仪购自美国 BIO-RAO 公司。

**1.2.2 Western blot 分析** 将标本从液氮中取出后,快速剪成小块后在冰上进行匀浆。收集匀浆经 4 °C 10 000×g 离心 10 min,取上清液。以牛血清清蛋白为标准,用 BCA 法对蛋白进行浓度测定。上样 20 μg 蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳,后予 15 V,30 min 半干转印至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。在室温下,用 5%脱脂奶粉 TBST 缓冲液对膜进行封闭 1 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。PKG-I、PKG-II、PKA、VASP、p-VASP Ser157 和 p-VASP Ser239 各个抗体(1:500~1:1 000)4 °C 孵育过夜。如前所述洗膜后,将膜与辣根过氧化物酶标记的抗 IgG 抗体(1:8 000~1:10 000)室温孵育 1 h。洗膜,化学发光(ECL)试剂显迹。同时用 GAPDH 抗体(1:10 000)作为内参照。采用 Scion Image 图像分析系统对 Western blot 图像进行分析计算。每例标本每个蛋白重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 采用 SigmaStat 3.5 统计分析软件对数据进行分析处理。在检测 CRC 组织中各 PKG、PKA、VASP 及其磷酸化蛋白的表达与临床病理指标的关系时,对于性别、年龄、肿瘤大小、分化程度和 TNM 分期病理指标采用 *t* 检验;对于 CEA 与 CA-125 的相关性检验采用 Pearson Correlation 检验。Western blot 实验所得数据为目标基因与内参 GAPDH 的比值,以  $\bar{x} \pm s$  表示,其中呈正态分布且方差齐的数据采用单因素方差分析(one-way ANOVA)的 Fisher Least-Significant Difference 检验。采用 SigmaPlot 10.0 图形软件进行作图。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

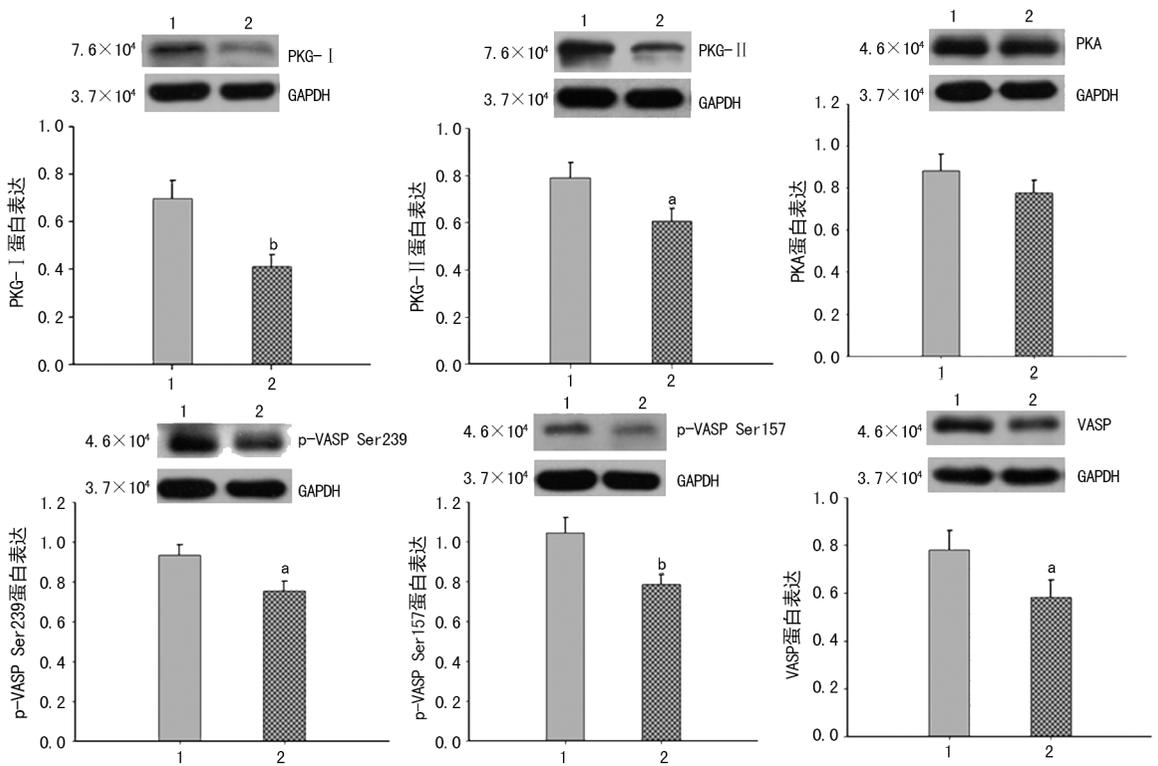
## 2 结果

**2.1 临床病理指标的相关性分析** PKG-I、PKG-II、PKA、VASP、p-VASP Ser157 和 p-VASP Ser239 各蛋白经 Western blot 检测,发现其在每例 CRC 标本中均有表达。这些蛋白的表达水平与患者性别、年龄、肿瘤大小、分化程度、TNM 分期及 CEA 和 CA-125 有一定的相关性,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

**2.2 Western bolt 检测结果** Western blot 结果显示, CRC 组织中的 PKG-I、PKG-II、VASP、p-VASP Ser157 和 p-VASP Ser239 蛋白表达水平均显著低于癌旁正常组织( $P < 0.05$ )。然而, CRC 组织中的 PKA 蛋白表达水平与癌旁正常组织相比并无明显差异,见图 1。

表 1 CRC 组织中各蛋白因子与临床病理指标的相关性(n=20)

项目	n	PKG1	PKG2	PKA	p-VASP Ser239	p-VASP Ser157	VASP
性别(P)		0.547	0.077	0.246	0.940	0.920	0.822
男	9						
女	11						
年龄(P)		0.200	0.094	0.546	0.155	0.193	0.936
>57 岁	10						
≤57 岁	10						
肿瘤大小(P)		0.089	0.970	0.377	0.971	0.488	0.284
>3.5 cm	10						
≤3.5 cm	10						
分化程度(P)		0.299	0.104	0.742	0.873	0.517	0.087
中分化	10						
中低分化	10						
TNM 分期(P)		0.682	0.132	0.712	0.969	0.336	0.579
I~II	9						
III~IV	11						
相关性(r)							
CEA	20	0.554	0.363	0.362	0.218	0.592	0.141
CA-125	20	0.919	0.994	0.671	0.292	0.253	0.335



1: 癌旁正常组织; 2: 结直肠癌组织; a: P<0.05, b: P<0.01, 与癌旁正常组织比较

图 1 Western blot 检测 CRC 组织与癌旁正常组织中 PKG、PKA、VASP 及其磷酸化蛋白表达

### 3 讨论

PKG 是蛋白激酶 AGC 家族的成员,从两个不同的基因转录为两种亚型,即 PKG-I 和 PKG-II。PKG-I 分布比较广泛,在血管平滑肌细胞(VSMC)、神经元、血小板、血管和肠平滑肌细胞分布较多,在心肌、血管内皮和大多数白细胞中表达较少。PKG-II 表达更多的分布于脑、肠和肾。在肠道中,PKG-II 参与囊性纤维化跨膜调节剂阴离子通道和氯通道的活

化,引起氯化物和碳酸氢盐的外排,然后使水流入肠腔,从而调节肠壁细胞内外的渗透压<sup>[14]</sup>。PKA 是 A 型激酶锚定蛋白家族成员,由催化亚基和抑制性调节亚基组成,其通过磷酸化底物蛋白或转录因子,以调节基因的转录翻译。PKA 参与多个信号转导网络以调节细胞的生长、代谢及增殖等过程<sup>[15]</sup>。VASP 属于接头蛋白 Ena/VASP 家族,可将细胞骨架系统连接到信号转导通路,并且它在细胞骨架组装、成纤维细

胞迁移、血小板活化和轴突导向中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。VASP 作为 PKG 与 PKA 的共同作用底物,其区别在于两种激酶对其作用的磷酸化位点不同,分别为 p-VASP Ser239 与 p-VASP Ser157,两种磷酸化蛋白的表达水平分别可提示 PKG 与 PKA 的活化水平。在本研究中,作者通过检测 20 例 CRC 患者病变癌组织与正常癌旁组织中的 PKG-I 与 PKG-II 的表达水平,发现 CRC 组织中的两种蛋白显著低于正常的癌旁组织;同时,CRC 组织中反映 PKG 活性的 p-VASP Ser239 的表达水平也显著降低。这一研究结果提示,PKG 蛋白的表达及活性均与 CRC 密切相关。虽然 CRC 组织中 PKA 的表达水平与正常组织中的表达相比并没有明显差异,但反映 PKA 活性的 p-VASP Ser157 的表达明显降低,这一结果提示,CRC 虽对 PKA 蛋白表达无显著影响,但对其活性却有显著影响。另外,CRC 中的 VASP 的表达水平同样明显降低。

WALDKIRCH 等<sup>[17]</sup>的研究结果发现 PKG-I 在肿瘤组织高表达时可以抑制肿瘤细胞的侵袭,因此推测其可能具有一定的抗肿瘤作用。与正常细胞相比,许多肿瘤类型的 PKG-I 表达降低,其中也包括从结肠切除标本中收集的肿瘤组织。有研究表明,PKG I 对人结肠癌细胞 SW620 的生长抑制是由于减少血管内皮生长因子导致血管生成严重缺乏。有研究人员提出其机制可能是 PKG-I 参与的凋亡通路 MEKK1/MEK4/JNK 通路有关<sup>[18]</sup>。虽然目前还少有 PKG-II 对结肠癌发生发展作用方面的报道,但已经有关于其他癌症方面的报道。FALLAHIAN 等<sup>[19]</sup>的研究结果显示 cGMP 可以诱导乳腺癌细胞的凋亡,并提出这一作用与 PKG-II 有关。近年来,有研究显示 PKG-II 在胃癌组织中表达和活性均明显降低,并且证实提高 PKG-II 活性可明显抑制胃癌细胞的生长,而这一作用可能与 EGFR/MAPK/ERK 通路和 EGFR/MAPK/JNK 通路相关。本研究结果显示,PKG-I 与 PKG-II 在 CRC 中的表达水平低于正常组织,并且反映其活性的磷酸化底物 p-VASP Ser239 的蛋白同样在 CRC 组织中表达减少,表明 PKG 两种亚型的表达及活性均被抑制,这一结果与上述 WALDKIRCH 等<sup>[17]</sup>的结果一致。

钱晶等<sup>[20]</sup>在研究 CRC 肝转移中 cAMP/PKA 通路的作用时发现,给小鼠腹腔注射 cAMP 类似物 8-溴-cAMP 后,原发灶中的 PKA 有微弱减少,而 VEGF、E-钙粘蛋白及 MMP2 的表达却有显著变化。TINSLEY 等<sup>[21]</sup>研究表明增加 cAMP 以激活结肠肿瘤细胞中的 PKA 并不显著促成细胞死亡。然而,LEIPHRAKPAM 等<sup>[22]</sup>的研究结果发现,在 FET 和 GEO 结肠癌细胞实验中转生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ )和胰岛素样生长因子 1 受体(IGF1R)增加细胞凋亡的机制可能与 PKA 的激活有关。

PKG 与 PKA 是分别依赖于细胞内 cGMP 与 cAMP 水平磷酸化特定蛋白的激酶,与其相关的经典的信号通路分别为 NO-cGMP-PKG 与 AC-cAMP-PKA。BABYKUTTY 等<sup>[23]</sup>的研究显示 NO-cGMP-PKG 通过激活 ERK-1/2 和 AP-1 促进 MMP-2/9 的表达,可以抑制结肠癌细胞迁移/侵袭。FRANCIS 等<sup>[24]</sup>发现细胞内的磷酸二酯酶(PDE)的可同时降低细胞内 cGMP 与 cAMP 水平,抑制 PKG 与 PKA 活性,并表明非甾体类抗炎药可通过抑制 PDE 的活性可增加 cGMP 与 cAMP 水平从而激活 PKG 与 PKA,但通过抑制 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路诱导结肠肿瘤细胞凋亡仅与 PKG 有关<sup>[25]</sup>。

VASP 作为一种肌动蛋白结合蛋白,也是细胞骨架蛋白,它控制着癌细胞的形状、极性和细胞分裂,迁移和侵袭的膜组织。有研究表明,VASP Ser 磷酸化作为调节肌动蛋白聚合速率和细胞骨架依赖性细胞器的关键因子,调控着丝状伪足、板状伪足、侵袭伪足、粘着斑和细胞-细胞连接等肌动蛋白依赖的膜细胞器<sup>[26]</sup>。宋胜江等<sup>[27]</sup>的研究发现,VASP 在结肠癌组织中的表达明显高于相对应的癌旁正常组织,这一结果与本研究结果一致。ALI 等<sup>[28]</sup>研究结果发现,分别抑制 p-VASP Ser157 和诱导 p-VASP Ser239 VASP 磷酸化可控制肌动蛋白细胞骨架组装以及结肠癌细胞的存活和死亡行为,这一结果表明,VASP Ser 磷酸化的失调可能是造成结肠癌永生和侵袭性细胞表型发育的潜在因素。在本研究中反映 PKA 活性的 p-VASP Ser157 在 CRC 组织中与 p-VASP Ser239 同时降低,与 ALI 等<sup>[28]</sup>研究相悖,推测可能与研究对象不同有关;ALI 等<sup>[28]</sup>研究用的结肠癌细胞,细胞种类较为单一,而本研究中用的是结肠癌组织,可能其中也含有其他细胞种类;另外,由于临床标本珍贵、难得,推测可能与本研究的样本量偏少有关,在后续相关研究中,将考虑增大样本量。

本文系统的研究了 PKG 两种亚型、PKA、VASP 以及反映 PKG 与 PKA 活性的两种 VASP Ser 磷酸化蛋白的表达水平在 CRC 组织已经正常癌旁组织中的表达,研究结果提示 PKG 两种亚型的活性及表达与 CRC 发生发展密切相关。这一结果与目前的相关报道呈现一致性。目前,信号转导研究揭示药物开发的新治疗靶点,这种前景正在改善;而本研究结果正是为临床诊断治疗 CRC 寻找到新的治疗靶点提供了参考依据。

## 参考文献

- [1] MORADI MARJANEH R, HASSANIAN S M, GHOBA-DI N, et al. Targeting the death receptor signaling pathway as a potential therapeutic target in the treatment of colorectal cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(10): 6538-6549.

- [2] ARNOLD M, SIERRA M S, LAVERSANNE M A, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality[J]. *Gut*, 2017, 66(4): 683-691.
- [3] MORADI-MARJANEH R, HASSANIAN S M, FIUJI H, et al. Toll like receptor signaling pathway as a potential therapeutic target in colorectal cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(8): 5613-5622.
- [4] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [5] 陈万青, 孙可欣, 郑荣寿, 等. 2014 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2018, 27(1): 1-14.
- [6] DU X H, CHEN C, ZHANG M, et al. Scutellarin reduces endothelium dysfunction through the PKG-I pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015(1): 430271.
- [7] LI L, LI L, CHEN C, et al. Scutellarin's cardiovascular endothelium protective mechanism: important role of PKG-I $\alpha$ [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139570.
- [8] TABRIZIAN K, HASHEMZAEI M, NASIRI A A, et al. Interactive involvement of hippocampal cAMP/PKA and cyclooxygenase-2 signaling pathways in spatial learning in the Morris water maze[J]. *Folia Neuropathologica*, 2018, 56(1): 58-66.
- [9] HU Y F, PAN S Y, ZHANG H T. Interaction of Cdk5 and cAMP/PKA signaling in the mediation of neuropsychiatric and neurodegenerative diseases[J]. *Advances in neurobiology*, 2017, 17(1): 45-61.
- [10] HU L D, ZOU H F, ZHAN S X, et al. EVL (Ena/VASP-like) expression is up-regulated in human breast cancer and its relative expression level is correlated with clinical stages[J]. *Oncol Rep*, 2008, 19(4): 1015-1020.
- [11] BENSON A B, VENOOK A P, CEDERQUIST L, et al. Colon cancer, version 1. 2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017, 15(3): 370-398.
- [12] JOHNSTON S, WILSON K, VARKER H A, et al. Real-world direct health care costs for metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab or bevacizumab-containing regimens in first-line or first-line through second-line therapy[J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2017, 16(4): 386.
- [13] MATIC I Z, KOLUNDZIJA B, DAMJANOVIC A, et al. Peripheral white blood cell subsets in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab; the potential clinical relevance[J]. *Front Immunol*, 2017, 8(1): 1886.
- [14] DESANTIS C E, LIN C C, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(4): 252-271.
- [15] RAHBI H, NARAYAN H, JONES D J, et al. The uroguanylin system and human disease[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2012, 123(12): 659-668.
- [16] MACHESKY L. Putting on the brakes: a negative regulatory function for ENA/VASP proteins in cell migration [J]. *Cell*, 2000, 101(7): 685-688.
- [17] WALDKIRCH E, UCKERT S, LANGNÄSE K, et al. Immunohistochemical distribution of cyclic GMP-dependent protein kinase-1 in human prostate tissue [J]. *Eur Urol*, 2007, 52(2): 495-501.
- [18] KWON I K, SCHOENLEIN P V, DELK J, et al. Expression of cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in metastatic colon carcinoma cells blocks tumor angiogenesis [J]. *Cancer*, 2008, 112(7): 1462-1470.
- [19] FALLAHIAN F, KARAMI-TEHRANI F, SALAMI S, et al. Cyclic GMP induced apoptosis via protein kinase G in oestrogen receptor-positive and -negative breast cancer cell lines[J]. *FEBS J*, 2011, 278(18): 3360-3369.
- [20] 钱晶, 蒋学通, 徐传奇, 等. cGMP/PKA 通路在结直肠癌肝转移中的作用及机制研究[J]. *中华结直肠疾病电子杂志*, 2016, 5(3): 244-248.
- [21] TINSLEY H N, GARY B D, THAIPARAMBIL J, et al. Colon tumor cell growth-inhibitory activity of sulindac sulfide and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs is associated with phosphodiesterase 5 inhibition[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010, 3(10): 1303-1313.
- [22] LEIPHRAPAM P D, BRATTAIN M G, BLACK J D, et al. TGF $\beta$  and IGF1R signaling activates protein kinase A through differential regulation of ezrin phosphorylation in colon cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(21): 8242-8254.
- [23] BABYKUTTY S, SUBOJ P, SRINIVAS P, et al. Insidious role of nitric oxide in migration/invasion of colon cancer cells by upregulating MMP-2/9 via activation of cGMP-PKG-ERK signaling pathways [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2012, 29(5): 471-492.
- [24] FRANCIS S H, BLOUNT M A, CORBIN J D. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions[J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(2): 651-690.
- [25] LEE K, APIAZZA G. The interaction between the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling cascade and PKG activation in cancer [J]. *J Biomed Res*, 2017, 31(3): 189-196.
- [26] ZUZGA D S, PELTA-HELLER J, LI P, et al. Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein Ser239 suppresses filopodia and invadopodia in colon cancer[J]. *Internat J Cancer*, 2012, 130(11): 2539-2548.
- [27] 宋胜江, 孙利敏, 徐定银, 等. VASP 在结肠癌组织中的表达及其对预后的影响[J]. *实用肿瘤杂志*, 2016, 31(01): 48-52.
- [28] ALI M, ROGERS L K, PITARI G M. Serine phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) regulates colon cancer cell survival and apoptosis[J]. *Life Sci*, 2015, 123(1): 1-8.