

组织蛋白酶B与结肠腺瘤和结肠癌的关系

乔 镇, 汪丽燕, 关景明

乔镇, 汪丽燕, 关景明, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科
黑龙江省哈尔滨市 150086
省科技厅攻关项目, No. GB01C12403
项目负责人: 关景明, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院 消化内科.
电话: 0451-86686695
收稿日期: 2004-08-31 接受日期: 2004-09-19

摘要

组织蛋白酶B(cathepsin B, CB)是一种溶酶体蛋白水解酶,参与肿瘤的浸润和转移.现公认结肠腺瘤是结肠癌的癌前病变.CB在结肠癌演变过程中,尤其在浸润和转移中发挥重要作用.现介绍CB的活化作用,表达特点,抑制剂及其分子生物学特征等,重点对CB与结肠腺瘤和结肠癌发生关系的研究进展做一综述.

乔镇, 汪丽燕, 关景明. 组织蛋白酶B与结肠腺瘤和结肠癌的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2446-2449
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2446.asp>

0 引言

结肠癌是临床上常见的一种疾病,在国外内有较高的发生率和死亡率,结肠癌的发生发展机制一直是学者们研究的热点.半胱氨酸蛋白酶包括组织蛋白酶B、L、H、D(CL、CH、CD)等,CB是其中研究较多的一种.CB不仅存在于正常组织和体液中,也存在于多种肿瘤组织,如肺癌,乳腺癌,结肠癌,胃癌^[1],前列腺癌等中.因CB可以通过多种机制降解细胞外基质,破坏宿主屏障,在结肠癌发生发展演变过程中,尤其在浸润和转移中发挥重要作用.

1 CB活性

1.1 CB酶原的活化 CB的存在形式有两种,一种为无活性的前体形式(procathepsin B)或称为酶原形式,另一种为有活性的成熟CB形式.通过体内和体外的研究发现CB的酶原形式需要通过激活才能转变为有活性的成熟CB,他的激活条件需要一定的pH值,或其他酶的存在,而只有成熟的CB才具有恶性潜能,参与肿瘤浸润和转移.正常细胞在酸性条件下CB活性最高,而恶性结肠癌细胞分泌无活性的类CB蛋白酶,即CB酶原形式,在中性或碱性有最佳活性.研究认为组织蛋白酶原D(procathepsin D)也参与CB酶原的激活^[2],参与肿瘤浸润和转移过程中细胞外基质的反应.经过胃蛋白酶处理过的CB,活性平均可增加7.3倍,表明酶在递质中

主要是以无活性的形式存在的^[3].这是由于肿瘤分泌的CB缺乏6-磷酸甘露糖受体识别标志,故不能被摄入溶酶体,而以酶原的形式存在于胞质和细胞外.结肠癌患者的腹水中也发现无活性的类CB,这种酶的分子质量为40 ku,经过胃蛋白酶处理,可以转化为分子质量为28 ku的活性形式,这种无活性的类CB酶是一种酶前体形式,而不是酶-抑制剂的混合物^[4].

1.2 活性CB的作用 肿瘤的恶性行为主要表现为浸润和转移,此过程需要肿瘤细胞与细胞外基质(ECM)和基底膜成分的黏附,细胞对ECM和基底膜的降解,以及细胞移行几个基础过程.层粘连蛋白(LN),纤维连接蛋白(FN)是ECM和基底膜的主要成分和细胞黏附蛋白.生理条件下,CB只在溶酶体中起作用,而在肿瘤组织中,CB可以由肿瘤细胞和基质细胞分泌,降解蛋白聚糖, LN, FN和IV型胶原蛋白等多种细胞外基质成分,破坏黏膜屏障,促进肿瘤细胞一系列降解过程,此外,CB还能通过激活胶原酶等其他蛋白水解酶而间接参与细胞外降解过程. Satoh *et al*^[5]发现,结肠腺瘤中的CB活性要明显高于肿瘤周边的组织,有趋向表明,浸润到浆膜或绒毛的癌中的CB活性要高于浸润到肌层的癌中CB活性.表明CB尤其是细胞膜中的CB在结肠肿瘤中呈较高表达,这使肿瘤细胞更易降解细胞外基质,引起肿瘤细胞的浸润和转移. Chabowski *et al*^[6]研究表明结肠癌组织的细胞溶质和匀浆中的CB活性要明显高于临近的正常组织,且癌和正常组织的组织匀浆中的CB活性有高于细胞溶质的趋势. LN是基底膜的主要成分,主要参与细胞基质的相互作用和肿瘤的浸润,CB可以降解LN.研究发现LN在腺瘤中是连续分布的,而在高度不典型增生/原位癌和结肠癌中是不连续或呈片段分布的,而且后二者的染色程度明显高于腺瘤,证明CB的染色强度与LN的破坏程度相关,因此有理由认为CB表达的增加和与肿瘤相关的层粘连蛋白的减少可能参与从腺瘤到结肠癌的进展过程^[7]. Mckerrow *et al*^[8]采用自动操作微量测定模板分析形式,测得CB的活性在原发结肠肿瘤中明显升高,而在伴有转移的肿瘤中CB活性最高. Talieri *et al*^[9]研究CB、CD参与人类几种肿瘤的进展过程时,对比了64个结肠癌和同一患者的正常结肠组织中CB、CD抗原水平和他们的免疫组织化学染色,结果显示癌组织中的抗原水平明显高(平均CB为35.79 μg/g, CD 3.97 μg/g)于周围正常黏膜(平均CB为24.62 μg/g, CD 2.69 μg/g). CB抗原水平和分化等级、Dukes分期明显正相关,但和淋巴结无关. CD抗原水

平和上述的参数指标无关. CB、CD抗原的染色密度从腺瘤到腺癌逐渐增高. CB、CD的染色程度和分化等级、Dukes分期、淋巴结有关. 还有研究表明CB可以和FasL相互作用参与结肠癌的转移^[10].

1.3 细胞膜定位与CB活性 在腺瘤和转移癌细胞中CB呈弥漫性胞质染色, 正常黏膜中呈粗颗粒状染色. Mckerrow *et al*^[8]通过免疫组化法进行定位, 发现CB主要是由有浸润的肿瘤顶端的巨噬细胞表达的. 在研究CB在结肠癌中的定位和活性关系时, Hazen *et al*^[11]发现在正常结肠黏膜中, 隐窝上皮包含有CB蛋白, 但其无活性, 基质中CB蛋白呈中等量表达, 且一般在结肠表皮下的区域才有活性. 在腺瘤组织中, 大部分CB蛋白呈颗粒状分布于管状腺瘤上皮的基底部, 且这部分CB是有活性的, 而基质中CB几乎不表达活性. 在低分化癌上皮内包含有低水平的CB蛋白, 弥漫分布于癌细胞内, 而基质内却包含有高水平的CB蛋白. 与中、高度分化癌比较, 低分化癌细胞中CB活性明显降低, 只有癌细胞的类卫星突起内才显示有CB的高度活性, 此外, 还观察到在血管增生, 炎症反应, 坏死的地方CB活性表达也增高, 这从组织学定位上证明CB参与恶性肿瘤的浸润, 与炎症细胞, 细胞凋亡和坏死有关.

1.4 CB糖蛋白形式 成熟CB有2种形式, 一种为30 ku的单链形式, 一种为双链形式, 为5 ku轻链和25 ku的重链. 在正常结肠黏膜和癌前病变腺瘤中, CB的表达主要是以非糖基化的27 ku形式存在的双链蛋白质. 大多数结肠癌CB的过度表达是在Dukes A、B期, 测得的CB蛋白大多为非糖基化27 ku的成熟双链形式和糖基化的28 K成熟双链形式的蛋白混合物. 癌提取物中的糖基化的CB蛋白对PNGase F(即分解高甘露糖的天冬酰胺连接的多糖又可以分解复杂形式的天冬酰胺连接的多糖)敏感, 而与Endo H(优先水解高甘露糖寡糖)不发生反应, 表明癌中糖基化为一种复杂形式, 而不是单纯高甘露糖形式的糖基化^[12].

2 CB与结肠肿瘤

2.1 CB与新生血管 CB降解细胞外基质和基底膜, 参与肿瘤细胞的浸润和转移, 而肿瘤浸润和转移需新生血管的形成作为前提条件, 血管生成和肿瘤生物学行为紧密相关. 目前认为, 新生血管形成受很多因素影响, 蛋白水解酶在肿瘤的血管生成中起重要作用. 肿瘤血管生成的第一步是血管基底膜的降解, 然后是内皮细胞向肿瘤细胞区移行. 由肿瘤基质中毛细血管和成纤维细胞分泌的CB可能参与降解血管基底膜和细胞外基质, 促使内皮细胞移行和血管生成. 王娅兰 *et al*^[13]发现CB表达只有在强阳性组和阴性组对比时, 微血管密度(MVD, microvessel density)才有统计学意义, 结果表明可能是CB影响血管生成, 也可能是CB降解的产物能促进血管生成. 新生血管的形成是肿瘤生长、转移发展所必须的, 他的形成不仅使肿瘤生长, 而且由于新生血

管基底膜的缺损而提供了癌细胞进入血管的途径, 从而促进肿瘤细胞的血行扩散. 研究表明在结肠癌中, 有血管增生的地方, CB活性表达量也增高^[11]. 说明CB对肿瘤血管的生成具有一定的作用. Kruszewski *et al*^[14]采用免疫组织化学法分析了90例被切除的结肠癌中CB蛋白的过度表达和血管生成强度(angiogenesis density)的联系, 及对预后的影响, 规定: 如果显微镜观察范围内, 有超过50%的癌细胞显示有抗CB的免疫反应性就为CB的过度表达; 3个具有最高血管数量范围的平均值为血管生成强度. 结果显示: 有36例(40%)可见CB的过度表达; 血管生成的增加和CB的过度表达明显相关; 血管密度较高和区域性的淋巴结转移有关; CB的过度表达在较大的年龄组中较常见(年龄大于中位年龄65岁); 按单变量分析时, 区域淋巴结中的转移、血管生成的增加、远处转移对预后有影响. 在原发结肠腺瘤的多变量分析中揭示, 只有当有区域淋巴结中的转移, 以及有远处转移而无血管生成增加时, 具有独立的预后价值. 由此, 可以认为在结肠腺瘤中, 血管生成强度和CB蛋白的过度表达之间有紧密联系, CB和血管生成强度与结肠癌的浸润和转移有关.

2.2 CB mRNA CB表达的调节不仅仅停留在蛋白水平上, 可能从转录或翻译时就发生了. 虽然以往的研究发现CB酶的活性在癌中增高, 但实际上CB mRNA水平的增加要比CB活性增加的更多、更稳定. 癌组织中CB mRNA平均约比正常对照组高3.7倍^[15], 表明结肠癌中CB表达的调节可能存在着转录后或者翻译后的调节. 此外, CB mRNA与Dukes分期呈负相关. 这与研究CB活性时发现CB活性与Dukes分期呈负相关一致. 但有研究^[15]发现Dukes A期表现出最高的CB mRNA水平, Dukes D期表达出较高的mRNA水平, Dukes B、C期的水平相对较低, 认为CB的分泌可能和结肠癌早期浸润和晚期远处转移有关. 肿瘤中CB表达增加这种特异性质存在局部浸润组织和已有远处转移的组织中. Northern blot 数据表明结肠癌中CB mRNA的增加主要是由于2.2-kilobase和4.0-kilobase转录体数量发生改变(正常组中也可见), 此外还有另外两种CB mRNA转录体(1.5和3 kilobase大小)也存在于肿瘤组织中. 人类肿瘤中CB mRNA主要是缺乏exon2(外显子2), 乳腺癌、结肠癌和黑色素瘤中包含一种CB转录体, 这种转录体还缺少exon3(外显子3), 其编码信号肽和7个活性前肽片断. 体内的转录/翻译分析表明这种信息片断将从内部的蛋氨酸密码子开始翻译, 并产生一个32 ku的缺乏信号肽和大半前肽的产物. 同时这种转录/翻译分析还发现: 缺乏exon2, exon3 CB mRNA: 缺乏exon2 CB mRNA: 包含5'末端全长的mRNA的翻译后的相对比率为8:2:1. 这些结果表明组织中CB表达在某种程度上是在mRNA水平上进行处理调控的. 在乳腺癌和结肠癌中, CB有12个exon和11个intron组成, 正常时, 其启动于exon3, 而肿瘤中由于exon 2、exon3都缺失, 形成了一特殊的

CB mRNA 产物, 因其缺失信号肽, 所以 CB 蛋白质合成后不能经内质网途径进入溶酶体, 而弥散于胞质中.

2.3 CB 与 ras 基因 结肠癌的发生是多步骤多基因调节的过程. 结肠癌的发生最初是 APC 抑癌基因的突变, 开始有息肉生成; 然后 K-ras 癌基因的突变激活, 形成良性二级腺瘤; 抑癌基因 DCC 的失活, 三级腺瘤的形成; p53 基因失活, 肿瘤开始恶化, 形成癌^[16]. ras 转染的细胞具有转移潜能. 肿瘤的转移过程有很多影响因素, 包括: 细胞间的联系, 细胞-基质相互作用和细胞内外的微环境改变. 肿瘤细胞需要通过蛋白酶的不正常表达克服宿主屏障, 如基底膜, 从而有助于局部浸润或远处转移. 当恶性肿瘤细胞浸润周围连接组织时, 基质蛋白酶对局部基底膜和其他结构蛋白的降解是必需的 (基质蛋白酶包括金属蛋白酶 MMP, 丝氨酸蛋白酶, 天冬氨酸蛋白酶, 半胱氨酸蛋白酶). ras 基因有 H-ras, K-ras, N-ras 三种, ras 可以通过点突变或过度表达来激活: 约 40-50% 结肠癌有 ras 突变, 主要位于 K-ras 基因的 12 或 13 位密码子 (codons); 约 70% 的结肠癌中都有 N-ras 的过度表达, 但单独的 N-ras 过度表达并不能诱导 CB 或 CL 活性水平. 与具有正常 N-ras 蛋白组织相比, 只有当 K-ras 或 N-ras 突变时产生的变异的 (altered) N-ras 蛋白存在于结肠癌中时, 才可表达较高的 CB, CL 活性. 此结果表明, 伴有 K-ras 突变或伴有变异形式 (altered forms) N-ras 蛋白时的结肠癌可能诱导 CB 或 CL 表达水平来增加肿瘤发生的潜能. Cavallo-Medred *et al*^[17] 采用免疫荧光和亚细胞分离技术对人类结肠癌细胞系 HCT116 (有 K-ras 突变) 和其子系 HKh-2 研究发现, CB 定位于结肠癌细胞的表面上的细胞膜穴样内陷 (caveolae) 内, 分布于 HCT116 细胞膜穴样内陷中的 CB 要比 HKh-2 中的要多, CB 定位受 K-ras 的突变调节. 这是由于 HKh-2 中活性 K-ras 的缺失, 减少了处于稳定状态的 p11 和 caveolin-1, 从而减少了 p11 在细胞膜穴样内陷中的分布 (p11 是肿瘤细胞表面 CB 结合部位). 可见, 在肿瘤进展时, CB 参与细胞膜表面尤其是 CB 结合部位蛋白水解反应.

2.4 CB 与预后 CB 参与肿瘤的浸润和转移, 因此 CB 的表达是否与患者的预后有关也是研究的热点之一, 这对判断患者生存期的长短具有一定的指导意义. Padilla *et al*^[18] 用 COX 和 Kaplan-meier 法进行生存分析发现, 结肠癌术前患者血清 CB 水平为 6.94 (3.57-11.6 $\mu\text{g/L}$), 而免疫组化法测得的 CB 阳性率为 66.9 (10-90%). 和对照组相比, 结肠癌血清中的 CB 和免疫组化值都有显著的升高, 并且发现血清中 CB 水平越高, 患者的生存时间越短. 可见, CB 可以作为一个独立的结肠癌的肿瘤预后标志物, 术前血清 CB 水平超过 6.94 $\mu\text{g/L}$, 提示预后不好, 生存时间缩短. 而 Kos *et al*^[19] 在 COX 单变量比例风险模型分析中 (univariate cox proportional hazards model) 也有类似结果, 但 CB 最佳截点值 (cutoff value) 为 9.4 $\mu\text{g/L}$ 时, 相对危险比率 (relative hazard ratio) 为 1.8,

中点观察时间为 4.4 (3.2-5.5 a). 在多变量分析中, Dukes 分期对其影响最强, 其次是年龄. 血清中 CB, CEA 分子水平都高的患者比二者都低的患者生存期缩短, 相对危险比率 2.2. 此外, CB, CL 活性越高, 患者生存期越短, 二者呈负相关^[20]. 肿瘤上皮细胞中 CB 高水平表达的患者, 生存期也明显缩短.

3 CB 和抑制剂

组织蛋白酶 B 的抑制剂主要包括 stefin A, stefin B, cystatin C (CC), 其中 cystatin C 是对 CB 抑制最强的抑制剂, kininogens 也是 CB 的抑制剂, 但作用较弱. 抑制剂广泛存在于人体的体液中, 在结肠癌患者的血清, 癌细胞提取物, 及腹水中都可以测到抑制剂的存在, 在不同体液中, 抑制剂的含量也存在明显差异. Kos *et al*^[21] 测得结肠癌患者血清中 stefin A, cystatin C 中等程度增加 (各为 1.4 倍和 1.6 倍), 而 stefin B 并没有明显改变, 这与各个抑制剂发挥不同的调节机制和功能有关. 虽然抑制剂的含量增加, 但增加的 CB 酶活性并未被相应增加的抑制剂平衡, 即 CB 和抑制剂处于失衡状态, 最终结果是 CB 浸润作用依然存在, 故有人把 CB 与抑制剂的比值作为诊断肿瘤恶性程度的指标. 在分析抑制剂和患者预后时, Kos *et al*^[21] 发现, 只有 stefin B 和 cystatin C 与生存有关, 高水平的 stefin B, cystatin C 患者死亡风险明显增高, 结果显示高水平的半胱氨酸蛋白酶抑制剂与结肠癌患者生存期缩短有关. Zore *et al*^[22] 发现结肠癌患者血清的 CB/CC 在处于 Dukes C, D 期的水平明显低于 Dukes A, B 期时的水平. 此结果显示, 结肠癌患者的血清中 CB 并没有被其抑制剂 cystatin C 所削弱, 说明随着肿瘤的进展, CB 和 cystatin C 二者失衡, 可能是 cystatin C 表达减少和 (或) CB 表达增多, 在肿瘤进展时, 抑制剂的表达相对受到抑制. 当 CB 和抑制剂之间的失去平衡, 将促进结肠癌发生发展, 有可能为 CB 表达的增多或者是抑制剂表达减少, 或者为二者同时发生变化. stefin A 与 LN, FN 分子结构上有高度的同源形, 尤其是与细胞结合的片段, 故 stefin A 可抑制癌细胞的黏附力, 从而阻断了肿瘤转移的始动因素, 阻止了 CB 对 LN, FN 的降解, 还可以间接的抑制 MMP 等的激活, 抑制 CB 降解过程.

在体外条件下, 有研究表明 CB 单克隆抗体可以特异的和 CB 结合, 封闭酶活性中心, 对抑制肿瘤细胞扩散有一定作用^[23], 但因其为鼠源性异种蛋白, 限制了其在人体的应用. 制备 CB 嵌合抗体, 则可以大大降低抗体用于人体引起的排斥反应. 在体外条件下, 已有人研究如何抑制 CB 的分泌. 樊晓辉 *et al*^[24] 利用基因工程方法, 将构建的人-鼠嵌合抗体基因转染中国仓鼠卵巢细胞, 并得到表达, 体外能抑制 Ras-transformed MCF-10A neo T 细胞株. 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的嵌合抗体对癌细胞浸润的抑制率就可达 23%, 这提示该人-鼠嵌合抗体在抗 CB 异常分泌的疾病如癌症方面具有良好的应用前

景. 是否这种嵌合抗体对结肠癌也有相应的一直作用还有待进一步研究. 有研究表明, 具有活性的 cystatin C 能够有效的减缓结肠癌细胞的浸润生长^[25].

总之, 初分泌的无活性的 CB 必须在一定的 pH 值或其他酶的存在下才能激活为有蛋白水解活性的 CB, 从而发挥其在结肠癌中的恶性潜能: 在结肠癌组织中表达增加, 细胞膜中的特异定位, 降解细胞外基质, 基底膜, 促进肿瘤的浸润和转移, 由于 CB 在腺瘤和结肠癌的表达差异可以把 CB 作为区别二者的敏感标志. CB 还可能参与肿瘤新生血管的形成, 促进肿瘤的生长. 从分子生物角度来看, CBmRNA 的水平在早期结肠癌中增加的更明显, 比蛋白更具稳定性, 推测可能存在转录或翻译后的调节, 具体机制尚待进一步研究. 在结肠癌组织中还发现抑制剂与 CB 的平衡作用也参与肿瘤的发生发展过程. 如何应用 CB 抗体或抑制剂抑制结肠癌的浸润生长成为近年来研究热点.

4 参考文献

- 1 沈洁, 陈向荣. 胃癌组织组织蛋白酶活性测定的临床意义. 世界华人消化杂志 1999;7:147-149
- 2 van der Stappen JW, Williams AC, Maciewicz RA, Paraskeva C. Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D. *Int J Cancer* 1996;67:547-554
- 3 Corticchiato O, Cajot JF, Abrahamson M, Chan SJ, Keppler D, Sordat B. Cystatin C and cathepsin B in human colon carcinoma: expression by cell lines and matrix degradation. *Int J Cancer* 1992;52:645-652
- 4 Matsuoka Y, Tsushima H, Koga Y, Mihara H, Hopsu-Havu VK. An inactive cathepsin B-like enzyme and cysteine proteinase inhibitors in colon cancer ascites. *Neoplasma* 1992;39:107-114
- 5 Satoh Y, Higashi T, Nouse K, Shiota T, Kinugasa N, Yoshida K, Uematsu S, Nakatsukasa H, Nishimura Y, Tsuji T. Cathepsin B in the growth of colorectal cancer increased activity of cathepsin B in human colorectal cancer. *Acta Med Okayama* 1996;50:305-311
- 6 Chabowski A, Skrzydlewska E, Sulkowska M, Famulski W, Sulkowski S, Chrzanowska A. The activity of cathepsin B in colorectal adenocarcinoma. *Pol Merkuriusz Lek* 2001;11:330-333
- 7 Khan A, Krishna M, Baker SP, Banner BF. Cathepsin B and tumor-associated laminin expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma. *Mod Pathol* 1998;11:704-708
- 8 McKerrow JH, Bhargava V, Hansell E, Huling S, Kuwahara T, Matley M, Coussens L, Warren R. A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma. *Mol Med* 2000;6:450-460
- 9 Talieri M, Papadopoulou S, Scorilas A, Xynopoulos D, Arnogianaki N, Plataniotis G, Yotis J, Agnanti N. Cathepsin B and cathepsin D expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma. *Cancer Lett* 2004;205:97-106
- 10 左富义, 李世拥, 安萍, 于波, 蔡慧芸. 蛋白质酵母双杂交系统的建立及其在大肠癌肝转移研究中的意义. 中华外科杂志 2004;42:672-674
- 11 Hazen LG, Bleeker FE, Lauritzen B, Bahns S, Song J, Jonker A, Van Driel BE, Lyon H, Hansen U, Kohler A, Van Noorden CJ. Comparative localization of cathepsin B protein and activity in colorectal cancer. *J Histochem Cytochem* 2000;48:1421-1430
- 12 Iacobuzio-Donahue CA, Shuja S, Cai J, Peng P, Murnane MJ. Elevations in cathepsin B protein content and enzyme activity occur independently of glycosylation during colorectal tumor progression. *J Biol Chem* 1997;272:29190-29199
- 13 Wang YL, Lin X. Cathepsin B expression and its relationship with microvessel density and biological behaviour of colorectal carcinoma. *Chine J Cancer Res* 2002;14:293-296
- 14 Kruszewski WJ, Rzepko R, Wojtacki J, Skokowski J, Kopacz A, Jaskiewicz K, Drucis K. Overexpression of cathepsin B correlates with angiogenesis in colon adenocarcinoma. *Neoplasma* 2004;51:38-43
- 15 Hirai K, Yokoyama M, Asano G, Tanaka S. Expression of cathepsin B and cystatin C in human colorectal cancer. *Hum Pathol* 1999;30:680-686
- 16 陈诗书, 汤雪明. 医学细胞与分子生物学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2003:702
- 17 Cavallo-Medved D, Dosescu J, Linebaugh BE, Sameni M, Rudy D, Sloane BF. Mutant K-ras regulates cathepsin B localization on the surface of human colorectal carcinoma cells. *Neoplasia* 2003;5:507-519
- 18 Padilla D, Cubo T, Molina JM, Garcia M, De la Osa G, Palomino T, Pardo R, Martin J, Arevalo E, Hernandez Calvo J. Prognostic significance and clinic utility of serum and immunohistochemical cathepsin B levels in colorectal cancer. *An Med Interna* 2003;20:521-525
- 19 Kos J, Nielsen HJ, Krasovec M, Christensen IJ, Cimerman N, Stephens RW, Brunner N. Prognostic values of cathepsin B and carcinoembryonic antigen in sera of patients with colorectal cancer. *Clinical Cancer Res* 1998;4:1511-1516
- 20 Troy AM, Sheahan K, Mulcahy HE, Duffy MJ, Hyland JM, O'Donoghue DP. Expression of cathepsin B and L antigen and activity is associated with early colorectal cancer progression. *Eur J Cancer* 2004;40:1610-1616
- 21 Kos J, Krasovec M, Cimerman N, Nielsen HJ, Christensen IJ, Brunner N. Cysteine proteinase inhibitors stefin A, stefin B, and cystatin C in sera from patients with colorectal cancer: relation to prognosis. *Clin Cancer Res* 2000;6:505-511
- 22 Zore I, Krasovec M, Cimerman N, Kuhelj R, Werle B, Nielsen HJ, Brunner N, Kos J. Cathepsin B/cystatin C complex levels in sera from patients with lung and colorectal cancer. *Biol Chem* 2001;382:805-810
- 23 Fan X, Kopitar-Jerala N, Premzl A, Bestagno M, Burrone O, Kos J. Molecular cloning and chimerisation of an inhibitory anti-cathepsin B antibody and its expression in Chinese hamster ovary cells. *Biol Chem* 2002;383:1817-1820
- 24 樊晓辉, Natasa KJ, Ales P, Janko K. 抗人组织蛋白酶B人-鼠嵌合抗体的表达及体外对癌细胞浸润的抑制效应. 中华微生物学和免疫学杂志 2003;23:910-913
- 25 Ogawa M, Jing H, Kitts DD, Nakai S, Nakamura S. In vitro anti-cancer activities in Caco-2 and HCT-116 cells of recombinant cystatin C prepared by a Pichia expression system. *J Med Food* 2003;6:317-322