

HBV相关性肝细胞癌及肝硬化患者外周血单个核细胞质谱分析

钟白云, 范学工, 刘蔚东, 黄燕, 邹明祥

■背景资料

蛋白质组学是继基因组学之后出现的一门新兴学科, 是当今生命科学研究领域的热点。肝细胞癌(HCC)是目前全球发病率高的恶性肿瘤之一, 目前对HCC蛋白质组的研究, 国内外主要针对HCC细胞株、癌组织等进行研究。

钟白云, 范学工, 黄燕, 邹明祥, 中南大学湘雅医院感染病科 湖南省长沙市 410008

刘蔚东, 中南大学湘雅医院卫生部肝胆肠外科研究中心 湖南省长沙市 410008

钟白云, 1998年中南大学湘雅医学院硕士, 副教授, 现在中南大学湘雅医院攻读博士, 从事肝癌的早期诊断及感染与免疫的研究。

通讯作者: 范学工, 410008, 湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院感染病科. xgfan@hotmail.com

电话: 0731-4327392

收稿日期: 2006-08-22 接受日期: 2006-09-25

Mass spectrometric analysis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis B virus associated hepatocellular carcinoma or liver cirrhosis

Bai-Yun Zhong, Xue-Gong Fan, Wei-Dong Liu, Yan Huang, Ming-Xiang Zou

Bai-Yun Zhong, Xue-Gong Fan, Yan Huang, Ming-Xiang Zou, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hu'nan Province, China

Wei-Dong Liu, National Hepatobiliary and Enteric Surgery Research Center, Ministry of Health, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hu'nan Province, China

Correspondence to: Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital of Central South University, 87 Xiangya Road, Changsha 410008, Hu'nan Province, China. xgfan@hotmail.com

Received: 2006-08-22 Accepted: 2006-09-25

Abstract

AIM: To establish two-dimensional electrophoresis (2-DE) maps of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with hepatitis B virus (HBV) associated hepatocellular carcinoma (HCC) or liver cirrhosis (LC), and identify the differentially expressed proteins.

METHODS: The total proteins from PBMC in patients with HBV associated HCC ($n = 16$) or LC ($n = 12$) were separated by means of immobilized pH gradient-based 2-DE. The differentially expressed proteins were screened using PDQuest analysis software, and then identified

by peptide mass fingerprint (PMF) based on matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and database searching.

RESULTS: A well-resolved and reproducible 2-DE pattern of PBMC was obtained from patients with HBV associated HCC or LC. For HCC, the mean number of protein spots was 1186 ± 43 , with an average matching rate of 91.6%, and for LC, the mean number of protein spots was 1013 ± 41 , with an average matching rate of 90.2%. Twenty-seven differential proteins were tested by MALDI-TOF-MS, and 16 were identified. Of the 16 proteins, 13 were up-regulated in patients with HCC, including heat-shock protein 27, member RAS oncogene family (RAB14), actin, alpha 1 antitrypsin, RNA-binding protein regulatory subunit and so on. By contrast, the levels of proteins such as PDX6, HSPA8 and MnSOD were significantly reduced in HCC patients. Some of these proteins participated protein synthesis and degradation, or chaperone, or protection and detoxification, or signal transduction, while some of them were involved in metabolism or cytoskeleton construction.

CONCLUSION: A well-resolved and reproducible 2-DE pattern of PBMC from patients with HBV related HCC or LC is established, and sixteen differentially expressed proteins were characterized.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Hepatitis B virus; Leukocytes; Mononuclear cell; Liver cirrhosis; Proteome; Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry

Zhong BY, Fan XG, Liu WD, Huang Y, Zou MX. Mass spectrometric analysis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis B virus associated hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):254-259

摘要

目的: 建立HBV相关性肝细胞癌(HCC)及肝硬化(LC)患者外周血单个核细胞(PBMC)的双向凝胶电泳图谱, 并识别鉴定其差异表达

的蛋白质.

方法: 利用固相pH梯度双向凝胶电泳分离HBV相关性HCC($n = 16$)及LC患者($n = 12$)PBMC的总蛋白质, 凝胶经蓝银显色后, PDQuest图像分析软件进行比较分析、识别差异表达的蛋白质, 应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)得到相应的肽质指纹图谱, 然后搜索数据库鉴定部分差异蛋白质点.

结果: 得到了分辨率较高、重复性较好的HBV相关性HCC及LC患者PBMC双向凝胶电泳图谱, HBV相关性HCC及LC患者PBMC凝胶的平均蛋白质点数分别为 1186 ± 43 及 1013 ± 41 ; 组内的平均匹配率分别为91.6%, 90.2%. 对27个差异蛋白质点进行了质谱分析, 鉴定出16个蛋白质, 在HBV相关性HCC患者PBMC中表达明显增强的有热休克蛋白(HSP)27、*ras*癌基因家族(RAB14)、肌动蛋白、 α_1 -抗胰蛋白及RNA结合蛋白调节亚基等13个蛋白点; 而PDX6、HSPA8及锰超氧化物歧化酶(MnSOD)在HCC患者PBMC中低表达. 这些差异蛋白质点包括蛋白质合成与分解、分子伴侣、解毒和DNA修复相关蛋白质、三大代谢相关酶类、细胞结构相关蛋白质以及信号传导相关蛋白质六类.

结论: 建立了分辨率高且重复性较好的HBV相关性HCC及LC患者PBMC双向凝胶电泳图谱, 并识别鉴定出了一些与HBV相关性HCC癌变相关的差异表达的蛋白质.

关键词: 肝细胞癌; 乙型肝炎病毒; 单个核细胞; 肝硬化; 蛋白质组; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

钟白云, 范学工, 刘蔚东, 黄燕, 邹明祥. HBV相关性肝细胞癌及肝硬化患者外周血单个核细胞质谱分析. 世界华人消化杂志 2007;15(3):254-259
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/254.asp>

0 引言

肝细胞癌(HCC)是全球发病率高的恶性肿瘤之一, 乙型肝炎病毒(HBV)感染是HCC的主要致病因子之一. 目前对HCC蛋白质组的研究, 国内外主要针对HCC细胞株、癌组织等^[1-5]. 本课题组前期已对HBV相关性HCC癌组织、肝硬化组织和慢性肝炎组织等进行了蛋白质差异分析研究^[6]. 但对HCC组织进行活检是侵入性的和创伤性的研究. 外周血单个核细胞(PBMC)是机体重要的免疫细胞, 与肝炎的发生、发展及诊断相

关^[7-8], 我们推测与HBV相关性HCC的发生及发展也可能存在着某些关系. 因而采用蛋白质组学方法研究PBMC, 试图寻找HCC早期诊断的有效指标, 为HCC的早期诊断、治疗及预后监测提供科学依据.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-12/2005-12住院患者28例, 男22例, 女6例; 年龄19-64(平均43.6)岁. 其中慢性乙型肝炎肝硬化(LC)12例, 诊断标准符合2000-09(西安)病毒性肝炎防治方案^[9], AFP阳性3例, 阴性9例. HBV相关性HCC16例, 符合原发性HCC临床分期I期标准^[10], 经病理切片证实, AFP阳性14例, 阴性2例. 所有患者均排除HAV, HCV, HDV, HEV及HIV病毒的混合或重叠感染.

2D Quant Kit定量试剂盒、尿素、硫脲、NP-40、Triton X-100、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺及固相pH梯度干胶条(IPG strip pH3-10NL, 24 cm)等为Amersham Biosciences产品; 过硫酸铵、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、硫代硫酸钠、碳酸氢铵、铁氰化钾、三氟乙酸及乙腈等为Sigma-Aldrich公司产品; 胰蛋白酶(Trypsin)为Promega公司产品; 余为国产分析纯. IPGphor等电聚焦仪、Ettan DALT垂直电泳槽及Image Scanner扫描仪(Amersham Biosciences公司); 低温高速离心机(Beckman公司); 恒温水箱(英国Grant公司); 真空冷冻干燥仪(Savant speed Vac & UVS400); Voyager-DE STR 4307 MALDI-TOF-MS质谱仪(Applied Biosystem公司). LabScan扫描软件及Data Explorer质谱分析软件(Applied Biosystem公司产品); PDQuest双向凝胶图谱分析软件(Bio-Rad公司产品); Mascot Distiller质谱信号峰识别软件及Mascot肽质量指纹图数据库查询软件(Matrixscience公司产品).

1.2 方法 每例研究对象空腹采血10 mL-15 mL, 分离PBMC, 置于-70℃. 采用Amersham Biosciences公司专门针对蛋白质组学研究的蛋白质抽提设计的2D Quant Kit定量试剂盒, 按说明操作.

1.2.1 双向凝胶电泳 第一向固相pH梯度等电聚焦; 第二向垂直SDS-PAGE电泳, 将平衡后的胶条移至PAGE分离胶上端, 在一向IPG胶条的酸性端放置双向凝胶电泳标准蛋白质, 排净气泡后用5 g/L的琼脂糖封胶^[11]. 电泳条件为: 2.5 W/胶电泳30 min, 然后以12 W/胶恒功率

■ 研发前沿

HCC的早期诊断、癌变机制及发现新的生物治疗靶点等是目前HCC研究热点和重点, 应用新技术去发现具有高度特异性和灵敏度的HCC早期分子标记, 对于HCC的高危人群, 尤其是慢性HBV感染者, 显得尤为迫切.

■应用要点

外周血单个核细胞(PBMC)是机体重要的免疫细胞,采用蛋白质组表达差异分析研究HCC及肝硬化患者PBMC,试图寻找HCC早期诊断有效指标,为HCC的早期诊断、治疗及预后监测提供科学依据。此种微创方法利于健康筛查。本文建立的PBMC蛋白质组表达差异分析方法,也可用于其他恶性肿瘤等疾病的研究,为寻找其诊断的分子标志、治疗及预后监测发挥作用。

表 1 HBV相关性HCC及LC病人PBMC差异表达蛋白质点

编号	序列号	蛋白质名称	标记	等电点 ¹	分子量(M _r) ¹	蛋白功能
03	gi 4758638	peroxiredoxin 6(PDX6)	↓	6.00	25 130	保护与细胞解毒
04	gi 54696638	HSP 27 protein	↑	5.98	22 830	分子伴侣
05	gi 55957331	RAB14, member RAS oncogene family	↑	5.94	20 510	信号传导
07	gi 3219762	Actin	↑	4.66	37 520	细胞骨架
08	gi 28193184	unamed protein product	↑	5.10	35 330	未明功能
09	gi 942629	Alpha 1 antitrypsin	↑	5.37	44 280	蛋白质合成与分解
10	A27077	HSPA8 protein (Fragment)	↓	5.42	71 080	分子伴侣
11	1FZAB	fibrinogen fragment d, chain B-	↑	7.66	36 330	止血与凝血
12	gi 35053	uracil DNA glycosylase(UNG)	↑	8.22	35 700	DNA修复与调节
13	gi 67464046	Chain Q, Crsytal Structure Of Human Liver GAPDH	↑	8.58	36 480	新陈代谢
17	A37378	Glutathione transferase (EC 2.5.1.18)	↑	5.43	23 570	分子伴侣
20	gi 600075	beta-actin	↑	5.26	18 090	细胞骨架
23	gi 72071136	similar to Trafficking protein particle complex subunit 1	↑	6.08	17 480	运输与结合
25	AAC12806	RNA-binding protein regulatory subunit	↑	6.33	20 500	癌基因与抑癌基因相关蛋白
26	gi 2780819	Chain B, Human Manganese Superoxide Dismutase Mutant Q143n(MnSOD)	↓	6.86	22 290	保护与细胞解毒
27	gi 32891807	biliverdin reductase B flavin reductase (NADPH)	↑	7.13	22 210	新陈代谢

¹来自数据库的理论物质的相对分子质量和等电点; ↑表示HCC组比LC组蛋白质斑点上调3倍以上; ↓表示HCC组比LC组蛋白质斑点下调3倍以上。

电泳,直至溴酚兰指示线到达凝胶底边处停止电泳。将凝胶从玻璃板上剥离下来,双蒸水清洗三次后进行蓝银显色。蓝银染色方法即为改进的传统胶体考染法(Blue silver法)^[12]。凝胶经Imagescanner扫描仪及LabScan扫描软件扫描,获取图像(分辨率为300 DPI),图像和凝胶大小比例为1:1,用PDQuest图象分析软件依次进行点检测、背景消减、标准化、匹配、建立平均凝胶、比较差异等分析。所有数据的统计分析在Excel及SPSS11.0软件上进行。

1.2.2 质谱分析 首先切割选定蛋白质点并置于1.5 mL的Eppendorf管中,超纯水反复冲洗干净后脱色,待凝胶的蓝色消褪后弃去脱色工作液,加超纯水反复冲洗至无色,再加入乙腈脱水2次,使胶块萎缩变白并黏在一起后,去掉乙腈,置于真空冷冻干燥仪中抽干;然后用胰酶37℃酶解24 h或过夜。酶解完成后,将样品萃取、脱盐、抽干浓缩及点样,室温干燥待测。将制备好的点样板放入Voyager-DE STR 4307 MALDI-TOF-MS质谱仪中进行分析,采用反射模式,正离子谱测定,离子源加速电压为20 000 V,反射电压比为1.12, N₂激光波长337 nm,脉冲宽度为3 ns,离子延迟提取100 ns,真空度4×10⁻⁷Torr,质谱

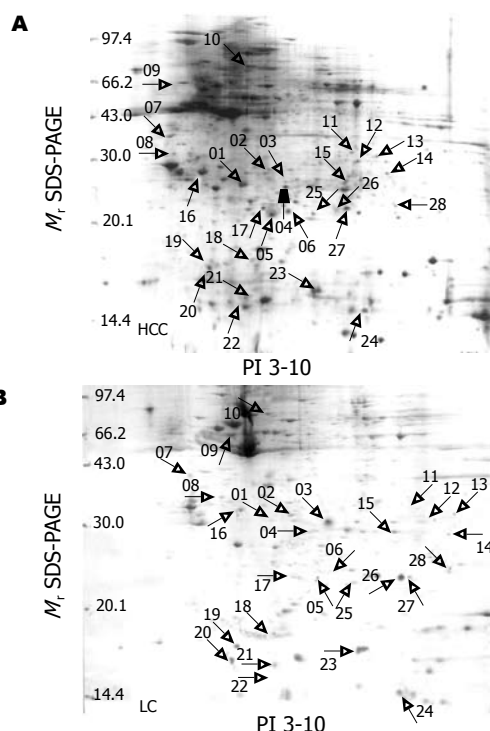


图 1 HBV相关性HCC及LC患者PBMC双向电泳图谱。水平轴为等电点方向;垂直轴为相对分子质量方向;箭头所示为差异蛋白点。

信号单次扫描累加50次,使用ACTH作为外部标准,胰蛋白酶自切降解峰(842.510, 2211.105)作为内部标准校正,获得肽质量指纹图(PMF)。

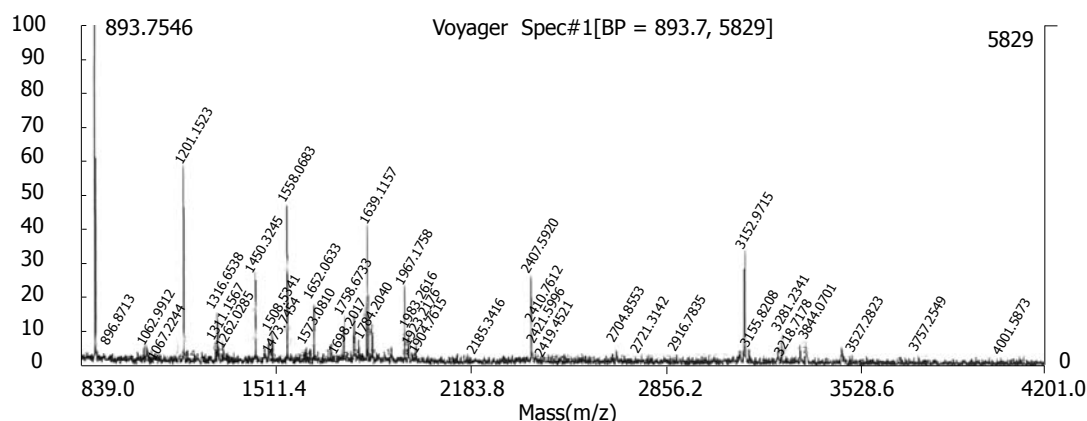


图2 HBV相关性HCC及LC患者PBMC双向电泳图谱蛋白质点05的肽质量指纹图谱. x轴为质荷比(m/z), y轴为相对强度; 峰旁标示的数字代表肽片段的单同位素峰 $[M+H]^+$ 的质量数.

■名词解释

蛋白质组: 即“proteome”, 定义为“一种基因组所表达的全部蛋白质”, 是1994年澳大利亚Macquarie大学的Wilkins和Williams *et al*在意大利的一次科学会议上首次提出的. 这个新术语很快得到了国际生物界的认可, 并成为当今生命科学研究领域的热点.

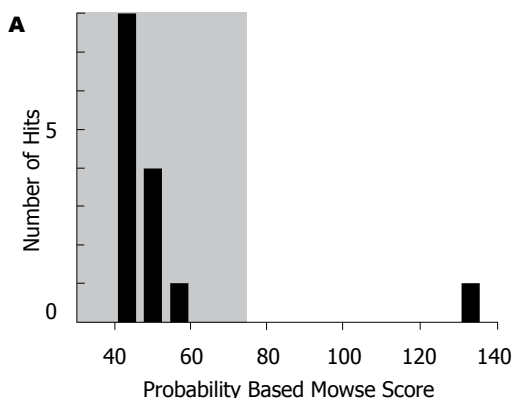


图3 05号蛋白质得分与蛋白质数据库查询到gil55957331蛋白质的匹配和序列覆盖情况. A: Mascot得分示意图: x轴为Mascot得分, y轴为匹配的个数, 得分超出阴影区表示得到阳性鉴定($P < 0.05$); B: 所鉴定RAB14蛋白质的等电点、相对分子质量、序列和通过质谱分析多肽片段得到氨基酸残基序列.

B MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: gil55957331 Score: 136 Expect: 3.7e-09
RAB14, member ras oncogene family [homo sapiens]
Nominal mass (M_r) 20510, Calculated pI Value: 5.94
NCBI BLAST search of [gil55957331](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from

NCBI Entrez: [gil73536235](#) from [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl(C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass Values searched: 31

Number of mass Values matched: 13

Sequence Coverage: 57%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MATAPYNYSY IFKYIIIGDM GVGKSCLLHQ FTEK**KFMADC PHTIGVEFGT**
51 **R**IIIVSGQKI **K**LQIWDTAGQ **E**RFRAVTRSY YRGAAGALMV YDITRRSTY
101 **H**LSSWLTDAR **N**LNTNPNTVII **L**IGNKADLEA **Q**RDVITYEAK **Q**FAEENGLF
151 **L**EASAKTGEN VEDAFLEAAK KIYQNIQDGS L

获得的PMF图谱用Mascot Distiller软件识别单同位素信号峰, 获得的肽片段的质荷比(m/z)数值输入Mascot查询系统进行检索. 搜索数据库为SWISS-PROT和NCBI蛋白质数据库, 其他搜索条件为: 肽片段质量800-5 000 Da, 表观等电点的误差范围为 ± 0.5 pH, 表观相对分子质量的误差范围为 $\pm 20\%$, 肽片段质量最大允许误差为100 ppm, 允许漏切的胰酶酶切位点数为1个, 物种来源为人类(*Homo sapiens*), 离子种类选择 $[M+H]^+$ 和单同位素峰(monoisotopic), 固定修饰为半胱氨酸碘乙酰胺化(carbamidomethyl).

2 结果

2.1 HBV相关性肝细胞癌、肝硬化患者PBMC蛋白质双向电泳图谱 PBMC总蛋白质经双向凝胶电泳分离, 蓝银显色后得到背景清晰、分辨率高、重复性好2-DE图谱. HBV相关性HCC及LC患者PBMC凝胶的平均蛋白质点数分别为 1186 ± 43 及 1013 ± 41 ; 组内的平均匹配率分别为91.6%, 90.2%(图1).

2.2 差异蛋白质点的MALDI-TOF-MS肽质指纹图分析 通过PDQuest软件分析HBV相关性HCC及LC患者PBMC差异表达的蛋白质, 随机选取至少在50%的凝胶中均有相同变化及表达量相差3倍以上的差异点共27个通过胶内原位酶解进行MALDI-TOF-MS肽质量指纹图的测定, 并以胰蛋白酶自切降解峰作为内部标准校正, 获得23张PMF. 图2为蛋白质点05的肽质量指纹图谱. 利用Mascot Distiller软件搜索SWISS-PROT和NCBI蛋白质数据库, 将查询到的结果再结合双向凝胶电泳图谱上相应点的表观等电点、相对分子质量、匹配肽段的多少(4个片段以上)和覆盖率($>15\%$)等进行综合分析, 寻找与之匹配的相关蛋白质, 鉴定的蛋白质名称及相应的相对分子质量和等电点见表1. (图3为上调05号蛋白质得分及其在蛋白质数据库查询到

■同行评价

本课题以HBV相关性HCC及肝硬化患者PBMC为研究对象,对PBMC的蛋白质进行了分析鉴定,选题较新颖,文题简明、切题,摘要内容完整,研究对象明确,实验结果可靠,具有较好的科学性和创新性,一定程度上反映了我国HBV相关性HCC的蛋白质组学研究的水平。

gi|55957331蛋白质的匹配和序列覆盖情况。

3 讨论

PBMC是机体重要的免疫细胞,在多种疾病发生、发展、治疗及预后判断过程中发挥重要作用^[7,13]。HBV相关性HCC患者体内HBV与肿瘤细胞本身及其产物刺激机体,免疫细胞就会识别这些“非己”成分,产生能抵抗“非己”成分的特殊物质,从而破坏和排斥进入体内的病原体和肿瘤细胞等,以便维持人体内部环境的平衡和稳定。在此过程中可能会出现一些与HCC诊断、治疗及监测预后密切相关的分子标记, Wang *et al*^[14]从PBMC中分离自然杀伤细胞(NK)体外培养增殖用于杀伤培养的HCC细胞,探讨HCC的免疫治疗。Mou *et al*^[13]报道检测PBMC中MAGE基因mRNA水平可早期预测HCC转移及评估预后。但从蛋白质组学探索PBMC寻找HCC诊断及治疗文献罕见。血清中含高丰度的白蛋白、免疫球蛋白及补体,如何有效去除这些蛋白质,是目前血清蛋白质组学的一道屏障。PBMC较血清成份易于分离与纯化,且是重要的免疫细胞,于是我们摸索建立了重复性较好HBV相关性HCC及LC患者PBMC蛋白质表达谱。PBMC凝胶的平均蛋白质点数分别为 1186 ± 43 及 1013 ± 41 ;组内的平均匹配率分别为91.6%, 90.2%。我们采用改进的考染方法-蓝银染色法对2-DE凝胶进行显色,胶本身着色较浅、背景好,灵敏度优于传统的考染方法。蓝银染色方法的灵敏度可达1纳克/蛋白点,明显优于传统的胶体考染法。经PDQuest软件分析,随机选取27差异蛋白点进行MALDI-TOF-MS肽质量指纹图的测定,共鉴定出16个蛋白质见表1,在HBV相关性HCC患者PBMC中表达明显增强的有热休克蛋白质(HSP)27、ras癌基因家族(RAB14)、肌动蛋白(Actin)、 α_1 -抗胰蛋白酶(Alpha 1 antitrypsin)、RNA结合蛋白调节亚基(RNA-binding protein regulatory subunit)等13个蛋白点;而PDX6、HSPA8及锰超氧化物歧化酶(MnSOD)在HCC患者PBMC中低表达。

初步鉴定的差异蛋白点,根据SWISS-PROT和NCBI蛋白质数据库中提供的功能信息进行了分类:包括蛋白质合成与分解、分子伴侣、解毒和DNA修复相关蛋白质、三大代谢相关酶类、细胞结构相关蛋白质以及信号传导相关蛋白质六类。因为所鉴定的蛋白质具有不同的功能,这反映出肿瘤发生、发展机制非常复杂。其中一部分是参与基本物质代谢和能量产生的

蛋白质,这些蛋白质共同完成了一些细胞的基本生物学过程,如三羧酸循环,糖酵解等;一部分与肿瘤发生及发展密切相关^[15-16],如RNA结合蛋白调节亚基、ras癌基因家族;还有一大类蛋白质被统称为分子伴侣(chaperone)^[17-19],如参与细胞在热休克、损伤、感染等不利条件下的应激反应的HSP以及DNA修复及调节(uracil DNA glycosylase, UNG)等蛋白质;其他蛋白质的功能涉及细胞防御,抗氧化,以及信号传导等。

哺乳动物的ras基因家族有三个成员,分别是H-ras、K-ras、N-ras,各种ras基因具有相似的结构,均由4个外显子组成,分布于全长约30 kb的DNA上。他们的编码产物为相对分子质量(M_r)21 000的蛋白质,故称为P21蛋白,与恶性肿瘤相关,在传递细胞生长分化信号方面起重要作用^[20-23]。他属于三磷酸鸟苷(GTP)结合蛋白(一种细胞信息传递的耦联因子),通过GTP与二磷酸鸟苷(GDP)的相互转化来调节信息的传递^[24]。有研究表明,激活ras的表达能增强血管生长因子的表达,提示Ras蛋白在血管生成中发挥作用,抑制Ras蛋白活性能抑制依赖Ras蛋白的肿瘤细胞增殖,也能干扰血管生成^[25-26]。我们发现HBV相关性HCC的PBMC中RAB14表达明显增加,可能与HCC血管生成有关。总之要确认上述蛋白质是否为HCC相关的蛋白质,还需扩大配对样本量、纯化分选样品进行差异表达蛋白质分析,并对这些蛋白质在人类HCC发生发展中的作用进一步研究。

致谢:感谢湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室提供良好的实验条件。

4 参考文献

- 1 Cesaratto L, Vascotto C, D'Ambrosio C, Scaloni A, Baccarani U, Paron I, Damante G, Calligaris S, Quadrifoglio F, Tiribelli C, Tell G. Overoxidation of peroxiredoxins as an immediate and sensitive marker of oxidative stress in HepG2 cells and its application to the redox effects induced by ischemia/reperfusion in human liver. *Free Radic Res* 2005; 39: 255-268
- 2 Li C, Tan YX, Zhou H, Ding SJ, Li SJ, Ma DJ, Man XB, Hong Y, Zhang L, Li L, Xia QC, Wu JR, Wang HY, Zeng R. Proteomic analysis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma: Identification of potential tumor markers. *Proteomics* 2005; 5: 1125-1139
- 3 Kuramitsu Y, Nakamura K. Proteomic analysis of cancer tissues: shedding light on carcinogenesis and possible biomarkers. *Proteomics* 2006; 6: 5650-5661
- 4 Feng JT, Shang S, Beretta L. Proteomics for the early detection and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3810-3817
- 5 Lee CL, Hsiao HH, Lin CW, Wu SP, Huang SY,

- Wu CY, Wang AH, Khoo KH. Strategic shotgun proteomics approach for efficient construction of an expression map of targeted protein families in hepatoma cell lines. *Proteomics* 2003; 3: 2472-2486
- 6 龙云铸, 范学工, 李宁, 黄宇琨. 应用肝组织蛋白质组模式诊断乙型肝炎病毒相关性肝细胞癌的初步研究. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 231-233
- 7 Kurokohchi K, Masaki T, Himoto T, Deguchi A, Nakai S, Morishita A, Yoneyama H, Kimura Y, Watanabe S, Kuriyama S. Usefulness of liver infiltrating CD86-positive mononuclear cells for diagnosis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2523-2529
- 8 Zhu CL, Yan WM, Zhu F, Zhu YF, Xi D, Tian DY, Levy G, Luo XP, Ning Q. Fibrinogen-like protein 2 fibroleukin expression and its correlation with disease progression in murine hepatitis virus type 3-induced fulminant hepatitis and in patients with severe viral hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6936-6940
- 9 中华医学会传染病与寄生虫病学分会/肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329
- 10 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准. *中华肝脏病杂志* 2001; 9: 324
- 11 Zhang Y, Fan XG, Chen R, Xiao ZQ, Feng XP, Tian XF, Chen ZH. Comparative proteome analysis of untreated and *Helicobacter pylori*-treated HepG2. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3485-3489
- 12 Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 25: 1327-1333
- 13 Mou DC, Cai SL, Peng JR, Wang Y, Chen HS, Pang XW, Leng XS, Chen WF. Evaluation of MAGE-1 and MAGE-3 as tumour-specific markers to detect blood dissemination of hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 2002; 86: 110-116
- 14 Wang FS, Liu MX, Zhang B, Shi M, Lei ZY, Sun WB, Du QY, Chen JM. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 464-468
- 15 Li H, Zeng Q, Weng Y, Lu D, Jiang H, Xu Z. Effects of ELF magnetic fields on protein expression profile of human breast cancer cell MCF7. *Sci China C Life Sci* 2005; 48: 506-514
- 16 Shukla S, Del Gatto-Konczak F, Breathnach R, Fisher SA. Competition of PTB with TIA proteins for binding to a U-rich cis-element determines tissue-specific splicing of the myosin phosphatase targeting subunit 1. *RNA* 2005; 11: 1725-1736
- 17 de Graauw M, Tijdens I, Cramer R, Corless S, Timms JF, van de Water B. Heat shock protein 27 is the major differentially phosphorylated protein involved in renal epithelial cellular stress response and controls focal adhesion organization and apoptosis. *J Biol Chem* 2005; 280: 29885-29898
- 18 Carta F, Demuro PP, Zanini C, Santona A, Castiglia D, D'Atri S, Ascierto PA, Napolitano M, Cossu A, Tadolini B, Turrini F, Manca A, Sini MC, Palmieri G, Rozzo AC. Analysis of candidate genes through a proteomics-based approach in primary cell lines from malignant melanomas and their metastases. *Melanoma Res* 2005; 15: 235-244
- 19 Priet S, Sire J, Querat G. Uracils as a cellular weapon against viruses and mechanisms of viral escape. *Curr HIV Res* 2006; 4: 31-42
- 20 Takahashi C, Contreras B, Iwanaga T, Takegami Y, Bakker A, Bronson RT, Noda M, Loda M, Hunt JL, Ewen ME. Nras loss induces metastatic conversion of Rb1-deficient neuroendocrine thyroid tumor. *Nat Genet* 2006; 38: 118-123
- 21 Coleman ML, Densham RM, Croft DR, Olson MF. Stability of p21Waf1/Cip1 CDK inhibitor protein is responsive to RhoA-mediated regulation of the actin cytoskeleton. *Oncogene* 2006; 25: 2708-2716
- 22 Friday BB, Adjei AA. K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756: 127-144
- 23 Ota H, Tokunaga E, Chang K, Hikasa M, Iijima K, Eto M, Kozaki K, Akishita M, Ouchi Y, Kaneki M. Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene* 2006; 25: 176-185
- 24 Diaz R, Lue J, Mathews J, Yoon A, Ahn D, Garcia-Espana A, Leonardi P, Vargas MP, Pellicer A. Inhibition of Ras oncogenic activity by Ras protooncogenes. *Int J Cancer* 2005; 113: 241-248
- 25 Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, Coomber BL, Mackman N, Rak JW. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005; 105: 1734-1741
- 26 Jeong S, Lee DH, Lee JI, Lee JW, Kwon KS, Kim PS, Kim HG, Shin YW, Kim YS, Kim YB. Expression of Ki-67, p53, and K-ras in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6765-6769

电编 李琪 编辑 张焕兰