

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.013

· 临床研究 ·

TMT 定量蛋白组学方法筛选乳腺癌腋窝淋巴结转移患者血清差异蛋白

李曦洲, 方敏[△], 盛媛, 于恩达(第二军医大学附属长海医院 普外科, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 分析有腋窝淋巴结转移和无腋窝淋巴结转移的乳腺浸润性导管癌患者血清中的差异蛋白, 筛选与乳腺癌转移相关的生物标志物和治疗靶点。 **方法:** 本研究采用定量蛋白质组学串联质谱标签(tandem mass tag, TMT)标记技术分别对 14 例有腋窝淋巴结转移及 14 例无腋窝淋巴结转移的乳腺癌患者血清蛋白进行检测, 并对蛋白质进行定量分析, 筛选出发生显著变化的差异蛋白, 再搜索 Uniprot 数据库和用 Proteome Discoverer 软件分析, 进一步进行生物信息学分析。 **结果:** 有腋窝淋巴结转移组中共筛选出差异蛋白 119 个, 其中 6 个表达上调, 113 个表达下调。基因本体(gene ontology, GO)注释分析和功能聚类分析表明, 这些差异蛋白质主要定位于细胞外区, 与肿瘤的生物合成、细胞增殖、血管生成相关。Western blotting 和 qRT-PCR 验证了 K1C19(下调 0.11 倍)和 PSME2(上调 2.02 倍)的表达。 **结论:** TMT 定量蛋白组学方法能有效筛选有腋窝淋巴结转移的和无腋窝淋巴结转移的乳腺癌患者血清中的差异蛋白。其中, K1C19 和 PSME2 是值得进一步研究的乳腺癌淋巴结转移的候选血清标志物。

[关键词] 乳腺癌; 腋窝淋巴结转移; 蛋白组学; 串联质谱标签; 差异蛋白

[中图分类号] R737.9; R73-37

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)04-0411-06

Application of TMT quantitative proteomics in identification of differentially expressed serum proteins of breast cancer patients with axillary lymph node metastasis

LI Xizhou, FANG Min[△], SHENG Yuan, YU Enda (Department of General Surgery, Changhai hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the differentially expressed proteins in serum among patients of breast cancer with and without axillary lymph node metastasis, and to screen the diagnostic biomarkers and therapeutic targets that related to breast cancer metastasis. **Methods:** Quantitative proteomics TMT(tandem mass tag) technology was used to detect and quantitatively analyze serum proteins of breast cancer patients with and without axillary lymph node metastasis (14 cases in each group), and to further screen significant differentially expressed proteins. Uniprot database and proteome discoverer software were applied to analyze the bioinformatics. **Results:** One hundred and nineteen differentially expressed proteins were identified, and 6 proteins were significantly up-regulated, 113 proteins were significantly down-regulated. Gene ontology (GO) annotation and functional cluster analyses showed that these differentially expressed proteins are locate at extra-cellular domain, and correlate with biosynthesis, cell proliferation and angiogenesis of tumor. Western blotting and qRT-PCR verified that the expressions of K1C19 (down-regulated by 0.11 times) and PSME2 (up-regulated by 2.02 times). **Conclusion:** TMT quantitative proteomics is a compelling way to discover differentially expressed proteins of breast cancer patients with and without axillary lymph node metastasis, and K1C19 and PSME2 are the potential serum biomarkers that deserve further exploration.

[Key words] breast cancer; axillary lymph node; proteomics; tandem mass tag(TMT); differentially expressed proteins

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(4): 411-416. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.013]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 8150111616)。Projecte supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 8150111616)

[作者简介] 李曦洲(1981-),女,博士生,主要从事乳腺及甲状腺疾病的诊治与基础研究, E-mail:85858121@qq.com;方敏(1991-),女,硕士生,主要从事乳腺及甲状腺疾病的诊治与基础研究, E-mail:fangmin0530@163.com。△共同第一作者

[通信作者] 于恩达(YU Enda, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤基础研究及普外科临床工作, E-mail:yuenda@163.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤。有无淋巴结转移是乳腺癌治疗和判断预后的重要临床病理学参数^[1]。播散转移是乳腺癌患者治疗失败和死亡的主要原因。虽然近年来乳腺癌的预后有了很大程度的改善,但是至今对已有转移性的乳腺癌患者依然没有有效的治疗方法^[2]。目前乳腺癌辅助治疗主要依据原发灶的相关生物学标志物,而原发灶并不能完全代表潜在转移的癌细胞^[3]。腋窝淋巴结转移是乳腺癌最常见的转移途径,转移的途径主要是通过已有的血管或新生的毛细血管,这些转移淋巴结更能代表全身潜在转移的癌细胞的生物学特性^[4]。而淋巴结转移的机制目前尚未阐明。

蛋白质作为生物功能的直接执行者,在乳腺癌的淋巴结转移中发挥了重要的作用。而快速的,高通量的蛋白组学技术的成功应用为筛选与转移相关蛋白,发现治疗新靶点提供了有效方法^[5]。本研究利用串联质谱标签(tandem mass tag, TMT)定量蛋白组学方法分析有淋巴结转移和无淋巴结转移的乳腺浸润性导管癌患者血清中的差异蛋白,并进行生物信息学分析,为后续研究乳腺癌发生发展进程中的分子机制提供依据,为临床乳腺癌诊断和治疗提供潜在的新靶点。

1 资料与方法

1.1 标本来源

血清标本取自2014年1月至2015年12月由第二军医大学附属长海医院乳腺外科收治的,并由术后病理证实为浸润性导管癌的28例乳腺癌患者,其中有腋窝淋巴结转移及无腋窝淋巴结转移各14例。28例均为乳腺浸润性导管癌I-III期,14例有淋巴结转移的病例淋巴结转移数量在1~4个。年龄34~67岁,平均年龄49.7岁。患者采血前均签知情同意书,经伦理委员会审查通过。

血清采集及保存。所有纳入对象在采血前均未接受任何治疗。清晨采集空腹静脉血4 ml, 4℃静置1 h,离心半径13.5 cm, 3 000 r/min离心5 min后分离血清, -80℃冰箱保存备用。所有血清标本在质谱分析前避免反复冻融。

1.2 主要试剂和仪器

BCA蛋白定量试剂盒、TMT试剂购于Thermo Fisher Scientific公司,十二烷基磺酸钠购于Amresco公司,乙腈购于J. T. Baker公司,胰酶购于Gibco公司,测序级胰蛋白酶购于Promega公司,qPCR定量试剂盒购自Promega, β -actin抗体购自Abcam, PA28 β 、Keratin 19抗体购自Cell Signaling Technolo-

gy公司, HRP/TRITC/FITC标记二抗购于Southern Biotech公司, 10 KD超滤管购自Millipore公司。其余试剂至少为国产分析纯级别。1.5 ml离心机购于Thermo Fisher Scientific,各种型号离心管均购于Axygen。酶标仪购于Bio-rad。ABI 7300定量PCR仪购于ABI。

1.3 提取有/无淋巴结转移的乳腺浸润性导管癌患者血清总蛋白

有/无淋巴结转移的两组乳腺癌患者的血清于冰上化冻均匀后,在有淋巴结转移组中每例样本取2 μ l混合,无淋巴结转移组血清也做相同处理,稀释后用BCA法检测试剂盒测总蛋白浓度。96孔板每孔中加标准品或待测样品10 μ l,再在每个样品中添加80 μ l工作液,振荡器上混匀。37℃摇床中孵育30 min。将96孔板冷却至室温后用酶标仪检测570 nm波长处的光密度(D)值。将每个样品的D值减去blank样品的D值,再与浓度制作标准曲线并根据标准曲线计算出待测样品的浓度。

取250 μ g蛋白溶液,悬空滴于10 k超滤管中,加200 μ l尿素,离心。倒掉液体,膜上加200 μ l尿素,离心。加100 μ l碘乙酰胺(尿素溶解),振荡摇匀,避光室温静置2 h。离心。加100 μ l尿素,离心,重复一遍。加100 μ l NH_4HCO_3 离心,重复一遍。换新管,加胰酶(NH_4HCO_3 稀释),37℃摇床200 r/min过夜酶解,离心收集肽段。滤膜用60 μ l 0.5 mol/L NaCl浸泡,离心,再次收集肽段,重复1或2次。样品酸化,0.1% CF_3COOH 酸化肽段。肽段脱盐。旋转冷冻真空抽干仪抽干样品,冷冻保存。

1.4 TMT标记蛋白

100 mmol/L三乙胺硼烷溶解样品,检测pH约8.5。41 μ l的乙腈溶解TMT试剂/管,TMT-126标记试剂加入无淋巴结转移组血清肽段中,TMT-128标记试剂加入淋巴结转移组血清肽段中,混匀,摇床室温4 h。加入8 μ l的5%羟胺(hydroxylamine, HDX)终止反应,摇床室温20 min。等比混合,酸化样品。脱盐、抽干。

1.5 LC-LTQ-MS/MS(液相色谱质谱联用)分析及质谱数据检索

抽干后样品用10 μ l的2%甲酸溶解;12 000 r/min离心5 min,进行LC-MS/MS分析。HPLC反向柱层析系统采用300 nl/min流速,5%~32%乙腈梯度进行样品分离检测,时间4 h;HPLC与LTQ Orbitrap XL质谱偶联,从一级谱图中选取信号最强的3个母离子进行HCD(Higher energy collisional dissociation)碎裂。数据使用Proteome Discov-

erer 软件(版本 1.4)进行检索分析。

1.6 生物信息学分析

对数据库检索得到的所有蛋白质进行分析,筛选表达变化在 1.5 倍以上(protein ratio 大于 1.5 或小于 0.67)的蛋白质为差异蛋白,对这些蛋白在 GeneCoDis3 中进行基因本体(Gene ontology, GO)注释分析和功能聚类分析。在 Uniprot 数据库里对筛选所得的差异蛋白质进行检索,对其进行功能分类与分析。

1.7 Western blotting 验证差异蛋白

组织样品采用裂解液(50 mmol/L Tris(pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 以及 sodium orthovanadate, sodium fluoride, EDTA, leupeptin)进行裂解,测定蛋白浓度后,取 20~30 μg 蛋白用 12.5% 的 SDS-PAGE 进行分离,然后将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜上。用 0.05% 土伦试剂的 PBST 配制 5% 的脱脂奶粉,进行封闭,再加入一抗孵育,洗膜,再用 HRP 标记的二抗孵育,蛋白条带用化学发光法显示。

1.8 qRT-PCR 检测验证差异蛋白基因水平表达

选取 2 个差异表达的基因,在 ABI 7300 定量 PCR 仪上采用 SYBR Green I 法进行 qRT-PCR 验证。反应体系(20 μl): SYBR Green Realtime PCR Master Mix 10 μl , ROX Reference Dye 0.4 μl , cDNA(50 ng/ μl) 1 μl , 正反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μl , ddH₂O 7.8 μl 。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s; 40 个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s)。由 PCR 扩增曲线得到 Ct 值。目的基因转录水平的变化采用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 的方法进行计算,并以 $\beta\text{-actin}$ 作为内参。*KRT19*(I 型细胞骨架 19(Keratin, type I cytoskeletal 19, 蛋白的编码基因)引物: 5'-ACCAAGTTTGAGACGGAACAG-3'(Sense), 5'-CCCTCAGCGTACTGATTTCT-3'(Antisense)。蛋白酶体激活子复合亚基 2 (Proteasome activator complex subunit 2, *PSME2*)引物: 5'-GCAAGAGGACTCCCTCAATGT-3'(Sense), 5'-CTTCTGGCTTAACCAGGGCA-3'(Antisense)。

2 结果

2.1 乳腺癌患者血清总蛋白及差异蛋白鉴定

本研究采用 TMT 标记的定量蛋白质组学方法分析有腋窝淋巴结转移患者与无腋窝淋巴结转移患者血清蛋白质表达差异。将质谱鉴定所得的原始数据利用 MaxQuant 软件在 IPI(International Protein Index)数据库里检索。而在 II 期乳腺癌实验组中共定量 346 个蛋白,以 128:126 > 1.5 为标准筛选出上调

表达的蛋白质 6 个。以 128:126 < 0.67 为标准筛选出 113 个下调表达的蛋白质(图 1 为差异蛋白表达热图,表 1 列出部分变化倍数大的蛋白)。

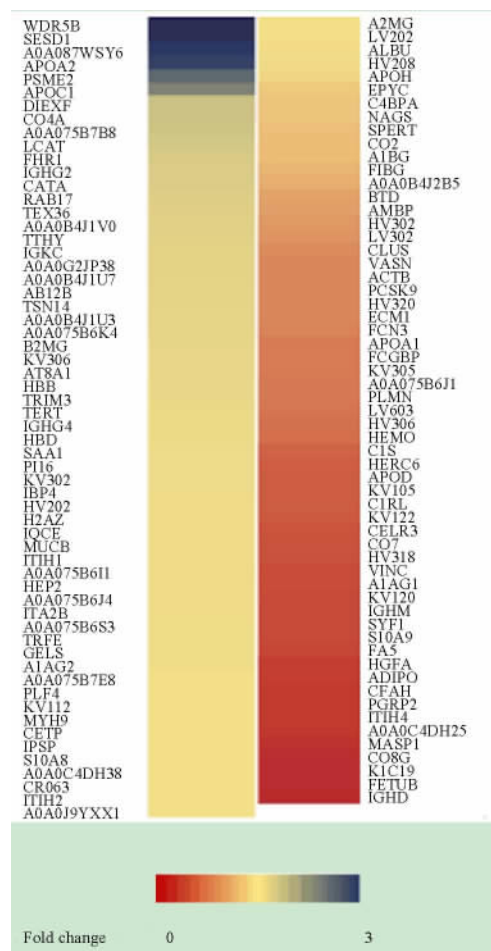


图 1 差异蛋白表达热图

Fig. 1 Heat maps of differentially expressed proteins

2.2 差异蛋白 GO 功能注释与显著性富集分析

利用 GeneCoDis3 分析差异表达蛋白在各基因 GO 功能条目的富集程度并排序,发现搜寻的差异蛋白主要是蛋白结合和血液凝固蛋白,位于细胞外区、细胞外空隙和线粒体,主要参与糖酵解、三羧酸循环和细胞呼吸代谢过程,这些 GO 条目的富集程度较高,且具有显著的统计学意义(图 2)。

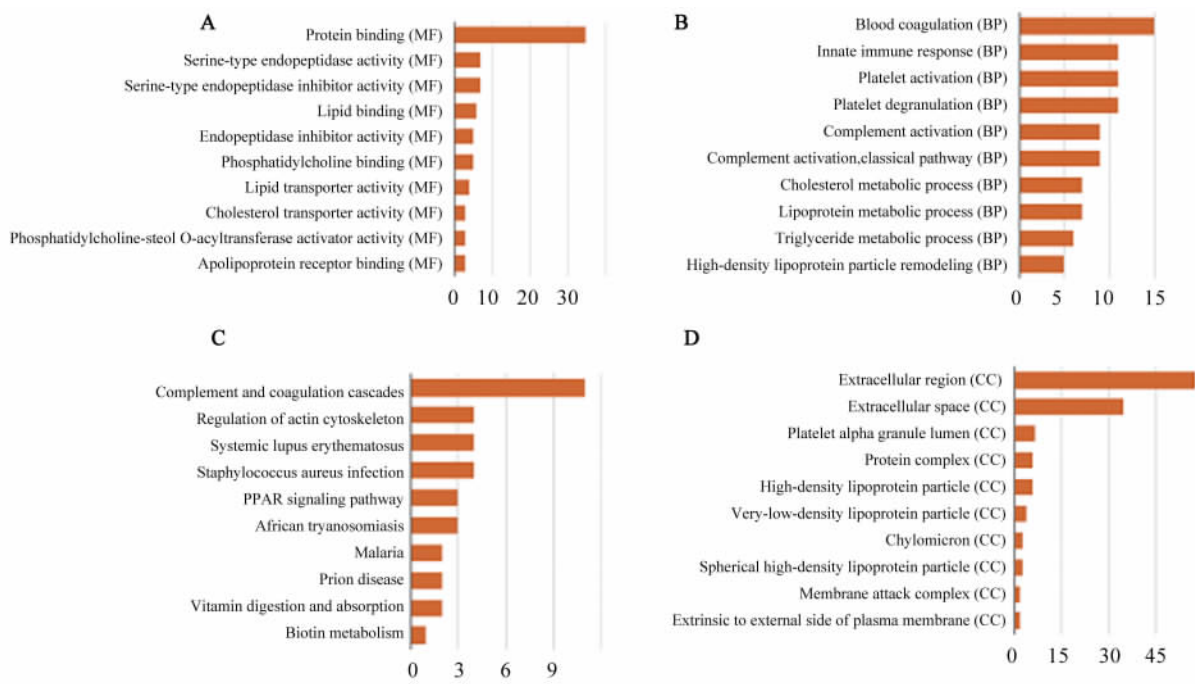
2.3 Western blotting 验证差异蛋白

PSME2 和 K1C19 两个蛋白变化倍数较显著,经查文献这两个蛋白与肿瘤相关,在乳腺癌中的作用尚不明确,有待进一步研究。因此选择这两个蛋白进行验证。Western blotting 检测结果(图 3)证实, K1C19 在有淋巴结转移乳腺癌患者血清中表达水平明显低于对照组,而 PSME2 表达明显高于对照组,与质谱鉴定结果一致。

表1 部分变化倍数大的蛋白

Tab.1 Parts of the proteins changed with relatively large fold

Protein name	UniprotKB	Fold change
WD repeat-containing protein 5B	WDR5B_HUMAN	3.33
Tyrosine-protein kinase Lyn	LYN_HUMAN	3.27
Protein IGKV3D-15 (Fragment)	A0A087WSY6_HUMAN	2.74
Apolipoprotein A-II	APOA2_HUMAN	2.58
Proteasome activator complex subunit 2	PSME2_HUMAN	2.02
Apolipoprotein C- I	APOC1_HUMAN	1.60
Ig kappa chain V- I region Mev	KV120_HUMAN	0.11
Ig mu chain C region	IGHM_HUMAN	0.11
Pre-mRNA-splicing factor SYF1	SYF1_HUMAN	0.11
Protein S100-A9	S10A9_HUMAN	0.11
Coagulation factor V	FA5_HUMAN	0.11
Hepatocyte growth factor activator	HGFA_HUMAN	0.11
Adiponectin	ADIPO_HUMAN	0.11
Complement factor H	CFAH_HUMAN	0.11
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	PCRP2_HUMAN	0.11
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITI14_HUMAN	0.11
Protein IGKV3D-20 (Fragment)	A0A0C4DH25_HUMAN	0.11
Mannan-binding lectin serine protease 1	MASP1_HUMAN	0.11
Complement component C8 gamma chain	CO8G_HUMAN	0.11
Keratin, type I cytoskeletal 19	K1C19_HUMAN	0.11
Fetuin-B	FETUB_HUMAN	0.11
Ig delta chain C region	IGHD_HUMAN	0.11



A: Molecular functions; B: Biological process; C: Signal pathway; D: Cellular position

The vertical axis is the GO category and the horizontal axis is the -log P of these GO terms

图2 乳腺癌有腋窝淋巴结转移及无腋窝淋巴结转移组差异蛋白的显著性富集分析

Fig.2 Significant enrichment analysis of identified proteins in breast cancer with axillary lymph node or not

2.4 差异蛋白对应基因的 qRT-PCR 检测

qRT-PCR 结果表明, *PSME2* 基因在有淋巴结转移乳腺癌患者血清中表达较对照组极显著上调 (1.054 ± 0.060) vs (0.560 ± 0.017), $P < 0.01$), 而 *KRT19* 基因较对照组表达极显著下调 (0.217 ± 0.012) vs (1.488 ± 0.034), $P < 0.01$), 与 Western blotting 对应蛋白表达水平及质谱筛选的蛋白表达一致。

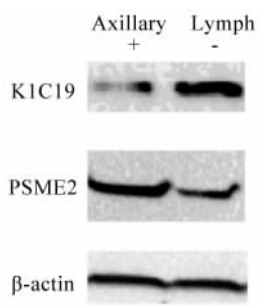


图3 PSME2 和 K1C19 蛋白在淋巴结转移乳腺癌患者血清中表达水平

Fig.3 Expressions of PSME2 and K1C19 protein in serum of patients with breast cancer with axillary lymph nodes

3 讨论

血液是反应机体机能的窗口, 腋窝淋巴结转移是乳腺癌常见的转移方式, 对比有腋窝淋巴结转移和无腋窝淋巴结转移患者血清中蛋白质组是寻找乳腺癌转移和判断预后标志物的重要一步, 而血清蛋白组学为筛选这样的蛋白提供了有效的技术手段^[6]。此次研究采用定量蛋白质组学标记技术对 14 例有腋窝淋巴结转移的及 14 例无腋窝淋巴结转移的乳腺癌患者血清蛋白进行检测, 定量蛋白质组学分析, 得到了一系列上调和下调显著的蛋白质。寻找与早期转移相关的生物标志物对乳腺癌的个体化治疗至关重要。本研究筛选出一些潜在的与转移相关的生物标志物。

PSME2 通过对蛋白质的破坏参与蛋白质水解的调节。有研究表明, PSME2 可能参与了肿瘤的发生和发展^[7]。体内和体外试验都表明上调 PSME2 表达可导致细胞生长, 增殖和肿瘤发生^[8-9]。在本次研究中发现, PSME2 在有腋窝淋巴结转移的乳腺癌组中表达比对照组上调 (2.02 倍)。PSME2 蛋白在肿瘤中的作用, 文献报道的结果也不尽相同, 比如, PSME2 蛋白表达在肺癌^[10]中下调, 而在胃癌^[11]和肾癌^[12]中明显上调。与原发肿瘤相比, PSME2 蛋白在转移性黑色素瘤中有更高水平的表达^[13]。

PSME2 蛋白在肿瘤发生发展中的功能有待研究。

K1C19 属于角蛋白家族, 是构成细胞骨架蛋白中间丝对的成分, 在导管上皮细胞中特异性表达, 在健康人的外周血中无表达^[14], 参与信号转导、应激反应和细胞凋亡的复杂调节^[15]。沉默 K1C19 可引起细胞增殖, 迁移和侵袭, 与患者的生存期降低及不良预后相关^[15-17]。在乳腺癌中, K1C19 蛋白被认为是淋巴结、外周血及骨髓转移的生物标志物^[18], 因此有人推测它与肿瘤的早期转移相关。此外, K1C19 蛋白还与 ER、PR 受体阳性, HER2 过表达, Ki67 低表达相关^[14]。本研究中, 相比无腋窝淋巴结转移组, 有腋窝淋巴结转移组 K1C19 表达显著下调 (0.11 倍)。有研究取 7 例乳腺癌患者原发肿瘤与腋窝转移的淋巴结组织蛋白, 采用二维凝胶电泳 (two-dimensional gel electrophoresis technology, 2-DE) 的方法进行蛋白组学研究, 在原发肿瘤中 8 个点显示了更高水平的 K1C19, 而在转移淋巴结中只有 2 个点^[19]。

差异基因分子功能分析表明, 患者存在腋窝淋巴结转移的条件下, 有几类分子功能的基因表达出现了明显的变化。其中调节蛋白结合功能的基因表达差异最为明显, 在高严谨筛选条件下 (表达差异倍数 > 1.5 , 或者 < 0.67), 共有两个蛋白 [酪氨酸蛋白激酶 Lyn (tyrosine-protein kinase Lyn)、载脂蛋白 A-II (apolipoprotein A-II) 表达被上调 2.58 ~ 3.27 倍; 共有 33 个蛋白 [三结构域蛋白 (tripartite motif-containing protein 3)、 β -2-糖蛋白-1 (beta-2-glycoprotein 1)、端粒酶逆转录酶 (telomerase reverse transcriptase) 等] 表达被下调 0.11 ~ 0.45 倍。在该类基因中, 人载脂蛋白 H (human apolipoprotein H, APOH) APOH 可以通过结合在受损细胞表面而调节内在的凝血级联反应, 呈下调趋势; 细胞外基质蛋白 1 (extracellular matrix protein 1, ECM1), 调节内皮细胞的增殖和血管生成, 呈下调趋势; 血纤维蛋白溶酶原 (plasminogen, PLMN) 作为一个解肌作用的因子参与到一系列生物进程当中, 如组织重构、肿瘤浸润及炎症, 呈下调趋势。上述基因都与肿瘤的与转移相关, 为探究肿瘤腋窝淋巴结转移的机制奠定基础。

综上所述, TMT 标记蛋白组学能够有效筛选腋窝淋巴结转移乳腺癌的差异蛋白。同时生物信息学分析进一步了解差异蛋白在乳腺癌淋巴结转移中参与的生物学过程, 而乳腺癌的淋巴结转移机制复杂, 是多因素共同作用的结果, 究竟是哪一种蛋白还是几种蛋白的作用还有待进一步研究。本次研究筛选出的 K1C19 和 PSME2 是否能成为乳腺癌淋巴结转

移的预测指标还需更深的研究。

[参 考 文 献]

- [1] PEIRIS H H, MUDDUWA L K, THALAGALA N I, et al. Do breast cancer risk factors affect the survival of breast cancer patients in Southern Sri Lanka[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2017, 18(1): 69-79. DOI:10.22034/APJCP.2017.18.1.69.
- [2] SONG J L, CHEN C, YUAN J P, et al. The association between prognosis of breast cancer and first-degree family history of breast or ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis[J/OL]. *Fam Cancer*, 2017[2017-01-10]. [Epub ahead of print] <https://link.springer.com/article/10.1007/s10689-017-9969-x>. DOI: 10.1007/s10689-017-9969-x.
- [3] PORTO-MASCARENHAS E C, ASSAD D X, CHARDIN H, et al. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: a review [J/OL]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 110: 62-73[2017-01-10]. [http://www.croh-online.com/article/S1040-8428\(16\)30388-2/abstract](http://www.croh-online.com/article/S1040-8428(16)30388-2/abstract). DOI: 10.1016/j.critrevonc.2016.12.009.
- [4] GIPPONI M, FREGATTI P, GARLASCHI A, et al. Axillary ultrasound and fine-needle aspiration cytology in the preoperative staging of axillary node metastasis in breast cancer patients [J/OL]. *Breast*, 2016, 30: 146-150[2017-01-10]. [http://www.thebreastonline.com/article/S0960-9776\(16\)30170-9/abstract](http://www.thebreastonline.com/article/S0960-9776(16)30170-9/abstract). DOI: 10.1016/j.breast.2016.09.009.
- [5] DUARTE T T, SPENCER C T. Personalized proteomics: the future of precision medicine[J/OL]. *Proteomes*, 2016, 4(4): E29 [2017-01-10]. <http://www.mdpi.com/2227-7382/4/4/29>. DOI: 10.3390/proteomes4040029.
- [6] SUMAN S, BASAK T, GUPTA P, et al. Quantitative proteomics revealed novel proteins associated with molecular subtypes of breast cancer[J/OL]. *J Proteomics*, 2016, 148: 183-193[2017-01-10]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391916303463>. DOI:10.1016/j.jprot.2016.07.033.
- [7] JIANG N, KHAM S K, KOH G S, et al. Identification of prognostic protein biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) [J]. *J Proteomics*, 2011, 74(6): 843-857. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.02.034.
- [8] THONGWATCHARA P, PROMWIKORN W, SRISOMSAP C, et al. Differential protein expression in primary breast cancer and matched axillary node metastasis [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(1): 185-191. DOI: 10.3892/or.2011.1266.
- [9] HUANG Q, HUANG Q, LIN W, et al. Potential roles for PA28beta in gastric adenocarcinoma development and diagnosis [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(8): 1275-1282. DOI: 10.1007/s00432-010-0778-y.
- [10] KIM J E, KOO K H, KIM Y H, et al. Identification of potential lung cancer biomarkers using an in vitro carcinogenesis model [J]. *Exp Mol Med*, 2008, 40(6): 709-720. DOI: 10.3858/emmm.2008.40.6.709.
- [11] EBERT M P, KRÜGER S, FOGERON M L, et al. Overexpression of cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis [J]. *Proteomics*, 2005, 5(6): 1693-1704. DOI:10.1002/pmic.200401030.
- [12] PERROUD B, LEE J, VALKOVA N, et al. Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling [J/OL]. *Mol Cancer*, 2006, 5: 64[2017-01-10]. <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-5-64>. DOI: 10.1186/1476-4598-5-64.
- [13] AL-GHOUL M, BRÜCK T B, LAUER-FIELDS J L, et al. Comparative proteomic analysis of matched primary and metastatic melanoma cell lines [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(9): 4107-4118. DOI: 10.1021/pr800174k.
- [14] SHAO M M, CHAN S K, YU A M, et al. Keratin expression in breast cancers [J]. *Virchows Arch*, 2012, 461(3): 313-322. DOI: 10.1007/s00428-012-1289-9.
- [15] ALIX-PANABIÈRES C, VENDRELL J P, SLIJPER M, et al. Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer [J/OL]. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(3): R39[2017-01-10]. <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ber2326>. DOI: 10.1186/ber2326.
- [16] OHI Y, UMEKITA Y, SAGARA Y, et al. Whole sentinel lymph node analysis by a molecular assay predicts axillary node status in breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2012, 107(8): 1239-1243. DOI: 10.1038/bjc.2012.387.
- [17] OSAKO T, IWASE T, KIMURA K, et al. Sentinel node tumour burden quantified based on cytokeratin 19 mRNA copy number predicts non-sentinel node metastases in breast cancer: molecular whole-node analysis of all removed nodes [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(6): 1187-1195. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.11.022.
- [18] JU J H, YANG W, LEE K M, et al. Regulation of cell proliferation and migration by keratin19-induced nuclear import of early growth response-1 in breast cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(16): 4335-4346. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3295.
- [19] MILIOLI H H, SANTOS S K, KAVISKI R, et al. Comparative proteomics of primary breast carcinomas and lymph node metastases outlining markers of tumor invasion [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2015, 12(2): 89-101.

[收稿日期] 2017-01-03 [修回日期] 2017-03-08

[本文编辑] 黄静怡

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿、欢迎订阅