

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.012

· 临床研究 ·

多因子固相抗体芯片筛选评价免疫细胞治疗肺癌的生物标志物

梁露花¹, 初廷广², 李东霖¹, 王思亮³, 李文欣², 项荣武¹(1. 沈阳药科大学 生物医药信息学教研室, 辽宁 沈阳 110016; 2. 辽宁迈迪生物科技有限公司, 辽宁 沈阳 117004; 3. 中国医科大学附属盛京医院 肿瘤科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] **目的:** 应用多因子固相抗体芯片筛选免疫细胞治疗肺癌患者血清的标志性蛋白作为临床评价指标, 建立肺癌疗效评价模型。**方法:** 采用多因子 Proteome Profiler™ 固相抗体芯片和 Image J 软件对 5 例肺癌恶化患者(恶化组)、5 例肺癌治疗有效患者(有效组)及 10 例健康体检者(正常个体对照组)进行血清蛋白的灰度/光密度分析, 将得到的蛋白灰度值采用 SPSS 软件进行分析, 建立肺癌疗效评价的 Fisher 模型。**结果:** 对比肺癌治疗恶化组、有效组患者和正常对照组健康个体的共有标志性蛋白, 筛选得到 8 个有显著差异($P < 0.05$)的蛋白(二肽基肽酶 IV、生长激素、IL-4、髓过氧化物酶、骨桥蛋白、晚期糖基化终产物受体、肿瘤坏死因子- α 和尿激酶纤维蛋白溶酶原激活物受体)。对所有试验者进行聚类分析, 发现这 8 个蛋白能区分恶化组和有效组患者及正常组健康个体。肺癌的 Fisher 模型得到验证。**结论:** 多因子固相抗体芯片技术和优化统计方法能够筛选出与肺癌的发生发展及疗效有关血清生物标志物, 为肺癌的发病机制研究及临床诊断和治疗奠定一定的临床试验基础, 对肺癌的个体化治疗具有重要指导意义。

[关键词] 肺癌; 免疫细胞治疗; 生物标志物; 统计学方法

[中图分类号] R730.51; R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)05-0527-06

Biomarkers of lung carcinoma for evaluation of the immunocytotherapy selected by solid phase antibody chip against multiple factors

LIANG Luhua¹, CHU Tingguang², LI Donglin¹, WANG Siliang³, LI Wenxin², XIANG Rongwu¹(1. Department of Biomedical Informatics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning, China; 2. Liaoning Mai Di Biological Technology Co. Ltd., Shenyang 117004, Liaoning, China; 3. Department of Oncology, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** Applying solid phase antibody chip against multiple factors to screen serum marker proteins of the patients with lung carcinoma who were treated by immunocytotherapy as clinical diagnosis index and to establish an evaluation model for clinical efficacy of the patients with lung carcinoma. **Methods:** Using Proteome Profiler™ solid phase antibody chip against multiple factors and Image J software to analyze gray scale/optical density of the serum marker proteins from 5 patients with advanced lung carcinoma, 5 patients with improved lung carcinoma and 10 healthy individuals. The protein gray values obtained were analyzed by SPSS software, and Fisher model for evaluation of clinical efficacy of the patients with lung carcinoma was established. **Results:** Analyzing and comparing the common marker proteins among the patients with advanced lung carcinoma, the patients with improved lung carcinoma and the healthy individuals, 8 proteins that are dipeptidyl peptidase IV, growth hormone, IL-4, myeloperoxidase, osteopontin, receptor of advanced glycation endproducts, TNF- α , and urokinase type plasminogen activator receptor with significant difference ($P < 0.05$) were

[基金项目] 辽宁省教育厅基金资助项目(No. 201610163L28)。Project supported by the Foundation of Liaoning Education Department(No. 201610163L28)

[作者简介] 梁露花(1987-),女,硕士,讲师,主要从事临床医学数据分析研究,E-mail: liangluhua1988@163.com

[通信作者] 项荣武(XIANG Rongwu, corresponding author),硕士,副教授,硕士生导师,主要从事临床肿瘤学、临床数据分析研究,E-mail: xrwlove@163.com;王思亮(WANG Siliang, co-corresponding author)硕士,副主任医师,主要从事胰腺癌放疗抵抗和化疗耐药机制研究,E-mail: doctorwangsl@hotmail.com

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170509.1015.002.html>

obtained. Clustering and analyzing data for all of the patients and the healthy individuals in the experiment found that the 8 proteins can very well distinguish the patients with advanced lung carcinoma from the patients with improved lung carcinoma and the healthy individuals. The Fisher model for lung carcinoma was confirmed. **Conclusion:** The solid phase antibody chip against multiple factors and optimal statistical methods could screen out the serum protein biomarkers related to occurrence, development and efficacy of lung carcinoma, which could establish a certain basis of clinical trail for researches on the mechanism of lung carcinogenesis as well as clinical diagnosis and treatment of the lung carcinoma. It could play an important guiding role in the individualized treatment of the lung carcinoma.

[**Key words**] lung carcinoma; immunocytotherapy; biomarker; statistic method

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(5): 527-532. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.012]

肺癌是目前全球发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一,占全部恶性肿瘤的 16% 和全部癌症死亡人数的 28%,男、女性肺癌的发病率和病死率分列所有恶性肿瘤首位和第二位^[1]。60% 的肺癌患者在确诊时已属中晚期,失去手术机会、预后极差,发展中国家肺癌患者的 5 年生存率仅 8.9%^[2]。临床上治疗肺癌多采用手术、放疗和化疗,但其疗效并不令人满意。近年来,尽管一些新的化疗药物和靶向药物的问世给肺癌提供了新的治疗选择,然而其疗效及延长生存期方面未有新突破。而免疫细胞治疗就是利用蛋白质组学理论和技术来提高患者的自身免疫能力,从而辅助肿瘤治疗同时提高患者的生活质量^[3]。据报道^[4],应用免疫疗法后,90% 的高度侵袭性白血病患者病情得到完全缓解;另一种检查点抑制剂疗法对黑色素瘤的治疗有效率可达 40% ~ 50%,而对肺癌、肝癌、肾癌的治疗有效率为 30%,膀胱癌为 40%,霍奇金淋巴瘤为 90%^[4]。上述这些有效治疗均不能完全确定有效的生物标志物,不能做到精准治疗。本课题基于高通量蛋白质芯片技术,对肺癌患者血清进行蛋白质筛选,采用优化统计分析法识别出肺癌疾病的相关生物标志物和治疗相关的生物标志物,为肺癌的诊断和治疗提供临床依据。

1 资料与方法

1.1 临床样本

收集 2013 年 8 月至 2015 年 7 月辽宁医科大学附属医院、沈阳市第一人民医院和盘锦市中心医院三家医院肿瘤科的经免疫细胞治疗肺癌病理确诊恶化的患者血清为治疗恶化组(5 例),收集经免疫细胞治疗及病理确诊的肺部良性病变患者血清作为治疗有效对照组(5 例);收集同期健康体检者血清作为正常对照组(10 例)。在正常情况下提取血清,其中恶化组和有效组患者分别分 3 个不同的时间点采集血清。以上患者和健康人均无肝、心、肾及糖尿病

等疾患。同时收集以上受检者 2 ml 空腹外周静脉血(避免溶血)血清。所有受检者抽血前均签署知情同意书,研究方案经医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂及仪器

R&D 多因子 Proteome Profiler™ 固相抗体芯片、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和胎牛血清白蛋白(BSA)由上海优宁生物科技股份有限公司生产。以色列 DNR 生物成像系统由北京博励行有限公司生产,试剂、校准品和质控物均为原装配套。

1.3 高通量蛋白芯片检测方法

预先规定每位正常健康体检者、恶化组患者和有效组患者检测蛋白芯片的蛋白点数量,每张芯片设置阳性对照点和阴性对照点,共 220 个点,包含 110 个蛋白质,每个蛋白质 2 个点。用多因子 Proteome Profiler™ 固相抗体芯片将目的抗体和对照抗体预先固定在硝酸纤维素膜上,细胞培养的血清、细胞裂解产物、血清、血浆或组织裂解物经过稀释后与生物素标记的混合检测抗体混合。实验用细胞因子阵列面板(cytokine array panel)A 膜是多因子 Proteome Profiler™ 固相抗体芯片试剂盒中的检测芯片。将样本/抗体混合物与细胞因子阵列面板 A 膜孵育,细胞因子/检测抗体通过共价结合与膜上的捕获抗体结合形成复合体。经过冲洗,洗去非特异性结合。最后用辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(streptavidin-HRP)标记的二抗检测并通过 ECL 化学发光完成信号收集。用移液器将正常人、恶化组患者和有效组患者的血清分别放到多因子 Proteome Profiler™ 固相抗体芯片上。细胞因子抗体芯片封闭后加入 50 ~ 500 μg 蛋白质(若标本为血清,通常取 100 μl 血清)与抗体芯片 4 °C 孵育过夜加入标记好的抗体室温孵育 1 h。-80 °C 冰箱保存,备用,避免反复冻融。在芯片上均匀滴加显色液,孵育 1 min 后在 DNR 生物成像系统中发光成像。

1.4 数据采集

成像图用 Image J 软件进行灰度/光密度分析得

到数值,将灰度/光密度数值导入 Excel 文件中对灰度级进行归一化处理,使得其背景和检测目标都达到相同的状态,从而剔除了光强变化的影响,使在不同光强下的检测结果相同,故得到的蛋白芯片上的蛋白灰度值是没有单位的。从而得到正常组、肺癌恶化组和有效组的蛋白质临床数据库。为了方便统计,用 eh 代表恶化组患者蛋白灰度数据,zc 代表正常组蛋白灰度数据,yx 代表有效组患者蛋白灰度数据。

1.5 统计学处理

用 SPSS19.0 软件进行单因素方差分析,对每个蛋白芯片上每个蛋白质的 2 个灰度值点进行配对样本 t 检验和不同时间测量的蛋白灰度值之间进行独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

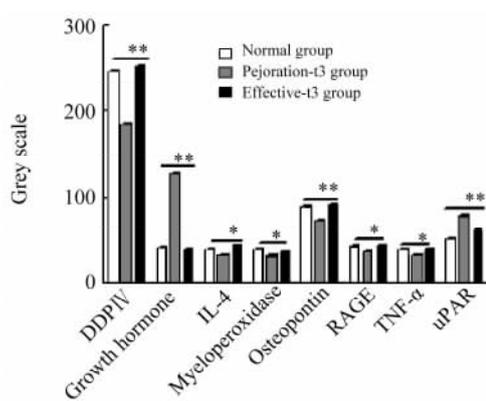
2.1 三组受试者筛选到 66 个共同标志蛋白

通过对正常组数据进行单因素方差分析剔除正常组 10 位健康个体中 1 位(超重肥胖者)与其他位 9 位健康个体结果均有差异的数据,正常对照组实际分析 9 例健康个体数据,对芯片每个蛋白质的 2 个点进行配对样本 t 检验,发现 14 个蛋白质的灰度值有差异($P < 0.05$)。对恶化组 5 个患者数据,按照 3 个不同采血时间点分别进行蛋白质灰度/光密度数值测量,分别对每个时间点的蛋白芯片每个蛋白质的 2 个灰度值点进行配对样本 t 检验,找出灰度值有差异的蛋白质($P < 0.05$),删除恶化组 3 次测量蛋白芯片 2 个点之间都有差异的 30 个蛋白质($P < 0.05$)。对有效组 5 个患者,按 3 个不同采血时间点分别进行蛋白质灰度/光密度数值测量,分别对每个时间点蛋白芯片的每个蛋白质 2 个点灰度值进行配对样本 t 检验,找出有差异的蛋白质,删除有效组 3 次测量蛋白芯片 2 个点之间有差异的 13 个蛋白质($P < 0.05$)。比较正常组 9 例、恶化组 5 例和有效组 5 例中蛋白芯片 110 个蛋白质,删除差异性蛋白质后,得到正常组、恶化组和有效组共同标志蛋白 66 个。

2.2 三组筛选出 8 个区别性标志蛋白

恶化组第三时间点(t_3)和有效组 t_3 是所有患者免疫细胞治疗最后一个疗程的采血时间。故为了进一步讨论随着免疫细胞治疗的进行恶化组和有效组的蛋白灰度值相当于正常人的变化情况,故选取 t_3 时间将正常组和恶化组 t_3 和有效组 t_3 进行比较,从而找出影响肺癌免疫细胞治疗的差异性蛋白。因此对正常组、恶化组和有效组各 66 个共同标志蛋白

进行分析,将正常组 66 个共同标志蛋白每个蛋白两次测量取平均值与恶化组第 3 次测量的每个蛋白数据进行独立样本 t 检验,发现正常组和恶化组共同的标志蛋白中存在差异性蛋白 11 个($P < 0.05$)。恶化组 t_3 测量的蛋白数据与有效组 t_3 测量的蛋白数据进行独立样本 t 检验比较发现差异性蛋白 32 个($P < 0.05$)。比较得到正常组、恶化组 t_3 和有效组 t_3 共同差异性蛋白 8 个,它们为二肽基肽酶 IV (dipeptidyl peptidase IV, DDP IV)、生长激素 (growth hormone)、IL-4、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase)、骨桥蛋白 (osteopontin)、晚期糖基化终产物受体 (receptor of advanced glycation endproducts, RAGE)、TNF- α 和尿激酶纤维蛋白溶酶原激活物受体 (urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR),见图 1。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Normal and effective-t3 group

图 1 正常组、恶化 t_3 组和有效 t_3 组共有差异性蛋白的比较
Fig. 1 Averages of common differential proteins in the normal, pejoration-t3 and effective-t3 groups

可见 DPP IV、生长激素、IL-4、髓过氧化物酶、骨桥蛋白、RAGE、TNF- α 和 uPAR 是正常组、恶化组和有效组共有的区别性标志物,恶化组、正常组及有效组的共同标志蛋白均值存在显著和非常显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

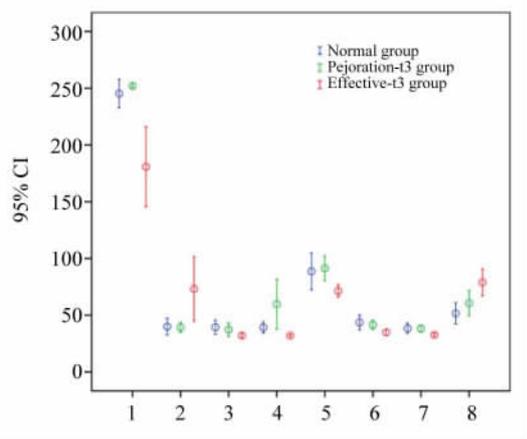
从正常组、恶化组 t_3 和有效组 t_3 共有的差异性蛋白质均值的 95% 置信区间 (95% CI) (表 1, 图 2) 可以看出,有效组 t_3 的 DPP IV、生长激素、IL-4、髓过氧化物酶、骨桥蛋白、RAGE、TNF- α 和 uPAR 蛋白的 95% CI 都全部或部分落在正常组这 8 个蛋白 (95% CI) 内,说明有效组 t_3 与正常组这 8 个蛋白的均值差异不显著。而恶化组 t_3 这 8 个蛋白 (95% CI) 和有效组 t_3 及正常组这 8 个蛋白 (95% CI) 重叠不明显,说明这 8 个蛋白在恶化组 t_3 和有效组 t_3 及正常

组之间差异显著, 可能是免疫细胞治疗肺癌后发生变化的标志性蛋白。

表 1 正常组、恶化 t3 组和有效 t3 组共有差异性蛋白平均值的 95% 可信区间

Tab. 1 95% confidence intervals of average for common difference proteins in the normal, pejoration-t3 and effective-t3 groups

Protein	Normal group 95% CI	Pejoration-t3 95% CI	Effective-t3 95% CI
DPPIV	232.642 6-257.860 6	152.125 6-215.324 8	249.736 1-253.380 5
Growth hormone	32.597 9-47.247 8	50.077 8-101.277 2	35.463 6-43.523 4
IL-4	33.181 7-45.514 1	30.702 6-33.734 6	32.641 4-44.332 8
Myeloperoxidase	34.220 2-44.161 6	31.088 8-33.096 2	42.452 0-84.405 4
Osteopontin	72.493 5-104.713 1	67.067 8-76.864 6	47.290 2-89.020 4
RAGE	37.038 3-50.180 3	32.788 4-38.444 2	38.126 5-47.321 7
TNF-α	33.880 2-42.894 7	31.552 3-34.245 3	35.528 1-42.064 9
uPAR	42.227 1-60.999 4	67.205 2-88.389 8	51.813 7-72.537 7



1: DPPIV; 2: Growth hormone; 3: IL-4; 4: Myeloperoxidase; 5: Osteopontin; 6: RAGE; 7: TNF-α; 8: uPAR

图 2 正常组、恶化 t3 组和有效 t3 组共有差异性蛋白平均值 95% 可信区间的图像

Fig. 2 Images of 95% confidence interval of average for common difference proteins in the normal, pejoration-t3 and effective-t3 groups

对正常组、有效组 t3 和恶化组 t3 这 8 个共有差异性蛋白测量两次取均值, 对 19 个人进行聚类分析, 结果(图 3)可将 19 个人分两类[恶化组(eh)和正常组(zc)及有效组(yx)], eh1、eh4、eh5 和 eh3 是一类, 其他为另一类。而 eh1、eh4、eh5 和 eh3 都是恶化组 t3 患者的数据, 其他绝大多数是正常组和有效组 t3 数据。说明这 8 个蛋白质能较好地地区别正常组、有效组和恶化组患者。这 8 个蛋白质可作为

肺癌免疫细胞治疗的生物标志物。

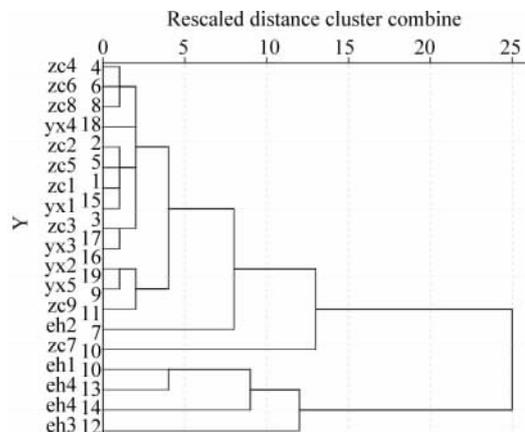


图 3 正常组、恶化 t3 组和有效 t3 组 20 名实验者的聚类分析
Fig. 3 Cluster analysis diagram of 19 individuals in the normal, pejoration-t3 and effective-t3 groups

2.3 建立免疫细胞治疗肺癌的评价模型

取恶化组和有效组 9 个患者这 8 个蛋白质标志物的灰度值, 作为自变量, 以是否有效作为因变量 (1 为有效, 0 为恶化), 建立用这 8 个生物标志物评价肺癌的 Fisher 模型, 利用 MATLAB 编程得到判别函数如下:

$$Y = -0.0412x_1 - 0.0339x_2 - 0.912x_3 + 1.172x_4 + 0.1675x_5 + 2.6683x_6 - 4.5468x_7 + 0.1098x_8$$

其中 x_1 到 x_8 依次分别为 DPPIV、生长激素、IL-4、髓过氧化物酶、骨桥蛋白、RAGE、TNF-α 和 uPAR 蛋白恶化组和有效组第 3 次测量 2 个点灰度值的平

均值。

MATLAB 编程计算得判别函数的临界值为 $y_0 = -4.1355$ 。若 $y < -4.1355$, 判别为有效组; 若 $y > -4.1355$, 则判别为恶化组。将第八个疗程开始检验的有效组患者第 3 次测量的 8 个蛋白灰度值代入 Fisher 判别函数进行检验, 得到该患者的判别函数值 $y = -4.7298 < -4.1355$ 时为有效组, 与实际情况相符。同时将第八个疗程开始检验的恶化组患者第 3 次测量的相应的 8 个蛋白灰度值代入 Fisher 判别函数进行检验, 得到该患者的判别函数值 $y = -3.6785 < -4.1355$ 时为恶化组, 也与情况相符。说明此模型作为肺癌免疫细胞治疗的疗效评价模型是合理的。

3 讨论

肿瘤是在多种因素共同作用下发生、发展, 同时伴随着多基因和多种蛋白质的变化而变化。随着免疫学发展, 肿瘤的免疫治疗已在多种肿瘤中广泛开展, 然而肺癌的免疫治疗临床报道及相关实验仍相对较少^[4]。蛋白质组学理论和技术的发展为我们提供了解决这一难题的可能。蛋白质能直接反映基因包含的信息, 它的功能一旦出现异常就可引发疾病, 任何生理、病理变化都与蛋白质成分和数量的改变密切相关。通过蛋白质组学研究疾病不同分期的蛋白质谱差异, 可以找到影响疾病进程的“特异分子”, 进行药物或其他干预, 尽可能避免或延迟复发转移的发生, 获得较好的临床疗效。这些变异的功能分子可以作为指示肿瘤发生的标志物^[5]。

本研究应用多因子固相抗体芯片法筛选获得 8 种在肺癌患者和正常健康人血清中共存并有区别的蛋白质, 和以往文献对这些蛋白质在肿瘤患者中的表达及作用的报道比较, 有如下发现:

(1) Wesley 等^[6]报道, 正常支气管和肺泡上皮中能够检测到 DPPⅣ 的表达及其活性, 非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中 DPPⅣ 的表达会抑制其细胞增殖, 体外细胞迁移以及裸鼠体内致癌。DPPⅣ 具有抑制肿瘤基因的功能, DPPⅣ 的减少可能会造成对 NSCLC 细胞生长的失控。(2) 作为营养支持治疗的辅助剂生长激素在外科患者围手术期间的治疗中有良好的应用前景。一些研究者^[7]通过体内实验显示生长激素能促进恶性肿瘤细胞的增殖, Whiteside 等^[8]认为生长激素促进分泌素受体反链 (GHSROS), GHSROS 能刺激 NSCLC 细胞迁移, 抑制正常肺源性支气管上皮细胞 BEAS-2B 的细胞迁移, 表明 GHSROS 的功能可能依赖于致癌

环境, 在肺癌细胞中表达并促进肺癌细胞的迁移, 导致在肿瘤产生及转移进展中起调控作用的非编码 RNA 数量增加。(3) Munitz 等^[9]发现嗜酸粒细胞受到嗜酸粒细胞趋化因子配体 CCLⅡ 刺激后, 可通过膜泡运输方式向局部环境快速释放存储的 IL-4, IL-4 可募集粒细胞集中到肿瘤病灶内, 杀伤癌细胞并抑制肿瘤血管生成。Cui 等^[10]研究表明 IL-4 具有抑制 NSCLC 细胞中 COX-2 mRNA 转录, 主要通过抑制 COX-2 来抑制地诺前列酮 (dinoprostone) 即 PGE2 的合成能力。(4) Rossi 等^[11]发现, TNF- α 能显著地促进肿瘤细胞和内皮细胞凋亡, 它在血管生成部位下调可以促进肿瘤转移和瘤内血管生成。Pal 等^[12]认为 IL-4 能抑制 NSCLC 细胞 COX-2 mRNA 的转录, 并主要通过抑制 COX-2 来抑制 PGE2 的合成能力。(5) Li 等^[13]研究表明 uPAR 与多种恶性肿瘤包括肺大细胞癌 (lung large cell cancer, LCLC) 的不良预后密切相关, uPAR 表达可以预测 LCLC 患者的血管生成拟态 (VM) 形成, 用作抑制 LCLC 血管生成和转移的新型治疗靶点。(6) Wang 等^[14]研究表明, 在 NSCLC 患者, 骨桥蛋白与总体生存率 (OS) 和无病生存率 (DFS) 显著相关, 其过度表达往往与 TNM 分期晚期肿瘤 (Ⅲ 和 Ⅳ 期) 相关, 表明骨桥蛋白在估计 NSCLC 生存率中具有显著的预测潜力。(7) Wang 等^[15]研究发现, RAGE 是肺癌患者的差异表达基因之一, 最初发现 NSCLC 和小细胞肺癌患者血清 sRAGE 水平降低。进一步研究表明, 与已切除的 NSCLC 患者的肺癌组织相比, RAGE 的表达在 NSCLC 患者中降低, 而 RAGE 配体 HMGB1 和 S100 蛋白表达均有所增加。血清和组织中的 RAGE 可以作为一种有效且方便的肺癌诊断生物标志物, RAGE 多态性可能有助于肺癌诊断和预后临床评估。(8) Lu 等^[16]研究指出, 髓过氧化物酶蛋白是来自中性粒细胞的一种酶, 可代谢激活多种致癌物质, 在肺癌病因中发挥作用, 其基因功能多态性可能会影响中国人群肺癌的发生。同时研究发现, 髓过氧化物酶的遗传性多态现象是中国人群中肺鳞状细胞癌风险的推动剂。

目前肺癌相关系列报道证实这 8 种蛋白与肺癌的发生和治疗有关, 有可能就是要寻找的血清肺癌生物标记物。综上所述, 在肺癌发生、发展过程中蛋白的表达极其复杂, DPPⅣ、生长激素、IL-4、髓过氧化物酶、骨桥蛋白、RAGE、TNF- α 和 uPAR 在肺癌恶化组、有效组和正常对照组血清的差异表达, 表明它们可能在肺癌的发生、发展过程中发挥重要作用, 为研究肺癌发病机制及寻找肺癌生物标记物奠定一定基

础,对临床个体化用药具有重要指导意义。

[参 考 文 献]

[1] 卡米拉·阿不里米提,仇红刚,马克,等. SELDI 蛋白质芯片筛选差异蛋白分子的二级鉴定[J]. 基础医学与临床,2012, 32 (3):277-282.

[2] 牟雯君. 基于血清多参数联合分析建立肺癌诊断模型和预后评估模型[D]. 天津:南开大学,2014.

[3] 张俊萍,毛光华,史天良,等. DC-CIK 联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌的 I 期临床疗效[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(4): 424-429. DOI: 10. 3872/j. issn. 1007-385X. 2011.04.016.

[4] 田瑞芬,郭素堂,宋霞,等. 应用蛋白芯片技术筛选早中期和晚期肺癌患者血清差异蛋白[J]. 肿瘤研究与临床,2009, 21 (8): 466-468.

[5] 左强,张军一,郑航. 多种肿瘤标志物蛋白芯片检测系统对肺癌的诊断价值[J]. 中国肺癌杂志,2004,7(2):154-157. DOI: 10. 3779/j. issn. 1009-3419. 2004. 02. 18.

[6] WESLEY U V, TIWARI S, HOUGHTON A N. Role for dipeptidyl peptidase IV in tumor suppression of human non small cell lung carcinoma cells[J]. Int J Cancer, 2004, 109(6): 855-866. DOI:10. 1002/ijc. 20091.

[7] MURDOCH C, TAZZYMAN S, WEBSTER S, et al. Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2 [J]. J Immunol, 2007, 178(11): 7405-7411. DOI: 10. 4049/ jimmunol. 178. 11. 7405.

[8] WHITESIDE E J, SEIM I, PAULI J P, et al. Identification of a long non-coding RNA gene, growth hormone secretagogue receptor opposite strand, which stimulates cell migration in non-small cell lung cancer cell lines[J]. Int J Oncol,2013,43(2): 566-574. DOI:10. 3892/ijo. 2013. 1969.

[9] MUNITZ A, LEVI-SCHAFFER F. Eosinophils: ‘new’ roles for ‘old’ cells[J]. Allergy, 2004, 59(3):268-275. DOI: 10. 1111/j. 1398-9995. 2003. 00442.

[10] CUI X, YANG S C, SHARMA S, et al. IL-4 regulates COX-2 and PGE2 production in human non-small cell lung cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343(4): 995-1001. DOI:10. 1016/j. bbrc. 2006. 03. 073.

[11] ROSSI C R, RUSSANO F, MOCELLIN S, et al. TNF-based isolated limb perfusion followed by consolidation biotherapy with systemic low-dose interferon alpha 2b in patients with in-transit melanoma metastases: a pilot trial[J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15(4): 1218-1223. DOI:10. 1245/s10434-007-9791-z.

[12] PAL S, YADAV P, SAINIS K B, et al. TNF- α and IGF-1 differentially modulate ionizing radiation responses of lung cancer cell lines [J/OL]. Cytokine, 2016, 2016: [Epub ahead of print] [2016-12-20]. http://dx. doi. org/10. 1016/j. cyto. 2016. 06. 015. DOI:10. 1016/j. cyto. 2016. 06. 015.

[13] LI Y, SUN B, ZHAO X, et al. Subpopulations of uPAR⁺ contribute to vasculogenic mimicry and metastasis in large cell lung cancer [J]. Exp Mol Pathol, 2015, 98(2):136-144. DOI:10. 1016/j. yexmp. 2015. 02. 001.

[14] WANG Y, YANG J, LIU H, et al. The association between osteopontin and survival in non-small-cell lung cancer patients: a meta-analysis of 13 cohorts[J]. Onco Targets Ther, 2015, 26(8): 3513-3521. DOI:10. 2147/OT. S94082.

[15] WANG H, LI Y, YU W, et al. Expression of the receptor for advanced glycation end products and frequency of polymorphism in lung cancer[J]. Oncol Lett, 2015, 10(1):51-60. DOI: 10. 3892/ol. 2015. 3200.

[16] LU W, XING D, QI J, et al. Genetic polymorphism in myeloperoxidase but not GSTM1 is associated with risk of lung squamous cell carcinoma in a Chinese population[J]. Int J Cancer, 2002, 102 (3): 275-279. DOI:10. 1002/ijc. 10712.

[收稿日期] 2016 - 12 - 21 [修回日期] 2017 - 03 - 16
[本文编辑] 宋关鸿

• 读 者 • 作 者 • 编 者 •

参考文献题名后应标注文献类型和文献载体标识代码

本刊参考文献按照国家标准 GB/T 7714-2015《信息与文献 参考文献著录规则》的要求进行著录。该国家标准要求,每条文献的题名后都应标上[文献类型标识代码]或[文献类型标识代码/文献载体标识代码]。对纸质文献,如为期刊中析出文献,题名后应标上[J];如为专著中析出文献,题名后应标上[M]。对电子资源类文献,如为网络期刊析出文献,题名后须标上[J/OL];如为网络专著中析出文献,题名后须标上[M/OL]。现把常用文献类型标识和电子文献载体标识代码列于表 1 作一介绍。

表 1 文献类型和文献载体标识代码

文献类型	标识代码	文献类型	标识代码	载体类型	标识代码
期 刊	J	报 纸	N	磁 带	MT
专 著	M	专 利	P	磁 盘	DK
汇 编	G	标 准	S	光 盘	CD
会 议 录	C	数 据 库	DB	联 机 网 络	OL
学 位 论 文	D	计 算 机 程 序	CP		
报 告	R	电 子 公 告	EB		